Université de Paris

École doctorale École doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries (563)

Laboratoire d'Evaluation thérapeutique et pharmacologie périnatale et pédiatrique

Pharmacocinétique du raltégravir pendant la grossesse, par approche de population

Par Yi ZHENG

Thèse de doctorat de Pharmacocinétique

Dirigée par Jean-Marc TRELUYER

Et par Déborah HIRT

Présentée et soutenue publiquement le 06 novembre 2019

Devant un jury composé de :

M. Nicola SIMON, PU-PH, Aix-Marseille Université, Rapporteur
M. Bernard DO, MCU-PH, Université Paris Sud, Rapporteur
Mme. Valériane LEROY, DR, INSERME Université de Toulouse, Examinateur
M. Jean-Marc TRELUYER, PU-PH, Université Paris Descartes, Directeur de thèse
Mme. Déborah HIRT, MCU-PH, Université Paris Descartes, Co-Directrice de thèse

Except where otherwise noted, this work is licensed under
https://creativecommons.org/licenses/by-nd/3.0/fr/

INTRODUCTION 14

1 VIH: état des lieux 15

2 Transmission mère-enfant (TME) 16

3 ARVs et la prévention de la transmissions mère-enfant 18

4 Traitements d'ARVs de la mère pendant la grossesse 20

4.1 Traitements ultracourts 20

4.2 Recommandation de l'OMS 21

4.3 Recommandation en France 21

5 Raltégravir 23

5.1 Utilisation thérapeutique 23

5.2 Chimie 24

5.3 Mécanisme d'action 25

5.4 L'innocuité et l'efficacité du RAL 27

5.5 Utilisation du raltégravir pendant la grossesse 36

5.6 Pharmacodynamique 42

5.7 Pharmacocinétique du RAL 43

5.8 Pharmacocinétique du RAL dans les populations particulières hors grossesse. 52

5.9 Impact physiologique sur la pharmacocinétique du RAL au cours de la grossesse 59

6 Etude ANRS 160 RalFE 60

7 Objectif de la thèse 60

METHODOLOGIE 63

1 L'étude ANRS 160 RalFE 64

1.1 Critères d'inclusion et non inclusion 64

1.2 Collection de sang 65

2 Méthode analytique 66

2.1 Séparation de la forme libre du médicament 66

2.2 La préparation des échantillons 70

2.3 Méthode de dosage 75

2.4 Procédure de validation d'une méthode analytique 76

3 La pharmacocinétique de population 83

3.1 La construction de la base de données 83

3.2 La construction du modèle en pKpop du RAL 84

3.3 L'évaluation des modèles 91

RESULTATS 92

Première étude: Méthode pour quantifier simultanément le dolutégravir, l'elvitégravir, la rilpivirine, le darunavir, le ritonavir, le raltégravir et le raltégravir-β-D-glucuronide dans le plasma humain en HPLC-MS/MS. 93

Revue de la littérature 93

Objectif 97

Méthodes 97

Résultats 98

Discussion 98

Conclusion 101

Article 1 102

Abstract 103

Deuxième étude : Quantification de la forme libre du raltégravir, du dolutégravir et du darunavir par ultrafiltration, associée à une méthode de LC-MS/MS 123

Revue de la littérature 123

Objectif 124

Méthodes 124

Résultats 125

Discussion et conclusion 127

Article 2 128

Troisième étude : Evaluation la pharmacocinétique du RAL libre chez les femmes enceintes par approche de population 149

Revue de la littérature 149

Objectif 153

Méthodes 153

Résultats 154

Discussion et conclusion 156

Article 3 159

CONCLUSION GENERALE 184

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 188

Table des illustrations

Figure 1. Evaluation et répartition du nombre de personnes vivant avec VIH par région en 2017 15

Figure 2. Evaluation du nombre global de personnes infectées par le VIH (A), nouvellement infectées (B), et morts du VIH (C) de 1990 à 2016 16

Figure 3. Proportion relative de la TME du VIH sans traitement selon l'âge gestationnel et le mode d'alimentation du nourrisson 18

Figure 4. TME du VIH-1 selon les types de traitements et la durée du traitement 19

Figure 5. La structure moléculaire du RAL 25

Figure 6. Structure de l'intégrase du VIH (A), procédure d'intégration du vADN dans le génome humain (B) et l'attaque nucléophile de CA- 3'-OH de vADN à l'ADN humain (C) 26

Figure 7. Le site active de dimère intégrase-vADN 27

Figure 8. Schéma des prélèvements sanguin dans l'étude ANRS 160 RalFE 66

Figure 9. Schéma explicatif de la DE 68

Figure 10. Schéma d'un tube d'UF 69

Figure 11. La courbe de pharmacocinétique en population et le courbe individuelle. 85

Figure 12. Le chromatogramme de LLOQ de post-extraction pour chaque molécule 100

Figure 13. Chromatogramme de la LLOQ de post-extraction pour chaque analyte 127

Figure 14. Les concentrations du RAL libre en fonction du temps 156

Liste des tableaux

Tableau 1. Recommandation de l'OMS pour les traitements ARVs pour la femme enceinte. 21

Tableau 2. Les essais cliniques pour l'évaluation de l'innocuité et l'efficacité du RAL. 32

Tableau 3. Les data cliniques d'utilisation du RAL au cours de grossesse..... 40

Tableau 4. L'effet de la nourriture sur la PK du RAL avec différentes formulations. 46

Tableau 5. La pharmacocinétique du RAL chez les patients. 49

Tableau 6. L'interaction médicamenteuse avec le RAL chez adultes. 51

Tableau 7. Pharmacocinétique du RAL chez les patients particuliers avec une pathologie hépatique ou rénale 55

Tableau 8. Pharmacocinétique du RAL chez les patients âgé ou chez les enfants moins de 18 ans 58

Tableau 9. Comparaison de la méthode de dialyse d'équilibre et l'ultrafiltration. 70

Tableau 10. Méthode analytique pour doser le RAL..... 95

Tableau 11. Résultats de validation de la méthode analytique..... 101

Tableau 12. Résultats de validation..... 126

Tableau 13. Comparaison de l'AUC et C_{trough} du RAL avec les résultats dans la littérature. 156

Résumé

La transmission mère-enfant contribue à 9% des nouvelles infections au VIH. La décroissance de la charge virale a été montrée comme le facteur majeur pour la prévention du risque de la transmission mère-enfant. Le raltégravir, a déjà montré son efficacité pour diminuer la CV avec des effets secondaires limités chez les adultes dans plusieurs études cliniques. Ainsi, le raltégravir pourrait être un bon candidat dans le contexte de la grossesse. Cependant, les changements physiologiques pendant la grossesse influent significativement sur la pharmacocinétique du médicament ce qui risque d'entraîner une modification des concentrations et un impact sur l'effet du traitement. Ainsi, des adaptations posologiques peuvent être nécessaires dans le contexte de la grossesse. A ce jour, la pharmacocinétique du raltégravir pendant la grossesse a été étudiée par seulement deux études cliniques qui ont montré une diminution de l'exposition du raltégravir pendant la grossesse sans impact clinique. Néanmoins, aucune donnée n'est disponible sur la pharmacocinétique du raltégravir libre qui est considéré comme la seule forme active du raltégravir.

L'objectif principal de mon travail de thèse est de décrire la pharmacocinétique du raltégravir libre et total chez la femme enceinte infectée par le VIH-1, au troisième trimestre de la grossesse (entre 30 et 37 semaines d'aménorrhée) et un mois après l'accouchement (entre 4 et 6 semaines de post-partum).

Nous avons, premièrement, développé et validé une méthode en LC-MS/MS pour mesurer la concentration totale du raltégravir et du raltégravir-glucuronide. Dans ce travail, nous avons évalué la spécificité et la sélectivité, la justesse et la fidélité, le rendement, l'effet matrice, l'effet mémoire et la stabilité de la méthode. La fiabilité de cette méthode est aussi confirmée par les résultats de contrôle externe d'Asqualab (confirmé par ISO9001). (Zheng et al. soumis dans *Journal of Pharmceutical and Biomedical Analyse*).

Ensuite, nous avons développé et validé une méthode par ultrafiltration pour séparer la fraction libre du raltégravir et la quantifier par une LC-MS/MS méthode. (Zheng et al. soumis dans *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*).

A partir ces concentrations obtenues, nous avons construit un modèle de pharmacocinétique de population au troisième de la grossesse et postpartum pour le raltégravir libre. Par ce modèle, nous avons trouvé une diminution importante de l'absorption du raltégravir et une augmentation de son élimination. L'exposition de la fraction libre du raltégravir est diminuée de 13% pendant la grossesse par rapport au postpartum. Et une diminution de 26% pour l'exposition du raltégravir total est cohérente avec les résultats publiés par d'anciennes études. Au moment de l'accouchement, 93% (n=40) des mères ont une CV inférieure à 40 copies/mL. Aucune transmission mère-enfant n'a été observée. Les effets indésirables n'ont pas été attribués à l'utilisation du raltégravir. Ces résultats cliniques confirment que les traitements basés sur le raltégravir sont efficaces et bien tolérés par les femmes enceintes (Zheng et al. soumis dans *Clinical Infectious Diseases*).

Abstract

Mother-to-child transmission (MTCT) was one of the most severe causes which contributes to 9% of the new HIV infections. The decrease of the viral load was shown to be the major factor in the prevention of mother-to-child transmission. Raltegravir has been proven to effectively decrease plasma viral load with few adverse events for adults in several clinical studies. Therefore, it could be a good choice in the treatment of HIV infected pregnant mothers. However, the physiologic changes during pregnancy could significantly change the pharmacokinetics of the drugs which could result in a modification of concentrations and in the treatment failure. Thus, it is necessary to adjust the doses of antiretrovirals during pregnancy. Up to now, the pharmacokinetic of raltegravir during pregnancy was available only in two clinical studies. The exposure to raltegravir in pregnant women was shown to decrease without clinically meaningful effect.

The principal objective of this clinical trial is to study pharmacokinetic properties of raltegravir in pregnant women infected by HIV-1, during the third trimester of pregnancy (between 30 and 37 weeks of amenorrhea) and 1 month after childbirth (between 4 and 6 weeks postpartum).

Firstly, we have developed and validated a LC-MS/MS method for the quantification of the concentrations of total and glucuronide raltegravir in human plasma. In this work, we have evaluated the specificity and selectivity, the precision and accuracy, the recovery, the matrix effect, the carry-over effect and the stability of the method. This method was also confirmed by external controls from Asqualab (Comfirmed by ISO9001). (Zheng et al. submitted in *Journal of Pharmceutical and Biomedical Analyse*).

Secondly, we have developed and validated an ultrafiltration method to separate the unbound raltegravir and to quantify it with a validated LC-MS/MS method. (Zheng et al. submitted in *Journal of chromatography B*).

From the unbound, total and glucuronide raltegravir concentration obtained, we have developed the first population pharmacokinetic model of raltegravir in pregnant women. In this model, a decrease of raltegravir absorption and an increase of raltegravir excretion were observed. The exposure to unbound raltegravir was found to decrease by 13% during pregnancy compared to postpartum. The total raltegravir was found to decrease by 26% during pregnancy which was consistent with previous studies. Eight adverse events in 7 women and four congenital abnormalities were reported, none was considered to be possibly related the use of raltegravir. 93% (n=40) of pregnant women had a viral load < 40 copies/mL at delivery. No mother to child transmission was found. The adverse effects observed in this study are not considered to have relation with the use of raltegravir. A good efficacy and tolerance of raltegravir during pregnancy was confirmed by these results (Zheng et al. submitted in *Clinical Infectious Diseases*).

Remerciements

J'adresse mes remerciements en premier lieu à Monsieur le Professeur Jean-Marc Tréluyer, mon directeur de thèse, pour son encadrement, son soutien et son esprit de synthèse. Merci de m'avoir fait confiance en me permettant de travailler sur la pharmacocinétique en population du raltégravir chez les femmes enceintes, sujet qui m'intéresse et me passionne depuis 4 ans.

Je tiens également à exprimer ici ma sincère gratitude et ma profonde reconnaissance à Madame le Dr. Déborah Hirt, pour votre patience, votre disponibilité, votre générosité, votre gentillesse, et pour m'avoir enseigné et aidé dans le domaine de la modélisation. Votre encadrement, vos conseils et vos encouragements m'ont permis finir cette thèse avec succès.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux Professeur Nicolas Simon, Docteur Bernard Do et Docteur Valériane Leroy pour avoir accepté d'accorder de votre temps à l'appréciation de notre travail et de prendre part à notre jury de thèse. J'en suis très honoré.

J'exprime toute ma gratitude aux rapporteurs de ce travail, Monsieur le professeur Nicolas Simon et Monsieur le Docteur Bernard Do. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail et l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de le juger.

J'adresse tous mes remerciements au Dr. Gabrielle Lui, Dr. Inès Gana, Dr. Naïm Bouazza et Dr. Frantz Foissac pour votre aide régulière, vos conseils précieux et votre disponibilité tout au long de cette thèse. J'ai été honoré d'apprendre à vos côtés sur l'analytique, la génétique et la modélisation.

Je tiens à remercier les membres de l'équipe de biomédicale pharmacologie à l'hôpital Cochin, en particulier Dr. Sihem BENABOUD, Dr. Radia AOURA, Dr. SANA BOUJAAFAR et également les techniciens, pour avoir m'accompagné et soutenue tout long de cette thèse et votre gentillesse et votre bonne humeur.

J'adresse tous mes sincères remerciements à tous les personnels dans l'équipe d'étude ANRS160RalFE pour votre contribution très précieux ce qui permet d'aboutir ce travail.

Merci à ma famille et mes proches pour votre soutien avec générosité tout long de ces années.

A Nan, mon amour, merci pour tout et ton amour

A Jialiang, mon petit coq, bienvenu parmi nous

A mes parents, merci pour vos soutiens inconditionnels

Liste des abréviations

3TC	Lamivudine
ABC	Abacavir
ACN	Acétonitrile
ARV	Antirétroviral
ATV	Atazanavir
AUC	Aire sous la courbe (Area under the curve)
AZT	Zidovudine
BCRP	protéine de résistance du cancer du sein
BID	2 fois/Jour
CL	Clairance
C_{max}	Concentration plasmatique maximum
C_{trough}	Concentration plasmatique résiduelle
CV%	Coefficient de variation
CV	Charge Virale
DRV	Darunavir
DE	Dialyse à l'équilibre
DTG	Dolutégravir
EFV	Efavirenz
EI	Etalon interne
ELL	Extraction en phase liquide-liquide
EMA	*European Medicines Agency*
EPP	Extraction par précipitation des protéines
ETV	Etravirine
F	Biodisponibilité
FDA	*Food and Drug Administration*
FTC	Emtricitabine
f_u	Fraction libre du médicament

GMR	Ratio des moyennes géométriques (geometric mean ratio)
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
INI	Inhibiteur d'intégrase
INNTI	Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse
INTI	Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse
IP	Inhibiteur de protéase
LLOQ	Limite inférieure de quantification (Lower limit of quantification)
LPV	Lopinavir
MeOH	Méthanol
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
NSB	*Non-specific binding*
NVP	Névirapine
OAD	1 fois/Jour
PBMC	Cellules mononuclées du sang périphérique
P-gp	P-glycoprotéine
PK	Pharmacocinétique
pKpop	Pharmacocinétique de population
PP	Protéines plasmatiques
RAL	Raltégravir
RTV	Ritonavir
SA	Semaines d'aménorrhée
SPE	Extraction en phase solide
TR	Temps de rétention
T_{max}	Temps pour atteindre la concentration plasmatique maximum
TME	Transmission mère enfant
T3	Troisième trimestre
UF	Ultrafiltration

ULOQ	Limite supérieure de quantification (Upper limit of quantification)
UV	Ultraviolet
V_d	Volume de distribution
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VPC	Visual Predictive Check
/r	boosté par ritonavir

Introduction

1 VIH: état des lieux

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) induit une destruction des lymphocytes T CD4+ et se traduit chez le patient par le syndrome d'immunodéficience acquise [1] qui affaiblit le système immunitaire humain et le rend vulnérable à des multiples infections opportunistes. Les particules virales sont retrouvées dans les liquides organiques tels que le sang, les sécrétions vaginales et séminales et aussi dans le lait maternel. La voie principale de transmission du virus est sexuelle mais aussi via le sang, par transfusion sanguine ou lors de l'accouchement. Il représente un problème de santé publique majeur mondiale causant plus de 25 millions de décès depuis 1990.

Selon le sondage de l'UNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS), en 2017, environ 36.9 millions de personnes dans le monde vivent avec le HIV, et environ 50% d'entre elles résident en Afrique subsaharienne[2,3].(Figure 1)

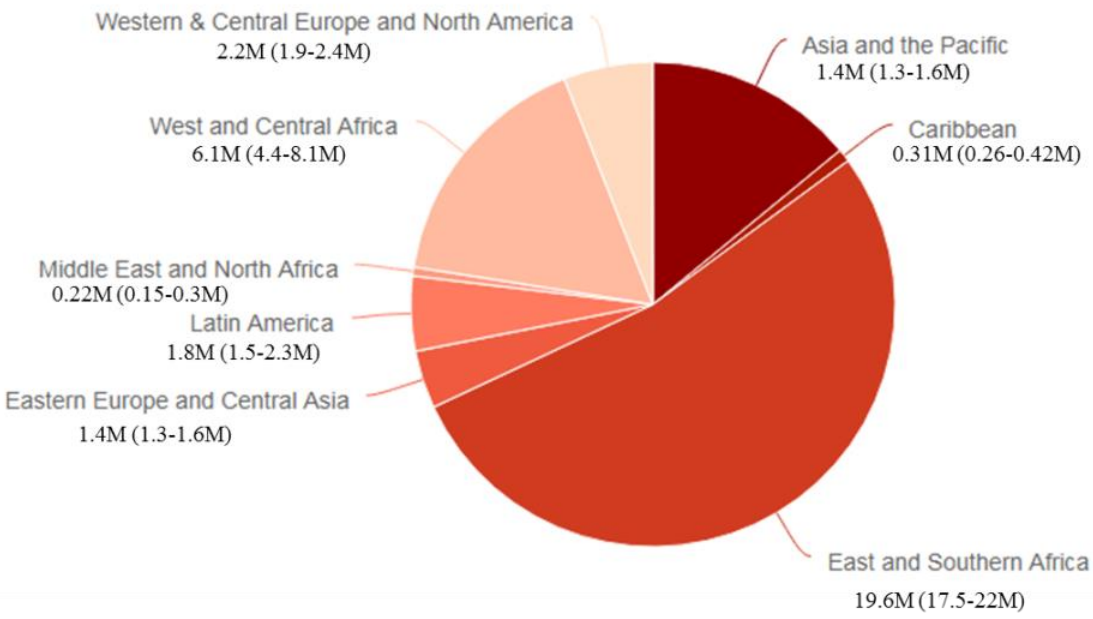


Figure 1. Evaluation et répartition du nombre de personnes vivant avec VIH par région en 2017 [3].

Grâce à un effort mondial significatif de lutte contre le VIH, le nombre de nouvelles

infections par le VIH et le nombre de morts dus au VIH continuent de diminuer, mais il reste un problème de santé publique majeur. En 2016, l'UNAIDS estimait encore à 1 million de patients morts du VIH et environ 5000 nouvelles infections par jour [3,4]. (Figure 2)

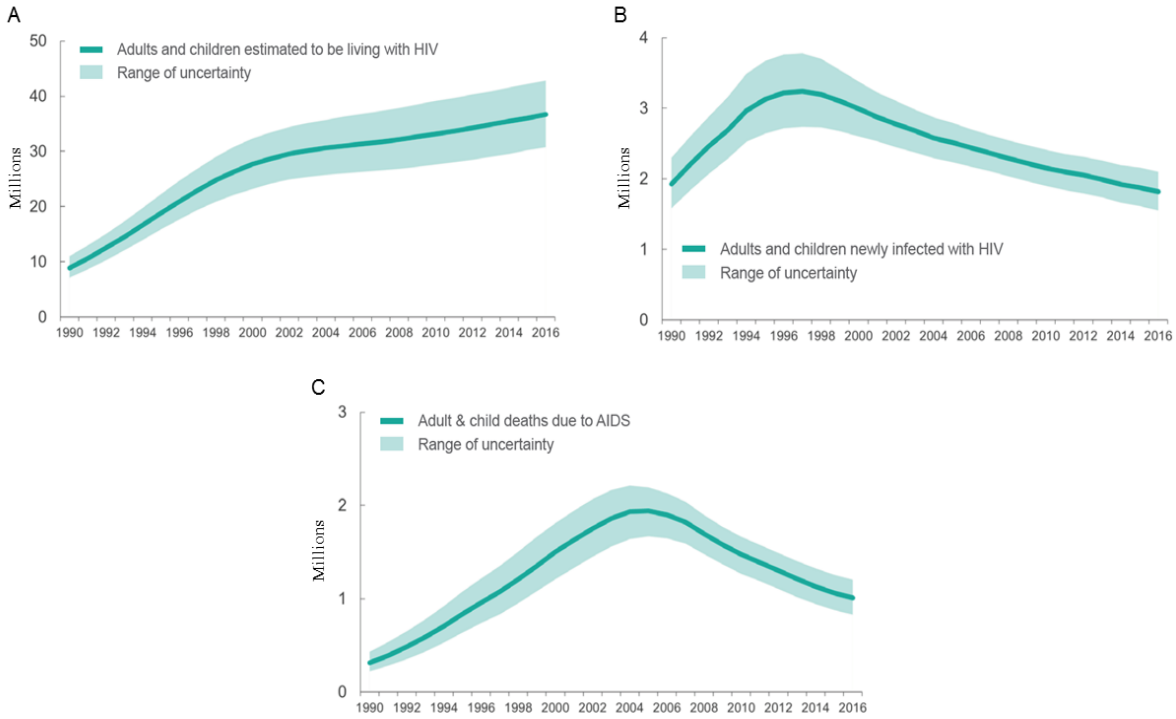


Figure 2. Evaluation du nombre global de personnes infectées par le VIH (A), nouvellement infectées (B), et morts du VIH (C) de 1990 à 2016[3]

2 Transmission mère-enfant (TME)

Selon l'UNAIDS, à partir de 1999, plus de femmes âgées de plus de 15 ans que les hommes étaient infectées par le VIH. Cette différence par sexe s'est amplifiée ; en 2000, il y avait seulement 0.2 million de femmes de plus que les hommes qui étaient infectées par VIH, et ce chiffre a augmenté jusqu'à atteindre 1.4 million en 2014[3]. Par rapport aux jeunes hommes, les jeunes femmes de 15 à 24 ans étaient jusqu'à 8 fois plus susceptibles d'être infectées par le VIH. Le nombre de femmes enceintes infectées par le VIH[5] était estimé à 1.5 million, ce qui augmente le risque de TME et contribue environ à 1/10 des nouvelles infections chaque

année. En 2016, le rapport de l'UNAIDS estimait à 1.8 million les nouvelles infections dont 0.16 million d'enfants de moins de 14 ans. De plus, 0.12 million d'enfants de moins de 14 ans infectés mourraient du syndrome d'immunodéficience acquise la même année[4]. Environ 90% de ces enfants de moins de 14 ans étaient infectés par TME[6].

La TME peut se produire à différents moments : pendant la grossesse, durant l'accouchement et pendant l'allaitement.

(a) Transmission pendant la grossesse : le placenta peut être infecté par le VIH à tous les stades pendant la grossesse. Certaines cellules placentaires (ex : cellules trophoblastiques) expriment le récepteur CD4. Selon certaines études, 5-10% (taux absolu : par rapport à la totalité de nouveau-nés avec la mère infectée) des enfants pourraient être contaminés via le liquide amniotique infecté ou par l'échange sanguin fœtal maternel[7–9].

(b) Transmission pendant l'accouchement : l'accouchement par voie basse pourrait augmenter le risque d'ingestion par le nouveau-né de sang et de sécrétions génitales infectés[10]. De plus, chez la femme enceinte, la production de particules virales dans les sécrétions cervico-vaginales est beaucoup plus élevée que chez la femme non enceinte[11]. Environ 10-20% (taux absolu) des enfants sont infectés pendant l'accouchement[9].

(c) Transmission pendant l'allaitement : Plusieurs études ont déjà montré la présence de VIH-1 sous forme de particules virales libres dans le lait maternel ou dans les cellules du lait maternel chez 39-58% des femmes enceintes infectées[12–15]. Le VIH-1 pourrait s'introduire dans la sous-muqueuse intestinale du nouveau-né [16]. Environ 5-20% (taux absolu) des

enfants sont contaminés pendant l'allaitement[9].

La figure 3. représente les proportions relatives de TME chez les femmes sans traitement antirétroviral (ARV) selon l'âge gestationnel et selon que l'enfant est allaité ou non[17].

Pour diminuer le risque de transmission mère-enfant, trois méthodes peuvent être efficaces : la césarienne programmée, pas allaitement et surtout un traitement ARV efficace. Avec ces moyens de prévention, le risque de TME passe de 25-40% à moins de 2% [17–21].

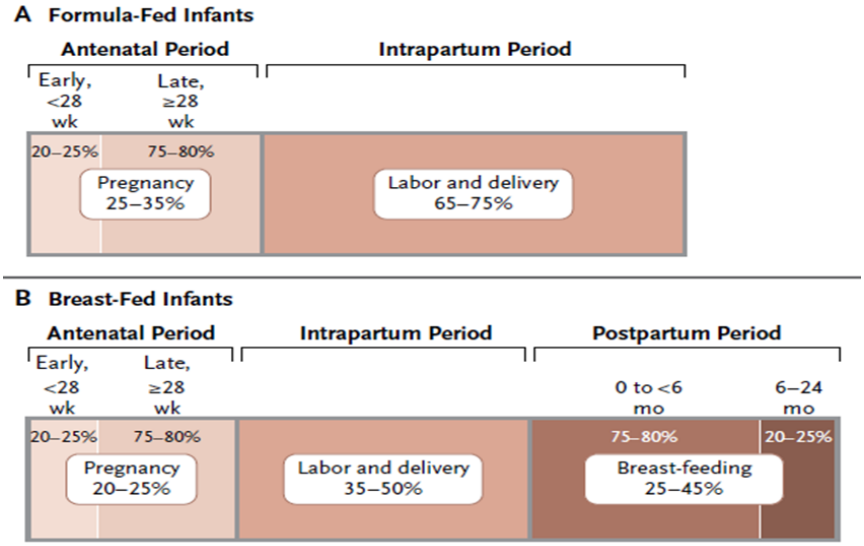


Figure 3. Proportion relative de la TME du VIH sans traitement selon l'âge gestationnel et le mode d'alimentation du nourrisson*: (A) les nouveau-nés sont nourris avec du lait artificiel ou (B) maternel*[17].

3 ARVs et la prévention de la transmissions mère-enfant

En 1994, la première étude (*Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 study)* sur l'utilisation des ARVs pour la prévention de la TME a montré que l'administration de la zidovudine (AZT) aux femmes pendant la grossesse et l'accouchement et aux nouveau-nés pendant les premières 6 semaines a diminué de 63% le taux de TME (de 22.5% à 8.4%)[22]. En 2003, l'étude de HIVNET 102 a été réalisée pour comparer la monothérapie sous névirapine (NVP) (prise unique de 200mg pour les femmes pendant l'accouchement et prise unique de 2

mg/kg pour les nouveau-nés à 72h après la naissance) avec la monothérapie sous AZT (prise unique de 300mg tous les 3h pour les femmes pendant l'accouchement et 4mg/kg en 2 fois par jour pendant 7 jours après la naissance) pour la prévention de la TME[23]. Dans cette étude, le taux de TME était de 41% plus faible dans le groupe NVP (47 infections sur 311 nouveau-nés à 18 mois) que dans le groupe AZT (75 infections trouvées chez 308 nouveau-nés à 18 mois)[23]. L'étude nommée WITS a ensuite démontré que le traitement antirétroviral hautement actif (une polythérapie ciblant différentes enzymes du VIH) avec au moins trois ARVs comprenant un inhibiteur de protéase (IP) ou/et des inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) était plus efficace pour la prévention de la TME que le bithérapie ou que la monothérapie sous AZT[18]. L'efficacité du traitement a été aussi évaluée en fonction de la durée de traitement[18]. Le taux de TME diminuait avec l'allongement de la durée du traitement. Les résultats de cette étude sont présentés dans la Figure 4. Par la suite, plusieurs études cliniques ont montré que la combinaison de deux ARVs ou plus était plus efficace que la monothérapie[24,25].

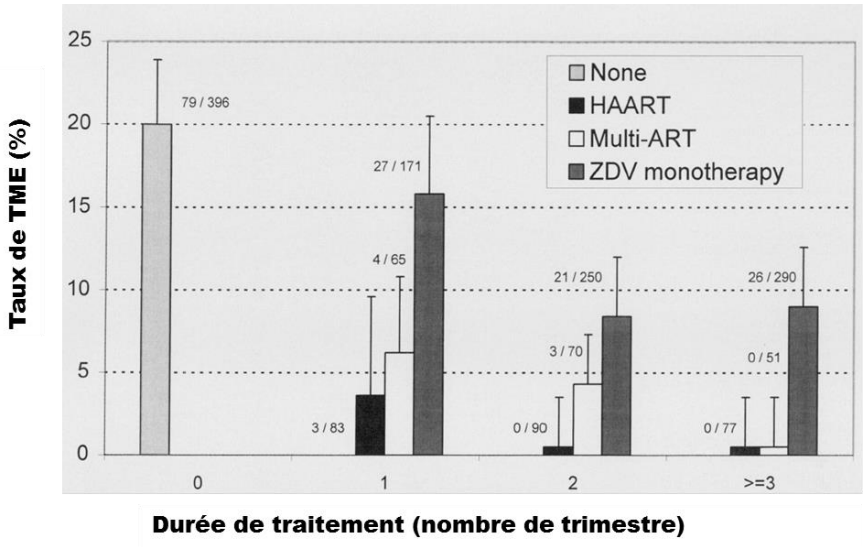


Figure 4. TME du VIH-1 selon les types de traitements et la durée du traitement[18]

4 Traitements d'ARVs de la mère pendant la grossesse

4.1 Traitements ultracourts

Seules trois molécules sont d'efficacité reconnue et utilisées dans la prévention de la TME avec des régimes courts ou ultra-courts : l'AZT, la Lamivudine (3TC) et la NVP qui sont recommandés en première ligne de traitement pour la prévention de la TME. Ces molécules peuvent être utilisées seules (AZT ou NVP) ou en combinaison de deux molécules (AZT +NVP ou AZT+3TC) ou de trois molécules (AZT +3TC+NVP). Ces antirétroviraux réduisent le risque de TME en diminuant la charge virale (CV) maternelle au moment de l'accouchement.

Toutefois, on observe avec la NVP prise en mono-dose un niveau de résistance virale élevé chez les femmes et chez les enfants infectés. La fréquence des mutations de résistance à la NVP chez la mère a été estimée entre 15% et 67% et chez les enfants infectés entre 20% et 52% suivant les études[26–28]. Dans l'essai TOPS en Afrique du Sud[29], le bras NVP monothérapie a même été interrompu à cause d'une fréquence de résistance à la NVP estimée être supérieure à 50% qui peut cependant être réduite par l'adjonction d'un traitement maternel de Combivir®(3TC+AZT) pendant quelques jours en post-partum. Une étude observationnelle réalisée en Côte d'Ivoire (ANRS 1201 Ditrame Plus-1) a, quant à elle, montré une fréquence de résistance virale de seulement 1% chez les mères et de 6% chez les enfants quand la prise de NVP en monodose était « encadrée » par un régime pré et post-partum antirétroviral de Combivir®[30]. Une autre étude TEmAA a montré que la co-administration de TDF/ emtricitabine (FTC) pouvait diminuer cette résistance virale causée par la NVP[31]. Dans cette étude, aucune résistance virale n'a été observée au 28^{e} jour après l'accouchement chez 38 femmes sous traitement de TDF/FTC plus NVP pendant 7 jours après de l'accouchement[31].

4.2 Recommandation de l'OMS

La nouvelle recommandation pour l'utilisation des antirétroviraux pour traiter la femme enceinte et prévenir la transmission à l'enfant a été publiée par l'Organisation mondiale de la santé (OMS)[32] sans tenir compte du nombre de CD4 de la mère (Tableau 1). Il est recommandé de ne pas discontinuer le traitement.

Tableau 1. Recommandation de l'OMS pour les traitements ARVs pour la femme enceinte.

<table>
<tr><th>Traitement</th><th colspan="2">Préférentiel</th><th>Alternatif</th></tr>
<tr><td>La première ligne</td><td colspan="2">TDF+3TC(ou FTC) +EFV</td><td>AZT+3TC+EFV(ou NVP)
TDF+3TC(ou FTC) +NVP</td></tr>
<tr><td rowspan="2">La deuxième ligne</td><td>Si stavudine ou AZT est utilisé dans la première ligne</td><td>TDF+ 3TC ou FTC+ATV/r ou LPV/r[a]</td><td rowspan="2">2 INTIs[b]+ DRV/r</td></tr>
<tr><td>Si TDF est utilisé dans la première ligne</td><td>AZT+3TC+ATV/r ou LPV/r[a]</td></tr>
<tr><td>La troisième ligne</td><td colspan="2">DRV/r + DTG[c] ou RAL ± 1-2INTIs</td></tr>
</table>

a : DRV/r peut être utilisé comme alternative pour PI/r et RAL+LPV/r peut être utilisé comme un alternative.

b : Si échec de traitement avec Abacavir (ABC) + 3TC ou TDF+ 3TC(FTC) en première ligne de traitement, AZT+3TC peut être utilisé comme seconde ligne de traitement et vice versa.

c : L'efficacité et innocuité de l'utilisation DTG chez les femmes enceintes n'sont pas disponibles.

4.3 Recommandation en France

En France, le traitement recommandé[33,34] pendant la grossesse consiste en une trithérapie systématique pour toutes les femmes pendant la grossesse. Si le traitement débute pendant la grossesse, le traitement de référence est basé sur un inhibiteur de la protéase boosté par le ritonavir (en général le DRV/r, LPV/r ou ATA/r) + 2 Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) (3TC, FTC, ABC, TDF, AZT avec différentes combinaisons possibles).

Plusieurs études, ont montré qu'un traitement par IP/r débuté au cours de la grossesse était

significativement associé à un sur-risque de prématurité et également à un sur-risque de complications gestationnelles pour la mère, comme : pré-éclampsie, diabète gestationnel et toxicité hépatique[35]. D'après l'auteur, ce risque pourrait être causé par le ritonavir (RTV) qui associé aux changements métaboliques complexes, interférait avec les systèmes surrénaliens de la mère et du fœtus par son interaction avec le CYP3A4[35,36]. Une autre étude clinique Mma Bana [37] a trouvé un taux de prématurité (21.4% versus 11.9%) qui était doublé chez les femmes prenant une trithérapie de AZT+3TC+LPV/r comparée à celui des femmes ayant une trithérapie de ABC+AZT+3TC. Une étude dans un modèle animal a montré une diminution de progestérone et un retard de croissance intra-utérin qui étaient associés à l'utilisation des PIs[38],.

Par ailleurs, la décroissance de la CV est le facteur majeur pour la prévention du risque de la TME. Les travaux menés en France dans la cohorte ANRS CO1 EPF montrent que le risque de transmission est très fortement corrélé avec la CV en fin de grossesse[39], et d'autant plus faible que la CV est contrôlée précocement[40].

La recherche d'autres antirétroviraux efficaces et bien tolérés pendant la grossesse est donc cruciale pour offrir une alternative à ces molécules afin notamment d'optimiser la prise en charge des femmes enceintes infectées par le VIH-1 lorsqu'elles sont diagnostiquées tardivement au cours de leur grossesse. L'objectif est de réduire le risque de TME sans compromettre les lignes thérapeutiques futures, ce qui concerne aussi bien les pays industrialisés que les pays à ressources limitées, même si les régimes de la prévention de la TME employés y diffèrent encore en partie.

Le raltégravir (RAL), premier représentant de la classe des inhibiteurs de l'intégrase du VIH, pourrait être un bon candidat, comme 3ème agent associé à 2 INTIs dans le contexte de la grossesse. Il faut noter ici que les dernières recommandations nationales françaises pour la

prise en charge des personnes vivant avec le VIH-1 précisent que le RAL peut être utilisé au cours de la grossesse soit pour des raisons de résistance ou d'intolérance aux autres options, soit dans le cadre d'un traitement tardif afin d'obtenir une décroissance rapide de la CV[33].

5 Raltégravir

5.1 Utilisation thérapeutique

Le RAL est développé par Merck&Co et mis sur le marché le 18 août 2006[41]. Il est aussi connu sous le nom de code MK-0518. C'est le premier ARV dans la classe des inhibiteurs d'intégrase (INI) du VIH, qui a obtenu son autorisation de mise sur le marché aux États-Unis de la *Food and Drug Administration* (FDA) le 12 October 2007[42] et en Union Européen de l'*European Medicines Agency* (EMA) le 20 Décembre 2007[43]. Il est commercialisé sous la marque ISENTRESS© et ISENTRESS© HD (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, New Jersey) en tablette de 400 mg et 600 mg, respectivement.

L'utilisation du RAL est recommandée dans différentes stratégies thérapeutiques:

La recommandation de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) de 2016[32] : la combinaison RAL + 2 INTI est recommandée : 1) dans le régime de première ligne pour l'enfant de moins de trois ans en cas de difficultés pour administrer le LPV/r ou la NVP ; 2) en régime de seconde ligne alternatif pour le traitement d'enfants entre trois ans et dix ans ; 3) en régime alternative de deuxième ligne pour le traitement des adultes et adolescents plus de 10 ans.

La recommandation des U.S. Department of Health and Human Services (DHHS) de 2018[44] : le RAL (2*600mg, 1 prise/jour ou 1*400 mg, 2 prises/jour) +TDF+FTC est un des régimes initiaux souvent donné pour les patients infectés. De

plus, il est aussi recommandé pour traiter les populations spéciales: les nouveau-nés avec un grand risque de TME pendant la période périnatale, les nouveau-nés infectés par le VIH et les femmes enceintes.

La recommandation en France[45] : le RAL (1200mg, 1 prise/jour) + TDF+ FTC est utilisé comme une option thérapeutique recommandée en première ligne, notamment pour la gestion d'interactions médicamenteuses. Et si le TDF ou le FTC n'est pas utilisable (par exemple insuffisance rénale), l'association du RAL + DRV/r serait une alternative.

En conclusion, le RAL pourrait être utilisé avec deux doses : 1200mg, 1 prise/jour ou 400 mg, 2 prises/jour en association avec 2 INTI (TDF+FTC/3TC ou 3TC+abacavir/AZT) ou avec DRV/r. Par manque de données cliniques pour le traitement à long terme, le régime basé sur le RAL est souvent recommandé comme traitement alternatif dans les cas de résistance virale aux autres ARVs, de toxicité des autres ARVs ou d'interaction avec les co-traitements. Grâce à l'efficacité du RAL pour diminuer la CV, le RAL est aussi recommandé pour traiter les femmes enceintes naïves avec au moins de 32 semaines d'aménorrhée (SA) ou sous les ARVs avec une CV>1000 copies/ml avec au moins de 32 SA[46].

5.2 Chimie

Le RAL est commercialisé sous forme de sel de potassium avec le nom chimique N-(2-(4-(4-fluorobenzylcarbamoyl)-5-hydroxy-1-méthyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl) propan-2-yl)-5-méthyl -1, 3,4-oxadiazole-2-carboxamide potassium sel[47]. La formule brute du RAL est $C_{20}H_{21}FN_6O_5$ avec une masse molaire de 444.42 g/mol. La structure est présentée dans la Figure 5[48]. Le RAL potassium est une poudre blanche. Avec un pKa de 7.02 et un logP de -0.39, il est soluble dans l'eau, légèrement soluble dans méthanol (MeOH), peu soluble dans

l'éthanol et l'acétonitrile (ACN), et pas soluble dans l'isopropanol.

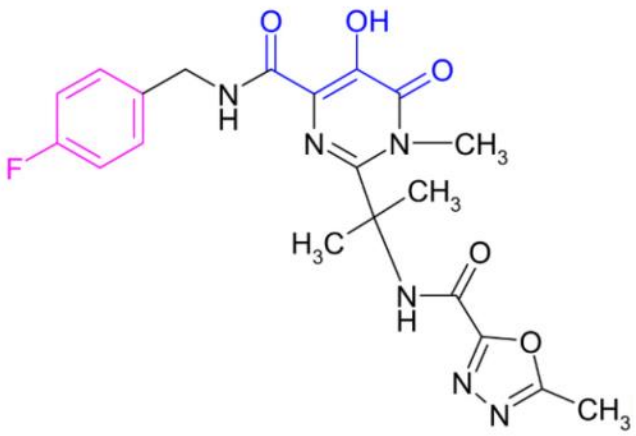


Figure 5. La structure moléculaire du RAL[48].

5.3 Mécanisme d'action

Depuis la synthèse du premier ARV, l'AZT, en 1987, le nombre d'ARVs disponibles a très vite augmenté, et leurs mécanismes d'action sont se diversifiés. Maintenant, environ 30 ARVs répartis en six classes avec différents mécanismes d'actions sont disponibles et utilisés dans différentes stratégies thérapeutiques. L'INI représente la dernière famille d'ARVs. L'ARN viral est d'abord rétrotranscrit en ADN viral double brin (vADN) par la transcriptase reverse. Puis, le vADN est intégré dans le génome humain par l'intégrase. Cette étape d'intégration est une étape nécessaire pour la production de nouveaux virus. La structure de l'intégrase est montrée en figure 6[49]. L'intégrase est une protéine de 32 kDa comprenant 288 acides aminés avec trois domaines structurales : une extrémité N terminale avec une liaison de zinc (résidus 1-50)[50]; un domaine catalytique (résidus 51-212) comprenant le site actif enzymatique, la triade catalytique (D64, D116 et E152)[51] et une extrémité C terminale (résidus 213-288) qui se lie de façon non-spécifique à l'ADN[52]. La procédure d'intégration du virus au génome humaine se fait en deux étapes : la première étape (étape d'hydrolyse), se fait dans le cytoplasme de la cellule infectée, et consiste en un clivage endo-nucléotidique de deux 3'-

nucleotides (pGT) du vADN, ce clivage est catalysé par l'intégrase, puis, deux groupes hydroxyles (OH^-) sont ajoutés en 3' des 2 brins du vADN qui est alors prêt pour la deuxième étape (l'étape de phosphodiester trans-estérification ou l'étape de transfert des brins du vADN)[53,54]. Dans la deuxième étape, les deux -3'-OH du vADN attaquent la liaison phosphodiester de l'ADN humain (présenté en bleu), cette étape est catalysée par l'intégrase à l'aide de deux cations divalents (M_A et M_B)[55]. M_A fonctionne comme un acide de Lewis pour faciliter l'attaque nucléophile du -3'-OH du vADN. Puis, M_B active le groupement oxoanion en 3'du vADN et stabilise le chélate pentacoordonné [56]. Le processus d'intégration se termine par la réparation de l'ADN par la polymérase humaine qui enlève le di-nucléotides en 5' du vADN[49,54].

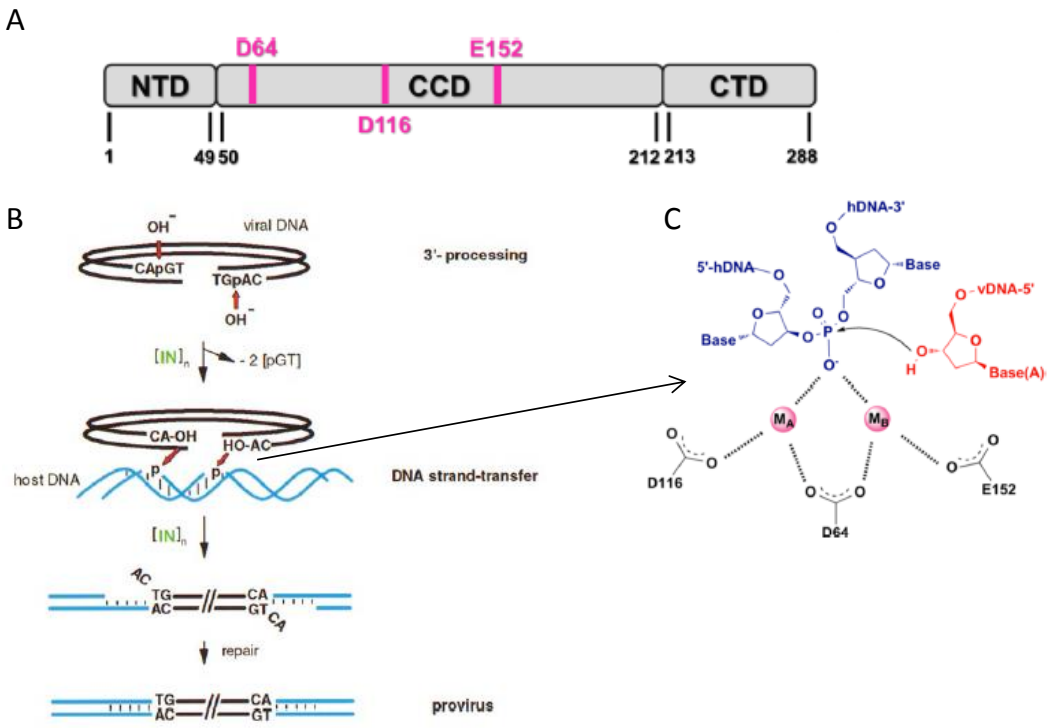


Figure 6. Structure de l'intégrase du VIH (A), procédure d'intégration du vADN dans le génome humain (B) et l'attaque nucléophile de CA- 3'-OH de vADN à l'ADN humain (C) [49,55].

