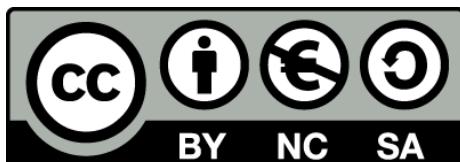




Individualització de les dosis de ganciclovir/valganciclovir per prediccó bayesiana, a partir d'un model farmacocinètic poblacional en pacients transplantats d'òrgan sòlid

Ariadna Padullés Zamora



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència [Reconeixement- NoComercial - Compartirlugal 3.0. Espanya de Creative Commons](#).

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento - NoComercial – Compartirlugal 3.0. España de Creative Commons](#).

This doctoral thesis is licensed under the [Creative Commons Attribution-NonCommercial- ShareAlike 3.0. Spain License](#).

FACULTAT DE FARMÀCIA

**INDIVIDUALITZACIÓ DE LES DOSIS DE
GANCICLOVIR/VALGANCICLOVIR PER PREDICCIÓ
BAYESIANA, A PARTIR D'UN MODEL
FARMACOCINÈTIC POBLACIONAL EN PACIENTS
TRANSPLANTATS D'ÒRGAN SÒLID.**

ARIADNA PADULLÉS ZAMORA
2014

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

**PROGRAMA DE DOCTORAT RECERCA, DESENVOLUPAMENT I
CONTROL DE MEDICAMENTS**

**INDIVIDUALITZACIÓ DE LES DOSIS DE
GANCICLOVIR/VALGANCICLOVIR PER PREDICCIÓ BAYESIANA, A
PARTIR D'UN MODEL FARMACOCINÈTIC POBLACIONAL EN
PACIENTS TRANSPLANTATS D'ÒRGAN SÒLID**

Memòria presentada per Ariadna Padullés Zamora per optar al títol de doctor
per la Universitat de Barcelona

Les Directores de tesi:

Dra. Helena Colom Codina

Dra. Núria Lloberas Blanch

La Tutora de tesi:

Dra. Helena Colom Codina

La doctorand:

Ariadna Padullés Zamora

2014

Les sotasingnats, **Dra. Helena Colom Codina**, Professora titular del Dpt. de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica de la Universitat de Barcelona, Tutora i Director de la present tesi; i **Dra. Núria Lloberas Blanch**, Co-Directora de la present tesi.

FAN CONSTAR

Que la tesi Doctoral titulada: **“INDIVIDUALITZACIÓ DE LES DOSIS DE GANCICLOVIR/VALGANCICLOVIR PER PREDICCIÓ BAYESIANA, A PARTIR D’UN MODEL FARMACOCINÈTIC POBLACIONAL EN PACIENTS TRANSPLANTATS D’ÒRGAN SÒLID”**, realitzada a L’Hospital Universitari de Bellvitge (UB), sota la nostra direcció per la llicenciada **Ariadna Padullés Zamora** per a optar al Grau de Doctora en Farmàcia, és en condicions de ser presentada i sotmesa a l’aprovació del tribunal convocat.

La qual cosa es fa constar per la present i a tots els efectes a Barcelona, 18 de Novembre de 2014.

Dra Helena Colom Codina
Professora titular del Dpt. de
Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica
de la Universitat de Barcelona
Tutora i Directora de la tesi

Dra. Núria Lloberas Blanch
Co-Directora de la tesi

Als meus pares i germana

AGRAÏMENTS

Aquesta tesi no s'hauria pogut dur a terme sense el treball en col·laboració. M'agradaria agraïr a totes aquelles persones que han compartit amb mi la realització d'aquest projecte i que han fet possible que arribés fins aquí:

En primer lloc vull donar les gràcies a les meves directores de tesi, la Núria Lloberas, i l'Helena Colom. Per donar-me l'oportunitat de participar en aquest projecte de recerca, per tots els coneixements transmesos i el suport incondicional. Moltes gràcies pels vostres consells, paciència i dedicació en el meu aprenentatge. Gràcies Núria per la teva capacitat de motivació i superació infinita. I a tu Helena, pel teu rigor científic, és un privilegi poder aprendre de tu.

Al Dr. Josep M Grinyó, ideòleg del projecte, per haver-me donat la possibilitat i confiança per dur a terme aquest projecte. Gràcies per l'esperit crític, però sempre constructiu, i la visió d'anàlisi que han permès el desenvolupament d'aquesta tesi.

Als metges del servei de Nefrologia de l'Hospital de Bellvitge i en especial als responsables de la Unitat de Transplantament Renal. A l'Oriol, l'Eduardo, al Joan i al Josep Maria, per reclutar la gran majoria de pacients transplantats renals i realitzar el seguiment clínic durant l'estudi. Merci per la vostra dedicació i disposició en tot moment.

A la unitat d'assajos del Servei de Nefrologia, Eulàlia, Carol, M Jesús i Meritxell. Per tot el suport logístic en l'organització del seguiment i les extraccions de mostres als pacients. A l'Anna, per la teva ajuda en tot moment i la paciència en la monitorització de l'estudi. També a les infermeres d'hospitalització, que de forma voluntària han extret mostres, per la sobrecàrrega de treball que ha suposat la realització d'aquest estudi.

Al tot el grup del laboratori de Nefrologia, per acollir-me i ajudar-me en tot moment. Són un exemple magnífic de grup d'investigadors. Voldria fer un

especial agraïment a la Gema i la seva alegria, per les bones estones i d'altres de desesperació davant l'UPLC. Al Franc, pel suport analític i a la Inés, per la seva constància, tot el temps invertit en l'anàlisi de les mostres i per la facilitat de treballar conjuntament.

Al Raül, per l'ajuda en la determinació analítica de les concentracions de GCV. Gràcies per respondre en els moments de crisi, sempre ens has ajudat i sense tu no hauríem pogut tirar endavant.

Als companys de la Unitat de Transplantament Hepàtic i Cardíac, per la seva col·laboració. De forma especial a la Núria Sabé que tant bon punt vam iniciar l'estudi va estar disposada a reclutar pacients. Gràcies per l'ajuda incondicional, és un plaer treballar amb tu.

Al Jordi Niubó, del Servei de Microbiologia, per l'anàlisi de les càrregues virals i avisar-me quan hi havia algun resultat positiu. Per la sobrecàrrega de treball que ha suposat la realització d'aquest estudi i la seva col·laboració en l'estudi durant tot aquest temps.

Gràcies a tots aquells que d'una manera o una altra des dels meus inicis han anat aportant-me coneixements i experiència, tant personals com professionals. Als companys i amics del Servei de Farmàcia de l'Hospital de Bellvitge que des de que vaig arribar com a R1 han sigut una font de coneixement en tots els àmbits. Al Ramon, al Pep i a la Maybe, per donar-me la confiança i el suport per dur a terme aquesta tesi. Als amics de residència, amb els que he crescut professional i personalment i amb els que he passat grans moments durant els anys de formació. A la Leti, la meva co-R, amb la que ens vam animar a iniciar el doctorat i vam fer els dos primers anys juntes. A la Núria, la Sara, l'Eli i l'Eugènia, per la seva constant ajuda i col·laboració. I també a tots els residents que s'estan formant, pel suport en el dia a dia. Al personal del Servei de Farmàcia que inconscientment, amb la feina diària em van facilitar fer el seguiment de la medicació dels pacients.

A tots els meus amics i companys, que sense saber-ho m'han ajudat en la realització d'aquest projecte. Gràcies pels moments compartits i per comprendre les absències.

A la meva estimada família, pares i germana, per encoratjar-me i ajudar-me en tots els meus projectes i animar-me a continuar en tot moment. Per transmetre'm la cultura de l'esforç i dedicació (sempre endavant).

Finalment, agrair a tots els pacients transplantats que de forma anònima i voluntària han participat en aquest estudi, sense ells no hauria estat possible la realització d'aquest estudi.

Aquesta tesi està basada en els següents articles.

- I. **Padullés A**, Colom H, Armendariz Y, Cerezo G, Caldés A, Pou L, Torras J, Grinyó JM, Lloberas N. Determination of ganciclovir in human plasma by ultra performance liquid chromatography-UV detection. Clinical Biochemistry 2012;45(4-5):309-14.
- II. Rigo-Bonnin R, **Padullés A**, Corral-Comesaña S, Cerezo G, Grinyó JM, Colom H, Lloberas N, Alía-Ramos P. Measurement of ganciclovir concentration in human plasma by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clin Chim Acta. 2013;427C:58-64.
- III. **Padullés A**, Colom H, Caldés A, Cerezo G, Torras J, Grinyó JM and Lloberas N. Optimal sparse sampling for estimating ganciclovir/valganciclovir AUC in solid organ transplant patients using NONMEN. Ther Drug Monit 2014;36(3):371-7.
- IV. **Padullés A**, Colom H, Bestard O, Melilli E, Sabé N, Rigo E, Niubó J, Torras J, Lladó L, Manito N, Caldés A, Cruzado JM, Grinyó JM and Lloberas N. Contribution of population pharmacokinetics to dose optimization of ganciclovir/ valganciclovir in kidney transplant patients. Manuscrit

INDEX

INDEX	1
ABREVIATURES.....	3
I. INTRODUCCIÓ	7
1. CITOMEGALOVIRUS I TRANSPLANT D'ÒRGAN SÒLID	9
1.1. FACTORS DE RISC.....	9
1.2. EFECTES DEL CITOMEGALOVIRUS	12
1.3. PREVENCIÓ DE LA INFECCIÓ PER CMV	14
1.4. TRACTAMENT DE LA MALALTIA PER CMV.....	17
2. GANCICLOVIR I VALGANCICLOVIR.....	19
2.1. MECANISME D'ACCIÓ I FARMACOCINÈTICA DEL GANCICLOVIR	20
2.2. MONITORITZACIÓ DEL GANCICLOVIR: ESTUDIS D'EFICÀCIA I TOXICITAT CLÍNICA.....	23
2.2.1. DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE GANCICLOVIR.....	26
2.2.2. ESTRATÈGIA DE MOSTREIG LIMITAT AMB GANCICLOVIR	27
3. FARMACOMETRIA	28
3.1 FARMACOCINÈTICA POBLACIONAL	30
3.2. MODELS FARMACOCINÈTICS POBLACIONALS DE GANCICLOVIR	32
4. ESTIMACIÓ DE L'EXPOSICIÓ: INDIVIDUALITZACIÓ DE LA DOSI MITJANÇANT LA UTILITZACIÓ D'UN PREDICTOR BAYESIÀ	35
4.1. CARACTERÍSTIQUES DEL MODEL APLICAT EN LA TESIS	35
4.2. AVALUACIÓ DE L'EXPOSICIÓ	36
II. HIPÒTESI.....	41
III. OBJECTIU.....	47
IV. RESULTATS	53
Capítol 1	55
Capítol 2	63
Capítol 3	73
Capítol 4	83
V. DISCUSSIÓ	125
VI. CONCLUSIONS.....	145
VII. BIBLIOGRAFIA	151

ABREVIATURES

AUC: àrea sota la corba de concentracions plasmàtiques enfront el temps.

Cl: aclariment plasmàtic

Cl_{D1}: aclariment intercompartimental

CLCR: aclariment de creatinina

CMV: citomegalovirus

D: donant

dGTP: trifosfat de desoxiguanosina

EBV: virus Epstein-Barr

F: biodisponibilitat

GCV: ganciclovir

HIV: virus de la immunodeficiència humana

HPLC: cromatografia líquida d'alta eficàcia

IC₅₀: concentració inhibitòria 50

IL6: interleuquina 6

K_A: constant d'absorció

OAT2: transportador d'anions orgànics tipus 2

PD: farmacodinàmia

PEPT1: transportador de pèptids intestinals tipus 1

PEPT2: transportador de pèptids intestinals tipus 2

PCR: reacció en cadena de la polimerasa

PK: farmacocinètica

R: receptor

T_L: temps de latència

Tmax: temps per assolir la concentració plasmàtica màxima

TNF- α : factor de necrosi tumoral alfa

TOS: transplantats d'òrgan sòlid

UHPLC: cromatografia líquida d'ultra alta eficàcia

UV: ultravioleta

ABREVIATURES

V_2 : volum de distribució del compartiment central

V_3 : volum de distribució del compartiment perifèric

VGCV: valganciclovir

VVZ: varicel·la zoster

I. INTRODUCCIÓ

I. INTRODUCCIÓ

1. CITOMEGALOVIRUS I TRANSPLANT D'ÒRGAN SÒLID

La immunosupressió després del trasplantament confereix una especial susceptibilitat a infeccions virals. Epidemiològicament, algunes són resultat de l'exposició a la comunitat (influenza, adenovirus), altres són transmeses amb l'empelt (citomegalovirus [CMV], virus Epstein-Barr [EBV]) i les últimes són conseqüència de la reactivació d'infeccions prèvies (varicel·la, varicel·la zoster [VVZ]). El CMV és el patogen viral més comú després del trasplantament i sense tractament preventiu o profilàctic, al voltant del 75% dels malalts transplantats presenten infecció per aquest agent viral els primers 3 mesos després del trasplantament.

1.1. FACTORS DE RISC

La infecció per CMV segueix essent una de les majors complicacions en receptors de transplantament d'òrgan sòlid (TOS) i es presenta entre el 30-80% dels pacients¹ tot i que la seva incidència i les manifestacions clíiques varien en funció del tipus de transplantament, dels factors de risc de malaltia i de les estratègies de prevenció.

Els principals factors de risc de malaltia per CMV (Taula 1) depenen de la serologia del donant i receptor, del grau d'immunosupressió del receptor, de la càrrega viral i del tipus d'òrgan transplantat. Així doncs, els factors de risc més importants són: a) transplantament de donant seropositiu a receptor seronegatiu (D+/R-), b) immunsupressió amb corticosteroides i immunoglobulines antitimocítiques utilitzades durant el tractament d'inducció o el rebuig i c) trasplantament d'intestí, pàncrees i pulmó.

La serologia del donant i del receptor (IgG) són els predictors clau del risc d'infecció. El principal factor de risc, per desenvolupar una malaltia per CMV en el post-transplantament és la combinació d'un receptor naïve per CMV que rep l'empelt d'un donant seropositiu per a CMV (D+/R-) essent el risc del 45% en absència de quimioprofilaxi. El CMV roman latent en monòcits i macròfags presents en diferents òrgans de l'anatomia i donat, que en el moment del trasplantament, el receptor no presenta immunitat específica, aquest desenvolupa una infecció primària. En el cas de que tant el donant com el receptor siguin seropositius (D+/R+), el risc de malaltia sense rebre profilaxis és moderat (15-20%). Aquesta es pot presentar com a reactivació o com a infecció transmesa pel donant. Pel que fa a la situació en que el donant és seronegatiu i el receptor seropositiu (D-/R+), el risc també és moderat i la infecció es produeix per reactivació viral. El cas de risc més baix, gairebé nul, és quan tant el donant com el receptor són seronegatius (D-/R-)².

Altres factors pel desenvolupament de la malaltia per CMV són el grau d'immunosupressió rebuda, especialment l'administració de teràpia d'inducció i pel tractament del rebuig ja que condicionarà la capacitat de resposta immune efectiva enfront al virus. La teràpia d'inducció té l'objectiu d'evitar el rebuig i els fàrmacs administrats actuen disminuint la proporció de precursores de cèl·lules T. La timoglobulina incrementa el risc de malaltia per CMV d'un 15.7% al 28.3%³. Per contra, les dades sobre el risc amb la teràpia amb basiliximab són controvertides i probablement l'increment de risc és escàs. En quan a la immunosupressió de manteniment, la majoria dels estudis assumeixen que el seu efecte és nul. La ciclosporina i el tacrolimus no solen donar lloc a una reactivació del CMV latent però si que poden accelerar la taxa de replicació⁴. Els inhibidors de la mTOR s'associen amb una disminució de la incidència de la malaltia per CMV que es pot atribuir al bloqueig de certes quinases responsables

de la síntesi proteica cel·lular, fet que podria impedir la síntesi de components dels virions de CMV^{5,6}.

La incidència de malaltia és més freqüent en el trasplantament d'intestí, pàncrees i pulmó que en l'hepàtic, cardíac i renal degut a que en l'intestí i pàncrees hi ha abundant teixit limfoide o macròfags amb una càrrega elevada de CMV latent o en replicació^{7,8}. També s'han descrit com a factors de risc les coinfeccions amb altres herpesvirus i el rebuig de l'empelt. Durant el rebuig es secreteen citoquines com el TNF-α i interleuquina 6 (IL6) que actuen induint la replicació de CMV i el pas des de l'estat de latència a la fase replicativa⁹.

Taula 1. Factors de risc d'infecció per CMV en pacients TOS.

Infecció primària en receptors seronegatius (D+/R-)

Factors que afavoreixen la progressió de la malaltia

- Immunosupressors
 - ✓ Immunoglobulines antitimocítiques
 - ✓ Micofenolat
 - ✓ Metilprednisolona
- Factors virals
 - ✓ Càrrega viral
 - ✓ Virus Herpes 6 (HHV6)
 - ✓ Virus Herpes 7 (HHV7)
- Factors immunològics
 - ✓ Mutacions en els gens de TLR2 i TLR4
 - ✓ Deficiència en MBL o genotip associat a la baixa producció

Factors que afavoreixen la reactivació de CMV en els receptors

-
- Estrès
 - Cirurgia
 - Hiponatrèmia intraoperatorària
 - Sepsis o Infeccions bacterianes greus (pneumococ o bactèries gram-negatives)
 - Còinfecció per altres virus
 - Virus Herpes 6 (HHV6)
 - Virus Herpes 7 (HHV7)
-

Factors que disminueixen la malaltia per CMV

- Immunitat del pacient enfront CMV abans del trasplantament
 - Immunosupressors: inhibidors de mTOR (sirolimus i everolimus)
 - Profilaxi antiviral
 - Tractament antiviral preventiu o anticipat
-

1.2. EFECTES DEL CITOMEGALOVIRUS

La incidència de la infecció per CMV en receptors TOS és del 30-80% i les manifestacions clíniques poden anar des de virèmia asimptomàtica fins a malaltia teixit invasiva. El període de màxim risc d'infecció està entre el primer i el sisè mes post-transplantament i la màxima incidència es troba entre el segon i tercer mes.

La infecció primària succeeix quan es detecta CMV en un individu que prèviament era seronegatiu mentre que la recurrència de la infecció és el resultat de la reactivació del virus latent (endògena) o de la reinfecció (exògena). En la infecció primària, la manca d'immunitat específica del receptor conduceix a una replicació viral augmentada normalment associada al desenvolupament de malaltia per CMV. En el cas de les reactivacions, la immunitat humoral i cel·lular del receptor redueix el procés replicatiu donant lloc a una menor incidència i

severitat de la malaltia, que només es desenvolupa entre el 10 i 20% dels pacients.

Globalment, la infecció per CMV és una de les principals causes de morbi-mortalitat, secundàries tant a la malaltia invasiva per CMV amb dany tissular i cel·lular (efectes directes), com als efectes moduladors de CMV sobre el sistema immune, que són independents de la càrrega viral (efectes indirectes) (Taula 2)^{10,11}. Els efectes directes deriven de la infecció per CMV i es pot manifestar com a virèmia asimptomàtica o com a malaltia per CMV. Aquesta última es considera quan un pacient presenta infecció amb signes i símptomes associats. Aquests símptomes poden presentar-se com un síndrome viral amb febre, leucopènia, trombocitopènia i augment de les transaminases o bé com a malaltia invasiva amb pneumonitis, enteritis, meningitis, nefritis, retinitis, cistitis, miocarditis, pancreatitis o encefalitis.

Els efectes indirectes estan causats per la resposta inflamatòria amb producció i alliberament de citoquines o per les alteracions en la resposta immune i resposta inflamatòria de l'hoste. La replicació viral del CMV produeix una situació d'immunosupressió com a conseqüència de les alteracions funcionals en els limfòcits i monòcits, modificant la capacitat de resposta i la producció de citoquines. A més, la infecció viral pot alterar l'expressió d'antígens de superfície provocant rebuig i/o causant la desregulació de la proliferació cel·lular. Aquests efectes indirectes s'han descrit en tots els tipus de TOS i inclouen rebuig agut i crònic (coneugut com nefropatia del ronyó en transplantament renal, vasculopatia de l'empelt en el transplantament cardíac i bronquilitis obliterant en el transplantament pulmonar), arteriosclerosi, diabetis mellitus post-transplantament, associació de CMV amb altres infeccions (bacterianes o fúngiques) i malaltia cardiovascular. La infecció per CMV també s'ha associat a l'activació d'altres herpes virus com a herpes simple, VVZ, EBV (associat amb els

síndromes limfoproliferatius associats al transplantament) o herpes virus humans (HHV-6, -7, -8).

Taula 2. Efectes directes i indirectes de la infecció per CMV

Efectes directes de la infecció per CMV	Efectes indirectes de la infecció per CMV
Febre i neutropènia (leucopènia, trombocitopènia, hepatitis, nefritis, fatiga, miàlgia, febre,)	Augment del risc d'infecció secundària bacteriana, fúngica o viral Augment del risc de rebuig
Mielosupressió	Augment del risc de desordre
Neumonia	limfoproliferatiu post-
Malaltia enteroinvasiva amb colitis, transplantament gastritis, úlcera sagnat o perforació.	Augment del risc d'infecció per HHV-
Hepatitis	6 i 7
Pancreatitis	Diabetis mellitus
Corioretinititis	Events cardiovasculars

1.3. PREVENCIÓ DE LA INFECCIÓ PER CMV

Les dos principals estratègies per la prevenció de la malaltia per CMV són la profilaxi universal i el tractament preventiu. Les dues estratègies presenten avantatges i inconvenients (*Taula 3*). La profilaxi implica l'administració de valganciclovir (VGCV) oral o ganciclovir (GCV) intravenós (iv) entre 3 i 6 mesos a tots els pacients o aquells considerats de risc i s'inicia en el post-transplantament

immediat. La teràpia anticipada o preventiva (preemptive therapy) consisteix en la monitorització setmanal de la càrrega viral i en l'inici de VGCV oral o GCV iv en cas de detecció de replicació viral. La primera preveu la reactivació d'altres herpesvirus així com els efectes indirectes, però per contra l'exposició perllongada als antivirals pot incrementar el risc de resistència i toxicitat i s'ha relacionat amb malaltia tardana per CMV. La teràpia preventiva pot contribuir a reduir el cost i toxicitat associada a la medicació antiviral però no preveu els efectes indirectes de CMV i la seva aplicació depèn de la logística de cada un dels centres. La taula 3 presenta de forma comparativa els efectes beneficiosos y les limitacions de la profilaxis universal vs el tractament preventiu¹².

Taula 3. Comparació del efectes beneficiosos i les limitacions de la profilaxis vs la teràpia preventiva

Efecte	Profilaxis	Preventiu
Malaltia per CMV	+++	+++
Malaltia tardana per CMV	++	-
Recidiva/Fracàs del tractament	++	++
Menys infeccions oportunistes	+++	+
Millor supervivència de l'empelt	++	-
Prevenció del rebuig	++	-
Supervivència	++	-
Altres virus	+	-
Limfoma post-transplantament	+	-
Sarcoma de Kaposi	+	-

Seguretat	++	+++
Logística	+++	+
Menor cost de fàrmacs	+	+++
Menor cost de monitorització	+++	+
Resistència a CMV	++	+

Facilitat d'aplicar i força de l'evidència essent +++ la de major evidència i - quan no hi ha evidència

Les recomanacions generals segons les guies de consens són les següents¹²:

- En pacients D+/R- la profilaxi universal i teràpia preventiva són aplicables malgrat la profilaxi universal està més recomanada i podria tenir certs avantatges. La duració de la profilaxi ha de ser de 3 a 6 mesos i degut a l'elevat risc de malaltia tardana es recomana la teràpia preventiva durant els 3-6 mesos després de la finalització de la profilaxi. La incidència d'infecció per CMV en pacients D+/R- sense tractament és del 50%¹³.
- En pacients R+ (amb D+ o D-) es recomana la teràpia preventiva excepte en aquells pacients d'elevat risc. Així doncs, en els pacients que reben transplantament de pulmó o intestí o que hagin rebut inducció amb immunoglobulina antitimocítica es recomana profilaxis durant 3 mesos.
- Els pacients D-/R- es consideren de baix risc i no es recomana la profilaxi.

El fàrmac d'elecció per a la profilaxi és el VGCV oral a les dosis de 900 mg cada 24h. Tal com s'indica a la Taula 4, aquestes dosis s'han d'ajustar d'acord a la funció renal del pacient utilitzant la fórmula de Cockcroft-Gault de manera que l'ús d'altres fórmules pot implicar una infradosificació^{14,15}. Existeix un estudi que

demostra que l'ús de la fórmula "modification of diet in renal disease" MDRD pel càcul del filtrat glomerular comporta una infraestimació del 20% en el 63.6% de la cohort estudiada i que potencialment resultaria en una infradosificació de VGCV en el 45.5% dels pacients¹⁶. Aquest fet és un factor de risc, que s'ha de sumar als prèviament descrits, per desenvolupar malaltia per CMV i ja s'han descrit alguns casos en la literatura¹⁷.

1.4. TRACTAMENT DE LA MALALTIA PER CMV

Les guies de consens publicades indiquen com a tractament d'elecció pel CMV el VGCV oral o GCV iv^{1,12}. Durant el tractament cal monitoritzar la funció renal i ajustar les dosis de fàrmac utilitzant la fórmula de Cockcroft-Gault com es mostra a les Taules 4 i 5. Una dosificació insuficient pot comportar una manca d'eficàcia clínica i el desenvolupament de resistències^{18,19}, mentre que dosis supraterapèutiques poden implicar increments de la toxicitat²⁰.

Taula 4. Ajust posològic de VGCV segons la funció renal

CL creatinina (mL/min)	Dosi profilaxi	Dosi Infecció
≥ 60	900 mg/24h	900 mg /12h
40-59	450 mg/24h	450 mg/12h
25-39	450 mg/48h	450 mg/24h
10-24	450 mg, 2 cops per setmana	450 mg/48h

Taula 5. Ajust posològic de GCV segons la funció renal

CL creatinina (mL/min)	Dosi
>50	5 mg/kg/12h
25-50	2,5 mg/kg/12h
10-25	2,5 mg/kg/24h

La reducció de les dosis de VGCV o GCV per efectes secundaris com leucopènia s'ha d'evitar sempre que sigui possible i abans de procedir a disminuir les dosis es recomana reduir les dosis d'altres fàrmacs mielotòxics com són el micofenolat de mofetil, els inhibidors de mTOR (sirolimus i everolimus) i/o cotrimoxazol. En cas de leucopènies severes, amb recompte absolut de neutròfils inferior a 1000 μL^{-1} , caldria considerar l'ús de factors estimulants de granulòcits.

La duració òptima del tractament depèn de la resposta clínica i virològica. La quantificació de la càrrega viral mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) s'ha de determinar setmanalment per tal de monitoritzar la resposta al tractament i el desenvolupament de resistències a GCV. Es recomana mantenir el tractament durant mínim dues setmanes i fins que la càrrega viral sigui negativa, essent necessari obtenir dos resultats negatius separats una setmana per assegurar l'aclariment viral^{21,22,23}. En alguns casos, un cop finalitzat el tractament, es duu a terme una profilaxi secundària amb VGCV oral durant dos o tres mesos en funció dels factors de risc de presentar recurrència (infecció primària, càrrega viral basal elevada, persistència de virèmia a l'inici de la profilaxi secundària, afectació multiorgànica i increment de la immunosupressió degut a la teràpia pel rebuig)^{24,21}.

L'aparició de resistències al tractament s'han descrit principalment en la subpoblació de pacients D+/R- en la qual, la incidència després de la virèmia és del 5-12% i és superior en els pacients receptors de transplantament de pulmó^{25,26,27}. Les resistències estan relacionades amb mutacions en el gen UL97 i UL54. Les presentacions clíniques inclouen des de casos asimptomàtics fins a infeccions severes. Els factors de risc descrits són: exposició perllongada a fàrmacs antivirals i replicació viral activa, elevada immunosupressió o exposició inadequada a l'antiviral²⁸. Durant la profilaxis la incidència de resistència és baixa, essent del 0 al 3%²⁹.

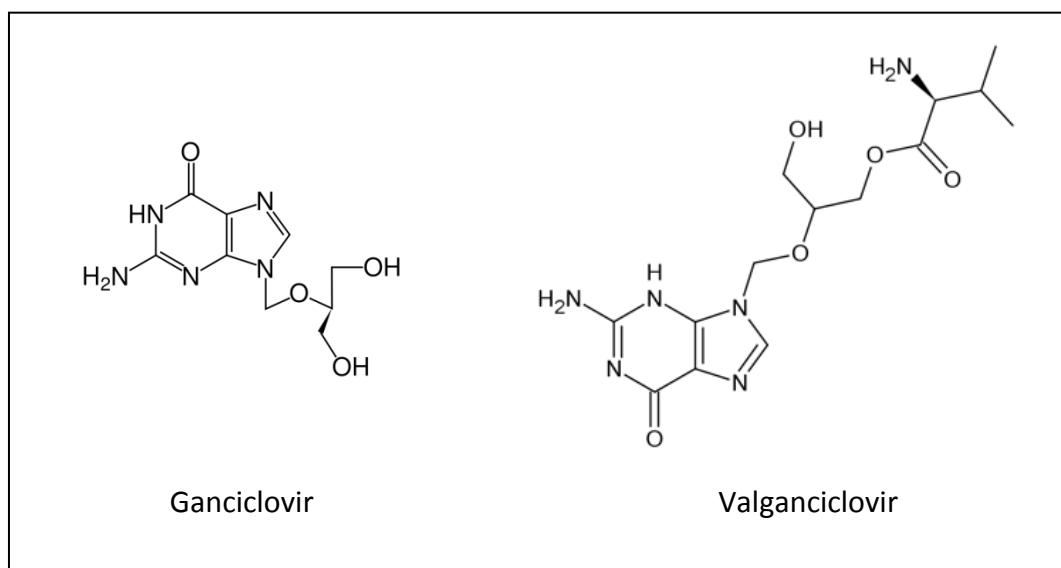
2. GANCICLOVIR I VALGANCICLOVIR

El GCV és un anàleg del nucleòsid acíclic de la guanina (*Figura 1*) considerat com a primera línia pel tractament i profilaxi enfront a infeccions per CMV en pacients immunodeprimits i l'estàndard per la prevenció i tractament de CMV en pacients TOS³⁰. L'administració de GCV oral té una baixa biodisponibilitat i com a conseqüència és necessària l'administració iv i l'hospitalització del pacient i està associat a un elevat cost, augmentant de la incidència d'infeccions de catèter i molèsties pel pacient.

Aquests motius van portar a la necessitat de desenvolupar el VGCV, un profàrmac del GCV. El VGCV és l'1-valil èster del GCV (*Figura 1*) i és substrat dels transportadors de pèptids intestinals^{31,32} la qual cosa fa que presenti una biodisponibilitat superior a la del GCV oral. En el tractament profilàctic, els resultat dels estudis d'equivalència de Wiltshire H i col³³ van mostrar que després de l'administració de VGCV oral s'assoleixen exposicions a GCV superiors a les obtingudes després de l'administració de GCV oral i s'associen a una superioritat en l'eficàcia al tractament³⁴. Pel que fa al tractament de la malaltia per CMV, en l'estudi VICTOR²⁴ es va demostrar la no inferioritat en l'eficàcia de

VGCV oral (900 mg/24h) vs GCV iv (5 mg/Kg/12h) en pacients TOS. El perfil de seguretat va ser similar en els dos grups.

Figura 1. Estructura química

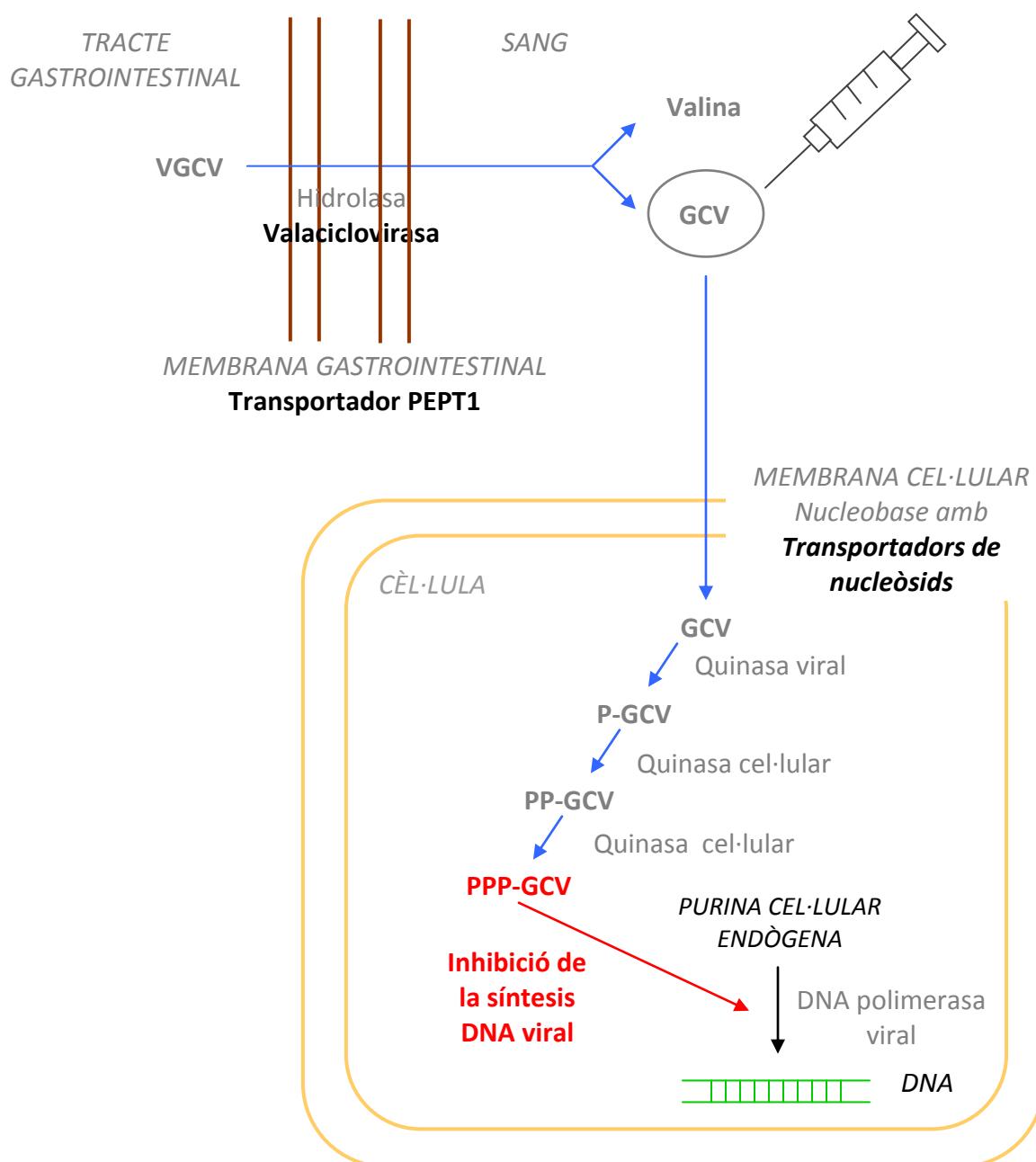


2.1. MECANISME D'ACCIÓ I FARMACOCINÈTICA DEL GANCICLOVIR

El GCV és un anàleg del nucleòsid acíclic de la guanina que actua inhibint la replicació viral. Competeix amb el trifosfat de desoxiguanosina (dGTP), substrat de la DNA polimerasa²⁰ que és responsable de la síntesis del DNA viral. Per això, el GCV requereix una activació prèvia en forma de fosforilacions. La *Figura 2* mostra les etapes d'activació del fàrmac. El GCV entra en les cèl.lules infectades mitjançant transportadors de nucleòsids i una vegada dins és fosforilat a GCV monofosfat (etapa limitant) per una proteïna codificada per la UL97. A continuació és fosforilat a GCV di i tri-fosfat a través de l'acció de quinases cel·lulars humanes. El GCV trifosfat és el responsable de la inhibició de la replicació viral. D'altra banda, tal com es descriu en la següent figura, després de l'administració oral de VGCV, aquest es transforma en GCV i és aquest últim el que actua inhibint la replicació viral (*Figura 2*).

