

Farmacokinetiek van lopinavir + ritonavir, intracellulair en in plasma van hiv-geïnficeerde patiënten

K.M.L. Crommentuyn, A.D.R. Huitema, E.C.M. van Gorp en J.H. Beijnen

Kernpunten

- Hiv-remmers moeten penetreren in virale reservoirs om de replicatie van het hiv effectief te remmen.
- Kennis over geneesmiddelconcentraties in deze virale reservoirs kan in combinatie met plasmagegevens inzicht geven in het mechanisme van therapiefalen en de ontwikkeling van resistentie.
- Ritonavir accumuleert in leukocyten tot hoge concentraties, wat suggereert dat ritonavir zou kunnen bijdragen aan de antiretrovirale effectiviteit van lopinavir + ritonavir.
- Geneesmiddelconcentraties van proteaseremmers in plasma kunnen niet zonder meer geëxtrapoleerd worden naar andere lichaamscomponenten.

Therapeutic drug monitoring (TDM) van antiretrovirale middelen wordt veelvuldig gebruikt om de behandeling van hiv-geïnficeerde patiënten te ondersteunen. De geëigende matrices voor TDM zijn bloed of plasma. Deze matrices zijn relatief eenvoudig te verkrijgen. Bovendien zijn relaties aangetoond tussen concentraties van verschillende antiretrovirale middelen in plasma en hun antivirale effectiviteit en/of bijwerkingen [1-3].

Hiv is echter niet alleen aanwezig in bloed en plasma, maar ook op plekken in het menselijk lichaam die lastig toegankelijk zijn voor virusremmers, de zogenaamde virale reservoirs. Een van de belangrijkste reservoirs is de poel van latent geïnficeerde, rustende CD4-positieve lymfocyten. Omdat hiv zich vermenigvuldigt in deze cellen, moeten de remmers van het virus hierin doordringen in concentraties die hoog genoeg zijn om de virusreplicatie te remmen [4]. De intracellulaire accumulatie van proteaseremmers is afhankelijk van onder andere passieve diffusie en actief transport [5]. De hoeveelheid geneesmiddel die beschikbaar is voor intracellulaire penetratie, wordt mede bepaald door de mate van eiwitbinding. De meeste proteaseremmers zijn lipofiele verbindingen met een hoge plasma-eiwitbinding [6]. Bovendien is bekend dat ze substraat zijn voor het membraaneiwit P-glycoproteïne dat in de celmembraan aanwezig is als effluxpomp [7]. Affiniteit voor dit transporteiwit vermindert de penetratie van proteaseremmers in de virale reservoirs.

Lopinavir is een proteaseremmer die slecht in het lichaam wordt opgenomen na orale inname, als gevolg van een lage biologische beschikbaarheid mede als gevolg van een uitgebreid en snel first-pass-metabolisme door CYP3A4-enzymen in de lever. Wanneer lopinavir wordt gecombineerd met een lage dosis ritonavir – ook een proteaseremmer en bovendien een sterke remmer van CYP3A4 – worden hoge, constante lopinavirplasmaconcentraties bereikt.

Abstract

Intracellular and plasma pharmacokinetics of lopinavir + ritonavir in HIV-infected patients

Background and objective

To examine the steady-state pharmacokinetics of orally administered lopinavir + ritonavir in plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in HIV-1-infected patients. Therapeutic drug monitoring of protease inhibitors is usually performed on plasma samples although their antiretroviral action is effected inside cells. Little is known about the intracellular accumulation and related plasma pharmacokinetics of protease inhibitors such as lopinavir + ritonavir.

Methods

11 ambulatory patients were recruited. Plasma (0-12 h) and PBMC (0-8 h) samples were drawn during a 12-hour dosing interval.

Results

The plasma concentration–time curves of lopinavir and ritonavir were characterized by an irregular absorption phase showing double peaks (C_{max}) in most subjects and single peaks in the remaining patients between 1 and 3 hours after drug intake. Pre-dose concentrations of both agents in plasma were significantly higher than the concentrations at the end of the dosing interval, indicating the presence of a circadian rhythm in their pharmacokinetics. The course of the intracellular concentration–time curves appeared to be similar to the plasma concentration curves, with the highest intracellular concentration measured 3 hours after drug intake. The median intracellular to plasma concentration ratios (interquartile range) were 1.18 (0.74-2.06) and 4.59 (3.20-7.70) for lopinavir and ritonavir, respectively.