Actuellement, la seule classe d'INI disponible sur le marché bloque la réaction du transfert des brins d'ADN viral (deuxième étape de l'intégration). Pour bloquer spécifiquement l'étape

de transfert des brins du vADN, la condition préalable est d'avoir deux groupements chimiques : un hétéroatome, nitrogène ou oxygène par exemple, capable de lier deux cations bivalents métalliques pour former le chélate ; et le noyau aromatique hydrophobe, responsable de l'inhibition pour bloquer et stabiliser le complexe de IN-vADN[57,58].

Dans le cas du RAL, le groupement en bleu sur la Figure 5 chélate les deux cations bivalents et se lie au groupement HO en 3' du vADN. La partie 3'-vADN est déplacée de 6 Å et ainsi crée une poche où le groupement halobenzyle (groupe rose dans figure 5) peut s'insérer. La liaison du RAL avec le site d'intégrase-vADN est stabilisée par des interactions de Van der Waals du RAL avec le groupe basique de 3'- vADN, la Pro214 et le Gln215 de l'intégrase (Figure 7)[48]. De plus, la stabilité de ce dimère est renforcée par l'interaction hydrophobe entre le groupe isopropyl et la Pro214 de l'intégrase-vADN et par l'interaction aromatique entre le groupe de méthyl-oxadiazole du RAL et la Tyr212 de l'intégrase-vADN (Figure 7)[48]. Finalement, le site actif de l'intégrase-vADN est désactivé par le RAL lié aux deux cations divalents.

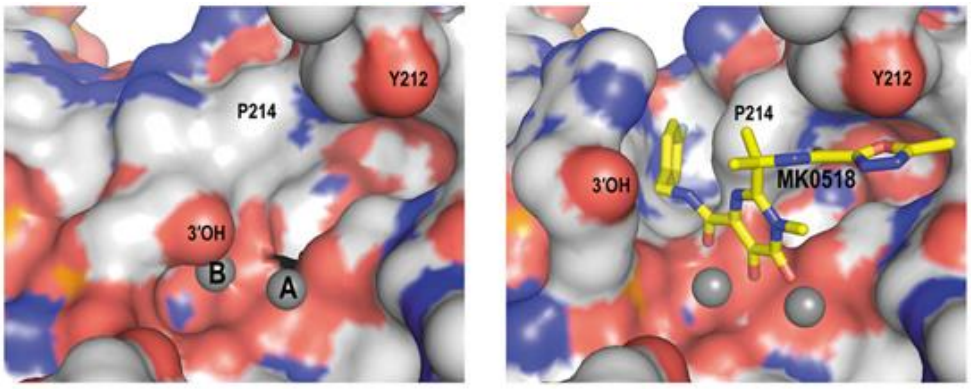


***Figure 7. Le site active de dimère intégrase-vADN** : sans (gauche) et avec (droit) interaction du RAL (MK0518)[48]. Les différents couleurs représentent différents atomes : gris claire pour C, rouge pour O et bleu pour N. Gris foncé pour représenter deux bivalent cation métallique.*

5.4 L'innocuité et l'efficacité du RAL

L'efficacité de la monothérapie sous RAL est étudiée dans la première partie du "Protocol 004" qui était un essai clinique multicentrique, randomisé, en double aveugle, contrôlé versus placebo[59]. Cinq groupes avec huit patients naïfs dans chaque groupe qui étaient traités par 100mg, 200mg, 400mg, 600mg de RAL ou placebo 2 fois/jour (BID) pendant 10 jours en co-traitement de TDF/3TC avec une posologie de 300/300mg, 1 fois/jour (OAD). Dans les groupes de RAL à toutes doses d'administration, les CV étaient toutes diminuées d'environ 2 log10 copies/ml, ce qui était deux fois plus efficace que les autres trithérapies basées sur les IPs ou sur les inhibiteurs de la transcriptase inverse[60,61]. De plus, dans tous les groupes traités avec le RAL, au moins 50% des patients avaient un niveau de CV inférieur à 400 copies/mL comparé à aucun patient dans le groupe placebo. Dans cette étude, le RAL était bien toléré avec aucun événement indésirable grave observé, huit effets indésirables liés au médicament signalés dans quatre groupes de RAL et deux dans le groupe placebo. Des résultats similaires ont été obtenus par l'étude "Protocol 005"[62] qui comparait l'efficacité des différentes posologies du RAL (200mg, 400mg, 600mg) BID avec le placebo pour traiter les patients déjà sous traitement d'autres ARVs. La même vitesse de diminution de la CV a été obtenue. A semaine 24, plus de 50% des patients dans chaque groupe de RAL avaient une CV inférieure à 50 copies/mL contre 13.3% pour le groupe placebo avec un profil d'innocuité comparable.

Après avoir comparé l'efficacité du RAL avec le placebo, l'innocuité et l'efficacité du RAL (400mg, BID) ont été comparées avec celles de l'éfavirenz (EFV) (600mg, OAD) qui était considéré comme la référence de traitement en association avec TDF/FTC (300/200mg OAD) dans l'étude clinique STARTMRK[63] et en association avec TDF/3TC (300/300mg OAD) dans l'étude clinique Protocol 004 part II[64] pour traiter les patients naïfs pendant 5 ans. Dans les deux études, moins d'effets indésirables liés à l'utilisation de médicaments ont été observé dans le groupe RAL (52% dans l'étude STARTAMRK et 55% dans l'étude Protocol 004 part

II) que dans le groupe EFV (80.1% dans l'étude STARTAMRK et 76.3% dans l'étude Protocol 004 part II). Surtout, beaucoup moins de patients ont déclaré un événement indésirable du système nerveux dans le groupe RAL (39.1% dans l'étude STARTAMARK et 38.1% dans l'étude Protocol 004 part II), quasiment la moitié par rapport au groupe EFV (64.2% dans l'étude STARTAMARK et 63.2% dans l'étude Protocol 004 part II). Dans l'étude STARTMARC, pour 281 patients sous traitement de 400mg BID du RAL pendant 5ans, les effets indésirables déclarés liés aux médicaments sont les plus souvent (groupe RAL versus groupe EFV): maux de tête (9.3%), nausées (8.9%), vertiges (7.8%), insomnies (7.5%), cauchemars (6.8) et diarrhées (5.3%)[63]. Au niveau de l'efficacité, plus de patients traités avec le régime d'ARVs basé sur RAL (71% dans l'étude STARTAMARK et 68.8% dans l'étude Protocol 004 part II) par rapport aux patients traités avec le régime basé sur EFV (61.3% dans l'étude STARTAMARK et 63.2% dans l'étude Protocol 004 part II) avaient un niveau de CV < 50 copies/mL. De plus, une augmentation de cellules CD4 plus importante et une réponse virologique plus rapide sont observées dans le groupe RAL. Avec des résultats très similaires, ces deux études cliniques ont montré que la trithérapie RAL plus TDF plus 3TC ou FTC était efficace durablement et était bien tolérée par les patients naïfs pendant 5 ans[63,64].

En considérant la toxicité potentielle des INTIs et de la résistance virale, l'efficacité du RAL co-traité avec le darunavir boosté par le ritonavir (DRV/r) est rapporté par l'étude A5262, une étude clinique de phase IIb, pour traiter 112 patients naïfs infectés par le VIH-1[65]. A la semaine 24, 79% des patients avaient une CV inférieure à 50 copies/mL et 71% à semaine 48. L'échec virologique se traduisait de trois façon différentes: soit la CV ≥ 1000 copies/mL à la semaine 12, soit l'augmentation de la CV à > 0.5 $\log_{10}$ copies/mL de semaine 4 à 12, soit la CV > 50 copies/mL après la semaine 24. Environ 26% de patients étaient en échec

virologique. Cet échec virologique important était associé à une ligne base de CV supérieure à 100 000 copies/ml, qui induisait une résistance au RAL chez les patients.

Ensuite, l'efficacité et la tolérance du RAL ont été étudiées en association avec différents régimes de traitement dans l'étude BENCHMRK[66]. Dans cette étude sur 240 semaines, pour les premiers 156 semaines, 703 patients sous traitement sans RAL ont été répartis en 2 groupes : l'un avec un traitement sous RAL (400mg, 2 fois/J) et l'autre, sous placebo en plus de leurs traitements d'ARVs. A partir de la semaine 156, tous les patients du groupe placebo passaient dans le groupe RAL. Dans le groupe RAL, 51% des patients à semaine 156 avaient une CV inférieure à 50 copies/mL contre 22% dans le groupe placebo. Une efficacité durable du RAL était montrée par la différence stable du pourcentage de patients avec CV<50 copies/ml entre les semaines 96 et 156. Après avoir remplacé le placebo par le RAL à une posologie de 400 mg BID dans le groupe placebo à semaine 156, le pourcentage de patients avec une CV inférieure à 50 copies/mL a augmenté de 22% en semaine 156 à 38% en semaine 240. Les effets indésirables déclarés liés aux médicaments sont comparables entre le groupe RAL et le groupe placebo pendant les 156 semaines de traitement: maux de tête (5% versus 5%), nausées (4% versus 5%), diarrhées (4% versus 4%) et fatigues (3% versus 1 %)[66]. Les résultats de cette étude clinique ont montré que le RAL était efficace pour diminuer la CV de façon durable et bien toléré par les patients déjà sous traitement ARVs depuis longtemps à qui l'on ajoute du RAL dans leurs multithérapies anti-VIH.

En plus des études cliniques présentées ci-dessus qui s'intéressent à différents régimes possibles en co-traitement avec le RAL (400mg, BID), s'est posée la question de la possibilité de remplacer le régime de RAL BID par OAD pour simplifier l'administration du RAL. L'efficacité et l'innocuité de la posologie de référence du RAL (400mg, BID) sont comparées à 800mg OAD dans l'étude QDRMK[67] et à 1200mg OAD dans l'étude

ONCEMRK[68]. Par rapport au groupe 400mg de RAL BID, le régime de 800mg OAD a plus de risque de l'échec virologique (14% versus 9%). Davantage de résistances virales ont été décrites pour le régime de 800mg OAD (1.8% versus 0.2% à 400mg BID). Pour ces raisons, la posologie de 800 mg OAD de RAL est considérée comme moins efficace que la posologie de 400mg BID et n'est pas recommandée pour traiter les patients naïfs. En revanche, dans l'étude ONCEMRK[68], une posologie de 1200mg OAD a été montrée comme aussi efficace qu'une posologie de 400mg BID chez les patients naïfs ; tous les patients étaient sous co-traitement de FTC/TDF (200mg/300mg OAD). A semaine 96, le même pourcentage de patients avec une CV inférieure à 40 copies/mL dans les deux groupes a été observé (81.5% pour le groupe OAD versus 80.1% pour le groupe BID). La fréquence de l'échec virologique était similaire pour le groupe OAD (9.6%) et le groupe BID (9.8%) avec seulement trois cas de résistance virologique dans les deux groupes. Les effets indésirables liés aux médicaments ont été déclarés par 26% des patients dans le groupe OAD et 26.7% dans le groupe BID, ce qui montre un profil d'innocuité similaire pour les deux posologies du RAL. Ainsi, dans l'étude ONCEMRK, l'efficacité et l'innocuité de RAL étaient comparables entre la posologie de 400mg BID et la posologie de 1200mg OAD. Les résultats des principales études cliniques sur l'efficacité et l'innocuité du RAL sont résumés dans le Tableau 2.

Tableau 2. Les essais cliniques pour l'évaluation de l'innocuité et l'efficacité du RAL.

Essai (n=17)			Description	Population traitée	Patients avec CV< 50 copies/mL		Discontinuation à cause d'effet indésirable		Commentaire
RAL	Réf	Co-traitement dans les deux groupes			RAL	Réf	RAL	Réf	
100/200/400/600mg BID (n=39/40/41/40)	EFV 600mg OAD (n=38)	TDF/3TC OAD¤	double aveugle, randomisé, portant sur plusieurs doses	Patients naïfs	84%/ 85% / 98%/ 89% S48	84% S48	0%	0%	Tolérance comparable et plus efficace pour RAL par rapport à l'EFV[59]
200/400/600mg BID (n=44/45/45)	Placebo BID (n=45)	Traitement ARV de fond optimal	double aveugle, randomisé, portant sur plusieurs doses	Patients avec résistance viral et CV>5000 copies/mL	65%/55%/67% S24	13% S24	2%	2%	Meilleur efficacité et tolérance comparable dans le groupe RAL[62]
400mg BID (n=350)	EFV 600mg OAD (n=282)	TDF/FTC (300/200 mg OAD) ¤	Phase III, randomisé, non-inférieur	Patients naïfs	71% S240	61% S240	5%	10%	Plus efficace et moins d'effet indésirable pour le groupe RAL [63]
400mg BID (n=160)	EFV 600mg OAD (n=38)	TDF/FTC (300/200 mg OAD)	double aveugle, randomisé, portant sur plusieurs doses	Patients naïfs	69% S240	63% S240			Bonne efficacité et tolérance du RAL pendant 5 ans[64]
400mg BID (n=112)	-	DRV/r 800/100mg OAD	Phase IIb, seule bras, ouvert multicentrique	Patients naïfs	71%	-	<1%	-	Bonne efficacité et tolérance, mais échec virale et résistance virale commun[65].

Essai (n=17)			Description	Population traitée	Patients avec CV< 50 copies/mL		Discontinuation à cause d'effet indésirable		Commentaire
RAL	**Réf**	**Co-traitement dans les deux groupes**			**RAL**	**Réf**	**RAL**	**Réf**	
400mg BID (n=462)	Placebo BID (n=237)	Traitement ARV de fond optimal	Phase III, double aveugle, randomisé, multicentrique	Patients avec résistance viral et CV>1000 copies/mL	51% S156	22% S156	23%	13%	Bonne efficacité et tolérance du RAL pendant 5 ans[66]
800mg OAD (n=328)	RAL 400mg BID (n=388)	TDF/FTC (300/150 mg OAD)	Phase III, randomisé, non-inférieur, double aveugle	Patients naïfs	83% S48	89% S48	1%	1%	Plus d'échec virale et moins efficace dans le groupe OAD, pas recommandé[67].
1200mg OAD (n=531)	RAL 400mg BID (n=266)	TDF/FTC (300/200 mg OAD)	Phase III, randomisé, non-inférieur, double aveugle	Patients naïfs	89% S48	88% S48	<1%	1%	Les deux traitement comparable, régime OAD est recommandé[68].
400mg BID (n=462)	Placebo (n=237)	Traitement optimale	Phase III, double aveugle, randomisé	Patients déjà sous traitement	62% S48	33% S48	1.5%	2.5%	Meilleur suppression virale dans groupes RAL[69]
400mg BID (n=350)	LPV/r 400/100mg BID (n=352)	-	Phase III, double aveugle, double placebo, randomisé, multicentrique	Patients déjà sous traitement	84% S24	91% S24	1%	1%	Efficacité du RAL comparable avec LPV/r[70]
400mg BID (n=139)	IP/r (n=134)	Traitement initiale	Multicentrique, randomisé, ouvert	Patients déjà sous traitement	89% S48	87% S48	2%	2%	non-inférieur d'efficacité dans groupe RAL[71]

Essai (n=17)			Description	Population traitée	Patients avec CV< 50 copies/mL		Discontinuation à cause d'effet indésirable		Commentaire
RAL	**Réf**	**Co-traitement dans les deux groupes**			**RAL**	**Réf**	**RAL**	**Réf**	
400mg BID (n=63)	ATV/r/TDF/FTC 300/100/ 300/100mg OAD	ATV 300mg BID	Multicentrique, randomisé, ouvert, contrôle par substance active	Patients naïfs	75% S24	63% S24	6%	0%	Efficacité comparable avec mieux profil de lipide chez les patients sous RAL[72]
400mg BID (n=42)	TDF/FTC 300/200mg OAD (n=43)	DRV/r 800/100mg OAD	Ouvert randomisée pilote	Patients naïfs	63% S48	83% S48	0%	0%	Moins efficace avec moins d'impact sur la santé osseuse pour RAL[73].
400mg BID (n=101)	TDF/FTC 300/200 mg OAD (n=105)	LPV/r 400/100mg BID	randomisé, ouvert, pilote	Patients naïfs	66% S96	68% S96	5%	3.8%	Efficacité et tolérance comparable avec moins d'impact physiologique pour RAL[74].
400mg BID (n=401)	TDF/FTC 300/200 mg OAD (n=401)	DRV/r 400/100mg BID	randomisé, ouvert, multicentrique non-inférieur	Patients naïfs	89% S96	93% S96	1.5%	2.6%	Plus d'augmentation graisse corporelle totale et de l'indice de masse corporelle par RAL[75]
400mg BID (n=260)	2/3 INNTI (n=255)	LPV/r 400/100mg BID	Phase III randomisé, ouvert, non-inférieur	Patients déjà sous traitement	92%*	91%*	1%	1%	Les deux régimes de traitement sont efficaces et bien tolérées[76]
400mg BID (n=433)	2/3 INNTI (n=426) ou LPV/r (n=418)	LPV/r 400/100mg BID	randomisé, non-inférieur, multicentrique, multinational	Patients déjà sous traitement	81% S144	86%[#1] 78%[#2] S144	5%	6%[#1] 3%[#2]	Efficacité et tolérance du RAL n'est pas mieux que INNTI+LPV/r[77]

RAL : La posologie du RAL utilisé

Réf : La posologie de traitement référence à comparer

S24/S48/S96/S144: semaine 24/48/96/144

** : données sur charge virale <400 copies/mL*

[#1] : Résultat pour groupe sous traitement d'INNTI+ LPV/r

[#2] : Résultat pour groupe sous monothérapie de LPV/r

¤ : Co-traitement avec seulement RAL.

En résumé, il a été montré que le RAL a une meilleure efficacité par rapport au placebo avec le même profil d'innocuité dans l'étude protocol 004 et protocol 005[59,62]. De plus, il a une meilleure efficacité et une meilleure tolérance par rapport aux régime basés sur EFV pendant les 5 années d'observation, en association avec 2 INTI dans l'étude STARTAMARK[63] et dans l'étude protocol 004 part II[64], et avec un régime d'ARVs dans l'étude BENCHMRK également[66]. En même temps, des analyses ont été menées sur le remplacement du RAL BID par le RAL OAD par l'étude QDRMK[67] pour 800mg et l'étude ONCEMRK pour 1200mg[68]. Finalement, par rapport à la posologie de référence (400mg, OAD), la posologie de 1200mg OAD a montré une efficacité et un profil d'innocuité comparable. Deux études (STARTAMARK et BENCHMRK) avec 5 ans de traitement sous RAL montre une fréquence de ces effets indésirables (maux de tête, nausées, diarrhées, vertiges, cauchemars et fatigue) généralement comparable avec le placebo et moindre par rapport au groupe EFV. Les effets indésirables de grade 3-4 ont été rarement observés[79]. Aucun effet toxique lié avec la surdose n'a été pas montré dans ces études cliniques. Aucune toxicité métabolique, mitochondriale, rénale et hépatique due au RAL n'a été observée avec le RAL en monothérapie chez les volontaires sains pendant 4 semaines[80]. Cependant, dans l'étude ACTG A5262, les auteurs ont montré une résistance virale importante chez les patients avec une CV supérieure à 100000copies/mL[65]. En conclusion, le RAL semble bien efficace et toléré par les patients infectés par VIH-1.

5.5 Utilisation du raltégravir pendant la grossesse

L'ensemble des essais cliniques, ainsi que des cas cliniques concernant l'utilisation du RAL sont résumés dans le tableau3.

Au Brésil, une étude clinique monocentrique, ouverte et randomisée a été lancée par Brites et al.[81]. Les patientes enceintes naïves avec une initiation tardive du traitement (> 28 SA) et

une CV >1000 copies/mL ont été incluses dans cette étude. Un total de 279 femmes enceintes infectées ont été réparties en deux groupes (1 :1), un groupe avec 400mg BID du RAL et l'autre groupe sous LPV/r (200/50 mg BID), tous avec un co-traitement AZT/3TC (300/150mg BID). Au moment de l'accouchement, 76% de patientes avaient une CV < 50 copies/mL dans le groupe RAL, contre 25% dans le groupe LPV/r. Environ trois fois moins d'effets indésirables ont été déclarés dans le groupe RAL (23.5%) que dans le groupe LPV/r (62.5%).

Cecchini et al. ont étudié les données de 31 femmes enceintes mises sous RAL en Argentine entre 2009-2015[82]. C'est une étude clinique monocentrique. Les patients étaient incluses dans cette étude selon trois critères d'inclusion : 41% (n=13) des patientes (groupe A) étaient déjà sous traitement ARV avec une CV élevée, 48.4% (n=15) des patientes (groupe B) sans aucun traitement ARV avec une initiation tardive du traitement ARVs (> 30SA) et 9.7% (n=3) de patients (groupe C) avec une résistance virale à leur traitement. Au moment de l'accouchement, 45.5% des patientes dans le groupe A et 70% des patientes dans le groupe B avaient une CV < 50 copies/mL, et 100% du groupe A et 80% du groupe B avaient une CV < 400 copies/mL avec aucun effet indésirable déclaré. Bien que 14% des bébés avaient un poids faible, aucun bébé n'a été infecté par VIH-1.

Puthanakit et al. ont répertorié 154 femmes enceintes qui ont un risque élevé de TME en Thaïlande. Environ 73% (n=113) de ces femmes étaient des patientes naïves avec une mise sous traitement ARV tardif (>32 SA) et 27% (n=41) de ces femmes étaient déjà sous traitement ARV mais avec une CV élevée (>1000 copies/mL) pendant 32-38 SA[83]. Au moment de l'accouchement, 45% (n=67) des femmes avaient une CV inférieure à 50 copies/mL. Sur 155 nouveaux nés, un bébé était mort à 7 jours après la naissance de façon inexplicable, 11% (n=17) étaient prématurés et 19% (n=30) étaient nées avec un faible poids.

Pour la TME, 3.9% (n=6) des enfants étaient infectés par VIH-1, mais parmi eux 3 enfants étaient probablement infectés in utéro avant le début du traitement sous RAL.

Gantner et al. ont répertorié toutes les femmes enceintes qui étaient sous traitement basé sur RAL pendant au minimum 15 jours entre 2009 et 2014[84] en France. Quatre-vingt-quatre femmes infectées par le VIH-1 étaient incluses dans cette base de données, 17% (n=16) de ces patients étaient naïves et mises sous traitement ARV tardivement. Finalement, 70% des patientes avaient une CV inférieure à 50 copies/mL et 84% des patientes avaient une CV inférieure à 400 copies/mL au moment de l'accouchement. Ces résultats montrent une bonne efficacité du RAL pendant la grossesse. Environ 84 bébés étaient nés dont 52% par césarienne. Le taux de bébé prématuré était de 19% (n=18). Aucune anomalie congénitale n'a été observée. Aucun bébé n'était contaminé par le VIH-1.

Concernant les essais cliniques, au total, 3630 femmes enceintes infectées par le VIH-1 sous un traitement basé sur le RAL sont incluses dans 10 revus clinique (tables 3). Chez ces femmes, 2.8% (n=100) des patientes étaient naïves, 6% (n=216) des patientes, déjà sous traitement ARVs sans RAL, et pour 91.3% (n=3314) des patientes pas d'information disponible. Parmi les 100 patientes naïves et les 216 patientes déjà sous ARVs, 201 patientes présentaient un haut risque de TME, et étaient soit des patientes naïves avec une mise sous RAL après 35 SA soit des patientes avec une CV élevée avec un traitement ARVs sans RAL inefficace proche du terme. Toutes ces études ont montré une bonne efficacité du RAL que les patientes soient naïves ou déjà sous traitement. Même sur les femmes à haut risque de TME, le RAL représente un traitement très efficace et permet de diminuer la CV à < 50 copies/mL avant accouchement chez 45% à 75% des patientes. Peu d'effets indésirables ont été déclarés, sauf une femme qui a souffert d'une toxicité hépatique. Dans ces études, en tout, 1183 naissances sont rapportées avec des informations précises. Seulement 7 (0.6%) nouveau-nés

infectés par VIH-1 déclarés dont 3 bébé étaient considérés comme déjà infecté avant la prise du RAL. Parmi les 27 (2.3%) bébés qui avaient une anomalie congénitale, seul 1 bébé présentait une anomalie du tube neural. Seuls 7 (0.6%) prématurés ont été déclarés et 4 (0.3%) bébés nés avec des poids faibles.

Vingt-huit cas cliniques de femmes enceintes sous traitement basé sur le RAL dans 15 publications ont été trouvés et sont montrés dans le tableau 3. Les patientes rapportées sont souvent des cas cliniques particuliers : 9 patientes avec plusieurs résistances virales ou intolérantes aux autre ARVs, 3 patientes avec une CV augmentée sous traitements ARVs sans RAL, 6 patientes naïves avec une initiation d'ARVs tardive et 6 patientes sous d'autres traitements avec une CV élevée proche de l'accouchement. L'intérêt d'ajouter le RAL dans le traitement est de diminuer la CV rapidement pour avoir une CV optimale pour éviter la TME. Toutes ces patientes ont une CV diminuée efficacement après l'addition du RAL, sauf dans un cas, où la CV était augmentée à cause du développement de résistance virale au RAL à 22^{e} semaine sous RAL qui a été ensuite remplacé par le DTG. Peu d'effets indésirables ont été rapportés, sauf une femme qui a arrêté le traitement du RAL à cause d'une toxicité hépatique qui a disparu après l'arrêt du RAL. Malgré deux accouchements prématurés, aucun bébé n'a été infecté par le VIH-1.

Tableau 3. Les data cliniques d'utilisation du RAL au cours de grossesse

Data/case	Nombre de femmes enceintes/nombre nouveau-né (Caractéristique de patients)	commentaires
Revue des données cliniques		
Brites et al.[81]	16 patientes naïves	**Efficacité :** 13 (76%) femmes ont CV<50 copies/mL avant l'accouchement. **Tolérance :** 4 (23.5%) effets indésirables déclarés avec 0 de grade3-4 déclaré.
Cecchini et al.[82]	13 patientes traitées avec CV élevé 15 patientes naïves avec une présence tardive	**Efficacité:** 45% de femmes dans le groupe de présence tardive et 70% de femmes dans groupe de CV élevé ont CV<50copies/mL avant l'accouchement. 0 bébé n'était infecté. **Tolérance :** 2 bébés avec malformation du septum ventriculaire, 18.5% de prématurité, 14% de poids natale faible
Puthanakit et al.[83]	154 /155 (41 patientes naïves avec une présence tardive et 113 patientes traitées avec CV>1000copies/mL)	**Bonne efficacité pour les femmes avec haut risque de TME** : 45% de femmes ont CV<50 copies/mL à accouchement avec 6 (3.9%) nouveau-nés infectés parmi lesquels 3 bébés sont considérés non lié avec RAL.
Gantner et al.[84]	94/96 (17% naïves et 83% traitées)	**Bonne efficacité :** 82% de patients avec CV <50 copies/mL avant l'accouchement et 0% de TME
Shamsuddin et al.[85]	2426	**Pas de relation entre anomalie du tube neural et exposition du RAL** : 3 nouveau nés avec anomalies du tube neural déclarés avec seulement 1(0.04%) possiblement liée au l'exposition du RAL.
Rasi et al.[86]	875/886	**Taux de d'anomalie congéniale comparable avec les autres ARVs** avec 23 (2.59%) d'anomalie congéniale déclaré avec 0 cas d'anomalie du tube neural
Mounce et al.[87]	7/7	**Efficacité** : 71.4% de patients ont CV<75 copies/mL avant l'accouchement avec 0 de TME **Tolérance :** 0 effet indésirable grave déclaré ; 2 bébés avec poids natal faible, 0 prématuré observé
Boucoiran et al.[88]	11 femmes enceintes de 3e trimestre (3 patients naïfs avec une présence tardif et 7 patients avec CV élevé)	**Efficacité** : 7 patients avec CV < 50 copies/mL avec 0 enfant infecté **Tolérance :** Seulement 1effet indésirable déclaré **Mais :** Une femme avec toxicité hépatique observé
Halsema et al.[89]	6/6	**Efficacité** : 100% de patients avec CV <400copies/mL avec 0 enfant infecté **Tolérance :** 0 anomalie congénitale observée.
Nóbrega et al.[90]	14 /15(9 patientes naîves avec une présence tardif, 5 patientes traitées par IPs)	**Efficacité** : Avec un temps médian sous RAL de 17 (range 7-32) jours, 50% de patientes avec CV<50copies/mL, 78% de patientes avec CV<500copies/mL et 22% de patientes sans résultat de CV. Un seul enfant infecté causé probablement par une transmission utéro.
Cas clinique		
Adeyemo et al.[91]	Trois patients traités avec CV à 5747, 37843 et 28364 copies/mL avec 38 SA	Après l'addition de RAL et enfurvitide dans le régime de traitement, une diminution de 2 logs copies/mL de CV observé avant 11e jour. Aucuns bébés n'étaient pas infectés. Aucun effet indésirable grave déclaré.
C-Osorio et al.[92]	Une patiente naïve de 30 ans en 30 SA et une prématurité d'une rupture des membranes. Le CV était 14000 copies/mL	Sous traitement de RAL+TDF/FTC+DRV/r+NVP, le bébé n'est pas infecté. Zéro effet indésirable déclaré. Passage transplacentaire de RAL a été observé.

Westling et al.[93]	Patient 1 : 25ans, naïve, en 37 SA, CV de 65600copies/mL	Sous traitement de RAL, TDF/FTC, LPV/r BID pendant 8 jours, CV à 2700 copies/mL avant accouchement césarienne. Le bébé n'était pas infecté.
	Patient 2 : 28 ans, naïve, en 30 SA, CV de 69600 copies/mL	Sous traitement d'AZT, 3TC, ATV/r pendant 10 jours, avec CV toujours élevé, RAL était ajouté. 15 jours après l'addition de RAL, CV étais 142 copies/mL et 20 copies/mL avant l'accouchement césarienne. Le bébé n'était pas infecté.
	Patient 3 : 16 ans, naïve, en 37 SA, CV de 96100 copies/mL	Sous traitment de TDF/FTC, ATV/r et RAL pendant 12 jours, CV de 831 copies/mL avant l'accouchement césarienne. Le bébé n'était pas infecté.
	Patient 4 : 29 ans, naïve, en 34 SA, CV de 637000 copies/mL	Sous traitement de TDF/FTC, ATV/r et RAL pendant 22 jours, CV de 691 copies/mL avant l'accouchement césarienne. Le bébé n'était pas infecté.
Hegazi et al.[94]	Trois patients traitée sous RAL 22 semaines/14h/22.5h avant l'accouchement avec CV de 5030/55/<40copies/mL	Avec <40/55/<40 copies/mL, les trois bébés sans infection. Pas d'effet indésirable déclaré. Le RAL était observé chez les trois bébés avec un taux de passage transplacentaire du RAL de 163%,13% et 44%.
Hoffer et al.[95]	Une patiente naïve avec CV de 8903 copies/mL en 35 SA	Sous traitement de 3TC/AZT/RAL/LPV/r (300/600/400/400 /200mg BID), CV à 927 copies/mL à le quatrième jour de traitement et à 20 copies/mL à 19^{e} jour de traitement avant accouchement. Le bébé n'était pas infecté. Aucun effet indésirable déclaré.
Yaita et al.[96]	Une patiente de 27 ans sous traitement de AZT+3TC+LPV/r en 18 SA avec une augmentation de CV de 71000 à 222000 copies/mL	Avec addition de RAL, le CV a été diminué < 20 copie/mL en 34 SA et maintien jusqu'à l'accouchement avec bébé non infecté. Pas d'effet indésirable déclaré.
Simonetti et al.[97]	Une patiente de 24 ans avec 20 ans de traitement et plusieurs résistances virales aux IP et INTI/INNTI	Un développement de résistance virale au RAL a observé 6 mois après le traitement et causé une re-augmentation de CV. RAL était ensuite remplacé par DTG 2 semaine avant accouchement. Le bébé n'était pas infecté
Renet et al.[98]	Une patiente naïve de 34 ans, en 35 SA, traitement initiale avec AZT/3TC, LPV/r, 9 jours après, avec 523975 copies/mL de CV, RAL étais ajouté	11 jours après l'addition de RAL, 1163 copies/mL de CV observé, RAL était arrêté à cause de toxicité hépatique lié au RAL. Avec l'accouchement par césarienne 3 jours après l'arrêt de RAL, bébé était né sans infection.
Cha et al.[99]	Une patiente traitée de 30 ans, sous AZT/3TC et LPV/r BID depuis 10 SA, avec une remontrée de CV de 720 à 106110 copies/mL en 33 SA, RAL étais ajouté	4 semaine après l'addition de RAL, CV diminuait jusqu'au 200 copies/mL. Le bébé n'était pas infecté.
Hegazi et al.[100]	Une patiente naïve de 28 ans, avec 28 SA, CV à $1.74*10^{7}$copies/mL	18 jour après le traitement de RAL, TDF/FTC et SQV/r BID, CV diminuait jusqu'au 17400 copies/mL, 71 jours après le traitement, CV était 208 copies/mL avant l'accouchement, sans TME observé.
Mckeown et al.[101]	Trois patientes traitées, avec une résistance virale élevée pour deux patientes et le troisième patient avec une allergique de NVP et une intolérance d'IPs	Le RAL était ajouté en 28/38/39 SA avec CV de 183/67100/238 copies/mL, respectivement. Avec CV de <40/185/<40 copies/mL avant les accouchements par césarienne, bébés étaient nés sans infection. Pas d'effet indésirable déclaré. Les concentrations élevée de RAL (3634, 209, 776 ng/mL) observé chez les trois bébés, avec les taux de passage transplacentaire de RAL de 737%, 950% et 1552%.
Croci et al.[102]	Une patiente traitée de 22 ans avec plusieurs résistances virales d'INTIs et IPs	Sous traitement de RAL, TDF/FTC et LPV/r depuis 4^{e} SA, le CV reste <20 copies/mL jusqu'à l'accouchement. Le bébé était né avec un poids faible de 2.4 kg mais sans infecté sain.

Taylor et al.[103]	Patient 1/2 : traitée/naïve, 32/24 ans, avec une présence tardive pour les deux, avec 58884/17782 copies/mL de CV en 34/33 SA	Avec 29/46 jours de traitement RAL et FTC/TDF pour les deux, CV diminuait au 40/<40 copies/mL avant l'accouchement césarienne, pas de TME observé.
	Patient 3/4 : traitée, 39/39 ans, avec faible virémie pour les deux, CV 51/109 copie/mL en 33/34 SA	Avec 23/19 jours de traitement de RAL, LPV/r, 3TC et RAL, LPV/r, 3TC, AZT pour patient 3 et 4, le CV était <40 copies pour les deux patients avant les accouchements césariennes. Le bébé de patient 3 était prématuré. Les bébés n'étaient pas infectés.
	Patient 5 : traité, 39 ans, une remonté de CV important à 269153 copies/mL en 34 SA	Avec 17 jours sous traitement de RAL, 3TC, AZT, LPV/r, EFV, le CV était 380 copies/mL avant l'accouchement césarienne, sans TME observé.
Pinnetti et al.[104]	Une patiente traitée, co-infectée avec le virus de l'hépatite C, résistance viale de INTI et Pis, sous traitement de AZT, 3TC, DRV/r, avec une CV à 75584 copies/mL en 38 SA	Le RAL et TDF était ajouté a partir 38^{e} SA, 9 jours après, avec CV à 260 copies/mL avant l'accouchement, le bébé était né sans infecté. Le RAL observé chez bébé montre un transplacentaire de RAL.
Jaworsky et al.[105]	Patiente 1 : 19 ans, avec résistance virale d'IPs et INTI/INNTI	Sous traitement RAL et 3TC/AZT/abacavir, TDF, étravirine (ETV), DRV/r depuis 21 semaine avant la grossesse, CV diminuait de 18579 à <50 copies/mL et maintien pendant la grossesse. Avec l'accouchement césarienne à 40^{e} SA, bébé pèse 2.7 kg et non infecté.
	Patiente 2 : 17 ans, avec résistance virale aux IPs et INTI/INNTI	Sous traitement 3TC/AZT/abacavir, TDF, ETV, DRV/r 4 mois d'aménorrhée, le CV diminuait de 6379 à 2017 copies/mL avant l'accouchement, bébé avec poids de 3.2 kg sans infection.

En résumé, dans les revues des essais cliniques et les rapports de cas cliniques chez les femmes enceintes, le traitement basé sur le RAL était toujours efficace et bien toléré par les mères et les enfants. Seulement 6 femmes mises sous RAL avant 30 SA ont été rapportées car le RAL est souvent utilisé pour diminuer la CV dans des cas cliniques particuliers avec une CV élevée chez des mères proche du terme de l'accouchement.

5.6 Pharmacodynamique

La concentration minimale du RAL pour inhiber 50% de l'activité d'intégrase virale du VIH-1 est de 2 à 6 nM ce qui est 10 000 fois plus sensible que les autres médicaments sur les autres enzymes virales comme la transcriptase inverse ou les polymérases[106]. L'IC95 (la concentration qui inhibe 95% du virus) du RAL est de 33nM (14.7µg/L) dans un milieu composé à 50% de plasma humain. Deux études ont montré que l'activité anti-virale du RAL

n'était pas corrélée avec la concentration résiduelle (C_{trough}) chez les patients naïfs comme chez les patients traités multirésistants [62]. Une étude in-vitro[107] a montré que pour arriver à une suppression virale maximale, la concentration du RAL total deveait être supérieure à EC90 sur au moins 13.68h pendant une période de 24h ou la concentration libre du RAL devait être supérieure à 3 ng/mL sur toute la durée de l'intervalle. L'auteur a conclu que l'exposition exprimée en aire sous courbe (AUC) du RAL est le paramètre qui a le plus d'impact sur la réponse virale, cependant aucune cible n'a été précisée[107].

5.7 Pharmacocinétique du RAL

La pharmacocinétique (PK) est l'étude du devenir d'une substance active contenue dans un médicament après son administration dans l'organisme. Elle décrite "l'ADME" pour: Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion.

5.7.1 L'absorption du RAL

Actuellement, le RAL est disponible sous trois formes galéniques : en comprimés pelliculés (400mg et 600mg), en comprimés à croquer (100mg et 25 mg) et en suspension buvable (sachet de 100mg), tous administrés par voie orale[108]. L'absorption du RAL s'effectue au niveau de la barrière gastro-intestinale qui permet seulement le passage de la fraction non ionisée du RAL. Le RAL est rapidement absorbé avec un temps pour atteindre la concentration maximale (T_{max}) de 3heures (à jeun) pour la posologie de 400mg BID et de 1.5-2 heures pour la posologie de 1200mg OAD[108]. La biodisponibilité n'est pas encore bien étudiée à cause d'un manque de formulation parentérale[109]. Sous forme de comprimés à croquer et de suspension buvable, le RAL a une biodisponibilité plus élevée par rapport aux comprimés pelliculés (600mg ou 400mg). La biodisponibilité du comprimé pelliculé de 600 mg est relativement plus élevée que la forme de 400 mg[108]. Toutefois, la biodisponibilité du RAL est diminuée pour les patients infectés par VIH qui est 25-30% moindre que les

volontaires sains[110]. Plusieurs facteurs pourraient changer l'absorption du RAL : pH gastro-intestinal, le repas et la co-administration d'antiacides de cations bivalents métalliques.

- L'augmentation du pH gastro-intestinal peut changer l'absorption du RAL : Le PKa du RAL est de 6.8. Une charge négative est induite par une perte d'un groupe hydroxyle en position 5 sur son Cycle 6-oxo-1,6-dihydropyrimidine à PH élevé. Pour cette raison entre pH 5-8.5, la solubilité du RAL augmente avec le pH qui facilite l'absorption du RAL. Un modèle pharmacocinétique basé sur la physiologie est utilisée pour simuler l'impact du RAL (400mg BID) sur l'absorption à différents pH gastro-intestinaux. Avec l'augmentation du pH gastro-intestinal, une augmentation de la solubilité du RAL conduit à une augmentation des concentrations plasmatiques maximales ($C_{max)}$, C_{trough} et $AUC_{0\text{-}12h}$, et une diminution du T_{max}[111]. Des résultats similaires ont été obtenus dans une autre étude ex-vivo[112] et confirmés par une étude clinique in-vivo[113]. Dans cette étude in-vivo, une co-administration de 20 mg d'oméprazole OAD (un inhibiteur de la pompe à protons qui réduit les sécrétions acides de l'estomac et conduit à une augmentation du PH gastro-intestinal) augmente de 3 fois l'AUC, 4 fois le C_{max} et 1.4 fois la C_{trough} du RAL après administration de 400 mg RAL BID [113].

- La graisse alimentaire : Tableau 4 [108,114] nous montre l'effet de l'alimentation sur l'absorption du RAL. L'augmentation rapidement du PH gastro-intestinal après le repas joue probablement sur l'absorption [115]. De plus, les acides gras du bol alimentaire facilitent la dissolution du RAL dans le liquide gastro-intestinal, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de l'absorption du RAL (400mg BID) lorsque le médicament est pris pendant les repas riches en

graisse. A ce jour, aucune donnée n'est disponible pour expliquer la diminution de l'absorption du RAL avec une nourriture pauvre en graisse par rapport à jeun. Toutefois, il n'y a pas de recommandation quant à la composition de la nourriture pour la prise du RAL [108] car aucune étude n'a montré de changement d'efficacité ou du profil d'innocuité en fonction de la composition des repas [114].

- La co-administration avec des antiacides comprenant des cations bivalents métalliques va diminuer l'exposition au RAL chez les patients infectés. Dans une étude in-vitro[112], il a été montré que la perméabilité cellulaire au RAL était diminuée par l'addition de cations bivalents métalliques (cations de magnésium et de calcium), par contre, le passage n'est pas impacté par l'addition de cations monovalents métalliques (cations de potassium). Il est probable que le complexe du RAL et cation bivalent métallique ne permette pas de passer la membrane cellulaire. Ce résultat in-vitro est aussi confirmé par des études cliniques in-vivo. Une étude clinique[116] a montré que la co-administration d'antiacides avec le RAL (400mg, BID) diminuait le T_{max} et la C_{trough} du RAL chez les patients et une C_{trough} inférieure à IC_{95} était observée chez 75% des patients sous ce co-traitement. Dans une autre étude clinique, R. Krishna et al. ont étudié l'impact des antiacides comprenant des cations métalliques sur la PK du RAL avec la posologie de 1200mg OAD chez 20 patients infectés par le VIH[117]. Des diminutions de 74%, 72% et 48% des C_{max}, C_{trough} et $AUC_{0\text{-}24h}$, respectivement, ont été observée chez ces patients co-traités par le RAL (1200 mg OAD) et antiacide de calcium carbonate. Les antiacides de magnésium ou d'hydroxyde d'aluminium ont les mêmes effets sur le RAL.

Tableau 4. L'effet de la nourriture sur la PK du RAL avec différentes formulations.

Formulation	**Teneur en lipide dans la nourriture**	**AUC Ratio[1] (90% CI)**	**C_{max} Ratio (90% CI)**	**C_{min} Ratio (90% CI)**
400 mg BID	Faible[2]	0.54 (0.41-0.71)	0.48 (0.35-0.67)	0.86 (0.54-1.36)
	Modérée [3]	1.13 (0.85-1.49)	1.05 (0.75-1.46)	1.66 (1.04-2.64)
	Elevée [4]	2.11 (1.60-2.80)	1.96 (1.41-2.73)	4.13 (2.60-6.57)
1200mg OAD	Faible	0.58 (0.46-0.74)	0.48 (0.37-0.62)	0.84 (0.63-1.10)
	Elevée	1.02 (0.86-1.21)	0.72 (0.58-0.90)	0.88 (0.66-1.18)
Comprimé à croquer	Elevée	0.94 (0.78-1.21)	0.72 (0.58-0.90)	0.88 (0.66-1.18)
Suspension	Non étudié			

1. PK ratio (après le repas/à jeun)

2. faible : 300Kcal, 2.5g de graisse

3. modéré: 600Kcal, 21g de graisse

4. élevé: 825 Kcal, 52g de graisse

5.7.2 La distribution du RAL

La distribution d'un médicament est fortement dépendante de sa fraction libre qui est considérée comme la fraction active, car elle a la capacité de franchir la membrane cellulaire, et d'agir sur sa cible. L'albumine et l'alpha-1-acide glycoprotéine sont les deux protéines qui se lient le plus aux médicaments[118]. L'albumine, à laquelle se lie principalement le RAL [119] , représente 50% des protéines plasmatiques totales[120]. La fraction liée du RAL représente environ 83% de sa forme totale[108].