Figura 2. Esquema representatiu de les etapes de trànsit i bioactivació del GCV i VGCV a l'organisme després de les respectives administracions IV i oral i del mecanisme d'acció una vegada accedeixen a les cèl·lules infectades.

dGP=desoxiguanina trifosfat; GCV=ganciclovir; PEPT1=transportadors de pèptids intestinals; P-GCV=GCV monofosfat; PP-GCV=GCV bifosfat; PPP-GCV=GCV trifosfat; VGCV=valganciclovir.



El GCV presenta una potent activitat antiviral enfront CMV. Malgrat té un mecanisme d'acció similar a l'aciclovir, és 26 vegades més potent enfront al CMV en base a la concentració necessària per assolir la inhibició del 50% de la càrrega viral (IC_{50}). Les concentracions intracel·lulars de GCV trifosfat en cèl·lules infectades són aproximadament 10 vegades superiors a les existents en cèl·lules no infectades. La replicació viral és inhibida *in vitro* (IC_{50}) a concentracions entre 0.1 i 1.6 mg/L^{35,36}.

El comportament farmacocinètic (PK) del GCV s'ha caracteritzat en diferents poblacions (voluntaris sans, pacients de SIDA i pacients transplantats)^{37,38,39}, i els primers estudis es van dur a terme en voluntaris sans o pacients HIV³⁷. El GCV administrat per via iv presenta un perfil de disposició biexponencial, amb una fase inicial que reflexa una distribució relativament ràpida a teixits, i una fase de disposició terminal més lenta que reflexa la seva cinètica d'eliminació. La majoria d'estudis PK que utilitzen l'aproximació compartmental han descrit el perfil PK del GCV amb un model de dos compartiments³⁷.

La seva eliminació és principalment per excreció renal de forma inalterada (87%), per filtració glomerular i secreció tubular activa mitjançant els transportadors d'anions orgànic tipus 2 (OAT2)⁴⁰. Per aquest motiu l'aclariment de GCV es correlaciona directament amb la funció renal determinada pels valors de l'aclariment de creatinina (CLCR). Aquest fet obliga a l'ajust de dosi per la funció renal. La seva unió a proteïnes plasmàtiques és baixa (1-2%) dins d'un marge de concentracions de 0-5-51 mg/L²⁰. La relació entre concentracions en eritròcits i plasma és molt propera a 1 (0.8) i l'equilibri de distribució entre concentracions plasmàtiques i dins de l'eritròcit s'assoleix ràpidament⁴¹. En un dels primers estudis PK realitzats en 4 pacients receptors de transplantament renal³⁸, els valors de semivida associats a la fase de disposició inicial ràpida (fase alfa) van ser de 0.29-0.47 h, la semivida associada a la fase de disposició lenta (fase beta)

o eliminació va ser de 4.29 a 10.3 h, el volum de distribució en compartiment central va presentar valors de 0.22 a 0.29 L/kg, el volum de distribució en estat estacionari va ser de 0.63 a 0.82 L/kg i els valors de l'aclariment plasmàtic de 0.04-0.13 L/h/kg.

El GCV administrat per via oral presenta una biodisponibilitat baixa, d'aproximadament el 5.6%, fet que limita l'exposició sistèmica. Per obtenir una exposició del 40-50% de l'obtinguda via iv a dosis de 5 mg/Kg/24h és necessària l'administració de 1g/8h de GCV oral^{42,43}. A diferència del GCV, el VGCV presenta una biodisponibilitat 10 vegades superior al GCV (66%±10%) degut al reconeixement com a substrat dels transportadors de pèptids intestinals (PEPT1 i PEPT2). Quan s'absorbeix és ràpidament hidrolitzat a GCV per acció d'una hidrolasa d'èsters d'aminoàcids (valaciclovirasa)^{44,45} present tant a la paret intestinal com al fetge, de forma que VGCV no es troba com a tal en circulació sistèmica^{46,47}. El GCV entra a la cèl·lula a través del transportador de nucleòsids.

La cinètica d'absorció/transformació del VGCV ha estat descrita com d'ordre ú en la majoria d'estudis^{33,48}. La presència d'una dieta rica en greixos afavoreix l'augment de la biodisponibilitat del GCV en comparació amb l'administració en dejú sense que s'observi un increment significatiu del temps per assolir la concentració plasmàtica màxima (tmax)⁴⁹.

2.2. MONITORITZACIÓ DEL GANCICLOVIR: ESTUDIS D'EFICÀCIA I TOXICITAT CLÍNICA

S'han dut a terme diferents estudis farmacocinètics-farmacodinàmics (PK/PD) clínics en la població de transplantats amb l'objectiu d'investigar la relació de l'exposició sistèmica a GCV i la prevenció de la virèmia, malaltia per CMV i l'aparició d'efectes adversos. En el primer estudi publicat⁵⁰ es va avaluar

l'eficàcia en la prevenció de la malaltia per CMV de 900 mg/24h de VGCV oral vs 1000 mg/8h de GCV oral en pacients TOS d'alt risc immunològic (D+/R-) (N=364). Els resultats van mostrar que l'eficàcia era similar entre els dos grups de tractament amb un perfil de seguretat comparable. També van observar que els valors d'AUC després de l'administració de VGCV oral eren superiors als obtinguts després de l'administració de GCV oral i els autors ho van relacionar amb la millor supressió de la virèmia i el retard en les primoinfeccions en comparació amb el grup GCV oral. Els efectes adversos reportats van ser hematològics, principalment leucopènia i neutropènia seguit de plaquetopènia i anèmia.

Amb aquestes mateixes dades, Wiltshire H i col³⁴ van realitzar un estudi PD per relacionar les exposicions obtingudes amb l'eficàcia i toxicitat. Van demostrar que la supressió de la virèmia durant el tractament profilàctic estava relacionat amb l'exposició a GCV estimat a través l'àrea sota la corba de les concentracions plasmàtiques enfront del temps (AUC). D'acord amb aquests autors, valors d'AUC de 40-50 µg·h/mL permeten la supressió de la virèmia durant el tractament profilàctic i redueixen la incidència del desenvolupament de la mateixa un mes després de finalitzar el tractament a valors d'un 20% i 10% per a valors d'AUC de 33 i 50 µg·h/mL, respectivament. En l'estudi sobre la mielotoxicitat es va observar una tendència a una menor incidència d'anèmia però major incidència de leucopènia i neutropènia en els pacients tractats amb VGCV oral. La correlació entre l'exposició i l'aparició d'efectes adversos va mostrar que només hi havia una dèbil tendència a augmentar la neutropènia i leucopènia amb l'increment de l'exposició a GCV.

Posteriorment, en l'estudi VICTOR²⁴ es va estudiar l'eficàcia del tractament de la malaltia per CMV amb 900 mg/12h de VGCV oral vs 5 mg/Kg/12h de GCV iv durant 21 dies seguit de tractament amb VGCV oral fins al dia 49 en tots els

pacients TOS (N=321). Es va demostrar la no inferioritat de VGCV oral però no es va relacionar amb dades d'exposició al fàrmac. El temps mig d'eradicació va ser de 21 dies pel grup VGCV oral vs 19 dies pel grup GCV iv i les discontinuacions de tractament van ser similars en les dos branques de tractament. La incidència d'efectes adversos va ser similar i els principalment reportats en els dos grups van ser anèmia, leucopènia, infecció del tracte urinari i diarrea.

En l'estudi de seguiment dels pacients inclosos en l'estudi VICTOR es van avaluar els resultats del tractament a l'any i s'inclouen les variables de recurrència, resistència a GCV i supervivència. Els resultats van mostrar que les taxes de recurrència (15.1%) eren independents del tractament inicial i que el factor predictor de recurrència en l'anàlisi multivariant era la persistència de la virèmia al dia 21 d'inici del tractament de la malaltia per CMV. Pel que fa a l'aparició de resistències i a l'anàlisi de supervivència, no hi van haver diferències en les dos branques de tractament.

Les guies de consens sobre la prevenció i tractament de CMV remarquen la necessitat de la dosificació adequada per evitar la ineficàcia i l'aparició de toxicitat¹². Malgrat això, no indiquen la necessitat de la monitorització dels nivells de GCV en plasma, per a la posterior optimització de dosis en cas d'infra o sobreexposició, en base als estudi PD que defineixen com a diana terapèutica un AUC=40-50 µg·h/mL. Tot i així, existeixen a la literatura autors que remarquen la necessitat de monitoritzar els nivells principalment en aquells pacients amb infeccions per CMV greus⁵¹.

Existeixen casos en que s'han monitoritzat les concentracions predosi de GCV però no hi ha cap estudi que demostri la correlació entre la predosi i l'exposició. Caldés A i col⁵² van demostrar la necessitat d'ajust de dosi en base als nivells plasmàtics de GCV per poder assolir l'AUC diana i segons la funció renal. En la

població de pacients pediàtrics també s'han analitzat les exposicions assolides en base a diferents algoritmes de dosificació inicial i alguns autors conclouen la necessitat de la monitorització PK degut a l'elevada variabilitat observada⁵³.

2.2.1. DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE GANCICLOVIR

Tot i que GCV sigui un fàrmac no inclòs en la rutina de monitorització PK per ajust de dosis segons ens nivells plasmàtics, existeixen a la literatura diversos mètodes per a la determinació analítica de GCV.

S'han publicat diversos mètodes cromatogràfics emprant la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) acoblada a diferents detectors per a la detecció de GCV el plasma, sèrum i altres fluids biològics^{54,55,56,57,58,59,60,61}. Alguns dels inconvenients d'aquests mètodes es podrien resumir en: temps llargs de preparació de les mostres, necessitat d'utilitzar tècniques d'extracció per aconseguir límits de quantificació més baixos, requeriment d'un volum de mostra de plasma gran (250-1000 µL), procés d'anàlisi de llarga duració, límit de quantificació elevat o relativa baixa sensibilitat.

Per superar tots aquests els inconvenients calen noves tècniques analítiques validades per a la quantificació amb precisió i exactitud de GCV en plasma de forma rutinària. En la pràctica clínica rutinària és fonamental disposar de tècniques que no suposin un gran consum de temps, que requereixi poc volum de mostra, que siguin suficientment sensibles i en definitiva que no representin costos molt elevats.

2.2.2. ESTRATÈGIA DE MOSTREIG LIMITAT AMB GANCICLOVIR

La determinació de l'AUC o de qualsevol altre paràmetre PK per un determinat pacient requereix l'extracció intensiva de mostres, és a dir, el número suficient per poder descriure correctament totes les fases de la corba (absorció, disposició ràpida i disposició lenta) i estimar els paràmetres amb fiabilitat i robustesa. No obstant, el mostreig intensiu (8-10 mostres per pacient) no és aplicable en la rutina clínica habitual ja sigui per motius ètics, de temps i econòmics i donat que això implicaria l'hospitalització del pacient.

Una aproximació molt utilitzada per evitar el mostreig intensiu són les estratègies de mostreig limitat basades en predir el valor de l'AUC amb la màxima robustesa possible a partir de poques mostres obtingudes de cada pacient. No hi ha una norma establerta sobre el número de mostres òptim perquè això depèn fonamentalment de la cinètica dels processos d'absorció i de disposició de cada fàrmac i de l'objectiu concret de l'estudi que es vol dissenyar. Per garantir la màxima qualitat de vida pel pacient la situació ideal seria entre una i tres mostres per pacient. A més, és convenient que les mostres s'extreguin durant les 8 hores posteriors a l'administració del fàrmac per evitar l'hospitalització i reduir costos. Un altre factor que pot condicionar els temps de mostreig a escollir és la sensibilitat de la metòdica analítica de que es disposa, donat que les concentracions als temps seleccionats han de ser superiors al límit inferior de quantificació de la tècnica analítica.

A la literatura existeixen nombrosos articles referents a mètodes per establir estratègies de mostreig limitat amb diferents fàrmacs^{62,63}. Clàssicament s'utilitzaven tècniques de regressió lineal combinades amb càlcul d'AUCs mitjançant l'anàlisi no compartmental⁶⁴. Actualment, el desenvolupament de l'aproximació d'anàlisi PK poblacional mitjançant els models d'efectes mixtes no

lineals, combinat amb la predicción bayesiana ha marcado un cambio en la metodología empleada dando muy buenos resultados⁶⁵. En este sentido también es necesario destacar la existencia de algoritmos que, a partir de un modelo poblacional previamente desarrollado, permiten estimar los tiempos óptimos de obtención de muestra dentro de un diseño de estrategia limitada para predecir el valor d'AUC con la máxima exactitud respecto al valor calculado a partir de un muestreo intensivo mediante la matriz de información de Fisher (PFIM)^{66,67,68,69}. El inconveniente de estos métodos es que, en ocasiones, los tiempos óptimos desde el punto de vista matemático no son compatibles con la práctica clínica.

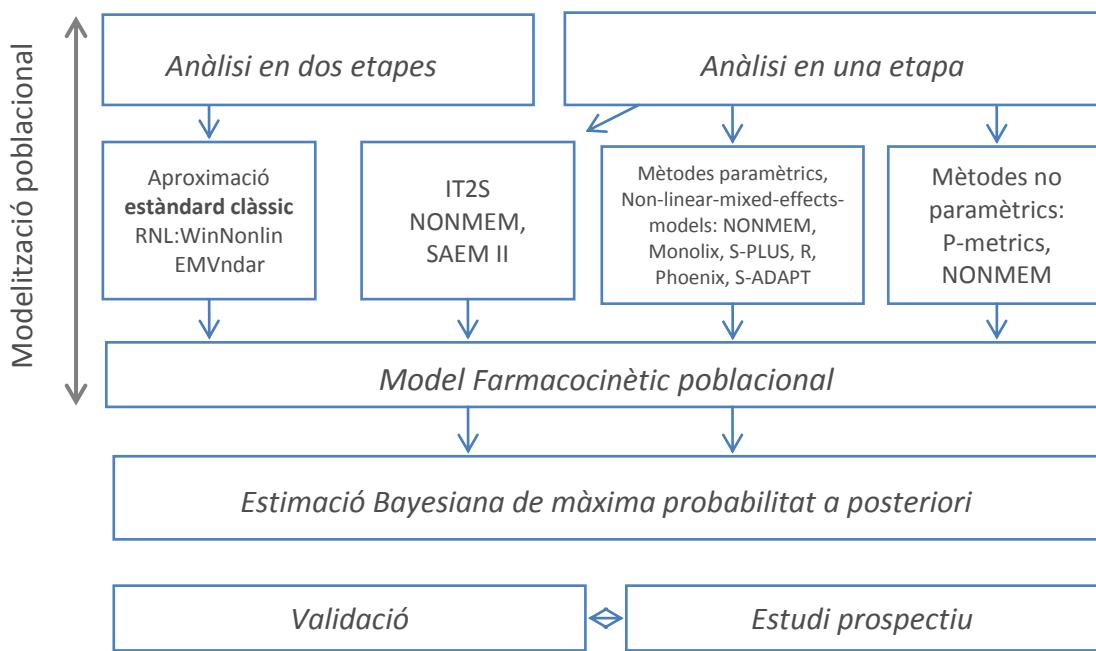
En el caso de GCV, Wiltshire H y cols^{33,50} ya emplearon una estrategia de muestreo limitado para desarrollar el modelo PK y PD de GCV utilizando tres ventanas de muestreo por visita: 1-3 h, 5-12 h y aproximadamente 24 h postdosis. Posteriormente, Perrottet N y cols desarrollaron un modelo PK poblacional utilizando datos de concentración de GCV extreños a la predosis y a las 3h postdosis⁴⁸ y los siguientes estudios PK/PD también utilizaron dos tiempos de muestreo siendo uno de ellos la predosis^{70,71}. Todo esto, la selección de los puntos de muestreo no se basa en una estrategia previamente diseñada e evaluada.

3. FARMACOMETRIA

Al llarg del temps s'han emprat diverses metodologies d'anàlisi de dades en estudis PK/PD. Actualment i des de fa algun temps s'ha introduït el terme de Farmacometria que es defineix com la ciència de desenvolupar i aplicar mètodes estadístics i matemàtics per caracteritzar, comprendre i predir la PK, la PD i el comportament dels biomarcadors d'un determinat fàrmac⁷². Les aproximacions més utilitzades en l'anàlisi de dades procedents d'estudis PK són l'aproximació no compartmental, l'aproximació compartmental clàssica i l'aproximació poblacional. La principal utilitat de l'anàlisi PK en la pràctica rutinària és com a

eina de suport en la individualització de la dosi durant la monitorització terapèutica.

Figura 3. Eines d'anàlisi PK per la individualització de la dosis.



Tal com indica la figura 3, la individualització de la dosi requereix, en una primera etapa, la caracterització des d'un punt de vista PK del fàrmac en la població diana a la que va destinat. Això es pot dur a terme amb mètodes de dos etapes o bé amb mètodes d'una sola etapa. En els mètodes en dos etapes primer s'estimen els valors individuals dels paràmetres per mètodes no compartmentals o compartmentals i en una segona etapa es fa una estadística descriptiva que proporciona els valors de tendència central o poblacionals dels paràmetres i la variabilitat associada (desviació estàndard). A més, mitjançant tècniques d'estadística multivariant es busquen possibles correlacions entre covariables i els paràmetres PK. Aquests mètodes presenten els següents inconvenients i) requereixen molta informació o punts experimentals per pacient, ii) s'obtenen

valors sobreestimats de la variabilitat associada als paràmetres PK estimats i iii) els valors dels paràmetres estimats s'han d'implementar en un programa de prediccó Bayesiana a posteriori per poder utilitzar aquesta informació en l'ajust de dosi. Malgrat aquests mètodes es van utilitzar en el passat ara han quedat obsolets.

Per contra, els mètodes d'una sola etapa són pròpiament els que es consideren poblacionals d'acord amb el que es descriu en el següent apartat.

3.1 FARMACOCINÈTICA POBLACIONAL

La PK poblacional es defineix com l'estudi de les fonts de variabilitat en les concentracions de fàrmac entre individus que reben un règim de dosificació estàndard. Aquesta aproximació permet analitzar simultàniament la informació de tots els subjectes en la població d'estudi, i a) estimar el valor promig dels paràmetres PK, b) quantificar tant la magnitud de la variabilitat associada als paràmetres PK dins de la població d'estudi com la contribució de determinades característiques individuals (pes corporal, edat, sexe), fisiopatològiques (paràmetres relacionats amb la funcionalitat renal o hepàtica) o terapèutiques (la presència de tractaments concomitants) a aquesta variabilitat c) estimar la variabilitat o error associat a les concentracions experimentals^{73,74}.

Ofereix la possibilitat d'efectuar ànàlisis simultanis integrant tota la informació PK d'un fàrmac, no només a partir de dades procedents de dissenys de mostreig relativament dispersos ("sparse data") sinó també a partir de dades procedents de dissenys intensius ("dense/rich data") o a partir de la combinació d'ambdós, dissenys balancejats amb el mateix número de mostres per individus vs dissenys no balancejats, així com d'estudis que estan normalment exclosos degut a que el seu disseny no permet l'ànàlisi PK clàssic.

Tal com es resumeix en la Figura 3, dins dels mètodes poblacionals n’hi ha que utilitzen l’aproximació paramètrica que assumeix distribució normal o logonormals dels paràmetres PK i l’aproximació no paramètrica que no fa assumpcions de normalitat i permet la identificació de subpoblacions, que no es podria fer amb l’aproximació paramètrica. Malgrat tot, l’aproximació paramètrica és la més emprada tal i com ho demostra el gran nombre d’estudis i de publicacions que l’han utilitzat durant els últims anys⁷⁵.

El programa més emprat és el NONMEM (Universitat de California, San Francisco, Beal i Sheiner⁷⁶) que té implementats els models no lineals d’efectes mixtes. “No lineal” es refereix al fet que la variable dependent (concentracions) està relacionada de manera no lineal amb els paràmetres del model i a les variables independents. “Efectes mixtes” es refereix a la parametrització: els paràmetres que no varien entre els individus són denominats efectes fixes i els paràmetres que varien entre els individus són denominats efectes aleatoris⁷⁷. Així els efectes fixes corresponen als paràmetres PK i coeficients de regressió de les covariables que descriuen part de la variabilitat interindividual deguda a característiques individuals conegeudes i els efectes aleatoris corresponen a la variabilitat associada als paràmetres i residual associada a les concentracions. Aquesta aproximació, permet l’anàlisi simultani de totes les dades per estimar els valors dels paràmetres PK (efectes fixes) i de la variança associada a les distribucions dels efectes aleatoris interindividuals (η) i residuals (ε).

Mètodes d’estimació Bayesiana a posteriori

Una vegada caracteritzat el comportament PK poblacional és possible estimar els valors individuals dels paràmetres PK en cada un dels pacients que pertanyen a la població d’estudi, mitjançant mètodes de predicció bayesiana a posteriori⁷⁸. Aquesta metodologia ha estat la més emprada com a suport durant la

monitorització terapèutica per la individualització de la dosi en els últims 40 anys. L'aproximació Bayesiana permet predir els valors individuals dels paràmetres i concentracions després d'un règim de dosificació donat (funció de distribució de la probabilitat a posteriori) en base a la informació PK poblacional prèvia (funció de distribució de la probabilitat a priori) i d'informació experimental del pacient com són les seves característiques individuals, particularment aquelles que són predictives del comportament PK i d'algunes dades de concentració plasmàtica vs temps (2-3 valors).

Els mètodes d'estimació Bayesiana permeten per tant i) predir les concentracions individuals després d'un determinat regim de dosificació i en funció d'això reajustar la dosi ii) comparar els valors de concentracions predites amb els observats, la qual cosa representa una validació del model emprat tal com es descriu també a la figura 3, iii) presenten molta flexibilitat en quan als temps experimentals de presa de mostra i iv) reutilitzar els valors de concentració vs temps registrats durant el procés per afegir a la informació poblacional i millorar el model poblacional prèviament desenvolupat.

3.2. MODELS FARMACOCINÈTICS POBLACIONALS DE GANCICLOVIR

L'aproximació dels models d'efectes mixtes no lineals implementada al programa NONMEM s'ha aplicat per l'estudi PK poblacional, dut a terme a partir de dades de concentració sèrica de GCV vs temps en diferents poblacions d'estudi: adults receptors SOT, adults seropositius pel virus de la immunodeficiència humà (HIV) i en població pediàtrica receptors SOT. Concretament existeixen en la literatura quatre models PK poblacionals de GCV per a la població de pacients adults receptors SOT. A la taula 6 es mostren les diferències entre el models descrits i els valors dels paràmetres poblacionals, tant els d'efectes fixes o valors

poblacionals dels paràmetres PK com els d'efectes aleatoris, es a dir, representatius de la variabilitat interindividual i residual.

El primer de tots es va desenvolupar l'any 1995 en pacients amb retinitis per CMV que eren HIV positius (53 pacients) o receptors SOT (7 pacients)⁷⁹. El segon model publicat³³ es va incloure en l'estudi IMPACT⁸⁰ i les dades dels pacients es van extreure d'un assaig clínic randomitzat, doble cec, que avaluava l'eficàcia i seguretat de VGCV oral comparat amb GCV oral per a la prevenció de la malaltia per CMV en pacient SOT d'alt risc immunològic (D+/R-)⁸¹. Els dos últims models es van publicar al 2009 i van incloure pacients receptors SOT sota tractament profilàctic o per malaltia per CMV. En el primer publicat per Perrottet N i col⁴⁸ els pacients estaven sota tractament profilàctic i el disseny de mostreig va ser limitat (2 mostres per pacient), però amb un número de pacients relativament elevat (N=65), mentre que en el segon publicat per Caldés i col⁵², els pacients estaven en tractament per infecció o malaltia per CMV, la mostra era més petita (N=20) i el mostreig va ser intensiu (12 mostres per pacient).

Taula 6. Característiques dels models PK poblacionals en adults receptors SOT publicats.

	Model 1 ⁷⁹	Model 2 ³³	Model 3 ⁴⁸	Model 4 ⁵²
Població	Pacients HIV o SOT amb retinitis per CMV	Pacient SOT d'alt risc immunològic (D+/R-)	Pacient SOT	Pacient SOT
Tipus de tractament	Tractament de la retinitis per CMV	Profilaxis de CMV	Profilaxis i tractament de la malaltia per CMV	Tractament de la malaltia per CMV.
Fàrmac administrat	GCV iv	GCV i VGCV oral	GCV iv i VGCV oral	GCV iv i VGCV oral.
Mostres obtingudes	Mostreig intensiu en una ocació: 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 15 i 24h post inici de la infusió	Mostreig dispers en dos ocasions: 1-3h, 5-12 i 24h post dosi	Mostreig dispers setmanal si tractament o mensual si profilaxis: predosi i 3 h post administració.	Mostreig intensiu en 2 ocasions: Predosi, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6 i 12 h post inici de la infusió de GCV iv i post administració de VGCV oral.
Comportament PK	Bicompartimental Eliminació d'ordre 1	Bicompartimental	Bicompartimental	Bicompartimental
<i>Valors dels paràmetres PK poblacionals</i>				
Paràmetres farmacocinètics	CL 0.168; 0.168·WT·(CLCR _{C-G} /100) ·(1-T)·(1-CMV) + 0.382 SOT: T=0.76, CMV=0 HIV: T=0, CMV=0.41 V ₂ 0.391·WT V ₃ 0.511·WT	CL _{C-G} 12.4 L/h V ₂ 25 L CL _{D1} 12 L/h V ₃ 49 L K _A 0.36 h ⁻¹ LT 0.661 h	CL θ _{empelt} ·CLCR _{MDRD} ·1.21 (θ _{empelt} : kidney 1.68, heart 0.86, lung and liver 1.17) V ₂ 24·(pes/70)·0.72 L CL _{D1} 4.1 L/h V ₃ 19.6 L K _A 0.65 h ⁻¹ F1 0.6	CL 7.49 L/h; 7.49·(CLCR _{C-G} /57) V ₂ 31.90 L CL _{D1} 10.20 L/h V ₃ 32.0 L K _A 0.895 h ⁻¹ F1 0.825 LT 0.382 H
Variabilitat interindividual	ω ² _{v2} 0.075	ω ² _{CL} 0.182 ω ² _{v2} 0.642	ω ² _{CL} 0.26 ω ² _{v1} 0.2	ω ² _{CL} 0.107 ω ² _{v2} 0.227 ω ² _{KA} 0.464 ω ² _{F1} 1.54
Variabilitat residual	Proporcional	Proporcional σ ₁	Proporcional σ ₁	Additiu σ ₁ Proporcional σ ₂

CL = aclariment; V₂ i V₃ = volum de distribució central i perifèric; WT = weight (Kg); C-G=Cockcroft-Gault

Per al model 4: CL_{D1} = aclariment intercompartmental entre el compartiment centra i perifèric; K_A = constant d'absorció de primer order; F = biodisponibilitat; LT = temps de latència; ω² = variança de la variabilitat interindividual; σ₁ = desviació estàndard del component additiu de la variabilitat residual; σ₂² = variança del component proporcional de la variabilitat residual; CLCR = aclariment de creatinina en mL/min calculat amb Cockcroft-Gault; 57 = promig.

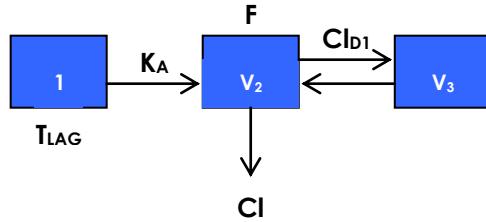
4. ESTIMACIÓ DE L'EXPOSICIÓ: INDIVIDUALITZACIÓ DE LA DOSI MITJANÇANT LA UTILITZACIÓ D'UN PREDICTOR BAYESIÀ.

Els models poblacionals explicats en l'apartat 3.2 mostren les covariables que influencien la PK de GCV en pacients TOS però només en el de Caldés A i col⁵² es proposa la utilització del model com a predictor bayesià de forma prospectiva. Van desenvolupar un model PK poblacional en la població de pacients transplantats SOT infectats per CMV i en tractament amb GCV iv seguit de VGCV via oral a partir de dades concentració temps (12 punts per pacient i via d'administració) i van utilitzar el model per avaluar la dosificació descrita pel fabricant. Van simular els valors d'exposició assolits després de l'administració de GCV i VGCV i en base a l'exposició diana descrita per Wiltshire H i col³³, es va estimar l'assoliment de l'objectiu terapèutic.

4.1. CARACTERÍSTIQUES DEL MODEL APlicAT EN LA TESIS

Degut a que en aquesta tesi es realitza l'aplicació del model PK desenvolupat per Caldés A i col⁵² en la pràctica clínica, aquest s'explica més detalladament a continuació.

El comportament PK del GCV després d'ambdós administracions iv i oral, es va descriure d'acord amb un model bicompartmental amb una eliminació de primer ordre des del compartiment central, parametritzat en termes d'aclariment plasmàtic (Cl), volum de distribució del compartiment central (V_2), aclariment intercompartimental (Cl_{D1}), volum de distribució del compartiment perifèric (V_3), constant d'absorció (K_A), biodisponibilitat (F) i temps de latència (T_L).



L'anàlisi de les dades va identificar l'aclariment de creatinina (CLCR) com a predictor de l'aclariment del GCV (Cl) de forma que CLCR va explicar el 52.03% de la variabilitat interindividual trobada en l'aclariment del fàrmac, que es va reduir d'un 68.19% a un 32.71% respecte al model base. No es va trobar cap influència del pes en els valors de Cl, com s'havia descrit en la literatura anteriorment. Això probablement va ser degut a l'estret marge de variació en els valors del pes dins dels pacients inclosos en l'estudi. La taula 6 mostra els valors dels paràmetres PK poblacionals obtinguts en aquest estudi.

4.2. AVALUACIÓ DE L'EXPOSICIÓ

A partir del model desenvolupat i utilitzant l'eina de la simulació van avaluar el règim de dosificació. Concretament, van determinar el percentatge de pacients, que segons funció renal (CLCLR), presentaven valors d'AUC entre 40-50 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$. Van realitzar una comparació de les exposicions assolides seguint la fitxa tècnica i seguint l'estratègia d'ajustar les dosis en base al model PK poblacional.

Els resultats de l'avaluació van demostrar que després de l'administració iv de GCV segons fitxa tècnica, els percentatges de pacients amb AUC entre 40 y 50 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ van ser només del 13,5%; observant que per CLCR < 30 mL/min més del 75% dels pacients presentaven AUC superiors a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$. Contràriament, per CLCR > 70 mL/min, més del 75% presentaven valors d'AUC per sota de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$. Una tendència similar es va observar després de l'administració de

VCGV. Els percentatges de pacients amb AUC entre 40 i 50 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ van ser del 15,6%, presentant el 98.6% (CLCR=10mL/min), 89.5% (CLCR=20mL/min) i 68.8% (CLCR=30mL/min) de pacients un AUC > 50 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$.

Per contra, els valors de les exposicions simulades amb dosis ajustades segons el model PK poblacional, van estar en diana terapèutica en el 50% dels pacients per a tots els valors d'aclariment de creatinina. Els resultats d'aquest estudi de Caldés A i col⁵² demostra la importància de l'ajust de dosi en base al CL individual de cada pacient, sobretot en la població de pacients SOT en que la funció renal evoluciona al llarg del període post-transplantament.

II. HIPÒTESI

II. HIPÒTESI

És coneguda la relació entre l'exposició sistèmica (AUC) a GCV i la prevenció de la virèmia, prevenció de la malaltia per CMV i l'aparició d'efectes adversos hematològics. L'àrea sota la corba de concentracions plasmàtiques de GCV està directament relacionada amb l'eficàcia i seguretat de manera que valors d'AUC de 40-50 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ permeten la supressió de la virèmia durant el tractament profilàctic i reduir la incidència del desenvolupament de la mateixa, un mes després de finalitzar el tractament. D'altra banda, una AUC superior a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ha demostrat estar relacionada amb un increment tant de la neutropènia com de la leucopènia. Amb aquests resultats podríem dir que l'assoliment d'un valor terapèutic d'AUC podria ser la clau per aconseguir bona eficàcia en el tractament i evitar efectes adversos així com l'aparició de resistències.

D'altra banda, s'ha demostrat que la funció renal és la variable predictora més important de la variabilitat observada en els nivells sèrics de GCV. La funció renal és d'especial importància en la subpoblació de transplantats renal que presenta valors de la funció de l'òrgan transplantat molt baixos (CLCR < 20 mL/min) en el moment del trasplantament i va millorant al llarg del període de seguiment. Això suposa la necessitat de fer l'ajust de dosi al llarg de tot el període post-trasplantament, especialment en la subpoblació de transplantats renals i sobretot quan el tractament s'inicia immediatament després del trasplantament.

Segons el model poblacional desenvolupat prèviament per Caldés A i col⁵², només un 16% dels pacients assoleixen l'objectiu terapèutic d'AUC després de l'estratègia de dosificació del fàrmac segons fitxa tècnica. Especialment, els pacients amb valors de funció renal molt disminuïda (CLCR < 30 mL/min) o

conservada (CLCR > 70 mL/min) estarien sobredosificats i infradosificats, respectivament, amb el risc de presentar més efectes adversos o bé fracàs terapèutic.