Conclusion

Both lopinavir and ritonavir accumulate to potentially therapeutic concentrations in PBMCs. The intracellular ritonavir concentrations were higher than reported in vitro EC₅₀ values and might therefore contribute to the antiretroviral efficacy of lopinavir + ritonavir. Irregular absorption and circadian plasma clearance patterns were observed for the protease inhibitor combination lopinavir + ritonavir.

PW Wetenschappelijk Platform. 2007;1(3):56-59

Derhalve is een combinatiepreparaat (Kaletra) ontwikkeld voor klinische toepassing [8]. De antiretrovirale werking van het preparaat lijkt volledig te berusten op de component lopinavir, gezien de lage ritonavirdosis en hierdoor lage concentraties in plasma.

Er is weinig bekend over de intracellulaire farmacokinetiek van de combinatie lopinavir + ritonavir in vivo. Informatie over geneesmiddelconcentraties in een compartiment waarin hiv zich vermenig-

vuldigt, kan in combinatie met plasmagegevens inzicht geven in het mechanisme van therapiefalen en de ontwikkeling van resistentie. Het doel van deze studie was de farmacokinetiek van lopinavir + ritonavir te bestuderen in plasma en in leukocyten.

Methoden

Patiënten

De patiënten werden gerekruteerd in het Slotervaartziekenhuis in Amsterdam. Ze kwamen in aanmerking voor deelname aan de studie wanneer ze tweemaal daags lopinavir 400 mg + ritonavir 100 mg gebruikten als onderdeel van hun combinatietherapie. Gelijktijdig gebruik van de niet-nucleoside reversetranscriptaseremmers nevirapine en efavirenz of van andere proteaseremmers was niet toegestaan, evenmin gelijktijdig gebruik van geneesmiddelen die interfereren met het metabolisme van lopinavir en/of ritonavir. Het onderzoek werd goedgekeurd door de Medisch Ethische Toetsingscommissie van het Slotervaartziekenhuis en alle patiënten gaven schriftelijk toestemming voor deelname.

Studieopzet

De patiënten werden gedurende één doseringsinterval (12 uur) in het ziekenhuis opgenomen voor de verzameling van bloedmonsters. Om de concentraties van lopinavir en ritonavir in plasma te bepalen, werd op veertien tijdstippen bloed afgenomen. Voor de bepaling van de intracellulaire accumulatie werd op vier tijdstippen bloed afgenomen in speciale Vacutainer Cell Preparation Tubes. Het aantal perifere mononucleaire bloedcellen (PBMC's) die aanwezig waren in de monsters, werd geteld voor analyse.

Bioanalyse

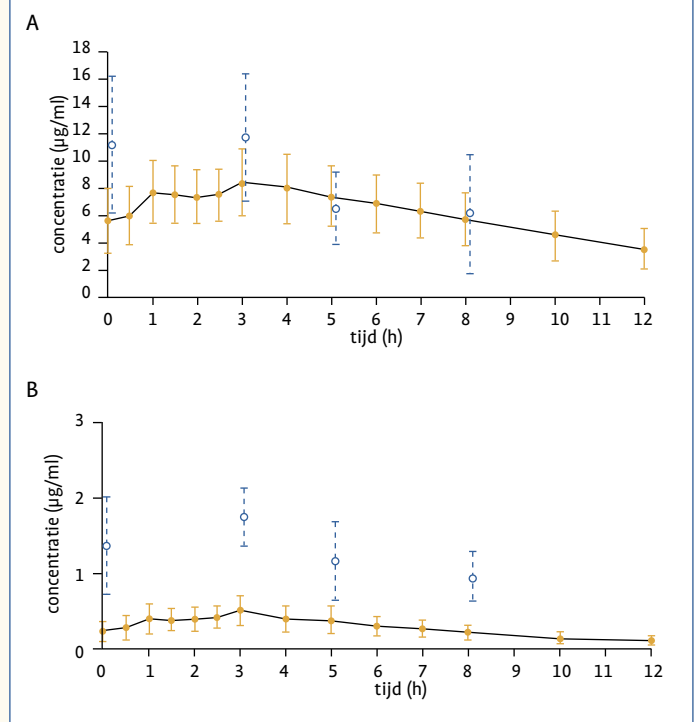
De concentraties van lopinavir en ritonavir in plasma en in PBMC's werden simultaan geanalyseerd met behulp van een gevoelige en gevalideerde methode die gebruikmaakt van HPLC met tandem-massaspectrometrische detectie [9]. De monstervoorbewerking bestond uit eiwitprecipitatie met een mengsel van methanol en acetonitril. Chromatografische scheiding werd verkregen met behulp van een *reversed phase*-systeem met een runtijd van 5,5 minuten. Concentraties werden gekwantificeerd van 0,1 tot 20 µg/ml voor lopinavir en 0,01 tot 10 µg/ml voor ritonavir. De plasmamonsters hadden een volume van 100 µl, dat werd verkregen na centrifugeren van volbloed. De celpellets werden gelyseerd door toevoeging van chloroform (1 ml) in combinatie met een 15 minuten durend verblijf in het ultrasoonbad. Na droogdampen van de chloroformlaag werd 100 µl blanco plasma toegevoegd, waarna de monsters verder werden bewerkt zoals de plasmamonsters. De intracellulaire concentraties werden bepaald ten opzichte van een ijklijn in plasma.