Le RAL a montré un relativement bon passage dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) avec un taux de passage dans le LCR du plasma en médiane de 3% (range 1%-61%)[121]. Ce résultat a été confirmé par une autre étude qui a obtenu 5.8% comme le médiane de taux de passage

avec un range de 1%-53.5%[122]. Avec une bonne pénétration dans le LCR, le RAL pourrait être utilisé pour traiter le VIH dans le système nerveux. Le RAL atteint également le tractus génital avec 162% de taux de passage obtenue par le ratio de C_{trough} dans le sperme versus C_{trough} dans le plasma[123]. Plus de RAL a été retrouvé dans les fluides cervico-vaginaux que dans le plasma, avec une médiane de taux de passage de 240% (range 140-410%). La pénétration du RAL dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) a été étudiée chez 5 patients[124]. Une médiane de taux de passage de 7% (range 5%-10%) a été obtenue. La bonne corrélation entre le profil de concentrations intracellulaires dans les PBMCs avec celui des concentrations plasmatiques signifie que RAL ne s'accumule pas dans la cellule. Dans une autre étude clinique[125], des résultats similaires ont été observés avec 5.3% (range 0.67-0.196) de taux de passage dans les PBMCs et 3.9% (range 0.7%-17.7%) de ratio d'AUC dans les PBMCs versus plasma. Ce taux de passage ne semble pas être modifié par les co-traitments (DRV/r, ETV, maraviroc ont été testés).

Le RAL est connu pour être un substrat de la P-glycoprotéine (P-gp) et de la protéine de résistance du cancer du sein (BCRP) mais n'est pas substrat des *multidrug resistant proteines* transporteurs d'efflux des médicaments[126,127] qui jouent un rôle important sur la pénétration des barrières hémato-tissulaires et sur l'accumulation des molécules dans les cellules[128]. Dans une étude in-vitro[126] sur les cellules Hcmec/D3 (lignée cellulaire souvent utilisée pour étudier la barrière hémato-encéphalique), l'ajout d'inhibiteur des transporteurs de la P-gp et de la BCRP a augmenté de façon significative la concentration intracellulaire du RAL par rapport aux mêmes conditions sans inhibiteur. Le même test a été fait pour la barrière hémato-testiculaire et barrière hémato-intestinale[126]. Des résultats similaires ont été obtenus : la concentration du RAL intracellulaire augmente avec la présence d'inhibiteur de P-gp ou/et de BCRP. Ces résultats montrent un rôle important de la P-gp et de la BCRP sur la distribution

du RAL dans les tissus et les organes. Cette étude aussi a montré que le RAL n'avait pas d'effet d'inhibition ou d'induction sur les transporteurs d'efflux des médicaments[126].

5.7.3 Le métabolisme et l'excrétion du RAL

Le métabolite du RAL, le RAL-glucuronide (M2) est principalement formé par la UDP-glucuronosyltransferases (UGT) 1A1 avec des contributions mineures de les UGT1A9 et UGT1A3[129]. Ce métabolite n'a pas d'activité antivirale. D'autre part, le RAL n'est pas métabolisé par le cytochrome P450. De plus, aucun effet d'inhibition ou d'induction des enzymes UGT ou des cytochromes P450 par le RAL n'a été observé.

Environ 31.8% du RAL sont éliminés dans l'urine, dont 9% sous forme inchangée et 23% sous forme métabolisée, et 51.2% sous la forme inchangée sont éliminés dans les fèces avec une grande partie provenant de l'hydrolyse du RAL-glucuronide dans l'intestin[129]. Cela signifie que le métabolisme est la voie principale d'élimination du RAL.

Les paramètres PKs du RAL de différentes études sur des patients naïfs ou des patients déjà sous ARV sont résumés dans le Tableau 5 qui montre une grande variabilité d'inter- et intra-sujets. Dans l'étude RASTA, une grande variabilité intra-patient (85.9%) et inter-patients (124.6%) a été observée chez les patients infectés[130]. Cette grande variabilité du RAL est observée dans toutes les étude cliniques dans différentes populations infectées par le VIH incluant femmes enceintes[131,132], patients avec une maladie hépatique[133], patients co-infectés par VIH-VCH[134], patients avec une insuffisance rénale ou hépatique[135], patients âgés (>60 ans)[136] et nouveau-nés[137]. L'origine de cette grande variabilité inter- et intra-sujet du RAL n'est pas encore clairement connue, cependant, l'absorption du RAL pourrait être à l'origine d'une partie de cette grande variabilité[111].

Tableau 5. La pharmacocinétique du RAL chez les patients.

ID	Posologie	Population	C_{max} (µM)	C_{tough} (nM)	AUC (µM*h)	T_{max} (h)	$T_{1/2}$ (h)
QDMRK[67]	800mg OAD	Patient naïf (n=22)	14(69%) Moyenne (CV%)	40(111%) Moyenne (CV%)	31(70%) Moyenne (CV%)	-	-
	400 mg BID	Patient naïf (n=20)	3 (135%) Moyenne (CV%)	257 (167%) Moyenne (CV%)	13 (99%) Moyenne (CV%)	-	-
Krishna et al.[117]	1200mg OAD	Patient traité (n=20)	20(16, 24) GM (95%CI)	75.6 (55.3, 10.3) GM (95%CI)	54 (44, 65) GM (95%CI)	-	-
Iwamoto et al.[138]	400 mg BID	VS femelle (n=6)	13 (12, 15) GM (95%CI)	51 (21, 122) GM (95%CI)	25(19,33) GM (95%CI)	1	α:0.87 ß:14
		VS male (n=6)	10 (8, 13) GM (95%CI)	120(92,157) GM (95%CI)	26(23,29) GM (95%CI)	1	α:0.91 ß:8
Real[139]	400 mg BID	Patient traité (n=38)	2 (0.4, 22) Médiane (range)	204(22, 3118) Médiane (range)	10(2,46) Médiane (range)	3(0.5, 8) Médiane (range)	-

Abréviation : GM, les moyens géométriques ; VS, volontaires sains

5.7.4 Médicaments interagissant avec le raltégravir

a. Effet du RAL sur les autre médicaments

Il a été montré dans différentes études ex-vivo que le RAL n'avait pas d' impact sur l'activité des CYP450[129], UGT[129], P-gp[126] ou BCRP[126]. L'absence d'interaction avec les CYP450 ou UGT est aussi confirmée par des études cliniques qui montraient que la co-administration du RAL n'avait pas d'impact significatif sur la PK du midazolam (substrat du CYP3A) ni sur la lamotrigine (substrat de l'UGT). D'autre part, le RAL n'a pas d'impact sur la PK pour des hormones contraceptives[140]. Contrairement aux INNTIs ou IPs qui influencent diverses enzymes ou transporteurs CYP450, UGT ou P-gp en induisant des interactions importantes avec d'autres médicaments, le RAL a des interactions très limitées. Dans plusieurs cas cliniques, les traitements basés sur le RAL étaient utilisés pour remplacer des INNTIs ou IPs qui changeaient la PK des autres traitements, comme les antinéoplastiques[141,142], les statines[143], les immunosuppresseurs[144] ou induisaient des toxicités hépatiques en association avec la rifampicine et la rifabutine [145],ou des traitements contre l'hépatite C comme le pegylated-interferon et la ribavirin[146].

b. Effet des co-traitements sur le RAL

Les interactions médicamenteuses qui changent la PK du RAL sont résumées dans le Tableau 6 [108,109]. La plus part des interactions ne nécessitent pas un ajustement de dose sauf dans le cas de la rifampicine, un fort inducteur d'UGT1A1, où la dose du RAL doit passer de 400 mg BID à 800 mg BID. La co-administration d'antiacide composé d'aluminium, ou de magnésium n'est pas recommandée avec le RAL. Pour certaines interactions qui diminuent beaucoup l'exposition du RAL mais sans changement clinique significatif avec la posologie de 400mg BID, l'augmentation de la posologie à 1200mg OAD n'est pas recommandée pour éviter le sous-dosage du RAL qui induirait le développement de résistance virale.

Tableau 6. L'interaction médicamenteuse avec le RAL chez adultes.

	Isentress (400mg BID)		Isentress HD (1200mg OAD)
	Effet sur PK	**Commentaire clinique**	**Commentaire clinique**
Antiacides avec cation métallique			
Antiacide avec aluminum et/ou magnesium	AUC:8.3% ↑ C_{max} : 53%↑ C_{trough}:65%↓[116]	Co-administration ou administration échelonnée ne sont pas recommandés	Co-administration ou administration échelonnée ne sont pas recommandé
Antiacide avec calcium	AUC:55% ↓ C_{max} : 52%↓ C_{trough}:32%↓	Sans ajustement de dose	Pas recommandé
ARVs			
Tipranavir/ritonavir	AUC:24% ↓ C_{max} : 18%↓ C_{trough}:55%↓[147]	Sans ajustement de dose	Pas recommandé
Efavirenz	AUC:36% ↓ C_{max} : 36%↓ C_{trough}:21%↓[148]	Sans ajustement de dose	Pas recommandé
Etravirine	AUC:29% ↑ C_{max} : 21%↑ C_{trough}:54%↑[149]	Sans ajustement de dose	Sans ajustement de dose
Ritonavir	AUC:16% ↓ C_{max} : 24% ↓ C_{trough}:1% ↓[149]	Sans ajustement de dose	Sans ajustement de dose
Atazanavir	AUC:54% ↑ C_{max} : 39%↑ C_{trough}:48%↑[150]	Sans ajustement de dose	Sans ajustement de dose
Atazanavir+ritonavir	AUC:41% ↑ C_{max} : 24%↑ C_{trough}:77%↑[151]	Sans ajustement de dose	Sans ajustement de dose
Fosamprenavir ou Fosamprenavir+ritonavir	AUC:51% ↓ C_{max} : 55% ↓ C_{trough}:36%↓[152]	Sans ajustement de dose	Sans ajustement de dose
Darunavir+ritonavir	AUC:29% ↓ C_{max} : 33% ↓ C_{trough}:38%↑[153]	Sans ajustement de dose	Sans ajustement de dose
LPV/r	C_{trough}:30%↓[154]	Sans ajustement de dose	Sans ajustement de dose
Maraviroc+ritonavir	AUC:36% ↓ C_{max} : 33% ↓ C_{trough}:28%↓[155]	Sans ajustement de dose	Sans ajustement de dose
Les autres médicaments			
Rifampicine	AUC:6% ↓ C_{max} : 1% ↓ C_{trough}:54%↓[156]	Remplacé par 800mg BID	Pas recommandé
Omeprazole	AUC:212% ↑ C_{max} : 315%↑ C_{trough}:46%↑[113]	Sans ajustement de dose	Sans ajustement de dose
Inducteur fort d'UGT: Carbamazepine Phenobarbital, Phenytoin	Donnée d'interaction avec RAL n'est pas encore disponible, la co-administration n'est pas recommandé.		

5.8 Pharmacocinétique du RAL dans les populations particulières hors grossesse.

5.8.1 Pharmacocinétique du RAL chez les patients avec une maladie hépatique ou rénale.

Le RAL est majoritairement métabolisé par l'UGT1A1 dans le foie, et ensuite 32% est éliminé par les reins dans les urines. Une pathologie hépatique ou rénale peut changer la PK du RAL chez les patients. Plusieurs études s'y sont intéressées chez les patients avec une maladie hépatique ou rénale (Tableau 7).

Les expositions au RAL chez les patient co-infectés VIH/ hépatite C avec ou sans cirrhose à une stade avancé sous le traitement de 400mg BID du RAL pendant 5 jours ont été comparées par H-Novoa et al.[157]. Aucune différence significative de C_{max} chez les patients avec ou sans cirrhose n'a été observée, avec un GMR de 1.15. Mais l'AUC_{0-12} et la C_{trough} des patients avec une cirrhose étaient beaucoup plus élevées par rapport au groupe sans cirrhose à cause d'une diminution du métabolisme du RAL et une accumulation du RAL chez les patients avec une cirrhose. Peut-être dû à la durée de traitement court, aucun effet indésirable n'a été déclaré. Bien que, dans cette étude, le nombre de patients et la durée de traitement étaient limités, le résultat confirme l'efficacité du RAL pour traiter les patients avec une cirrhose à un stade avancé avec une bonne tolérance pendant une durée de traitement court. Dans une autre étude clinique, aucun différence n'a été observée pour la C_{trough} du RAL chez les patients infectés par le VIH avec ou sans hépatite C chronique sans cirrhose avec une posologie de 400mg BID du RAL[134].

Dans l'étude ANRS 148, la PK du RAL a été évalué chez les patients avec une maladie hépatique terminale et chez les patients à 1 mois après une transplantation du foie[133]. Bien qu'une exposition au RAL chez les patients avec une maladie hépatique terminale était plus élevée que les patients avec une fonction hépatique normale, le RAL était bien toléré par les

patients avec aucun effet indésirable déclaré. Pour les patients après une transplantation de foie, la concentration du RAL-glucuronide est comparable avec les patients normaux, ce qui signifie une récupération de la fonction hépatique chez les patients avec la transplantation. Par ailleurs, dans cette étude, le RAL n'interagissait pas avec les immunosuppresseurs comme la cyclosporine et l'acide mycophénolique qui sont surtout métabolisés par le cytochrome P450 3A4. Contrairement aux IPs considérés comme inhibiteurs du cytochrome P450 3A4 et INNTI considérés comme inducteurs, le RAL n'est pas le substrat du cytochrome P450 3A4 et n'a pas d'impact sur son activité [129].

Une autre étude clinique a comparé l'exposition au RAL chez les patients avec une insuffisance hépatique modérée ou rénale grave avec les volontaires sains[135]. L'AUC, la C_{max} et la C_{trough} de ces patients particuliers ne différaient pas de celles des volontaires sains. La clairance rénale du RAL chez les patients avec une insuffisance rénale était beaucoup plus petite que celle des volontaires sains (2.7 versus 31.5). Cependant, la GMR de l'AUC (0.85) et de la C_{max} (0.68) ne reflète pas une variation aussi importante que la clairance. Les auteurs ont considéré que ces variations n'avaient pas d'impact clinique. C'est peut-être parce que seulement 30% du RAL est éliminé par la voie rénale avec 9% sous forme RAL et 21% sous forme RAL-glucuronide. Ainsi, la variation de l'élimination globale du RAL est peu impactée par la fonction rénale.

Tous ces travaux ont montré qu'un traitement basé sur le RAL est efficace, bien toléré et a beaucoup moins d'interactions médicamenteuses chez les patients avec un problème hépatique ou rénale. Par rapport au régime basé sur IP/r ou l'EFV qui ont montré une induction de la fibrose du foie ou toxicité hépatique chez les patients infectées par le virus de l'hépatite B ou C, le régime basé sur RAL est mieux adapté à ces patients. De plus, comme le RAL est principalement métabolisé par l'UGT1A1, il n'a pas d'effet sur l'activité de la

famille des cytochromes P450. L'utilisation du RAL chez les patients devant recevoir des médicaments métabolisés par les cytochromes P450 comme les immunosuppresseurs pourrait éviter l'interaction entre ces co-traitements. Bien que le RAL soit métabolisé par le foie et éliminé à environ 33% par les reins, les changements PKs induits par la maladie hépatique et/ou rénale ne sont pas cliniquement significatifs. L'insuffisance rénale diminue la clairance rénale du RAL, cependant, comme le RAL est majoritairement éliminé par le foie et seulement une petite partie par la voie rénale[135], l'impact de la fonction rénale sur la clairance du RAL est limité. Pour la fonction hépatique, bien que le RAL soit métabolisé majoritairement par l'UGT1A1, la pathologie hépatique semble avoir peu d'impact sur la PK du RAL [158,159]. Le mécanisme n'est pas encore clairement connu, et est peut-être lié à la présent d'UGT1A1 dans d'autres organes que le foie ou la libération ou activation d'une enzyme latente par une pathologie hépatique[135,159]. Avec une efficacité équivalente aux autres traitements ARV, l'utilisation du RAL offre une option de traitement bien toléré, dans le cas de transplantation, pathologies hépatiques et rénales à la place des IPs et INTI qui induisent des problèmes d'interactions médicamenteuse, ou de toxicité hépatique ou de fibrose hépatique.

Tableau 7. Pharmacocinétique du RAL chez les patients particuliers avec une pathologie hépatique ou rénale

Etude	Caractéristique patients /contrôle	Nombre patients /control	Dose	AUC GMR (90%CI)	C_{max} GMR (90%CI)	C_{trough} GMR (90%CI)	Conclusion
H-Novoa et al.	Infecté par VIH et hépatite C avec cirrhose / infecté par VIH et hépatite C sans cirrhose	5/5	400mg BID	1.72 (1.02-2.92)	1.15 (0.55-2.43)	6.58 (2.92-14.9)	Accumulation du RAL, bien toléré, pas besoin d'ajuster la dose
Calza et al.[134]	Infecté par VIH et hépatite C chronique sans cirrhose /infecté par VIH	13/16	400mg BID	-	-	1.125 Ratio de médiane	Pas d'impact
Barau et al.[133]	Pathologie hépatique terminale	10	400mg BID	75.2µM*h (12-148) Médiane (intervalle)	19.7µM (2-36) Médiane (intervalle)	0.95µM (0.08-1.9) Médiane (intervalle)	Absente d'interaction avec co-traitement et bien toléré par les patients
	Transplantation du foie	4		72.8 µM*h (37-118) Médiane (intervalle)	15.6 µM (12-33) Médiane (intervalle)	1.0 µM (0.38-4.3) Médiane (intervalle)	
Iwamoto et al.[135]	Avec insuffisant hépatique modérée /VS	8/8	400mg BID	0.86 (0.41, 1.77)	0.63 (0.23, 1.70)	1.26 (0.65, 2.43)	Peu d'impact sur PK du RAL
	Avec insuffisant rénal grave /VS	10/10		0.85 (0.49, 1.49)	0.68 (0.35, 1.42)	1.28 (0.79, 2.06)	Clairance plus faible avec peu d'impact sur PK du RAL

Abréviation : VS, volontaires sains; GM, moyenne géométrique

5.8.2 Pharmacocinétique du RAL chez les patients âgés et les enfants.

L'âge est connu pour impacter la PK des médicaments chez les patients plus âgés (>60ans) et les enfants (<18 ans)[160,161]. L.Calza et al. ont exploré le changement de l'exposition au RAL (400mg BID) ou au DRV/r (800/100mg OAD) co-administrés avec du TDF/FTC (300/200mg OAD) chez les patients âgés (>60 ans) par rapport à des patients de 20 ans plus jeunes dans une étude clinique (Tableau 8)[136]. Les efficacités de ces deux traitements étaient comparables avec 97.6% des patients dans le groupe RAL et 97.8% des patients dans groupe DRV/r avec une CV indétectable (<20 copies/mL). Les deux régimes de traitement étaient bien tolérés. Les C_{trough} du DRV et du RTV chez les personnes âgées étaient significativement plus élevées

que chez les personnes plus jeunes. En revanche la C_{trough} du RAL n'était pas significativement différente. En conclusion, l'auteur propose de faire un ajustement de dose pour le DRV/r, ce qui n'est pas nécessaire pour le RAL chez les patients supérieurs à 60 ans. Dans une autre étude clinique, un résultat similaire a été observé pour l'administration du RAL chez les personnes de plus de 60 ans. L'exposition au RAL chez les personnes de plus de 60 ans était comparable à celle des personnes plus jeunes[162].

L'étude IMPAACT P1066 (Tableau 8), un essai clinique multicentrique, non-randomisé ouvert de phase I/II sur 48 semaines a évalué la PK du RAL avec différentes posologies et différentes formulations : comprimés de 400 mg pour les enfants de 6 à 18 ans (400mg BID), comprimés à croquer administrés aux enfants de 6 à 12ans et de 2 à 6 ans (6mg/kg BID), suspension buvable administrée aux enfants de 6 mois à 2 ans et de 4 semaines à 6 mois (6mg/kg BID)[163,164]. Bien que l'exposition soit un peu plus élevée pour les enfants qui ont reçu le RAL sous forme de suspension ou de comprimés à croquer par rapport aux comprimés à avaler, elles sont quand même comparables entre elles et aux données des adultes[108,163,164]. Le profil d'efficacité et d'innocuité du RAL dans cette étude étaient analysés à semaine 240 par Nachman et al.[165]. Le RAL sous forme de comprimés à croquer et de suspension buvable semblait plus efficace avec 77.4% et 86.7% d'enfant ayant une CV inférieure à 400 copies/mL à semaine 240 par rapport aux patients qui ont reçu les comprimés à avaler de 400mg avec 44.2%. L'efficacité et la tolérance étaient comparables chez les enfants et les adultes.

Une étude clinique IMPAACT P1110 a exploré les expositions au RAL chez les nouveau-nés à 48 heures traités avec 1.5 mg/kg OAD du RAL en suspension buvable et chez les nouveau-nés de 15-18 jours traités avec 3mg/kg BID du RAL en suspension buvable (Tableau 8)[166]. A noter que le RAL est métabolisé majoritairement par l'UGT1A1 qui a une activité diminuée à

la naissance, qui augmente exponentiellement à partir de la 1e semaine et mature en 1 mois après la naissance[167]. Ainsi, l'exposition du RAL se trouve plus élevée chez les nouveau-nés à 48h par rapport à l'adulte ou les enfants plus âgés. Cependant, le RAL était bien toléré par les nouveau-nés. La moyenne géométrique de l'AUC du RAL du groupe de 15-18 jours n'était pas différent de l'exposition des enfants plus âgés. Ainsi, la dose recommandée pour le RAL est de 1.5 mg/kg OAD pour un bébé de 48H-7 jours, et de 3mg/kg BID pour un bébé de 8-28 jours et de 6mg/kg BID pour un bébé après 28 jours[137].

Tableau 8. Pharmacocinétique du RAL chez les patients âgé ou chez les enfants moins de 18 ans

Etude	Caractéristique patients /contrôle	Nombre patients /control	Dose	AUC GMR (90%CI)	C_{max} GMR (90%CI)	C_{trough} GMR (90%CI)	Conclusion
Calza et al.[136]	>60 ans/<40 ans	19/23	400mg BID	-	-	1.12	Pas de différence significative pour C_{trough}
Vera et al.[162]	66±3.4 ans	19	400mg BID	14 µM*h (75) GM (CV%)	3.9 µM*h (81) GM (CV%)	0.17 µM*h (101) GM (CV%)	Bien toléré et pas de différence significatif en fonction d'âge
Nachman et al[164].	4 semaine-6 mois	12	6mg/kg BID suspension	22.3 µM*h (40) GM (CV%)	8.6µM (38.7) GM (CV%)	0.117µM (68) GM (CV%)	Le PK sont comparables pour les enfants avec différents intervalle d'âge et formule du RAL avec une bonne profile de l'efficacité et la tolérance.
	6 mois-2 ans	15		19.8 µM*h (34) GM (CV%)	10.6µM (64.8) GM (CV%)	0.108µM (52) GM (CV%)	
Nachman et al[163].	2-6 ans	12	6mg/kg BID comprimés à croquer	18µM*h (58.6) GM (CV%)	9.8µM (56.5) GM (CV%)	0.07µM (55.5) GM (CV%)	
	6-12 ans	10		22.5µM*h (33.6) GM (CV%)	10.5µM (53.3) GM (CV%)	0.13µM (87.6) GM (CV%)	
		11	400mg BID comprimé	15.7µM*h (120.4) GM (CV%)	4.8µM (129.9) GM (CV%)	0.25µM (220.5) GM (CV%)	
	12-18ans	11	400mg BID comprimé	15.7µM*h (97.6) GM (CV%)	4.0 µM (95.1) GM (CV%)	0.33µM (78.3) GM (CV%)	
Clark et al.[166]	0-48h	25	1.5mg/kg OAD	85.9µM*h (38.4) GM (CV%)	5.3 µM (35) GM (CV%)	2.13µM (64.2) GM (CV%)	L'exposition du RAL plus élevé pour nouveau-né avec UGT1A1 immature, cependant bien toléré.
	15-18 jours	24	3.0mg/kg BID	32.1µM*h (43.3) GM (CV%)	6.4 µM (41.9) GM (CV%)	0.4µM (93.8) GM (CV%)	

Abréviation : VS, volontaires sains; GM, moyenne géométrique.

5.9 Impact physiologique sur la pharmacocinétique du RAL au cours de la grossesse

Trois facteurs liés aux changements physiologiques pendant grossesse peuvent provoquer un impact sur l'absorption du RAL. Premièrement, le RAL est connu comme étant un substrat de la P-gp[127] qui est surexprimée pendant la grossesse. Dans ce cas-là, la P-gp au niveau des intestins va diminuer l'absorption du RAL par son activité d'efflux augmentée pendant la grossesse. De plus, la diminution de la motilité de l'intestin associée à l'augmentation de la progestérone pendant la grossesse va prolonger de 30 à 50% le temps de la vidange gastrique qui altère la biodisponibilité du RAL et entraîne une diminution du C_{max} et une augmentation du T_{max} [168]. D'un autre côté, l'augmentation du pH gastrique liée à une diminution de 40% de la sécrétion d'acide gastrique[169] augmenterait l'absorption du RAL[111]. L'absorption du RAL pourrait aussi être diminuée par les nausées et vomissements[170]. Pour la distribution, le premier impact de la grossesse est le volume de distribution (V_d) suite à une expansion de 40-50% du volume plasmatique[171]. En moyenne, on a une augmentation de 8L d'eau, pendant la grossesse, dans le corps avec 60% pour le placenta, fœtus et liquide amniotique, et 40% pour les tissus maternels. Cette augmentation de volume entraîne, surtout, une diminution de la C_{max} pendant la grossesse. De plus, cette augmentation de liquide diminue de 20-30% la concentration de l'albumine plasmatique ce qui entraîne possiblement une augmentation de la fraction libre du RAL. La rilpivirine est un autre ARV qui est fortement liée (99.7%) aux protéines, majoritairement à l'albumine, comme le RAL. Une étude clinique[172] a montré que la fraction libre de la rilpivirine augmentait de 20% pendant le troisième trimestre (T3) rapport au postpartum. Ce pourcentage d'augmentation est cohérent avec le pourcentage de diminution de l'albumine plasmatique. Dans un modèle animal, une augmentation de 10% de la fraction libre a été observée chez les rates gestantes[173]. A ce jour, aucune donnée concernant la fraction libre du RAL chez la femme enceinte n'est disponible, alors qu'elle est

la fraction active du médicament. L'élimination du RAL est influencée par deux facteurs importants : le métabolisme et l'élimination rénale. Le RAL est majoritairement métabolisé par l'UGT1A1 qui est surexprimé en raison de l'augmentation de la progestérone[174] et du cortisol[175] pendant la grossesse. Une augmentation de la vitesse de la filtration glomérulaire et une augmentation de 25-50% du débit sanguin rénal pourraient entrainer une augmentation de l'élimination rénale du RAL puisque 33% du RAL sont éliminés dans les urines[169].

6 Etude ANRS 160 RalFE

Au vu de ces données, il nous paraît important d'étudier les propriétés PKs du RAL sur un effectif important et dans le cadre de multithérapies n'incluant pas d'autres médicaments (antirétroviraux ou pas) pouvant interagir avec le RAL.

L'étude ANRS 160 RalFE (NCT02099474) est une étude de PK, multicentrique françaises ouverte randomisée s'adressant à des femmes enceintes recevant une triple association antirétrovirale contenant du RAL, prescrite pour une raison médicale par le clinicien qui les suit sur le plan du VIH. La PK du RAL chez ces femmes infectées par le VIH-1 pendant la période de T3 est comparée avec la période de post-partum (entre S4 et S6 après l'accouchement).

7 Objectif de la thèse

Actuellement, en France, ce sont les trithérapies à base d'inhibiteurs de la protéase « boostés » par le ritonavir qui sont recommandées pour les femmes enceintes infectées par le VIH pour la prévention de la transmission mère-enfant. Cependant, ces traitements pourraient augmenter le risque de prématurité. Pour mieux protéger la mère et le bébé, trouver un autre

traitement ARV plus efficace et mieux toléré par les femmes enceintes devient crucial.

Le RAL est le premier INI approuvé par FDA qui permet de diminuer efficacement et rapidement la CV avec une très bonne tolérance par les patients. En France, dans le traitement des femmes enceintes, il n'est recommandé que dans les cas où une diminution rapide de la CV est nécessaire. La PK du RAL chez la femme enceinte est peu étudiée, on compte seulement deux études cliniques chez 60 femmes enceintes en tout. Plus de données cliniques sur l'utilisation du RAL chez la femme enceinte sont nécessaires pour confirmer son efficacité et son innocuité dans cette population particulière. De plus, le RAL libre est la seule forme qui est considérée comme la forme active avec la capacité de diffuser dans les tissus et d'atteindre la cible. Les changements physiologiques au cours de la grossesse, notamment la diminution de concentrations des protéines plasmatiques, nécessitent l'étude des concentrations libres, et pas seulement de la concentration totale.

Par ailleurs, pour étudier la PK du RAL, des méthodes analytiques fiables sont cruciales pour recueillir les données. A ce jour, bien que plusieurs méthodes pour doser la concentration totale du RAL soient disponibles, une seule méthode pour doser le RAL-glucuronide est complètement validée et publiée. Et aucune méthode analytique avec des données complètes de validation pour doser le RAL libre n'est publiée.

Pour atteindre ces objectifs, les travaux se divisent en trois étapes:

1. Développer et valider une méthode analytique fiable pour quantifier la concentration de la forme libre du RAL. (Article 1)

2. Développer et valider une méthode analytique fiable pour quantifier la concentration de la forme totale du RAL et RAL-glucuronide (le métabolite du RAL) (Article 2)

3. Etudier l'impact de la grossesse sur la pharmacocinétique du RAL chez les femmes enceintes par une approche de pharmacocinétique de population et évaluer la tolérance et efficacité du RAL chez les femmes enceintes. (Article 3)

Méthodologie

1 L'étude ANRS 160 RalFE

Il s'agit d'une étude qui a été réalisée sur 12 hôpitaux de l'Île de France. Il était prévu d'inclure 43 femmes et leurs bébés sur un temps de recrutement de 18 mois. Le but était d'évaluer la PK du RAL libre, total et RAL-glucuronide chez la femme enceinte et d'évaluer le passage du médicament chez l'enfant.

1.1 Critères d'inclusion et non inclusion

Les critères d'inclusion des femmes enceintes dans cette étude étaient :

- Femme enceinte, entre 30 et 37 SA
- Agée de 18 ans et plus
- Infectée par le VIH-1
- Recevant une combinaison thérapeutique stable depuis au moins 15 jours avant l'inclusion, et comportant du RAL administré à la posologie standard (i.e., 400mg BID). Le médecin devait prévoir de maintenir *a priori* ce traitement jusqu'à la fin de la grossesse et au moins un mois après l'accouchement
- Consentement libre et éclairé, signé par la mère et l'investigateur (au plus tard le jour de la pré-inclusion et avant tout examen réalisé dans le cadre de la recherche)
- Personne affiliée ou bénéficiaire d'un régime de sécurité sociale
- Participante acceptant d'être inscrite dans le fichier national des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales.

Les critères de non-inclusion des femmes enceintes dans cette étude étaient:

- Infectée par le VIH-2
- Agée de moins de 18 ans
- Recevant une association thérapeutique antirétrovirale comportant de l'atazanavir (Reyataz®), fosamprenavir (Telzir®), ou de l'EFV (contenu dans Sustiva® et Atripla®)
- Utilisant actuellement des médicaments, des drogues ou de l'alcool pouvant interférer avec la recherche : rifampicine, phénobarbital, phénytoïne, topiques gastro-intestinaux, antiacides et adsorbants
- Présentant une situation clinique ou une pathologie aigue incompatible avec la réalisation d'une étude de PK
- Absence prévue qui pourrait entraver la participation à la recherche (voyage à l'étranger, déménagement, mutation imminente …)
- Participant à une autre recherche, en dehors de l'enquête périnatale française (ANRS CO1 EPF ou ANRS CO11 observatoire), comprenant une période d'exclusion toujours en cours à la pré-inclusion
- Personne sous tutelle ou curatelle, ou privée de liberté par une décision judiciaire ou administrative

Ces critères d'inclusion et de non-inclusion ont été choisis de façon à éviter les co-traitements pouvant agir sur la PK de RAL. Finalement, cette étude a inclus 43 femmes infectées par le VIH-1 et exposées au RAL pendant la grossesse.

1.2 Collection de sang

Les prélèvements de sang total ont été réalisés sur trois périodes différentes pour chaque femme : période 1 pendant le T3 (30-37 SA), période 2 au moment de l'accouchement, période 3 enpostpartum entre 4-6 semaines après l'accouchement. Pendant les périodes 1 et 3, cinq prélèvements de sang total ont été collectés avant l'administration du RAL : juste avant la prise du médicament (pré-dose, H0), puis 0.5 h (H0.5), 3h (H3), 8h (H8) et 12h (H12) après l'administration (Figure 8). Pendant la période 2, un seul prélèvement de sang a été réalisé à l'accouchement. La figure 8 représente le schéma des prélèvements de sang pendant les trois périodes. Les échantillons de plasma ont été obtenus par centrifugation des prélèvements de sang total à 1500 g pendant 10 minutes à température ambiante puis stockés dans un tube EDTA. Dans un délai maximum de 6h après le prélèvement, les plasmas obtenus ont été congelés à -80°C jusqu'au moment de l'analyse. Un tube de sang total par femme a également été collecté puis stocké directement à -80°C pour l'analyse génétique.

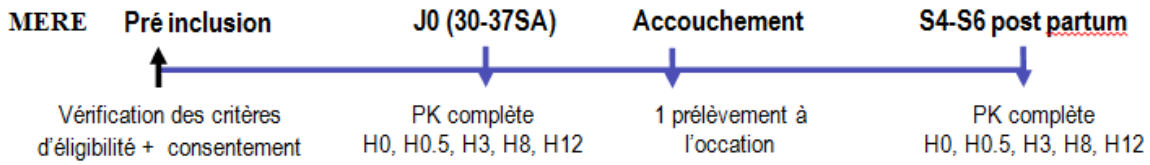


Figure 8. Schéma des prélèvements sanguin réalisé chez les femmes enceintes dans l'étude ANRS 160 RalFE

2 Méthode analytique

2.1 Séparation de la forme libre du médicament

Plusieurs méthodes sont disponibles pour séparer la forme libre de la forme totale: dialyse à l'équilibre (DE), ultrafiltration (UF), ultracentrifugation, microextraction en phase solide, microdialysis etc.[176] La méthode de DE et d'UF sont les deux méthodes les plus utilisées pour isoler la forme libre d'un médicament [176].

2.1.1 Dialyse à l'équilibre

La méthode de DE est considérée comme un "*gold standard*" pour obtenir la fraction libre d'un médicament. Une membrane semi-perméable est utilisée pour séparer deux compartiments. Elle permet aux petites molécules seulement de diffuser librement d'un compartiment à l'autre et empêche la diffusion des grosses molécules comme les protéines. Le seuil de perméabilité de la membrane peut être choisi en fonction de la taille du médicament et de la protéine impliquée, 30KDa est souvent choisi comme seuil. Le plasma est introduit dans un des deux compartiments, et une solution tampon sans protéine qui ressemble au plasma (Sörensen phosphate buffer 67mM pH 7.4 souvent utilisé) est introduite dans l'autre compartiment. Le système doit être incubé à 37°C (température physique) et agité par retournement. La forme libre du médicament présente dans le plasma peut passer la membrane et diffuser dans l'autre compartiment contenant le tampon jusqu'à l'état d'équilibre, c'est-à-dire lorsque la concentration de la forme libre est la même dans les deux compartiments. Selon les molécules, ce procédé peut prendre entre 4 et 24 h pour atteindre l'état d'équilibre. Les concentrations libres et totales du médicament sont ensuite obtenues par quantification de la concentration du médicament dans le tampon et dans le plasma, respectivement[176–178]. Bien que cette méthode soit considérée comme une méthode de référence pour isoler le médicament libre, elle a plusieurs inconvénients qui limitent son utilisation dans les laboratoires [176,178,179]: i) le principal inconvénient est le temps d'équilibre trop long (4-24h); ii) la concentration libre du médicament peut être différente à cause d'un déséquilibre des ions des deux côtés de la membrane selon l'effet Gibbs-Donnan; iii) un changement de volume d'échantillon (un passage de l'eau du compartiment tampon au compartiment plasmatique) causé par un effet osmotique peut avoir un effet de dilution sur la concentration de médicament dans le plasma; iv) La stabilité du médicament à 37°C doit être

testée sur toute la durée de la dialyse. L'avantage de cette méthode est l'absence de l'effet *non-specific binding* (NSB). Bien que l'efficacité de cette méthode soit renforcée par l'utilisation de plaques 96 puits, le temps (4-24h) nécessaire pour atteindre l'état d'équilibre limite son utilisation. Le principe de la DE est représenté dans la figure 9.

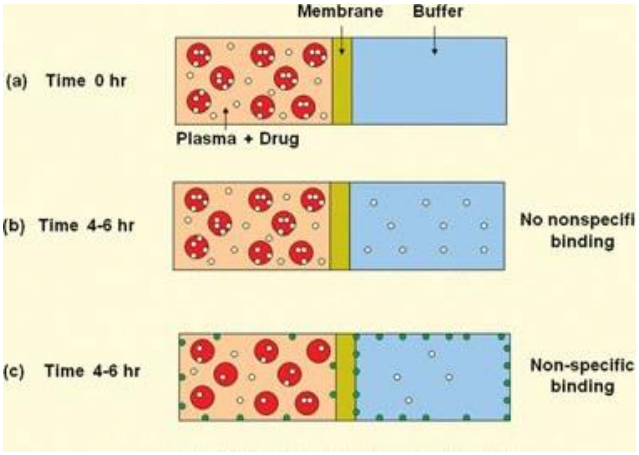


Figure 9. Schéma explicatif de la DE[178]*. a) DE à T0 avant la diffusion ; b) DE à l'état d'équilibre avec la molécule sans NSB, c) DE à l'état d'équilibre avec la molécule impactée par NSB. Les gros points rouges représentent les protéines plasmatiques. Les petits points jaunes représentent le médicament et les points verts représentent les molécules adsorbées sur la membrane et les parois du compartiment de dialyse.*

2.1.2 Ultrafiltration

L'UF est la deuxième méthode la plus utilisée pour isoler la fraction libre d'un médicament. Deux formats existent pour la méthode UF: le tube d'UF Centrifree® et la plaque de 96-puits (MultiScreen® et Ultracel-PPB)[176]. Un tube d'UF est présenté dans la Figure 10. Le plasma avec les médicaments est déposé dans le réservoir d'échantillon (*sample reservoir* dans la figure 10). Grâce à la force de centrifugation, seules les petites molécules peuvent franchir la membrane semi-perméable (le seuil de perméabilité normalement utilisé est de 30KDa ou de 10KDa). Le médicament libre et l'eau plasmatique provenant de l'échantillon plasmatique sont récupérés dans le compartiment de recueil (*filtrate cup* dans la figure 10).

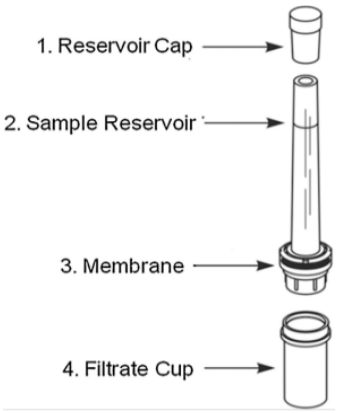


Figure 10. Schéma d'un tube d'UF

Plusieurs facteurs peuvent influencer le résultat obtenu par cette méthode :

- Le NSB qui existe pour certaines molécules pourrait diminuer la concentration du médicament libre obtenue. Ce phénomène peut être évité en prétraitant la membrane avec 5% de TWEEN 80 (pour les médicaments hydrophobes et acides) ou 5% de chlorure de benzalkonium (pour les médicaments basiques) ou en trempant le tube d'UF dans le siméthicone présaturé. Un rinçage à l'eau pure est obligatoire après la procédure de prétraitement[180].
- La fuite des protéines à travers la membrane (cas rare) pourrait augmenter la concentration du médicament libre, surtout pour les molécules qui sont fortement liées aux protéines.
- Les conditions de centrifugation peuvent modifier le passage du médicament libre à travers la membrane (ex. : température, vitesse et durée). Dans certaines études, un déséquilibre de la liaison protéique avec plus de 10% d'ultrafiltrat obtenu a été montré d'augmenter la concentration protéique dans le réservoir d'échantillon[181,182]. Cependant, McMillin et al.[183] et Nilsson et al.[179] ont observé une fraction libre stable sans changement avec un plus grand volume d'ultrafiltrat obtenu. En tout cas, l'impact induit par les différentes conditions de centrifugation reste à être étudié.

La comparaison entre les deux techniques est résumée dans le tableau 9.Par rapport à l'ED, l'UF est une technique rapide et simple à exécuter, et ainsi, beaucoup plus adaptée à l'analyse de routine dans les laboratoires.

Tableau 9. Comparaison de la méthode de dialyse d'équilibre et l'ultrafiltration.

	Méthode	
	Ultrafiltration	**Dialyse d'équilibre**
Seuil de perméabilité de la membrane	>10 KDa	
Volume de plasma minimum	50µL pour plaque de 96-puits 150µL pour le tube Centrifree®	50 µL pour plaque
Temps	10-30 minutes	4-24 heures
Effet Gibbs-Donnan	-	Déséquilibre des ions des deux côté de la membrane
Changement de volume	-	Le changement de volume doit être pris en compte pour calculer la f_u et l'ajout du dextran permet de limiter le passage de l'eau
Stabilité de molécule à 37°C	-	A tester pendant la durée nécessaire pour atteindre l'état d'équilibre
Non-spécifique-binding	A évaluer dans les conditions de manipulation	Existe mais n'influence pas le résultat de f_u
La fuite protéique	Rare même à une grande vitesse de centrifugation	-
Avantage	Méthode rapide, simple	Méthode de référence Pas d'impact par NSB
Inconvénient	Effet NSB	Chronophage ; Tenir compte de la modification de volume ; Stabilité du médicament à 37°C à vérifier

2.2 La préparation des échantillons

La préparation des échantillons est une étape préliminaire pour récupérer les médicaments

d'intérêt sous forme totale et enlever le maximum de substrats endogènes (par ex: les protéines, hormones, lipides etc...) et exogènes (par ex: les co-traitements) dans la matrice biologique qui pourraient interférer avec la quantification. Comme cette préparation va casser toutes les liaisons protéiques, elle est surtout utilisée pour extraire les médicaments sous forme totale. Les trois techniques les plus utilisées sont les suivantes: extraction par précipitation des protéines (EPP), extraction liquide-liquide (ELL) et extraction en phase solide (SPE). Le choix de la technique est important parce qu'il influence la sensibilité, la spécificité, la sélectivité, la reproductibilité de la méthode de la quantification[184]. La méthode est choisie selon les propriétés chimiques des molécules à doser comme l'hydrophobicité (logP) et l'ionisation (pKa). Le coût, l'impact sur environnement, la facilité d'utilisation, la durée de l'extraction sont aussi des facteurs à considérer avant de choisir la méthode la plus adaptée. La méthode choisie dépendra aussi de la matrice qui peut être le plasma (> 80% d'études), mais aussi le cheveu, la salive, les PBMC etc, ce qui nécessite plus de développement[185].

L'EPP est une méthode simple et rapide qui est beaucoup utilisée dans l'analyse des médicaments dans les liquides biologiques, surtout dans le plasma qui est une matrice complexe et riche en protéines. Le principe de cette technique est d'utiliser des réactifs comme les solvants organiques, les acides, les sels d'ions métalliques pour dénaturer les protéines plasmatiques, les précipiter et libérer les médicaments. Les réactifs les plus utilisées sont l'ACN, le MeOH, l'acide trichloracétique, le sulfate de zinc. Néanmoins, comme l'utilisation d'acide ou de sel pourrait induire des conditions inadaptées à la suite de l'analyse, une étape de rinçage pour éliminer ces facteurs est toujours nécessaire. La sélectivité limitée est un inconvénient majeur de cette méthode. Avec le solvant de précipitation, le surnageant contient toujours de grandes quantités de sels et de phospholipides qui sont responsables de

contaminations et de l'effet matrice dans l'analyse[186]. Par rapport à l'ELL et la SPE, l'extrait contient plus de résidus protéiques ce qui réduit la vie de la colonne de séparation[186]. Cependant, le manque de sélectivité pourra aussi être considéré comme un avantage de cette méthode par rapport aux deux autres. En effet, une méthode peu sélective permet d'extraire plusieurs médicaments avec des propriétés physico-chimiques très différentes. L'EPP est ainsi beaucoup utilisée dans les méthodes qui dosent simultanément des médicaments très polaires et apolaires avec un bon rendement pour les deux types de molécules. Souvent un bon rendement pourra être obtenu avec cette méthode. De plus, cette méthode a besoin de moins de développement et est très reproductible par rapport aux méthodes d'ELL et de SPE.