Malgrat que el GCV no sigui un fàrmac que actualment es monitoritzi de forma rutinària, la variabilitat PK observada després de la seva administració representa un problema potencial per l'eficàcia i seguretat. La infecció per CMV juga un paper important després del transplantament en termes de morbi/mortalitat, essent la incidència d'infecció per CMV D+/R- en pacients sense tractament del 45%. Per aquest motiu la optimització de la posologia en base a un model predictiu que permetés ajustar la dosi en funció de les característiques individuals de cada pacient, per assolir l'exposició adequada a GCV, seria de gran utilitat. Com a conseqüència es minimitzarien els efectes adversos, garantint una major eficàcia en la població diana i es reduirien els costs associats. Tanmateix s'evitaria l'aparició de resistències secundari a la infradosificació, com ja s'han descrit en el tractament amb GCV oral.

Per tot això, és fonamental disposar d'un model PK poblacional prèviament desenvolupat així com del corresponent predictor bayesià. Per tant, la individualització de la dosi de GCV/VGCV en funció de les característiques de cada pacient i de les concentracions sèriques de GCV, pot contribuir en gran manera a assolir l'exposició òptima al fàrmac en els pacients transplantats.

III. OBJECTIUS

III. OBJECTIUS

Objectiu principal

Optimitzar la posologia de GCV i VGCV, assessorada per l'exposició al fàrmac segons l'àrea sota la corba de nivells plasmàtics (AUC), mitjançant l'aproximació bayesiana en base al model farmacocinètic poblacional prèviament desenvolupat. S'avaluarà l'exposició assolida després de l'administració de GCV i VGCV segons l'estrategia d'optimització i es compararà amb l'AUC assolida seguint les indicacions del laboratori fabricant.

Objectius secundaris

1. Validació de la metòdica analítica mitjançant UHPLC/UV i UHPL/MSMS
2. Establir un disseny d'estrategia limitada d'extracció de mostres per poder estimar paràmetres farmacocinètics, entre ells valors d'AUC de GCV, utilitzant l'aproximació dels models d'efectes mixtes no lineals, amb la màxima robustesa i fiabilitat possible emprant el menor número de mostres possible.
3. Avaluar l'impacte de l'optimització de la posologia segons el model poblacional en l'eficàcia estimada segons la càrrega viral i millora clínica i en els paràmetres de tolerància clínica.

IV. RESULTATS

Capítol 1

Determination of ganciclovir in human plasma by ultra performance liquid chromatography –UV detection.

Padullés A, Colom H, Armendariz Y, Cerezo G, Caldés A, Pou L, Torras J, Grinyó JM, Lloberas N.

Clinical Biochemistry 2012;45(4-5):309-14.

RESULTATS



Determination of ganciclovir in human plasma by ultra performance liquid chromatography–UV detection

A. Padullés ^c, H. Colom ^b, Y. Armendariz ^a, G. Cerezo ^a, A. Caldes ^a, L. Pou ^d, J. Torras ^a, J.M. Grinyó ^a, N. Lloberas ^{a,*}

^a Nephrology Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

^b Department of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, School of Pharmacy, University of Barcelona, Spain

^c Pharmacy Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

^d Biochemistry Department, Hospital Valle Hebrón, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 September 2011

Received in revised form 3 December 2011

Accepted 16 December 2011

Available online 4 January 2012

Keywords:

Therapeutic drug monitoring

Ganciclovir

Valganciclovir

HPLC

UHPLC

ABSTRACT

Objectives: Implement a sensitive UHPLC method for the assay of ganciclovir in human plasma.

Design and methods: We developed and validated a chromatographic method coupled to ultraviolet detection for quantification of ganciclovir, with a short run time using a small volume of human plasma. Comparison of system performance was made with respect to analysis time, efficiency and sensitivity.

Results: Correlation coefficients (*r*) of the calibration curves ranged from 0.999744 to 0.999784. Within-day and between-day imprecision and inaccuracy, specificity and recovery were also evaluated for validation. The method was precise and accurate and the retention time was 0.7 min. The calibration curves were linear between 0.5 and 30 µg/mL. There was a good correlation between HPLC and UHPLC techniques.

Conclusions: We developed a method that is currently applied in a clinical study assessing GCV plasma concentration variability after ganciclovir and valganciclovir administration.

© 2012 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Cytomegalovirus (CMV) is the most common opportunistic pathogen affecting solid organ transplant (SOT) [1]. Ganciclovir (GCV) a deoxyguanosine analog was the initial choice for both prevention and treatment of the CMV disease in transplant patients [2]. Intravenous (IV) administration of GCV (5 mg/kg/12 h given during 2–3 weeks or prolonged administrations according to product information [3]), has been the gold standard for the treatment of established infection, while oral GCV was administered for CMV prophylaxis due to its poor bioavailability (F) [4]. Valganciclovir (VGCV), the valyl ester of GCV, is characterized by a near ten-fold higher bioavailability than GCV [5,6] and offers the perspective of replacing suboptimal oral prophylactic (oral GCV) and intravenous

therapeutic regimens. The approved indications [7] of VGCV are the treatment of CMV retinitis in HIV patients and the prophylaxis of CMV infection in SOT patients.

Pharmacokinetic of GCV after IV GCV and/or oral VGCV has been studied in different patient populations. New pharmacokinetics analyses, as population pharmacokinetics, provide predictive models that allow dose adjustment.

Therapeutic GCV plasma concentrations in solid organ transplant recipients receiving oral VGCV therapy typically range from 2.0 to 20 µg/mL [8]. The suppression of CMV viremia and disease is related [9] to exposure to GCV, so it is important to achieve the required exposure, avoiding adverse events and development of viral resistances. Only one pharmacokinetic (PK) study [10] compared exposure to GCV between patients receiving GCV IV and oral VGCV, at steady state, in SOT patients suffering of CMV infection. A previous study demonstrated viraemia suppression during prophylaxis with GCV exposure (AUC) of 40–50 µg h/mL [9], suggesting that dose adjustment to a target exposure value would justify the development of a clinically applicable population pharmacokinetic model.

Some high-performance liquid chromatographic (HPLC) methods have been described for the analysis of GCV in plasma, serum and other biological fluids [11–18]. However, these HPLC/Ultraviolet (UV) methods have one or more of the following shortcomings: time-consuming extraction procedures (12, 13, 14), a requirement of large plasma volumes (250–1000 µL) (12, 13, 15), long run times

Abbreviations: (GCV), Ganciclovir; (VGCV), Valganciclovir; (TCA), Trichloroacetic acid solution; (UV), Ultraviolet; (HPLC), High-performance liquid chromatography; (UHPLC), Ultra High-performance liquid chromatography; (PK), Pharmacokinetic; (AUC), Area under the concentrations time curve; (QC), Quality control; (LLOQ), Lower limit of quantifications; (SD), Standard deviation; (RE), Relative error; (C.V.), Coefficient of variation; (RT), Retention time; (SOT), Solid organ transplant.

* Corresponding author at: Nephrology Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Lab Exp Nephrology 4122, Pab. Govern, 4^a planta, UB, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Fax: +34 93 4035806.

E-mail address: nlloberas@ub.edu (N. Lloberas).

(16, 17), high limit of quantification (LLOQ) (18) or relatively low sensitivity. Actually, ganciclovir concentrations are currently measured in our reference hospital by a validated HPLC with UV detection method [19]. That method either requires large sample volume or has long run time. In order to overcome these problems, a new method for the analysis of GCV was developed. The aim of this work is the validation of the method of GCV analysis with UHPLC using UV detection. Plasma samples of transplant recipients were determined by the current applied HPLC method and UHPLC, and both results were correlated.

Materials and methods

Chemicals

GCV was a gift from Roche Pharma (Palo Alto, CA, USA). Methanol, acetonitrile, trichloroacetic acid solution (TCA) 50% and potassium monophosphate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was obtained from Milli-Q® UF-Plus apparatus (Millipore Corporation, Millford, MA, USA).

Apparatus and chromatographic conditions

Chromatography was performed using a Waters Acuity™ UHPLC system (Waters, Milford, MA, USA) with a ultraviolet (UV) detector set to 254 nm. The separation was carried out on a UHPLC Acuity HSS T3 column ($1.8\text{ }\mu\text{m} \times 2.1 \times 50\text{ mm}$) obtained from Waters (Milford, MA, USA). A Vanguard HSS T3 precolumn ($1.8\text{ }\mu\text{m} \times 2.1 \times 5\text{ mm}$) was used to prevent particles from clogging the column and to prolong column life. It was equipped with cooling autosampler and column oven enabling temperature control of the analytical column. The temperature of the autosampler chamber was held at 40°C . The injection mode was partial loop with needle overfill and the volume injected was $7.5\text{ }\mu\text{L}$. Elution was performed at 0.7 mL/min with a mobile phase solution that was potassium monophosphate water solution (pH 4.0; 0.02 M) containing 1% of acetonitrile. The strong and weak wash solvent was methanol and water (20:80 v/v). The Acuity UHPLC system was equipped with an HP Pavilion (Hewlett Packard, Palo Alto CA, USA) with the EMPOWER™ software (Waters, Milford, MA, USA) to process the data (area integration, calculation and plotting of chromatograms) throughout the method validation. The GCV area was direct extrapolated from the daily calibration curve and only in few samples the area was manually adjusted.

Samples collection

According to a study protocol previously approved by the Ethics Committee of University Hospital, blood samples were taken from solid organ transplant patients under prophylaxis or treatment with GCV and VGCV during their hospital stay and for their subsequent routine follow-up at their scheduled medical visits. Blood samples (5 mL) were withdrawn in vacuettes® tubes before and at $30, 60, 90\text{ min}$ and $2, 3, 4, 6, 8,$ and 12 h after the start of GCV administration. Samples were centrifuged at 13000 rpm for 10 min at 4°C (Sorvall Centrifuge, Thermo Fisher, MA, USA) and the plasma was separated and transferred into two aliquots of 1 mL -polypropylene test tubes and stored at -20°C up to the time of analysis.

Stock solution and plasma calibration standards

Stock solution of GCV $1000\text{ }\mu\text{g/mL}$ in HCl 0.1 N was further diluted with blank plasma for the preparation of the working solution of GCV $80\text{ }\mu\text{g/mL}$. To prepare solutions for the construction of standard curves, a measured amount of each stock solution was transferred into a test tube and mixed well. Subsequently, serial dilutions were performed to create mixed standard solutions at target concentration

ranges of $0.5, 1, 5, 10, 16, 20, 25$ and $30\text{ }\mu\text{g/mL}$. Blank plasma was obtained from a pool of plasma of healthy volunteers and was stored maximum 48 h at $4\text{--}12^\circ\text{C}$. The calibration standards were stored up to 3 months at -20°C as $200\text{ }\mu\text{L}$ aliquots in 1.5 mL -polypropylene Eppendorf tubes, and thawed on the day of analysis.

Quality control (QC) samples were also prepared by spiking the stock solution into blank plasma, as described for the preparation of the calibration standards. The concentration levels of QC samples of GCV (1.5, 8.5 and $15\text{ }\mu\text{g/mL}$) were selected to encompass the clinically relevant range of concentrations expected in plasma samples. The QC samples were stored up to 3 months at -20°C and analyzed every time along with patient samples.

Sample preparation

On the day of analysis, standards and patient samples were thawed, allowed to equilibrate to room temperature and vortex-mixed. For the precipitation of plasma protein, 50% trichloroacetic acid solution (TCA) solution ($20\text{ }\mu\text{L}$) was added to $200\text{ }\mu\text{L}$ of plasma samples (calibration and patients). After being vortex-mixed, the suspensions were centrifuged for 10 min on a bench top centrifuge at 13000 rpm at room temperature (Hettich® Benchtop Universal 16R centrifuge, Bäch, Switzerland). The supernatants collected were introduced into conic 1.5 mL autosampler vials (Bonded Pre-slit silicone/PTFE septum, Waters, Milford, MA, USA) and a volume of $7.5\text{ }\mu\text{L}$ was used for UHPLC analysis.

Method validation

All assay validation procedures were carried out according to current guidelines [20], which include specificity, linearity, intra-day and inter-day precision and accuracy, lower limit of quantification, recovery and stability.

Linearity and limit of quantification

Linearity was assessed by analyzing a set of five calibration curves for plasma. Calibration curves were prepared as described in the "Stock solution and plasma calibration standards" section above. The linearity of the method was determined by plotting peak area (y) of GCV against theoretical concentration (x) of GCV. Calibration measurements were subjected to least square regression analysis by computer program, to provide information on the slope, y-intercept, correlation coefficient (r) and the back calculated concentrations. The coefficient of correlation should be 0.9800 or greater.

The lowest limit of quantification (LLOQ) is defined as the lowest GCV concentration that could be quantified with precision and accuracy values lower than 20%.

Precision and accuracy

The intra-assay and inter-assay precision and accuracy were evaluated by analyzing 5 replicates at four different concentrations, LLOQ and QC samples at three concentrations (low, medium and high: 1.5, 8.5 and $15\text{ }\mu\text{g/mL}$). Mean and standard deviation (SD) were obtained from back-calculated drug concentrations at each level. Accuracy and precision were evaluated in terms of relative error (RE) and coefficient of variation (C.V.), respectively. Precision and accuracy values higher than 15% were not accepted except at LLOQ, where it should not deviate by more than 20%.

Recovery

Absolute recovery of extraction procedure was assessed by comparing the peak area of the QCs (1.5, 8.5 and $15\text{ }\mu\text{g/mL}$) with those of the reference standards prepared in HCl and injected directly into the analytic column. It was expressed as percentage area ratio of the extracted QC relative to the directly injected reference standard.

Table A.1

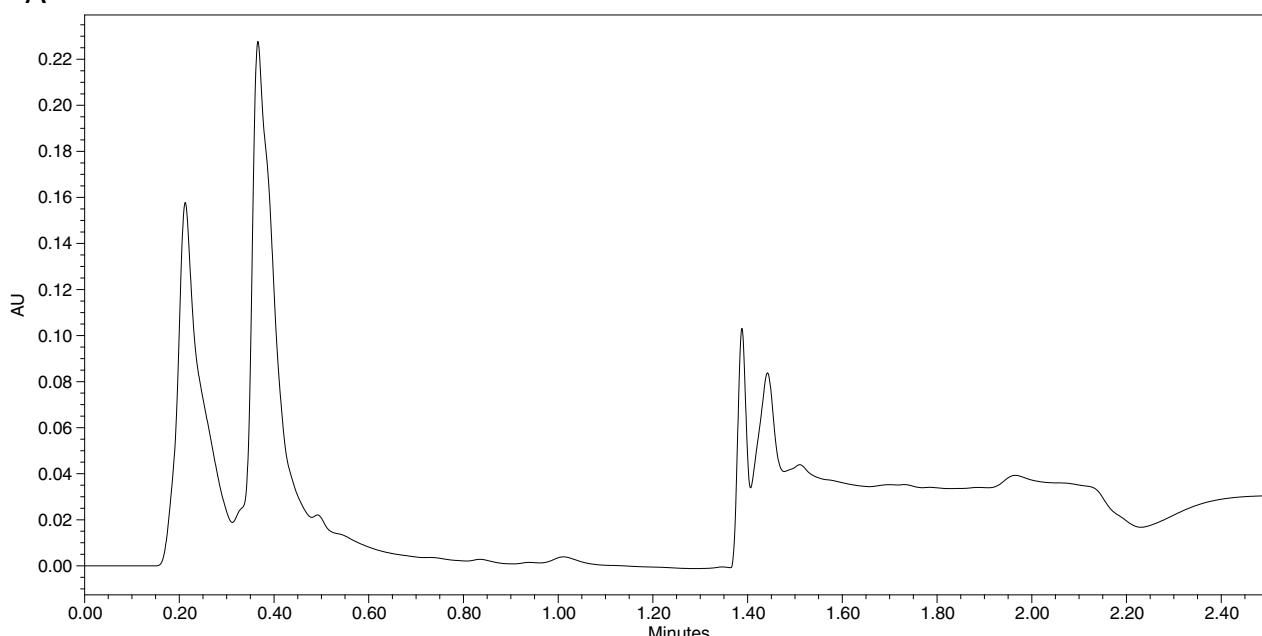
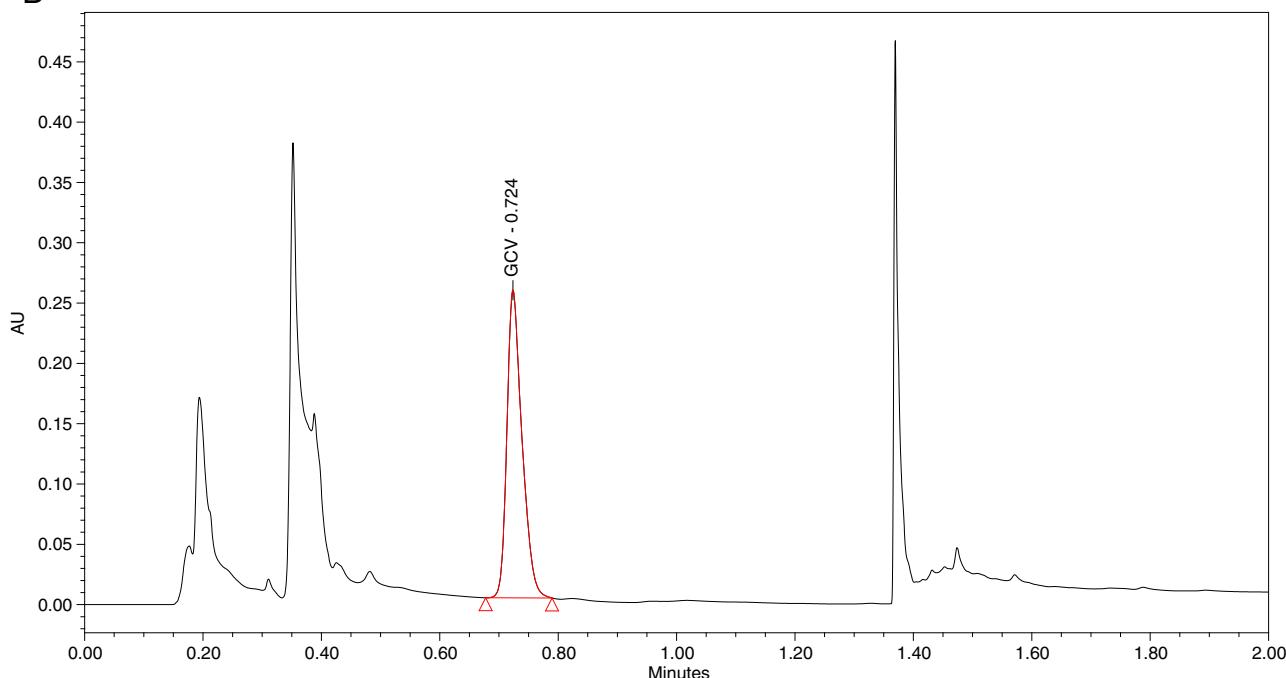
Comparison of system performance of UHPLC and HPLC.

	Chromatograph	Column	Injection volume	Mobile phase	RT (min)	Flow (mL/min)	Detector (nm)	LLOQ ($\mu\text{g/mL}$)
UHPLC	Aquity WATERS	HSS T3 column 1.8 $\mu\text{m} \times 2.1 \times 50 \text{ mm}$	7.5 μL	$\text{K}_3\text{PO}_4 + \text{ACN} 1\%$ (0.02 M pH 4.0)	0.7	0.7	254	0.5
HPLC	Kontron Diode Array ANFA-04	Nucleosil 120 C ₁₈ 3 $\mu\text{m} 4 \times 0.46 \text{ cm}$	40 μL	K_3PO_4 (0.02 M pH 4.0)	5	1	254	0.5

Stability

Freeze-thaw cycles, autosampler and long-term stability studies were performed at five replicates and were studied on three QC samples

at three concentrations (1.5, 8.5 and 15 $\mu\text{g/mL}$). To evaluate freeze-thaw stability, samples were subjected to freezing for 24 h at -20°C and thawed unassisted at room temperature for 3 cycles. Long-term

A**B****Fig. B.1.** Representative UHPLC Chromatogram for GCV. Typical chromatograms showing: (A) blank plasma, (B) plasma spiked with GCV 16 $\mu\text{g/mL}$.

stability after three months under storage at -20°C was also performed [19]. Mean area ratios of extracted samples after each experimental condition as a function of the mean area ratios of freshly extracted samples analyzed at time zero were compared and results were expressed as percentages of freshly sample concentrations which were considered as 100%.

Specificity

To evaluate potential chromatographic interference by other drugs commonly co-administered in renal transplant patients, pooled blank plasma samples from different sources containing 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each drug were tested. Specificity was determined by checking the absence of interfering peaks of endogenous or exogenous materials at the same retention time of the analytes [19].

Chromatographic interference was studied by injecting the mixture of GCV with conventionally coadministered drugs, including cyclosporine, tacrolimus, mycophenolic acid, everolimus, sirolimus, prednisone, sulfamethoxazole and trimethoprim.

Correlation with HPLC method

Samples of all patients were analyzed in duplicated by two chromatographic techniques (UHPLC and HPLC) to determine GCV concentrations following the conditions and performance shown in Table A.1. To ensure linear relationship between data, linearity was tested as described by Passing and Bablok [12] using Analyse-it Standard Edition software integrated into Excel '97. If linearity is given, the test of the null hypothesis $a=0$ and $b=1$ is carried out.

The analysis of GCV in serum by high-performance liquid chromatographic (HPLC) method with UV-vis detection was performed as follows. A nucleosil 120C₁₈ 3 μm 4 \times 0.46 cm was used. For the precipitation of plasma protein, 20 μL of TCA solution was added to 200 μL serum sample and vortexed and centrifugated at 10000 rpm for 4 min. The supernatant was directly injected into HPLC system. The mobile phase was a phosphate buffer 0.02 M (pH 4.0) and delivered a flow rate of 1 mL/min. Sample volume injected was 40 μL and the total runtime was 5 min.

Results

Assay performance was determined in accordance with FDA [13] guidelines for bioanalytical method validation. The method was validated by determination of linearity, precision, accuracy, sensitivity, lower limit of quantification (LLOQ), and stability. In Table A.1., a comparison of the conditions and performances for the two techniques HPLC/UHPLC is shown. The UHPLC retention time (RT) was 0.7 min meanwhile in HPLC was 5 min. Although GCV peak was at 0.7 min, the total run time was 2.5 min because after each analysis, the UHPLC column was washed by methanol and acetonitrile at a flow rate of 0.7 ml/min for 1.5 min. The total run time was less than half with respect to the HPLC measuring more sample patients per day. Typical UHPLC chromatogram is depicted in Fig. B.1.

Table A.2

Summary of the intra and inter assay precision and accuracy data.

Spiked ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Analyzed	Precision CV %	Accuracy RE
<i>Intra assay (n=5)</i>			
LLQ (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$	8.32	12.70
Low (1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$	13.09	2.00
Middle (8.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	8.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.16	1.53
High (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	15.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.02	3.33
<i>Inter assay (n=5)</i>			
LLQ (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.54 $\mu\text{g}/\text{mL}$	18.03	7.95
Low (1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$	11.72	0.67
Middle (8.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	8.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2.58	0.59
High (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	15.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2.77	0.67

Linearity and limit of quantification

The correlation coefficients for all the standards were greater than 0.999 and the slopes of the five curves prepared on five different days had a mean coefficient of variation (C.V.) of 3.63%. A typical equation for the calibration curves was $Y = 2.81e + 004X + 2.56e + 003$ where y and x were the peak-area and the GCV concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

The validation of LLOQ was conducted in 10 different batches of blank plasma. The lower limit of quantification of GCV by UHPLC was 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with 7.5 μL injected into the UHPLC column. However, the calibration was performed over the range from 0.5 to 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ because our plasma sample concentration was higher than 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Precision and accuracy

The data of intra-day and inter-day precision and accuracy for the method are listed in Table A.2. Inter- and intra-accuracy and precision for assays were characterized by LLOQ and the three levels of QCs run in five replicates. The LLOQ was 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the low-level QC was 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the medium was 8.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the high was 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The precision determined at each concentration of a single run (intra-day) and between different assays (inter-day) were within 1.02–13.09% and 2.58–18.03%, respectively. The accuracy as the percentage of deviation between nominal and measured concentration was in the range of 1.53–12.70% for intra-day and 0.59–7.95% for inter-day assays. Results are summarized in Fig. B.2.

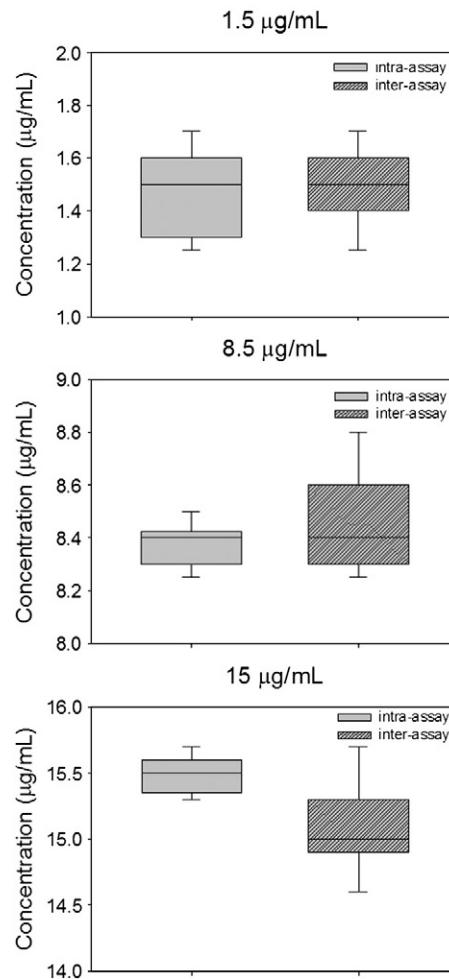


Fig. B.2. Box plots corresponding to the median, and 10th, 25th, 75th and 90th percentiles for the QC concentrations of 1.5, 8.5 and 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Table A.3

Recovery studies of GCV.

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (mean \pm SD, %)	CV (%)
1.5	102.9 \pm 0.05	0.06
8.5	101.4 \pm 0.01	0.01
15	90 \pm 0.26	0.29

Recovery

This extraction method provided an acceptable mean absolute recovery of GCV $> 85\%$. Table A.3 lists the results of recovery studies.

Stability of GCV

The short-term, long-term, and freeze-thaw stability of the analytes was determined in human plasma after each storage period, and the results were compared to the initial concentration (samples that were processed immediately after being freshly prepared). Samples were regarded as stable if the deviation from the initial condition was within $\pm 15\%$ [19].

Specificity

No chromatographic interference was observed from the following potentially co-administered drugs or their metabolites: cyclosporine, tacrolimus, mycophenolic acid, everolimus, sirolimus, prednisone, sulfamethoxazole and trimethoprim [19].

Correlation with HPLC method

There was a good correlation between both techniques as shown in Fig. B.3 2. (Passing-Bablok). The CI95% of b (the slope) was 0.854–1.091 and the CI95% of a (intersection y ax) was -0.867 – 0.685 [20,21].

Discussion

The UHPLC method was developed to determine GCV in human plasma for pharmacokinetic investigations and is currently applied in a research protocol.

The correlation coefficients for all the standards were greater than 0.999, suggesting that the UHPLC determination for the GCV tested exhibited good linearity within the concentration range of 0.5–30 $\mu\text{g/mL}$ in our work conditions. Considering that the GCV LLOQ

by HPLC was 0.5 $\mu\text{g/mL}$, the present method provides a high sensitivity that could be attributed to the extra resolution and peak sharpness produced by the UHPLC chromatographic system.

The precision and accuracy of the present method conform to the criteria for the analysis of biological samples according to the guidance of US FDA, where the precision (C.V.) and accuracy (RE) determined at each concentration level should not exceed 15% of the coefficient of variation (C.V.). The intra-day and inter-day RE values showed a high repeatability and reproducibility. These results indicate that the proposed UHPLC method provides acceptable precision.

Compared with the current method used by HPLC, UHPLC is a recently developed technology and provides a higher peak capacity, greater resolution, increased sensitivity and higher speed of analysis. The reduction of the retention time and the small sample volume by UHPLC with the isocratic program is very important in order to improve the monitoring of this drug in patients. Shortening of the total runtime using UHPLC is very significant if considering the overall number of patient samples in the kinetic study. The correlation between both techniques is good meaning that UHPLC and HPLC are useful for determining GCV concentrations. We developed a simple and sensitive UHPLC method for determination of GCV for 200 μL of plasma sample using UV detector. Results obtained demonstrate its usefulness for therapeutic monitoring or further pharmacokinetics studies.

Conclusions

Therapeutic drug monitoring of ganciclovir administration is not employed in the treatment of solid organ transplant (SOT) patients infected with CMV but this method is currently applied in a research protocol. Viraemia suppression during prophylaxis with ganciclovir exposure (AUC) of 40–50 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$, suggests that dose adjustment to a target exposure value would justify the development of a clinically applicable population pharmacokinetic model. An approach allowing modification of dose, after GCV plasma determination, to achieve a target plasma exposure is likely to improve outcome in SOT patients infected by CMV. This requires not only fast and sensitive bioanalytical method but also selective method with regard to co-administered drugs that is provided by UHPLC technique.

Conflict of interest

None.

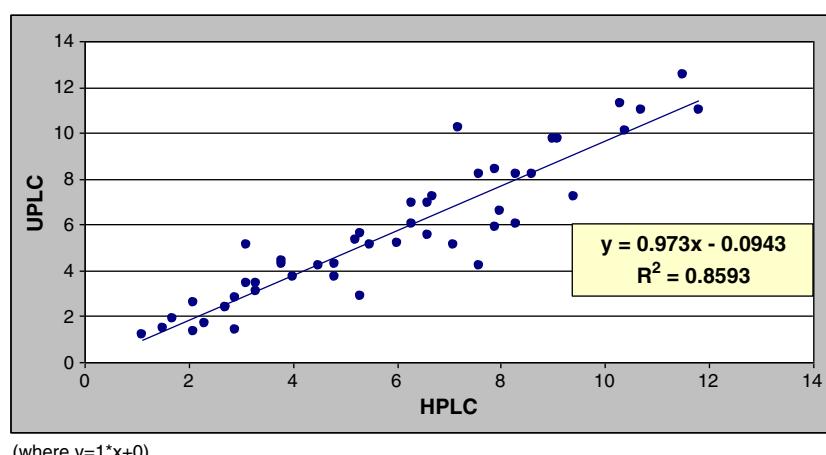


Fig. B.3. Correlation between HPLC/UHPLC (Passing-Bablok).

Acknowledgments

We are sincerely grateful to María Sarrias for the logistic support in hospital samples recruitment. We thank all the healthy volunteers who have contributed to the study. This study was supported by Roche Foundation and grants from Instituto de Salud Carlos III (CP06/00067) and MSFS (EC10-144).

Appendices

- A. Tables
- B. Figures

References

- [1] Tolokoff-Rubin NE, Rubin RH. The impact of cytomegalovirus infections on graft function and patient outcome. *Graft* 1999;S101–3.
- [2] Mc Gavin JK, Goal KL. Ganciclovir: an update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Drugs* 2001;61: 1153–83.
- [3] Information product of Ganciclovir.
- [4] Crumpacker CS. Ganciclovir. *N Eng J Med* 1996;335:721–9.
- [5] Pescovitz MD, Rabkin J, Merino R, Paya C, Pirsch J, Freeman RB, O'Grady J, Robinson C, Z, To, Wren K, Banken L, Buhles W, Brown F. Valganciclovir results in improved oral absorption of ganciclovir in liver transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2811–281.
- [6] Pescovitz MD, Pruet TL, Gonwa T, Brook B, McGory R, Wicker K, Griffy K, Robinson CA, Jung D. Oral ganciclovir dosing in transplant recipients and dialysis patients based on renal function. *Transplantation* 1998;66:1104–7.
- [7] Information product of Valganciclovir.
- [8] Wiltshire H, Hirankarn S, Farrell C, Paya C, Pescovitz MD, Humar A, Domínguez E, Washburn K, Blumberg E, Alexander B, Freeman R, Heaton N. Pharmacokinetic profile of ganciclovir after its oral administration and from its prodrug, valganciclovir in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2005;44:495–507.
- [9] Wiltshire H, Paya C, Pescovitz MD, Humar A, Domínguez E, Washburn K, Blumberg E, Alexander B, Freeman R, Heaton N, Zuideveld KP. Pharmacodynamics of oral ganciclovir and valganciclovir in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2005;79: 1477–83.
- [10] Caldés A, Colom H, Armendariz Y, Garrido MJ, Trocóniz 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;53: 4816–24.
- [11] Loregian A, Gatti R, Palù G, De Palo E. Separation method for acyclovir and related antiviral compounds. *J Chromatogr B* 2001;764:289–311.
- [12] Campanero MA, Sabada B, García-Quetglas E, Azanza JR. Developement and validation of sensitive method for the determination of ganciclovir in human plasma samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 1998;706: 311–7.
- [13] Cociglio M, Peyriere H, Hillaire-Buys D, Alric R. Application of a standardized coextractive clean up procedure to routine high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 1998;705:79–85.
- [14] Kishino S, Takekuma Y, Sugawara M, Furukawa H, Todo S, Miyazaki K. Liquid Chromatographic method for the determination of acyclovir and/or acyclovir in human plasma using amperometric detection. *J Chromatogr B* 2002;780: 289–94.
- [15] Chu F, Kiang CH, Sung ML, Huang B, Reeve RL, Tarnowski T. A rapid, sensitive HPLC method for the determination of ganciclovir in human plasma and serum. *J Pharm Biomed Anal* 1999;21:657–67.
- [16] Teshima D, Otsubo K, Yoshida T, Itoh Y, Oishi R. A simple and simultaneous determination of acyclovir and ganciclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 2003;17:500–3.
- [17] Dao Y, Jiao Z, Zhong M. Simultaneous determination of aciclovir, ganciclovir, and penciclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B* 2008;867:270–6.
- [18] Asberg A, Nupen Hansen C, Reubaert L. Determination of ganciclovir in different matrices from solid organ transplanted patients treated with a wide range of concomitant drugs. *J Pharm Biomed Anal* 2007;43:1039–44.
- [19] Pou L, Campos F, Almirante B, Pascual C. A rapid liquid chromatographic (HPLC) method for determination of ganciclovir in serum. In: Galteau MM, Siest G, Henny J, editors. Biologie prospective, Comptes rendus du 8° Colloque de Pont-a-Mousson. Paris, France: John Libbey Eurotext; 1993. p. 183–6.
- [20] Guidance for industry, bioanalytical method validation U.S. department of health and human services Food and Drug administration center for Drug Evaluation and research (CDER) center for veterinary medicine (CVM); May 2001. BP.
- [21] Passing H, Bablok W. *J Clin Chem Clin Biochem* 1984;22:431.