Farmacokinetische analyse

De plasma- en intracellulaire concentraties werden geanalyseerd

Figuur 1

Gemiddelde (± standaarddeviatie) concentratie-tijdcurven van lopinavir (A) en ritonavir (B) in plasma (n = 11) (●) en in perifere mononucleaire bloedcellen (PBMC's; ○) (n = 10, 9, 8, 7 op 0, 3, 5, 8 uur na inname) gedurende een 12-uurs doseringsinterval na inname van lopinavir 400 mg + ritonavir 100 mg tweemaal daags



met behulp van niet-compartimentele analyse. De intracellulaire geneesmiddelconcentratie werd berekend op basis van een verondersteld celvolume van 0,4 pl en de celtelling [4]. Voor de statistische berekeningen werd gebruikgemaakt van SPSS, versie 11.0.1.

Resultaten

Aan deze farmacokinetische studie namen 11 hiv-1-geïnfecteerde patiënten deel (9 mannen, 2 vrouwen). De mediane leeftijd was 45 jaar. Allen hadden een ondetecteerbaar aantal virusdeeltjes in bloed (< 50 kopieën/ml) op de studiedag en het mediane aantal CD4-positieve lymfocyten was 350.

De maximale concentratie in plasma trad op na ongeveer 1 tot 3 uur en was 8,4 µg/ml voor lopinavir en 0,62 µg/ml voor ritonavir. Opvallend in de plasmaconcentratie-tijdcurven van enkele patiënten waren de secundaire pieken in de absorptiefase, met de eerste piek na circa 1 uur en de tweede na circa 3 uur (figuur 1A). De concentratie van zowel lopinavir als ritonavir was hoger net voor inname van de middelen dan aan het eind van het doseringsinterval. De mediane

Tabel 1

Mediane (interkwartiele spreiding) farmacokinetische parameters in plasma en perifere mononucleaire bloedcellen van lopinavir en ritonavir in een dosering van 400 mg respectievelijk 100 mg tweemaal daags (n = 11)

Parameter	Lopinavir		Ritonavir	
	plasma	intracellulair	plasma	intracellulair
C _{max} (µg/ml)	8,44 (7,45-10,01)	13,40 (9,81-16,91)	0,62 (0,44-0,73)	1,80 (1,50-1,99)
t _{max} (h) □	1,0-2,8	3,0 (0-5,0)	1,0-3,0	2,9 (2,8-3,1)
AUC ₁₂ (µg·ml ⁻¹ ·h)	75,4 (61,8-82,8)	89,2 (63,1-113,7)	3,5 (2,7-4,1)	10,6 (9,1-14,2)
CL/F (l/h)	5,3 (4,8-6,4)		28,3 (24,5-36,3)	
t _{1/2} (h)	6,4 (5,7-8,6)		3,7 (3,0-4,7)	
V/F (l)	55,7 (40,2-61,5)		168,7 (112,9-239,8)	
C _{pre-dosis} (µg/ml)	5,16 (4,25-6,67)	10,00 (8,26-13,90)	0,18 (0,13-0,29)	1,53 (1,09-1,95)
C ₁₂ (µg/ml)	3,56 (3,09-4,84)		0,10 (0,06-0,15)	
Concentratieratio intracellulair/plasma		1,18 (0,74-2,06)		4,59 (3,20-7,70)

C_{max}: maximale concentratie; t_{max}: tijdstip waarop de maximale concentratie gemeten wordt; AUC₁₂: oppervlakte onder de curve van het 12-uur doseringsinterval; CL/F: schijnbare totale lichaamsklaring; t_{1/2}: halfwaardetijd; V/F: schijnbaar verdelingsvolume; C_{pre-dosis}: concentratie net voor inname van het geneesmiddel; C₁₂: concentratie aan het eind van het doseringsinterval; concentratieratio intracellulair/plasma: AUC₁₂ intracellulair/AUC₁₂ plasma.