L'ELL permet d'extraire les médicaments hydrophobes de phases aqueuses comme le plasma avec une phase non miscible avec l'eau comme le dichlorométhane, l'éthyle acétate, l'acétone, le méthyl tert-butyl éther etc...[187]. Les médicaments hydrophobes et non-ionisés sont récupérés dans la phase organique. Grâce à la faible constante diélectrique de ces phases organiques, peu de sels restent dans l'extrait[186]. La plupart des phospholipides est éliminée par cette méthode. Une optimisation des rendements et de la sélectivité est possible en combinant différentes phases organiques. Un pH optimal pour transformer les médicaments d'intérêt sous forme de molécules neutres non ionisées est recommandé pour améliorer le rendement[187]. Cependant, la formation d'émulsion à l'interface des deux phases peut empêcher de récupérer le volume total de la phase organique et piéger certaines molécules, ce qui diminue beaucoup les rendements des molécules d'intérêt[187]. De plus, comme la solubilité des différentes molécules est toujours différente, pour extraire plusieurs molécules dans une seule technique, il est difficile d'avoir un bon rendement pour toutes les molécules. Pour avoir un rendement optimal, un volume important de phase organique ou plusieurs cycles d'extractions sont nécessaires, mais cela augmente le coût de technique et les frais de

recyclages. De plus, il rallonge le temps de technique et rend également cette étape de prétraitement plus complexe. Par ailleurs, ces phases organiques sont toutes toxiques et surtout très volatiles, la manipulation sous hotte est fortement recommandée en accord avec les règles de gestion des risques chimiques[186]. Une étape d'évaporation et de reconstitution est toujours recommandée après avoir récupéré la phase organique , cela permet d'augmenter la sensibilité de l'analyse[186], mais cela peut aussi induire un problème d'instabilité des médicaments pendant l'étape d'évaporation et rallonger le temps d'exécution.

La SPE est une méthode assez récente par rapport aux deux autres méthodes, mise au point dans les années 1970[186] pour répondre aux inconvénients associés à l'utilisation de l'ELL. Cette technique est basée sur un partage des médicaments d'intérêt entre la matrice, l'absorbant de la phase stationnaire (tube SPE ou cartouche SPE) et la solution de l'élution. En général, une procédure de SPE se décompose en quatre étapes : l'étape de conditionnement, de surcharge, de rinçage et d'élution. L'étape de conditionnement permet d'activer les sites de rétention de l'absorbant de la phase stationnaire avec la phase organique ou la solution tampon. L'étape de surcharge de l'échantillon consiste à déposer l'échantillon plasmatique dans un cartouche SPE. Certains substrats dont l'analyte d'intérêt sont retenus par l'absorbant du tube SPE, les autres substrats sont élués par une pression positive ou négative. Une étape de rinçage permet d'éliminer les substrats non voulus à l'aide de la pression positive ou négative. Finalement, dans l'étape d'élution, les analytes, retenus par absorbance du tube SPE, sont élués et récupérés par une solution d'élution. La SPE est réalisé soit sur des cartouches individuelles, soit sur des plaques de 96 puits. Une vaste gamme de matériaux (avec comme absorbant de la silice greffée C18, C8, CN, Phényle, NH_2 etc…) avec différents mécanismes de rétention (phase normale, phase inverse et phase d'échange d'ions) sont disponibles sur le marché. Le choix de la colonne et du mécanisme se fait en fonction de

la nature de l'analyte d'intérêt et permet d'améliorer la sensibilité et réduire les interférences (phospholipide, sel) par rapport aux deux autres méthodes d'extraction[186]. De plus, l'optimisation permet d'avoir un rendement élevé. Les inconvénients de cette méthode sont limités, mais non négligeables : coût élevé, difficulté pour extraire des molécules avec des propriétés physico-chimiques très différentes dans la même méthode, surtout pour les molécules polaires, et développement de la méthode plus lourd par rapport aux deux autres méthodes. A ce jour, la méthode SPE est considérée comme une méthode qui a le plus de potentiel. Pour répondre au différentes demandes, beaucoup de nouvelles méthodes plus sélectives, plus puissantes dérivées de la méthode SPE comme l'extraction liquide en phase solide, la microextraction en phase solide, l'extraction par absorption sur barreau magnétique etc… sont développées et appliquées dans différents cas de bioanalyse[188–190].

Archibald et al. ont revu toutes les méthodes analytiques validées pour doser les ARV dans les liquides biologiques. Ainsi 41 méthodes sont validées dans le plasma ou le sérum humain[185]. L'EPP est la méthode d'extraction la plus utilisée, elle est rapportée dans 19 articles. Quasiment le même nombre de méthodes utilisant l'ELL (n=7) et la SPE (n=6) sont validées. Quatre méthodes utilisent une technique qui combine l'EPP et la SPE, et 2 méthodes qui combinent l'EPP et l'ELL et 3 méthodes utilisent d'autres méthodes d'extraction. Pour les méthodes qui quantifient simultanément plus de trois molécules en même temps, EPP est toujours la technique utilisée. Il y a 13 méthodes qui extraient plus de trois molécules qui utilisent l'EPP, 5 méthodes utilisent l'ELL et 3 méthodes utilisent la SPE. Comme les INNTIs et les IPs sont des molécules lipophiles, et les INTIs, des molécules hydrophiles, l'ELL est beaucoup utilisée pour doser les INNTIs et les IPs mais inadaptée aux INTIs. Malgré les bonnes sensibilité et sélectivité de la SPE, elle n'est pas la méthode la plus utilisée, peut-être à cause de son coût élevé ou de sa procédure plus compliquée.

2.3 Méthode de dosage

La méthode pour déterminer les concentrations totales ou libres d'un médicament est indépendante de la méthode de traitement de l'échantillon utilisée en pré-analyse. Deux méthodes basées sur différents mécanismes sont utilisées pour quantifier la concentration libre du médicament : la méthode non-spécifique et la méthode spécifique. Cette dernière est aussi utilisée pour mesurer la concentration totale.

Le comptage par scintillation liquide (CSL) représente l'unique méthode non-spécifique et utilise des composés à marquage radioactif. L'utilisation de cette méthode permet de doser directement le médicament libre et d'éviter l'étape d'extraction, le développement et la validation d'une méthode. Cependant, la radioactivité est mesurée quel que soit son origine, c'est pourquoi c'est une méthode non spécifique. Par conséquent, la stabilité et la pureté de ces composés marqués doivent être strictement contrôlées pour obtenir un résultat fiable surtout pour les molécules qui sont fortement liées (>90%) aux protéines. Par exemple, si on accepte 10% d'erreur, pour un composé lié à 80%, les impuretés de ce composé marqué ne doivent pas dépasser 2%. Si le composé est lié à 99.5%, le composé marqué doit être pure à 99.95%.

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) couplée avec un détecteur d'ultraviolet-visible (UV-visible) ou de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) sont deux méthodes très spécifiques qui permettent de doser le médicament sous forme libre et totale. Bien que l'HPLC-UV soit une méthode beaucoup moins sensible et moins spécifique par rapport à la LC-MS/MS, elle est toujours très utilisée dans les laboratoires. Cependant, la LC-MS/MS, étant une méthode très sensible et spécifique, est de plus en plus présente dans les laboratoires, surtout pour mesurer les concentrations libres des médicaments qui demandent une sensibilité très haute. A partir de 2011, toutes les méthodes mesurant la

fraction libre des ARVs utilisent la LC-MS/MS comme méthode de quantification sauf une équipe qui utilise la CSL[180]. Pour tous les méthodes rapportés depuis 2000, il y a 60% des méthodes utilisées pour quantifier la fraction libre en LC-MS/MS, 20% en HPLC-UV et 20% en CSL[180]. Pour mesurer les concentrations totales d'ARV, la LC-MS/MS (n=26) est plus utilisée que l'HPLC-UV (n=12)[185]. Parmi les 26 méthodes en LC-MS/MS, 61% (n=16) extraient le plasma en EPP, 27% (n=7) en SPE et seulement 8% (n=2) en ELL[185]. Quand LC-MS/MS est utilisé pour analyser les molécules, l'EPP est largement préférée par rapport aux deux autres méthodes plus spécifiques ; cela permet d'allier la spécificité et la sensibilité de la LC-MS/MS avec la simplicité de l'exécution de l'extraction [185]. Contrairement à la LC-MS/MS, avec l'HPLC-UV qui est beaucoup moins spécifique, seulement 8% (n=1) des méthodes utilisent l'EPP comme méthode d'extraction, 42% (n=5) des méthodes utilisent l'ELL et 33% des méthodes utilisent la SPE[185]. Grâce à sa spécificité, la LC-MS/MS est plus utilisée pour doser plusieurs ARVs (n>3) dans la même méthode. Elle est utilisée dans 75% des méthodes pour doser plusieurs ARVs par rapport à 25% pour HPLC-UV[185].

En résumé, la CSL est une méthode non-spécifique qui peut être utilisée pour doser la forme libre d'un médicament. De part sa simplicité d'exécution sans développement, elle est utilisée par certains laboratoires. Cependant, la stabilité et l'impureté du composé marqué doivent être bien contrôlées. De plus en plus de laboratoires préfèrent utiliser une méthode spécifique avec le système HPLC. La LC-MS/MS est beaucoup plus utilisée par rapport à l'HPLC-UV comme technique de quantification grâce à sa spécificité et sa sensibilité élevée pour doser le médicament sous forme totale et libre. Cependant, à cause du coût important de la LC-MS/MS, l'HPLC-UV pourrait être une méthode alternative quand la LC-MS/MS n'est pas disponible dans le laboratoire.

2.4 Procédure de validation d'une méthode analytique

Le but de la validation d'une méthode analytique est de prouver la fiabilité d'une méthode pour déterminer la concentration d'un ou plusieurs analytes dans une matrice biologique [191,192]. Une étude de validation complète est nécessaire pour mettre en place une méthode analytique qui servira à la suite pour le suivi thérapeutique pharmacologique ou pour une étude clinique[191,192]. La procédure de validation utilisée dans ce travail pour la méthode de quantification de la concentration totale et de la concentration libre est conforme aux guidelines de la FDA et de l'EMA[191,192]. Plusieurs paramètres doivent être validés : la sensibilité, la sélectivité, la spécificité, la linéarité, la justesse et la fidélité, l'effet mémoire, l'effet matrice, le rendement, le NSB (seulement pour fraction libre), la stabilité et l'effet de dilution. Deux solutions mères de chaque molécule sont préparées par la dilution de la poudre de molécule dans un milieu organique ou aqueux avec une concentration de 1mg/mL ou 0.5mg/mL, une pour la préparation des standards de calibration et l'autre pour les contrôles de qualités internes (CQs). En jour d'analyse, les standards de calibration et les CQs sont préparés par dilution des solutions mères dans le blanc plasma humain pour mesurer la concentration totale et dans le blanc ultrafiltrat pour mesurer la concentration libre.

2.4.1 La sensibilité

La sensibilité de la méthode est définie par *Lower limit of quantification* (LLOQ) qui est souvent utilisée comme le premier point des standards de calibration et correspondant à la concentration la plus basse. La LLOQ est validée par trois critères :

- Le signal (exprimé par l'aire du pic) de la molécule doit être > 5 fois le signal dans le blanc plasma (ou ultrafiltrat) au même temps de rétention (TR).
- La justesse (exprimée par le biais) doit être inférieure à ±20% de la concentration théorique qui est confirmée dans au moins 3 séries de

manipulations avec un minimum de 5 répétitions. Le biais est calculé en utilisant l'équation suivante:

$$B\% = \left(\frac{C_{obs} - C_{nor}}{C_{nor}}\right) * 100 \qquad \textbf{Eq. 1}$$

- Où B% représente le biais, C_{obs}, la moyenne des concentrations observées et C_{nor} représente la concentration normale (théorique).

- La fidélité (exprimée par le coefficient de variation CV%) doit être inférieure à ±20% de la concentration théorique qui est confirmée dans au moins 3 séries de manipulations avec au minimum 5 répétitions. Le CV% est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$CV\% = \frac{\sigma}{C_{obs}} * 100 \qquad \textbf{Eq. 2}$$

Où σ représente l'écart type.

2.4.2 La sélectivité et la spécificité

La sélectivité de la méthode permet d'évaluer les interférences endogènes (ex : protéines, acides gras) dans la matrice (plasma ou ultrafiltrat) et la spécificité de la méthode permet d'évaluer les interférences exogènes, surtout les co-traitements potentiels. Pour évaluer la sélectivité de la méthode, au moins 6 blancs plasmas de 6 sources différentes doivent être analysés. Pour évaluer la spécificité, tous les médicaments potentiellement utilisés en co-traitement avec la molécule d'intérêt doivent être analysés par la même méthode analytique. Le signal du pic d'interférence ne doit pas dépasser 20% du signal de la LLOQ et 5% de signal de l'étalon interne (EI), la méthode peut être considérée comme sélective et spécifique.

2.4.3 La linéarité et effet mémoire

La linéarité décrit la relation de concentration-réponse de la molécule d'intérêt en utilisant différents modèles de régression (linéaire ou quadratique) avec différents facteurs de pondération (1/x ou $1/x^2$). Une courbe de calibration doit être construite avec un échantillon de blanc plasma/ultrafiltrat (sans analyte ni EI), un échantillon de G0 (blanc plasma/ultrafiltrat + EI) et au moins 6 échantillons avec différents niveaux de concentrations d'analyte couvrant un intervalle de quantification spécifique de chaque molécule à doser. La linéarité de la méthode doit être vérifiée trois fois sur trois jours différents. Le biais de chaque niveau de standard de calibration doit être inférieur à ±15% sauf pour la LLOQ pour laquelle on accepte jusqu'à ±20%. Pour les standards qui dépassent le seuil d'acception, ils doivent être supprimés en gardant au moins 75% des standards dans la courbe de calibration et au minimum 6 niveaux différents, la LLOQ et l'*upper limit of quantification* (ULOQ) ne permettent pas d'être supprimé. Le modèle de calibration est souvent évalué par un coefficient de corrélation ou coefficient de détermination, qui n'est pas acceptable d'un point de vue statistique[193].

L'effet mémoire permet d'évaluer l'impact du dosage précédant sur la fiabilité du dosage suivant. Il est évalué par injection d'un échantillon de blanc plasma/ultrafiltrat à la suite d'une injection d'ULOQ en trois cycles. Un effet mémoire est considéré inacceptable lorsqu'un signal dans l'échantillon de blanc plasma supérieur à 20% du signal de la LLOQ et 5% du signal de l'étalon interne (EI).

2.4.4 La justesse et la fidélité

Quatre niveaux de CQs sont utilisés pour évaluer la justesse et la fidélité de la méthode : i) LLOQ, ii) contrôle qualité bas (LCQ) qui est trois fois plus concentré que la LLOQ, iii) le contrôle qualité moyen (MCQ) qui est égal à 40% de l'ULOQ et iv) le contrôle qualité haut (HCQ) défini à 80% de l'ULOQ. La justesse de la méthode est étudiée par l'analyse du biais

des 4 niveaux des CQs dans l'intra- et inter-jours en utilisant l'Eq. 1. La fidélité de la méthode est étudiée par l'analyse du CV% des 4 niveaux des CQs dans l'intra- et l'inter-jour en utilisant l'Eq. 2. La justesse et la fidélité intra-série doit être analysée par une seule série de 4 niveaux de CQs avec 5 répétitions pour chaque niveau. La justesse et la fidélité inter-jours doit être analysée, sur 3 journées différentes, avec 3 séries de quatre niveaux de CQs avec 5 répétitions pour chaque niveau de CQs dans chaque série. Le biais et le CV% de ces dosages intra- et inter-jours doivent être inférieurs à 15% sauf pour LLOQ pour laquelle on accepte jusqu'à 20%. Pour chaque série, une courbe de calibration doit être préparée en même temps que les CQs pour quantifier leurs concentrations.

2.4.5 Le rendement et l'effet de matrice

L'étude de rendement permet d'évaluer le rendement d'extraction (cela concerne seulement la méthode pour doser la forme totale). Il est évalué par le pourcentage de médicament récupérable après l'étape d'extraction ce qui permet d'évaluer la fiabilité de la méthode d'extraction. Une méthode d'extraction avec une bonne répétabilité est toujours préférable à une méthode avec un rendement élevé mais moins répétable.

L'effet matrice est un effet d'accentuation ou de suppression ionique par les substrats ionisés dans la matrice (ex : protéines, métabolites, co-traitement, etc…) en utilisant la LC-MS/MS comme détecteur. L'effet matrice est évalué par 4 répétitions de la LCQ et HCQ, sur les plasmas de 6 sources différentes. Le biais et le CV% ne doivent pas dépasser 15%.

La méthode proposée par Matuszewski et al.[194] est la plus utilisée pour étudier le rendement et l'effet matrice. Trois types d'échantillons sont préparés à la même concentration que les échantillons de LCQ ou HCQ : l'échantillon A est préparé par dilution directe des molécules dans la phase mobile ; l'échantillon B est préparé par dilution directe des molécules dans le

blanc extrait/ultrafiltrat ; l'échantillon C sont préparés par l'extraction du LCQ ou du HCQ dans le plasma. Le rendement est calculé en utilisant Eq. 3 et l'effet matrice est calculé en utilisant Eq. 4 qui sont reportées ci-dessous:

$$EM\% = \left(\frac{R_B - R_A}{R_A}\right) * 100 \qquad \textbf{Eq. 3}$$

$$RDM\% = \frac{R_C}{R_B} * 100 \qquad \textbf{Eq. 4}$$

Où EM% représente l'effet matrice, R_B représente le signal de l'analyte dans l'échantillon B, R_A représente le signal de l'analyte dans l'échantillon A, RDM% représente le pourcentage du rendement, R_c représente le signal de l'analyte dans l'échantillon C. Un EM% et un CV% inférieurs à 15% signifient l'absence d'effet matrice. Le CV% du rendement doit être inférieur à 15%.

2.4.6 Le NSB

Le NSB de la méthode d'UF est évalué par la comparaison des signaux des analytes dilués dans le blanc ultrafiltrat après UF versus avant UF en analysant 5 répétitions de LCQ et de HCQ préparés séparément dans 6 plasmas de 6 sources différentes (Eq.5):

$$NSB\% = \left(\frac{R_{ap} - R_{av}}{R_{av}}\right) * 100 \qquad \textbf{Eq. 5}$$

Où NSB% représente le pourcentage de liaison non-spécifique, R_{ap} représente le signal de l'analyte dilué dans l'ultrafiltrat après filtration, R_{av} représente le signal de l'analyte dilué dans l'ultrafiltrat avant filtration. Le NSB% doit être inférieur à 15%, sinon, un ajustement de la f_u doit être fait en considérant l'effet de NSB.

2.4.7 La stabilité

L'étude de stabilité permet d'évaluer le changement de la concentration du médicament après

le stockage avec les conditions testées par rapport aux échantillons préparés fraîchement (T0). Les conditions testées pour l'étude de stabilité sont définies par les conditions de stockage des échantillons plasmatiques et les conditions d'extraction avec comme objectif de confirmer l'absence de changement significatif de la concentration du médicament d'intérêt après le stockage ou l'extraction. Les conditions à tester sont: stabilité plasmatique après trois cycles de congélation-décongélation, stabilité plasmatique à température de stockage (-20°C) pendant au moins 1 mois, stabilité plasmatique à température ambiante pendant 24 h, stabilité post-extraction ou dans l'ultrafiltrat à la température de l'autosampler à 8°C / -20°C pendant 24 h. La stabilité du médicament dans chaque condition est évaluée par l'analyse de la variation de la concentration de 4 répétitions de LCQ et HCQ dans le plasma/ultrafiltrat et post-extraction en utilisant l'équation suivante :

$$STA\% = (\frac{C_{sta} - C_{T0}}{CT0}) * 100 \qquad \textbf{Eq. 6}$$

Où STA% représente la stabilité, C_{sta} représente la concentration du médicament mesurée après les conditions testées, C_{T0} représente la concentration du médicament mesurée à T0. L'analyte sera considéré comme stable dans la condition testée si les valeurs de STA% et de CV% sont inférieures à 15%.

2.4.8 Effet de dilution

L'effet de dilution est évalué par l'analyse de la concentration de l'échantillon avec une concentration deux fois plus élevée que l'ULOQ qui est dilué au cinquième dans le plasma ou ultrafiltrat. Le biais (Eq. 1) et CV% (Eq. 2) doivent être inférieurs à 15%.

Une fois que toutes ces étapes ont été réalisées avec les exigences définies, la méthode est dite validée et peut être considérée comme fiable.

3 La pharmacocinétique de population

La pharmacocinétique de population (pKpop) est une méthode qui permet d'analyser simultanément les concentrations de médicament avec les données cliniques provenant de nombreux individus[195] en utilisant des modèles non linéaires à effets mixtes. L'objectif de ces modèles de pKpop est d'estimer des paramètres PK, de décrire la variabilité inter-individuelle et inter-occasion, et d'expliquer une partie de cette variabilité par les covariables cliniques comme le poids, l'âge, le sexe, un ou des polymorphisme(s) génétique(s) etc…. Cette approche permet d'avoir peu de prélèvements par sujet avec un nombre de sujets assez important. Le schéma de prélèvement peut être aléatoire mais il faut couvrir l'intervalle entre deux administrations de médicament. Elle s'applique surtout à un groupe de sujets hétérogènes.

Pour l'ensemble des travaux réalisés, la modélisation en pKpop a été réalisée en trois étapes : la construction de la base de données, la construction du modèle en pKpop et la validation du modèle. Les deux dernières étapes ont été réalisées par le biais du logiciel MONOLIX 2018®

3.1 La construction de la base de données

Trois catégories de données sont recueillies pour construire la base de données.

1) Les données utilisées pour construire le modèle structural : les concentrations plasmatiques du RAL total, libre et RAL-glucuronide, la date et l'heure de prélèvement et d'administration du médicament, les doses reçues et le rythme des administrations.

2) Les informations démographiques pour chaque patient au moment du prélèvement : l'âge, le poids, le nombre de semaines d'aménorrhée ou le nombre de semaines après l'accouchement.

3) Les informations biologiques par chaque patients au moment du prélèvement : le niveau d'albumine, d'aspartate aminotransférase, d'alanine aminotransférase, de bilirubine, de créatinine et les résultats de génotypage (rs8175347 pour UGT1A1 et rs1045642 pour P-gp).

Les données démographiques et biologique sont utilisées comme covariables propres à chaque individu ou propre à chaque occasion.

3.2 La construction du modèle en pKpop du RAL

Pour construire un modèle de pKpop, trois modèles doivent être développés : le modèle de structure, les modèles de variabilité (qui contiennent la variabilité résiduelle et la variabilité interindividuelle) et le modèle de covariable.

3.2.1 Le modèle de structure

Le modèle structural caractérise le processus biologique du médicament dans le système physiologique. Dans le modèle structural sont décrites les différentes phases du médicament. L'absorption peut être représentée par une constante d'ordre zéro ou d'ordre 1, un lag-time ou par un ou plusieurs compartiments de transit pour décrire un retard à l'absorption. La distribution peut être modélisée par un ou plusieurs compartiments, et l'élimination par un modèle linaire ou non-linaire. Ces phases sont décrites en estimant les différents paramètres PK tel que K_a (la constante d'absorption), T_{lag} (lag-time), K_{tr} (la constante de transit), F (la biodisponibilité), V_d (le volume de distribution), CL (la clairance), Q (la clairance intercompartimentale) etc… Dans ce modèle, le système physiologique du corps est considéré comme un assemblage de compartiments entre lesquels le médicament peut s'échanger ou être métabolisé avant d'être éliminé hors de ce système.

Le modèle structural peut être décrit en général par l'équation suivante[195] :

$$y_j = f(\theta_i, t_j) \qquad \textbf{Eq.7}$$

θ_i représente le vecteur des paramètres PK (e.g., ka, V_d, CL etc…) pour le patient i; y_{ij} la concentration du patient i au temps j (t_j).

3.2.2 Le modèle de variabilités résiduelle

De plus, pour chaque modèle est tracée une courbe individuelle à partir des paramètres individuels du patient qui tient compte du modèle structural et de la concentration mesurée chez les patients (Figure 11). L'écart entre la valeur individuelle prédite par la modèle et l'observation est décrit par la variabilité résiduelle provenant de différentes sources : les erreurs de doses, des temps de prélèvements, les erreurs analytiques et la variabilité intra-individuelle et les causes non-identifiable.

.

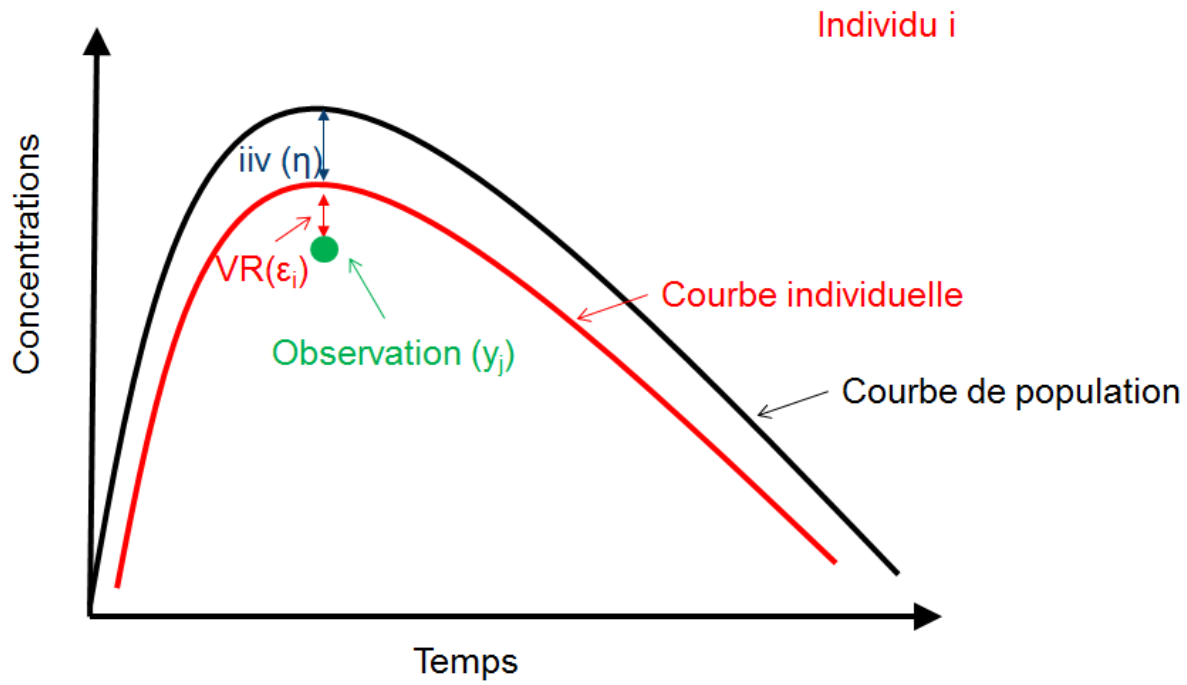


***Figure 11. La courbe de pharmacocinétique en population et le courbe individuelle** : iiv représente la variabilité interindividuelle (η) pour individu i ; VR représente la variabilité résiduelle (Ɛj).*

Trois modèles d'erreur sont classiquement utilisés pour estimer la variabilité résiduelle représentée par ε_i qui suit une distribution normale de moyenne 0 et de variance σ^2:

- Erreur additive : suppose une erreur constante pour chaque observation décrite par l'équation suivante :

  $$y_j = f(\theta_i, t_j) + \varepsilon add_i$$

  Eq. 8a

- Erreur proportionnelle: suppose que l'erreur est proportionnelle à l'observation:

  $$y_j = f(\theta_i, t_j) * (1 + \varepsilon prop_i) \quad \textbf{Eq.8b}$$

- Erreur mixte : suppose une erreur qui contient une partie constante (εadd_i) et une partie proportionnelle ($\varepsilon prop_i$).

  $$y_j = f(\theta_i, t_j) * (1 + \varepsilon prop_i) + \varepsilon add_i \quad \textbf{Eq. 8c}$$

3.2.3 Le modèle de variabilité interindividuelle

L'écart entre la concentration individuelle prédite et celle prédite pour la population correspond à la variabilité interindividuelle. Cette variabilité est la résultante de l'écart entre les paramètres individuels et de population. Il existe deux modèles pour décrire la variabilité interindividuelle:

- Le modèle additif qui permet d'avoir la variance de la variabilité constante est représenté par l'équation suivante:

  $$\theta_i = \theta_{pop} + \eta_i \quad \textbf{Eq.9a}$$

- Avec θ_i correspondant aux différents paramètres PK tel que K_a, V_d, CL etc

pour un individu i; θ_{pop} correspondant aux paramètres PK estimés pour la population; η_i correspondant à la variabilité interindividuelle du paramètre pour l'individu i.

- Le modèle proportionnel est présenté par l'équation suivante:

$$\theta_i = \theta_{pop} * \exp(\eta_i) \quad \textbf{Eq.9b}$$

Ce modèle exponentiel permet d'avoir des paramètres cinétiques toujours positifs et a été utilisé pour décrire la variabilité interindividuelle des paramètres PK du RAL.

3.2.4 Le modèle de covariables

La construction du modèle de covariables consiste à rechercher les relations entre les paramètres PK et les caractéristiques cliniques ou démographiques des individus. L'inclusion des covariables dans le modèle permet d'expliquer la variabilité interindividuelle, d'identifier des sous-groupes dont le PK est différente et finalement augmenter la performance prédictive du modèle. Deux types de covariable peuvent exister : les covariables continues ou catégorielles.

- L'effet des covariables continues a été testé suivant l'équation :

$$\theta = \theta_m * \left(\frac{\text{CO}}{\text{médian (CO)}}\right)^{ß^{\theta}_{\text{CO}}} \quad \textbf{Eq. 10a}$$

Avec θ_m représente les paramètres PK estimés pour un individu avec la covariable égale à la médiane dans la population ; CO représente la valeur de la covariable continue; médian (CO) représente la médiane des covariables dans la popualtion; $ß^{\theta}_{CO}$ représente le facteur qui décrit l'influence de la

covariable sur le paramètre PK.

- L'effet des covariables catégorielles à deux classes a été testé suivant l'équation :

$$\theta = \theta_m * ß_{CO}^{\theta\ CO} \qquad \textbf{Eq. 10b}$$

Avec CO représente la covariable dichotomique qui prend les valeurs 0 ou 1 correspondant aux deux sous-groupes dans la population ; θ_m représente les paramètres PK estimés pour les individus dans le sous-groupe avec la covariable dichotomique égale à 0.

3.2.5 Stratégie de modélisation dans l'étude ANRS 160RalFE

Les données ont été analysées par une méthode de régression non linéaire à effets mixtes en utilisant le logiciel MONOLIX® version 2018R1 (http://lixoft.com).

Plusieurs modèles structuraux ont été testés pour décrire la concentration libre du RAL (i.e., 1 ou 2 compartiments, avec une absorption d'ordre 1, avec ou sans lag-time ou compartiments de transit, et une élimination linéaire). Le modèle avec une fonction objective (dans le cas de modèles emboités) ou avec une valeur d'*Akaike Information Criterion* et de *Bayesian information criteria* (dans le cas de modèles non-emboîtés) la plus faible et qui permettait d'améliorer les graphiques diagnostiques a été retenu. La concentration total de RAL a été reliée ensuite à la concentration libre dans le modèle en supposant une liaison entre RAL et PP soit saturable ou soit non-saturable. La relation entre la concentration libre et total du RAL peut être représentée par l'équation suivante :

$$C_{total} = C_{libre} + C_{lié} \qquad \textbf{Eq. 11}$$

Avec C_{libre}, la concentration du médicament libre ; C_{total}, la concentration du médicament

total ; $C_{lié}$, la concentration du médicament lié au PP.

Nous pouvons considérer le processus de la dissociation du complexe PP-médicament comme une réaction chimique qui s'écrirait de la façon suivante :

$$[médicament\ lié\ au\ PP] \Leftrightarrow [médicament\ libre] + [site\ de\ liaison\ libre\ sur\ PP]$$

On peut définir la notion de constante de dissociation (K_d) dans les conditions d'équilibre avec équation suivante :

$$K_d = \frac{C_{libre} \times Nsl}{C_{lié}} = \frac{C_{libre} \times (B_{max} - C_{lié})}{C_{lié}} \qquad \textbf{Eq.12}$$

Avec K_d, la constante de dissociation ; Nsl, nombre de site de liaison libre sur PP ; B_{max}, la capacité maximum de liaison du médicament.

En reformulant l'équation **Eq.12**, on obtient :

$$C_{lié} = \frac{C_{libre} \times B_{max}}{K_d + C_{libre}} \qquad \textbf{Eq.13}$$

En combinaison d'**Eq. 11** et **Eq.13**, l'équation suivant est obtenue :

$$C_{total} = C_{libre} + \frac{C_{libre} \times B_{max}}{K_d + C_{libre}} = C_{libre} * (1 + \frac{B_{max}}{K_d + C_{libre}}) \qquad \textbf{Eq.14}$$

Dans le cas où la liaison est non-saturable, le $K_d >> C_{libre}$ et l'EQ.8 se transforme en équation suivante :

$$C_{total} = C_{libre} * \left(1 + \frac{B_{max}}{K_d}\right) = C_{libre} * (1 + \frac{NS * [PP]}{K_d}) \qquad \textbf{Eq.15}$$

Avec NS représente le nombre de sites de liaison sur 1 unité de PP ; [PP] représente la concentration de PP dans le plasma du patient.

Comme le RAL est connu pour se lier majoritairement à l'albumine, nous avons utilisé la

concentration d'albumine à la place de PP. L'EQ. 15 et EQ. 14 ont été utilisées comme équations qui représentent la liaison non-saturable ou saturable pour intégrer la concentration totale au modèle du RAL libre. Et la concentration du RAL-glucuronide a été combiné dans le modèle par l'ajout d'un compartiment supplémentaire pour ce métabolite.

Pour le modèle d'erreur résiduelle, différents types de modèle ont été testés (i.e, erreur additive, proportionnelle ou mixte). Concernant l'estimation de la variabilité interindividuelle sur un paramètre il a été considéré que le retrait d'une variabilité interindividuelle significative devait induire une augmentation d'au moins 6.63 points sur -2xlog-likelihood (fonction objective) ($p<0.01$). Dans le cas contraire, cette variabilité a été considérée comme non-significative et a été enlevée du modèle.

Après avoir choisi le modèle structural et les modèles de la variabilité, le modèle de covariables a pu être testé. Dans notre étude, le poids, l'âge, l'âge gestationnel, le niveau d'aspartate aminotransférase, d'alanine aminotransférase, de bilirubine, de créatinine ont été considérés comme des covariables continues en utilisant l'équation EQ. 10a. Le polymorphisme de l'UGT1A1 et de la P-gp (type sauvage présenté par 0 versus type muté présenté par 1) ainsi que la période de grossesse (femme enceinte représentée par 0 versus femme en postpartum représenté par 1) ont été considérés comme des covariables dichotomiques en utilisant l'équation EQ. 10b. Une stratégie ascendante-descendante a été utilisée pour tester l'ensemble des covariables [196]. Une covariable est inclue dans le modèle si son effet est biologiquement plausible ; son inclusion diminue la fonction adjective d'au moins 6.63 points sur -2xlog-likelihood ($p<0.01$) ; une réduction de la variabilité interindividuelle du paramètre associé est observée. Les covariables sont ainsi testées une par une. La covariable la plus significative est alors ajoutée au modèle. Les autres covariables sont ensuite testées jusqu'à ce qu'aucune covariable ne soit significative. A la fin, toutes les

covariables ajoutées dans le modèle sont enlevées une par une, les covariables sont finalement retenues dans le modèle si leur retrait induit une augmentation d'au moins 6.63 unités sur la fonction objective (-2xlog-likelihood ($p<0.01$)).

3.3 L'évaluation des modèles

L'évaluation a été basée sur les graphiques diagnostics : concentrations observées en fonction des prédictions de population, concentrations observées en fonction des prédictions individuelles, les résidus (la différence entre la concentration observées et prédites) en fonction des concentrations et du temps.

Une méthode *Prediction Corrected-Visual Predictive Check* a également été utilisée avec 500 simulations de Monte Carlo pour évaluer et valider le modèle final. Le *Visual Predictive Check* (VPC) permet de comparer les données simulées par le modèle final et les données réellement observées pour évaluer la performance prédictive du modèle. Le VPC sous forme de *Prediction Corrected* permet de standardiser à la fois les concentrations observées et simulées. Le modèle a été considéré comme acceptable si les 5^e, 50^e et 95^e percentiles des concentrations observées étaient bien inclus dans l'intervalle de confiance à 90% des 5^e, 50^e et 95^e percentiles des concentrations simulées.

Résultats

Première étude: Méthode pour quantifier simultanément le dolutégravir, l'elvitégravir, la rilpivirine, le darunavir, le ritonavir, le raltégravir et le raltégravir-β-D-glucuronide dans le plasma humain en HPLC-MS/MS.

Revue de la littérature

Plusieurs méthodes analytiques (n=18) ont été publiées pour mesurer la concentration totale du RAL, seul ou en association avec d'autres molécules antirétrovirales, dans les liquides biologiques humains. Concernant le dosage du RAL dans le plasma humain, 16 méthodes ont été développées (Tableau 10). L'EPP est la méthode d'extraction la plus utilisée, on la retrouve dans 8 méthodes, alors que l'ELL est utilisée dans 4 méthodes et la SPE dans 4 méthodes également (Tableau 10). Parmi les 7 méthodes qui quantifiaient simultanément plusieurs molécules (n>3), seulement 1 méthode utilisait la SPE, et les 6 autres méthodes utilisaient l'EPP comme méthode d'extraction. Compte tenu de sa faible sélectivité, l'EPP est utilisable pour un large spectre de molécules, ce qui représente un réel avantage, surtout pour doser simultanément plusieurs composés. D'autre part, c'est une technique simple à mettre en place.

Pour analyser le RAL, grâce à sa spécificité et sa sensibilité, la LC-MS/MS (n=12) était une méthode plus utilisée que les autres méthodes : HPLC-UV (n=5) et HPLC-fluorescence (n=1). Dans ces méthodes, la plus petite LLOQ était de 0.125 ng/mL en utilisant la MS/MS comme détecteur alors qu'elle était seulement de 10 ng/mL en utilisant l'UV et 5 ng/mL en utilisant la fluorescence. Parmi les 6 méthodes qui permettent de doser simultanément le RAL et au moins trois autres ARVs, seulement 1 méthode utilisait la technique d'HPLC-UV[197], et les 5 autres méthodes utilisaient la LC-MS/MS[198–202]. Charbe et al. ont validé une méthode qui permet de quantifier le RAL avec 8 autres ARVs en HPLC-UV. Néanmoins, l'HPLC-UV est

beaucoup moins spécifique que la LC-MS/MS. L'HPLC-UV présente un risque élevé d'interférence, d'autant plus que les patients sous RAL sont souvent sous multi-thérapie. De plus, cette technique utilisait 500 µL de plasma de patient ce qui représente un volume important, surtout pour des patients particuliers comme les nouveau-nés dont certains sont prématurés. Parmi les 5 méthodes en LC-MS/MS pour doser plusieurs ARVs, 3 méthodes n'utilisaient pas d'isotope marqué du RAL comme étalon interne, ce qui aurait permis d'éliminer l'impact de l'effet matrice potentiel des plasma des patients[198–200]. Seulement deux méthodes validées par Bollen et al .[201] et Persons et al.[202], ont utilisé l'isotope marqué du RAL comme étalon interne. Cependant, ces deux méthodes ont été validées en UPLC-MS/MS, qui n'est pas applicable dans les laboratoires avec uniquement des systèmes HPLC. Par ailleurs, le RAL-glucuronide est connu pour se dégrader en RAL dans la source de la LC-MS/MS ce qui pourrait induire une surestimation pour la concentration du RAL[203]. Donc, une séparation chromatographique de ces deux molécules est nécessaire pour éviter cette interférence avec le RAL. Mais, dans les 12 méthodes en LC-MS/MS qui ne dosaient pas la concentration du RAL-glucuronide , seulement trois méthodes[200,204,205] ont séparé le RAL-glucuronide et le RAL, et les 8 autres méthodes risquaient de surestimer la concentration du RAL. En pratique, cette surestimation risquerait d'entraîner des résistances virales et finalement aboutir à un échec thérapeutique. A ce jour, une seule méthode analytique dosant le RAL et le RAL-glucuronide a été publiée [206]. Néanmoins, dans cet article, la stabilité du RAL et du RAL-glucuronide n'a pas été évaluée dans les conditions de stockage, ni à la température de l'autosampler après extraction[206].

Tableau 10. Méthode analytique pour doser le RAL

	Molécules	**Matrice**	**Détection**	**Extraction**	**Intervalle du RAL (ng/mL)**
Fayet et al.[200]	RAL, MVC, DRV, ETV	Plasma	LC-MS/MS	EPP par ACN	12.5-5000
Jourdil et al.[204]	RAL, imatinib, 3 antifongiques, 5 antibiotiques	Plasma	LC-MS/MS	EPP par ACN	10-2000
Poirier et al.[207]	RAL	Plasma	HPLC-Fluorescence	ELL par hexane/méthylène choroïde 50:50 (v/v)	5-1000
Goldwirt et al.[208]	RAL	Plasma	HPLC-UV	ELL par dichlorométhane/hexane 50:50 (v/v)	10-10000
Long et al.[209]	RAL	Plasma	LC-MS/MS	ELL par hexane/méthylène choroïde 50:50 (v/v)	1-3000
M-Thoumas et al.[210]	RAL	Plasma PBMC	LC-MS/MS	SPE	50-5000 2.5-500
Simiele et al.[199]	RAL, DRV, NVP, IDV, APV, SQV, MVC, CBT NFV, ATV, EFV, ETV, RTV, LPV, RPV, EVG, DTG	Plasma	LC-MS/MS	EPP par ACN/MeOH 50:50 (v/v)	11.7-3000
Rezk et al.[211]	RAL	Plasma	HPLC-UV	SPE	20-10000
Charbe et al.[197]	RAL, ATZ, DTG, DRV, EFV, ETV, LPV, RPV, TPV	Plasma	HPLC-UV	SPE	40-9600
Notari et al.[212]	RAL, MVC	Plasma	HPLC-UV	SPE	19.53-2500
Bollen et al.[201]	RAL, DTG, ETV, NVP, ETV	Plasma	UPLC-MS/MS	EPP par MeOH	9.7-9730
Heine et al.[205]	RAL	Plasma DBS PBMCs	LC-MS/MS	EPP par ACN/MeOH (1/1) EPP par ACN/MeOH/0.2M zincsulphate (1/1/2) EPP par MeOH	50-10000 50-10000 1-500
Merschman et al.[213]	RAL	Plasma	LC-MS/MS	ELL par hexane/méthylène choroïde 50:50 (v/v)	2-1000
Wang et al.[206]	RAL, RAL-GLU	Plasma	LC-MS/MS	EPP par ACN	0.88-888
Djerada et al.[198]	RAL, DRV, NVP, IDV, APV, SQV, MVC, BPV ATV, EFV, ETV, RTV, LPV, RPV, EVG, TPV, TDF	Plasma	LC-MS/MS	EPP par ACN	7.81-2000
Parsons et al.[202]	RAL, RPV, ETV, MVC	Plasma Tissu	UPLC-MS/MS	EPP par ACN SPE	1-5000
Talameh et al.[214]	RAL	Liquide génitale femelle	HPLC-UV	SPE	50-10000
D'Avolio et al.[215]	RAL, DRV, NVP, IDV, APV, SQV, ATV, EFV, ETV, RTV, LPV,	PBMCs	LC-MS/MS	sonication	0.125-32

Abréviation :TPV,tipranavir ;IDV,indinavir, ;APV,amprenavir;SQV,saquinavir ;NFV,nelfinavir ; CBT,cobicistat; BPV,bocepreviv; DBS, dried blood spots; MVC,maraviroc.

A ce jour, les DTG, l'EGV et le RPV sont les trois derniers ARVs mis sur le marché. Il s'agit de trois INTIs fréquemment retrouvés dans les premières lignes de traitement du fait de leur efficacité pour diminuer la CV et leur bonne tolérance[44,216,217]. Les traitements basés sur le DTG sont recommandés en première ligne de traitement pour les adultes et enfants par l'OMS[217]. Les traitements basés sur le RAL sont recommandés en première ligne de traitement pour les nouveau-nés, et en traitement préférentiel alternatif pour les enfants ayant une inadaptation à un traitement par DTG[217]. L'EGV est aussi recommandé dans les régimes préférentiels dans certaines situations cliniques par l'US DHHS guideline[218]. La RPV est l'INNRT le plus récent, recommandée en première ligne de traitement dans certains cas cliniques[44]. Les co-traitements de DRV/r + DTG ou RAL sont aussi recommandés par plusieurs études cliniques grâce à leur efficacité et leur bonne tolérance[219,220]. La prescription du DTG avec le DRV/r et 1 ou 2 INTIs est recommandée en deuxième ligne de traitement alternatif pour les adultes et enfants par l'OMS[217]. Cependant, l'utilisation de ces nouveaux ARVs est assez restreinte en raison de données cliniques trop limitées. Une méthode simple, fiable et applicable dans la plupart des laboratoires et qui permette de doser simultanément ces nouveaux ARVs pourrait faciliter le recueil des données cliniques. Plusieurs méthodes dosant [198,200–202] une molécule, deux, voire trois de ces nouveaux ARVs sont disponibles. Cependant la seule méthode[199] permettant de doser les 4 ARVs simultanément a été développée sur UPLC, et n'est pas utilisable dans les laboratoire ne disposant que d'un système HPLC[199]. De plus, cette technique n'utilise pas les isotopes marqués comme étalon interne ce qui ne permet pas d'éviter l'impact de l'effet matrice potentiel diminuant ainsi sa fiabilité.