Capítol 2

Measurement of ganciclovir concentration in human plasma by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

Rigo-Bonnin R, Padullés A, Corral-Comesaña S, Cerezo G, Grinyó JM, Colom H, Lloberas N, Alía-Ramos P.

Clin Chim Acta. 2013;427C:58-64.

RESULTATS



Measurement of ganciclovir concentration in human plasma by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry



Raül Rigo-Bonnin ^{a,*}, Ariadna Padullés ^b, Sofía Corral-Comesaña ^a, Gema Cerezo ^c, Josep Maria Grinyó ^c, Helena Colom ^d, Pedro Alía-Ramos ^{a,1}, Núria Lloberas ^{c,1}

^a Laboratori Clínic Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

^b Pharmacy Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

^c Nephrology Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

^d Department of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, School of Pharmacy, University of Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 March 2013

Received in revised form 23 August 2013

Accepted 30 September 2013

Available online 10 October 2013

Keywords:

Acyclovir

Cytomegalovirus

Ganciclovir

Therapeutic drug monitoring

UPLC-MS/MS

Valganciclovir

ABSTRACT

Background: Ganciclovir/valganciclovir plays an important role in the treatment and prevention of cytomegalovirus disease after organ transplantation.

Material and methods: We developed and validated a simple chromatographic method by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure plasma concentration of ganciclovir in human plasma. Chromatographic separation was achieved using an Acquity® UPLC® BEH™ (2.1 × 50 mm id, 1.7 µm) reverse-phase C₁₈ column, with a water/methanol linear gradient containing ammonium acetate/formic acid at a 0.4 mL/min flow rate. Ganciclovir and its internal standard (acyclovir) were detected by electrospray ionization mass spectrometry in positive ion multiple reaction monitoring mode.

Results: The limit of detection and quantification were 0.03 and 0.06 mg/L, respectively, and linearity was observed between 0.06 and 30.0 mg/L. Intra-day and day-to-day coefficients of variation and relative biases ranged from 3.6 to 5.4%, 4.2 to 6.2% – 2.6 to –1.1% and –4.0 to –2.8%, respectively. Recovery values were greater than 81%. Evaluation of the matrix effect showed ion suppression for ganciclovir and acyclovir. No carry-over was observed.

Conclusions: The validated method is useful for both therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies. It could be applied to the daily clinical laboratory practice to measure the concentration of ganciclovir in human plasma.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cytomegalovirus (CMV) infection is the most common disease after solid organ transplantation and it is the cause of several clinical disorders [1]. Ganciclovir (GCV), a deoxyguanosine analog (see Fig. S1A in the Data Supplement), is the initial choice for both prevention and treatment of CMV disease in transplant patients [2]. Intravenous administration of GCV has been the gold standard for the treatment of

established infection, while oral GCV is administered for CMV prophylaxis due to its poor bioavailability [3]. Valganciclovir (VGCV) is an orally available valyl ester prodrug of GCV (see Fig. S1B in the Data Supplement) that shows a ten-fold higher bioavailability than GCV [4,5].

Pharmacokinetics of GCV after intravenous GCV or oral VGCV has been studied in different sub-populations [6,7]. New pharmacokinetic analyses, like population pharmacokinetics, provide predictive models that allow dose adjustment [8]. A pharmacokinetic study demonstrated viremia suppression during prophylaxis with GCV exposure (AUC) of 40–50 mg · h/L and there was only a weak tendency to increased neutropenia and leucopenia with higher GCV exposure [7]. Therefore it was suggested that dose adjustment to this target exposure value, after GCV concentration measurement, would improve the outcome of transplanted patients with CMV infection. Recently, Caldes et al. [8] developed a population pharmacokinetic model and demonstrated that clearance of creatinine was the best predictor of GCV clearance, performing dose adjustment by this covariate strategy to achieve the most efficacious GCV exposure. When the adequacy of the manufacturer's recommended clearance of creatinine-adjusted doses was evaluated it was observed that GCV exposure was not in the established therapeutic target in most

Abbreviations: CMV, cytomegalovirus; GCV, ganciclovir; VGCV, valganciclovir; SOT, solid organ transplant; AUC, area under the curve; HPLC, high-performance liquid chromatography; UV, ultraviolet; UPLC, ultra-performance liquid chromatography; MS/MS, tandem mass spectrometry; ACV, acyclovir; EMA, European Medicines Agency; CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute; IFCC, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; QC, quality control; ESL, electrospray ionization; MS, mass spectrometer; MRM, multiple reaction monitoring; *m/z*, mass-to-charge; LLOQ, lower limit of quantification; LLOD, lower limit of detection; S/N, signal-to-noise; CV, coefficient of variation.

* Corresponding author at: Laboratori Clínic Department, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona 08907, Spain. Tel.: +34 932607543; fax: +34 932607546.

E-mail address: raulr@bellvitgehospital.cat (R. Rigo-Bonnin).

¹ Both authors are considered co-directors of this study.

of the patients treated with standard doses. No previous studies from routine therapeutic drug monitoring (TDM) of GCV/VGCV in adult SOT patients have been published and only some case reports in adults remark the importance of dose optimization [9–11]. However, these results indicate that GCV/VGCV dose adjustment to achieve the target exposure established would justify the TDM to improve the outcome in SOT patients specifically for those in whom changes in renal function can occur throughout the treatment period.

In this context, the need of dose individualization has been considered in pediatric kidney transplant patients. Zhao et al. developed and validated a population pharmacokinetic model and proposed a Bayesian estimator based on three concentrations after drug intake that could be useful for individualization of VGCV prophylaxis in pediatric patients [12].

High-performance liquid chromatography (HPLC) methods for the measurement of GCV in human plasma using ultraviolet (UV) or fluorescence detection have been described previously [13–18]. However, HPLC-UV or HPLC-fluorescence techniques are less selective than HPLC-tandem mass spectrometry (MS/MS). In particular, in SOT poly-medicated patients, the measurement of GCV concentration using HPLC-UV or fluorescence detection could be incorrect because of the risk of co-elution of unspecified endogenous or exogenous compounds with similar chemical structure.

Different methods for the measurement of GCV concentration in human plasma based on HPLC-MS/MS have been published [19–22]. The method described here, however, differs essentially from previous methods, namely in the type of liquid chromatography (UPLC instead HPLC) and the protein precipitation type used for analyte extraction.

Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) is a new liquid chromatography system using high flow and pressure conditions with sub-2 µm particle columns. In addition, UPLC provides better performance than HPLC in reduced times even without working under high flow and pressure conditions, due to faster auto-sampler robotics and reduced dwell and dead volumes ($\leq 150 \mu\text{L}$). These characteristics provide more resolution and shorter retention time [23–25]. The better resolution and the narrower peaks lead to minimized interferences during ionization, and as a consequence, matrix effects could be lower, or even disappear [26,27].

The aim of this work was to develop and to validate an UPLC-MS/MS method for the measurement of GCV concentration in human plasma and, as a secondary aim, to study the interchangeability results between UPLC-MS/MS and UPLC-UV methods.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and reagents

GCV was donated by Roche Pharma (Palo Alto, CA, USA) and acyclovir (ACV) (see Fig. S1C in the Data Supplement) by Tedec-Meiji Farma (Alcalá de Henares, Madrid, Spain). LC-MS grade ammonium acetate, formic acid and zinc sulfate were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). LC-MS grade methanol was supplied by Merck Millipore Group (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was generated by a Milli-Q water purification system (Merck Millipore Group, Bedford, MA, USA).

2.2. Calibration standards, quality control samples and internal standard

Separate stock solutions of GCV 1.0 g/L free base were prepared by dissolving the appropriate amount of GCV with 0.1 N HCl in water. Drug-free plasma was obtained from a pool of plasma of different patients and was used as a biological matrix for calibration standards and quality controls (QC).

A stock calibrator (100 mg/L) and stock QC (50 mg/L) were prepared by spiking drug-free pool of human plasma with the stock solutions of

GCV. After equilibration, serial dilutions of the stock calibrator in drug-free plasma were done to obtain eight calibration standards (0.0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 10.0, 20.0 and 30 mg/L). Separately, three QC samples (2.5, 7.5 and 15.0 mg/L) were prepared as described for the preparation of the calibration standards. The calibration standards and the QC samples were stored light-protected for up to 6 months at $-75 \pm 3^\circ\text{C}$ as 100 µL aliquots in 1.5 mL-polypropylene microcentrifuge tubes, and thawed on the day of analysis.

A preparation containing ACV 25.0 g/L was used as stock solution of internal standard. After diluting the stock solution in methanol, the ACV working solution was obtained at 5.0 mg/L. This solution was stored light-protected at 2–8 °C.

2.3. Sample preparation

One hundred microliters of calibration standards, either QC or plasma samples were transferred to 1.5 mL-polypropylene microcentrifuge tubes and 100 µL of zinc sulfate 0.1 mol/L was added for protein precipitation. The mixture was vortexed for 5 s. Two hundred microliters of ACV working solution was added to the mixture and vortex-mixed for 20 s. The tubes were centrifuged for 20 min at 13,000 g at room temperature. Three hundred microliters of the clear supernatant was transferred into UPLC vials and placed in the auto-sampler ready for injection.

2.4. Instrumentation

Analyses were conducted using an Acquity® UPLC® integrated measurement system (Waters, Milford, MA, USA) consisting of a thermostatic auto-sampler, a binary solvent delivery manager and a column over a thermostated compartment. Separation was performed on an Acquity® UPLC® BEH™ C₁₈ reverse-phase column, 2.1 × 50 mm, packed with 1.7 µm particles (Waters, Milford, MA, USA). The temperature of the column chamber was held at 35 °C.

A gradient mobile phase was applied with solvent A containing 2 mM ammonium acetate and 0.1% (v/v) formic acid in water, and solvent B containing 2 mM ammonium acetate and 0.1% (v/v) formic acid in methanol. The mobile phase flow rate was maintained at 0.4 mL/min. From 0.0 to 0.3 min isocratic conditions were run with 85% A. Solvent A was decreased from 85 to 50% in the time range of 0.3–1.0 min (linear gradient). Solvent A was then increased from 50% to 85% in the time range of 1.0–1.5 min (linear gradient). Re-equilibration was performed from 1.5 to 2.5 min at 85% A. The injection volume was 20 µL in a 50 µL loop (partial loop with needle overfill injection mode) and the auto-sampler temperature was held at 4 °C.

Detection was carried out using an Acquity® TQD® tandem-quadrupole mass spectrometer (MS) equipped with a Z-spray electrospray ionization (ESI) source (Waters, Milford, MA, USA) operating in positive mode. Nitrogen was used as the nebulizing and desolvation gas, and argon was used as collision gas. The optimized MS settings employed for GCV and ACV were: capillary potential (3.5 kV), extractor voltage (3 V), RF lens voltage (0.1 V), source temperature (150 °C), desolvation temperature (450 °C), desolvation gas flow rate (900 L/h), cone gas flow rate (50 L/h), collision gas flow (0.18 mL/min), cone voltage (17 V) for GCV and ACV and collision energy (11 eV) for GCV and ACV. GCV and ACV were detected in multiple reaction monitoring (MRM) mode using mass-to-charge (*m/z*) transition of 256.1 → 152.0 and 226.1 → 152.0, respectively. The scan dwell time was set at 0.2 s for every channel.

2.5. Validation procedure

Validation was performed according to the European Medicines Agency (EMA) and Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)-International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) guidelines [28–30].

2.5.1. Calibration

Eight-level calibration standards containing GCV were processed daily before GCV quantification. Integration of smoothed peak areas and calculation of GCV concentration were performed with TargetLynx™ v 4.1 software (Waters, Milford, MA, USA).

According to EMA guideline [28], calculated concentrations of the calibration standards were all within $\pm 15\%$ of the nominal value, except for the lower limit of quantification (LLOQ) for which it was within $\pm 20\%$.

The calibration curves were generated by linear fit of the GCV/ACV standard response ratio versus GCV concentration (1/X weighting; excluding the option to force through the point of origin).

2.5.2. Selectivity

Thirty different batches of plasma from patients non-treated with GCV/VGCV but receiving other drugs such as anticonvulsants (carbamazepine, phenobarbital, phenytoin or valproic acid), antibiotics (amikacin, gentamicin, tobramycin or vancomycin), immunosuppressants (cyclosporine, everolimus, mycophenolic acid, sirolimus or tacrolimus), methotrexate or digoxin were used. Two samples were processed for each of these drugs with concentrations in the respective therapeutic intervals.

According to the EMA guideline [28], the absence of interfering components is accepted when the peak area response of interfering peak at the retention time of analyte (GCV) is less than 20% of the LLOQ for the analyte (GCV) and 5% for the internal standard (ACV).

2.5.3. Limit of detection and limit of quantification

The CLSI-IFCC C50-A guideline [29] defines the lower limit of detection (LLOD) as the lowest concentration where the signal-to-noise (S/N) ratio is three or more, and the LLOQ as the lowest concentration at which the S/N ratio is 10 or more and that could be estimated with an acceptable day-to-day imprecision (coefficient of variation of $\leq 20\%$).

To estimate the LLOD and the LLOQ, the calibrator level 3 (0.1 mg/L) was diluted two-fold, five-fold and ten-fold with drug-free plasma pool and each concentration was processed repeatedly twenty times in a single series per day.

2.5.4. Carry-over

In accordance to the EMA guideline [28], carry-over was assessed by injecting a blank sample (0.0 mg/L) after a high concentration sample at the upper limit of quantification (30.0 mg/L). Carry-over is accepted if the peak area response in the blank sample obtained after measurement of the high concentration sample is not greater than 20% of the analyte (GCV) peak area response at the LLOQ and 5% of the peak area response of the internal standard (ACV).

2.5.5. Imprecision and bias

Four samples, three QC and one LLOQ were used to estimate intra-day and day-to-day imprecision and bias according to the following equations:

$$CV(\%) = (s/\bar{x}) \cdot 100 \quad \delta_r(\%) = [(\bar{x}-\mu)/\mu] \cdot 100,$$

where CV , s , \bar{x} , δ_r and μ are coefficient of variation, standard deviation, mean, relative bias and the conventional value, respectively. Conventional value of the control samples was assigned by weighting procedures.

For intra- and inter-day imprecision and bias, twenty seven aliquots of each concentration were tested repeatedly in one day and in a single series per day, for 67 days, respectively. Coefficient of variation and δ_r results were analyzed following the EMA acceptance criteria (15% for quality control materials and 20% for LLOQ).

2.5.6. Measurement interval (linearity)

According to the EMA and CLSI EP6-A guidelines [28,30], to calculate the measurement interval, the highest calibration point (30.0 mg/L) was diluted with the calibrator level 2 (0.05 mg/L) at ratios of 4:0, 3:1, 2:2, 1:3 and 0:4 to achieve theoretical concentrations of 30.0, 22.6, 15.0, 7.5 and 0.05 mg/L, respectively. According to the EMA guideline [28], each dilution was measured in triplicate, and imprecision and bias should be $\pm 15\%$.

The measured values were plotted on the y-axis versus the expected or known values on the x-axis. The measured values were considered to be linear following criteria from the CLSI document EP6-A [30], as assessed in the Analyse-it® statistical software (Analyse-it Software Ltd, Leeds, UK).

2.5.7. Recovery

Recovery was obtained by comparing the peak area response of six replicates of GCV spiked in human plasma produced at three different concentrations (0.2, 4.0 and 15.0 mg/L) for GCV with the peak area response of equivalent neat samples, respectively. Similarly, the recovery of ACV was studied. According to CLSI-IFCC C50-A guideline [29], the variation in recovery between all concentrations should be less than 15%.

2.5.8. Matrix effect

According to the EMA guideline [28] and Viswanathan et al. [31], the quantitative measure of matrix effect can be termed as matrix factor and defined as the ratio of the peak area response in the presence of matrix (measured by analyzing blank matrix spiked after extraction with analyte), to the peak area response in the absence of matrix (pure solution of analyte):

$$\text{Matrix factor} = \text{Peak area response in presence of matrix components}/\text{Peak area response in absence of matrix components}.$$

A matrix factor greater than 1 may be due to ion enhancement and less than 1 may be due to ion suppression. Similarly internal standard can also experience ion enhancement or ion suppression.

To take into account the matrix effects of internal standard (in our case, ACV), an ACV-normalized matrix factor was calculated by dividing the matrix factor of GCV by the matrix factor of the ACV. The ACV-normalized matrix factor was calculated in ten different lots of matrix plasma at three different concentrations (0.2, 4.0 and 15.0 mg/L) to determine the variability of matrix effect in samples from different individuals. The variability in matrix effect as measured by the coefficient of variation should be less than 15%.

2.5.9. Stability study

Stability studies included stock solution stabilities of GCV and ACV, extracted samples in-auto-sampler stability and short- and long-term stabilities for GCV.

To evaluate the effect of refrigeration, the peak area response of the stock solutions refrigerated at $5 \pm 3^\circ\text{C}$ was compared with fresh stock at room temperature. The stability of samples in the auto-sampler was tested after 24 hour storage at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ to allow for sample waiting or re-injection. To evaluate short-term stability, the aliquots for QC were first stored at $5 \pm 3^\circ\text{C}$ for 7 days and then equilibrated to room temperature and extracted and tested against their fresh counterparts. For long-term stability evaluation, the aliquots for QC were first frozen at $-75 \pm 3^\circ\text{C}$ for 6 months and then thawed before extraction and tested against fresh calibration and QC samples. Differences between the initial concentrations and after storage period showed degradation.

All stability exercises were carried out using ten replicates of QC samples at three different concentration levels (2.5, 7.5 and 15.0 mg/L) against fresh calibration standards and the results were compared with the fresh QC samples. European Medicines

Agency [28] defines stable samples when the mean concentration at each level is within $\pm 15\%$ of the nominal concentration.

2.5.10. Interchangeability study

According to a study protocol previously approved by the Ethics Committee of our University Hospital, blood samples were taken from renal transplantation patients with GCV/VGCV therapy (prophylaxis or treatment). Blood samples were collected in plasma tubes with EDTA-K₃ at 0.5–1 h, 3–4 h and 6–8 h after GCV/VGCV administration. Samples were centrifuged at 1200 g for 10 min at 4 \pm 1 °C and plasma was stored at -75 ± 3 °C until the analysis.

For 60 days, 70 plasma samples were analyzed in duplicate by two chromatographic methods, UPLC-UV and UPLC-MS/MS. The UPLC-UV was a previously validated method in an Acquity® UPLC chromatograph (Waters, Milford, MA, USA) coupled with an UV detector set to 254 nm [13]. The analytical column was an Acquity® UPLC HSS 2.1 \times 50 mm; 1.8 μ m from Waters. The temperature of the column chamber was held at 40 °C. Mobile phase was a potassium monophosphate water solution (pH 4.0; 0.02 M) containing 1% of acetonitrile and the flow rate was 0.7 mL/min. The injection volume was 7.5 μ L in a 10 μ L loop (partial loop with needle overfill injection mode).

The Passing–Bablok non-parametric regression and Bland–Altman parametric regression tests [32–35] were used to study the interchangeability between results obtained by UPLC-UV and UPLC-MS/MS methods. Calculations were made with MedCalc statistical program version 11.5.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

2.6. Application to clinical pharmacokinetic study

The UPLC-MS/MS method here described was developed to measure GCV concentrations in human plasma for pharmacokinetic investigations and it is currently applied in a research protocol. The assay was a pharmacokinetic study that included dose adjustment to achieve a target plasma exposure (AUC 40–50 mg·h/L) from the start of the treatment based on the PK model previously developed. It was approved by the Ethics Committee of our Hospital and all volunteers signed their informed consent to participate in the study. The model provided initial dose optimization based on clearance of creatinine values and established target exposure. Areas under the curve values were predicted by Bayesian method.

To demonstrate that this UPLC–MS/MS method was applicable to pharmacokinetic studies, it was used to measure GCV concentrations in human plasma from renal transplant subjects treated with oral VGCV or intravenous GCV under the specific protocol. Three blood samples were taken from each patient at steady-state for TDM. Blood samples were collected as explained in Section 2.5.9.

On the basis of the previous work [7], viremia can be suppressed during prophylaxis with exposures of 40 to 50 mg·h/L; hence, in the current study, a target exposure of 45 mg·h/L was considered adequate for that purpose.

3. Results

Under the chromatographic conditions described above for UPLC-MS/MS method, the retention time for GCV and ACV was 0.51 and 0.53 min, respectively. Typical chromatograms are shown in Fig. 1. The UPLC-MS/MS run time was 2.5 min, including the time necessary for the solvent gradient to return to baseline conditions before the next injection.

3.1. Selectivity

No interfering peaks were present in any plasma sample from patients receiving other drugs. The peak area responses observed in all plasma batches at GCV retention time were $\leq 9.1\%$ of the LLOQ of GCV, being less than 3.9% at the ACV retention time.

3.2. Limit of detection and limit of quantification

The LLOD was 0.03 mg/L (S/N ratio of 3.4) and the LLOQ was 0.06 mg/L (S/N ratio of 10.5, CV of 19.4%).

3.3. Carry-over

Peak area response observed in the blank sample after measurement of the high concentration sample was 16.1% of the GCV peak area response at the LLOQ and 3.1% the peak area response of the ACV.

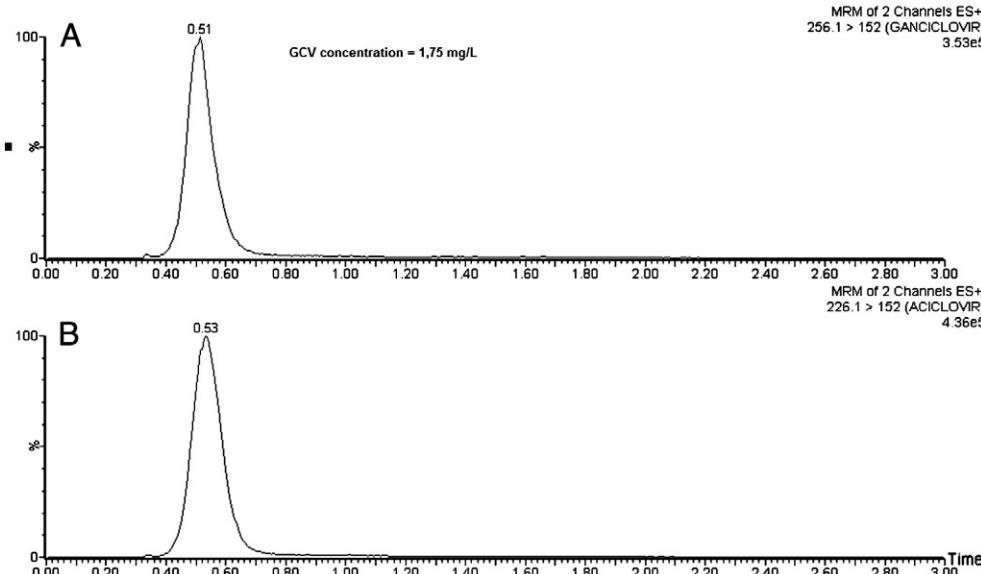


Fig. 1. A representative UPLC-MS/MS chromatogram for (A) ganciclovir (patient sample concentration at 1.75 mg/L) and (B) acyclovir in human plasma.

Table 1

Intra-day and day-to-day imprecision and bias values obtained in UPLC-MS/MS for ganciclovir concentration in human plasma.

	Sample	n	μ (mg/L)	\bar{x} (mg/L)	CV (%)	δ_r (%)
Intra-day assay	QC 1	27	2.50	2.46	5.4	-1.6
	QC 2	27	7.50	7.42	4.2	-1.1
	QC 3	27	15.0	14.6	3.6	-2.6
Day-to-day assay	LLOQ	27	0.050	0.055	19.4	10.0
	QC 1	27	2.50	2.43	6.2	-2.8
	QC 2	27	7.50	7.29	4.9	-2.8
	QC 3	27	15.0	14.4	4.2	-4.0

QC 1, internal quality control 1; QC 2, internal quality control 2; QC 3, internal quality control 3; LLOQ, low limit of quantification; n, number of samples processed; μ , conventional values (these values are assigned by weighting of the internal control materials); \bar{x} , mean values; CV, coefficients of variation; δ_r , relative biases.

3.4. Imprecision and bias

Data of intra-day and day-to-day imprecision and relative bias are summarized in Table 1. Imprecision and relative bias were lower than the maximum permissible requirements for these metrological characteristics (15% for quality control materials and 20% for LLOQ).

3.5. Measurement interval (linearity)

Measurement interval was found to be linear between 0.06 and 30.0 mg/L. The resulting mean measured values of each sample were compared to predicted concentrations and yielded a linear regression of $y = 1.064 \cdot x + 0.059$ ($r^2 = 0.9995$). Dilution integrity of the samples achieved acceptance criteria for imprecision and bias (15%).

3.6. Recovery

The mean recovery (process efficiency) for GCV and ACV from plasma was 83.4% and 80.3%, respectively (Table 2). The variation in recovery between all concentrations (CV) was 2.9% and 2.1% for GCV and ACV, respectively (Table 2).

3.7. Matrix effect

Values for matrix factor, variability of matrix effect and ACV-normalized matrix factor in different lots of plasma are summarized in Table 3. Evaluation of the matrix effect showed ion suppression for GCV. As shown in Table 3, the matrix effects were well compensated by the internal standard, ACV.

3.8. Stability study

The different concentrations of GCV in plasma were stable during storage at $5 \pm 3^\circ\text{C}$, $-75 \pm 3^\circ\text{C}$ and $4 \pm 1^\circ\text{C}$ in auto-sampler for a period of 7 days, 6 months and 24 h, respectively (see Table S2 in the Data Supplement). Stock solutions of GCV and ACV stored at $5 \pm 3^\circ\text{C}$ were stable for 15 days.

Table 2

Recovery values (%) for ganciclovir and acyclovir (internal standard).

Sample number	Concentration (mg/L)	Ganciclovir	Acyclovir
1	0.2	82.2	78.8
2	4.0	86.2	82.1
3	15.0	81.9	79.9
\bar{x} (%)		83.4	80.3
s (%)		2.4	1.7
CV (%)		2.9	2.1

\bar{x} , mean values; s, standard deviation; CV, coefficients of variation.

Table 3

Matrix factor and ACV-normalized matrix factor for ganciclovir in different lots of plasma.

Matrix Direction	Matrix factor (%)			ACV-normalized matrix factor		
	0.2 mg/L	4.0 mg/L	15.0 mg/L	0.2 mg/L	4.0 mg/L	15.0 mg/L
1	91.6	80.5	84.9	1.073	0.820	0.941
2	96.7	90.5	96.4	1.045	0.910	1.110
3	97.6	85.4	90.1	1.103	1.039	1.001
4	99.2	94.6	97.8	1.116	0.954	1.084
5	80.1	82.1	82.2	0.888	0.900	0.826
6	98.2	95.4	97.2	0.981	0.971	1.042
7	83.9	82.9	85.4	0.837	0.916	0.893
8	97.6	96.8	97.2	1.122	0.976	0.977
9	82.4	83.1	85.2	0.826	1.023	0.935
10	97.6	94.7	97.9	0.887	1.152	1.001
\bar{x}	92.5	88.6	91.3	0.988	0.966	0.981
s	7.5	6.4	6.4	0.119	0.091	0.086
CV	8.1	7.2	7.0	12.0	9.4	8.8

\bar{x} , mean values; s, standard deviation; CV, coefficients of variation.

The results for all the stability exercises were within the acceptable limits ($\pm 15\%$).

3.9. Interchangeability study

Plasma sample results from solid organ transplant patients (prophylaxis or treatment with GCV/VGCV) processed by UPLC-MS/MS and UPLC-UV are shown in Table S3 and Fig. S4 in the Data Supplement. The results obtained by both methods were interchangeable.

3.10. Clinical application

The method was successfully applied in the pharmacokinetic study and the drug adjustment was performed based on plasma concentration values measured by UPLC-MS/MS. The time profiles of GCV plasma concentrations following GCV/VGCV administration of a typical patient are displayed in Fig. 2. Superimposed values of the observed and individually predicted GCV concentrations based on the pharmacokinetic model [8] are shown. Area under the curve values were predicted by Bayesian method based on plasma concentrations sampled at three time points after dose. Target AUC values were within 40–50 mg·h/L as recommended by Wiltshire et al. [7] avoiding adverse events and development of viral resistances. Thus, it is important to achieve the required exposure, as the suppression of CMV viremia and disease is related to GCV exposure.

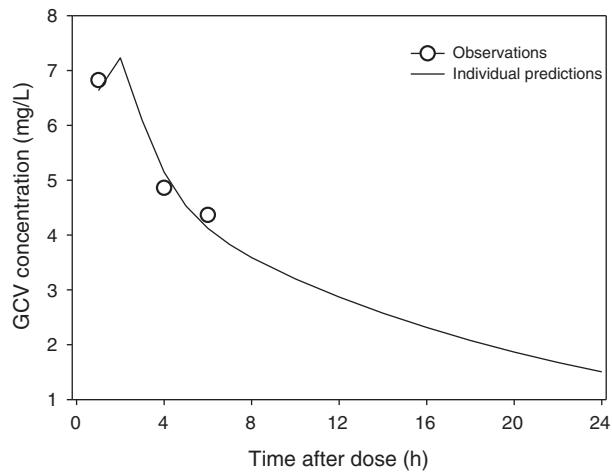


Fig. 2. Time profile of GCV plasma concentrations following GCV/VGCV administration to a typical patient. The observed GCV values from the patient are shown superimposed on the individually predicted GCV.

4. Discussion

An ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UPLC–MS/MS) method was developed and validated for the measurement of GCV concentrations in human plasma and is currently applied in a research protocol. This method could support the therapeutic drug monitoring of GCV based on a population pharmacokinetic model described by Caldes et al. [8]. Intrinsic characteristics of UPLC–MS/MS technique let us achieve shorter retention time than those reached using other methods [19–22].

Protein precipitation with a solution of zinc sulfate 0.1 mol/L and methanol simplified the extraction procedures published by others [19,20].

Regarding the internal standard, due to problems of availability and high price of stable labeled compounds, ACV (a compound with similar chemical structure) was the first choice for the analysis as other authors [19–21]. Similar recovery and narrow peaks as GCV observed during the chromatography led to good results. On the other hand, ACV is unlikely to be co-administered with GCV, co-elutes simultaneously with GCV and will therefore be subjected to the same matrix effects as we demonstrated in our matrix effect study and other authors described [19–21]. For all these reasons, we considered ACV as a good internal standard.

Various combinations of mobile phase and gradient elution modes were performed to achieve a good resolution and symmetric peaks, a high response, a short retention time, and better peak shape. The choice of the monitored ions was made after studying MS/MS fragmentation pattern of GCV and ACV. Ganciclovir was quantified using the MRM mode due to its high sensitivity data acquisition when the precursor and the product ions are monitored. The first quadrupole selected the protonated ion at m/z 256.1 and 226.1. Fractioned ions m/z 152.0 for GCV and ACV were detected and selected in the third quadrupole.

In the validation procedure, different analytical characteristics and studies were evaluated. No interfering peaks were present in any plasma sample from patients receiving other drugs indicating that the proposed UPLC–MS/MS method provides acceptable selectivity. Also, no significant carry-over was observed. Recovery values from plasmas were above 80% for GCV and ACV. The imprecision and bias values obtained, for each concentration level, were found to neither exceed the 15% of the CV for QC samples nor the 20% for LLOQ; thus conforming to the EMA criteria [28]. These results indicate that the proposed UPLC–MS/MS method provides acceptable precision and veracity. The LLOQ (0.06 mg/L) obtained was acceptable considering the expected concentrations in the pharmacokinetic study. The coefficient of determination (r^2) obtained was greater than 0.999, suggesting that the UPLC–MS/MS method presented acceptable linearity within the concentration range of 0.06–30.0 mg/L.

During validation, the evaluation of the matrix effect and the variability of matrix effect in samples from different individuals are a crucial key. These two issues are often not properly studied and could compromise the analysis performance. Although protein precipitation is probably the extraction method most prone to matrix effects, in our evaluation of the matrix effect we observed that the concentration of the three samples assayed showed a steady value given that, the use of ACV as an internal standard compensate the existing ion suppression observed in the GCV.

Our UPLC–MS/MS method, compared with the UPLC–UV method, provides lower LLOQ, higher selectivity and shorter run time. The higher selectivity is necessary to improve the GCV TDM in SOT patients, decreasing the risk of co-elution of unspecified endogenous or exogenous compounds with similar chemical structure to GCV. Despite the differences observed when using the two methods, with advantages for UPLC–MS/MS, there was a good correlation between them, being both methods interchangeable and useful for determining GCV concentrations.

5. Conclusions

Viremia suppression during CMV therapy is related with GCV exposure (AUC) of 40–50 mg·h/L, suggesting that dose adjustment to a target exposure value could improve the outcome in SOT patients. We developed a simple UPLC–MS/MS method for measurement of GCV plasma concentrations that could be useful for TDM of CMV therapy in SOT patients. In addition, it could also be relevant for further pharmacokinetic studies required for the daily practice of clinical laboratory to measure the concentration of GCV in human plasma.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2013.09.049>.

Acknowledgments

Nuria Lloberas is a researcher in ISCIII Miguel Servet (CP06/00067) and this study was partly supported by a grant from Instituto de Salud Carlos III and Ministerio de Sanidad y Consumo MSPSI (EC10-144) and PI12/01564.