□ Voor de t_{max} in plasma is slechts de interkwartielafstand weergegeven.

tijd tussen inname van avond- en ochtenddosering was 12,25 uur (10,75-14,5 uur). Het verloop van de concentratie-tijdcurve in cellen was vergelijkbaar met de plasmacurven met een maximale concentratie op 3 uur na inname (figuur 1B). Enkele intracellulaire concentraties konden niet berekend worden omdat de celtelling of de afname van het bloedmonster was mislukt. De mediane intracellulaire blootstelling (AUC₁₂) was 89,6 µg·ml⁻¹·h voor lopinavir en 10,6 µg·ml⁻¹·h voor ritonavir. In plasma waren deze waarden lager, wat resulteerde in intracellulair/plasmaconcentratieratio's van 1,18 en 4,59 voor respectievelijk lopinavir en ritonavir. De berekende farmacokinetische parameters van lopinavir en ritonavir in plasma en cellen zijn weergegeven in tabel 1. Drie patiënten die gelijktijdig tenofovir gebruikten, hadden geen significant afwijkende mediane waarde voor de minimale en maximale plasmaconcentratie of de AUC (p = 0,3; p = 0,8; p = 0,3: Mann-Whitney-test).

Beschouwing

In deze studie is de plasma- en intracellulaire farmacokinetiek van de proteaseremmercombinatie lopinavir + ritonavir onderzocht. De concentratie-tijdcurven in plasma werden gekarakteriseerd door een onregelmatig patroon in de absorptiefase dat nog niet eerder beschreven is. Dit patroon wordt mogelijk veroorzaakt door onvolledige en vertraagde maaglediging, zoals eerder is aangetoond voor

ranitidine [10]. In preklinisch onderzoek met muizen is aangetoond dat ritonavir de maaglediging sterk vertraagt [11].

De berekende farmacokinetische parameters voor lopinavir in plasma komen overeen met gegevens uit de literatuur [8]. Hoewel gelijktijdig gebruik van tenofovir de blootstelling aan lopinavir + ritonavir enigszins zou kunnen verlagen [12], hebben we dat in deze kleine studie niet kunnen bevestigen. Ook voor ritonavir zijn farmacokinetische parameters berekend die overeenkomen met eerder gepubliceerde waarden voor ritonavir in combinatie met lopinavir [8]. De plasmafarmacokinetiek van ritonavir lijkt echter dosisafhankelijk te zijn en beïnvloed te worden door de gecombineerde proteaseremmer [13, 14]. Deze dosisafhankelijke kinetiek zou het gevolg kunnen zijn van verzadigbaar levermetabolisme of van dosisafhankelijk first-pass-verlies door intestinaal CYP3A4 [15].

De dalconcentraties van beide proteaseremmers waren significant hoger voor inname van de ochtenddosering dan aan het eind van het doseringsinterval. Dit verschil in dalconcentraties kon niet verklaard worden door een verschil in doseringsinterval en berust waarschijnlijk op de aanwezigheid van een circadiaan ritme. Dit fenomeen is eerder beschreven voor andere proteaseremmers [15, 16].

Beide middelen vertoonden intracellulaire accumulatie met een intracellulair concentratie-tijdverloop vergelijkbaar met de curven in plasma. De gevonden intracellulaire/plasmaconcentratieratio van

1,18 voor lopinavir maakt dat lopinavir minder in cellen accumuleert dan nelfinavir en saquinavir, maar meer dan indinavir [4]. De intracellulaire accumulatie van ritonavir lijkt, net als de plasmafarmacokinetiek, af te hangen van de dosis en van de gecombineerde proteaseremmer [4]. Toediening in een lage dosering in combinatie met lopinavir resulteert in een hoge intracellulaire concentratie die boven gerapporteerde waarden ligt voor de EC₅₀ (50 % effectieve concentratie in vitro) [17]. Dit suggereert dat ritonavir, ondanks de lage concentraties in plasma, toch zou kunnen bijdragen aan het antiretrovirale effect van lopinavir + ritonavir.

Conclusie

De opvallendste bevinding uit deze studie is de hoge intracellulaire ritonavirconcentratie die bereikt wordt door een lage dosis ritonavir te combineren met lopinavir. Hieruit blijkt dat het niet correct is plasmaconcentraties zonder meer te extrapoleren naar andere lichaamscompartimenten. Hoewel hiv zich in de leukocyten vermenigvuldigt, is het prematuur plasma te vervangen door PBMC's als matrix voor de routinematige uitvoering van TDM. Het volume bloed dat nodig is voor de bepaling van een intracellulaire concentratie, is vele malen groter dan voor een plasmaconcentratie. Ook is de gehele monstervoorbewerking kritisch en bewerkelijk. Daarnaast stelt het gebruik van alternatieve matrices eisen aan chromatografie en detectie [18]. Goed opgezette en uitgevoerde studies naar de penetratie van antiretrovirale middelen in virale reservoirs blijven echter nodig.