Par ailleurs, il est plus compliqué de développer et de valider une méthode analytique pour doser simultanément plusieurs molécules, car toutes les molécules doivent être validées dans

les mêmes conditions expérimentales alors que leurs propriétés physico-chimiques sont différentes. Il faut trouver un compromis dans l'optimisation de la méthode pour une quantification fiable de toutes les molécules. Une méthode qui dose simultanément plusieurs molécules a plusieurs avantages comme : 1) une économie de temps de matériels et de personnel ; 2) des volumes de plasma prélevé plus faible chez des patients compliqués comme les nouveau-nés ; 3) moins de pollution. Ainsi, il est toujours intéressant de valider une méthode pour doser simultanément plusieurs molécules.

Objectif

L'objectif de cette étude était de développer et valider une méthode simple et fiable pour quantifier simultanément le RAL, le RAL-glucuronide, le DTG, l'EGV, la RPV, le DRV et le RTV par HPLC-MS/MS et qui soit applicable en routine et pour les études cliniques.

Méthodes

Les molécules ont été quantifiées sur un système chromatographique en phase liquide (Accela®) couplé avec un triple quadruple tandem spectrométrie de masse (TSQ Quantum discovery®). Le RAL-glucuronide et son isotope étalon interne ont été analysés en mode négatif *multiple reaction monitroing* tandis que toutes les autres molécules étaient détectées en mode positif. Les molécules ont été ionisées par un électronébuliseur. La séparation des molécules a été réalisée sur une colonne Kinetex® phenyl-hexyl (5 µm, 100 mm x 3 mm) en utilisant comme phase mobile un mélange d'eau et d'ACN avec 0.05% (v/v) d'acide formique dans les deux phases. Chaque molécule a été quantifiée en utilisant le composé isotopique correspondant comme étalon interne.

Pour cette méthode d'EPP, un volume de 300 µL d'ACN était utilisé pour extraire 100µL d'échantillon plasmatique (calibration standard, contrôle qualité et plasma de patient) plus

20µL d'EI solution. Après 5 minutes d'agitation et 10 minutes de centrifugation à 17000g, les surnageants étaient évaporés au sec sous azote et reconstitués dans 200µL de phase mobile. Après 10 minutes de centrifugation à 17000 g, 25µL de surnageant était injecté et analysé par LC-MS/MS.

La méthode a été développée et validée selon les guidelines de la FDA et de l'EMA (cf. chapitre méthodologie). Cette méthode a été appliquée dans la routine du service de pharmacologie à l'hôpital Cochin et dans l'étude ANRS 160 RalFE.

Résultats

Toutes les molécules ont bien été séparées sauf l'EVG et le RTV qui étaient côte à côte sans interférence entre elles (Figure 12). Les résultats des tests de sensibilité, sélectivité, spécificité, linéarité, justesse, fidélité, effet mémoire, effet matrice, rendement et stabilité étaient tous conformes aux critères des guidelines de la FDA et de l'EMA. Cette méthode est bien sélective et spécifique avec aucune interférence endogène plasmatique observée en testant 6 plasmas de différentes sources, ni interférence exogène de 39 co-traitements potentiels. Le résultat de linéarité, justesse, fidélité, rendement, effet matrice et stabilité sont résumés dans le tableau 11. Pour les tests de stabilité, nous avons testé seulement les conditions qui n'ont pas été testées par les anciennes publications. Aucune dégradation n'a été observée. La fiabilité de cette méthode est bien confirmée, depuis septembre 2018, par les résultats de contrôle qualité externe (Tableau 11) fourni par ASQUALAB qui est conforme à la norme ISO9001.

Discussion

Une séparation chromatographique du RAL-glucuronide et du RAL évite l'interférence causée par la fragmentation du RAL-glucuronide sur le RAL dans la source d'ionisation. Par

rapport aux autres colonnes testées, la colonne phényl-hexyl permet d'avoir une bien meilleure forme de pic avec un TR correct. Le MeOH est utilisé comme phase organique car l'ACN est connue pour avoir une interaction avec la colonne phényl-hexyl ce qui diminue la résolution des molécules. Par rapport aux méthodes déjà publiées, cette méthode présente plusieurs avantages. En utilisant les composés isotopiques marqués, l'impact de l'effet matrice est minimisé ce qui renforce la fiabilité de cette méthode. Dans plusieurs anciennes méthodes analytiques en LC-MS/MS publiées, l'utilisation de composés isotopiques marqués est limitée par son prix élevé et sont remplacés par d'autres molécules[198–200]. Cependant, ces composés isotopiques marqués sont considérés comme les molécules qui se rapprochent le plus de l'analyte. L'EPP est utilisée pour l'extraction plasmatique qui est simple d'exécution. De plus, cette méthode a besoin d'un petit volume de plasma de patient (100µL), ce qui facilite le prélèvement sanguin. Cependant, cette méthode a certaines limites comme le temps d'analyse long (16 minutes) qui est nécessaire pour séparer les analytes en utilisant un système HPLC. Cependant, c'est un temps acceptable pour l'analyse en routine. Un autre inconvénient de cette méthode est que le RAL, le DTG, l'EVG et la RPV ne sont pas utilisés simultanément. Ainsi, afin de poursuivre ce travail une prochaine étape consisterait à ajouter les co-traitements souvent utilisés pour ces molécules comme les INTIs. Comme ces quatre molécules sont souvent recommandées en association avec les INTIs, le développement d'une nouvelle méthode contenant l'ensemble de ces molécules pourrait faire partie de cette technique.

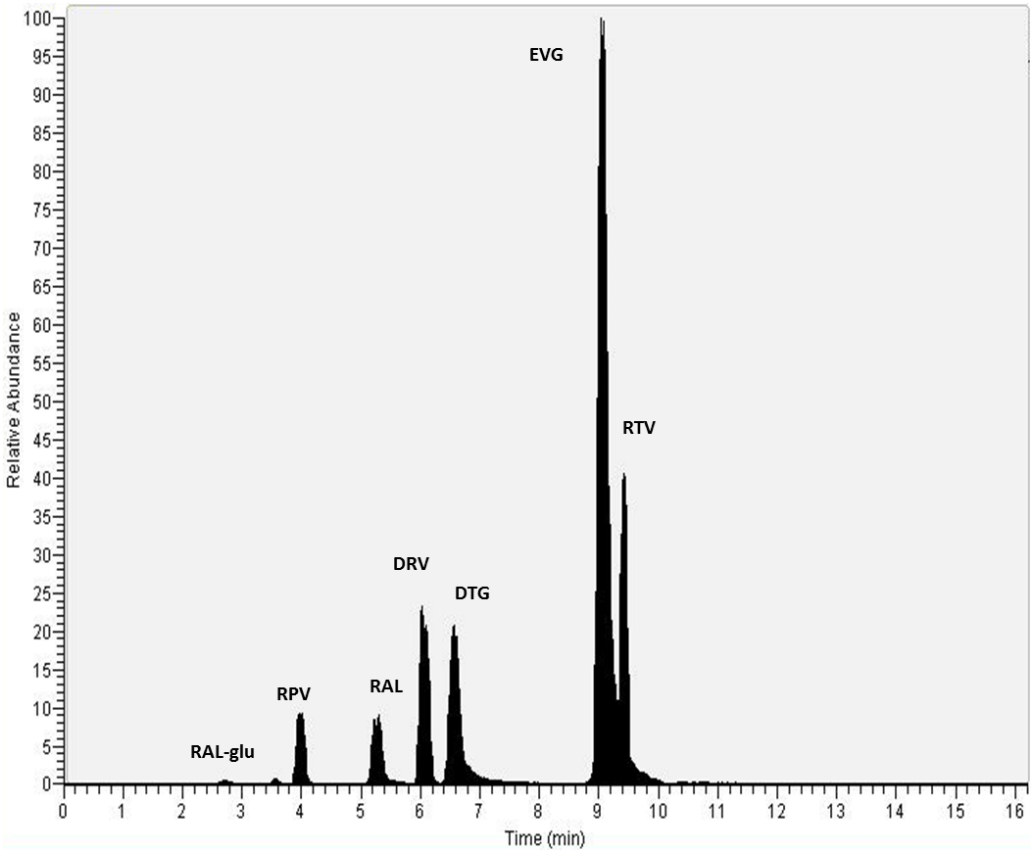


Figure 12. Le chromatogramme de LLOQ de post-extraction pour chaque molécule *: raltégravir-β-D-glucuronide (Ral-Glu, 10 ng/mL) à 2.8 min, rilpivirine (RPV,10 ng/mL) à 4.0 min, raltégravir (RAL,10 ng/mL) à 5.3 min, darunavir (DRV,60 ng/mL) à 6.1 min, dolutégravir (DTG, 20 ng/mL) à 6.7 min, elvitegravir (EVG,20 ng/mL) à 9.1 min et ritonavir (RTV, 10 ng/mL) à 9.4 min avec l'abondance relative (cps) en ordonnée et le temps de rétention (min) en X abscisse .*

Tableau 11. Résultats de validation de la méthode analytique

	RAL-glu	RPV	RAL	DRV	DTG	EVG	RTV
TR (min)	2.8	4.0	5.3	6.1	6.7	9.1	9.4
Transition (m/z)	619.100> >316.160	367.102> >195.090	445.117> >108.970	548.156> >392.190	420.100> >277.070	448.072> >344.050	721.600> >296.090
Calibration (ng/mL)	10-2500	10-2500	10-2500	60-15000	20-5000	20-5000	10-2500
Justesse	-9.9-9.1%	-9.5-7.0%	-7.6-10.0%	-8.4-7.8%	-7.3-3.8%	-8.6-9.2%	-8.7-9.5%
Fidélité	4.0-9.3%	5.1-12.3%	4.0-8.1%	3.3-12.1%	3.2-9.2%	3.5-10.4%	4.3-11.1%
Rendement	91-96%	100-103%	94-102%	100-101%	98-101%	99-105%	101-111%
EM	82-111%	103-111%	94-106%	98-108%	96-106%	97-108%	102-115%
Stabilité post-extraction pendant 24H							
Température ambiante	98-103%	97-98%	93-106%	101-105%	93-97%	95-101%	106-107%
8°C	87-94%	98-104%	87-110%%	99-103%	91-105%	94-101%	106-115%
Stabilité dans le plasma pendant 1 mois							
-20°C	96-103%	97-106%	105-107%	99-105%	96-99%	104-114%	105-115%
Z-score de contrôle ASQUALAB bi-niveaux							
Septembre/2018	Non applicable	0 et -1.13	0.74 et -0.14	1.15 et 0.27	-1.19 et 1.93	0.83 et -0.58	1.0 et 1.23
Avril /2019	Non applicable	Non applicable	Non applicable	-0.21 et 1.9	Non applicable	Non applicable	-0.12 et 0.42

Conclusion

C'est la première méthode analytique qui permet de doser simultanément le RAL, le RAL-glucuronide, le DRV, le DTG, la RPV, l'EVG et le RTV en utilisant l'HPLC-MS/MS. Cette méthode s'adapte aussi aux laboratoires qui ne sont pas équipés d'un système UPLC. La méthode est simple et fiable, adaptée pour le suivi thérapeutique pharmacologique de routine et les études cliniques.

HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of dolutegravir, elvitegravir, rilpivirine, darunavir, ritonavir, raltegravir and raltegravir-β-D-glucuronide in human plasma

Yi Zheng[1,2,3*], Radia ABOURA[1], Sana BOUJAAFAR[1], Gabrielle LUI[1,2,3],Déborah HIRT[1,2,3], Naïm Bouazza[2,3], Frantz Foissac[2,3], Jean-Marc TRELUYER[1,2,3], Sihem BENABOUD[1,2,3], Inès GANA[1]

1. Service de Pharmacologie Clinique, Hôpital Cochin, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Paris Centre, Paris, France
2. EA 7323, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75006 Paris, France
3. Unité de Recherche Clinique Paris Descartes Necker Cochin, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France.

[*] **Corresponding author:** Yi Zheng zhengyi86@hotmail.fr

Highlight:

- **This paper proposes an HPLC-MS/MS method to determine raltegravir-β-D-glucuronide, rilpivirine, raltegravir, darunavir, dolutegravir, elvitegravir and ritonavir in human plasma using isotopic labeled internal standards.**
- **This method requires only 100µL of plasma from patients.**
- **This method is simple, reliable, cost-effective and suitable for routine analysis and clinical research.**

Keywords: Liquid chromatography; Tandem mass spectrometry; Antiretroviral; Therapeutic drug monitoring

Word count: 3513

Tables: 3

Figures: 1 (print without color)

Graphic abstract (print without color)

Abstract

Therapeutic drug monitoring (TDM) is essential in the optimization of antiretroviral (ARV) treatments. In this work, we describe a new method for the simultaneous quantification of six molecules: the three novel ARV agents dolutegravir (DTG), elvitegravir (ELV) and rilpivirine (RPV), the first integrase inhibitor raltegravir (RAL) and its major metabolite the raltegravir-β-D-glucuronide (RAL-GLU), a protease inhibitor darunavir (DRV) and its booster ritonavir (RTV) in human plasma. The drugs were extracted from 100µL of plasma by a simple method of protein precipitation using acetonitrile. The separation was carried out on a Kinetex phehyl-hexyl column using a phase mobile composed of 55% of water (0.05% formic acid,v/v) and 45% of methanol (0.05% formic acid,v/v). The flow rate was set at 0.5mL/min. The calibration ranged from 60 to 15000 ng/mL for DRV, from 20 to 5000 ng/mL for DTG and ELV, from 10 to 2500 ng/mL for RAL, RAL-GLU, RTV and RPV. The proposed method was validated with a good precision (inter- and intra-day CV% inferior to 12.3%) and a good accuracy (inter- and intra-day bias between -9.9% and 10%) for all the analytes. The proposed method is simple, reliable and suitable for therapeutic drug monitoring (TDM) and for pharmacokinetics studies.

1. Introduction

Rilpivirine (RPV), dolutegravir (DTG) and elvitegravir (ELV) are the three newest licensed ARV drugs. As the second generation of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), RPV presents the same efficacy as efavirenz but better safety [1,2]. DTG, ELV and raltegravir (RAL) are three integrase inhibitors approved by the FDA. They rapidly decrease viral loads by inhibiting the integrase enzyme which is essential for viral survival [3]. World Health Organization (WHO) currently recommends DTG-based regimen as the preferred first-line anti-retroviral treatment for the people infected with HIV [4]. RAL is also recommended as the preferred first-line regimen for neonates, and for the infants and children in whom DTG cannot be used [4]. Finally, the combination of DTG and DRV boosted by RTV with 1 or 2 Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs) is recommended as an alternative second line regimen for treatment of adults and children [4].

Therapeutic drug monitoring (TDM) of ARV drugs is recommended [5–7] to optimize efficacy, avoid resistance and minimize toxicity. Several analytical methods have been reported to determine simultaneously the concentrations of one or two in the three newest ARV(RPV, DTG and ELV) with or without the other ARV using either LC-MS/MS [8–10] or HPLC-UV[11,12] and one method for the simultaneous quantification RPV, DTG and ELV without the others ARV using HPLC-UV[13]. As far as we know, a single validated method has been reported for the simultaneous quantification of RPV, DTG, ELV with the other ARV in plasma using UPLC-MS/MS[14]. However, the main drawback of this method is the lack of isotopic labeled internal standards (IS), which could result in potential matrix effects. Furthermore, this method was not suitable for the laboratory that doesn't have UPLC system.

Raltegravir-glucuronide (RAL-GLU) is the main metabolite of RAL[15]. A large inter- and intra-individual variability in RAL plasmatic concentrations (85.9% and 124.6% respectively) have been reported [16]. Assaying RAL-GLU plasmatic concentrations could be helpful to better understand this large inter- and intra-individual variability in RAL plasmatic concentrations. To date, clinical data including RAL-GLU plasmatic concentrations are very sparse, possibly due to the fact that only one fully validated analytical method has been reported.

The aim of this study was to develop and validate a novel analytical HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of RPV, DTG, ELV, RAL, RAL-GLU, DRV and RTV in human plasma using the corresponding isotopic labeled internal standards.

2. Material and methods

2.1 Standards and reagents

Raltegravir potassium salt, dolutegravir, elvitegravir, [$^{2}H_{6}$]-raltegravir-glucuronide, [$^{13}C_{6}$]-rilpivirine, [^{13}C, $^{2}H_{5}$]-dolutegravir, [$^{13}C_{6}$]-darunavir and [$^{13}C_{6}$]-elvitegravir were acquired from Alsachim (Strasbourg, France). Raltegravir-glucuronide, rilpivirine, darunavir, [$^{2}H_{3}$]-raltegravir and [$^{2}H_{6}$]-ritonavir were purchased from TRC (Toronto, Canada). Methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), formic acid and ammonium format, all in LC/MS grade, and ritonavir were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). LC/MS grade water was purchased from J.T.Baker (Gliwice, Poland). Drug free plasma was obtained from Utak Laboratories (Valencia, Spain) and stored at -20°C.

2.2 Chromatographic conditions

Molecule separation was carried out on an Accela® System liquid chromatography (Fisher scientific, les Ulis, France) using a reversed phase Kinetex phenyl-hexyl

analytical column (5 µm, 100 mm x 3 mm; Phenomenex, Le Pecq Cedex, France) associated with a Kinetex phenyl-hexyl guard column. The column temperature was set at 30°C. Compounds were eluted using a gradient with a flow rate of 0.5 mL/min. The mobile phase consisted of water (A) and acetonitrile (B), both with 0.05% (v/v) formic acid. The optimized gradient conditions were as follows: isocratic elution from 0 min to 1 min with 45% of B, then a linear gradient up to 100% of B from 1 min to 12 min. After holding at 100% of B during 1 min, the mobile phase composition returned to 45% of B in 0.1 min and followed by a re-equilibration step for 5 min.

Mass spectrometry detection was performed on a TSQ Quantum discovery MAX triple quadrupole mass-spectrometer (Fisher scientific, les Ulis, France). After Heated-ElectroSpray Ionization (H-ESI), RAL-GLU and [$^2H_6$]-raltegravir-glucuronide ([$^2H_6$]-RAL-GLU) were detected in the negative multiple reaction monitoring (MRM) mode, all the other molecules were detected in the positive MRM mode. The two mass transitions with the best responses were selected for each analyte, one for quantification (first ion trace) and the second (secondary ion trace) for confirmation, and only one transition of quantification was used for each IS. Transitions, collision energies and tube lens used for each analyte and each IS were listed in the Table 1. The following parameters were optimized to achieve the best sensitivity: capillary voltage was set at 3 kV; the gas transfer temperature at 350˚C; sheath gas at 45 psi, and auxiliary gas at 35 psi. Nitrogen employed as both nebulizing and auxiliary gas was supplied by a NM 30 LA generator (LabGaz System, Massy, France).

Xcalibur software (version 2.0, Thermofisher Scientific) was used for instrument control, data acquisition and analysis.

Table.1 Parent to fragment (daughters) mass transition and relative collision energies (CE), tube lens used for each analyte and internal standard using HPLC-MS/MS

Analytes	Transition (m/z)		Collision energy (V)	Tube Lens (V)	Retention time (min)
Raltegravir-glucuronide	Quantification	619.100>>316.160	32	60	2.8
	Confirmation	619.100>>443.210	19		
Rilpivirine	Quantification	367.102>>195.090	33	97	4.0
	Confirmation	367.102>>128.050	60		
Raltegravir	Quantification	445.117>>108.970	33	76	5.3
	Confirmation	445.117>>361.110	16		
Darunavir	Quantification	548.156>>392.190	13	58	6.1
	Confirmation	548.156>>436.180	5		
Dolutegravir	Quantification	420.100>>277.070	33	92	6.7
	Confirmation	420.100>>126.980	60		
Elvitegravir	Quantification	448.072>>344.050	29	84	9.1
	Confirmation	448.072>>430.150	20		
Ritonavir	Quantification	721.600>>296.090	17	84	9.4
	Confirmation	721.600>>268.060	28		
[$^{2}H_6$]-Raltegravir-glucuronide	Quantification	625.070>>322.200	31	55	2.8
[$^{13}C_6$]-rilpivirine	Quantification	373.140>>195.140	35	90	4.0
[$^{2}H_6$]-raltegravir	Quantification	448.136>>108.960	34	73	5.3
[$^{13}C_6$]-darunavir	Quantification	554.177>>398.230	13	62	6.1
[^{13}C, $^{2}H_5$]-dolutegravir	Quantification	426.144>>277.060	28	113	6.7
[$^{13}C_6$]-elvitegravir	Quantification	454.124>>350.040	32	76	9.1
[$^{2}H_6$]-ritonavir	Quantification	725.120>>300.120	33	84	9.5

2.3 Preparation of calibration standards and quality control samples

Stock solutions of RPV, DTG, ELV, RAL, RAL-GLU, DRV and RTV were separately prepared for calibration standards (CALs) and quality control samples (QCs) in LC/MS grade methanol at a final concentration of 1mg/mL. Stock solutions of [$^{13}C_6$]-darunavir

([$^{13}C_6$]-DRV), [^{13}C,$^{2}H_5$]-dolutegravir ([^{13}C,$^{2}H_5$]-DTG), [$^{13}C_6$]-elvitegravir ([$^{13}C_6$]-ELV), [$^{2}H_6$]-RAL-GLU, [$^{2}H_6$]-raltegravir ([$^{2}H_3$]-RAL), [$^{2}H_6$]-ritonavir ([$^{2}H_6$]-RTV) and [$^{13}C_6$]-rilpivirine ([$^{13}C_6$]-RPV) were also prepared in LC/MS grade methanol at a concentration of 1mg/mL. All these stock solutions were aliquoted, then stored at -20°C in darkness.

The day of analysis, two working solutions which contain 6 and 150 µg/mL of DAR, 2 and 50 µg/mL of DTG and ELV, 1 and 25 µg/mL of RAL, RAL-GLU, RTV and RPV were diluted with appropriate volume drug-free plasma to prepare CALs. A set of eight CALs with DAR in the range of concentrations from 60 to 15000 ng/mL, with DTG and ELV in the range from 20 to 5000 ng/mL, with RAL, RAL-GLU, RTV and RPV in the range from 10 to 2500 ng/mL was prepared.

Four levels of QCs for lower limit of quantification (LLOQ), low quality control (LQC), medium quality control (MQC) and high quality control (HQC) were prepared freshly at concentrations of 60, 180, 6000, 12000 ng/mL for DAR; 20, 60, 2000 and 4000 ng/mL for DTG and ELV; 10, 30, 1000 and 2000 ng/mL for RAL, RAL-GLU, RTV and RPV respectively.

An IS working solution of 625 ng/mL for [$^{2}H_6$]-RAL-GLU, [$^{2}H_6$]-RAL, [$^{2}H_6$]-RTV and [$^{13}C_6$]-RPV, and 1250 ng/mL for [$^{13}C_6$]-DRV, [^{13}C, $^{2}H_5$]-DTG and [$^{13}C_6$]-ELV was freshly prepared by dilution from stock solution of each IS in LC/MS grade water.

2.4 Sample preparation

A volume of 100 µL of plasma of each sample was mixed with 20 µl of IS working solution. Then, 300 µl of acetonitrile was added to precipitate the proteins. The mixture was vortexed for 5 minutes (VX-2500 Multi-Tube Vortexer®, VWR), then centrifuged at 17000 g at 4°C for 10 minutes. The supernatants were transferred into glass tubes and

evaporated to dryness at room temperature under a gentle nitrogen stream. Two hundred microliters of mobile phase were added to reconstitute the dry residue. After 10 minutes of centrifugation at 17000 g at 4°C, 25 µl of supernatant of each sample was injected and analyzed in the LC-MS/MS system.

2.5 Method validation

The method was validated according to the Food and Administration (FDA) [17] and European Medicines Agency (EMA) [18] guidelines for bioanalytical method validation.

2.5.1 Specificity and selectivity

LLOQ of each molecule was determined based on the signal-to-noise ratio which was at least of 10:1. Selectivity of the method was confirmed by analyzing 10 drug-free human plasmas to rule out the risk of interference with endogenous compounds. Specificity of the method was also investigated by analyzing 39 potential co-medications including 19 antibiotics (amoxicillin, cefazolin, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, cloxacillin, ciprofloxacin, flucytosine, levofloxacin, isoniazid, meropenem, moxifloxacin, rifampicin, sulfamethoxazole, trimethoprim, piperacillin, paracetamol, pefloxacin and pyrazinamide), 4 antifungics (fluconazole, itraconazole, voriconazole and posaconazole), 12 ARVs (lamivudine, tenofovir, maraviroc, abacavir, efavirenz, lopinavir, cidofovir, emtricitabine, zidovudine, ganciclovir, nevirapine and atazanavir) and 4 antiepileptics (clobazam, lamotrigine, levetiracetam and carbamazepine) at plasma therapeutic levels. The MRM signal of interference for each analyte should be less than 20% of the LLOQ for the corresponding analytes and less than 5% for the corresponding IS.

2.5.2 Linearity, accuracy and precision

The linearity of the method was evaluated by analyzing three complete standard curves

on three different days. With each standard curve, four levels of CQs were assayed with five replicates. Calibration curves, which were plotted using the ratio of peak area of analyte/peak area of IS versus analyte concentration, were calculated using either linear regression with weight of $1/X^2$ for RAL-GLU, RAL, DTG, ELV and RTV or quadratic regression with weight of 1/X for RPV and DRV. Repeatability and reproducibility of the method were evaluated by analyzing the intra- and inter-day precision (coefficient of variation, expressed as CV%) and accuracy (expressed as bias) of four levels of CQs. Five replicates of each level of CQs were assayed in one run for the intra-day study and in three runs on three different days for the inter-day study. The CV and bias should be within ±15% except LLOQ which should not exceed 20%. The carry-over study was performed with three replicates by injecting two extracted drug-free plasma after the injection of an upper limit of CALs.

2.5.3 Recovery, matrix effect, and carry over

Absolute recovery of the analytes and IS was determined by comparing the mean peak areas of extracted plasma samples to those of reference standards. The reference standards were prepared by directly diluting the working solution of all the analytes in the extracted blank plasma at the same concentration. Matrix effect of the method was investigated in 6 different plasmas by comparing the mean peak areas of the analytes diluted in extracted blank plasma with the peak areas of the analytes diluted in phase mobile at the same concentration. For recovery and matrix effect tests, two concentrations at LQC (30ng/mL for RAL-GLU, RPV, RAL and RTV, 60 ng/mL for DTG and ELV, and 180ng/mL for DAR) and HQC (2000 ng/mL for RAL-GLU, RPV, RAL and RTV, 4000 ng/mL for DTG and ELV, and 12000 ng/mL for DAR) were analyzed with six replicates in a single run.

The carry over study was performed by injecting two extracted blank plasmas after the injection of the upper limit of CAL. The interference should not exceed 20% of the LLOQ and 5% of the IS.

2.5.4 Stability

Different stability tests for these analytes have been already conducted in previous studies. Thus, all the analytes are known to be stable after at least 3 freeze-thaw cycles. Furthermore, plasma can be stored at room temperature for 24 hours without any significant change in drug level [8,15,19]. For long term stability study, all the other analytes, except RAL-GLU (no data available), have already been reported to be stable at -20°C for at least 6 weeks [12,20,21]. Short-term stability (+4°C and room temperature for 24 hours) of the processed samples and long-term stability (-20°C for 1 month) of the unprocessed plasma samples were investigated in our study. Two levels of concentration at LQC and HQC for all the analytes were analyzed in triplicate, for each stability test. The concentrations observed at the end of the stability study condition were compared with those of the beginning. The bias and CV should not exceed 15% for this stability test.

2.5.5 Application

This method was confirmed by analyzing the external quality control samples from ASQUALAB (Paris, France). This program of external quality control was confirmed by ISO 9001. More than twenty laboratories took part in the program for analyzing the different ARV. Our results were compared with the mean concentrations obtained by all the participants. With the Z-score less than 2 and the bias less than 25% for the two different level of external quality control, the method could be considered to be reliable

[22].

The proposed method has been successfully applied to the plasmas of routine TDM from HIV-infected patients and to the RalFE ANRS 160 study. The RalFE ANRS 160 study was an open-label, multicenter, phase II randomized trial which was approved by the French Ethics Committee. The aim was to study pharmacokinetic properties of raltegravir in pregnant women infected by HIV-1, during the third trimester of pregnancy (between 30 and 37 weeks of amenorrhea) and 1 month after childbirth.

3. Results and discussion

3.1 Method development

As shown in a previous study[15], RAL-GLU was degraded to RAL in source, baseline chromatographic separation was obligatory to avoid interference from each other. Several different types of reversed phase columns have been tested. Finally, the kinetex phenyl-hexyl column (100*3mm, 5µm) was chosen in order to have sharp and symmetric peaks, correct retention times, and most importantly, a good separation for all the analytes. For the mobile phase, as ACN had an interaction effect with the phenyl-hexyl column, methanol was chosen in this method. As previously reported for LC-MS/MS method [14,15,23], 0.05% formic acid were added in the mobile phase (water and methanol) to optimize the ionization of these molecules. In these chromatographic conditions, the retention times were 2.8 minutes for RAL-GLU, 4.0 minutes for RPV, 5.3 minutes for RAL, 6.1 minutes for DRV, 6.7 minutes for DTG, 9.1 minutes for ELV and 9.4 minutes for RTV. The chromatogram from blank plasma samples and LLOQ of each analytes were shown in FIG 1.

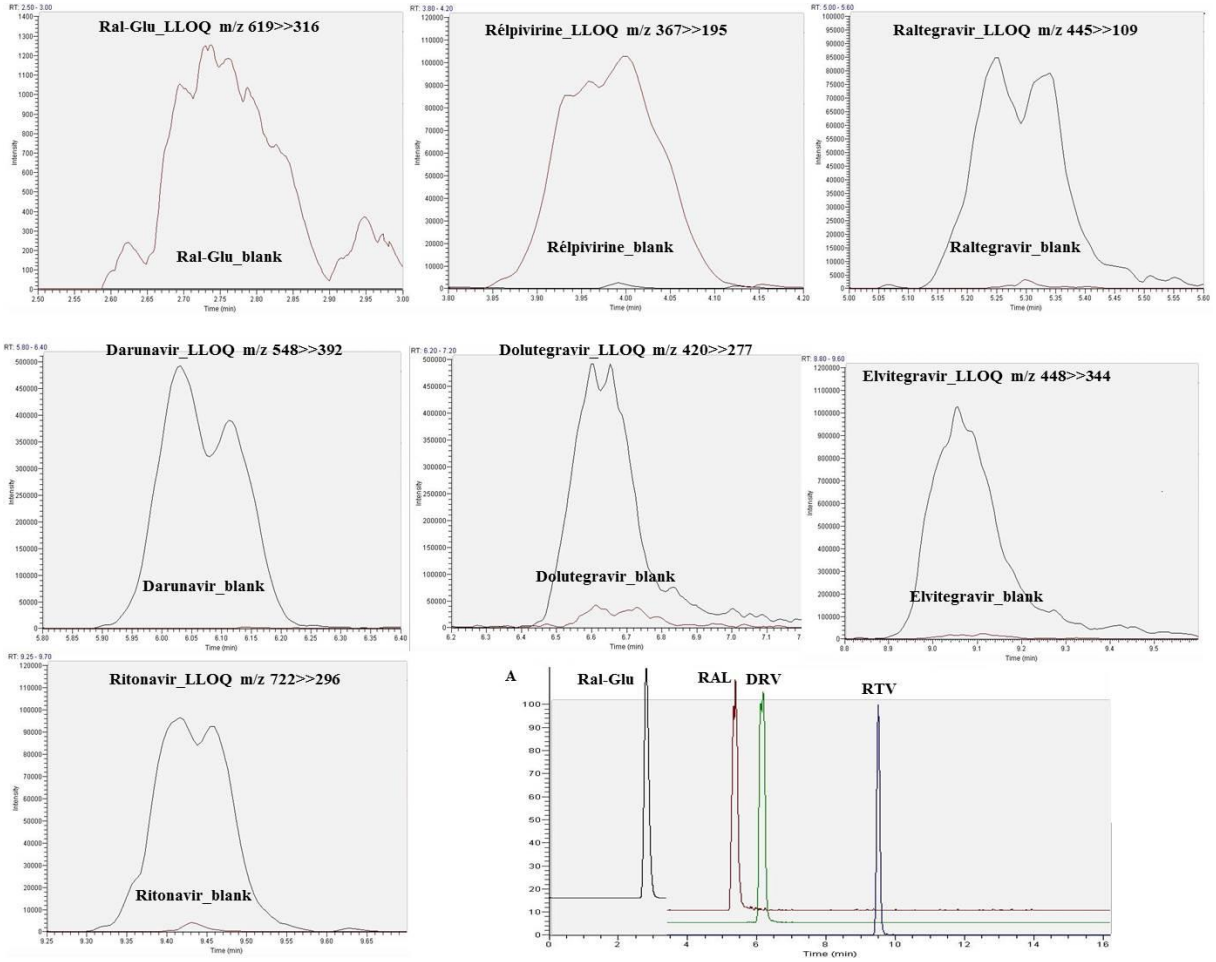


Fig 1. Typical chromatogram of blank extracs and LLOQ of each analyte : raltegravir-β-D-glucuronide (Ral-Glu, 10 ng/mL) at 2.8 min, rilpivirine (10 ng/mL) at 4.0 min, raltegravir (10 ng/mL) at 5.3 min, darunavir (60 ng/mL) at 6.1 min, dolutegravir (20 ng/mL) at 6.7 min, elvitegravir (20 ng/mL) at 9.1 min and ritonavir (RTV, 10 ng/mL) at 9.4 min with absolute abundance (cps) in Y axis and retention time (min) in X axis. A) Chromatogram of a C_{12h} plasma sample from a patient receiving a combination treatment of raltegravir 400 mg twice-daily (concentration of raltegravir: 449ng/mL and concentration of raltegravir-glucuronide: 77ng/mL), darunavir 600 mg twice-daily (concentration: 1499 ng/mL) and ritonavir 100 mg twice daily (concentration: 289 ng/mL), with relative abundance in Y axis and retention time in X axis.

3.2 Method Validation

3.2.1 LLOQ, specificity and selectivity

The LLOQ was 10 ng/mL RAL-GLU, RPV, RAL and RTV, 20 ng/mL for DTG and ELV, and 60 ng/mL for DRV.

For the specificity analysis, 39 drugs (listed in the section 2.5) were tested. Selectivity of

the method was also investigated by analyzing 10 different blank plasmas. No significant interference from exogenous or endogenous compounds was found in both tests of specificity and selectivity.

3.2.2 Linearity, accuracy and precision

Calibration curves were linear and ranged from 10 to 2500 ng/mL for RAL-GLU, RAL, RTV and RPV, from 20 to 5000 ng/mL for DTG and ELV, and from 60 to 15000 ng/mL for DRV. The correlation coefficients (r^2) of the calibration curves exceeded 0.995 for all the analytes showing a good linearity of the method for each analyte. The values of accuracy and precision were below 10% and 13% for the intra- and inter-day studies, respectively (Table 2). Taken together, these results indicate the reliability of the present method.

Table 2. Precision and accuracy of raltegravir, dolutegravir, elvitegravir, rilpivirine, darunavir, ritonavir and raltegravir-glucuronide in human plasma

		Intra-day (n=5)		Inter-day (n=15)	
	Theoretical (µg/L)	Bias* (%)	Precision (%)	Bias* (%)	Precision (%)
Raltegravir-ß-D-glucuronid	10	5.2	8.4	9.1	7.7
	30	-9.9	5.9	-0.9	9.3
	1000	-1.3	5.1	1.4	4.0
	2000	6.1	7.8	5.9	5.6
Rilpivirine	10	-5.0	9.0	-2.5	12.3
	30	-9.5	6.9	-1.4	9.3
	1000	-3.4	5.1	0.5	6.2
	2000	7.0	6.8	4.2	5.8
Raltegravir	10	4.3	8.1	5.9	7.2
	30	-7.6	6.4	-7.6	7.4
	1000	4.1	6.0	3.6	4.0
	2000	10.0	6.7	7.1	5.9
Darunavir	60	4.9	5.4	6.0	12.1
	180	-8.4	3.3	-4.4	7.8
	6000	-2.8	4.9	-4.3	5.0
	12000	7.8	7.6	0.9	8.3
Dolutegravir	20	-7.3	5.1	1.0	8.0
	60	-7.2	6.0	-1.8	8.9
	2000	0.2	3.2	2.5	4.9
	4000	1.9	9.2	3.8	7.5
Elvitegravir	20	-6.8	5.8	1.98	10.4
	60	-8.6	3.5	-2.9	7.9
	2000	1.8	4.3	1.9	4.7
	4000	9.2	7.3	6.6	6.1
Ritonavir	10	-1.9	8.2	2.1	11.1
	30	-9.5	5.7	-6.6	7.5
	1000	-1.1	4.5	-2.5	4.3
	2000	8.7	7.5	2.1	8.5

**Accuracy is expressed as bias*

3.2.3 Matrix effect, recovery and carry over

The matrix effects (n=6 different plasmas) were between 82-111% for RAL-GLU, 103-111% for RLV, 94-106% for RAL, 98-108% for DRV, 96-106% for DTG, 97-108% for ELV and 102-115% for RTV, which suggests that no ionization enhancement or suppression was observed.

The recovery of each analyte obtained by analyzing LOQ and HOQ were 96% and 91% for RAL-GLU, 103% and 100% for RPV, 102% and 94% for RAL, 101% and 100% for DRV, 101% and 98% for DTG, 105% and 99% for ELV, 111% and 101% for RTV, respectively. These results of recovery was similar with the previously reports[8,14,15,24] using ACN or ANC plus methanol precipitation methods.

No carry over effect was observed for all analytes and IS.

3.2.4 Stability

Table 3 presents the results of stability studies. With bias between -13% to 15%, all the analytes could be considered as stable at autosampler temperature (8°C) and at room temperature during 24 hours in mobile phase after being processed and at -20°C in plasma for 1 month.

Table 3. Stability of raltegravir-glucuronide, rilpivirine, raltegravir, darunavir, dolutegravir, elvitegravir and ritonavir under various storage conditions (n=4 for each value)

		processed samples				unprocessed samples	
		At RT[1] (24H)		At 8°C (24H)		At -20°C (1 MOIS)	
	Concentration (mg/L)	Stability[2] (%)	CV[3] (%)	Stability[2] (%)	CV[3] (%)	Stability[2] (%)	CV[3] (%)
Raltegravir-glucuronide	30	98.3	4.3	-12.8	13.4	96.2	1.4
	2000	102.8	4.5	7.2	3.5	103.2	1.5
Rilpivirine	30	97.7	4.6	3.6	14.2	97.1	3.2
	2000	97.3	5.1	-2.1	4.4	105.5	7.7
Raltegravir	30	92.6	3.9	-12.9	2.2	104	2.1
	2000	106.1	1.1	9.6	3.5	106.5	0.5
Darunavir	180	104.6	5.0	-1.5	4.0	99.2	1.5
	12000	101.7	5.1	3.2	3.0	104.8	1.3
Dolutegravir	60	92.6	3.4	-9.3	0.3	96.2	1.8
	4000	97.4	5.4	5.3	1.5	99.3	1.1
Elvitegravir	60	94.8	0.5	-6.1	0.6	103.7	6.9
	4000	101.7	2.4	1.2	1.3	114	7.6
Ritonavir	30	107.1	5.3	14.8	9.7	105.3	1.1
	2000	105.6	4.1	5.9	6.7	115	6.8

3.2.5 Application

Since 2019, one low concentration level and one high concentration level of external quality control samples were analyzed for DRV and RTV. The Z-scores (bias) obtained were -0.21 (-1.7%) and -1.3 (-0.12%) for the low concentration level of DRV and RTV, 1.9 (18.3%) and 0.42 (5.3%) for the high concentration level of DRV and RTV, respectively. These results confirm the reliability of the proposed method.

In the RalFE ANRS 160 study, a total of 39 trough concentrations (C_{trough}) of raltegravir and raltegravir-glucuronide from 39 pregnant women during the third trimester were obtained. The median C_{trough} raltegravir and raltegavir-glucuronide were 77 ng/mL and 112 ng/mL respectively, with a range from 11 to 749 ng/mL for raltegravir and from 23 ng/mL to 1310 ng/mL for raltegravir-glucuronide. This found is in accordance with the only two previous studies of pharmacokinetics of raltegravir in pregnancy [25,26], in which the median Ctrough (range) of raltegravir in the third trimester of pregnancy was found to be 77 ng/mL (43 to 137 ng/mL) by Blonk et al.[25] in PANNA study and to be 64 ng/mL (11 to 607 ng/mL) by Watts et al. [26] in IMPAACT 1026s study.

In this study, 6 women received 600 mg darunavir and 100mg ritonavir twice daily as the co-treatment with raltegravir during the third trimester of pregnancy. The median C_{trough} (interquartile range) of darunavir and ritonavir obtained were 2319 ng/mL (1499-3485 ng/mL) and 293 ng/mL (183-319 ng/mL). This result is comparable with the result obtained from the HIV-infected women during the third trimester of pregnancy by Stek et al. in IMPACCT network Protocol P1026 study [27] in which the median C_{trough} (interquartile range) of darunavir and ritonavir were found to be 2220 ng/mL (1680-3260ng/mL) and 180 µg/mL (110-250 ng/mL) respectively. A chromatogram of one of the six pregnant women receiving a combination of

raltegravir/darunavir/ritonavir at the dosage of 400mg/600/mg/100mg twice daily was show in Fig. 1 (Chromatogram A). The concentrations obtained were 449 ng/mL, 77 ng/mL, 1499 ng/mL and 289 ng/mL for raltegravir, raltegravir-glucuronide, darunavir and ritonavir respectively.

4. Conclusion

Here, we present the first fully developed and validated HPCL-MS/MS method allowing the simultaneous quantification of RAL, RAL-GLU, DGT, ELV, RLV, DRV and RTV in human plasma samples. To the best of our knowledge, only one fully validated method [14] has been published, which simultaneously quantifies RAL, DGT, ELV, RLV, DRV and RTV on UPLC-MS/MS using quinoxalone as IS for all the analytes. But no HPLC method was available. The proposed method could contribute to the TDM or pharmacokinetics studies of these molecules in laboratories having no UPLC-MS/MS. Furthermore, our study uses isotopic labeled internal standards, a “gold reference" when quantification is performed using a mass spectrometry detector. Although, it is more expensive, it could better respect the analytes and avoid potential matrix effect from co-eluting endogenous or exogenous compounds which could be present in blood samples from some patients[24]. Furthermore, the proposed method needs only 100µL of patients’ plasma samples which simplify the collection of blood samples from the children.

The proposed method is precise, accurate, specific and sensitive, suitable for the TDM of routine clinical practice and pharmacokinetic studies of raltegravir-glucuronide, raltegravir, dolutegravir, elvitegravir, rilpivirine, darunavir and ritonavir.

Reference

[1] M. Sharma, L.D. Saravolatz, Rilpivirine: a new non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, J. Antimicrob. Chemother. 68 (2013) 250–256. doi:10.1093/jac/dks404.

[2] D. Jayaweera, P. Dilanchian, New therapeutic landscape of NNRTIs for treatment of HIV: a look at recent data, Expert Opin. Pharmacother. 13 (2012) 2601–2612. doi:10.1517/14656566.2012.742506.

[3] Y. Han, T. Mesplède, M.A. Wainberg, Investigational HIV integrase inhibitors in phase I and phase II clinical trials, Expert Opin. Investig. Drugs. 26 (2017) 1207–1213. doi:10.1080/13543784.2017.1378643.

[4] WHO-CDS-HIV-18.51-eng.pdf, (n.d.). https://apps-who-int.gate2.inist.fr/iris/bitstream/handle/10665/277395/WHO-CDS-HIV-18.51-eng.pdf (accessed March 18, 2019).

[5] F. Parant, P. Miailhes, F.B. and M.-C. Gagnieu, Dolutegravir-Related Neurological Adverse Events: A Case Report of Successful Management with Therapeutic Drug Monitoring, Curr. Drug Saf. (2018). http://www.eurekaselect.com/159092/article (accessed July 12, 2018).*

[6] P. Clevenbergh, S. Mouly, P. Sellier, E. Badsi, J. Cervoni, V. Vincent, H. Trout, J.-F. Bergmann, Improving HIV infection management using antiretroviral plasma drug levels monitoring: a clinician's point of view, Curr. HIV Res. 2 (2004) 309–321.