References

- [1] Tolokoff-Rubin NE, Rubin RH. The impact of cytomegalovirus infections on graft function and patient outcome. *Graft* 1999;5101–3 [Suppl].
- [2] McGavin JK, Goal JK. Ganciclovir: an update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Drugs* 2001;61:1153–83.
- [3] Crumpacker CS. Ganciclovir. *N Engl J Med* 1996;335:721–9.
- [4] Pescovitz MD, Rabkin J, Merino R, et al. Valganciclovir results in improved oral absorption of ganciclovir in liver transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2811–5.
- [5] Pescovitz MD, Pruitt TL, Gonwa T, et al. Oral ganciclovir dosing in transplant recipients and dialysis patients based on renal function. *Transplantation* 1998;66:1104–7.
- [6] 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;44:495–507.
- [7] Wiltshire H, Paya C, Pescovitz MD, et al. Pharmacodynamics of oral ganciclovir and valganciclovir in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2005;79:1477–83.
- [8] Caldés A, Colom H, Armendariz 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;53:4816–24.
- [9] Bedino G, Esposito P, Bosio F, et al. The role of therapeutic drug monitoring in the treatment of cytomegalovirus disease in kidney transplantation. *Int Urol Nephrol* 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s11255-012-0293-y>.
- [10] Piketty C, Bardin C, Gilquin J, et al. Monitoring plasma levels of ganciclovir in AIDS patients receiving oral ganciclovir as maintenance therapy for CMV retinitis. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:117–20.
- [11] Fishman J, Doran M, Volpicelli S, et al. Dosing of intravenous ganciclovir for the prophylaxis and treatment of cytomegalovirus infection in solid organ transplant. *Transplantation* 2000;69:389–94.
- [12] Zhao W, Fakhoury M, Filia M, et al. Individualization of valganciclovir prophylaxis for cytomegalovirus infection in pediatric kidney transplant patients. *Ther Drug Monit* 2012;34:326–30.
- [13] Padellés A, Colom H, Armendariz Y, et al. Determination of ganciclovir in human plasma by ultra performance liquid chromatography-UV detection. *Clin Biochem* 2012;45:309–14.
- [14] Yoshida T, Takahashi R, Imai K, Uchida H, Arai Y, Ohishi T. A simple, sensitive determination of ganciclovir in infant plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr Sci* 2010;48:208–11.
- [15] Dao YJ, Jiao Z, Zhong MK. Simultaneous determination of aciclovir, ganciclovir, and penciclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2008;867:270–6.
- [16] Asberg A, Nupen Hansen C, Reubaert L. Determination of ganciclovir in different matrices from solid organ transplanted patients treated with a wide range of concomitant drugs. *J Pharm Biomed Anal* 2007;43:1039–44.
- [17] Teshima D, Otsubo K, Yoshida T, Itoh Y, Oishi R. A simple and simultaneous determination of acyclovir and ganciclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 2003;17:500–3.
- [18] Merodio M, Campanero MA, Mirshahi T, Mirshahi M, Irache JM. Development of a sensitive method for the determination of ganciclovir by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2000;870:159–67.
- [19] Xu K, Lanuti M, Lambright ES, Force SD, Albelda SM, Blair IA. A rapid and sensitive method for the quantification of ganciclovir in plasma using liquid chromatography/selected reaction monitoring/mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 2000;14:93–8.
- [20] Singh O, Saxena S, Mishra S, Khuroo A, Monif T. Determination of valganciclovir and ganciclovir in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometric detection. *Clin Biochem* 2011;44:907–15.
- [21] Xu HR, Li XN, Chen WL, Liu GY, Chu NN, Yu C. A sensitive assay for simultaneous determination of plasma concentrations of valganciclovir and its active metabolite ganciclovir by LC/MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;848:329–34.

- [22] Heinig K, Wirz T, Gajate-Perez A, Belli S. Determination of ganciclovir and its prodrug valganciclovir by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011;879:436–42.
- [23] Churchwell MI, Twaddle NC, Meeker LR, Doerge DR. Improving LC-MS sensitivity through increases in chromatographic performance: comparisons of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS. *J Chromatogr B* 2005;825:134–43.
- [24] Novakova L, Matyssova L, Solich P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta* 2006;68:908–18.
- [25] Leandro CC, Hancock P, Fussell RJ, Keely BJ. Comparison of ultraperformance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2006;1103:94–101.
- [26] Van De Steene JC, Lambert WE. Comparison of matrix effects in HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS analysis of nine basic pharmaceuticals in surface waters. *J Am Soc Mass Spectrom* 2008;19:713–8.
- [27] Chambers E, Wagrowski-Diehl DM, Lu Z, Mazzeo JR. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *J Chromatogr B* 2007;852:22–34.
- [28] European Medicines Agency. Guideline on validation of bioanalytical methods; 2009, London. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf; 2009. [Accessed: 22 April 2012].
- [29] Clinical and Laboratory Standards Institute, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Mass spectrometry in the clinical laboratory: general principles and guidance. C50-P. Wayne, PA: CLSI; 2007.
- [30] Clinical and Laboratory Standard Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline. EP6-A. Wayne, PA: CLSI; 2003.
- [31] Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, et al. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. *Pharm Res* 2007;24:1962–73.
- [32] Passing H, Bablok WA. New biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:709–20.
- [33] Passing H, Bablok WA. General regression procedure for method transformation. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988;26:783–90.
- [34] Altman DG, Bland JM. Measurement in medicine: the analysis of method comparison studies. *Statistician* 1983;32:307–17.
- [35] Bland JM, Altman. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;327:307–10.

RESULTATS

Capítol 3

Optimal sparse sampling for estimating ganciclovir/valganciclovir AUC in solid organ transplant patients using NONMEN.

Padullés A, Colom H, Caldés A, Cerezo G, Torras J, Grinyó JM and Lloberas N
Ther Drug Monit 2014;36(3):371-7.

RESULTATS

Optimal Sparse Sampling for Estimating Ganciclovir/Valganciclovir AUC in Solid Organ Transplant Patients Using NONMEM

Ariadna Padullés Caldés, PharmD,* Helena Colom, PharmD, PhD, † Anna Caldes,‡ Gema Cerezo, MLT,‡ Joan Torras, MD, PhD,‡ Josep M. Grinyó, MD, PhD,‡ and Núria Lloberas, PharmD, PhD‡

Background: Ganciclovir and valganciclovir (GCV/VGCV) are used for the treatment and prophylaxis of cytomegalovirus in solid organ transplant (SOT) patients. An area under the time-concentration curve of 40–50 $\mu\text{g} \times \text{h/mL}$ is related to efficacy. Therapeutic drug monitoring could prevent suboptimal drug exposure and adverse events, but obtaining full concentration profiles is not feasible. Sampling optimization by developing a reliable and clinically applicable limited sampling strategy (LSS) may simplify dose adjustment.

Methods: An LSS was developed using an original pharmacokinetic (PK) data set of 40 full profiles from 20 adult SOT patients. The LSS was developed based on population and Bayesian prediction approaches. Population PK parameters from a previous model were used for simulation or as priors (NONMEM version 7.2). Median percentage of prediction error and median of absolute percentage prediction error were calculated for plasma clearance (CL) and central compartment distribution volume (V_2). Bias and precisions were compared using 1-way analysis of variance (SPSSv19.0).

Results: Sampling windows were designed according to the PK profile previously observed with the entire set of data. The 4 windows selected were distributed from 0.5 to 1.5 hours, 2 to 3 hours, 4 to 5 hours, and 6 to 8 hours. Predose and concentrations beyond 8 hours were not considered in any case because simulated negative concentrations occurred in both cases. Predicted exposure using 3 sampling times (0.5–1.5, 4–5, and 6–8 hours) showed the best predictive performance, by either the population or Bayesian approaches. Bias and imprecision for CL and V_2 were 0 and 0.60%, and –0.78% and 0.78%, respectively.

Conclusions: GCV/VGCV area under the time-concentration curve in SOT patients could be predicted with acceptable accuracy for

clinical management and dose individualization using LSS. The estimator of GCV/VGCV, using 3 concentrations measured at 0.5–1.5, 4–5, and 6–8 hours after drug intake, could be used for dose adjustment.

Key Words: ganciclovir, limited sampling strategy, cytomegalovirus, therapeutic drug monitoring

(*Ther Drug Monit* 2014;36:371–377)

INTRODUCTION

Cytomegalovirus (CMV) is the most common opportunistic pathogen affecting solid organ transplant (SOT) patients.¹ Ganciclovir (GCV) was the initial choice for both prevention and treatment of CMV disease in transplant patients.² Intravenous (IV) administration of GCV³ has been the gold standard for the treatment of established infection, whereas oral GCV was given for CMV prophylaxis.⁴ Valganciclovir (VGCV), a prodrug of GCV, provided higher oral bioavailability than GCV^{5,6} and offered the prospect of replacing suboptimal oral prophylactic treatment without the inconvenient IV administration.

Therapeutic GCV plasma concentrations in SOT recipients receiving oral VGCV therapy typically range from 2.0 to 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.⁷ The suppression of CMV viremia and disease is related to exposure to GCV, thus it is important to achieve the required exposure, avoiding adverse events and development of viral resistances. According to Wiltshire et al,⁸ exposure values of 40–50 $\mu\text{g} \times \text{h/mL}$, given by area under the concentration-time curve (AUC_{0-24}) after once-daily dose at steady state, predicted a low incidence of breakthrough viremia during prophylaxis. Otherwise, this risk was increased up to 8-fold with AUC_{0-24} of 25 $\mu\text{g} \times \text{h/mL}$. Therefore, the target AUC values of 40–50 $\mu\text{g} \times \text{h/mL}$ was recommended during prophylactic therapy in both adult and pediatric SOT patients to achieve optimal exposure.

These findings provide a rational AUC for GCV/VGCV dose adjustment, but implementations of this strategy in clinical practice are lacking. For practical and cost issues, a full AUC with a minimum of 6–8 blood samples over 24 hours is not a feasible option. Therapeutic drug monitoring (TDM) practice obtaining full concentration-time curve is a burden to the patient, expensive, and time consuming. These problems could be overcome with a limited sampling procedure based on Bayesian predictors.

Received for publication February 28, 2013; accepted August 26, 2013.

From the *Pharmacy Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat; †Department of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, School of Pharmacy, University of Barcelona; and ‡Nephrology Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

Supported by a grant from Instituto de Salud Carlos III and Ministerio de Sanidad y Consumo MSPSI (EC10-144) and PI12/01564.

N. Lloberas is a researcher in ISCIII Miguel Servet (CP06/00067).

The authors declare no conflict of interest.

Correspondence: Ariadna Padullés Caldés, PharmD, Pharmacy Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, 08907, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain (e-mail: apadules@bellvitgehospital.cat). Copyright © 2013 by Lippincott Williams & Wilkins

Caldés et al⁹ developed a population pharmacokinetic (PK) model of GCV/VGCV in SOT patients with CMV infection that provided initial dose optimization based on clearance of creatinine (CLCR) values and a given target exposure. This study allowed the comparison of the percentage of patients with AUC values falling within the therapeutic exposure after the manufacturer's recommended doses versus after dose optimization. In addition, results indicated that dosing adjustment could improve patient outcome, specifically when changes in renal function occur throughout the treatment period.

No previous studies with data obtained from routine TDM of GCV/VGCV have been in adult SOT patients. Only some case reports in adults note the importance of dose optimization.^{10–12} In pediatric kidney transplant patients, the need for dose individualization has been considered. Zhao et al¹³ developed and validated a PK model and proposed a Bayesian estimator based on 3 concentrations after drug intake that could be useful for individualization of VGCV prophylaxis in pediatric patients.

The aim of our study was to optimize sampling times during GCV/VGCV therapy by developing and validating a clinically applicable limited sampling strategy (LSS) to predict AUC, using population and Bayesian estimation, in situations in which extensive pharmacokinetic sampling is not feasible as such during TDM.

PATIENTS AND METHODS

Data Collection and Drug Analysis

The current LSS was established based on a previously developed PK model⁹ in 20 adult SOT patients receiving treatment with GCV (5 days) followed by VGCV (16 days). According to a study protocol previously approved by the Ethics Committee of University Hospital, blood samples were taken at steady state on day 5 and day 15. Pharmacokinetic profiles consisted of 10 blood samples collected before and during 12 hours (at 30, 60, and 90 minutes and 2, 3, 4, 6, 8, and 12 hours) after the start of GCV infusion or VGC oral administration.

GCV concentrations were measured by high-performance liquid chromatography with UV detection according to a previously validated method.¹⁴ Linearity was shown over a range of 0.5–30 µg/mL, with an intra- and inter-assay precision of <7.0% and an inaccuracy of <5%. The lower limit of quantification (LLOQ) was 0.5 µg/mL.

LSS Development

The LSS was developed based on either a population pharmacokinetic modeling or a Bayesian prediction approach. Population pharmacokinetic parameters from a previously developed and validated model⁹ were used either for simulation (population modeling approach) or as priors, when the Bayesian prediction method was applied. This model had been parameterized in terms of total GCV clearance (CL), central compartment distribution volume (V_2), distributional clearance (CL_D), peripheral compartment distribution volume (V_3), first-order absorption rate constant (KA), bioavailability (F_1), and lag time. Between-patient variability was associated

with CL, V_2 , F_1 , and KA, and CLCR was the best predictor of CL. The final population pharmacokinetic parameters were those summarized in Table 1, and the time profiles of GCV concentrations after IV GCV and oral VGCV administration are shown in Figure 1.

Selection of Sampling Times

In both cases, the LSS design was established based on the most informative sampling times that allowed accurate and precise estimation of the pharmacokinetic parameters, but also on clinical practice constraints. Hence, during the clinical routine, it is accepted that the number of samples should not exceed 3 to avoid pain and stress and should be drawn within 8 hours postdose to avoid hospitalization. However, drug concentrations at the selected sampling times should always be greater than the LLOQ of the analytical method. This aspect was covered by simulating 1000 full data sets for each dosing regimen, adjusted by CLCR (Cockcroft–Gault formula¹⁵) according to the manufacturer's recommendations. The population pharmacokinetic parameters of the previous model developed were used for this purpose. The 95% confidence intervals (CI) of predicted concentrations at each experimental time were calculated. The experimental times with the lower limit of the 95% CI less than the LLOQ were not further considered for the LSS.

Then, the entire concentration versus time profile was split into 4 sampling windows and different sampling time designs were established, including maximum 1 sample for each window, so that random combinations from 2 to 5 sampling times were selected covering the full PK profile.

TABLE 1. Final Population Pharmacokinetic Parameters

Parameters	Value
Pharmacokinetics Parameters	
CL, L/h	7.49
V_2 , L	31.90
CL_D , L/h	10.20
V_3 , L	32.0
KA, h ⁻¹	0.895
F_1	0.825
LT, h	0.382
Interindividual variability*	
CL	0.107
V_2	0.227
KA	0.464
F_1	1.54
Residual variability†	
Additive σ_1 , mcg/mL	0.465
Proportional σ^2_2	0.143

*Estimates of interpatient variability are expressed as variance values (ω^2).

† σ_1 , standard deviation of additive component of residual variability; σ^2_2 , variance of proportional component of residual variability.

CL, total GCV clearance; CL_D , distributional clearance; F_1 , bioavailability; KA, first-order absorption rate constant; LT, lag time; V_2 , central compartment distribution volume; V_3 , peripheral compartment distribution volume.

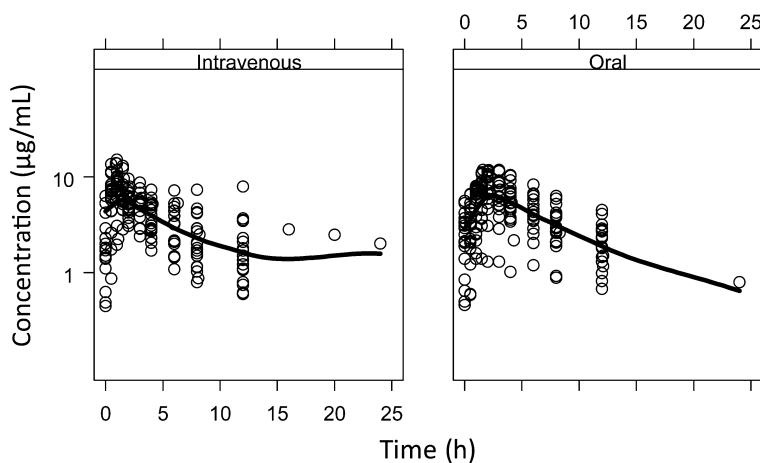


FIGURE 1. GCV concentrations versus time postdose after IV administration of ganciclovir (left) and oral administration of VGCV (right) in SOT patients. Circles represent observed GCV concentrations. Solid lines represent the smooth line indicating the general data trend.

Computing of PK Parameters

Population Pharmacokinetic Modeling Approach

For each timing design and CLCR value, 50 data sets of 15 individuals with varying CLCR from 20 to 90 mL/min were simulated based on the population PK parameter values of the previous model. Doses were assigned depending on renal function, given by CLCR values (ranging from 20 to 90 mL/min), according to the manufacturer's recommendations. Simulated serum concentrations were used to reestimate population pharmacokinetics parameters. The first-order conditional estimation method with interaction was used throughout the estimation process with NONMEM version 7.2 (nonlinear mixed-effects model; Icon Development, Ellicott City, MD). Precision, plausibility of the parameters obtained, successful minimization process, and the number of significant digits higher than 3 were the diagnostic criteria considered.

Bayesian Approach

In the Bayesian approach, the population PK parameters of the model developed previously were used as priors to estimate the individual pharmacokinetic parameters of each limited sampling design. The reference PK parameter values were also calculated by Bayesian estimation (MAXEVAL = 0 and POSTHOC options) using all the available time points. The sampling schedules with best performance according to the population approach were those also investigated in this case.

Comparison of Strategies

To evaluate the reliability of the parameter estimates using the LSS, comparisons of population and individual PK parameters estimated from the proposed schedules versus those obtained from the full original sampling times (reference parameters) were performed. Hence, because of their most clinical relevance, bias and precision were calculated for only plasma clearance (CL) and central compartment distribution volume (V_2), to assess the predictive performance of each LSS according to the guidelines proposed by Sheiner and Beal.¹⁶ The median values of the percentage of prediction error (MPPE%) and its 95% CI were calculated to evaluate the bias and the median of absolute percentage prediction

error (MAPE%), and its 95% CI was a measure of imprecision.

$$\text{MPPE\%} = \text{median } ((P_{\text{LSS}} - P_{\text{ref}})/P_{\text{ref}}) \times 100,$$

$$\text{MAPE\%} = \text{median } (|P_{\text{LSS}} - P_{\text{ref}}|/P_{\text{ref}}) \times 100,$$

where, P_{LSS} is the population or individual PK parameters estimated from the LSS, and P_{ref} is the population or individual PK parameters estimated from the full intensive sampling profile.

Values of MPPE and MAPE of <15% were considered acceptable, as is the practice in clinical studies.¹⁷ Bias and precisions were compared among designs through 1-way analysis of variance using the SPSSv19.0 statistical package. A significance level of 0.05 was assumed in all the statistical analyses.

RESULTS

Sampling windows were designed according to the PK profile previously observed with the entire set of data.⁹ The 4 windows selected were distributed from 0.5 to 1.5 hours, 2 to 3 hours, 4 to 5 hours, and 6 to 8 hours. Table 2 summarizes the 20 sampling schedules tested in NONMEM. Although the inclusion of predose concentrations had been considered in each sampling strategy (designs 1–11) initially, simulated negative concentrations resulted in all cases. Therefore, this sampling time was not considered further, leading to 9 sampling combinations from 4 to 2 windows (designs 12–20). This was in agreement with the simulations performed with the entire PK profiles. These showed that for times beyond 8 hours, concentrations were less than the LLOQ so that the last sampling time had to be limited to 8 hours postdose.

The bias and imprecision estimates for CL and V_2 corresponding to each sampling strategy when the population approach was applied are displayed in Table 3. According to these results, none of the sampling strategies investigated was significantly biased, with MPPE% values being always lower than 4% and 10% for CL and V_2 , respectively. Moreover the 95% CI included the zero value in all the cases.

TABLE 2. Limited Sampling Strategies

		Sampling Strategies (Including Predose)										
Windows (Time After Dose)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	0	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
1	0.5–1.5 h	×	×		×	×			×			
2	2–3 h	×	×	×		×	×			×		
3	4–5 h	×	×	×	×		×	×		×		
4	6–8 h	×		×	×			×			×	

		Sampling Strategies (Not Including Predose)								
Windows (Time After Dose)		12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	0.5–1.5 h	×	×		×	×			×	
2	2–3 h	×	×	×		×	×		×	
3	4–5 h	×	×	×	×		×	×		
4	6–8 h	×		×	×			×	×	×

Imprecision values given by the MAPE% were also acceptable in all the cases (lower than 5% and 11% for CL and V_2 , respectively). However, for sampling strategies 13–14 (using 3 time points) and 16–20 (using 2 time points), it was necessary to fix both peripheral distribution volume (V_3) and distributional clearance (CL_D) values, to get successful estimations of the parameters of interest, that is, CL and V_2 . The best predictive performance (lowest bias and greatest precision) was obtained with the limited sampling design number 15, in which, case fixing pharmacokinetic parameters was not necessary. In that schedule, the median bias estimate for CL was zero, and the 95% CI of the MAPE was –1.03% to 0.75%, including the zero value. The median imprecision for CL was

0.60%, and the 95% CI of the MAPE was 0.13%–1.03%. Regarding V_2 , a similar trend was observed (median bias and imprecision of –0.78 and 0.78, respectively) although larger 95% CI for both bias (–2.70 to –0.08) and imprecision (0.08–2.70) were found.

Design number 12, with 4 time points, also performed adequately with high accuracy and precision (Table 3). On inspection of box plots (Fig. 2) of the MPPE estimates of each LSS for CL, the lowest median bias was observed for sparse sampling design numbers 12, 15, and 19. Among the 3 selected schedules, it was not necessary to fix any PK parameter for designs 12 and 15, unlike design 19, which also showed the largest interquartile range in bias estimation. Similarly this occurred for V_2 (Fig. 3).

The bias and imprecision estimates for the individual Bayesian CL and V_2 values predicted, from the different strategies, are shown in Table 4. According to these results, design numbers 12, 13, 15, and 19 were those showing the best predictive performance. Bias and imprecision estimated for CL were lower than 6% and 10%, respectively, in all the cases. Higher values of both were found in the case of V_2 (bias lower than 14% and imprecision lower than 33%). Among them, schedule numbers 13 and 15 showed the lowest and closest bias and imprecision values for both parameters (CL and V_2). In the case of CL, median bias values of –5.690 (95% CI, –11.87 to 7.28) and –2.52 (95% CI, –16.75 to 13.14) for designs 13

TABLE 3. Predictive Performance for the Sampling Strategies Based on the Population Approach

Strategy	No. Samples	CL MPPE (%)		CL MAPE (%)	
		Median	95% CI	Median	95% CI
12	4	0.13	–0.71 to 5.60	0.27	0.02–5.65
13	3	1.34	–1.32 to 2.42	1.34	0.63–2.42
14	3	0.67	–1.50 to 1.73	0.80	0.13–1.85
15	3	0.00	–1.03 to 0.75	0.60	0.13–1.03
16	2	1.74	–1.00 to 4.12	3.20	1.74–5.95
17	2	4.01	–4.99 to 7.20	4.54	3.89–7.20
19	2	0.07	–1.27 to 4.12	0.93	0.41–4.18
20	2	1.47	–1.45 to 2.82	1.47	0.88–2.82

Strategy	No. Samples	V ₂ MPPE (%)		V ₂ MAPE (%)	
		Median	95% CI	Median	95% CI
12	4	0	–2.29 to 1.97	0.94	0–2.45
13	3	–1.25	–4.56 to 13.86	2.19	0.19–14.56
14	3	3.13	–3.09 to 7.12	3.13	1.76–7.12
15	3	–0.78	–2.70 to 0.08	0.78	0.08–2.70
16	2	2.19	–9.62 to 11.88	2.82	0.60–12.02
17	2	9.72	–12.63 to 19.17	10.97	3.34–19.36
19	2	–0.63	–21.55 to 14.50	8.46	0.09–22.63
20	2	5.96	3.01 to 8.37	5.96	3.01–8.37

CL, total GCV clearance; V_2 , central compartment distribution volume.

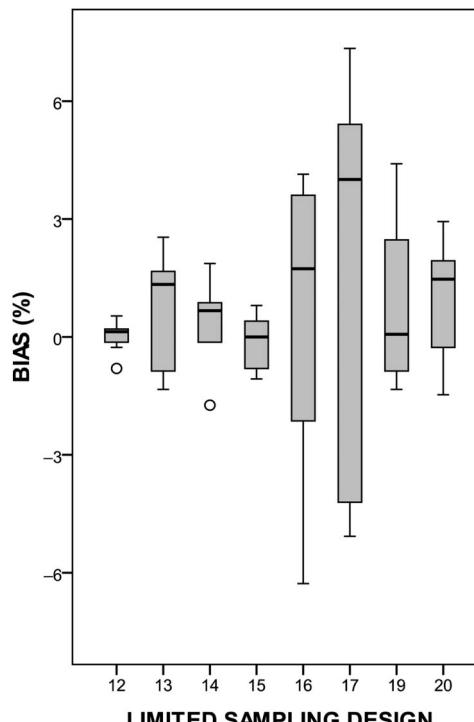


FIGURE 2. Box plots of the bias distribution associated with the population CL estimation for the tested limited sampling designs. The bold horizontal bars in the middle show the median values, whereas the outer boundaries of the boxes represent the ranges of the 25th and 75th percentiles (interquartile ranges). The whiskers indicate the maximum and the minimum values of bias. Circles represent the outlier values.

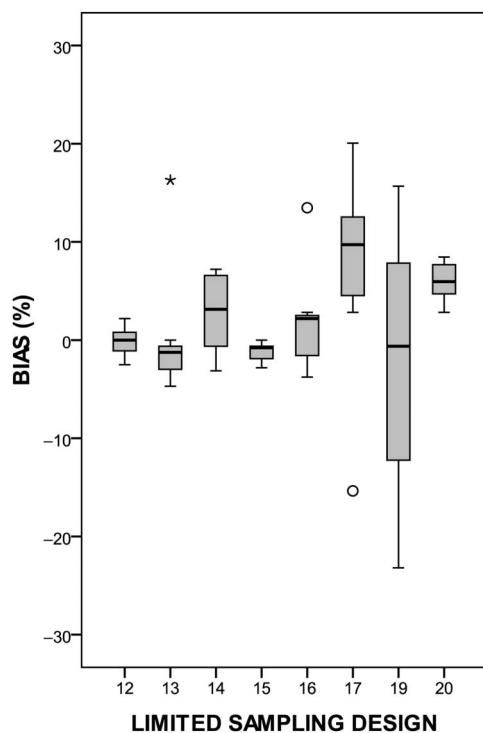


FIGURE 3. Box plots of the bias distribution associated with the population V_2 estimation for the tested limited sampling designs. The bold horizontal bars in the middle show the median values, whereas the outer boundaries of the boxes represent the ranges of the 25th and 75th percentiles (interquartile ranges). The whiskers indicate the maximum and the minimum values of bias. Circles and star represent the outlier values.

and 15, respectively, were found. Again, a similar trend was observed for V_2 (median bias and imprecision of 2.48 and -13.27 for schedule 13; -2.19 and 13.79 for schedule 15, respectively), although a larger 95% CI for bias and precision was observed.

DISCUSSION

This study evaluated several simplified sample schedules compatible with clinical practice and patient comfort to be applied during TDM of GCV/VGCV in transplant patients. The schedules were acceptable for ethical, practical, and economic reasons.

Monitoring of full pharmacokinetic profiles has obvious practical disadvantages. Identification of several optimal but LSSs is an attractive prospect for monitoring GCV/VGCV and could provide accurate estimates of total systemic drug exposure (AUC). Moreover, fixed sampling times are a limited factor in clinical studies and TDM programs and are difficult to perform because patient samples are taken in outpatient clinical settings and follow-up can be complex. Usually, the delay in the medical control of patients and poor patient compliance are related to the time of drug administration. As a consequence, the use of sampling windows has been proposed by several authors^{18–21} to control sampling times

TABLE 4. Predictive Performance for the Sampling Strategies Based on the Bayesian Approach

Strategy	No. Samples	CL MPPE (%)		CL MAPE (%)	
		Median	95% CI	Median	95% CI
12	4	-2.25	-32.90 to 13.27	7.09	0.37–32.90
13	3	-5.690	-11.87 to 7.28	6.02	0.06–11.87
14	3	-5.530	-50.84 to 107.11	9.06	0.43–107.11
15	3	-2.52	-16.75 to 13.14	5.14	0.33–16.75
16	2	-3.92	-47.27 to 114.96	9.45	0.11–114.96
17	2	-7.19	-50.43 to 104.70	9.68	1.90–104.7
19	2	-2.57	-37.85 to 16.27	3.67	1.61–37.85
20	2	-3.70	-48.94 to 110.23	7.15	0.29–110.23
Strategy	No. Samples	V ₂ MPPE (%)		V ₂ MAPE (%)	
		Median	95% CI	Median	95% CI
12	4	-4.30	-46.87 to 71.02	29.35	4.22 to 71.02
13	3	2.48	-31.93 to 62.65	-13.27	-69.37 to 129.45
14	3	-13.27	-69.37 to 129.45	32.23	5.03 to 129.48
15	3	-2.19	-50.27 to 53.67	13.79	0 to 61.05
16	2	-1.48	-31.49 to 55.24	18.03	0.08 to 57.54
17	2	1.72	-68.54 to 187.66	25.08	3.3 to 187.66
19	2	8.19	-68.63 to 216.93	23.82	1.07 to 216.93
20	2	12.09	-40.09 to 68.64	17.69	0.15 to 68.64

CL, total GCV clearance; V_2 , central compartment distribution volume.

by specifying intervals within which patients can be sampled. This approach offers flexibility and also provides informative additional data. In our study, we used sampling times empirically selected within preestablished windows, although we advocated the use of Bayesian estimation methods from a previously developed population pharmacokinetic model already published.⁹ We also included the results obtained with the population approach that could be useful for future pharmacokinetic–pharmacodynamic studies.

Sampling windows were constructed according to the entire PK profile observed previously after GCV/VGCV in the target population. Our last sampling time was limited to 8 hours to overcome clinical constraints and given that the lower limit of the 95% CI of concentrations at sampling times beyond 8 hours were always less than the LLOQ. Based on the sampling windows, all samples could be collected within the daily hospital routine but still at times that were near optimal and informative for describing the PK parameters, representative of absorption and disposition processes. CL and V_2 were selected for LSS evaluation: CL because delayed elimination can lead to overexposure and toxicity and V_2 because it is determining of the peak concentrations achieved. Hence, windows were considered from 0.5 to 1.5 hours during which there are increasing plasma concentrations, from 2 to 3 hours and 4 to 5 hours, around the peak concentrations, and then, from 6 to 8 hours during the decreasing concentration phase.

Predose concentrations were included in every sampling strategy (design 1–11) because (1) trough levels are generally well correlated with AUC and therefore with pharmacodynamic parameters and (2) sampling at this time point

provides less biased time-concentration values. In our study, trough concentrations could not be included in the sampling schedules. In effect, in our case, unlike other models,¹³ the residual error included an additive component apart from the proportional error. This resulted in a higher residual error (37.8%) than that strictly given by the proportional error (20%) provided by Zhao et al¹³ for concentrations around the LLOQ. In addition, our additive component, 0.465 µg/mL, was nearly as high as our analytical method LLOQ. Therefore, those negative concentrations values were found after simulation excluding the evaluation of this sampling time during the LSS.

From the 9 remaining designs studied and based on the population approach, schedule numbers 12 (with 4 points, 0.5–1.5, 2–3, 4–5, and 6–8 hours postdose), 15 (with 3 time points, 0.5–1.5, 4–5, and 6–8 hours postdose) and 19 (with 2 time points, 2–3 and 6–8 hours postdose) were selected, showing the lowest bias and best precision estimates for both CL and V_2 , as reflected in the box plots. The narrower 95% CI was observed for design 15, from –1.03 to 0.75 followed by design 19 (from –1.27 to 4.12) and design 12 (from –0.71 to 5.60). A similar trend was observed in V_2 . Among the 3 designs, 12 and 15 did not require fixing of any PK parameter, unlike design 19, which also showed the largest interquartile range for bias estimation. Thus, the schedule number 15 was selected because it allowed precise estimation of both parameters without fixing any PK parameters (Table 3 and 4). Therefore, it would be a good strategy to estimate GCV exposure with only 3 time points: 0.5–1.5, 4–5, and 6–8 hours after the start of drug administration.

The Bayesian approach also showed that sampling design number 15 was the best in bias and precision of both PK parameters, CL and V_2 . In addition, designs number 12, 13, and 19 also displayed good predictive performances (low bias and imprecision). Among these, LSS number 13 would be the most suitable according to the clinical practice restrictions. However, unlike strategy 13, the inclusion of the sampling window 6–8 hours in schedule numbers 12 and 15 resulted in better precision estimates for CL. Comparing both designs, 15, including only 3 time points, was the best choice based on clinical practice constraints. Regarding prediction V_2 , a similar trend was observed, although bias and imprecision values were larger than those for CL in all the cases. The sparse data design 19, with only 2 measures of concentration at 2–3 hours and 6–8 hours postdose, estimated V_2 with larger bias and imprecision than those mentioned above. Despite these results, it should not be discarded for TDM when the number of samples is very limited.

These results confirm that accuracy and precision in the estimation of the PK parameters and exposure are very sensitive to the sampling strategy. Given that the suppression of CMV viremia and disease is related to GCV exposure, the sampling strategy is particularly important to achieve the required exposure, avoiding the adverse events and the development of viral resistance. Wiltshire et al demonstrated viremia suppression during prophylaxis with a GCV exposure (AUC) of 40–50 µg × h/mL, suggesting that dose adjustment to a target exposure value could achieve the required exposure, avoiding adverse events, clinical failure, and CMV

resistance. Recently, Caldés et al⁹ developed a population pharmacokinetic (PK) model of GCV/VGCV in SOT patients with CMV infection and concluded that AUC value was highly dependent on the CL value and dose adjustment could be performed based on this parameter and the target exposure.

No previous data of LSS exist in adult transplant patients. Zhao et al,¹³ using plasma concentrations from 14 pediatric patients who received oral VGCV, suggested sampling at C0, C2, and C4 hours. They assayed 9 different sampling designs using from 1 to 3 samples; an LSS that did not contain a predose concentration time point had lower bias and imprecision than those using trough concentrations. Although their results were in accordance to our LSS, finally, the Bayesian estimator containing 3 sampling points (C0, C2, and C4 hours) was the one selected for dose individualization. The schedules were developed in a pediatric population, and it may not be valid for adult patients.

In summary, optimal sampling strategies were developed to predict GCV individual AUC values. Our results showed that the best LSS required 3 concentration time points (0.5–1.5, 4–5, and 6–8 hours) based on bias and precision and could be applied for TDM of GCV/VGC in adult SOT patients to optimize individual treatment. Moreover, this design could be useful for future pharmacokinetic–pharmacodynamic studies.