Kristel Crommentuyn: Ziekenhuisapotheek, Slotervaartziekenhuis, Amsterdam; thans in opleiding tot ziekenhuisapotheker in het Albert Schweitzerziekenhuis in Dordrecht. Alwin Huitema en Jos Beijnen: Ziekenhuisapotheek, Slotervaartziekenhuis, Amsterdam. Erik van Gorp: Interne geneeskunde, Slotervaartziekenhuis, Amsterdam.

Correspondentie: dr. K.M.L. Crommentuyn, k.crommentuijn@asz.nl.

Gebaseerd op de registratielezing van K.M.L. Crommentuyn.

De hier gepresenteerde gegevens zijn ook gepubliceerd in: Crommentuyn KML, Mulder JW, Mairuhu ATA, van Gorp ECM, Meenhorst PL, Huitema ADR, Beijnen JH. The plasma and intracellular steady-state pharmacokinetics of lopinavir/ritonavir in HIV-1 infected patients. *Antivir Ther.* 2004;9:779-85.

LITERATUUR

- 1 Burger DM, Hugen P, Reiss P, et al. Therapeutic drug monitoring of nelfinavir and indinavir in treatment-naïve HIV-1-infected individuals. *AIDS.* 2003;17:1157-65.
- 2 Gatti G, Di Biagio A, Casazza R, et al. The relationship between ritonavir plasma levels and side-effects: implications for therapeutic drug monitoring. *AIDS.* 1999;13:2083-9.
- 3 Veldkamp AI, Weverling GJ, Lange JM, et al. High exposure to nevirapine in plasma is associated with an improved virological response in HIV-1-infected individuals. *AIDS.* 2001;15:1089-95.
- 4 Khoo SH, Hoggard PG, Williams I, et al. Intracellular accumulation of human immunodeficiency virus protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:3228-35.

- 5 Ford J, Khoo SH, Back DJ. The intracellular pharmacology of antiretroviral protease inhibitors. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54:982-90.
- 6 Boffito M, Back DJ, Blaschke TF, et al. Protein binding in antiretroviral therapies. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2003;19:825-35.
- 7 Huisman MT, Smit JW, Schinkel AH. Significance of P-glycoprotein for the pharmacology and clinical use of HIV protease inhibitors. *AIDS.* 2000;14:237-42.
- 8 Cvetkovic RS, Goa KL. Lopinavir/ritonavir. A review of its use in the management of HIV infection. *Drugs.* 2003;63(8):769-802.
- 9 Crommentuyn KML, Rosing H, Nan-Oftringa LGAH, et al. Rapid quantification of HIV protease inhibitors in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectr.* 2003;38:157-66.
- 10 Yin OQP, Tomlinson B, Chow AHL, et al. A modified two-portion absorption model to describe double-peak absorption profiles of ranitidine. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42:179-92.
- 11 Huisman MT, Smit JW, Wiltshire HR, et al. Assessing safety and efficacy of directed P-glycoprotein inhibition to improve the pharmacokinetic properties of saquinavir co-administered with ritonavir. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;304:596-602.
- 12 Flaherty JF, Kearney BP, Wolf JJ, et al. A multiple-dose, randomized, crossover drug interaction study between tenofovir DF and efavirenz, indinavir, or lopinavir/ritonavir. In: 1st IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment. Buenos Aires, Argentina, 8-11 Jul 2001 [Abstract 336].
- 13 Guiard-Schmid JB, Poirier JM, Meynard JL, et al. High variability of plasma drug concentrations in dual protease inhibitor regimens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:986-90.
- 14 Kappelhoff BS, Huitema ADR, Crommentuyn KML, et al. Development and validation of a population pharmacokinetic model for ritonavir used as a booster or as an antiviral agent in HIV-1-infected patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2005;59:174-82.
- 15 Hsu A, Granneman GR, Witt G, et al. Multiple-dose pharmacokinetics of ritonavir in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:898-905.
- 16 Justesen US, Pedersen C. Diurnal variation of plasma protease inhibitor concentrations. *AIDS.* 2002;16:2487-9.
- 17 Kempf DJ, Marsh KC, Denissen JF, et al. ABT-538 is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus protease and has high oral bioavailability in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:2484-8.
- 18 Crommentuyn KML, Huitema ADR, Beijnen JH. Bioanalysis of HIV protease inhibitors in samples from sanctuary sites. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;38:139-47.