[7] D. Kreutzwiser, N. Sheehan, N. Dayneka, B. Lemire, A. Wong, L. Samson, J. Brophy, Therapeutic drug monitoring guided raltegravir dosing for prevention of vertical transmission in a premature neonate born to a woman living with perinatally acquired HIV, Antivir. Ther. 22 (2017) 545–549. doi:10.3851/IMP3139.

[8] Z. Djerada, C. Feliu, C. Tournois, D. Vautier, L. Binet, A. Robinet, H. Marty, C. Gozalo, D. Lamiable, H. Millart, Validation of a fast method for quantitative analysis of elvitegravir, raltegravir, maraviroc, etravirine, tenofovir, boceprevir and 10 other antiretroviral agents in human plasma samples with a new UPLC-MS/MS technology, J. Pharm. Biomed. Anal. 86 (2013) 100–111. doi:10.1016/j.jpba.2013.08.002.

[9] P.D.J. Bollen, M.J.A. de Graaff-Teulen, S. Schalkwijk, N.P. van Erp, D.M. Burger, Development and validation of an UPLC-MS/MS bioanalytical method for simultaneous quantification of the antiretroviral drugs dolutegravir, elvitegravir, raltegravir, nevirapine and etravirine in human plasma, J. Chromatogr. B. 1105 (2019) 76–84. doi:10.1016/j.jchromb.2018.12.008.

[10] K. Tsuchiya, M. Ohuchi, N. Yamane, H. Aikawa, H. Gatanaga, S. Oka, A. Hamada, High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for simultaneous determination of raltegravir, dolutegravir and elvitegravir concentrations in human plasma and cerebrospinal fluid samples, Biomed. Chromatogr. 32 (2018) e4058. doi:10.1002/bmc.4058.

[11] V. Cozzi, N. Charbe, S. Baldelli, S. Castoldi, C. Atzori, D. Cattaneo, E. Clementi, Development and

Validation of a Chromatographic Ultraviolet Method for the Simultaneous Quantification of Dolutegravir and Rilpivirine in Human Plasma, Ther. Drug Monit. 38 (2016) 407–413. doi:10.1097/FTD.0000000000000290.

[12] N. Charbe, S. Baldelli, V. Cozzi, S. Castoldi, D. Cattaneo, E. Clementi, Development of an HPLC–UV assay method for the simultaneous quantification of nine antiretroviral agents in the plasma of HIV-infected patients, J. Pharm. Anal. 6 (2016) 396–403. doi:10.1016/j.jpha.2016.05.008.

[13] M. Tempestilli, A. Ammassari, A. D'Avolio, S. Cicalini, A.L. Gallo, S. Fazio, A. Antinori, L.P. Pucillo, Development and validation of an HPLC-UV method for quantification of elvitegravir and two other new antiretrovirals, dolutegravir and rilpivirine, in the plasma of HIV-positive patients, Biomed. Chromatogr. BMC. (2018) e4274. doi:10.1002/bmc.4274.

[14] M. Simiele, A. Ariaudo, A. De Nicolò, F. Favata, M. Ferrante, C. Carcieri, S. Bonora, G. Di Perri, A. D'Avolio, UPLC–MS/MS method for the simultaneous quantification of three new antiretroviral drugs, dolutegravir, elvitegravir and rilpivirine, and other thirteen antiretroviral agents plus cobicistat and ritonavir boosters in human plasma, J. Pharm. Biomed. Anal. 138 (2017) 223–230. doi:10.1016/j.jpba.2017.02.002.

[15] L.-Z. Wang, L.S.-U. Lee, W.-L. Thuya, G.H. Soon, L.-R. Kong, P.-L. Nye, E.J. Deoon Lee, C. Flexner, B.-C. Goh, Simultaneous determination of raltegravir and raltegravir glucuronide in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometric method, J. Mass Spectrom. 46 (2011) 202–208. doi:10.1002/jms.1874.

[16] S. Fortuna, M. Fabbiani, S. Digiambenedetto, E. Ragazzoni, L. Lisi, R. Cauda, P. Navarra, Variability of Raltegravir Plasma Levels in the Clinical Setting, Pharmacology. 92 (2013) 43–48. doi:10.1159/000351851.

[17] Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, (2019). http://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry (accessed March 6, 2019).

[18] guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf, Eur. Med. Agency. (n.d.). https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (accessed June 3, 2019).

[19] M. Grégoire, G. Deslandes, C. Renaud, R. Bouquié, C. Allavena, F. Raffi, P. Jolliet, E. Dailly, A liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay for quantification of rilpivirine and dolutegravir in human plasma, J. Chromatogr. B. 971 (2014) 1–9. doi:10.1016/j.jchromb.2014.09.006.

[20] A. Fayet, A. Béguin, B. Zanolari, S. Cruchon, N. Guignard, A. Telenti, M. Cavassini, H.F. Günthard, T. Buclin, J. Biollaz, A LC–tandem MS assay for the simultaneous measurement of new antiretroviral agents: Raltegravir, maraviroc, darunavir, and etravirine, J. Chromatogr. B. 877 (2009) 1057–1069. doi:10.1016/j.jchromb.2009.02.057.

[21] S.D. Penchala, S. Fawcett, L. Else, D. Egan, A. Amara, E. Elliot, E. Challenger, D. Back, M. Boffito, S. Khoo, The development and application of a novel LC–MS/MS method for the measurement of Dolutegravir, Elvitegravir and Cobicistat in human plasma, J. Chromatogr. B. 1027 (2016) 174–180. doi:10.1016/j.jchromb.2016.05.040.

[22] P. Hill, A. Uldall, P. Wilding, Fundamentals for External Quality Assessment (EQA) Guidelines for Improving Analytical Quality by Establishing and Managing EQA schemes . Examples from basic chemistry using limited resources, in: 1999.

[23] L. Else, V. Watson, J. Tjia, A. Hughes, M. Siccardi, S. Khoo, D. Back, Validation of a rapid and sensitive high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS) assay for the simultaneous determination of existing and new antiretroviral compounds, J. Chromatogr. B. 878 (2010) 1455–1465. doi:10.1016/j.jchromb.2010.03.036.

[24] M. Aouri, A. Calmy, B. Hirschel, A. Telenti, T. Buclin, M. Cavassini, A. Rauch, L.A. Decosterd, A validated assay by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous quantification of elvitegravir and rilpivirine in HIV positive patients: LC tandem MS of elvitegravir and rilpivirine, J. Mass Spectrom. 48 (2013) 616–625. doi:10.1002/jms.3200.

[25] M.I. Blonk, A.P.H. Colbers, C. Hidalgo-Tenorio, K. Kabeya, K. Weizsäcker, A.E. Haberl, J. Moltó, D.A. Hawkins, V.D. Ende, M. E, A. Gingelmaier, G.P. Taylor, J. Ivanovic, C. Giaquinto, D.M. Burger, A.J. a. M. van der Ven, J. Nellen, F. Lyons, J. Lambert, C. Wyen, G. Faetkenheuer, J.K. Rockstroh, C. Schwarze-Zander, S.T. Sadiq, Y. Gilleece, C. Wood, Raltegravir in HIV-1–Infected Pregnant Women: Pharmacokinetics, Safety, and Efficacy, Clin. Infect. Dis. 61 (2015) 809–816. doi:10.1093/cid/civ366.

[26] D.H. Watts, A. Stek, B.M. Best, J. Wang, E.V. Capparelli, T.R. Cressey, F. Aweeka, P. Lizak, R. Kreitchmann, S.K. Burchett, D.E. Shapiro, E. Hawkins, E. Smith, M. Mirochnick, IMPAACT 1026s study team, Raltegravir pharmacokinetics during pregnancy, J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 1999. 67 (2014) 375–381. doi:10.1097/QAI.0000000000000318.

[27] A. Stek, B.M. Best, J. Wang, E.V. Capparelli, S.K. Burchett, R. Kreitchmann, K. Rungruengthanakit, T.R. Cressey, L.M. Mofenson, E. Smith, D. Shapiro, M. Mirochnick, Pharmacokinetics of Once Versus Twice Daily Darunavir in Pregnant HIV-Infected Women:, JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 70 (2015) 33–41. doi:10.1097/QAI.0000000000000668.

Deuxième étude : Quantification de la forme libre du raltégravir, du dolutégravir et du darunavir par ultrafiltration, associée à une méthode de LC-MS/MS

Revue de la littérature

Le RAL, le DTG et le DRV sont trois ARVs recommandés en première ou seconde ligne de traitement ARVs par l'US DHHS[218] ou par l'OMS[221]. Le DTG et le DRV sont fortement liés aux protéines plasmatiques avec des fractions libres d'environ 1% et 7%, respectivement[222,223]. Par rapport aux DTG et DRV, le RAL est moins lié avec une fraction libre de 17%[119]. Pour ces trois molécules, un changement de la concentration des protéines plasmatiques pourrait entraîner un changement de la fraction libre sans impacter la concentration totale. Cependant, seule la forme libre est considérée comme active, car elle a la capacité de passer dans les tissus et organes pour atteindre les cibles[176]. Ainsi, la concentration libre du médicament est beaucoup plus informative que la concentration totale, en particulier pour les patients qui risque d'avoir une modification de la concentration des protéines. Comme c'est par exemple le cas pourles patients atteints d'une pathologie hépatique, chez les femmes enceintes, ou chez les personnes âgées. Le suivi thérapeutique pharmacologique de la forme libre des médicaments est recommandé pour ces patients[224].

Une seule méthode avec des données de validation permettant d'isoler et de doser la fraction libre du DTG a été publiée par Metsu et al[222]. La DE est utilisée comme technique d'isolation de la forme libre. Bien que la DE soit considérée comme un *gold standard* pour isoler le médicament libre, cette méthode a deux inconvénients majeurs: premièrement, elle est chronophage, nécessite 4 h pour atteindre l'état équilibre, ce qui est inadapté pour la routine et pour les études cliniques; deuxièmement, elle se fait sur 1 ml de plasma ce qui représente un

volume important pour certains patients comme les nouveau-nés. A ce jour, il n'y a pas d'autre méthode publiée avec des données de validation complète pour isoler et mesurer la fraction libre du RAL, du DTG et du DRV.

La DE et l'UF sont les deux méthodes les plus utilisées pour isoler les médicaments libres. Par rapport à la DE, l'UF comportent plusieurs avantages : tout d'abord il est plus facile de contrôler les conditions qui risquent d'influencer les résultats comme le pH, la température, la vitesse de centrifugation ; d'autre part, elle est très rapide, et consiste en une centrifugation de 10-20 minutes; enfin, les concentrations totales et libres des médicaments sont directement mesurées dans l'ultrafiltrat et le plasma, sans nécessité d'ajustement contrairement à la DE. En résumé, grâce à sa simplicité et rapidité d'exécution, malgré le problème de NSB, l'UF est plus adaptée à la demande de la routine et des études cliniques, et est de plus en plus utilisée dans les laboratoires d'analyses de biologie médicale ou un laboratoire de pharmacologie[225]. Parmi toutes les méthodes publiées pour mesurer la concentration libre des ARVs (n=36), la méthode d'UF (n=26) est beaucoup plus utilisée que la DE (n=10) [180].

Objectif

L'objectif de cette étude était de développer et de valider une méthode simple, fiable et adaptée en routine pour l'analyse simultanée de la forme libre du RAL, du DTG et du DRV dans le plasma humain par UF, et quantifiée en LC-MS/MS.

Méthodes

Les molécules ont été quantifiées en utilisant un système chromatographique d'UPLC (Acuity®) couplé avec un triple quadruple tandem spectrométrie de masse (TQD Quantum ®). Le RAL, le DTG et le DRV ont été quantifiés en utilisant les correspondants isotopiques marqués comme étalon interne. Toutes les molécules ont été analysées en mode positif de

multiple reaction monitoring. Les molécules ont été ionisées par électronébuliseur. La séparation des molécules a été réalisée sur une colonne BEC® C18 (1.7 µm, 50 mm x 2.1 mm) avec une phase mobile qui consiste en un mélange d'eau et d'ACN avec 0.1% (v/v) d'acide formique dans les deux phases. Le temps total d'analyse était de 4 minutes.

Les standards de calibration et de contrôles qualités ont été préparés en diluant la solution mère de RAL, du DTG et du DRV dans le blanc ultrafiltrat. La méthode d'UF a été utilisée pour isoler les molécules libres dans le plasma humain. Les plasmas congelés des patients ont été décongelés et bien homogénéisés à 37°C pendant 15 minutes. Puis, un volume de 300µL de plasma a été centrifugé dans un tube Centrifree® à une vitesse de 1500g à 37°C pendant 5 minutes avec un rotor à angle fixe. Ensuite, 50µL d'ultrafiltrat a été mélangé avec 5µL de solution d'EIs, et 20 µL de ce mélange a été injecté dans le système chromatographique.

La méthode a été développée et validée selon les guidelines de la FDA et l'EMA (cf. Méthodologie). Cette méthode a été appliquée dans l'étude ANRS 160 RalFE pour étudier la PK du RAL libre chez les femmes enceintes.

Résultats

Toutes les molécules ont bien été séparées sur le chromatogramme montré en Figure 13. Les résultats des tests de sensibilité, sélectivité, spécificité, linéarité, justesse, fidélité, effet mémoire, effet matrice, NSB et stabilité étaient tous conformes aux exigences des guidelines. Aucun pic d'interférence n'a été observé en testant 6 différents plasmas et 42 co-traitements potentiels confirmant ainsi la bonne spécificité et sélectivité de cette méthode. Les résultats de linéarité, justesse, fidélité, NSB, effet matrice et stabilité sont résumés dans le Tableau 12. Les variations de température (entre 20-40°C), de la vitesse (entre 1000-2000g) et de la durée (entre 5-30 minutes) de centrifugation n'ont pas eu d'impact sur les résultats de dosage de la

fraction libre. Le NSB était négligeable pour les trois molécules dans cette méthode. Et aucune dégradation n'a été est observée dans les tests de stabilité.

Tableau 12. Résultats de validation

	DTG	**RAL**	**DRV**
TR (min)	0.94	1.04	1.7
Transition (m/z)	420.110>>127.045	445.174>>108.967	548.247>>392.220
Calibration (ng/mL)	0.5-200	1-400	10-4000
Justesse	-4.1 à 4.6%	-3.3 à 5.2%	-5.6 à 8.8%
Fidélité	1.8 à 9.0%	5.9 à 13.3%	1.6 à 5.6%
NSB	-4.5 à 5.9%	-1.9 à 6.0%	-0.6 à 0.15%
EM	3.3 à 9.7%	1.3 à 5.1%	3.3 à 3.8%
Stabilité dans ultrafiltrate pendant 24h			
Congelé à -20°C	96.2-111.4%	96.4-100.6%	97.1-102.1%
8°C (autosample)	98.1-100.4%	96.6-101.5%	97.2-102.0%
Fraction libre obtenue en comparant à la littérature			
Fraction libre obtenue/littérature (nombre d'échantillon)	0.71%/0.71% [222]	19.2%/17%[119] (n=340)	92.7%/91.5-93.9%[223] (n=44)

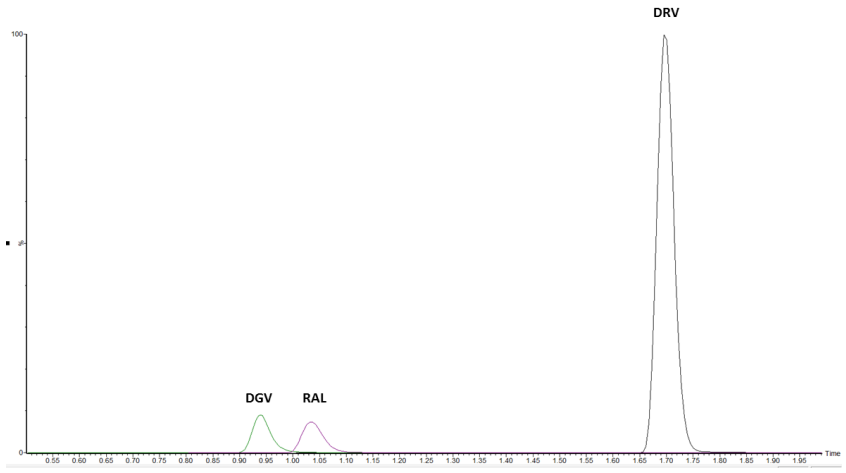


***Figure 13. Chromatogramme de la LLOQ de post-extraction pour chaque analyte** : dolutégravir (DTG, 0.5 ng/mL) à 0.94 min ; raltégravir (RAL,1 ng/mL) à 1.04 min; darunavir (DRV, 10 ng/mL) à 1.7 min avec l'abondance relative (cps) en ordonnée et temps de rétention (min) en abscisse.*

Discussion et conclusion

Par rapport à la seule méthode publiée par Metsu et al.[222] pour doser le DTG libre en utilisant la DE, notre méthode est beaucoup plu simple et beaucoup plus rapide en utilisant l'UF. Les facteurs comme le NSB, la température, la vitesse et la durée de centrifugation n'ont pas d'influence sur les résultats de dosage de la concentration libre. Cette méthode a plusieurs avantages : un temps d'analyse court qui dure 4 minutes; elle est simple et rapide; utilise seulement 150µL de plasma. Les résultats obtenus pour les fractions libres du RAL, du DTG et du DRV sont cohérents avec ceux de la littérature confirmant la fiabilité de cette méthode. Cependant, une comparaison des concentrations libres obtenues en utilisant la DE et l'UF sont à programmer pour la prochaine étape pour confirmer les résultats obtenus par la méthode proposée.

Notre étude est la première méthode qui quantifie simultanément les concentrations libres du RAL, du DTG et du DRV et qui fournit des données complètes de validation et d'étude d'impact des facteurs qui influenceraient la concentration libre. Cette méthode est simple, rapide, et adaptée au suivi thérapeutique en routine et aux études cliniques.

Development of a simple and rapid method to determine the unbound fraction of dolutegravir, darunavir and raltegravir in human plasma using ultrafiltration and LC-MS/MS

Yi ZHENG[1,2,3*], Gabrielle LUI[1,2,3], Sana BOUJAAFAR[1], Radia ABOURA[1], Naïm BOUAZZA[2,3], Frantz FOISSAC[2,3], Jean-Marc TRELUYER[1,2,3], Sihem BENABOUD[1,2,3], Déborah HIRT[1,2,3], Inès GANA[1]

Service de Pharmacologie Clinique, Hôpital Cochin, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Paris Centre, Paris, France

EA 7323, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75006 Paris, France

Unité de Recherche Clinique Paris Descartes Necker Cochin, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France.

[*] **Corresponding author**: Yi Zheng zhengyi86@hotmail.fr

Highlight:

- This paper proposes an ultrafiltration-LC-MS/MS method to determine unbound concentration of dolutegravir, raltegravir and darunavir in human plasma.
- Lower limit of quantification was 0.5 ng/mL for dolutegravir, 1 ng/mL for raltegravir and 6 ng/mL for darunavir.
- This method is simple, rapid, reliable and suitable for routine analysis and clinical research.

Keywords: LC-MS/MS; raltegravir; darunavir; dolutegravir; ultrafiltration; unbound concentration

Word count: 3383

Tables: 3

Figures: 1 (print without color)

Abstract

Raltegravir, dolutegravir and darunavir are three antiretroviral drugs widely used in combined antiretroviral therapies. These three drugs are highly bound to plasma proteins. Compared to the total concentration, the concentration of unbound drug which is considered as the only pharmacological active form should be more informative to improve therapeutic drug monitoring in patients to avoid virological failure or toxicity. The aim of the present study was to develop an ultrafiltration protocol and a LC-MS/MS method to simultaneously determine the concentrations of the unbound RAL, DGV and DRV in human plasma. Several interference factors that could impact the results of the ultrafiltration method were tested. Finally, 150 µl of plasma was ultrafiltrated using Centrifree® ultrafiltration devices with ultracel YM-T membrane (cutoff 30 KDa) during 10 minutes at 37°C at 1500g. Then, 20 µL of the ultrafiltrate were injected into the LC-MS/MS system. The chromatographic separation was carried out on a BEH C18 column using a mobile phase containing deionized water and acetonitrile, both with 0.05% (v/v) of formic acid, with a gradient elution at a flow rate of 0.5 mL/min. The calibration ranged from 1 to 400 ng/mL for raltegravir, from 0.5 to 200 ng/mL for dolutegravir and from 10 to 4000 ng/mL for darunavir. This method was validated with a good precision (inter- and intra-day CV% inferior to 14%) and a good accuracy (inter- and intra-day bias between -5.6 to 8.8%) for all the analytes. The ultrafiltration method was not sensible to the temperature and centrifugation time, with non-specific-binding negligible. This method is simple, reliable and suitable for therapeutic drug monitoring (TDM) and for pharmacokinetic studies.

1. Introduction

Raltegravir (RAL) and dolutegravir (DTG) are the first and second approved integrase strand transfer inhibitors (INSTI), the newest class of antiretroviral (ARV) drugs. In previous clinical studies [1,2], RAL and DTG + 2 Nucleoside reverse-transcriptase inhibitors (NRTIs) were shown to be more effective for reducing viral load with fewer adverse effects than efavirenz (600mg) + 2 NRTIs which were the first-line regimen for adults, adolescents and pregnant or breastfeeding women [3]. In a previously published meta-analysis including 31404 patients and 154 treatment groups from 70 trials, RAL and DTG were found to be the only treatments that provided a significantly higher viral suppression together with satisfactory profiles of safety when compared with efavirenz [4]. Furthermore, RAL and DTG are known to be primarily metabolized by UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 and not to be an inhibitor nor inductor of the cytochromes (CYP) or UGT enzymes [5]. RAL and DTG were shown to have a minimal drug-drug interaction profile in different clinical studies [6,7]. RAL and DTG + 2 NRTIs were recommended as part of the first-line regimens in pregnancy and in naive adult patients, by the U.S. Department of Health and Human Services [8] and the World Health Organization [3], respectively. Darunavir (DRV) is another ARV of the protease inhibitor class which was recommended as a first-line regimens in pregnancy by DHHS guideline [8,9].

RAL is approximately bound at 83% to plasma proteins, and mainly to albumin [10]. Dolutegravir has much higher bound fraction (>99%), principally to albumin and in a lesser extent to the alpha-1-acid glycoprotein (AAG) [11]. Darunavir is also highly bound (approximately 95%), mainly to alpha-1-acid glycoprotein (AAG) [12]. The free fraction

is known to be the only pharmacologically active form with the capacity to cross cell membranes and diffuse into tissues to reach the physiological sites of action [13]. The variation of the unbound drug concentrations, especially for the highly bound molecules (>85%), could have a clinical impact on the efficacy and toxicity of the treatment [14]. Inter- and intra-individual variations of the unbound fraction exist due to different physiological state like pregnancy or liver disease [15,16]. Barau et al. have shown a variation of raltegravir unbound fraction ranging from 12.3% to 32.3% in 10 patients with final-stage liver disease [15]. Currently, clinical studies focusing on the unbound concentration are scarce, and they mostly focused on the total concentration which do not reflect the unbound concentration and could lead to an inadequate recommendation [17,18].

Several methods for the quantification of unbound concentrations of RAL, DRV or DTG were used in some reports of clinical studies but often not well detailed [15,17,19]. None of them used a fully detailed and validated method, with all information necessary for practice. The only fully validated method for the quantification of unbound concentration of these three molecules was described by Metsu et al. for dolutegravir using the equilibrium dialysis (ED) and the LC-MS/MS. ED is known to be a reference method for isolating the unbound fraction. However, the disadvantage of this ED method is known to be time-consuming (4-28h) [20]. Therefore, it might not be suitable for therapeutic monitoring in routine clinical practice nor for clinical studies. The other mainly used technique to obtain unbound fraction of drugs is the ultrafiltration (UF) method which is simple and rapid, more suitable for routine clinical practice or clinical studies [20].

The aim of this study was to develop and validate an UF and LC-MS/MS methods to simultaneously determine unbound concentrations of RAL, DGV and DRV in human plasma. This method can be applied in therapeutic monitoring of unbound RAL, DGV and DRV in clinical routine practice or in clinical studies.

2. Materials and method

2.1 Chemical and reagents

Raltegravir potassium salt, dolutegravir, [^{13}C,$^{2}H_5$]-dolutegravir, and [$^{13}C_6$]-darunavir were purchased from Alsachim (Strasbourg, France). [$^{2}H_3$]-raltegravir was purchased from TRC (Toronto, Canada). Darunavir was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). MS grade water was obtained from Carlo erba (Val de Reuil, France). MS grade acetonitrile and methanol were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and formic acid from VWR (Fontenay-sous-bois, France). Drug free plasma was purchased from Utak Laboratories (Valencia, Spain) and stored at -20°C. Centrifree® ultrafiltration devices with ultracel YM-T membrane were purchased from Merck Millipore (Tullagreen, Co.Cork, Irland)

2.2 Chromatography Liquid

An Acquity UPLC® chromatography system (Waters®, Milford, USA) piloted by the Masslynx software (version 4.1) was used in this method. The separation was performed on a Waters BEC C18 analytical column (Waters®, Milford, USA), 50 mm length, 2.1 mm internal diameter and 1.7µm particle size, associated with a C18 guard column (Waters®, Milford, USA). The column temperature was set at 35°C. The mobile phase was a mixture of phase A (water with 0.1% formic acid, v/v) and phase B (acetonitrile

with 0.1% formic acid, v/v). The compounds were eluted using a linear gradient during 4 minutes (min) as followed: 0-0.5min, 65% of phase A and 35% of phase B were used as initial condition; then from 0.5-2min, phase B was increased up to 90% and stay at 90% from 2-3min to wash the column; finally, the composition of the mobile phase returned to the initial condition in 0.1 min and stayed stable from 3.1-4min to the equilibrate the column. The flow rate used was set to 0.5 mL/min. 20µL of the sample were injected into the chromatography system.

2.3 Mass spectrometry

An Acquity TQD® mass spectrometry system (Waters®, Milford, USA) was used as a detector. Heated-electrospray ionization (H-ESI) with positive ion mode was used for compounds detection. The parameters of the mass system were set as follows: capillary voltage at 3 KV, desolvation temperature at 600 °C, desolvation gas flow at 950 L/h and cone gas flow at 50 L/h. Argon was used for compounds collision. The parent ions, daughter ions of quantification and identification, cone voltage, collision energy and retention times for each molecule and internal standards (IS) are presented in the Table 1.

Table.1 Parent to fragment (daughters) mass transition and relative collision energies (CE), Cone used and the retention time (RT) for each analyte and internal standard

Analytes	Transition (m/z)		CE (V)	Cone (V)	RT (min)
Raltegravir	Quantification	445.174>>108.967	27	39	1.04
	Confirmation	445.174>>361.180	18		
Dolutegravir	Quantification	420.110>>127.045	38	58	0.93
	Confirmation	420.110>>277.121	35		
Darunavir	Quantification	548.247>>392.220	15	35	1.71
	Confirmation	548.247>>112.998	30		
[$^{2}H_3$]-raltegravir	Quantification	448.174>>109.032	48	50	1.04
[^{13}C, $^{2}H_5$]-dolutegravir	Quantification	426.174>>277.131	35	58	0.93
[$^{13}C_6$]-darunavir	Quantification	554.274>>113.128	15	35	1.71

2.4 Software

All the calculations were performed using Microsoft Excel 2010 software (Microsoft, USA)

2.5 Preparation of stock solutions, calibration standards and quality control solutions

For each compound, two stock solutions were prepared at 1 mg/mL in methanol, one for the calibration standards (CAL) and the other for the internal quality controls solutions (IQCs). A stock solution at 1 mg/mL was prepared in methanol for each isotope molecule used as internal standard. All these stock solutions were aliquoted and stored at -20°C in darkness.

The day of the analysis, the eight calibration standards containing RAL, DGV and DRV were prepared freshly by diluting the stock solution in blank ultrafiltrat, with concentrations ranging from 10 to 4000 ng/ mL for darunavir, 0.5 to 200 ng/mL for

dolutegravir and from 1 to 400 ng/mL for raltegravir. The blank ultrafiltrate was obtained by centrifuging blank plasma through centrifree® ultrafiltration devices at 1500g during 20 minutes.

Four levels of IQCs were prepared in the same way as calibration standards by diluting an IQC stock solution in the blank ultrafiltrate. Concentrations of IQCs were 10, 30, 1600, 3200 ng/mL for darunavir; 0.5, 1.5, 80, 160 ng/mL for dolutegravir and 1, 3, 160, 320 ng/mL for raltegravir.

An IS working solution was prepared freshly by dilution of the isotope IS stock solution in an appropriate volume of ultrapure water to obtain a final concentration of 250 ng/mL for [^{13}C, $^{2}H_5$]-dolutegravir and 500 ng/mL for [$^{13}C_6$]-darunavir and [$^{2}H_3$]-raltegravir,

2.6 Ultrafiltration

The unbound drug was obtained and separated from protein-bound drug by using UF method. After thawing and incubation at 37°C during 15 minutes, 150µL of patient plasma were added into Centrifree® tube (molecular weight cutoff 30 KDa) and centrifuged (1500g at 37°C during 5 minutes) using an Eppendorf® 5430R centrifuge with a fixed angle rotor. Finally, 50 µL of ultrafiltrate were mixed with 5µL of IS working solution and injected into the chromatographic system.

2.7 Method validation

The method was validated according to the guidelines for bioanalytical method validation of Food and Drug Administration [21].

2.7.1 Selectivity, specificity and carry-over

The selectivity was verified in ten different drug free human plasmas which were independently and randomly selected for the absence of potential interferences with endogenous compounds. The specificity was verified by the absence of the interference with 42 potential co-treatments (abacavir, amoxicillin, atazanavir, carbamazepine, cefazolin, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, cidofovir, ciprofloxacin, clobazam, cloxacillin, efavirenz, elvitegravir, emtricitabine, flucytosine, fluconazole, ganciclovir, isoniazid, itraconazole, lamivudine, lamotrigine, levetiracetam, levofloxacin, lopinavir, maraviroc, meropenem, moxifloxacin, nevirapine, paracetamol, piperacillin, posaconazole, pyrazinamide, rifampicin, ritonavir, sulfamethoxazole, tenofovir, trimethoprim, voriconazole, and zidovudine). For carry-over study, two blank ultrafiltrates were analyzed after injection of the highest standard on three different days. The interfering components should not exceed 20% of the lower limit of quantification (LLOQ) of the analyte and 5% of the internal standard.

2.7.2 Linearity of standard curve and LLOQ

The linearity of the method was confirmed with three complete standard curves analyzed on three different days. The standard curve ranged from 10 to 4000 ng/mL for darunavir, from 0.5 to 200 ng/mL for dolutegravir, and from 1 to 400 ng/mL for raltegravir. A linear and quadratic regression with weighting of $1/x$ or $1/x^2$ was tested to plot the peak area ratios (y) of analyte to IS versus analyte concentrations. The LLOQ was defined as having a signal to noise ratio (S/N) of 10 with bias and coefficient of variation (CV) inferior to 20% by analyzing six different samples.

2.7.3 Accuracy and precision

The intra- and inter-day accuracy and precision were assayed by quantification of four

levels (LLOQ, low, middle and high) of IQCs. The concentration of LLOQ, low quality control (LQC), middle quality control (MQC) and high quality control (HQC) are 1, 3, 160, 320 ng/mL for raltegravir; 0.5, 1.5, 80, 160 ng/mL for dolutegravir and 10, 30, 1600, 3200 ng/mL for darunavir, respectively. 5 replicates of each level of IQCs were analyzed in one run for intra-day study, and on three different days for inter-day analysis. The accuracy (expressed as bias %) and the precision (CV %) should between -20% and 20% for the lowest IQCs (LLOQ) and between -15% and 15% for the other levels of IQCs.

2.7.4 Matrix effect and non-specific binding (NSB)

The matrix effect was evaluated by analyzing two different levels of concentrations (LQC and HQC) in four replicates in a single run. Six blank plasmas from different patients without administration of RAL, DTG and DRV were tested. The matrix effect was calculated by the ratio of the peak area of the analyte diluted in the blank ultrafiltrate versus the peak area of the same analyte diluted in pure water at the same concentration. A matrix effect superior to 115% or inferior to 85% will be considered to have an ion enhancement or ion suppression effect.

NSB was evaluated by analyzing LQC and HQC in four replicates in a single run. The samples were prepared by diluting the working solution of each analyte using blank ultrafiltrate to obtaine the same concentration of LQC and HQC. Then the samples were analyzed before and after the UF. NSB was obtained by calculating a ratio of the peak area of each analyte obtained from the samples after UF versus the one obtained from the same samples before UF.

2.7.5 Stability

RAL, DGV and DRV have been shown by a previous study to be stable in plasma after three freeze-and-threw cycles and during at least 3 months at -20°C [22]. But no stability data were available for these three analytes in ultrafiltrate. The stability studies of RAL, DGV and DRV in the ultrafiltrate were investigated at room temperature, 8°C (temperature set for autosampleur) and -20°C during 24 hours by analyzing two levels of concentrations (LQC and HQC) of each analyte with 4 replicates at each concentration level. The results of each analyte obtained after the test conditions were compared with those obtained with freshly prepared samples.

2.7.6 Application

The validated method was successfully applied to the samples from the ANRS 160 RalFE study for the quantification of unbound concentrations of RAL and DRV. ANRS 160 RalFE study was an open-label, multicenter, phase II randomized trial which was approved by the French Ethics Committee. Forty-one pregnant women who were prescribed RAL (400mg, QD) based regime were included in RalFE study. Five blood samples were collected at pre-dose, 0.5 hours, 3 hours, 8 hours and 12 hours after RAL intake during the third trimester (T3) of pregnancy (between 30 and 37 weeks of amenorrhea) and in the postpartum period (between 4 and 6 weeks after delivery). This report focuses only on the results of the free fraction changes due to pregnancy in women treated with RAL plus darunavir boosted by ritonavir (DRV/r). This method was also applied to 10 patients of DGV from routine practice.

3. Results and discussions

3.1 Development

A C18 column rather than a hexyl-phenyl column was preferred in order to have a shorter retention time and sharper peaks. With hexyl-phenyl column, larger peaks with tailing were observed for DGV which was probably due to π-π interaction between aromatic structure of DGV and the stationary phase. For the mobile phase, we preferred acetronitrile to methanol as the organic solvent in order to elute compounds more quickly. Finally, the total run time lasted only 4 min which could spare both time and mobile phase.

To obtain the unbound concentrations of RAL, DGV and DRV, the centrifree ultrafiltration device was chosen. This device equipped with ultracel YM-T membrane has a nominal molecular weight limit of 30 KDa which could prevent effectively the passage of albumin (approximate 67KDa) [23] and of AAG (approximate 45KDa)[24]. As one of the two main methods for the separation of unbound fraction from total fraction, UF have the advantage to be simpler and more rapid compared to ED method [14]. However, several factors could possibly have an impact on the results of the UF method, such as: the temperature, the duration of centrifugation, the NSB. To investigate the impact of the temperature of centrifugation on free fraction, 20°C and 40°C were tested. No difference was found for the free fraction obtained at the two temperatures tested (data not show). Thus, 37° was chosen as it is the physiological body temperature. Then, the impact of centrifugation time was also studied by comparing the concentrations obtained after 5 min, 10min and 20 min. No difference was found with different centrifugation times tested (data not show) and 5 min was chosen to be more effective. The results of the NSB tests were shown in section 3.2.3.

3.2 ***Method Validation***

3.3 Selectivity, specificity and carry-over

Six plasma samples from different healthy volunteers were used to perform the selectivity study. No significant endogenous interference was observed. The specificity of the method was evaluated by analyzing 42 potential co-treatments listed in the section 2.7.1. No significant exogenous interference was noted. No carry-over effect for RAL, DRV, DTG and all the IS were observed.

3.4 Linearity, LLOQ, accuracy and precision

The linearity of the method was evaluated over the range of 1-400 ng/mL for RAL, 0.5-200 ng/mL for DTG and 10-4000 ng/mL for DRV using a quadratic regression with weighting of $1/x^2$ for all the three analytes. The correlation determinations (R^2) were more than 0.995 for all the analytes confirming a good linearity of this method. The regression intercepts were not statistically different from zero.

The LLOQ values of the method were set at 1 ng/mL for RAL, 0.5 ng/mL for DTG and 10 ng/mL for DRV. The chromatograms of LLOQs and blank ultrafiltrate for all these three analytes were shown in Fig. 1.

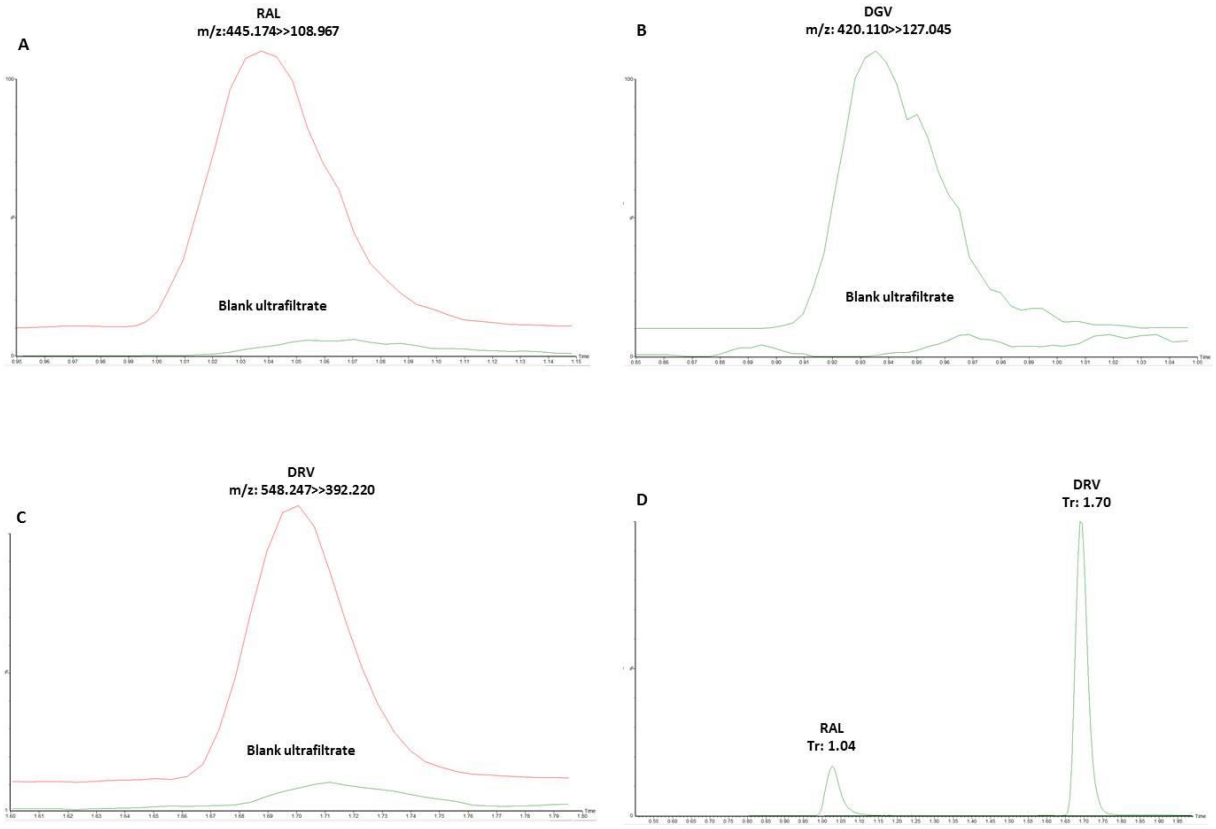


Fig 1. Typical chromatogram of blank ultrafiltrate and LLOQ of each analyte : A) raltegravir (1 ng/mL) at 1.04 min; B) dolutegravir (0.5 ng/mL) at 0.94 min; C) darunavir (10 ng/mL) at 1.7 min; with absolute abundance (cps) in Y axis and retention time (min) in X axis. D) Chromatogram of a C_{12h} plasma sample from a pregnant patient receiving a combination treatment of raltegravir 400 mg twice-daily (concentration of raltegravir: 10.6ng/mL with free fraction of 23%) and concentration of darunavir 600 mg twice-daily (concentration: 219 ng/mL with free fraction of 9.2%) absolute abundance (cps) in Y axis and retention time in X axis.

The intra- and inter-days precision and accuracy (Table 2) were inferior to 10% for RAL, DTG and DRV except for the inter-days precision of LLOQ for RAL which was 14.8%. These results show a good repeatability and a good reproducibility for this method.

Table 2. Precision and accuracy of unbound raltegravir, dolutegravir, and darunavir in human plasma

	Theoretical (µg/L)	Intra-day (n=5)		Inter-day (n=15)	
		Bias* (%)	Precision (%)	Bias* (%)	Precision (%)
Raltegravir	1	5.2	5.8	-3.1	13.3
	3	1.3	5.9	-3.3	8.8
	160	5.2	1.9	3.1	6.2
	320	3.2	1.8	-1.0	4.7
Dolutegravir	0.5	2.0	6.9	0.1	6.0
	1.5	-0.7	5.4	-4.1	9.0
	80	4.6	1.8	2.9	7.0
	320	2.2	2.9	-1.4	6.3
Darunavir	10	5.7	3.5	3.9	4.1
	30	-3.2	5.0	-5.6	5.6
	1600	8.8	1.6	5.7	5.4
	3200	4.3	2.0	-1.1	4.9

**Accuracy is expressed as bias*

3.5 Matrix effect and non-specific binding (NSB)

Matrix effect of each analyte was analyzed in six plasma samples from different sources. The result obtained was inferior to 10% for all the analytes at the concentration of the LQC and the HQC which confirmed no ion enhanced effect or ion suppression effect for RAL, DTG or DRV in this method.

The result of NSB was between -6.4 to 6.0% for RAL, DTG and DRV which showed that the NSB was negligible for these three analytes. The results of matrix effect and NSB were summarized in the table 3.

Table 3. Ultrafiltrat stability, non-specific-binding (NSB) and matrix effect (ME) of raltegravir, dolutegravir and darunavir. (n=4 for each value)

		Stability				Matrix effect (ME)		NSB	
		At -20°C (24H)		At 8°C (24H)					
	Concentration (mg/L)	Stability[1] (%)	CV[2] (%)	Stability (%)	CV (%)	ME (%)	CV (%)	NSB (%)	CV (%)
Raltegravir	3	0.6	2.8	-3.4	3.2	5.1	8.7	6.0	8.9
	320	-3.6	6.6	1.5	1.8	1.3	7.9	-4.9	5.0
Dolutegravir	1.5	11.4	11.8	-1.9	6.3	3.3	8.3	5.9	8.6
	160	-3.8	7.7	0.4	1.4	9.7	4.4	-4.5	7.4
Darunavir	30	2.1	4.3	-2.8	2.8	3.8	10.0	-6.4	9.1
	320	-2.9	5.7	2.0	2.3	3.0	5.1	-0.15	8.9

[1] Expressed as the mean percentage change from time zero (nominal concentration)

[2]CV: coefficient variation

3.6 Stability

The results of the stability of the drugs in the ultrafiltrate at 8°C and -20°C are shown in Table 4. No significant degradation was observed for both conditions tested during 24H.

3.7 Clinical application

The free fraction of DGV, RAL and DRV were calculated as the ratio of the unbound concentration versus the total concentration of the same samples. The total DGV, RAL and DRV concentrations were simultaneously determined by a LC-MS/MS method which was validated according to FDA guideline. The reliability of the method for measuring total concentration was confirmed by analyzing the external quality control samples from ASQUALAB (Paris, France) which was confirmed by ISO 9001.

Among the forty one women from the ANRS 160 RalFE study, thirteen women were prescribed RAL plus DRV/r with or without the other ARV drugs. Ten of these thirteen women, which included three women with DRV 600mg twice daily and seven women with DRV 800mg once-daily, were sampled before and after delivery. This paper describes only the results of these ten women who were prescribed DRV/r plus RAL with the samples collected before and after delivery to compare the change of free fraction of RAL and DRV before and after delivery. Finally, the unbound concentrations and total concentrations of RAL and DRV were measured in 54 samples collected during the third trimester (T3) and in 43 samples collected in the postpartum period. The mean free fraction of DRV was found to be 9.0% (standard deviation 2.2%) during the T3 and of 7.3% (standard deviation 2.4%) in postpartum period. These result were similar to those obtained by Colbers et al. who have found a mean of 12% in T3 and 10% after birth in PANNA Network [17] and in accordance with the free fraction of 91.5%-93.9% in healthy males observed by Sekar et al.[25]. An increase of 23% of mean free fraction during the T3 compared to postpartum was found for DRV. This increase of free fraction during pregnancy was also observed for RAL. The free fraction of RAL was found to be 21.5% (standard deviation 7.0%) during the T3 and 18.0% (standard deviation 4.1%) during postpartum. A similar result was observed in HIV-infected patients with 23.8% of free fraction of RAL by Barau et al. [10] and in healthy people with 17% of free fraction by Iwamoto et al.[26]. This increase of free fraction of RAL and DRV observed in pregnant women is probably due to the decreased concentration of albumin and AAG during pregnancy.