REFERENCES

1. Tolkoff-Rubin NE, Rubin RH. The impact of cytomegalovirus infections on graft function and patient outcome. *Graft*. 1999;S101–S103.
2. Mc Gavin JK, Goal KL. Ganciclovir: an update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Drugs*. 2001;61:1153–1183.
3. Information product of Ganciclovir (Cymevene(R)). Roche Farma, February 2013.
4. Crumpacker CS. Ganciclovir. *N Engl J Med*. 1996;335:721–729.
5. Pescovitz MD, Rabkin J, Merino R, et al. Valganciclovir results in improved oral absorption of ganciclovir in liver transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:2811–2815.
6. Pescovitz MD, Pruitt TL, Gonwa T, et al. Oral ganciclovir dosing in transplant recipients and dialysis patients based on renal function. *Transplantation*. 1998;66:1104–1107.
7. 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: 495–507.
8. Wiltshire H, Paya C, Pescovitz MD, et al. Pharmacodynamics of oral ganciclovir and valganciclovir in solid organ transplant recipients. *Transplantation*. 2005;79:1477–1483.
9. Caldés A, Colom H, Armendariz 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;53:4816–4824.
10. Bedino G, Esposito P, Bosio F, et al. The role of therapeutic drug monitoring in the treatment of cytomegalovirus disease in kidney transplantation. *Int Urol Nephrol*. 2012. DOI: 10.1007/s11255-012-0293-y.
11. Piketty C, Bardin C, Gilquin J, et al. Monitoring plasma levels of ganciclovir in AIDS patients receiving oral ganciclovir as maintenance therapy for CMV retinitis. *Clin Microbiol Infect*. 2000;6:117–120.
12. Fishman J, Doran M, Volpicelli S, et al. Dosing of intravenous ganciclovir for the prophylaxis and treatment of cytomegalovirus infection in solid organ transplant. *Transplantation*. 2000;69:389–394.
13. Zhao W, Fakhoury M, Fila M, et al. Individualization of valganciclovir prophylaxis for cytomegalovirus infection in pediatric kidney transplant patients. *Valganciclovir pediatrics. Ther Drug Monit*. 2012;34:326–330.
14. Pou L, Campos F, Almirante B, et al. A rapid liquid chromatographic (HPLC) method for determination of ganciclovir in serum, p. 183–186. In: *Biology prospective. Comptes rendus du 8ieme Colloque de*

- Pont-a-Mousson.* Galteau MM, Siest G, Henny J, ed. Paris, France: John Libbey Eurotext; 1993.
15. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron.* 1976;16:31–41.
 16. Sheiner LB, Beal SL. Some suggestions for measuring predictive performance. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1981;9:503–512.
 17. Ting LS, Villeneuve E, Ensom MH. Beyond cyclosporine: a systematic review of limited sampling strategies for other immunosuppressants. *Ther Drug Monit.* 2006;28:419–430.
 18. Chenel M, Ogungbenro K, Duval V, et al. Optimal blood sampling time windows for parameter estimation using a population approach: design of a phase II clinical trial. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2005;32:737–756.
 19. Graham G, Aarons L. Optimum blood sampling time windows for parameter estimation in population pharmacokinetic experiments. *Stat Med.* 2006;25:4004–4019.
 20. Hashimoto Y, Sheiner LB. Designs for population pharmacodynamics: value of pharmacokinetic data and population analysis. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1991;19:333–353.
 21. Jonsson EN, Wade JR, Karlsson MO. Comparison of some practical sampling strategies for population pharmacokinetic studies. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1996;24:245–263.

RESULTATS

Capítol 4

Contribution of population pharmacokinetics to dose optimization of ganciclovir/valganciclovir in kidney transplant patients.

Padullés A, Colom H, Bestard O, Melilli E, Sabé N, Rigo E, Niubó J, Torras J, Lladó L, Manito N, Caldés A, Cruzado JM, Grinyó JM and Lloberas N.

Manuscrit

RESULTATS

TITLE: Contribution of population pharmacokinetics to dose optimization of ganciclovir/ valganciclovir in solid organ transplant patients.

AUTHORS:

Padullés A¹, Colom H², Bestard O³, Melilli E³, Sabé N⁴, Rigo R⁵, Niubó J⁶, Torras J³, Lladó L⁷, Manito N⁸, Caldés A³, Cruzado JM³, Grinyó JM³ and Lloberas N³

¹Pharmacy Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain.

²Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department. Biopharmaceutics and Pharmacokinetics Unit, School of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

³Nephrology Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain.

⁴Infectious Diseases Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge Barcelona, Spain.

⁵Biochemistry Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge Barcelona, Spain.

⁶Microbiology Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain.

⁷Digestive Surgery Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain.

⁸Cardiology Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain.

KEYWORDS: ganciclovir, valganciclovir, solid organ transplant patients, pharmaokinetics, bayesian, population pharmacokinetics.

RUNNING TITLE: Antiviral dose individualization

Corresponding author:

Núria Lloberas

Nephrology Department, Hospital Universitari de Bellvitge, Lab Exp Nephrology
4122, Pab. Govern, 4a planta, UB

Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

Tel/Fax: +34-93-4035806; E-mail: nloberas@ub.edu

ABSTRACT

Background:

A previous study of our group showed that solid organ transplant (SOT) patients treated with ganciclovir (GCV) or valganciclovir (VGCV) following dosage manufacturer's recommendations were either over or underexposed. As consequence, drug dose adjustments by Bayesian prediction based on population pharmacokinetic parameters (PPK) from a previously developed model might optimize GCV treatment according to a target value (area under the curve [AUC]=40-50 μ g·h/mL).

Methods:

A two arm, randomized and open-label, superiority trial (margin of 40%) in adult SOT recipients treated with GCV/VGCV, either as prophylaxis or treatment of CMV infection, was carried out. Group A: manufacturer's recommended doses. Group B: dose adjustment based on target exposure by Bayesian prediction (NONMEM).

Results:

Results of 53 SOT patients were analyzed. CGV dose adjustment by Bayesian prediction optimized exposure as the 88.4% of patients were within the therapeutic AUC range vs the 18.7% in the group treated according to the manufacturer's recommendations. The 40% of superiority margin ($p=1.7\times 10^{-6}$, 95%CI of the difference: 54-86) was fulfilled. The time required to reach AUC was delayed in Group A ($p=0.000029$). A trend towards shorter time to viral clearance was seen for Group B vs group A (17.6 vs 12.5 days, $p=0.125$). The incidence of relapse (66.67% vs 9.01%) and the late CMV disease (33.3% vs 8.3%) were both higher in Group A vs B. No relevant differences in toxicity were observed.

Conclusions:

GCV/VGCV dose adjustment based on target exposure by Bayesian prediction contributes to optimize the GCV/VGCV treatment achieving the therapeutic AUC from the early stages of the treatment

INTRODUCTION

Human cytomegalovirus (CMV) is a significant viral pathogen affecting solid organ transplant (SOT) recipients; CMV infection is a major complication which results in high morbidity. Clinical manifestations of CMV include an acute viral syndrome and tissue invasive disease [1-5]. Without prophylaxis, most CMV infections occur during the first 3 months post-transplant when patients are receiving intensive immunosuppressive regimens for prevention of graft rejection. SOT patients at highest risk for CMV infection are seronegative recipients of organs from seropositive donors (CMV D+/R-) and those receiving T cell depleting agents [6].

The gold standard therapy for prevention and treatment of CMV disease in SOT patients consists of intravenous ganciclovir (iv GCV) and/or oral valganciclovir (VGCV) and doses must be adjusted according to renal function. Underdosing may result in lack of clinical efficacy and the development and selection of resistance strains, whereas supratherapeutic doses may increase toxicity [7]. According to Wiltshire et al [8], exposure values of 40-50 µg·h/mL, measured by area under the concentration-time curve (AUC) at steady-state, predict a low incidence of breakthrough viremia during prophylaxis. Otherwise, the risk of viremia (virus replication) is increased up to 8-fold with low AUCs.

GCV/VGCV shows a high pharmacokinetic (PK) interindividual variability, which can affect drug efficacy and safety. Our group developed a population pharmacokinetic (PPK) model of GCV/VGCV in SOT patients with CMV infection where interpatient variability was explained by creatinine clearance (CRCL) [9]. In addition, the adequacy of the manufacturer's recommended doses to achieve the target AUC was evaluated and results suggested potential dosage refinements [10]. We hypothesized that using the PPK model previously

developed as a tool for Bayesian prediction, we could optimize GCV treatment, achieving the target AUC from the early steps of the treatment and throughout the entire treatment.

MATERIAL AND METHODS

Study design

A randomized, open-label, unicenter trial in adult SOT recipients treated with GCV/VGCV either as prophylaxis or treatment of CMV infection (viremia/disease) was performed (Nº EudraCT: 2010-021433-32). The trial was designed as a superiority study on the percentage of target AUC achievement with a superiority margin of 40%.

Patients were randomized in two groups depending on the dosing adjustment strategy applied (1:1). Group A received GCV/VGCV following the manufacturer's recommended dosing based on renal function and body weight; Group B initial doses of GCV/VGCV were calculated based on a previously developed PPK model [9] and the following doses were adjusted using the Bayesian prediction approach based on patient drug concentrations and renal function.

Kidney, liver or heart transplant patients were eligible for inclusion in the study if they were ≥ 18 years of age and were treated with GCV or VGCV for either prophylaxis or CMV disease according to the standard practice. Patients were ineligible if they had a calculated CRCL below 10 mL/min using the Cockcroft-Gault equation, had a history of hypersensitivity to GCV/VGCV, were receiving concomitant treatment with other anti-CMV therapy or were lactating or pregnant. Patients under prophylaxis received oral VGCV for 90 days, whereas those with CMV infection were treated with GCV/VGCV until two consecutive, negative results of CMV viral load, one week apart, were obtained.

Oral VGCV was administered as tablets (Valcyte® 450 mg; F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) and/or suspension (Valcyte® 50 mg/mL suspension; F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland). Sequential treatment combining iv GCV (Cymevene®; F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) for maximum 5 days, followed by oral VGCV, was administered in patients with CMV disease.

The assay was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and good clinical practice guidelines. The trial protocol was approved by Bellvitge Hospital Ethics Research Committee. Written informed consent was obtained from each patient prior to randomization.

Endpoints measures

The primary endpoint was defined as the percentage of patients with target systemic GCV exposures measured by AUC values ranging within 40 and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$. The AUC values were estimated at the following steady state occasions: 3 days after the beginning of the treatment, 3 days after dose adjustment, after any change in CRCL $>10 \text{ mL/min}$ or changes of the administration route. Exposures on Days 30, 60 and 90, if the treatment was continued, were also measured. The time needed to achieve the target AUC was also analyzed.

The secondary endpoints included measurements of time to viral eradication, recurrence of CMV infection (6 months follow-up) and incidence of late CMV disease. Assessments of safety and tolerability were also performed. The viral load kinetics in patients with CMV infection was assessed using viral load determination until Day 45. Hematological and biochemistry parameters were measured at baseline and at each occasion of PK evaluation and on Days 30, 60 and 90 during the follow-up period.

Ganciclovir plasma concentration measurements

Blood samples were collected at three times sampling windows (0.5-1.5, 4-5 and 6-8 h) for each occasion according to a limited sampling strategy previously developed by our group [11]. Plasma GCV concentrations were determined by a validated ultra high-performance liquid chromatography coupled with ultraviolet detection [12].

GCV doses, measured concentrations and renal function (CRCL) estimated on each occasion and for each patient, were used for maximum a posteriori (MAP) Bayesian prediction of GCV systemic exposure with a PPK model previously developed and implemented in the non-linear mixed-effects modeling (NONMEM) computer program version 7.2 (Icon Development, Ellicott City, USA).

Viral monitoring

CMV DNA analysis was carried out with the Abbott Real time CMV amplification reagent kit (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA) using 500µL plasma-EDTA (quantification limits 20 to 10E7 copies/mL). DNA from samples was obtained 24 h after sample collection using magnetic DNA extraction on the m24sp equipment. The viral cutoff value at which to consider eradication was set at 20 copies/mL plasma.

Safety monitoring

Hematological adverse events were recorded at each sampling time as present or absent. For hematological abnormalities, anemia was defined as hemoglobin concentration <8 g/L, leukopenia as a white blood cell count <3.9x10⁹ cells/L, and thrombocytopenia as platelets <125x10⁹ cells/L [8].

Sample size calculation and statistical methods

The study was powered as a superiority trial. The primary endpoint was defined as at least 40% of superiority margin in the achieved target AUC, in the Bayesian prediction dose adjustment group vs the manufacturer's recommendation. A sample size of 25 ± 2 patients per group provided 80% statistical power to claim superiority of one group vs the other ($p<0.05$). The primary outcome was analyzed by a Chi-square test and superiority was declared when statistical significant differences between proportions were found and the lower bound of the one-sided 95% confidence interval (95%CI) for the difference between groups was above the superiority margin of 40% (B vs A Groups). Taking into account that our previous study showed that the AUC values obtained following iv GCV and oral VGCV administrations were comparable [15], the analysis of the primary endpoint was performed combining both administration routes.

Differences in percentages of patients reaching the target AUC values over time between both groups were assessed considering the median of systemic exposure for each patient. In addition, the difference of time delay needed to achieve target AUC between both groups was analyzed using a Kaplan-Meier survival analysis. This primary endpoint was also evaluated by isolated GCV determinations for each patient and by different CRCL cutoffs.

Statistical analyses applied for secondary endpoints were the t-test for normally distributed data, the Chi-square test for categorical variables and the Kaplan-Meier survival analysis for time to viral clearance comparisons. The power of dosing strategy to allow relapse prediction and late onset disease after discontinuation of prophylaxis was investigated by the area under the ROC (receiver-operator curve) analysis. All the statistical analyses were performed using SPSS v19.0, with a significance level of 0.05.

Statistical analyses were performed with the intention to treat (ITT) population for the primary endpoints. The secondary safety endpoint included all patients who were randomized, had received at least one dose of study medication, had at least one AUC determination and one safety assessment. The per-protocol population of the efficacy endpoint included only those patients who completed the treatment and the 90 days follow-up period.

RESULTS

Baseline characteristics

A total of 60 SOT patients, eligible to be treated with GCV or VGC for either prophylaxis or CMV infection, were included. The intention-to-treat (ITT) population included 53 patients: 27 assigned to group A and 26 to group B. Patients' flow in the study is shown in Figure 1. There were no significantly relevant differences in main demographic and baseline characteristics between the two therapeutic groups (Table 1). Baseline viral characteristics of patients with CMV infection are shown in Table 2.

Evaluation of systemic exposure

The results of 160 AUC measurements from 53 patients were analysed. The mean AUC values estimated from the total set of measurements as from cutoff CRCL interval are graphically displayed in Figure 2. Analysis of median systemic exposure over time for each patient showed a statistically significant major proportion of patients achieving the target AUC when following the Bayesian approach (Group B) fulfilling the 40% superiority margin (18.5% Group A vs 88.4% Group B, $p=1.7\times 10^{-6}$, 95%CI of the difference: 54-86%). Median AUC values were 37.4 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ in Group A and 42.9 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ in Group B.

The time required to reach the target AUC was longer for Group A than Group B patients (log rank statistics = 15.48, p=0.000083, 56.7 days CI95% = [40.24-73.07] vs 16.8 days CI95% = [11.67-21.87], Fig. 3A). Once patients were classified by prophylaxis or treatment of CMV infection, differences were also statistically significant (p=0.000029). In this case, time to reach the target AUC was higher in patients under prophylaxis than those under treatment of CMV infection. The follow-up of patients under prophylaxis showed a wider time between sampling occasions and AUC determinations than those treated for CMV infections (Fig 3B and 3C).

Considering the total number of AUC measurements, the Bayesian prediction approach resulted in a major proportion of AUC values within the therapeutic range (18.7% Group A vs 65.9% in Group B, p= 1.4x10⁻⁸, 95%CI of difference: 36-59%) also fulfilling the 40% superiority margin. The percentages of measurements achieving the AUC target in each group are presented in Table 3. Considering the different of CRCL cutoffs intervals, differences in AUC values between both groups were statistically significant for patients with CRCL<30 (p=0.008, 95%CI of difference: 41-92%) or >60 mL/min (p=8.746x10⁻⁷, 95%CI of difference: 45-74%). However, no differences were observed for patients with CRCL between 30 and 50 mL/min (Table 3)

In some patients assigned to group B, the GCV/VGCV dose was adjusted in response to sub-therapeutic (24.7%) and supra-therapeutic (9.41%) determinations. The repeated AUC values showed target exposure achievement in all cases.

Analysis of clinical outcome

Patients under treatment for CMV infection

The comparison of time to viral clearance between both arms showed a trend to earlier clearance in Group B patients. Time to viral eradication was 17.6 days in Group A and 12.5 days in Group B, showing a 40.8% of reduction (log rank statistics=2.34, p=0.125). Kaplan-Meier curve of time to viral eradication is displayed in Figure 4. The median two-exponential decay of viral load for each group until day 45 is displayed in Figure 5.

The number of patients with CMV recurrence was higher in Group A than in Group B (66.67% vs 9.01%, respectively). The 85% of patients who relapsed were those treated according to the manufacturer's recommendations. No differences were found in time to recurrence between both groups. The power of dosing strategy to predict the probability of a relapse occurrence evaluated through the ROC curves was statistically significant [p=0.007; AUC 0.835; CI95% 0.66-1.02; sensitivity 100% and specificity 91.7%] (Figure 6A)

Patients under prophylaxis

There was no incidence of CMV viremia during the prophylactic period. The incidence of late onset disease during the following 3 months after discontinuation of prophylaxis was lower in Group B compared with Group A (33.3% vs 8.3%, respectively). When the predictive power of the dose adjustment strategy to identify late CMV disease probability was evaluated, the accuracy of dose strategy to identify patients with late CMV was not statistically significant [p=0.168; AUC 0.706; CI95% 0.45-0.96; sensitivity 100% and specificity 40%] (Figure 6B).

Adverse events

There were no major differences in the occurrence of adverse events between treatment groups. At least one hematological adverse event was reported in 45.8% patients during treatment. Leukopenia occurred in 39.6% of patients (33.3 % Group A; 46.15% Group B). Anemia was reported in 2 patients, although 8 patients received epoetin therapy during the study period and one patient required blood transfusion. Thrombocytopenia occurred in 7.4% of patients in arm A but in none in arm B.

Dosage

Patients under iv GCV and oral VGCV treatment according to the Bayesian prediction approach received higher doses than patients dosed as manufacturer's recommendations. The median daily dose of oral VGCV for patients under prophylaxis was lower in Group B than in Group A. Dosage distributions are shown in Figure 7.

DISCUSSION

This is the first randomized, controlled superiority trial comparing Bayesian prediction approach vs conventional dosing of GCV and VGCV for the prophylaxis and treatment of CMV infection in SOT patients in order to optimize GCV treatment. In this prospective trial, the proportion of patients achieving the target AUC was higher after dose adjustment using the Bayesian prediction approach than after the manufacturer's recommendation, reaching the superiority margin of 40%, fitting the primary endpoint defined in our study. Furthermore, time to reach the target AUC was earlier in those patients dosed by Bayesian prediction approach. These results are of major importance considering that therapeutic exposure had been correlated with treatment

efficacy [8]. Aiming for targeted initial exposures is especially advisable in the case of CMV infection treatment, to quickly get control of viral replication.

A previous pharmacokinetic study carried out by our group showed under-/over-exposure to GCV in patients dosed following the manufacturer's strategy [10]. Thus, a PPK model was developed to identify relevant covariates accounting for GCV exposure [9]. In the current PPK model applied, CRCL was shown to be the most influential covariate explaining the interpatient variability in CL (52.03%). The body weight explained only 4% in CL and was not considered in the current PPK model [9]. Manufacturer's dose recommendations are also adjusted by CRCL but not using a Bayesian prediction that allow to optimize GCV treatment to achieve the target AUC.

According to the PPK model simulations, exposures achieved after the manufacturer's recommended initial doses showed that orally administered doses resulted in over-exposures in patients with CRCL values under 30 mL/min and under-exposures in patients with CRCL values over 60 mL/min. The current study confirmed that the labelling dosing algorithm is only valid for about one-fifth of patients, and most of them belong to CRCL cutoff values between 30-50 mL/min. To date, there is little data concerning GCV dose optimization [6, 13]. Applying our PPK model using the Bayesian prediction, represents a step forward in showing the optimal GCV dosing schedules for management of CMV infection which might help in individualizing anti-CMV therapy.

Clinical outcome analysis for patients under treatment for CMV infection following the PPK model using Bayesian prediction showed a trend towards decreased time to reach viral eradication. However, this is a pharmacokinetic study, not designed and not powered to assess clinical efficacy. Further adequate

studies should be performed in order to study the effect of dose optimization on clinical outcomes.

Apart from the adequacy of dosing, as previously described, other factors that may result in longer treatment durations are high baseline viral load and high net state of immunosuppression [6]. According to Asberg et al [15], baseline viral load can be a significant predictor of viral eradication. In our study, baseline viral load was lower than 200000 copies/mL in all patients, as the majority received preemptive therapy. In addition, no differences were observed in median initial viral loads between the two groups.

Regarding recurrence, we found a viral recurrence rate of 28% which is in line with earlier reports ranging from 25% to 30% [16, 17, 18]. However, there was a trend to higher incidence of relapsing in those patients treated according to the manufacturer recommendations. Although response to antiviral therapy is likely dependent on a complex interaction between the virus and the host [6, 15, 19], our results suggested that optimal exposure may improve long term efficacy.

Considering the safety profile of GCV and VGCV, therapy was well tolerated and no difference in adverse event profile, including leukopenia, anemia and thrombocytopenia was observed. The incidence of hematological adverse events was similar to that previously reported (41.39%) [8].

In conclusion, patients dosed following the manufacturer recommendations did not achieve the target AUC. In contrast, patients dosed by PPK model using the Bayesian prediction reach the optimal exposure. Although our study was an application of therapeutic drug monitoring, further dose tailoring studies focused on efficacy as primary endpoint may improve clinical outcome of patients.

ACKNOWLEDGMENTS

Nuria Lloberas is a researcher from ISCIII Miguel Servet (CP06/00067) and REDinREN RD12/0021/003. This study was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III and Ministerio de Sanidad y Consumo PI12/01564 and MSPSI (EC10-144). The authors gratefully acknowledge Gema Cerezo for the technical assistance in this study.

REFERENCES

1. De la Torre-Cisneros, Fariñas de la Torre-Cisneros J, Fariñas MC et al. GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2011; 29: 735-58.
2. Cervera C, Fernández-Ruiz M, Valledor A et al. Epidemiology and risk factors for late infection in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2011; 13: 598-607.
3. Cervera C, Gurguí M, Lumbreras C. Risk factors for cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2011; 29 suppl 6: 11-7.
4. Charpentier B, Rostaing L, Berthoux F et al. A three arm study comparing immediate tacrolimus therapy with antithymocyte globulin induction therapy followed by tacrolimus or cyclosporine A in adult renal transplant recipients. *Transplantation.* 2003; 75: 844-51.
5. Tolkoff-Rubin NE and Rubin RH. The impact of cytomegalovirus infection on graft function and patient outcome. *Graft* 1999; 2: S101-3.
6. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation.* 2013; 96: 333-60.
7. 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: 611-20.
8. Wiltshire H, Paya CV, Pescovitz MD et al. Pharmacodynamics of oral ganciclovir and valganciclovir in solid organ transplant recipients. *Transplantation.* 2005; 79: 1477-83.
9. A. Caldés, H. Colom, Y. Armendariz 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: 4816-24.
10. Caldés A, Gil-Vernet S, Armendariz Y 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: 204-12.
 11. Padullés A, Colom H, Caldes A et al. Optimal sparse sampling for estimating ganciclovir/valganciclovir AUC in solid organ transplant patients using NONMEN. *Ther Drug Monit.* 2014;36:371-7.
 12. Padullés A, Colom H, Armendariz Y et al. Determination of ganciclovir in human plasma by ultra performance liquid chromatography-UV detection. *Clin Biochem.* 2012; 45: 309-14.
 13. Bedino G, Esposito P, Bosio F et al. The role of therapeutic drug monitoring in the treatment of cytomegalovirus disease in kidney transplantation. *Int Urol Nephrol.* 2013; 45: 1809-13.
 14. Caldés A, Gil-Vernet S, Armendariz Y 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: 204-12.
 15. Asberg A, Humar A, Rollag H et al. Oral Valganciclovir is noninferior to intravenous ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *American Journal Transplantation* 2007; 7: 2106-13.
 16. Falagas ME, Snydman DR, Griffith J et al. Clinical and epidemiological predictors of recurrent cytomegalovirus disease in orthotopic liver transplant recipients. Boston Center for Liver Transplantation CMVIG Study Group. *Clin Infect Dis.* 1997; 25: 314-7.

17. Humar A, Kumar D, Raboud J et al. Interactions between cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and the recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Am J Transplant.* 2002 May;2(5):461-6
18. Asberg A, Humar A, Jardine AG et al. Long-term outcomes of CMV disease treatment with valganciclovir versus IV ganciclovir in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009; 9: 1205.
19. Bestard O, Lucia M, Crespo E et al. Pretransplant immediately early-1-specific T cell responses provide protection for CMV infection after kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2013; 13: 1793-805.

TABLES

Table 1. Demographic and baseline characteristics for all ITT patients.

	Group A (N = 27)	Group B (N = 26)	p-value
Type of treatment (N)			
Prophylaxis	14	13	
Infection	13	13	NS ¹
Sex N (%)			
Female/male	9 (33.3) / 18 (66.7)	13 (50) / 13 (50)	NS ¹
Age (year)			
Mean ± SD	52.6 ± 19.6	55.1 ± 14.7	NS ²
Weight (Kg)			
Mean ± SD	70.1 ± 13.6	70.4 ± 16.4	NS ²
Transplanted organ N (%)			
Kidney	23	25	NS ¹
Liver	2	0	
Heart	2	1	
HLA-A mismatches			
No mismatch	1	3	NS ¹
1 or 2 mismatch	22	22	
Missing	4	1	
HLA-B mismatches			
No mismatch	0	0	NS ¹
1 or 2 mismatch	23	25	
Missing	4	1	
Donor/Recipient CMV IgG serostatus at time of transplantations N (%)			
D+/R-	10 (37.0)	4 (16)	
D+/R+	15 (55.6)	16 (64)*	
D-/R+	2 (7.4)	4 (16)*	
D-/R-	0	1 (3.8)	
Induction immunosuppression N (%)			
ATG	9 (33.3)	10 (38.5)	NS ¹
Basiliximab	17 (63)	16 (61.5)	
None	1 (3.7)	0	
Immunological risk N (%) †			
High/ Low	18 (66.7) / 9 (33.3)	14 (56) / 11 (44)*	NS ¹
Rejection episode N (%)			
Yes/No	3 (12) / 22 (88)	2 (8.7) / 21 (91.3)	NS ¹
Maintenance immunosuppression			
CsA+MMF+corticoids	2 (7.7)	4 (15.4)	NS ¹
TAC+MMF+corticoids	24 (92.3)	19 (73.1)	
CsA+MMF	0	1 (3.8)	
TAC+MMF	0	1 (3.8)	
CsA+corticoids	0	1 (3.8)	
Creatinine	157.8	144.8	NS ²
CRCL(mL/min)	55.8	54.3	NS ²
Hemoglobin	108.5	102	NS ²
Leukocytes	6.84	7.15	NS ²
Lymphocytes	1.23	1.33	NS ²

Platelets	207	239	NS ²
-----------	-----	-----	-----------------

*For one of the recipients with CMV IgG serostatus positive, donor IgG serostatus is missing

[†]Patients classified according to donor and recipient IgG serostatus and induction therapy: high risk (D+/R- with any induction therapy or D-/R+ and D+/R+ treated with antithymocyte globulin) and low risk (D-/R- or D-/R+ and D+/R+ treated with basiliximab or no induction therapy).

¹chi-square. ² t-test. ³Mann-Whitney test. NS: Not statistically significant (significance level adopted p<0.05)

Table 2. Baseline viral characteristics of per-protocol patients under treatment for CMV infection (viremia/disease)

	Group A (N = 12)	Group B (N =11)	p-value
Previous anti CMV strategy N (%)			
Prophylactic	5 (58.3)	1 (9.1)	NS ¹
Preemptive	7 (41.7)	10 (90.9)	
Disease treatment	None	None	
Median baseline viral load (copies/mL)(N)	5513	4100	NS ²
Patients with previous prophylactic treatment	64459	4809	NS ²
Patients under preemptive treatment	3542	3379	NS ²

¹chi-square, ²Mann-Whitney test.

NS: Not statistically significant (significance level adopted p<0.05)

Table 3. Percentages of measurements achieving the target AUC (40-50 mcg·h/mL) by Group. Patients were gathered by different CRCL cut-offs values and the type of treatment.

Classification variable for statistical analysis		% measurements achieving the target AUC			p
		Group A	Group B	Difference (95%CI)	
All of patients included		18.70	65.90	47.20 (36-59)	1.38×10^{-8}
CRCL cut-off values	< 30 mL/min	0	66.7	66.7 (41-92)	0.008
	30-40 mL/min	37.5	66.7	29.2 (-5-63)	0.428
	40-50 mL/min	33.3	57.1	23.8 (-8-55)	0.467
	50-60 mL/min	33.3	66.7	33.4 (-17-84)	0.549
	> 60 mL/min	8.60	68.30	59.70 (45-74)	8.746×10^{-7}
Type of treatment	Prophylaxis	21.30	62.90	41.60 (27-56)	0.000139
	Treatment of CMV disease	14.30	70.90	56.60 (39-74)	5.885×10^{-5}

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Patients flow in the study.

Figure 2. Average estimated systemic exposure of GCV following administration of iv GCV or oral VGC considering CRCL cut-offs

Figure 3. Rate of first achievement of AUC target according to randomization group over the follow up period (Kaplan–Meier analysis using log rank statistics).

Figure 4. Kaplan-Meier curves showing cumulative probability of viral eradication in patients treated with either oral VGCV or iv GCV.

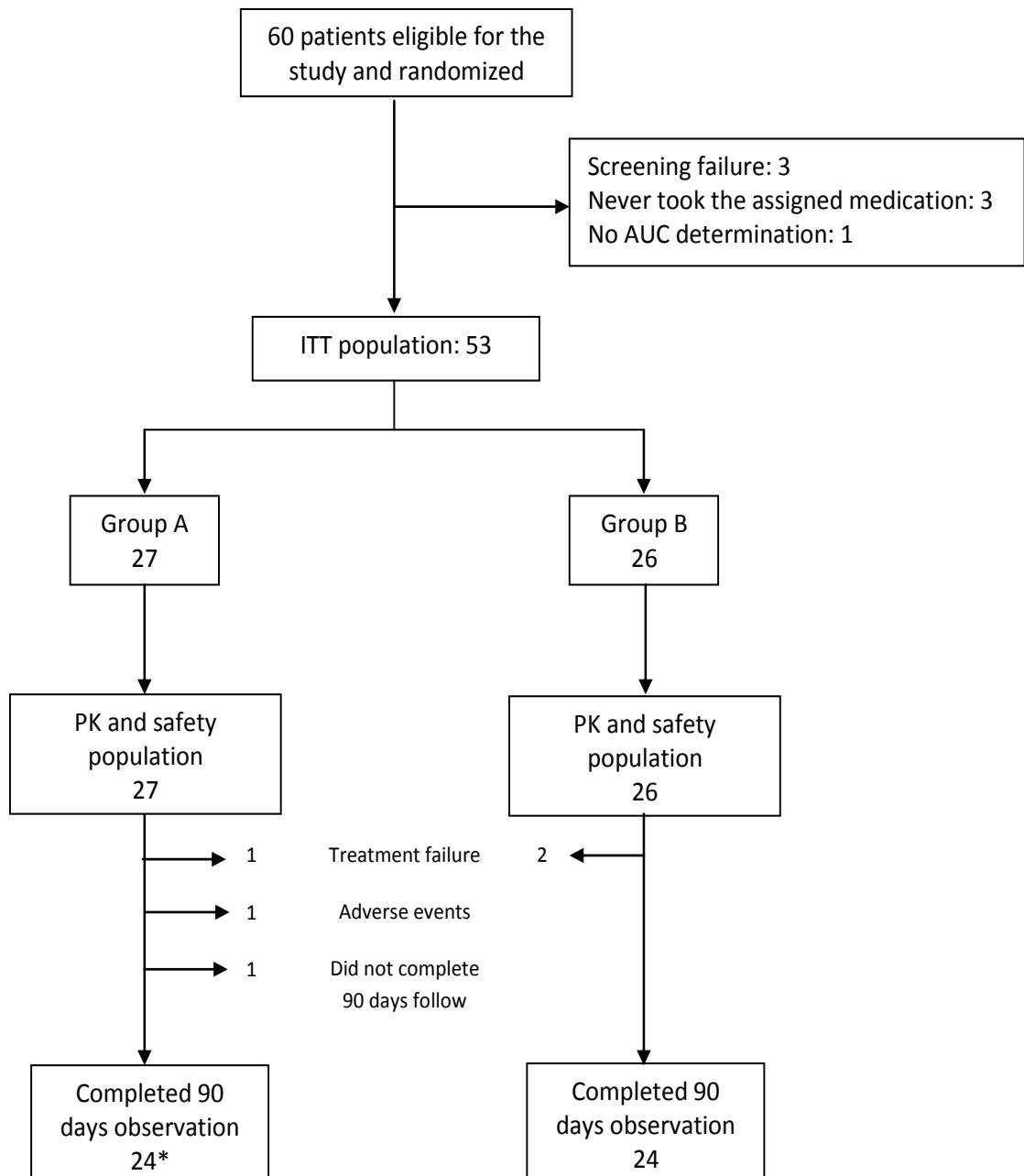
Figure 5. Plots of individual viral load decays observed until Day 45 for patients treated according to manufacturer's recommendation (left) and for patients with dose adjusted by Bayesian approach (right). Grey line represents the limit of quantification of the analytical method. (Relapse data not shown)

Figure 6. Receiver operation curve (ROC) of dose adjustment based on target AUC, recipient IgG serostatus and immunological risk for predicting relapse (A); of dose adjustment based on AU_{target}, recipient IgG serostatus, episodes of rejection and immunological risk for predicting late CMV disease (B).

Figure 7. Dosage distributions considering the randomization group, route of administrations, type of treatment and CRCL cut-offs: (A) iv GCV dosage, (B) oral VGCV dosage in patients under prophylaxis and (C) oral VGCV dosage in patients under treatment of CMV infection.

FIGURES

Figure 1.



*1 patient exitus at Day 110 (did not complete 6 months follow)

Figure 2.

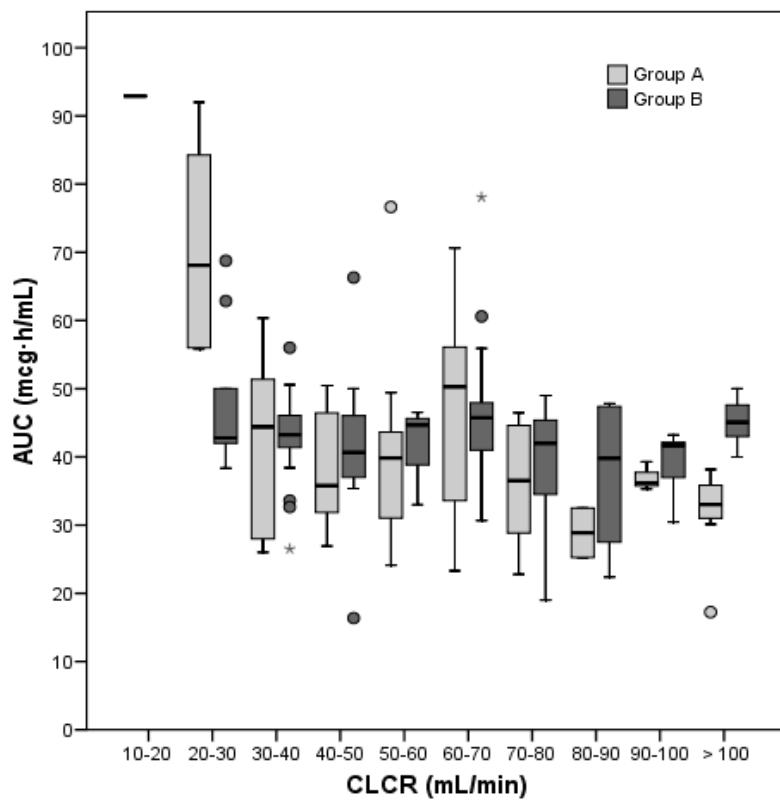


Figure 3.