The free fraction of DGV was analyzed in ten patients from routine practice with a mean total DGV concentration of 2227.5 ng/mL (SD: 86.3%). The mean free fraction of DGV

obtained was 0.71% (SD: 0.13%). This result was in accordance with the free fraction obtained by Metsu et al. which was 0.71% (SD:0.2%) using validated equilibrium dialysis and LC-LMS/MS methods [14].

4. Conclusion

We have fully developed a LC-MS/MS method which is selective, sensitive, reliable and rapid for the determination of unbound RAL, DGV and DRV concentrations in human plasma. Compared to an ED method, ultrafiltration is much simpler and more rapid which define his characteristics to be more suitable in the routine practice and clinical studies. Nevertheless ultrafiltration is known to suffer from non-specific binding which was negligible in the present work.

Reference

[1] J.L. Lennox, E. DeJesus, A. Lazzarin, R.B. Pollard, J.V.R. Madruga, D.S. Berger, J. Zhao, X. Xu, A. Williams-Diaz, A.J. Rodgers, R.J. Barnard, M.D. Miller, M.J. DiNubile, B.-Y. Nguyen, R. Leavitt, P. Sklar, Safety and efficacy of raltegravir-based versus efavirenz-based combination therapy in treatment-naive patients with HIV-1 infection: a multicentre, double-blind randomised controlled trial, The Lancet. 374 (2009) 796–806. doi:10.1016/S0140-6736(09)60918-1.

[2] S.L. Walmsley, A. Antela, N. Clumeck, D. Duiculescu, A. Eberhard, F. Gutiérrez, L. Hocqueloux, F. Maggiolo, U. Sandkovsky, C. Granier, K. Pappa, B. Wynne, S. Min, G. Nichols, SINGLE Investigators, Dolutegravir plus abacavir-lamivudine for the treatment of HIV-1 infection, N. Engl. J. Med. 369 (2013) 1807–1818. doi:10.1056/NEJMoa1215541.

[3] WHO, Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: recommendations for a public health approach, World Health Organization, 2016. https://apps.who.int/iris/handle/10665/208825 (accessed July 30, 2019).

[4] S. Kanters, M. Vitoria, M. Doherty, M.E. Socias, N. Ford, J.I. Forrest, E. Popoff, N. Bansback, S. Nsanzimana, K. Thorlund, E.J. Mills, Comparative efficacy and safety of first-line antiretroviral therapy for the treatment of HIV infection: a systematic review and network meta-analysis, Lancet HIV. 3 (2016) e510–e520. doi:10.1016/S2352-3018(16)30091-1.

[5] S. Castellino, L. Moss, D. Wagner, J. Borland, I. Song, S. Chen, Y. Lou, S.S. Min, I. Goljer, A. Culp, S.C. Piscitelli, P.M. Savina, Metabolism, Excretion, and Mass Balance of the HIV-1 Integrase Inhibitor Dolutegravir in Humans, Antimicrob. Agents Chemother. 57 (2013) 3536–3546. doi:10.1128/AAC.00292-13.

[6] D.M. Burger, Raltegravir: a review of its pharmacokinetics, pharmacology and clinical studies, Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 6 (2010) 1151–1160. doi:10.1517/17425255.2010.513383.

[7] C.E. Kandel, S.L. Walmsley, Dolutegravir – a review of the pharmacology, efficacy, and safety in the treatment of HIV, Drug Des. Devel. Ther. 9 (2015) 3547–3555. doi:10.2147/DDDT.S84850.

[8] DHHS, Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents with HIV, AIDSinfo. (2018). https://aidsinfo.nih.gov/guidelines/html/1/adult-and-adolescent-arv/37/whats-new-in-the-guidelines- (accessed July 31, 2019).

[9] R. Pope, A. Kashuba, Darunavir for use in pregnant women with HIV, Expert Rev. Clin. Pharmacol. 10 (2017) 1317–1327. doi:10.1080/17512433.2017.1390428.

[10] C. Barau, V. Furlan, Y. Yazdanpanah, C. Fagard, J.-M. Molina, A.-M. Taburet, A. Barrail-Tran, Characterization of Binding of Raltegravir to Plasma Proteins, Antimicrob. Agents Chemother. 57 (2013) 5147–5150. doi:10.1128/AAC.00625-13.

[11] I.H. Song, J. Borland, P.M. Savina, S. Chen, P. Patel, T. Wajima, A.F. Peppercorn, S.C. Piscitelli, Pharmacokinetics of Single-Dose Dolutegravir in HIV-Seronegative Subjects With Moderate Hepatic Impairment Compared to Healthy Matched Controls, Clin. Pharmacol. Drug Dev. 2 (2013) 342–348. doi:10.1002/cpdd.55.

[12] M. Rittweger, K. Arasteh, Clinical Pharmacokinetics of Darunavir:, Clin. Pharmacokinet. 46 (2007) 739–756. doi:10.2165/00003088-200746090-00002.

[13] K. Patel, C. M.J. Kirkpatrick, Pharmacokinetic Concepts Revisited - Basic and Applied, Curr. Pharm. Biotechnol. 12 (2011) 1983–1990. doi:10.2174/138920111798808400.

[14] D. Metsu, T. Lanot, F. Fraissinet, M. Picot, D. Concordet, M. Cabrol, F. Dubois-Galopin, E. Chatelut, P. Delobel, P. Gandia, Determination of dolutegravir's unbound fraction in human plasma using validated equilibrium dialysis and LC-MS/MS methods, Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem. 479 (2018) 56–65. doi:10.1016/j.cca.2017.12.034.

[15] C. Barau, J. Braun, C. Vincent, S. Haim-Boukobza, J.-M. Molina, P. Miailhes, I. Fournier, J.-P. Aboulker, D. Vittecoq, J.-C. Duclos-Vallée, A.-M. Taburet, E. Teicher, E. Teicher, J.-C. Duclos-Vallée, J.-P. Aboulker, J. Braun, I. Fournier, C. Vincent, A. Arulananthan, V. Eliette, F. Euphrasie, B. Guillon, P. Ralaimazava, S. Haïm-Boukobza, A.-M. Roque-Afonso, L. Bonhomme-Faivre, E. Rudant, A.-M. Taburet, J.P. Aboulker, L. Bonhomme-Faivre, J. Braun, S. Couffin-Cadiergues, C. Delaugerre, F. Durand, D. Vittecoq, P. Flandre, R. Garraffo, J. Ghosn, A. Marraud, G. Pageaux, O. Derradji, C. Bolliot, F. Churaqui, T.M. Antonini, A. Coilly, P. Ichai, O. Ogier, M.

Belnard, J.-M. Molina, V. De Lastours, S. Gazaignes, D. Ponscarme, H. Sauvageon, P. Miailhes, J. Koffi, S. Radenne, C. Brochier, Pharmacokinetic Study of Raltegravir in HIV-Infected Patients With End-Stage Liver Disease: The LIVERAL-ANRS 148 Study, Clin. Infect. Dis. 59 (2014) 1177–1184. doi:10.1093/cid/ciu515.

[16] G. Koren, G. Pariente, Pregnancy- Associated Changes in Pharmacokinetics and their Clinical Implications, Pharm. Res. 35 (2018) 61. doi:10.1007/s11095-018-2352-2.

[17] A. Colbers, J. Moltó, J. Ivanovic, K. Kabeya, D. Hawkins, A. Gingelmaier, G. Taylor, K. Weizsäcker, S.T. Sadiq, M. Van der Ende, C. Giaquinto, D. Burger, Pharmacokinetics of total and unbound darunavir in HIV-1-infected pregnant women, J. Antimicrob. Chemother. 70 (2015) 534–542. doi:10.1093/jac/dku400.

[18] D. Metsu, P.L. Toutain, E. Chatelut, P. Delobel, P. Gandia, Antiretroviral unbound concentration during pregnancy: piece of interest in the puzzle?, J. Antimicrob. Chemother. 72 (2017) 2407–2409. doi:10.1093/jac/dkx176.

[19] S.L. Letendre, A.M. Mills, K.T. Tashima, D.A. Thomas, S.S. Min, S. Chen, I.H. Song, S.C. Piscitelli, ING116070: A Study of the Pharmacokinetics and Antiviral Activity of Dolutegravir in Cerebrospinal Fluid in HIV-1–Infected, Antiretroviral Therapy–Naive Subjects, Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. 59 (2014) 1032–1037. doi:10.1093/cid/ciu477.

[20] S.M. Illamola, D. Hirt, J.M. Tréluyer, S. Urien, S. Benaboud, Challenges regarding analysis of unbound fraction of highly bound protein antiretroviral drugs in several biological matrices: lack of harmonisation and guidelines, Drug Discov. Today. 20 (2015) 466–474. doi:10.1016/j.drudis.2014.11.010.

[21] FDA, Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, US Food Drug Adm. (2019). http://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry (accessed July 4, 2019).

[22] N. Charbe, S. Baldelli, V. Cozzi, S. Castoldi, D. Cattaneo, E. Clementi, Development of an HPLC-UV assay method for the simultaneous quantification of nine antiretroviral agents in the plasma of HIV-infected patients, J. Pharm. Anal. 6 (2016) 396–403. doi:10.1016/j.jpha.2016.05.008.

[23] G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, Human serum albumin: From bench to bedside, Mol. Aspects Med. 33 (2012) 209–290. doi:10.1016/j.mam.2011.12.002.

[24] Z.H. Israili, P.G. Dayton, HUMAN ALPHA-1-GLYCOPROTEIN AND ITS INTERACTIONS WITH DRUGS †,‡, Drug Metab. Rev. 33 (2001) 161–235. doi:10.1081/DMR-100104402.

[25] V. Sekar, S. Spinosa-Guzman, E. Lefebvre, R. Hoetelmans, Clinical pharmacology of TMC114 - a new HIV protease inhibitor, (2006).

[26] M. Iwamoto, L.A. Wenning, A.S. Petry, M. Laethem, M.D. Smet, J.T. Kost, S.A. Merschman, K.M. Strohmaier, S. Ramael, K.C. Lasseter, J.A. Stone, K.M. Gottesdiener, J.A. Wagner, Safety, Tolerability, and

Pharmacokinetics of Raltegravir After Single and Multiple Doses in Healthy Subjects, Clin. Pharmacol. Ther. 83 (2008) 293–299. doi:10.1038/sj.clpt.6100281.

Troisième étude : Evaluation la pharmacocinétique du RAL libre chez les femmes enceintes par approche de population

Revue de la littérature

La PK du RAL pendant la grossesse et la période de postpartum a été rapportée dans seulement deux étude : l'étude IMPAACT 1026s[131] et l'étude PANNA[132].

Dans l'étude IMPAACT 1026s[131], les données cliniques de 42 femmes ont été collectées ; 16 femmes pendant le deuxième trimestre de grossesse entre 20-26 SA, 41 femmes pendant le T3 de grossesse entre 34-41 SA et 38 femme en postpartum (pendant 3-14 semaines après l'accouchement). Les informations concernant la suppression virale et les effets indésirables n'ont pas été recueillies par l'auteur. Une diminution de la médiane de l'AUC du RAL a été trouvée au T2 (-43%) et au T3 (-53%) par rapport au postpartum. Environ 3 fois plus des femmes avaient un ralentissement de l'absorption pendant la grossesse (33%) par rapport aux femmes en postpartum (10%).

Dans l'étude PANNA[132], la PK du RAL chez 18 femmes a été évaluée pendant le T3 (médiane 33 SA, l'écart interquartile: 32-35 SA) et en postpartum (médiane: 5 semaines après l'accouchement, l'écart interquartile : 4-6 semaines) avec une posologie de 400mg BID. La diminution de la CV était rapide avec 86% des femmes avec une CV inférieure à 50 copies/mL et les autres avec une CV inférieure à 400 copies/mL avant l'accouchement. Dix femmes ayant des effets indésirables dont trois de grade 3 ont été déclarés mais aucun n'était relié au traitement ARV. Dix-neuf des vingt-deux nouveaux nés sont nés à terme sans anomalie congénitale. Aucun bébé n'a été infecté par le VIH-1. Les moyennes de l'AUC, de la C_{max} et de la C_{trough} du RAL étaient diminuées de 29%, 18% et 36%, respectivement, pendant le T3 par rapport au postpartum avec une grande variabilité inter- et intra-

individuelle. Mais cette diminution pendant la grossesse n'était pas identique pour toutes les mères ; 35% (n=6) des femmes avaient une AUC_{0-12} et une C_{trough} plus élevées pendant le T3.

Finalement, les études PANNA et IMPAACT ont montré un effet grossesse significatif sur la PK du RAL total, surtout, une diminution de l'exposition du RAL qui se traduit par la diminution de l'AUC, la C_{max} et la $C_{trough.}$, liées à une augmentation de la V_d et CL[131,132]. Cependant, ces deux études ont conclu que par rapport à sa variabilité intra- et inter-individuelle, cette diminution de l'exposition du RAL pendant grossesse n'avait pas d'impact clinique et l'ajustement de dose n'était pas nécessaire. Ces deux études ont deux limites : premièrement, une partie des patientes (44% dans l'étude PANNA et 5% dans l'étude IMPAACT 1026s) ont reçu un ou plusieurs co-traitements connus pour avoir des impacts sur la PK du RAL: 4 patientes de PANNA et 2 patientes d'IMPAACT 1026s étaient co-traitées avec l'ATV/r, 2 patientes (PANNA) ont reçu un antiacide, et 3 (PANNA) patientes des suppléments contenant du calcium ou magnésium ; deuxièmement, ces deux études n'ont pas analysé la fraction libre du RAL qui est la seule forme active et dont la concentration risque d'être modifiée pendant la grossesse.

Les ARVs sont connus pour avoir une activité qui est dépendante de la concentration de la forme libre et du temps d'exposition[226]. Pour cette raison, la concentration libre en résiduel doit être suffisante pour inhiber la réplication du VIH. La résistance virale est connue pour se développer lorsque les concentrations d'ARV sont insuffisantes pour inhiber la réplication virale[227]. A ce jour, la majorité des études PKs d'ARVs est basée sur la concentration totale plasmatique qui n'est pas le reflet de la concentration réelle au niveau de la cible, surtout dans les cas particuliers où l'affinité des protéines ou la concentration des protéines est modifiée, par exemple dans le cas de maladies hépatiques, ou lorsqu'il y a une interaction médicamenteuse, ou durant la grossesse, etc...

Cependant, à ce jour, aucune donnée du RAL libre chez la femme enceinte est disponible. La RPV, le DRV, l'ETV et le LPV sont les 4 seules molécules pour lesquelles des données de concentrations totales et libres pendant la grossesse sont disponibles. Dans les études cliniques qui considèrent seulement les concentrations totales, les AUCs du LPV et du DRV étaient diminuées pendant le T3 (41%[228] à 400mg BID de LPV, 39%[203] à 800mg OAD de DRV) par rapport au postpartum. Pour éviter l'échec de traitement causé par des concentrations infra-thérapeutiques, les auteurs ont proposé d'augmenter la dose d'administration pour le LPV et le DRV[203,228]. Cependant, d'autres études cliniques analysant de façon simultanée pendant la grossesse le changement d'exposition de la concentration totale et de la fraction libre, ont trouvé que les AUCs totales étaient également diminuées pour le LPV[229](27% à 400mg BID) et le DRV[230] (35% à 800mg OAD de DRV). De plus, la diminution de l'AUC était beaucoup moins significative pour les formes libre du LPV (16%) et du DRV (21%) que pour les formes totales. Cette différence entre l'AUC totale et l'AUC libre est due à une augmentation de la fraction libre pour le LPV[229] (0.84% pour T3 versus 0.75% pour postpartum) et pour le DRV[230] (22% pour le T3 versus 18% pour le postpartum), conséquence d'une diminution de la concentration des protéines plasmatiques (PP) pendant la grossesse. Finalement, une augmentation de la dose n'est pas recommandée pour le LPV et le DRV pendant grossesse, car les femmes enceintes risqueraient d'être sur-dosées. Mais cette différence des AUC totale et libre n'est pas toujours observée pendant la grossesse. Dans une étude clinique de phase IIIB[172], les AUC de RPV total et libre diminuent de façon cohérente pendant le T2 (29% pour l'AUC totale et 25% pour l'AUC libre) et le T3 (31% pour l'AUC totale et 21% pour l'AUC libre), avec 0.28% de fractions libre du RPV pendant le T3 et 0.23% pendant le postpartum. Contrairement aux autres études, Schalkwijk et al. ont trouvé une fraction libre d'ETV diminuée pendant grossesse, de 0.083 à 0.075% (postpartum versus T3). Pour expliquer ce résultat particulier, l'auteur a fait des hypothèses d'une perte d'affinité de

liaison ou d'une augmentation d'autres transporteurs hypothétiques dans le plasma pendant la grossesse[231].

Malgré des liaisons protéiques comparables, les fractions libres de LPV, de la RPV et de l'ETV, il n'est pas possible de les prédire à partir de la fraction totale. La concentration totale n'est donc pas suffisante pour avoir des recommandations correctes. Pour suivre la règle générale : si on veut connaitre l'impact de la grossesse sur la forme active (forme libre) du médicament, il est préférable de la mesurer.

Pour mieux étudier les propriétés de la PK du RAL chez les femmes enceinte, une approche de population a été appliquée. A ce jour, un seul modèle de pKpop du RAL total pour adulte a été publié par A-Almeddine en utilisant le logiciel NONMEM[110]. Au total, 335 concentrations de RAL total chez 145 patients infectés par le VIH recevant400mg BID ou 800mg OAD et 209 concentrations de RAL total de 19 volontaires sains ont été modélisées. Finalement, un modèle à deux compartiments a été utilisé pour définir la PK du RAL. Les paramètres estimés par ce modèle étaient : 60.2 L/h pour la clairance, 223L pour le V_d central, 113L pour le V_d périphérique 8.5L/h pour la clairance inter-compartimentale, $0.65h^{-1}$ pour la constante d'absorption chez les volontaires sains et 0.21 h^{-1} chez les patients. Une augmentation de 39% de la biodisponibilité relative du RAL a été montrée lorsque l'ATV était donné en co-traitement. Un effet du taux de bilirubine a aussi été observé sur la biodisponibilité du RAL dans cetarticle. Par rapport au volontaire sain, les patients infectés ont une diminution de la biodisponibilité de 25%. La biodisponibilité du RAL chez les femmes était 45% plus faible que les hommes. Les caucasiens ont une diminution de 60% du V_d périphérique par rapport autres ethnies (surtout les africains subsahariens). L'effet de ces deux dernières covariables n'a pas été observé par Iwamoto et al.[138] et par Wohl et al.[139] qui ont trouvé une PK du RAL similaire quel que soit le sexe ou l'ethnie du patient. Dans ce modèle, les variabilités inter- et

intra-individuelle estimées entre 60-94.2%, étaient en accord avec les résultats obtenus dans d'autres études cliniques. Cette grande variabilité n'a cependant été expliquée qu'en partie. Cette étude n'a pas modélisé les données du métabolite ni la fraction libre du RAL, qui pourraient expliquer une large partie de ces variabilités. A ce jour, aucun modèle pKpop n'est disponible pour analyser la PK du RAL libre chez les femmes enceintes.

Objectif

En s'appuyant sur les données issues de l'étude ANRS 160 RalFE réalisée chez des femmes enceintes infectées par le VIH. L'objectif de cette étude était d'analyser par approche de population la PK du RAL libre, total et du RAL-glucuronide chez les femmes enceintes et d'évaluer l'impact de la grossesse et de la génétique sur la PK du RAL.

Méthodes

Quarante-trois femmes âgés de 23.3 à 45.7 ans ayant reçu du RAL 400mg BID depuis au moins 15 jours avant d'être prélevées ont été inclues dans cette étude. Les concentrations du RAL libre, total et du RAL-glucuronide ont été déterminées chez ces femmes pendant le T3 de grossesse entre 32-36 SA et en postpartum entre 4-6 semaines après l'accouchement. Pour la période de l'accouchement, un seul prélèvement par femme était collecté à des délais variables de la prise. Pour les deux autre périodes, 5 prélèvements étaient collectés par femme pour chacune des périodes, avec les temps de prélèvements suivants: pré-dose, et 0.5 h, 3h, 8h et 12h suivant l'administration du RAL. La concentration du RAL total et RAL-glucuronide ont été déterminées par une méthode validé en LC-MS/MS (article 1), et le RAL libre a été isolé par l''UF et mesuré par une méthode validé en LC-MS/MS (article 2). Les polymorphismes rs1045642 dans le gène ABCB1 et rs8175347 (répétitions de TA dans *TATA box*) du gène UGT1A1 ont été analysés pour chaque femme. Les niveaux d'aspartate aminotransférase, d'alanine aminotransférase, de créatinine, de bilirubine et d'albumine ont

été mesurées en utilisant l'analyseur cobas® 8000. Toutes ces données ont été analysées en utilisant le programme de modélisation MONOLIX® version 2018R1.

Les données de RAL libre ont été analysées premièrement en testant un modèle à un ou deux compartiments avec ou sans temps de latence et avec ou sans compartiments de transit. Puis, les concentrations du RAL total ont été ajoutées et associées avec les concentrations du RAL libre en testant une relation linéaire ou non-linéaire intégrant la concentration d'albumine. Les concentrations du RAL-glucuronide ont enfin été ajoutées via un compartiment additionnel sur le compartiment central du RAL libre. Les modèles d'erreurs (additive, proportionnelle ou combiné) ont été testés pour expliquer la variabilité résiduelle.

L'Age, le poids, l'aspartate aminotransférase, l'alanine aminotransférase, la créatinine et la bilirubine ont été testés comme covariables continues sur différents paramètres PK et deux polymorphismes génétique ainsi que l'effet grossesse ont été testés comme covariables catégorielles.

Finalement, le model a été évalué par pcVPC en simulant 500 fois les concentration par le model obtenue.

Résultats

Après exclusion de deux femmes sans données génétique, 346 concentrations totales de RAL et de RAL-glucuronide et 340 concentrations libres du RAL provenant de 41 femmes étaient disponibles pour la construction du modèle.

Un modèle à un compartiment avec un compartiment de transit a été le modèle décrivant le plus fidèlement les données. Les concentrations totale (C_{total}) et libre (C_{libre}) du RAL ont été associées en utilisant l'équation **Eq. 15a** décrivant une liaison non-spécifique (relation linaire) à l'albumine.

Ainsi, les paramètres estimés par ce modèle étaient les suivants : la constante d'absorption (Ka) qui a également été utilisée pour estimer la constante de compartiment transit, la clairance apparente (CL/F), le volume central apparent (V/F), le métabolisme du RAL en RAL-glucuronide décrit par CL_{met}/V_{met}, la constante d'élimination du métabolite $K_{e\text{-}met}$, la constante de liaison non-spécifique sur chaque molécule de l'albumine $K_{NS,}$ F étant la biodisponibilité. Le modèle d'erreur proportionnel est celui qui décrivait le mieux les variabilités résiduelles des concentrations du RAL libre, du RAL total et du RAL-glucuronide. Des variabilités inter-individuelle ont pu être estimées pour K_a, CL/F, V/F et CL_{met}/V_{met}. L'ajout de l'effet grossesse sur la constante d'absorption, sur la clairance du RAL libre et de l'effet du polymorphisme d'UGT1A1 sur clairance du RAL métabolisé en RAL-glucuronide a induit une diminution de 15 points, 12 points et 10 points de la fonction objective, respectivement. Après intégration de l'effet grossesse, le K_{tr} a été diminué de 65% et la clairance augmentée de 18% chez les femmes enceintes comparée au postpartum. Ce décalage d'absorption du RAL pendant la grossesse est présenté en Figure 14 avec une concentration de RAL à 0.5h post administration plus élevée chez les femmes non-enceinte que chez les femmes enceintes.

En utilisant ce modèle, en moyenne, les AUC du RAL total et libre ont été diminuées de 25% et 12% chez les femmes pendant le T3 par rapport au postpartum, respectivement. La C_{trough} du RAL total chez la femme enceinte était plus faible que chez la femme non-enceinte, alors que la C_{trough} du RAL libre est similaire chez les femmes enceintes et non-enceintes. L'AUC et la C_{trough} du RAL total ont été comparées avec celles obtenues dans les études PANNA, IMPAACT et QDMARK dans le Tableau 13.

Les 43 nouveau-nés étaient VIH négatif à 6 mois. Aucun effet indésirable n'a été déclaré suite à l'utilisation du RAL. Les anomalies congénitales observées chez 4 nouveau-nés n'étaient

pas imputables au RAL.

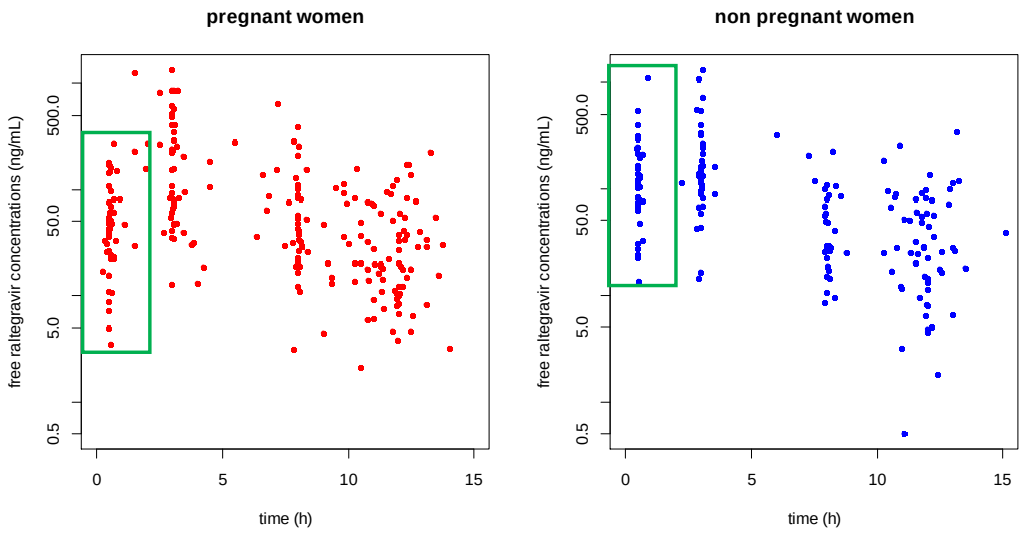


Figure 14. ***Les concentrations du RAL libre en fonction du temps*** *: après l'administration du RAL chez les femmes enceintes (gauche) et chez les femmes non-enceintes (droit).Les carrés vertes montrent les concentrations du RAL libre à 0.5 heure après l'administration du RAL.*

Tableau 13. Comparaison de l'AUC et C_{trough} du RAL avec les résultats dans la littérature.

	Pendant troisième trimestre			**Pendant postpartum**			**Adulte**
	IMPAACT[131]	PANNA[132]	RalFE	IMPAACT[131]	PANNA[132]	RalFE	QDMRK[67]
AUC (mg*h/L)	5.4 (1.4-35.6)	5.0 (3.6-7.0)	5.85 (1.6-13.0)	11.6 (1.6-39.9)	7.11 (4.9-10.3)	7.8 (1.8-21)	5.8
C_{trough} (mg/L)	0.06 (0.01-0.6)	0.08 (0.04-1.3)	0.18 (0.03-0.5)	0.08 (0.02-1.3)	0.12 (0.08-0.19)	0.2 (0.04-0.6)	0.11

Discussion et conclusion

Dans cette étude, nous proposons le premier modèle PK par approche de population pour décrire la concentration plasmatique du RAL libre, total et RAL-glucuronide chez les patientes infectées par le VIH-1 au cours de la grossesse.

L'AUC et la C_{trough} du RAL total observées dans cette étude sont cohérentes avec les données observées dans les études PANNA et IMPAACT 1026s (Tableau 13). De plus, l'AUC du RAL total est diminuée de 25% pendant le T3 par rapport au postpartum, alors que celle du RAL libre est diminuée de 12%. C'est probablement dû à l'augmentation de 17% de la fraction libre du RAL induite par une diminution de la concentration de l'albumine de 20%. La faible diminution de la C_{trough} chez les femmes enceintes, nous a confirmé que l'adaptation de posologie n'est pas utile chez les femmes enceintes.

Dans cette étude, un retard à l'absorption et une diminution de l'absorption du RAL ont été observé, ce qui a été aussi observé par Watts et al.[131] chez 33% des femmes enceintes dans l'étude IMPAACT 1026s. Ce décalage d'absorption est possiblement causé par : la surexpression de la P-gp qui diminue le passage du RAL à traverser la barrière gastro-intestinale pendant grossesse; la diminution de la motilité intestinale pendant la grossesse; les nausées et les vomissements.

Par ailleurs, une augmentation de 18% de la clairance du RAL libre a été observée dans notre étude. L'augmentation de l'activité d'UGT1A1 pendant la grossesse[232] est probablement responsable de cette augmentation de la clairance hépatique du RAL qui est majoritairement métabolisé par UGT1A1[129]. L'augmentation de la clairance rénale du RAL libre peut être due à la surexpression de la P-gp qui élimine plus de RAL pendant la grossesse et à l'augmentation du débit de filtration glomérulaire.

L'effet du polymorphisme génétique rs8175347 d'UGT1A1 sur la clairance hépatique du RAL a été intégré dans le modèle PK proposé. Par rapport aux femmes avec le type muté, les femmes avec le génotype sauvage ont une clairance de formation du métabolite 19% supérieure. Cela a aussi été observé dans une autre étude clinique[233].

Cette étude montre que le RAL est efficace car aucune TME n’a été observée et qu’il a été bien toléré par les patientes. Au vu des résultats de PK, une modification de la dose du RAL pour traiter les femmes enceintes n'est pas nécessaire.

Article 3. soumis dans le *Journal Clinical infection diseases*

Effect of pregnancy on raltegravir free concentrations, the ANRS 160 Ralfe trial

Yi Zheng[1,2,], Déborah Hirt[1,2], Sandrine Delmas[7], Gabrielle Lui[1,2], Sihem Benaboud[1,2], Jerome Lechedanec[7], Jean-Marc Tréluyer[1,2,4], Camille Chenevier-Gobeaux[8], Elisa Arezes[7], Ambre Gelley[9], Imane Amri[9],Saïk Urien[2,3,4], Naim Bouazza [2,3,4], Frantz Foissac [2,3,4], Josiane Warszawski[7], and Jade Ghosn[5,6] for the ANRS 160 RalFe Study Group[§]*

1. Service de Pharmacologie Clinique, AP-HP, Hôpital Cochin, Paris, France
2. Paris Descartes University, EA 7323, Paris, France.
3. Unité de Recherche Clinique Paris Descartes Necker Cochin, AP-HP, France
4. CIC-1419 Inserm, Cochin-Necker, Paris, France
5. AP-HP, Hôpitaux Universitaires Paris Nord Val de Seine, site Bichat-Claude Bernard, service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Paris, France
6. INSERM UMR 1137 IAME, Université Paris Diderot, Faculté de Médecine site Bichat, Paris, France
7. Service d'Epidémiologie et Santé Publique, AP-HP, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France
8. Service de Diagnostic Biologique Automatisé, AP-HP, Hôpital Cochin, Paris, France
9. ANRS, France Recherche Nord&Sud Sida-hiv Hépatites, Paris, France

§. Members of ANRS 160 RalFe Study Group listed in the acknowledgement

*Corresponding author: Yi ZHENG, E-mail: zhengyi86@hotmail.fr;

Keyword: raltegravir; population pharmacokinetics; pregnant women; unbound concentration; HIV

Abstract

BACKGROUND: Raltegravir is the first approved HIV-1 integrase strand transfer inhibitor. Few pharmacokinetics data of unbound raltegravir was available in pregnant women.

METHOD: RalFe ANRS160 study was a non-randomized, open label, multicenter trial enrolling HIV-infected pregnant women receiving a combined antiretroviral regimen containing raltegravir 400 mg twice daily. Biological samples were collected during the third trimester of pregnancy (between 30 and 37 weeks of amenorrhea) and at postpartum (4 to 6 weeks after delivery). None of these women received an antiretroviral drug, which could interact with raltegravir. Free raltegravir, total raltegravir and raltegravir glucuronide concentrations were measured using a validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry and ultrafiltration methods. A population pharmacokinetic model was developed by using the Monolix software.

RESULT: A total of 346 plasma samples were collected from 41 women during pregnancy and from 38 of these women during postpartum. A one-compartment model described free raltegravir (RAL). During pregnancy, the absorption was decreased and delayed and the RAL elimination clearance and glucuronidation increased by 18%. Mean total $C_{through}$ and $AUC_{0\text{-}12h}$ decreased by 14 and 25% during the third trimester of pregnancy, compared to the postpartum period. However, the unbound active trough RAL concentrations were not significantly different during pregnancy compared to the postpartum period (median of 0.042 vs 0.043 mg/L).

CONCLUSION: This is the first study reporting raltegravir free and glucuronide pharmacokinetics during pregnancy. Pregnancy effect is moderate on the active raltegravir free concentration, especially compared to its inter-subject variability, with no clinical relevance.

Introduction

Mother-to-child transmission (MTCT) was one of the most severe causes which contributes to 9% of the new HIV infections [1]. The combined antiretroviral therapy (cART) which has been demonstrated, by different studies[2–5], to be highly effective in the prevention of mother-to-child transmission (PMTCT) of HIV. One of the most important goals of cART is to decrease the level of plasma viral load which is directly proportional to the risk of vertical transmission and to the maternal morbidity and mortality[6,7]. With cART, the rate of MTCT is reduced from15-40% to less than 2%[6,8,9].

Raltegravir (RAL) is the first HIV-1 integrase strand transfer inhibitor (INSTI) approved by FDA since 2007. In previous studies, RAL was shown to decrease viral load effectively with fewer adverse events observed in the HIV infected patients [10,11] [12] .Thus, RAL seems an appealing ARV candidate for women living with HIV and presenting late during pregnancy, as it is paramount to decrease their plasma viral load as quickly as possible in such setting.

However, physiological changes during pregnancy, especially during the third trimester of pregnancy (T3), are known to affect significantly pharmacokinetics of drugs, via absorption, distribution, metabolism and excretion [13–15] . These changes could lead to a decrease in drug concentrations, lowering its effect. For these reasons, it is important to understand the change of RAL pharmacokinetics in pregnant women during T3.

Up to now, only few RAL pharmacokinetics data in pregnant women are available. A phase 4 trial (PANNA study) [16] reported, in eighteen HIV-infected pregnant women followed during pregnancy and post-partum, a mean decrease exposure of 29%. However, this decrease was not consistent for all the pregnant women as 35% of them

had a higher $AUC_{0\text{-}12h}$ during T3. Another RAL pharmacokinetics study (IMPAACT 1026s) [17] reported, in thirty-eight women, an 53% decrease exposure during pregnancy. Of note, in both studies, concomitant medications that could possibly modify RAL exposure were used for several patients, such as ritonavir-boosted atazanavir (4 patients for PANNA study and 2 patients for IMPAACT 1026s study). Based on total concentrations; although lower exposure of raltegravir during pregnancy than during postpartum, both studies concluded that RAL dose does not need to be modified.

For pregnant women, very few data are available for pharmacokinetics of unbound RAL, which is considered as the fraction active of RAL and raltegravir-glucuronide (RAL-GLU) pharmacokinetics. RAL was shown to bind to human serum albumin (HSA) with 83%[18]. Thus, the decrease in plasma protein concentration[19] reported during pregnancy could lead to an increase in the unbound RAL. Furthermore, RAL is metabolized by UGT1A1 isoenzyme which activity increases during pregnancy (that could lead to a decrease in RAL)[20], and for which genetic polymorphism has been reported. RAL is also known to be a substrate of the P-glycoprotein (P-gp)[21], a highly expressed transporter in placenta[22] .

The aim of this study was to investigate the pharmacokinetics of unbound, total and glucuronide RAL in pregnant women and to evaluate the influence of pregnancy and genetics on its pharmacokinetics.

Materials and methods

Patients: The RalFE ANRS 160 study (NCT02099474) was an open-label, multicenter, phase II randomized trial. All HIV-1 infected pregnant women included in this study were more than 18 years old and between 30 and 37 weeks of amenorrhea. The French Ethics Committee and the relevant authority approved this study, and a signed informed

consent was obtained for the pregnant women.

Treatments: To be eligible, pregnant women enrolled had to be on a stable cART for at least 15 days before inclusion, containing RAL at the standard dosage (400 mg twice daily) by oral administration. Participating women could not receive atazanavir, fosamprenavir, efavirenz, rifampicine, phenobarbital, phenytoin, gastrointestinal topicals, antacids or adsorbents which had been shown to interact with RAL, as mentioned in product information[23].

Sample Collection: Five blood samples were collected at 0, 0.5, 3, 8 and 12 hours after drug intake in T3 during pregnancy (between 30 and 37 weeks of amenorrhea) and in the postpartum period (between 4 and 6 weeks after delivery). All the blood samples were collected into 5-ml EDTA vacutainer tubes. All these blood samples were centrifuged at 4000rpm during 5 min at 4°C, within 8 hours after sampling, and then plasma was stored at −80 °C until analysis. An aliquot of blood sample for each woman was directly stored at -80°C for the extraction of DNAs and genotyping analysis. Plasma samples were used to determine RAL unbound, total and glucuronide concentrations. HSA, alanine aminotransferase (ALAT), aspartate aminotransferase (ASAT), creatinine (CREA) and bilirubin (BILI) were measured during T3 and postpartum.

Analytical Methods: RAL unbound, total and glucuronide concentration were measured in the clinical pharmacology department of Cochin Hospital (Paris, France). The method for simultaneous quantification of total and glucuronide RAL concentration was validated using a LC-MS/MS methodology. Calibration curves ranged from 10 to 5000 ng/mL. RAL-free fraction was obtained by an ultra-filtration method using Centrifree® Ultrafiltration Devices (molecular weight cutoff 30kDa) (Merck Millipore, Ireland), and then measured using a validated LC-MS/MS method with calibration curve ranged from

1 to 400ng/mL. These two methods were both validated according to Food and Drug Administration (FDA) guidelines[24] with the intra- and inter-day accuracy and precision inferior to 12%.

Genotyping:

DNAs were extracted from total blood using Qiagen Midi kit (France, Courtaboeuf) following the manufacturer's instructions. Quality control and quantity were assessed with a Nanodrop (ThermoFisher®).

The rs1045642 polymorphism in ABCB1 has been genotyped using Taqman pre-designed kit (Life Technologies, Courtaboeuf), following manufacturer's instructions on Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System.

The polymorphism of TA repetition in the TATA box of UGT1A1, noted rs8175347, has been sequenced using in the first PCR step the following primers (18832463, Ehmer): Forward: 5'-AACATTAACTTGGTGTATCGATTGGT-3' Reverse: 5'-AGCAGGCCCAGGACAAGT-3'. PCR amplicons were then purified and sequenced by Eurofins (France) using the cycle sequencing technology (dideoxy chain termination/cycle sequencing) on ABI 3730XL sequencing machines, and BigDye3.1 chemistry.

Population pharmacokinetic model: The modeling of RAL unbound, total and glucuronid concentrations was performed using the software MONOLIX, version 2018R1 (http://lixoft.com).

The RAL unbound concentration was firstly modeled. Then the bound RAL concentrations were linked to the unbound concentrations by relationships integrating the HSA concentrations, by linear and nonlinear protein binding regression. The RAL-

GLU concentration was lastly added by the addition of another compartment, linked to the unbound compartment by a first order constant. The inter-individual variabilities (IIV) were assumed to be a log-normally distribution. Proportional models were used to describe unbound, total and glucuronide RAL residual variabilities.

Covariates (COV) included age, body weight, ASAT, ALAT, CREA, BILI pregnancy and two genetic polymorphism (UGT1A1*28 and rs1045642 in P-gp) were investigated for developing the model. These covariates were evaluated via upward-backward model building, as previously described[25]. Final equations are reported in table..

Finally, the model was evaluated by the prediction-corrected visual predictive check (pcVPC) which was performed by 500 simulations form the final model.

Pharmacokinetic comparisons between women during pregnancy and post-partum:

Areas under the curve and trough concentrations for the free and total RAL were derived from the final model. Wilcoxon paired test was used to compare these parameters during and after pregnancy. RAL free and total trough concentrations were also compared respectively to the concentration that inhibits 95% of the virus (i.e. 2.5 mg/L) and the mean protein binding corrected concentration which inhibits 95% of the virus (i.e. 15 mg/L).

Results

Population Characteristics: For the pharmacokinetic analysis, forty-one pregnant women were included, with a median age of 33.8 (23.3-45.7) years and a median body weight of 77 (54-109) kg. More demographic characteristics are summarized in Table 1. Forty-one women had blood sampling during T3 and thirty-eight of them had blood

sampling during the postpartum period. A total of 346 plasma samples were collected, then 346 total RAL, 340 unbound RAL and 346 RAL-GLU were quantified. All concentrations were collected at steady state.

Table 1. Subject characteristics

Median age at delivery (range)	33ans (23-45)
Nationality (N[1])	Sub-Saharan African 72% (31)
	France 16% (7)
	Haiti-Portugal-Switzerland 12% (5)
Tabacoo consume	5
Alcohol consume	0
Drug consume	0
Start of raltegravir	
At the moment of conception, N[1]	18
If not, the time of beginning (range)	20 (2-34) weeks
Concomitant ARVs	
NRTI	9% (4) 3TC
	9% (4) 3TC+ABC
	49% (21) TDF+FTC
NRTI + PI	2% (1) 3TC +DRV/r
	12% (5) TDF+FTC+DRV/r
NNRTI	2% (1) ETV
NNRTI+PI	2% (1) ETV+ DRV/r
NRTI + NNRTI	2% (1) TDF+NVP
PI	14% (6) DRV/r
Inclusion (day 0) (n=41)	
Gestation age, weeks, median (range)	33 (30-37)
Weight, kg, median (IQR)	77 (54-109)
HIV RNA detectable (>50 copies/mL)[2]	16% (6)
If HIV RNA detectable, median viral load (IQR)	52 (36-90) copies/mL
CD4 count, cells/µL, median (IQR)	539 (347-682)
Delivery (n=41)	
Gestation age, weeks, median (IQR)	39 (39-40)
Cesarean delivery	16 (37%)
HIV RNA detectable (>50 copies/mL)	12% (5)
If HIV RNA detectable, median viral load (IQR)	42 4(0-68) copies/mL
CD4 count, cells/µL, median (IQR)	599 (459-789)
Postpartum (n=38)	
Time after delivery, weeks, median (IQR))	5 (4-5)
Weight, kg, median (IQR)	71.5 (50-100)
HIV RNA detectable (>50 copies/mL)	21% (7)
If HIV RNA detectable, median viral load (IQR)	58 (40-2230) copies/mL
CD4 count, cells/µL, median (IQR)	609 (439-746)
Pregnancy outcomes (n=42)	
Moderate premature[3]	5% (2)
Birth weight, g, median (IQR)	3145 (1760-3115)
Infant HIV DNA and/or RNA PCR test negative	100% (42)

1. *N: Number of patients*
2. *Data available for 37 patients*
3. *Gestation ages between 32 to 36 weeks*
4. *Data available for 42 infants*

Abbreviation: nucleoside analog reverse-transcriptase inhibitor (NRTI), protease inhibiter (PI), non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), lamivudine (3TC), abacavir (ABC), tenofovir (TDF), emtricitabine (FTC), ritonavir boosted darunavir (DRV/r), etravirine (ETV), nevirapine (NEV).

Three samples were under the limit of quantification (LOQ) of the method (one for total, one for free and one for glucuronide RAL), and thus, they were replaced by half of the LOQ for modeling (29). The genotyping result of P-gp was available for thirty-nine women. The percentages of the wild-type homozygotes, mutant homozygotes and heterozygotes of P-gp was 74.35% (n=29), 7.69% (n=3) and 17.95% (n=7), respectively. For UGT1A1, forty-one result were available: 24.39% of women (n=10) were wild type with (TA)6/(TA)6, 2.44% of women (n=1) with (TA)5/(TA)6, 2.44% of women (n=1) with (TA)5/(TA)7, 39.02% of women (n=16) with (TA)6/(TA)7, 2.44% of women (n=1) with (TA)6/(TA)8, 26.83% of women (n=11) with (TA)7/(TA)7 and 2.44% of women (n=1) with (TA)7/(TA)9.

Population Pharmacokinetic Modeling: A one compartment model, with first order absorption and elimination, best described the mother's unbound RAL concentrations. A transit compartment was added to mimic the delayed arrival of the drug in the plasma. Finally, Ka and the transit time constant (K_{TR}) were confounded to a unique absorption parameter ($K_a = K_{TR}$). As RAL was mostly bound to HSA, the total RAL concentrations (C_T) were related to the unbound RAL concentrations (C_U) according to a non-specific (linear) binding to HSA, i.e., $C_T = C_U*(1 + K_{NS}*HSA)$. A non-linear binding was also tested but did not improve the model. An additional compartment was added to describe the RAL-GLU formation from RAL.