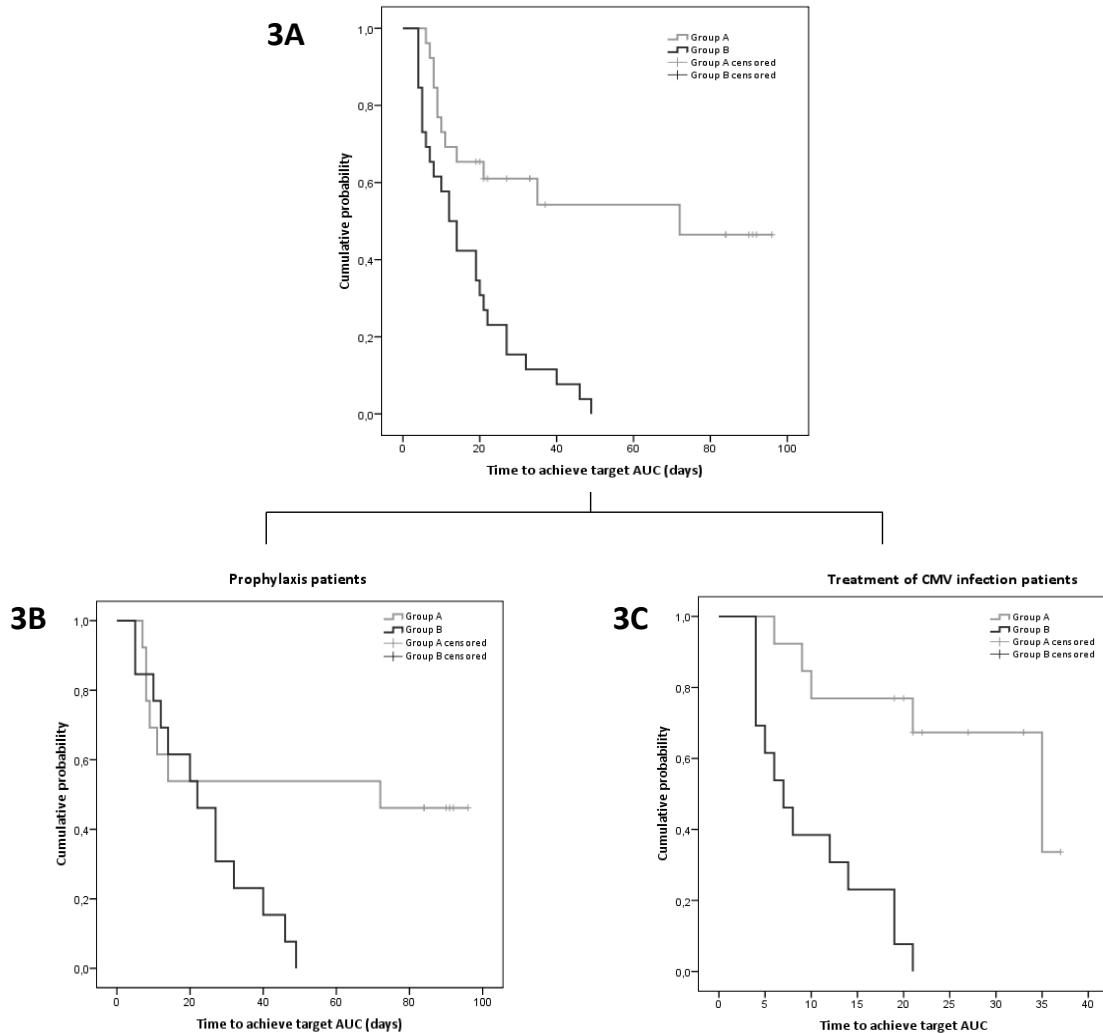


Figure 4.

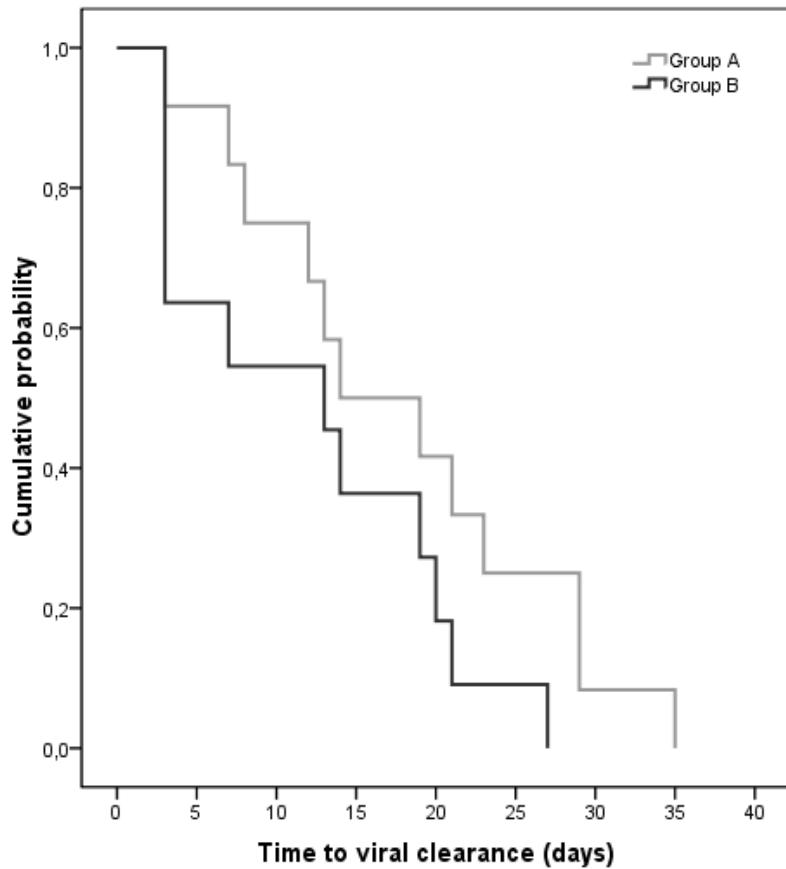


Figure 5.

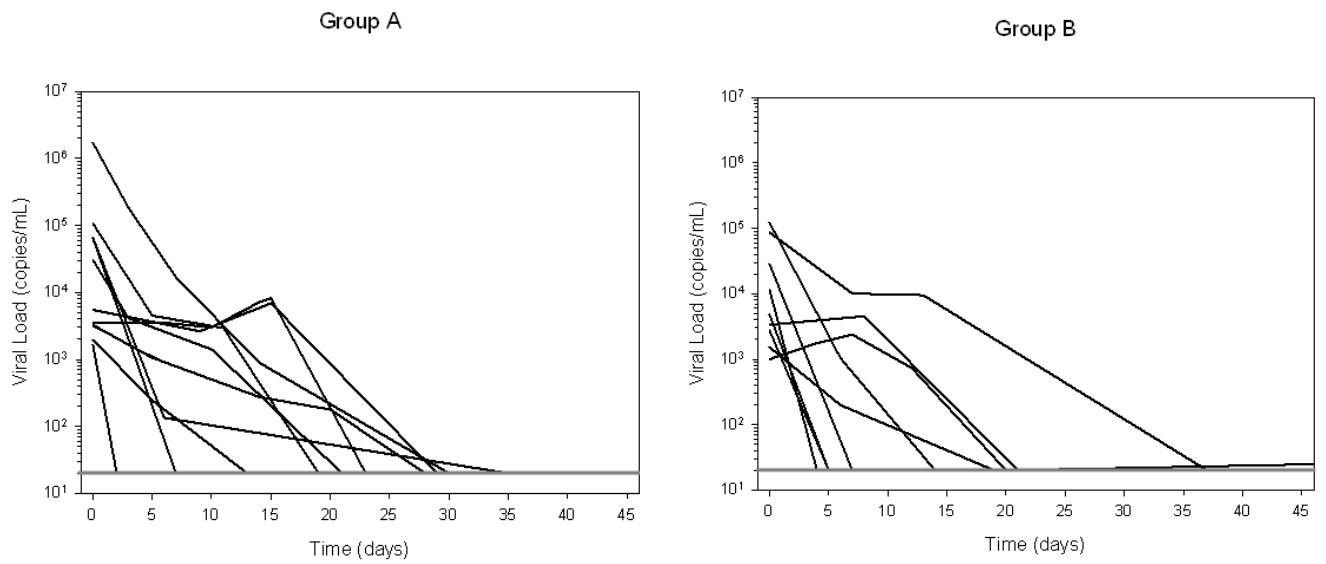
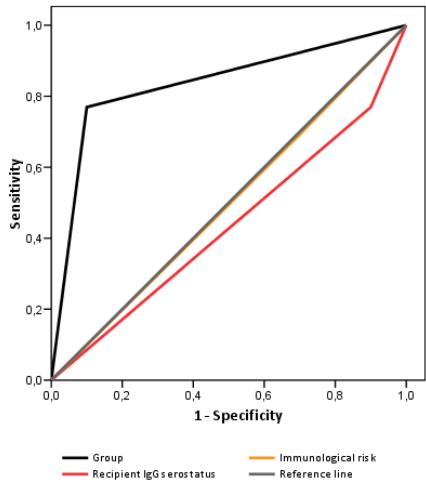


Figure 6.

6A



6B

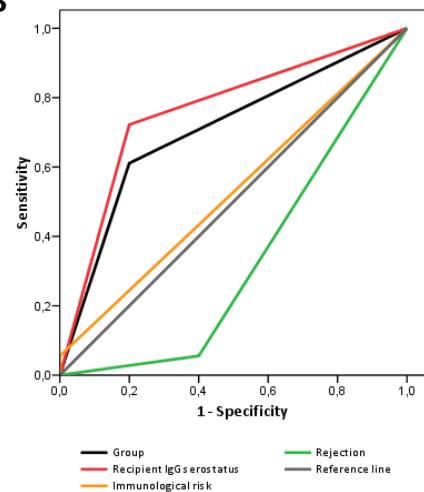
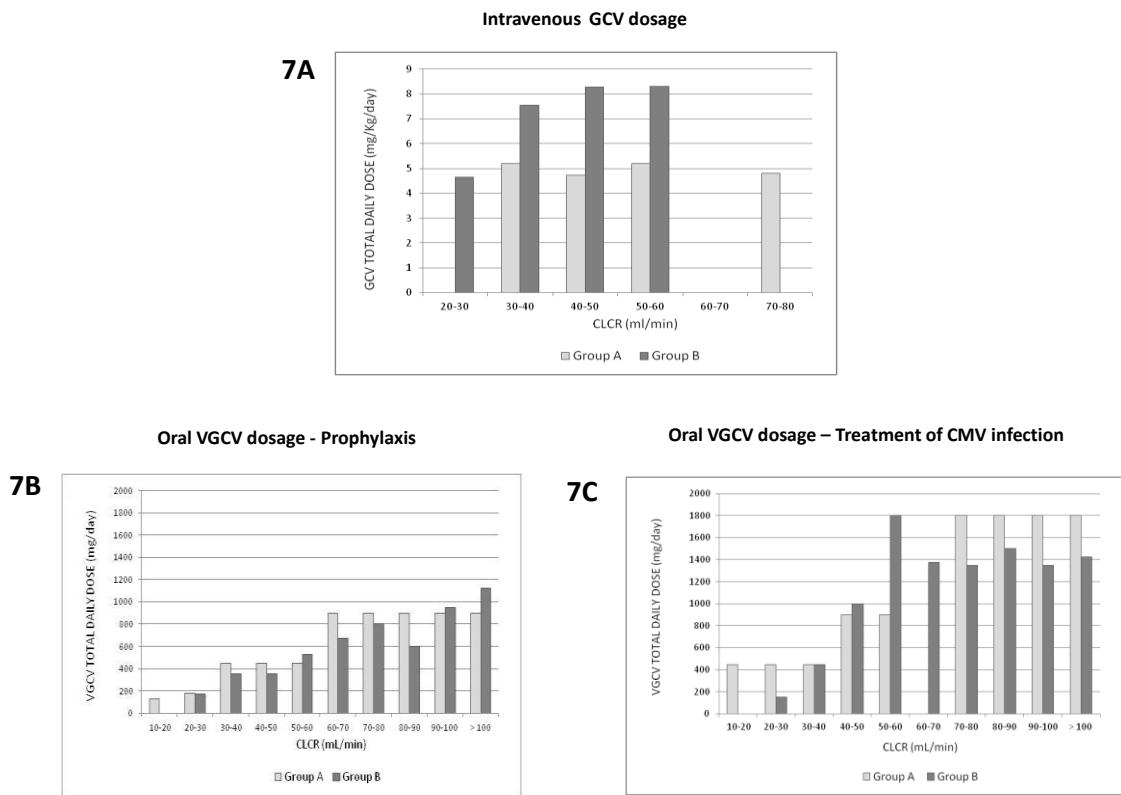


Figure 7.



V. DISCUSSIÓ

V. DISCUSSIÓ

En aquest apartat es durà a terme una discussió general del contingut d'aquesta tesi. Recull els resultats de quatre estudis realitzats de forma seqüencial a fi i efecte d'assolir l'objectiu principal de l'assaig, és a dir, demostrar que la utilització d'un predictor bayesiana per a l'optimització de la dosi de GCV en pacients TOS assessorada pels valors de l'AUC presenta una superioritat major del 40% en l'assoliment de la diana terapèutica respecte a l'estrategia de dosificació segons fitxa tècnica. Tanmateix s'ha demostrat la superioritat en els resultats d'eficàcia sense afectar el perfil de seguretat.

D'acord amb la hipòtesi de partida, els resultats presentats en aquesta tesi prenenen marcar un pas endavant en l'optimització de la dosificació del GCV mostrant els esquemes òptims de dosificació per a la profilaxi i tractament de CMV en base a les relacions PK/PD. De fet s'ha complimentat la primera etapa dins d'aquest procés, establir la dosi òptima en base a l'exposició (PK) i es completarà amb l'optimització de la dosi en base a la reducció de la càrrega viral (PK/PD). Amb els resultats obtinguts d'aquesta tesi, la finalitat és poder fer-ne un ús clínic en un futur pròxim per a la individualització de les dosis de GCV per a cada pacient.

La nostra hipòtesis de partida es basa en la relació entre l'exposició a GCV i la resposta, estant l'AUC de GCV directament relacionada amb l'eficàcia i seguretat. Wiltshire H i col³⁴ varen demostrar que els valors d'AUC de 40-50 µg·h/mL permetien la supressió de la virèmia durant el tractament profilàctic reduint la incidència del desenvolupament de la mateixa i l'aparició d'efectes adversos suggerint l'ajust de dosi a aquesta diana d'exposició establerta. Malgrat aquests resultats, i degut a que són poques les dades que descriuen la optimització de la posologia de GCV, aquest fàrmac no es monitoritza en la pràctica clínica habitual.

Aquest fet justificaria la necessitat de desenvolupar un model PK poblacional que es pogués aplicar a la clínica.

El model poblacional prèviament publicat⁵² i l'avaluació de les exposicions obtingudes amb les dosis estàndard va suposar el primer pas per al desenvolupament de pautes terapèutiques òptimes en base a les relacions PK/PD. Cal destacar que aquest model incloïa la funció renal donada pels valors de CLCR estimats segons Cockcroft-Gault, com a única covariable explicativa de part de la variabilitat PK del GCV. La limitació d'aquest model era l'absència del pes corporal com a covariable, fet bastant freqüent en poblacions d'adults on no hi ha un gran marge de variació entre els valors de pesos corporals. L'estudi de l'adequació de l'estratègia de dosificació proposada pel laboratori fabricant segons la funció renal donada pel CLCR va demostrar que els pacients amb CLCR < 30 i > 70 mL/min estaven sobre o infra-exposats respectivament. També es va observar que els pacients tractats amb GCV iv i amb valors de CLCR=50 mL/min estaven específicament infra-dosificats.

A partir dels resultats d'aquest estudi es va plantejar l'objectiu d'optimitzar la teràpia amb GCV/VGCV en pacients TOS i el punt inicial va ser implantar la metòdica analítica en el nostre centre. En primer lloc, es va realitzar el desenvolupament i la validació de la metòdica analítica en el nostre centre amb una nova tècnica, concretament, la cromatografia líquida d'ultra alta eficàcia (UHPLC) amb detecció ultravioleta (UV). Fins aquell moment s'havia determinat de forma externalitzada amb cromatografia d'alta eficàcia (HPLC). Aquesta tècnica novedosa en aquell moment superava alguns dels inconvenients presents en la determinació mitjançant HPLC, aportant major capacitat, millor resolució, sensibilitat i velocitat d'anàlisi.

Els resultats del primer treball mostren la precisió i exactitud del mètode analític seguint els criteris d'anàlisi de mostres biològiques d'acord a les guies de la FDA. El valor del límit de quantificació (LLOQ) va ser de 0.05 µg/mL, millorant la sensibilitat de l'HPLC que tenia un valor de LLOQ menor (0.5 µg/mL). Tot i així, les calibracions es van realitzar amb un interval de concentració entre 0.5 i 30 µg/mL degut a que els valors de concentracions en totes les determinacions dels punts de l'AUC emprades per a la monitorització de GCV i ajust de dosi en base al model PK poblacional eren superiors a 1 µg/mL. El mètode analític va presentar una bona linealitat en les nostres condicions de treball dins de l'interval de concentracions de 0.5-30 µg/mL.

Els valors d'exactitud i precisió intra-dia i inter-dia van mostrar elevada repetibilitat i reproductibilitat presentant valors inferiors al 15% i 20% en el cas de punt LLOQ. Així es va demostrar que el mètode UHPLC amb detector UV presenta una precisió i exactitud acceptable. La reducció del temps de retenció (5 minuts amb HPLC vs 0.7 min amb UHPLC) i el poc volum de mostra emprat (200 µL), així com la facilitat de preparació de la mostra amb la precipitació de proteïnes, és molt important per a la monitorització de fàrmacs i en el cas del GCV, escurçar el temps total de determinació és molt important considerant el nombre total de mostres en l'estudi cinètic.

De forma similar a l'HPLC, l'especificitat del mètode es va confirmar i no es van observar interferències amb la medicació concomitant habitual dels pacients transplantats com són els immunosupressors i la profilaxis antibiòtica. La correlació entre HPLC i UHPLC/UV va ser bona, de manera que ambdós mètodes són útils i intercanviables per a la determinació de GCV.

Existeixen a la literatura treballs previs de la determinació de GCV mitjançant HPLC amb detector d'espectrofluorimetria⁸², fluorescència⁸³ o ultravioleta⁸⁴. La

primera metodologia presenta l'avantatge que discrimina un metabolit de l'aciclovir però donat que en la nostra població no s'administra de forma concomitant GCV/VGCV i aciclovir, aquest avantatge no seria molt rellevant. El principal inconvenient és el temps de retenció que va ser de 30 min i el temps total de determinació que va ser de 42 minuts⁸². En el segon treball amb detector de fluorescència, el LLOQ va ser de 0.025 µg/mL, inferior al presentat pel nostre grup i similar als prèviament publicat⁸⁵ amb el mateix detector però amb un volum d'injecció de 100 µL⁸³. Igual que en l'anterior, la principal desavantatge va ser el temps de retenció que va ser de 8.1 min. El tercer treball, que empra el mateix detector, va assolir un LLOQ de 0.05 µg/mL amb el mateix volum d'injecció de mostra però amb un temps de retenció de 3.91 min⁸⁴, superior al presentat en aquesta tesi que és de 0.7 min.

Paral·lelament i degut a la disponibilitat d'un UHPLC amb detector de masses (MS/MS) en el nostre centre per a la determinació de rutina de fàrmacs immunosupressors, es va dur a terme el segon treball on es va desenvolupar i validar la metòdica analítica amb aquesta tècnica de detecció. L'objectiu era implantar la tècnica en el departament de Bioquímica Clínica, on es duen a terme les determinacions dels fàrmacs, per a la monitorització de GCV de forma rutinària facilitant la introducció de la optimització de dosis en base les concentracions assolides en la pràctica diària en el nostre hospital.

De nou la selectivitat de la metòdica amb UHPLC-MS/MS, va ser idònia ja que no es van observar pics que interferissin amb les mostres plasmàtiques de pacients polimedcats, fet especialment important en els pacients transplantats. El temps de retenció de GCV va ser de 0.51 minuts, lleugerament inferior a l'obtingut amb el detector UV. El límit de detecció va ser de 0.03 µg/mL i el LOQ de 0.06 µg/mL, inferior al que presenta la metòdica amb detector UV. En quan a la precisió i exactitud, es van complir les exigències de la EMA. La metòdica presenta una

elevada selectivitat que és especialment important en els pacients transplantats, ja que disminueix el risc de co-elució d'altres substàncies endògenes o exògenes amb estructura similar a GCV. La correlació amb el mètode validat amb UHPL/UV va ser bona demostrant la intercanviabilitat de les dues tècniques i la utilitat per a la determinació de GCV.

Existeixen a la literatura altres metòdiques amb cromatografia líquida i detector MS/MS^{86,87,88}. El LLOQ és similar entre els diferents mètodes però el temps de retenció van ser superiors a 0.5 minuts. La principal avantatge d'aquest mètode respecte els prèviament comentats, és la rapidesa i senzillesa de la preparació de la mostra amb la precipitació de proteïnes.

El desenvolupament del model PK poblacional i l'estimació de l'AUC assolit s'havia realitzat amb un disseny intensiu de presa de mostres de 12 punts per ocasió i pacient, però aquesta estratègia no és aplicable en la pràctica clínica rutinària ja sigui per motius ètics, logístics o bé econòmics. Per altra banda, els temps fixes de mostreig són un factor limitant en els estudis clínics i en els programes de monitorització PK i són de difícil aplicació degut a que les extraccions es duen a terme de forma ambulatòria i el seguiment és complex. Habitualment les distorsions en el control mèdic dels pacients i la manca de compliment respecte al temps d'administració del fàrmac d'estudi implica problemes en la logística d'extraccions de mostres. Com a conseqüència, diferents autors^{89,90,91,92} han proposat establir diverses finestres de mostreig consistents en intervals fixes de temps dins dels quals són possible les extraccions de mostres. Aquesta aproximació ofereix flexibilitat i valors de concentració plasmàtica vs temps que igualment són informatius per una estimació robusta de paràmetres PK. Per aquests motius, posteriorment es va desenvolupar una estratègia de mostreig limitat per a poder predir els valors d'exposició individuals emprant el menor número de mostres per pacient

possibles i amb la major precisió i exactitud. El tercer treball presentat va avaluar diferents finestres de mostreig simplificat compatible amb la pràctica clínica i el confort del pacient de manera que pogués ésser aplicable durant la monitorització PK de GCV/VGCV en pacients transplantats considerant aspectes ètics, pràctics i econòmics.

En una fase inicial, es van escollir les finestres de mostreig d'acord amb el perfil PK del GCV prèviament observat i sempre es va considerar com a últim temps experimental el de les 8h post-administració. Això reduïa el temps d'espera dels pacients i el risc d'obtenir valors de concentracions per sota del límit de quantificació de la metòdica analítica. D'aquesta manera totes les mostres es van poder extreure durant la rutina diària de l'hospital i al mateix temps van ser òptimes i informatives per a descriure els paràmetres PK representatius dels processos d'absorció i disposició.

D'altra banda, el fet de disposar d'un model PK poblacional previ va agilitzar molt la selecció de l'estratègia òptima de mostreig limitat, donat que per cada disseny proposat es van poder calcular els paràmetres per predicció bayesiana utilitzant el model i estratificant pels valors de la covariable més influent per descriure la variabilitat PK, és a dir, la funció renal donada pel CLCR. Aquesta metodologia és més robusta que la utilitzada tradicionalment⁶⁴ on es calculaven exposicions amb molts pocs punts experimentals utilitzant l'aproximació no compartimental. Aquesta aproximació sol emprar els mètodes trapezoïdals pel càcul d'àrees sota la corba que poden donar lloc a sobreestimació (fase ascendent de les corbes) o infraestimació (fase descendent de les corbes) quan els punts experimentals estan molt separats en el temps. La selecció de la millor estratègia de mostreig limitat es va determinar mitjançant el mètode de Sheiner i Beal⁹³. Per cada disseny i subpoblació es calcularen l'exactitud i la precisió per cada paràmetre (efectes mixtes i aleatoris). Els paràmetres que es van seleccionar per a

l'avaluació de l'estrategia de mostreig van ser dos paràmetres primaris, l'aclariment plasmàtic (CL) i el volum de distribució en compartiment central (V2). L'aclariment, degut a que és el paràmetre PK directament afectat per canvis en el procés d'eliminació del fàrmac, de manera que un retard implicaria una sobre-exposició i toxicitat. El volum en compartiment central, degut a que és determinant del valor de les concentracions màximes (Cmax) assolides, a la vegada que l'estimació d'aquest paràmetre depèn de la robustesa en la determinació del Cmax. Així les finestres considerades van ser de 0.5 a 1.5h, quan es dóna l'increment de concentracions plasmàtiques, de 2 a 3h i de 4 a 5h al voltant del pic de concentracions i de la fase de disposició ràpida i de 6 a 8h que és la fase de disposició més lenta que reflexa l'eliminació del fàrmac.

En una primera etapa es van considerar les concentracions pre-dosi degut a que generalment correlacionen correctament amb l'AUC i els paràmetres PD i l'extracció en aquest punt dóna valors de concentració-temps poc esbiaixats. Finalment no es va poder incloure en els esquemes de mostreig ja que, a diferència d'altres autors^{94,95}, en el model poblacional emprat, l'error residual incloïa un component additiu a part de l'error proporcional. Això augmenta la probabilitat de predir concentracions negatives per valors de concentracions molt pròxims al límit de quantificació de la metòdica analítica, quan el model s'utilitza com a eina predictora. Aquesta va ser una de les limitacions del model utilitzat a conseqüència de la metòdica analítica emprada en el seu moment. L'esquema de mostreig que finalment es va seleccionar degut a presentava la major exactitud i precisió per a l'estimació de CL i V2 van ser el disseny amb 3 punts (0.5-1.5, 4-5h i 6-8h post-dosi) seguit del de 2 punts (2-3h i 6-8h post-dosi). L'estrategia amb dos temps de mostreig va estimar els valors de CL i V2 amb més imprecisió i inexactitud però no s'hauria de descartar per a la monitorització quan hi han situacions que limiten en gran manera el nombre de mostres a extraure.

Wiltshire H i col^{33,50} ja van emprar una estratègia de mostreig limitat per a desenvolupar el model PK i PD de GCV utilitzant tres finestres de mostreig per visita: 1-3 h, 5-12 h i aproximadament 24 h postdosi. No obstant, a jutjar per la publicació i degut a que la metodologia pel seu desenvolupament no està descrita, sembla tractar-se d'una estratègia empírica sense base matemàtica on l'únic factor que es tenia en compte era el perfil de la corba i les seves fases. Posteriorment, Perrottet N i col⁴⁸ van desenvolupar un model PK poblacional utilitzant dades de concentració de GCV extretes a la predosi i a les 3h postdosi i els següents estudis PK/PD també van utilitzar dos temps de mostreig essent un d'ells la predosi^{70,96} i tampoc en cap d'aquests casos es tractava de metodologies amb robustesa justificada. En canvi, en la població pediàtrics Zhao W i col⁹⁴ suggereixen el mostreig a la predosi, 2h i 4h postdosi. Aquests autors van avaluar, mitjançant l'estimació bayesiana a partir d'un model poblacional publicat⁹⁷, nou dissenys diferents i malgrat el que presentava major exactitud i precisió era el que no contenia la predosi, de forma similar als nostres resultats, finalment van seleccionar C0, C2h i C4h.

Una cop validada la metodologia per a la monitorització clínica del GCV i desenvolupada una estratègia de mostreig amb el menor nombre de mostres possibles, el pas següent va ser aplicar el model PK poblacional en un assaig clínic randomitzat comparant dues estratègies de dosificació de GCV i VGCV per a la profilaxis i tractament de la malaltia per CMV en pacients SOT. No hi havia cap estudi previ publicat a la literatura amb aquestes característiques, les conclusions del qual podien ser molt rellevants. Per això, en el quart treball es va dur a terme la monitorització PK (TDM) de GCV estimant els paràmetres PK i valors d'exposició (AUC) en base al valors de concentracions obtingudes determinades amb la metòdica analítica desenvolupada. L'estratègia emprada de TDM és la descrita com més cost-efectiva ja que aplica un model poblacional

combinat amb una estratègia de mostreig òptim. D'aquesta manera es pot estudiar el comportament PK individual amb el menor nombre de mostres⁹⁸.

Els resultats donen suport al valor de la TDM per assolir l'exposició dins de la diana terapèutica considerant l'elevada variabilitat PK de GCV després de l'administració de GCV iv o VGCV oral. L'estudi previ en que es va desenvolupar el model PK poblacional va suposar el primer pas per establir els esquemes òptims de dosificació de GCV per al tractament de la malaltia per CMV en base a les relacions PK/PD. Aquest mateix estudi va avaluar l'adequació de les dosis descrites a la fitxa tècnica segons el CLCR per evitar la sobre i infraexposició. Els pacients amb CLCR <30 i >70 mL/min van estar específicament sobre i infraexposats, respectivament. A més a més, els pacients amb valors de CLCR de 50 mL/min van obtenir valors d'AUC < 40 µg·h/mL després de l'administració de GCV iv. D'altra banda, l'estudi en qüestió va representar també una validació externa del model prèviament desenvolupat, a la vegada que va permetre recollir més dades de concentració vs temps per poder incorporar i millorar el model anterior en un futur pròxim.

Entre els autors que han publicat fins a l'actualitat sobre l'optimització posològica de GCV, Whiltshire H i col³⁴ va ser el primer en demostrar que la supressió de la virèmia durant la profilaxis estava relacionada amb valors d'exposició (AUC) de 40-50 µg·h/mL. Això va suggerir la necessitat d'ajustar les dosis a la diana justificant el desenvolupament i ús d'un model PK poblacional aplicable a la clínica. Per contra, molts pocs autors⁹⁹, descriuen que l'exposició a GCV no influeix en la variabilitat en l'aclariment viral. En aquest sentit cal destacar que alguns centres utilitzen dosis de 450 mg independentment de la funció renal per a la profilaxi, basant-se en l'equivalència amb 3 g de GCV oral. Tot i així, no existeixen suficients dades que donin suport a aquesta aproximació.

D'altra banda aquestes dosis baixes podrien comportar més risc de desenvolupar virèmia i resistències¹².

Les dades de l'estudi presentat van mostrar la superioritat de l'estratègia d'individualització de dosi segons el model PK poblacional (88.4%) comparat amb l'estratègia descrita en fitxa tècnica (18.5%), assolint el marge de superioritat que es va definir als objectius de l'assaig (superioritat del 40% en la proporció de pacients que assoleixen la diana terapèutica: AUC 40-50 µg·h/mL). Analitzant el número d'ocasions en que es determinava l'AUC de forma individual, també es va confirmar la superioritat de la dosificació ajustada en base a les concentracions plasmàtiques de GCV i al model PK poblacional utilitzat com a predictor bayesià, ja que en el 69.5% de les ocasions es van obtenir valors d'AUC dins de la diana definida. De fet, els resultats d'exposició ens indiquen que la dosificació convencional només permet assolir la diana terapèutica en una cinquena part dels pacients.

L'avaluació del temps fins assolir la diana terapèutica va mostrar que era menor en el grup dosificat segons el model poblacional vs el grup dosificat segons la fitxa tècnica. Aquest punt és d'especial rellevància per la importància d'assolir els nivells terapèutics de manera precoç des de l'inici del tractament, sobretot en aquells pacients tractats per una infecció per CMV o aquells pacients d'alt risc d'infecció per CMV.

Els resultats d'exposició de cada ocasió també es van analitzar realitzant diferents sub-anàlisis segons la funció renal. L'objectiu era estudiar si existien certs grups poblacionals amb una determinada funció renal que estiguessin específicament infra o sobreexposats. Això és d'esperar per un fàrmac que s'elimina pràcticament totalment inalterat per via renal. Els pacients amb valors de CLCR <30 o > 60 mL/min (valors estimats segons Cockroft-Gault) i dosificats

segons la fitxa tècnica van presentar valors d'exposició per sobre o per sota de la diana establerta, respectivament. Concretament, els pacients amb CLCR entre 20 i 30 mL/min van presentar un valor promig d'AUC de $70.71 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL} \pm 15.13$. Cal destacar que aquests resultats van ser molt similars als valors presentats en l'article de Caldés A i col⁵² i confirmen que la dosi recomanada pels diferents talls de funció renal segons fitxa tècnica s'haurien de reconsiderar per a tenir més pacients correctament dosificats.

Els pacients amb CLCR entre 30 i 50 mL/min van presentar valors d'AUC similars entre els dos grups de tractament. En el cas dels pacients amb CLCR 50-60 mL/min, es va observar una tendència a la infradosificació que no va resultar significativa. De nou, aquests resultats van ser similars als prèviament publicats⁵² en que només assolien l'AUC diana el 33% dels pacients amb CLCR 50-60 mL/min.

Tal com ja s'ha descrit en el model utilitzat com a predictor bayesià, gran part de la variabilitat en l'aclariment de GCV era explicada per canvis en la funció renal estimada mitjançant la fórmula de Cockroft-Gault. En el cas dels pacients assignats al grup d'ajust de dosi per predicció bayesiana, les dosis van haver de ser re-ajustades en un 34.1% de les ocasions, degut a que es van obtenir valors d'exposició infra o supraterapèutics. Això podria ser degut a canvis en la funció renal entre ocasions o visites després de l'últim ajust. Fet que és previsible per a un fàrmac com el GCV, on la funció renal és la variable que més influeix en els valors d'exposició assolida en la població d'estudi. Tot i això, la inclusió del pes també podria ser important i rellevant per l'ajust de dosi. Tot i que el model PK poblacional aplicat no incloïa el pes com a covariable que expliqués la variabilitat observada, la variació en el pes podria explicar part de les infra i sobreexposicions observades. En el model PK poblacional emprat la variable del pes estava inclosa dins el càlcul del CLCR segons la fórmula de Cockroft-Gault.

Però cal destacar que actualment les fórmules emprades per a l'estimació del filtrat glomerular són MDRD¹⁰⁰ i més recentment CKD-EPI^{101,102} (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration), que no inclouen el pes com a variable en el càcul. En qualsevol cas, la inclusió del pes és essencial per a l'ajust de dosi de GCV iv de manera que en un futur pròxim s'haurien d'incloure dades de pacients amb valors de pesos més extrems en el model per aconseguir poder explicar part de la variabilitat observada pels diferents valors d'aquesta covariable.

L'anàlisi dels resultats del tractament va demostrar la superioritat de l'ajust de dosi utilitzant el model PK poblacional com a predictor bayesià. El temps transcorregut fins a l'eradicació viral va ser superior en els pacients dosificats segons fitxa tècnic respecte als altres, amb una diferència que va presentar tendència a la significació estadística (28.6% superior). La mediana de dies fins a la negativització de la càrrega viral en els pacients dosificats segons el model PK poblacional va ser de 12.5 dies i en els pacients dosificats segons fitxa tècnica de 17.6 dies. Aquests resultats concorden amb les guies clíniques¹² sobre el maneig del tractament de CMV que ressalten que la dosificació inadequada pot comportar un fracàs del tractament o bé l'aparició d'efectes adversos així com el desenvolupament de resistències. Per altra banda aquestes diferències en el temps de curació es podrien relacionar amb l'assoliment de l'exposició diana de forma precoç, perquè permetria la supressió de la virèmia ja des de l'inici del tractament. Caldrien estudis amb un major nombre de pacients per avaluar l'efecte que té l'ajust posològic, per assolir la diana terapèutica, sobre l'eficàcia del tractament.

Per tal de poder assegurar que les diferències en els resultats obtinguts en aquest estudi entre ambdós grups de tractament estaven relacionades al tipus d'estratègia de dosificació utilitzada i no a d'altres factors de confusió, es va fer

una descriptiva per cada grup de diferents variables que s'han descrit a la literatura com a factors predictius de curació de la infecció/malaltia per CMV. Això va permetre avaluar possibles diferències entre els dos grups de randomització que poguessin esbiaixar els resultats. En l'estudi VICTOR²⁴, assaig pivotal de VGCV oral per al tractament de la infecció i malaltia per CMV, la variable que va afectar l'aclariment viral va ser la càrrega viral basal. Els pacients amb valors < 10000 còpies/mL en aquest paràmetre, presentaven una probabilitat 6.41 vegades superior de negativització del virus de al dia 21 respecte als pacients amb càrrega viral > 10000 còpies/mL. En el nostre cas, no hi van haver diferències en la mediana de càrrega viral basal entre els dos grups de tractament (5513 còpies/mL en el Grup A i 4100 còpies/mL en el Grup B). En els dos grups la càrrega viral basal inferior a 200000 còpies/mL, excepte en un pacient assignat al Grup A, i el 43.3% superior a 10000 còpies/mL, degut a que la major part estaven sota tractament anticipat. Per tant, les diferències observades en l'eficàcia al tractament de la infecció per CMV no es van poder atribuir a la càrrega viral basal.

D'altres factors potencials que poden influenciar la resposta enfront la infecció per CMV són la serologia D/R, malaltia teixit invasiva, tractament previ amb teràpia anti CMV, tipus d'òrgan transplantat i la intensitat d'immunosupressió. En la nostra població d'estudi no hi havia diferencies en la distribució de pacients segons la serologia en el moment de randomització. En el nostre estudi tots els pacients D+/R- van respondre abans dels 21 dies a excepció d'un pacient assignat al grup dosificat segons fitxa tècnica. Els dos pacients D+/R- assignats al grup d'ajust de dosi segons el model PK poblacional van negativitzar la càrrega viral abans dels 7 dies de tractament. En contrast, Perrottet N i col¹⁰³ van observar que en 7 pacients D+/R- tractats amb VGCV oral per malaltia tardana o recurrència, no van presentar la resposta adequada tot i assolir les exposicions

adequades a GCV. Suggereixen que la variabilitat immunològica en els pacient seronegatius juga un paper important en la resposta a CMV.

La incidència de recidiva en el nostre estudi va ser del 28% i aquest resultat està en concordança amb les dades de publicacions anteriors en que la incidència està al voltant del 25 al 30%^{21,104,105}. Cal remarcar que el 85% dels pacients que varen presentar recidiva eren els assignats al grup de dosificació segons fitxa tècnica. De forma similar al temps d'eradicació viral, en el cas de la variable recurrència es va la influència de factors predictors de recurrència i que podrien esbiaixar els resultats obtinguts. Es van analitzar la serologia D/R, el tractament immunosupressor d'inducció, la càrrega viral basal o estratègia de tractament. L'únic factor significatiu i predictor de recurrència va ser el tipus d'estratègia de tractament. Tot i això, cal destacar que la resposta a la teràpia antiviral és dependent de la complexa interacció entre el virus i l'hoste.

Pel que fa a la resposta al tractament profilàctic, no hi va haver cap pacient que presentés virèmia durant la profilaxis, a diferència de l'estudi PD de Wiltshire i col³⁴ en el que es va observar un 2.9% d'incidència de virèmia. Als 6 mesos post-transplant, l'aparició de virèmia de forma global en tota la població d'estudi va ser del 20.8%, lleugerament inferior a la reportada en l'estudi PD (39.7%). D'acord amb la literatura, es va observar una major incidència de primoinfeccions en pacients seronegatius. En la població de l'assaig, la proporció de pacients que presentaren primoinfecció després del període de profilaxis va ser superior en el grup de pacients dosificats segons fitxa tècnica.

El GCV i VGCV varen ser ben tolerats sense diferències en el perfil d'efectes adversos incloent leucopènia, anèmia i trombocitopènia. La incidència d'events hematològics fou similar als prèviament reportats (41.39%)³⁴. En el nostre estudi només el 16% dels pacients presentaven valors d'AUC superiors a 50 µg·h/mL

debut a que la major part de les vegades en que no es va assolir la diana terapèutica va ser per infraexposició. Aquest estudi no va permetre la correlació dels efectes adversos amb l'exposició assolida ja que no havia estat dissenyat amb aquest objectiu i no tenia suficient potència estadística.

En l'estudi PK poblacional previ ja es va observar que els pacients en tractament amb GCV iv estaven infraexposats quan es dosificava segons la fitxa tècnica, sobretot en aquells pacients amb CLCR de 50 mL/min que presentaven valors d'AUC de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ i només un 3.5% assolien la diana terapèutics. Igualment, en aquells amb CLCR < 30 mL/min s'assoliren nivells supraterapèutics en més del 90% dels casos. Aquest fet es deuria a que la fitxa tècnica utilitza punts de tall de funció renal massa amplis indicant dosis massa reduïdes o excessives. En concordança amb aquests resultats, els pacients que es varen dosificar segons el model PK poblacional rebien dosis majors (6.9 mg/Kg/dia) que aquells dosificats segons fitxa tècnica (4.9 mg/Kg/dia). Per altra banda, els pacients amb CLCR entre 30 i 40 mL/min varen rebre dosis de 7.5 mg/Kg/dia i els que presentaven CLCR entre 40 i 60 mL/min 8.3 mg/Kg/dia.

La mediana de dosificació via oral en pacients en profilaxis va ser inferior en els pacients amb ajust de dosi segons el model PK (900 mg/dia en el grup A vs 450 mg/dia en el grup B). Els pacients tractats amb VGCV oral per la infecció varen rebre dosis similars entre els dos grups de randomització quan s'analitza de forma global. Tot i així, si s'avaluen les dosis rebudes segons els diferents talls de CLCR, les medianes de dosis foren inferiors en el grup dosificat segons el model PK.

El nostre estudi demostra l'efecte de l'ajust de dosi de GCV/VGCV en base al model poblacional en l'assoliment de la diana terapèutica. Els resultats recolzen a la necessitat de la monitorització farmacocinètica de GCV en base a les

DISCUSSIÓ

concentracions observades per assolir la diana terapèutica degut a l'elevada variabilitat observada després de l'administració de GCV iv o VGCV oral.

VI. CONCLUSIONS

VI. CONCLUSIONS

1. Es desenvoluparen dos mètodes analítics per a la determinació de GCV en mostres de plasma. La validació dels dos mètodes va confirmar la selectivitat, especificitat, precisió i exactitud per a la determinació de GCV.
2. Es va desenvolupar una estratègia de mostreig simplificat considerant aspectes ètics, pràctics i econòmics, compatible amb la pràctica clínica i el confort del pacient. L'esquema de mostreig que finalment es va seleccionar va ser el disseny amb 3 punts (0.5-1.5, 4-5h i 6-8h post-dosi) seguit del de 2 punts (2-3h i 6-8h post-dosi). Aquesta estratègia, desenvolupada en base a tècniques de predicció bayesiana utilitzant un model PK poblacional prèviament desenvolupat, s'aplicà durant la monitorització PK de GCV/VGCV en pacients transplantats.
3. L'estudi demostrà la superioritat de l'estratègia d'individualització de GCV/VGCV utilitzant un predictor bayesià a partir d'un model PK poblacional prèviament desenvolupat respecte a l'estratègia descrita en fitxa tècnica. El marge de superioritat en la proporció de pacients amb exposició dins de la diana terapèutica (AUC 40-50 µg·h/mL) en el grup de predicció bayesiana respecte al de fitxa tècnica va ser superior al 40%, assolint l'objectiu plantejat.
4. L'anàlisi comparatiu de l'exposició assolida entre ambdós estratègies de tractament pels diferents talls de funció renal, va confirmar que les dosis recomanades segons fitxa tècnica s'haurien de reconsiderar per a tenir més pacients correctament dosificats. Els pacients tractats segons la fitxa tècnica i que presentaven valors de CLCR <30 o > 60 mL/min van

presentar valors d'exposició per sobre o per sota de la diana estableerta, respectivament.

5. En els pacients amb infecció o malaltia que rebien tractament ajustat segons el predictor bayesià, el temps necessari per a l'eradicació viral va ser inferior que en aquells dosificats segons fitxa tècnica.
6. La proporció de pacients amb recidiva va ser superior en el grup de pacients dosificats segons fitxa tècnica.
7. La proporció de pacients que presentaren primoinfecció després del període de profilaxis va ser superior en el grup de pacients dosificats segons fitxa tècnica.
8. La incidència d'efectes adversos hematològics va ser similar als prèviament reportats sense diferències significatives en el perfil de toxicitat entre els dos grups.
9. En concordança amb els resultats d'exposició avaluats, els pacients que es van dosificar segons la predicción bayesiana rebien dosis majors de GCV iv que aquells dosificats segons fitxa tècnica ja que la majoria de pacients presentaven valors de CLCR entre 40 i 60 mL/min. En l'administració de VGCV oral segons la predicción bayesiana, els pacients amb CLCR < 30 mL/min rebien dosis inferiors a les descrites en fitxa tècnica. Per contra, aquells pacients amb CLCR > 70 mL/min rebien dosis superiors comparat amb la fitxa tècnica.

VII. BIBLIOGRAFIA

VII. BIBLIOGRAFIA

- ¹ De la Torre-Cisneros, Fariñas de la Torre-Cisneros J, Fariñas MC, Castón JJ, Aguado JM, Cantisán S, Carratalá J, Cervera C, Cisneros JM, Cordero E, Crespo-Leiro MG, Fortún J, Frauca E, Gavaldá J, Gil-Vernet S, Gurguí M, Len O, Lumbieras C, Marcos MÁ, Martín-Dávila P, Monforte V, Montejo M, Moreno A, Muñoz P, Navarro D, Pahissa A, Pérez JL, Rodriguez-Bernot A, Rumbao J, San Juan R, Santos F, Varo E, Zurbano F; GESITRA-SEIMC/REIPI. GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2011; 29: 735-58.
- ² Cervera C, Gurguí M, Lumbieras C. Risk factors for cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2011; 29 suppl 6: 11-7.
- ³ Charpentier B, Rostaing L, Berthoux F, Lang P, Civati G, Touraine JL, et al. A three arm study comparing immediate tacrolimus therapy with antithymocyte globulin induction therapy followed by tacrolimus or cyclosporine A in adult renal transplant recipients. *Transplantation.* 2003; 75: 844-51.
- ⁴ Hadley S, Samore MH, Lewis WD, Jenkins RL, Karchmer AW, Hammer SM. Major infectious complications after orthotopic liver transplantation and comparison of outcomes in patients receiving cyclosporine or FK506 as primary immunosuppression. *Transplantation.* 1995; 59: 851-9.
- ⁵ Vigano M, Dengler T, Mattei MF, Poncelet A, Vanhaecke J, Vermes E, et al. Lower incidence of cytomegalovirus infection with everolimus versus mycophenolate mofetil in de novo cardiac transplant recipients: a randomized, multicenter study. *Transpl Infect Dis.* 2010; 12: 23-30.
- ⁶ Cervera C, Fernández-Ruiz M, Valledor A, Linares L, Antón A, Marcos MA, et al. Epidemiology and risk factors for late infection in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2011; 13: 598-607.
- ⁷ Kirklin JK, Naftel DC, Levine TB, Bourge RC, Pelletier GB, O'Donnell J, et al. Cytomegalovirus after heart transplantation. Risk factors for infection and death: a multiinstitutional study. The Cardiac Transplant Research Database Group. *J Heart Lung Transplant.* 1994; 13: 394-404.
- ⁸ Manez R, Kusne S, Green M, Abu-Elmagd K, Irish W, Reyes J, et al. Incidence and risk factors associated with the development of cytomegalovirus disease after intestinal transplantation. *Transplantation.* 1995; 59: 1010-4.
- ⁹ Fietze E, Prosch S, Reinke P, Stein J, Docke WD, Staffa G, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor. *Transplantation.* 1994; 58: 675-80.

-
- ¹⁰ Tolkoff-Rubin NE and Rubin RH. The impact of cytomegalovirus infection on graft function and patient outcome. *Graft* 1999; 2: S101-3.
- ¹¹ Fishman J.A. Infection in organ-transplant recipients. *New Engl Journ Medicine*. 2004; 24: 1741-1751.
- ¹² Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, Humar A; Transplantation Society International CMV Consensus Group. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation*. 2013 Aug 27; 96: 333-60.
- ¹³ Lowance D.H, Neumayer C.M, Legender J.P, Squiflet J, Kovarik P.J et al. Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. *N. Engl. J. Med* 1999; 340: 1462-1469.
- ¹⁴ Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976; 16: 31.
- ¹⁵ Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang YL, Hendriksen S, Kusek JW, Van Lente F; Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2006; 145(4): 247-54. Erratum in: *Ann Intern Med*. 2008; 149(7): 519.
- ¹⁶ Trevillyan J, Angus P, Shelton E, Whitlam J, Ierino F, Pavlovic J, Gregory D, Urbancic K, Torresi J, Testro A, Grayson ML. 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; 57(8): 4058-60.
- ¹⁷ Penne EL, Nurmohamed SA. Underdosing of prophylactic valganciclovir due to inaccurate estimation of glomerular filtration rate leading to severe cytomegalovirus disease in a kidney transplant recipient. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(2): 1271-2.
- ¹⁸ Emery VC, Griffiths PD. Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(14): 8039-44.
- ¹⁹ Limaye A, Corey L, Koelle D.M, Davis C.L, Boeckh M. Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid organ transplants. *Lancet* 2000; 356: 64-649.
- ²⁰ 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): 1153-83.
- ²¹ Asberg A, Humar A, Jardine AG, Rollag H, Pescovitz MD, Mouas H, Bignamini A, Töz H, Dittmer I, Montejo M, Hartmann A; VICTOR Study Group. Long-term

-
- outcomes of CMV disease treatment with valganciclovir versus IV ganciclovir in solid organ transplant recipients. Am J Transplant 2009; 9: 1205.
- ²² Chou SW. Cytomegalovirus drug resistance and clinical implications. Transpl Infect Dis 2001; 3: 20
- ²³ Sia IG, Wilson JA, Groettum CM, Espy MJ, Smith TF, Paya CV. Cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts relapsing CMV infection after solid organ transplantation. J Infect Dis 2000; 181: 717.
- ²⁴ Asberg A, Humar A, Rollag H, Jardine AG, Mouas H, Pescovitz MD, Sgarabotto D, Tuncer M, Noronha IL, Hartmann A; VICTOR Study Group. Oral Valganciclovir is noninferior to intravenous ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. American Journal Transplantation 2007; 7: 2106-2113.
- ²⁵ Boivin G, Goyette N, Rollag H, et al. Cytomegalovirus resistance in solid organ transplant recipients treated with intravenous ganciclovir or oral valganciclovir. Antivir Ther 2009; 14: 697.
- ²⁶ Hantz S, Garnier-Geoffroy F, Mazeron MC, Garrigue I, Merville P, Mengelle C, Rostaing L, Saint Marcoux F, Essig M, Rerolle JP, Cotin S, Germi R, Pillet S, Lebranchu Y, Turlure P, Alain S; French CMV Resistance Survey Study Group. Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 2628.
- ²⁷ Myhre HA, Haug Dorenberg D, Kristiansen KI, Rollag H, Leivestad T, Asberg A, Hartmann A. Incidence and outcomes of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infections in 1244 kidney transplant recipients. Transplantation 2011; 92: 217.
- ²⁸ Lurain NS, Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. Clin Microbiol Rev. 2010; 23(4): 689-712.
- ²⁹ Boivin G, Goyette N, Farhan M, Ives J, Elston R. Incidence of cytomegalovirus UL97 and UL54 amino acid substitutions detected after 100 or 200 days of valganciclovir prophylaxis. J Clin Virol 2012; 53: 208.
- ³⁰ Mc Gavin 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.
- ³¹ Sugawara, M. et al. Transport of valganciclovir, a ganciclovir prodrug, via peptide transporters PEPT1 and PEPT2. J. Pharm Sciences. 2000; 89: 781-9.
- ³² Cvetkovic RS, Wellington K. Valganciclovir: A review of its use in the management of CMV infection and disease in immunocompromised patients. Drugs 2005; 65(6): 859-878.
- ³³ Wiltshire H, Hirankarn S, Farrell C, Paya C, Pescovitz MD, Humar A, Dominguez E, Washburn K, Blumberg E, Alexander B, Freeman R, Heaton N; Valganciclovir

Solid Organ Transplant Study Group. Pharmacokinetic profile of ganciclovir after its oral administration and from its prodrug, valganciclovir, in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* 2005; 44: 495-507.

³⁴ Wiltshire H, Paya CV, Pescovitz MD, Humar A, Dominguez E, Washburn K, Blumberg E, Alexander B, Freeman R, Heaton N, Zuiderveld KP; Valganciclovir Solid Organ Transplant Study Group. Pharmacodynamics of oral ganciclovir and valganciclovir in solid organ transplant recipients. *Transplantation.* 2005; 79(11): 1477-83.

³⁵ Mc Gavin 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.

³⁶ Crumpacker CS. Ganciclovir. *N Engl J Med* 1996; 335: 721-9

³⁷ Brown F, Banken L, Saywell K, Arum I. Pharmacokinetics of valganciclovir and ganciclovir following multiple oral dosages of valganciclovir in HIV- and CMV-seropositive volunteers. *Clin Pharmacokinet.* 1999; 37(2):167-76.

³⁸ Tornatore KM, Garey KW, Saigal N, et al. Ganciclovir pharmacokinetics and cytokine dynamics in renal transplant recipients with cytomegalovirus infection. *Clin Transplant* 2001; 15: 297-308.

³⁹ Winston DJ, Baden LR, Gabriel DA, Emmanouilides C, Shaw LM, Lange WR, Ratanatharathorn V. 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.* 2006; 12(6):635-40.

⁴⁰ Cheng Y, Vapurcuyan A, Shahidullah M, Aleksunes LM, Pelis RM. Expression of organic anion transporter 2 in the human kidney and its potential role in the tubular secretion of guanine-containing antiviral drugs. *Drug Metab Dispos.* 2012; 40:617-24.

⁴¹ Perrottet N, Robatel C, Meylan P, Pascual M, Venetz JP, Aubert JD, Berger MM, Decosterd LA, Buclin T. Disposition of valganciclovir during continuous renal replacement therapy in two lung transplant recipients. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61(6):1332-5.

⁴² Pescovitz MD, Rabkin J, Merino R, Paya C, Pirsch et al. Valganciclovir results in improved oral absorption of ganciclovir in liver transplant recipients. *Antimicrob agents chemother.* 2000; 44(10): 2811-2815.

⁴³ Pescovitz MD, Pruett TL, Gonwa T, Brook B, McGory R, Wicker K, Griffy K, Robinson CA, Jung D. Oral ganciclovir dosing in transplant recipients and dialysis patients based on renal function. *Transplantation.* 1998; 66(8): 1104-7

-
- ⁴⁴ Insook K, Xian-Yan C, Seonyoung K, et al. Identification of a human valacyclovirase. *J Biochem* 2003; 278: 25348-56.
- ⁴⁵ Lai L, Xu Z, Zhou J, et al. Molecular basis of prodrug activation by human valacyclovirase, an α-amino acid ester hydrolase. *J Biol Chem* 2008; 283: 9318-27
- ⁴⁶ Cvetkovic RS, Wellington K. Valganciclovir. A Review of its use in the management of CMV infection and disease in immunocompromised patients. *Drugs* 2006; 65(6): 859-878.
- ⁴⁷ Curran M and Noble S. Valganciclovir. *Drugs* 2001; 61: 1145-1150.
- ⁴⁸ Perrottet N, Csajka C, Pascual M, Lamota F, Meylan P et al. Population pharmacokinetics of ganciclovir in solid-organ transplant recipients receiving oral valganciclovir. *Antimicrob Agents Therapy* 2009; 53: 3017-3023.
- ⁴⁹ Brown F, Banken L, Saywell K, Arum I. Pharmacokinetics of valganciclovir and ganciclovir following multiple oral dosages of valganciclovir in HIV- and CMV-seropositive volunteers. *Clin Pharmacokinet*. 1999; 37: 167-76.
- ⁵⁰ Paya C, Humar A, Dominguez E, Washburn K, Blumberg E, Alexander B, Freeman R, Heaton N, Pescovitz MD; Valganciclovir Solid Organ Transplant Study Group. Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2004; 4:611-20.
- ⁵¹ Bedino G, Esposito P, Bosio F, Corradetti V, Valsania T, Rocca C, Pattonieri EF, Gregorini M, Rampino T, Dal Canton A. The role of therapeutic drug monitoring in the treatment of cytomegalovirus disease in kidney transplantation. *Int Urol Nephrol*. 2013; 45: 1809-13.
- ⁵² Caldés A, Colom H, Armendariz Y, Garrido MJ, Troconiz IF 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: 4816-24.
- ⁵³ Asberg A, Bjerre A, Neely M. New algorithm for valganciclovir dosing in pediatric solid organ transplant recipients. *Pediatr Transplant*. 2014; 18: 103-11.
- ⁵⁴ Lorean A, Gatti R, Palù G, De Palo E. Separation method for acyclovir and related antiviral compounds, *Journal of Chromatography B* 2001; 764: 289-311.
- ⁵⁵ Campanero MA, Sabada B, García-Quetglas G, Azanza JR. Developement and validation of sensitive method for the determination of ganciclovir in human plasma samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr B* 1998; 706: 311-317.
- ⁵⁶ Cociglio M, Peyriere H, Hillaire-Buys D, Alric R. Application of a standardized coextractive clean up procedure to routine high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 1998; 705: 79-85.

-
- ⁵⁷ Kishino S, Takekuma Y, Sugawara M, Furukawa H, Todo S, Miyazaki K. Liquid Chromatographic method for the determination of acyclovir and/or acyclovir in human plasma using amperometric detection. *J. Chromatogr B* 2002; 780: 289-294.
- ⁵⁸ Chu F, Kiang CH, Sung ML, Huang B, Reeve RL, Tarnowski TL. A rapid, sensitive HPLC method for the determination of ganciclovir in human plasma and serum. *J Pharm Biomed Anal* 1999; 21: 657-667.
- ⁵⁹ Teshima D, Otsubo K, Yoshida T, Itoh Y, Oishi R. A simple and simultaneous determination of acyclovir and ganciclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 2003; 17: 500-503.
- ⁶⁰ Dao Y, Jiao Z, Zhong M. Simultaneous determination of aciclovir, ganciclovir, and penciclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B* 2008; 867: 270-276.
- ⁶¹ Asberg A, Nupen Hansen C, Reubaet L. Determination of ganciclovir in different matrices from solid organ transplanted patients treated with a wide range of concomitant drugs, *J Pharm Biom Anal* 2007; 43: 1039-1044.
- ⁶² Fadiran EO, Jones CD, Ette EI. Designing population pharmacokinetic studies: performance of mixed designs. *Eur J Drug Metab & Pharmacokinet* 2000; 25: 231-239.
- ⁶³ Green B, Duffull B. Prospective evaluation of a D-optimal designed population pharmacokinetic study. *J Pharmacokin Pharmacodyn* 2003; 30: 145-161.
- ⁶⁴ Pawinski T, Luszczynska P, Durlik M, Majchrzak J, Baczkowska T, Chrzanowska M, Sobiak J, Glyda M, Kuriata-Kordek M, Kamińska D, Krajewska M, Klinger M. Development and validation of limited sampling strategies for the estimation of mycophenolic acid area under the curve in adult kidney and liver transplant recipients receiving concomitant enteric-coated mycophenolate sodium and tacrolimus. *Ther Drug Monit.* 2013; 35: 760-9.
- ⁶⁵ van Kesteren C, Mathôt RA, Raymond E, Armand JP, Fumoleau P, Punt C, Ravic M, Wanders J, Beijnen JH, Schellens JH; Early Clinical Studies Group of the EORTC and NDDO Oncology. Development and validation of limited sampling strategies for prediction of the systemic exposure to the novel anticancer agent E7070 (N-(3-chloro-7-indolyl)-1,4- benzenedisulphonamide). *Br J Clin Pharmacol.* 2002; 54: 463-71.
- ⁶⁶ Bazzoli C, Retout S, Mentré F. Design evaluation and optimisation in multiple response nonlinear mixed effect models: PFIM 3.0. *Comput Methods Programs Biomed.* 2010;98:55-65.

-
- ⁶⁷ Wang J et Endrenyi L. A computationally efficient approach for the design of population pharmacokinetic studies. *J Pharmacokinet Biopharm*, 1992; 20: 279-294.
- ⁶⁸ Mentré F, Mallet M, and Baccar D. Optimal design in random-effects regression models. *Biometrika* 1997; 84: 429.
- ⁶⁹ Retout S, Duffull S and Mentré F. Development and implementation of the population Fisher information matrix for the evaluation of population pharmacokinetic designs. *Comput. Methods Programs Biomed* 2001; 65: 141-151.
- ⁷⁰ Manuel O, Perrottet N et al. Ganciclovir exposure under a 450 mg daily dosage of valganciclovir for cytomegalovirus prevention in kidney transplantation: a prospective study. *Clin Transplant*. 2010; 24: 794-800.
- ⁷¹ Perrottet N, Manuel O et al. Variable clearance despite adequate ganciclovir plasma levels during valganciclovir treatment for cytomegalovirus disease in D+/R- transplant recipients. *BMC Infectious Disease* 2010; 10: 2.
- ⁷² Williams PJ. *Pharmacometrics: The science of quantitative pharmacology*. 1^º Edició. Wiley-Interscience, 2007. ISBN 0-471-67783-3.
- ⁷³ FDA (Food and Drug Administration) Guideline for population PK: guidance for Industry. Population Pharmacokinetics.
- ⁷⁴ EMA (European Medicines Agency): Guideline on reporting the results of population pharmacokinetic analysis. June 2007.
- ⁷⁵ Csajka C, Verotta D. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling: history and perspectives. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2006; 33: 227-79.
- ⁷⁶ Beal SL, Boeckman AJ, Sheiner LB. NONMEM: user's guides. San Francisco (CA): University of California at San Francisco. 1988-1992.
- ⁷⁷ Mould DR and Upton RN. Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development-Part 2: Introduction to Pharmacokinetic Modeling Methods. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology* 2013; 2: e38.
- ⁷⁸ Thomson AH, Whiting B. Bayesian parameter estimation and population pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*. 1992; 22: 447-67.
- ⁷⁹ Yuen GJ, Drusano GL, Fletcher C, Capparelli E, Connor JD, Lalezari JP, Drew L, Follansbee S, Busch D, Jacobson M, et al. Population differences in ganciclovir clearance as determined by nonlinear mixed-effects modelling. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39: 2350-2.

-
- ⁸⁰ Welker H, Farhan M, Humar A, Washington C. Ganciclovir pharmacokinetic parameters do not change when extending valganciclovir cytomegalovirus prophylaxis from 100 to 200 days. *Transplantation*. 2010; 90: 1414-9.
- ⁸¹ Paya C, Humar A, Dominguez E, Washburn K, Blumberg E, Alexander B, Freeman R, Heaton N, Pescovitz MD; Valganciclovir Solid Organ Transplant Study Group. Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2004; 4: 611-20.
- ⁸² Perrottet N, Beguin A, Meylan P, Pascual M, Manuel O, Buclin T, Biollaz J, Decosterd LA. Determination of aciclovir and ganciclovir in human plasma by liquid chromatography-spectrofluorimetric detection and stability studies in blood samples *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007; 852: 420-9.
- ⁸³ Yoshida T, Takahashi R, Imai K, Uchida H, Arai Y, Ohishi T. A simple, sensitive determination of ganciclovir in infant plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr Sci*. 2010; 48: 208-11.
- ⁸⁴ Weller DR, Balfour HH Jr, Vezina HE. Simultaneous determination of acyclovir, ganciclovir, and (R)-9-[4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)butyl]guanine in human plasma using high-performance liquid chromatography. *Weller DR1, Balfour HH Jr, Vezina HE. Biomed Chromatogr*. 2009; 23: 822-7.
- ⁸⁵ Dao YJ, Jiao Z, and Zhong M.K. Simultaneous determination of acyclovir, ganciclovir, and penciclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* 2008; 867: 270–216.
- ⁸⁶ Singh O, Saxena S, Mishra S, Khuroo A, Monif T. Determination of valganciclovir and ganciclovir in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometric detection. *Clin Biochem*. 2011; 44: 907-15.
- ⁸⁷ Heinig K, Wirz T, Gajate-Perez A, Belli S. Determination of Ganciclovir and its prodrug Valganciclovir by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011; 879: 436-42.
- ⁸⁸ Xu HR, Li XN, Chen WL, Liu GY, Chu NN, Yu C. A sensitive assay for simultaneous determination of plasma concentrations of valganciclovir and its active metabolite ganciclovir by LC/MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007; 848: 329-34.
- ⁸⁹ Chenel M, Ogungbenro K, Duval V, Laveille C, Jochemsen R, Aarons L. Optimal blood sampling time windows for parameter estimation using a population

-
- approach: design of a phase II clinical trial. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2005; 32: 737-56.
- ⁹⁰ Graham G, Aarons L. Optimum blood sampling time windows for parameter estimation in population pharmacokinetic experiments. *Stat Med.* 2006 15; 25: 4004-19.
- ⁹¹ Hashimoto Y, Sheiner LB. Designs for population pharmacodynamics: value of pharmacokinetic data and population analysis. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1991; 19(3): 333-53.
- ⁹² Jonsson EN, Wade JR, Karlsson MO. Comparison of some practical sampling strategies for population pharmacokinetic studies. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1996; 24: 245-263.
- ⁹³ Sheiner LB and Beal SL. Some suggestions for measuring predictive performance. *J Pharmacokin and Biopharm* 1981; 9: 503-512.
- ⁹⁴ Zhao W, Fakhoury M, Fila M Baudouin V, Deschênes G, Jacqz-Aigrain E.. Individualization of valganciclovir prophylaxis for cytomegalovirus infection in pediatric kidney transplant patients. *Valganciclovir pediatria. Ther Drug Monit.* 2012; 34: 326-330.
- ⁹⁵ Vaudry W, Ettenger R, Jara P, Varela-Fascinetto G, Bouw MR, Ives J, Walker R; Valcyte WV16726 Study Group. Valganciclovir dosing according to body surface area and renal function in pediatric solid organ transplant recipients. *Am J Transplant.* 2009; 9: 636-43.
- ⁹⁶ Perrottet N, Manuel O Lamoth F, Venetz JP, Sahli R, Decosterd LA, Buclin T, Pascual M, Meylan P. Variable clearance despite adequate ganciclovir plasma levels during valganciclovir treatment for cytomegalovirus disease in D+/R- transplant recipients. *BMC Infectious Disease* 2010; 10: 2.
- ⁹⁷ Zhao W, Baudouin V, Zhang D, Deschênes G, Le Guellec C, Jacqz-Aigrain E. Population pharmacokinetics of ganciclovir following administration of valganciclovir in paediatric renal transplant patients. *Clin Pharmacokinet.* 2009; 48: 321-8.
- ⁹⁸ Duffull S, Waterhouse T, Eccleston J. Some considerations on the design of population pharmacokinetic studies. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2005; 32: 441-57.
- ⁹⁹ Manuel O, Pascual M, Perrottet N, Lamoth F, Venetz JP, Decosterd LA, Buclin T, Meylan PR. Ganciclovir exposure under a 450 mg daily dosage of valganciclovir for cytomegalovirus prevention in kidney transplantation: a prospective study. *Clin Transplant.* 2010; 24: 794-800.
- ¹⁰⁰ Levey AS, Coresh J, Greene T, Marsh J, Stevens LA, Kusek JW, Van Lente F; Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration. Expressing the Modification

of Diet in Renal Disease Study equation for estimating glomerular filtration rate with standardized serum creatinine values. *Clin Chem.* 2007; 53: 766-72.

¹⁰¹ Alcázar R, Albalate M. New methods for estimating glomerular filtration rate. Achieving more precision in diagnosing chronic kidney disease. *Nefrologia.* 2010; 30: 143-6.

¹⁰² Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Greene T, Coresh J; CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009; 150: 604-12.

¹⁰³ Perrottet N, Manuel O, Lamoth F, Venetz JP, Sahli R, Decosterd LA, Buclin T, Pascual M, Meylan P. Variable viral clearance despite adequate ganciclovir plasma levels during valganciclovir treatment for cytomegalovirus disease in D+/R- transplant recipients. *BMC Infect Dis.* 2010; 10: 2.

¹⁰⁴ Falagas ME, Snydman DR, Griffith J, Werner BG, Freeman R, Rohrer R. Clinical and epidemiological predictors of recurrent cytomegalovirus disease in orthotopic liver transplant recipients. Boston Center for Liver Transplantation CMVIG Study Group. *Clin Infect Dis.* 1997; 25: 314-7.

¹⁰⁵ Humar A, Kumar D, Raboud J, Caliendo AM, Moussa G, Levy G, Mazzulli T. Interactions between cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and the recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Am J Transplant.* 2002; 2: 461-6