The final combined pharmacokinetic model for unbound RAL, total RAL and RAL-GLU is graphically represented in Figure 1. The between-subject variability was estimated for K_{TR}, CL_U/F, V_U/F and CL_{met}/V_{met}. The inclusion of pregnant effect on the K_{TR} led to a decrease of 15.5 units in the function objective value and 18% in the K_{TR} intersubject variability. Then the inclusion of pregnancy effect on both the CL_U/F and CL_{met}/V_{met} led

to a decrease of 10 units in the function objective value and 3% in both the CL_U/F intersubject variability and CL_{met}/V_{met} intersubject variability. Furthermore the effect of UGT1A1 polymorphism on the CL_{met}/V_{met} was also significant. Compared to wild-type homozygotes, the group of mutant homozygotes and heterozygotes was found to have an 18% decrease in CL_{met}/V_{met}. After inclusion of these three covariates, no other covariate had a significant effect on RAL pharmacokinetics. The final population pharmacokinetics parameters are summarized in Table 2 and the population pharmacokinetic curves for unbound, total and glucuronide RAL are represented in Figure 2. Pregnant women were found to have a lower K_{TR} (65%) resulting in a delayed absorption of the drug and a higher clearance (18%) resulting in a faster elimination compared to the non-pregnant women. The prediction-corrected visual predictive check shows that the median of observed data is well included within the 90% confidence interval of the simulated data (Figure 3).

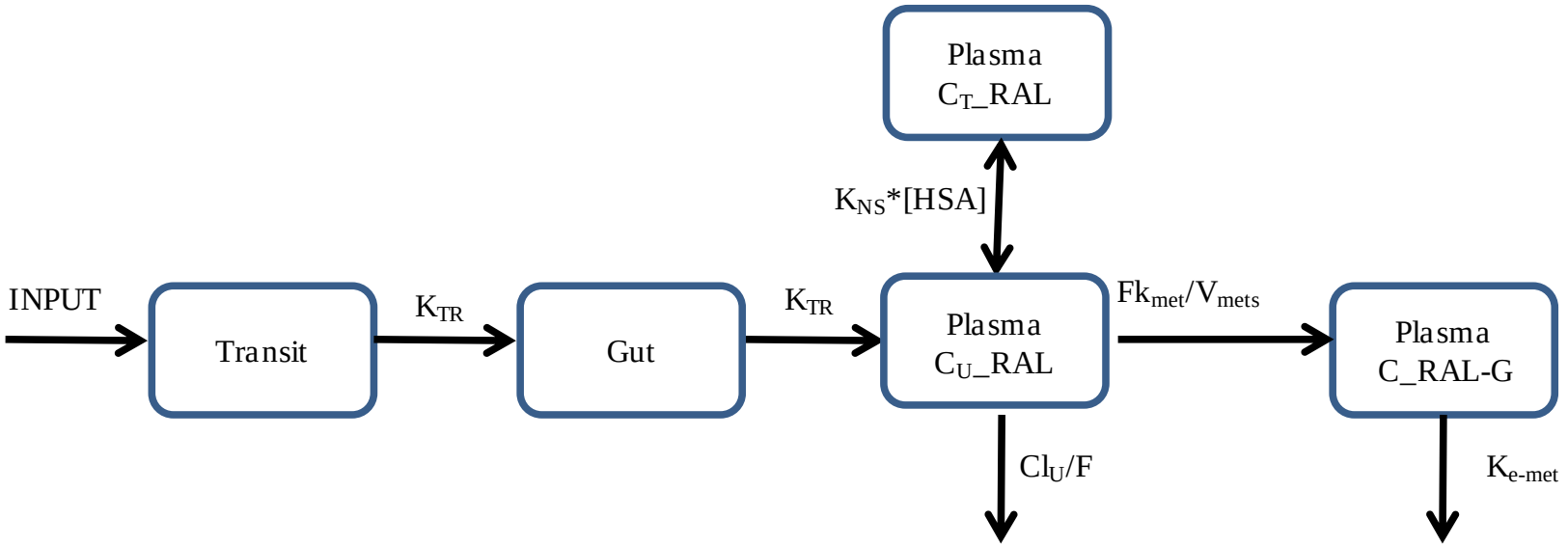


Figure 1. Population pharmacokinetic model of unbound, total and glucuronide RAL concentrations. In this model, C_U-RAL, C_T-RAL and C_RAL-G represent the unbound, total and glucuronide RAL concentration in plasma. The parameters estimated was the transit /absorption constant rate (K_{TR}), apparent elimination clearance of unbound RAL (CL_U/F), apparent volume of distribution of unbound RAL (V_U/F), apparent transfer from unbound RAL to RAL-GLU (CL_{met}/V_{met}) apparent elimination rate constant of RAL-GLU ($K_{e\text{-}met}$) , K_{NS}, the non specific binding constant for has ($C_{BOUND} = K_{NS}*C_U*[HSA]$) and the number of RAL binding sites in HSA. [HSA] is the concentration of HSA in plasma.

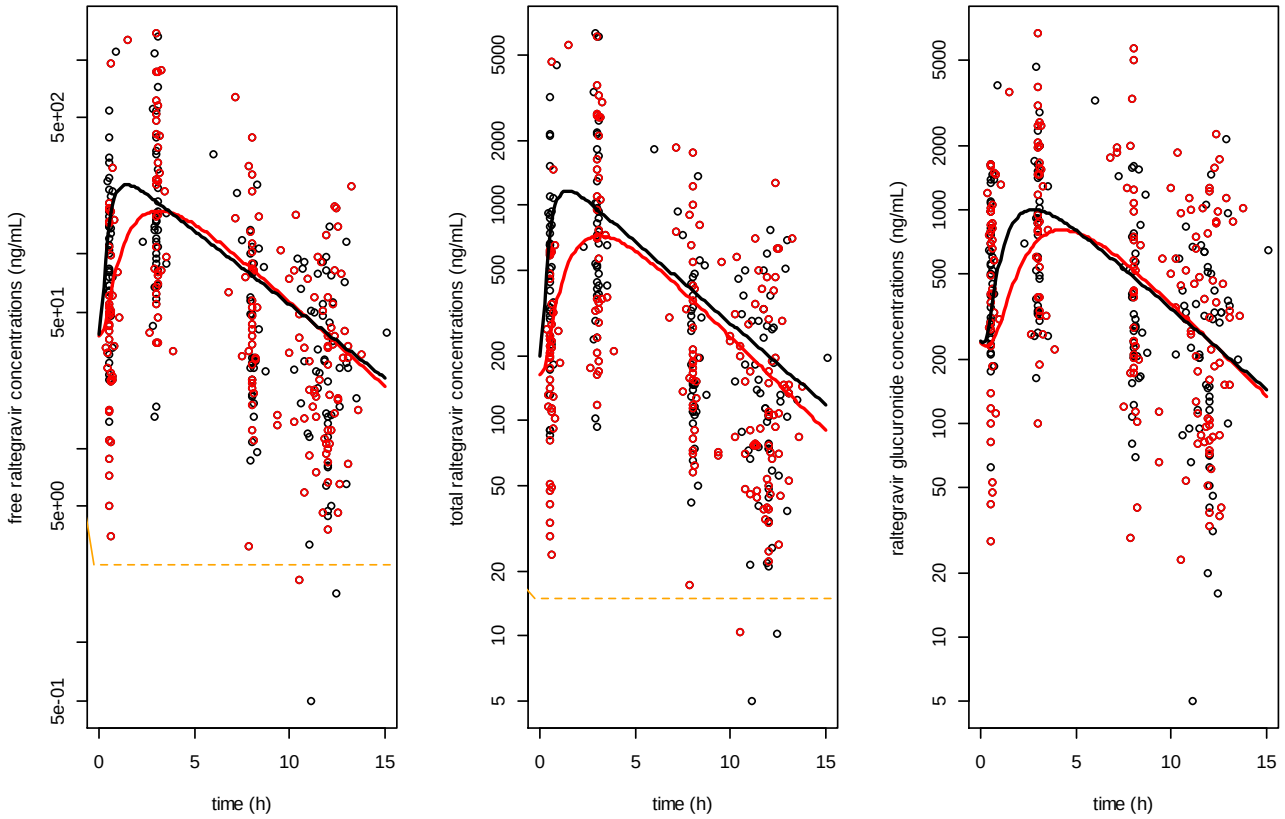


Figure 2. Observed concentrations of raltegravir free fraction, total fraction and glucuronid fraction (from left to right) and individual median predictions (curve) for each fraction respectively obtained from the pharmacokinetic model proposed. The red color represent the concentration obtained during pregnancy and the black color represent the concentration obtained during post-partum.

Table 2. Parameters estimated of the final unbound, total and glucuronid raltegravir population model in 41 women during the third trimester pregnancy and postpartum.

Parameter	Estimate	RSE%[1]
K_{TR} (h^{-1})	2.87	20.2
CL_U /F($L.h^{-1}$)	281	12
V_U /F(L)	1690	21.1
CL_{met} /V_{met} (h^{-1})	5.4	21.1
$K_{e\text{-}mets}$ (h^{-1})	1	14.3
K_{NS}	0.098	6.89
$\beta^{K/preg}$	0.35	12.2
$\beta^{CL/preg}$	1.18	3.59
$\beta^{CLm/UGT}$	0.81	16.8
Corr_V_{un}_CL_{un}	0.912	3.46
ω _K_{TR}	1.03	13.2
ω _CL_U	0.708	12
ω _V_U	1.16	12.5
ω _CL_{met}	0.369	17.7
RPE-unbound	0.68	0.04
RPE-total	0.714	0.004
RPE-metabolite	0.661	0.009

KEY: rse%, relative standard error; K_{TR}, transition rate/absorption rate; CL_U, clearance of unbound raltegravir; V_U central volumes of distribution of unbound prednisolone; CL_{met}, clearance of raltegravir metabolized into raltegravir-glucuronide;V_{met}, volumes of distribution of raltegravir-glucuronide; $K_{e\text{-}met}$, elimination rate of unbound raltegravir by other process; K_{NS}, the non-specific binding constant for has (C_{BOUND} = K_{NS}*C_U*HSA); $B^{K/preg}$, the effect of pregnancy on absorption rate of unbound raltegravir; $\beta^{CL/preg}$, the effect of pregnancy on clearance of unbound raltegravir; $\beta^{CLm/UGT}$, the effect of UGT1A1 on clearance of raltegravir metabolized into raltegravir-glucuronide; ω, between-subject variability; RPE, residual proportional error; F, bioavailability. The pregnancy and UGT1A1 effect was obtained using the equiqtion:

$$Pi = \theta i \times \left(\beta_{Pi}^{preg}\right)^{PREG} ou\ Pi = \theta i \times \left(\beta_{Pi}^{ugt}\right)^{UGT}$$

Where θi is the typical parameter Pi value, β_{Pi}^{preg} the estimated influential factor of pregnancy to the parameter Pi, β_{Pi}^{ugt} the estimated influential factor of UGT1A1 to the parameter Pi, PREG=1 if samples were collected during pregnancy and 0 if otherwise, UGT=1 if samples were collected from the women with mutation type of polymorphism de UGT1A1 and 0 if the women with homozygote wild type.

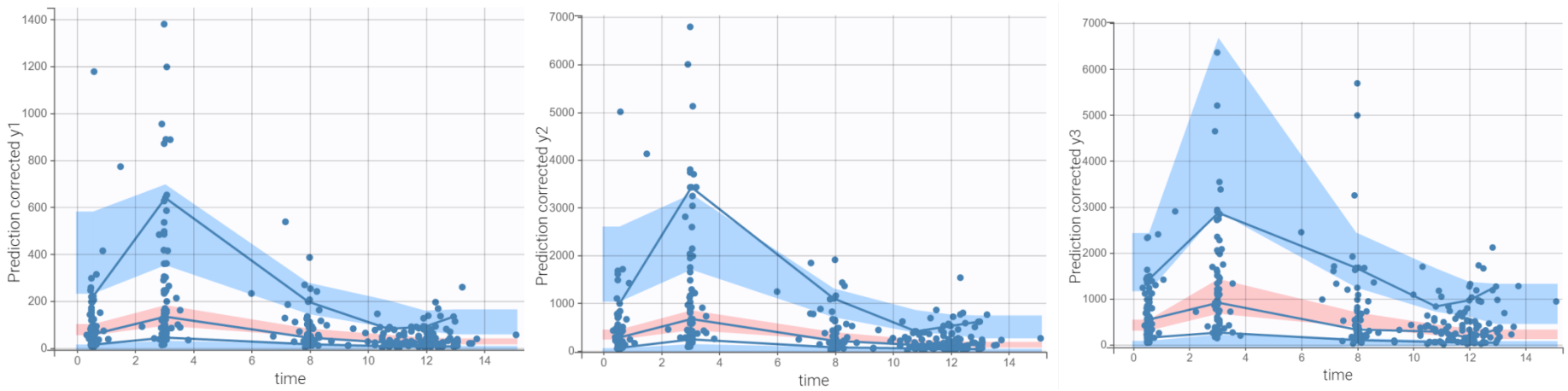


Figure 3. Prediction-corrected visual predictive check (PC-VPC) plot for evaluation the pharmacokinetic model of raltegravir free fraction, total fraction and glucuronid fraction (from left to right). The lines show the 10th, 50th, and 90th percentiles of observed data. The areas represent the 90% confidence interval around the simulated percentiles. Blue filled circles stand for observed concentrations of RAL for each fraction.

Pharmacokinetic comparisons between pregnant and non-pregnant women:

Median (range) HSA plasma concentrations was 33.2 g/L (19.4 to 49.5 g/L) during T3 and 41.4g/L (22.9 to 56.2 g/L) during postpartum. The median unbound fraction (f_U) was 22.5 % during T3 and 19.2% during postpartum.

Areas under the curve and trough concentrations for the free and for the total RAL were reported in Table 3. Free and total area under the curve were significantly lower in pregnant women than in the non-pregnant women ($p<10^{-6}$). A mean decrease of 25% for total AUC and 12% for unbound AUC was observed in pregnant women compared to non-pregnant women. For trough concentrations, total RAL were significantly lower in pregnant than in non-pregnant women ($p<0.006$), however unbound trough RAL concentrations were not significantly different from pregnant and non-pregnant women. A mean decrease of 14% for total trough RAL concentrations was observed in pregnant women compared to non-pregnant women.

As shown in Figure 2, two samples from non-pregnant women and one sample from a pregnant woman (among 340 samples) had an unbound RAL below the 95% inhibitory concentration (i.e. 2.5 mg/L). A same conclusion was made for the 95% inhibitory total concentration (i.e. 15 mg/L).

Table 3. Free and total raltegravir areas under the curve and trough concentrations for pregnant and post-partum women

median (range)	pregnant	Post-partum
free AUC (mg/L.h)	1.45 (0.32-3.61)	1.64 (0.38-4.18)
total AUC (mg/L.h)	5.85 (1.35-12.98)	7.83 (1.76-21.08)
free C_{trough} (mg/L)	0.043 (0.0058-0.1)	0.042 (0.074-0.11)
total C_{trough} (mg/L)	0.176 (0.026-0.48)	0.2 (0.038-0.57)

Clinical outcomes: All 43 infants born tested negative for HIV at Month 6. Eight adverse events were reported in 7 women, none was considered to be possibly related the use of RAL. The only grade 3 event was pregnancy cholestasis. Congenital abnormalities were reported for 4 infants (hexadactyly, agenesis of right kidney and duplicated vagina, hypoplasia left thumb and duplicated digestive tract in iliac fossa) and 5 infants (12%) were hospitalized for 6 adverse events. However, these abnormalities and adverse events were not possibly related to the use of RAL. Thus, RAL (400mg bid) was considered to be well tolerated by pregnant women in this study. As raltegravir protein binding and raltegravir elimination were shown to be linear, this model could be used to predict raltegravir free fraction in women who would receive the new formulation of RAL 1200 mg once daily.

Discussion

This is the first population pharmacokinetic model which describes unbound, total and glucuronide RAL concentrations in pregnant women. This population approach is particularly useful in pregnant women, for whom it is difficult to collect many samples for a sufficiently marge sample of women to correctly describe the high variability of this drug.

To date, only few RAL pharmacokinetics data are available in pregnant women. In our study, during T3, mean total $C_{through}$ and $AUC_{0\text{-}12h}$ were 176 ng/mL and 5851 ng*h/mL, corresponding to a decrease of 14 and 25%, compared to the postpartum period. This is quite in agreement with previous studies. In the PANNA study [16], the median $C_{through}$ and AUC $_{0\text{-}12h}$ were 77 ng/mL and 5000 ng*h/mL during T3, with a mean decrease of 36% and 29% compared to postpartum. In the IMPAACT 1026s study[17], during T3, the median $C_{through}$ and AUC $_{0\text{-}12h}$ were 64 ng/mL and 5400 ng*h/mL with a mean decrease of 20% and 53% compared to postpartum.

RAL is 83% plasma protein bound, mostly to the HSA[26]. As HAS decreased during pregnancy and is about 37.6±3.6% at 34 weeks of gestation [27], RAL free fraction should increase. Thus, unbound antiretrovirals are considered as the active form, which could cross physiological barriers[26,28]. All previous studies only focused on the pharmacokinetics of total RAL, however unbound RAL should be more informative.

In the ANRS 160 Ralfe trial, the median percentage of unbound fraction was 22.5% during T3 and 19.2% during postpartum. This found was not different from previous results which was 26.2% in healthy patients and 23.8% in HIV-infected patients[26]. The decrease in unbound raltegravir exposure during pregnancy is less important than the total exposure; a mean decrease of 25% for total AUC and 12% for unbound AUC was observed in pregnant women compared to non-pregnant women. Moreover, if a significant decrease of 14% was observed for total trough RAL concentrations in pregnant women, the unbound active trough RAL concentrations were not significantly different between pregnant and non-pregnant women. Thus, the dosage should not be modified during pregnancy.

In our study, pregnant women were found to have a lower absorption/transit constant rate (K_{TR} was 65% lower) corresponding to a lower C_{max} and a delayed absorption. If the

decreased of C_{max} has also been reported in previous studies[16,17], the delayed absorption was not observed in these studies, as no different T_{max} was observed between pregnant women and non-pregnant women. However Watts et al. had also observed an absorption lag time in about a third of their pregnant women[17] which is coherent with our results. Furthermore, as a substrate of P-gp, the absorption of RAL might be reduced by increased expression of intestinal P-gp [21,29] during pregnancy[30]. Pregnancy associated delayed gastric emptying and reduced small intestine motility could possibly enhance this decrease of RAL absorption[15,31]. Nausea and vomiting could also lead to a reduced absorption of RAL[15].

Pregnant women were found to have an 18% increased apparent elimination clearance which reflects increased RAL glucuronidation, increased elimination of the unbound RAL and decreased bioavailability. Indeed, RAL was shown to be primarily metabolized by the UGT1A1 isoenzyme[32]. In previous studies, UGT1A1 activity was found to be increased during pregnancy due to increased cortisol and progesterone levels[33,34]. Moreover, RAL is 9% eliminated unchanged in urine and glomerular filtration rate is known to be increased during pregnancy. Finally, RAL is substrate of P-gp which is more expressed during pregnancy and could result in an increased efflux of RAL[21] (decreasing bioavailability).

In UGT1A1 gene, the most studied polymorphism is the rs8175347, which has been shown to reflect the expression and activity of UGT1A1[35,36]. This polymorphism is located in the promoter region and consisted of variation in TA repetition in the TATAA box[37]. The wild type allele is $(TA)_6TAA$ more frequent in Caucasian population, whereas the alleles muted with $(TA)_5$, $(TA)_7$ or $(TA)_8$ are more frequent in Africains[38]. This mutant TATAA box was associated with a decreased expression and activity of UGT1A1

which contributes to hyperbilirubinemia[39]. In the proposed pharmacokinetic model, a decrease of 19% for RAL glucuronidation was found for the women with muted alleles compared to the women with wild type of the promoter of *UGT1A1*. This result was consistent with previous studies[37,40]. In an clinic study, the median ratios of RAL-GLU/RAL concentrations was showed to have a significantly decreased of 50% and 45% in $(TA)_7TAA$ and $(TA)_5TAA$ patients, respectively, compared to that of $(TA)_6TAA$ patients[40]. Furthermore, in this study, a woman and her baby with the 9 repeats TA in TATAA box ($(TA)_9TAA$) was observed. To our best knowledge, this is the first report of 9 TA repeats for this polymorphism in human. No effect was found for P-gp polymorphism on the absorption or clearance of RAL with 9 TA repeats.

In conclusion, this is the first population pharmacokinetic model which describes unbound, total and glucuronide RAL concentrations in pregnant women. During T3, mean total $C_{through}$ and AUC $_{0\text{-}12h}$ decreased by 14 and 25%, compared to the postpartum period. Pregnant women were found to have a delayed and lower absorption of the drug and an 18% higher elimination compared to the non-pregnant women. If a significant decrease of 14% was observed for total trough RAL concentrations in pregnant women, the unbound active trough RAL concentrations were not significantly different between pregnant and non-pregnant women. Thus, the dose of RAL does not warrant modification during pregnancy.

Funding: This work was supported, and funded by Agence National de Recherche sur le sida et les hepatitis virales (ANRS).The study was also conducted with the support of MSD France.

Acknowledgements:

ANRS 160 RalFe Study Group

Agen M, Arezes E, Delmas S, Garin A, Huyn P, Le Chenadec J, Warszawski J (Equipe EPF: CESP INSERM U1018, Le Kremlin-Bicêtre, France),

Independent Committee: David Rey (Hopital civil strasbourg), Dominique Costagliola (U1136 ,Paris), Francis Barin (CHU tours)

APHP Hôpital Avicenne, Bobigny, France (Yazid Baazia, Wael Mansour, Iwaka Valentin); APHP Hôpital Jean Verdier, Bondy, France (Amélie Benbara*, Lionel Carbillon, Catherine Delannoy, Marie-Florence Dzukam, Vincent Jeantils*, Mufide Kahraman, Eric Lachassine*, Oscar Lezcano, Fatouma Mchangama, Youssouf Mohamed Kassim); APHP Hôpital Béclère, Clamart, France (Ghislaine Bachelet, Yves Castanet, Véronique Chambrin*, Laure Clech*, Anne Gaël Cordier*, Sylvie Cosse, Benjamin Deviaris, Sophie Nedellec, Salima Oucherif, Isabelle Poirrier, Mariem Raho-Moussa); APHP Hôpital Beaujon, Clichy, France (Maïa Banige, Christine Bazin, Mariam Bensalah, Pierre-François Ceccaldi*, Agnès Villemant Uludag*); APHP Hôpital Louis Mourier, Colombes, France (Martine Bloch, Catherine Crenn-Hebert, Dominique Duro, Corinne Floch-Tudal*, Houria Ichou, Laurent Mandelbrot, Laurence Marty, Fabienne Mazy, Françoise Meier*, Emmanuel Mortier); Centre Hospitalier Sud Francilien, Corbeil Essonne, France (Zaitoun Abdallah Moussa, Nouara Agher, Martine Blanchard, Amélie Chabrol*, Pierre Chevojon, Alain Devidas, Anne-Claire Donnadieu*, Dominique Fernandez, Michèle Granier*, Sabah Kubab, Joelle Neizelien, Rose Nguyen, Claire Malbrunot); Centre Hospitalier Intercommunal, Créteil, France (Jérôme Barré, Valérie Garrait*, Diane Jourdan, Christiane Kommé, Patrick Ledudal, Lanto Ratsimbazafy*, Laurent Richier); APHP Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France (Claire Boithias, Katia Bourdic, Claire Colmant*, Corinne Fourcade*, Sylvie Fridmann, Cécile Goujard*, Ikram Jrad, Laure Jule, Delphine Peretti*); Centre Hospitalier Intercommunal, Montreuil, France (Valérie Chety, Fatma Hamila, Brigitte Heller-Roussin*, Christophe Poncelet*, Hana Talabani-Boizot, Cécile Winter*); APHP Hôpital Bichat, Paris, France (Lahcene Allal, Mélanie Bertine, Marylène Bodard, Agnès Bourgeois Moine*, Sandrine Chendjou, Florence Damond, Sylvie Lariven, Sylvie Le Gac, Sophie Matheron*, Fabienne Mazy, Sarah Peerbaccus, Bao Phung, Adriana Pinto, Mandovi Rajguru, Julia Zelie); APHP Hôpital Cochin-Port Royal, Paris, France (Touria Belkacem, Sihem Benaboud, Alexandra Compagnucci, Ghislaine Firtion, Déborah Hirt, Anne Krivine, Gabrielle Lui, Yi Zheng, Valérie Marcou, Emmanuelle Pannier*, Jean-Marc Treluyer); APHP Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France (Lio Collias, Marina Karmochkine*, Hélène Peré, Marie-Laure Lucas, Magalie Ptak, Christelle Ledoux) ; APHP Hôpital Hôtel-Dieu, Paris, France (Agnès Cros, Jade Ghosn*, Maria Blanca Hadacek, Christophe Kokougan, Aline Maignan, Audrey Merlet, Thu Huyen Nguyen, Hafeda Rostane, Alain Sobel, Jean Paul Viard) ; APHP Hôpital Lariboisière, Paris, France (Dominique Ayral, Guylaine Castor-Alexandre, Nicole Ciraru-Vigneron*, Véronique Delcey, Audrey Depond, Myriam Diemer, Geneviève Mouchnino, Anne Coursol, Agathe Rami*, Pierre Sellier, Safia Souak); APHP Hôpital Necker, Paris, France (Véronique Avettand, Stéphane Blanche*, Caroline Charlier, Claudine Duvivier*, Pierre Frange, Nathalie Kerguen, Delphine Lemercier, Marine Driessen*, Adeline Melard, Christine Pichon, Claire Rouzaud, Fatima Touam, Florence Veber); APHP Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière, Paris, France (Henri Agut, Manuela Bonmarchand, Patricia Bourse, Erika Bourzam, Fabienne Caby, Vincent Calvez, Aziza Chermak, Marc Dommergues*, Catherine Lupin, Isabelle Melonio, Audrey Merlet, Marco Millones, Luminata Schneider, Anne Simon*, Jennifer Sommer, Cathia Soulie, Roland Tubiana*, Christine Blanc); APHP Hôpital Saint-Louis, Paris, France (Marie-Laure Chaix, Constance Delaugerre, Nadia Mahjoub) ; APHP Hôpital Tenon, Paris, France (Bassel Bachour, Valèrie Berrebi, François Hervé*, Catherine Lependeven, Lise Selleret*,

Laurence Slama*, Pélagie Thibaut, Loraine Zarka); APHP Hôpital Trousseau, Paris, France (Eida Bui, Bruno Carbonne, Catherine Dollfus*, Philippe Faucher*, Yanne Michel, Kendra Saloum, Aurélie Schnurgier, Marie-Dominique Tabone, Geneviève Vaudre); APHP Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France (Coralie Pallier, Muriel Mace, Lina Mouna) ; Centre Hospitalier Général, Saint-Denis, France (Sabrine Andris, Pascal Bolot*, Abdelghani Boussairi, Chantal Chaplain, Dieudoné Ekoukou, Nelly Ghibaudo, Amel Mahdi*, Christelle Nourry, Isabelle Gros, Marie-Aude Khuong-Josses*).

* Principal investigator

Reference

1. WHO. Global guidance on criteria and processes for validation: Elimination of Mother-to-Child Transmission of HIV and Syphilis. WHO. Available at: http://www.who.int/reproductivehealth/publications/emtct-hiv-syphilis/en/. Accessed July 27, 2018.

2. Cooper ER, Charurat M, Mofenson L, et al. Combination Antiretroviral Strategies for the Treatment of Pregnant HIV-1-Infected Women and Prevention of Perinatal HIV-1 Transmission. JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr 2002; ***29****: 484.*

3. Townsend CL, Cortina-Borja M, Peckham CS, de Ruiter A, Lyall H, Tookey PA. Low rates of mother-to-child transmission of HIV following effective pregnancy interventions in the United Kingdom and Ireland, 2000–2006. AIDS 2008; ***22****: 973.*

4. Fowler MG, Qin M, Fiscus SA, et al. Benefits and Risks of Antiretroviral Therapy for Perinatal HIV Prevention. N Engl J Med 2016; ***375****: 1726–37.*

5. Dabis F, Msellati P, Meda N, et al. 6-month efficacy, tolerance, and acceptability of a short regimen of oral zidovudine to reduce vertical transmission of HIV in breastfed children in Côte d'Ivoire and Burkina Faso: a double-blind placebo-controlled multicentre trial. The Lancet 1999; ***353****: 786–92.*

6. Warszawski J, Tubiana R, Le Chenadec J, et al. Mother-to-child HIV transmission despite antiretroviral therapy in the ANRS French Perinatal Cohort. AIDS Lond Engl 2008; ***22****: 289–99.*

7. Myer L, Essajee S, Broyles LN, et al. Pregnant and breastfeeding women: A priority population for HIV viral load monitoring. PLoS Med 2017; ***14****. Available at:*

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5557351/. Accessed December 5, 2018.

8. Delicio AM, Lajos GJ, Amaral E, et al. Adverse effects of antiretroviral therapy in pregnant women infected with HIV in Brazil from 2000 to 2015: a cohort study. BMC Infect Dis 2018; ***18****. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6161436/. Accessed December 5, 2018.*

9. Connor EM, Sperling RS, Gelber R, et al. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. N Engl J Med 1994; ***331****: 1173–80.*

10. Markowitz M, Morales-Ramirez JO, Nguyen B-Y, et al. Antiretroviral Activity, Pharmacokinetics, and Tolerability of MK-0518, a Novel Inhibitor of HIV-1 Integrase, Dosed As Monotherapy for 10 Days in Treatment-Naive HIV-1-Infected Individuals: JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr 2006; ***43****: 509–15.*

11. Grinsztejn B, Nguyen B-Y, Katlama C, et al. Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial. The Lancet 2007; ***369****: 1261–9.*

12. Markowitz M, Nguyen B-Y, Gotuzzo E, et al. Rapid and durable antiretroviral effect of the HIV-1 Integrase inhibitor raltegravir as part of combination therapy in treatment-naive patients with HIV-1 infection: results of a 48-week controlled study. J Acquir Immune Defic Syndr 1999 2007; ***46****: 125–33.*

13. Bailey H, Zash R, Rasi V, Thorne C. HIV treatment in pregnancy. Lancet HIV 2018; ***5****: e457–67.*

14. Koren G, Pariente G. Pregnancy- Associated Changes in Pharmacokinetics and their Clinical Implications. Pharm Res 2018; ***35****: 61.*

15. Gilbert EM, Darin KM, Scarsi KK, McLaughlin MM. Antiretroviral Pharmacokinetics in Pregnant Women. Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther 2015; ***35****: 838–55.*

16. Blonk MI, Colbers APH, Hidalgo-Tenorio C, et al. Raltegravir in HIV-1–Infected Pregnant Women: Pharmacokinetics, Safety, and Efficacy. Clin Infect Dis 2015; ***61****: 809–16.*

17. Watts DH, Stek A, Best BM, et al. Raltegravir pharmacokinetics during pregnancy. J Acquir Immune Defic Syndr 1999 2014; ***67****: 375–81.*

18. Iwamoto M, Wenning LA, Petry AS, et al. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Raltegravir After Single and Multiple Doses in Healthy Subjects. Clin Pharmacol Ther 2008; ***83****: 293–9.*

19. Roustit M, Jlaiel M, Leclercq P, Stanke-Labesque F. Pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of antiretrovirals in pregnant women. Br J Clin Pharmacol 2008; ***66****: 179–95.*

20. Maliakkal A, Walmsley S, Tseng A. Critical Review: Review of the Efficacy, Safety, and Pharmacokinetics of Raltegravir in Pregnancy. JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr 2016; ***72****: 153–61.*

21. Hashiguchi Y, Hamada A, Shinohara T, Tsuchiya K, Jono H, Saito H. Role of P-glycoprotein in the efflux of raltegravir from human intestinal cells and CD4+ T-cells as an interaction target for anti-HIV agents. Biochem Biophys Res Commun 2013; ***439****: 221–7.*

22. Hoque MT, Kis O, De Rosa MF, Bendayan R. Raltegravir Permeability across Blood-Tissue Barriers and the Potential Role of Drug Efflux Transporters. Antimicrob Agents Chemother 2015; ***59****: 2572–82.*

23. EMA. ISENTRESS product infromation. Eur Med Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/isentress-epar-product-information_en.pdf. Accessed July 3, 2019.

24. FDA. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. US Food Drug Adm 2019. Available at: http://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry. Accessed July 4, 2019.

25. Foissac F, Urien S, Hirt D, et al. Pharmacokinetics and Virological Efficacy after Switch to Once-Daily Lopinavir-Ritonavir in Treatment-Experienced HIV-1-Infected Children. Antimicrob Agents Chemother 2011; ***55****: 4320–5.*

26. Barau C, Furlan V, Yazdanpanah Y, et al. Characterization of Binding of Raltegravir to Plasma Proteins. Antimicrob Agents Chemother 2013; ***57****: 5147–50.*

27. Abduljalil K, Furness P, Johnson TN, Rostami-Hodjegan A, Soltani H. Anatomical, Physiological and Metabolic Changes with Gestational Age during Normal Pregnancy: A Database for Parameters Required in Physiologically Based Pharmacokinetic Modelling. Clin Pharmacokinet 2012; ***51****: 365–96.*

28. Lê MP, Belarbi L, Chaix M-L, et al. Penetration and antiviral efficacy of total and unbound maraviroc, raltegravir and rilpivirine in both female and male genital fluids from HIV-positive patients receiving regimens containing these antiretrovirals. J Antimicrob Chemother 2017; ***72****: 3167–71.*

29. Minuesa G, Arimany-Nardi C, Erkizia I, et al. P-glycoprotein (ABCB1) activity decreases raltegravir disposition in primary CD4+P-gphigh cells and correlates with HIV-1 viral load. J Antimicrob Chemother 2016; ***71****: 2782–92.*

30. van der Galiën R, ter Heine R, Greupink R, et al. Pharmacokinetics of HIV-Integrase Inhibitors During Pregnancy: Mechanisms, Clinical Implications and Knowledge Gaps. Clin Pharmacokinet 2018. Available at: http://link.springer.com/10.1007/s40262-018-0684-z. Accessed November 16, 2018.

31. Dawes M, Chowienczyk PJ. Pharmacokinetics in pregnancy. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2001; ***15****: 819–26.*

32. Kassahun K, McIntosh I, Cui D, et al. Metabolism and Disposition in Humans of Raltegravir (MK-0518), an Anti-AIDS Drug Targeting the Human Immunodeficiency Virus 1 Integrase Enzyme. Drug Metab Dispos 2007; ***35****: 1657–63.*

33. JEONG H, CHOI S, SONG JW, CHEN H, FISCHER JH. Regulation of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 by progesterone and its impact on labetalol elimination. Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst 2008; ***38****: 62–75.*

34. Usui T, Kuno T, Mizutani T. Induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 by cortisol-GR. Mol Biol Rep 2006; ***33****: 91–6.*

35. Burger DM. Raltegravir: a review of its pharmacokinetics, pharmacology and clinical studies. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2010; ***6****: 1151–60.*

36. Miners JO, McKinnon RA, Mackenzie PI. Genetic polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferases and their functional significance. Toxicology 2002; ***181–182****: 453–6.*

37. Wenning L, Petry A, Kost J, et al. Pharmacokinetics of Raltegravir in Individuals With UGT1A1 Polymorphisms. Clin Pharmacol Ther 2009; ***85****: 623–7.*

38. Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? Proc Natl Acad Sci U S A 1998; ***95****: 8170–4.*

39. Danoff TM, Campbell DA, McCarthy LC, et al. A Gilbert's syndrome UGT1A1 variant confers susceptibility to tranilast-induced hyperbilirubinemia. Pharmacogenomics J 2004; ***4****: 49–53.*

40. Belkhir L, Seguin-Devaux C, Elens L, et al. Impact of UGT1A1 polymorphisms on Raltegravir and its glucuronide plasma concentrations in a cohort of HIV-1 infected patients. Sci Rep 2018; ***8****: 7359.*

Conclusion générale

Les études PK des médicaments nécessitent des méthodes analytiques fiables et répétables qui répondent aux critères de validation. D'autre part, dans la phase de développement de la méthode, il est important de considérer la simplicité et la rapidité d'exécution qui sont aussi des facteurs importants qui renforcent la fiabilité et la répétabilité de la méthode par la diminution de la variabilité et des erreurs humaines par rapport à une méthode avec une procédure compliquée et longue à mettre en place.

Dans cette étude PK du RAL libre chez la femme enceinte, deux méthodes analytiques ont été développées et validées pour quantifier la concentration plasmatique du RAL total ou libre, respectivement. Par rapport à l'UV, MS/MS est un détecteur beaucoup moins sensible aux interférences ce qui permet de rendre un résultat beaucoup plus fiable. Sa sensibilité élevée permet d'avoir une LLOQ assez basse ce qui est nécessaire pour la quantification du RAL libre. De plus, il permet de simplifier la méthode d'extraction.

Pour la méthode de dosage groupé du RAL total avec le RAL-glucuronide, la RPV, le DRV, le DTG, le RTV et l'EVG, une méthode de précipitation des protéines plasmatiques par l'ACN a été choisie comme la méthode d'extraction. Bien que cette méthode soit moins spécifique que la méthode d'ELL ou SPE, elle est techniquement très simple, avec un bon rendement, non-sélectif ce qui permet d'extraire en même temps des molécules avec des propriétés physico-chimiques très différentes. La méthode proposée est la première méthode qui permet de doser les trois derniers ARVs (RPV, DTG et EVG) mis sur le marché en utilisant la LC-MS/MS et des composés isotopiques comme étalon interne. L'utilisation des composés isotopiques permet de renforcer la fiabilité en corrigeant l'effet matrice potentiel dans les plasmas des patients. La fiabilité de cette méthode est aussi confirmée par les contrôles qualité externes d'ASQUALAB. Cette méthode est actuellement utilisée dans le suivi thérapeutique pharmacologique de routine dans notre service et aussi pour l'étude

clinique ANRS 160 RalFE. Elle sera également utilisée pour doser le DRV et le DTG dans l'étude ANRS 152.

Pour la méthode d'isolation de la forme libre du RAL, du DTG, et du DRV, l'UF a été préférée pour sa simplicité et sa rapidité, paramètres importants à prendre en compte pour les analyses en routine, par rapport à l'ED qui est une technique chronophage. Le NSB de cette méthode a un effet négligeable sur les résultats de la fraction libre des trois analytes. Les autres facteurs susceptibles d'influencer la fiabilité des résultats comme la température, la durée et la vitesse de centrifugation ont été aussi évalués. L'absence d'impact de ces trois facteurs a été confirmée. Les fractions libres obtenues pour le RAL et le DRV dans l'étude ANRS 160 RalFE sont cohérentes avec les résultats rapportés dans la littérature. La méthode proposée est la première méthode analytique pour quantifier la concentration du RAL, du DTG ou du DRV libre. Cette méthode est simple, rapide et répétable et s'adapte aux analyses de routine et aux études cliniques.

Dans le cadre de l'étude ANRS 160RalFE, nous avons développé un modèle PK du RAL libre, RAL total et RAL-glucuronide par approche de population chez 41 femmes pendant le T3 (30-37 SA) et le postpartum (4-6 semaines après l'accouchement) dans l'étude ANRS 160 RalFE. Grâce à ce modèle, nous avons montré un décalage d'absorption du RAL et une augmentation de 18% de la clairance (hépatique et rénale) du RAL pendant la grossesse. Ces modifications entraînent une diminution de 25% de l'AUC total et de 14% pour la C_{trough} totale pendant le T3 par rapport au postpartum. Cependant, avec l'augmentation de la fraction libre due à la diminution de la concentration d'albumine pendant la grossesse, la diminution de l'AUC forme libre est seulement de 12% avec une C_{trough} libre au T3 similaire au postpartum. Ces modification étant faibles, un changement de dose n'est pas nécessaire pour le RAL pour traiter les femmes enceintes. Par ailleurs, un effet du polymorphisme génétique

de l'UGT1A1 a été aussi observé avec une augmentation de 19% chez les femmes porteuses de l'allèle sauvage par rapport à l'allèle muté.

Les concentrations du RAL total, libre et glucuronide ont également été mesurées dans le sang maternel, le sang de cordon et le liquide amniotique à l'accouchement et dans le sang des nouveau-nés au 1^{e} jour et entre le 3ème et 6ème jour après la naissance. En perspective, un modèle de pKpop sera développé pour décrire le passage transplacentaire du RAL libre et l'élimination du RGV chez le nouveau-né. A noter que l'allongement du temps d'élimination du RAL chez les nouveau-nés est connu à cause de l'immaturité de l'UGT1A1 et d'une circulation entéro-hépatique du RAL[234]. De plus, dans cette étude, 13 femmes étaient co-traitées par du DRV/r. Grâce à nos méthodes analytiques, les concentrations du DRV total et libre ont également été déterminées en même temps que le dosage du RAL. Un modèle de pKpop du DRV chez les femmes enceintes sera développé pour discuter de la nécessité de modifier les doses de DRV pendant la grossesse, ce qui a récemment été évoqué[235].

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

*1. Pavlova-McCalla, E., Trepka, M. J., Ramirez, G. & Niyonsenga, T. Socioeconomic Status and Survival of People with Human Immunodeficiency Virus Infection before and after the Introduction of Highly Active Antiretroviral Therapy: A Systematic Literature Review. J AIDS Clin Res **3**, (2012).*

2. November 20, C. S. Unaidsd. last updated: & 2018. Global Statistics. HIV.gov (2018). Available at: https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/data-and-trends/global-statistics. (Accessed: 30th April 2019)

3. AIDSinfo | UNAIDS. Available at: http://aidsinfo.unaids.org/. (Accessed: 2nd May 2019)

4. Unaids_Data_book_2017. Available at: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20170720_Data_book_2017_en.pdf. (Accessed: 2nd May 2019)

5. The gap report 2014: children and pregnant women living with HIV. Geneva: UNAIDS: 2014:5. Available at: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/09_ChildrenandpregnantwomenlivingwithHIV.pdf. (Accessed: 10th May 2019)

*6. Lumaca, A., Galli, L., de Martino, M. & Chiappini, E. Paediatric HIV-1 infection: updated strategies of prevention mother-to-child transmission. J Chemother **30**, 193–202 (2018).*

*7. Simonon, A. et al. An Assessment of the Timing of Mother-to-Child Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Means of Polymerase Chain Reaction. JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **7**, 952 (1994).*

*8. Bertolli, J. et al. Estimating the Timing of Mother-to-Child Transmission of Human Immunodeficiency Virus in a Breast-Feeding Population in Kinshasa, Zaire. J Infect Dis **174**, 722–726 (1996).*

*9. De Cock, K. M. et al. Prevention of mother-to-child HIV transmission in resource-poor countries: translating research into policy and practice. JAMA **283**, 1175–1182 (2000).*

10. Coovadia, H. Mother-to-child transmission (MTCT) of HIV-1. in HIV/AIDS in South Africa (eds. Karim, S. S. A. & Karim, Q. A.) 201–215 (Cambridge University Press, 2010). doi:10.1017/CBO9781139062404.013

*11. Hénin, Y. et al. Virus excretion in the cervicovaginal secretions of pregnant and nonpregnant HIV-infected women. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. **6**, 72–75 (1993).*

*12. Nduati, R. W. et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Cells in Breast Milk: Association with Immunosuppression and Vitamin A Deficiency. J Infect Dis **172**, 1461–1468 (1995).*

*13. Lewis, P. et al. Cell-Free Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Breast Milk. J Infect Dis **177**, 34–39 (1998).*

*14. Ruff, A. J. et al. Prevalence of HIV-1 DNA and p24 antigen in breast milk and correlation with maternal factors. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. **7**, 68–73 (1994).*

*15.Van de Perre, P. et al. Infective and anti-infective properties of breastmilk from HIV-1-infected women. Lancet **341**, 914–918 (1993).*

*16.Van de Perre, P. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 through breast-feeding: how can it be prevented? J. Infect. Dis. **179 Suppl 3**, S405-407 (1999).*

*17.Luzuriaga, K. & Mofenson, L. M. Challenges in the Elimination of Pediatric HIV-1 Infection. New England Journal of Medicine **374**, 761–770 (2016).*

*18.Cooper, E. R. et al. Combination Antiretroviral Strategies for the Treatment of Pregnant HIV-1-Infected Women and Prevention of Perinatal HIV-1 Transmission. JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **29**, 484 (2002).*

*19.Italian Register for Human Immunodeficiency Virus Infection in Children. Determinants of mother-to-infant human immunodeficiency virus 1 transmission before and after the introduction of zidovudine prophylaxis. Arch Pediatr Adolesc Med **156**, 915–921 (2002).*

*20.HIV-infected pregnant women and vertical transmission in Europe since 1986. European collaborative study. AIDS **15**, 761–770 (2001).*

21.Newell, C. T. and M.-L. Mother-to-Child Transmission of HIV Infection and its Prevention. Current HIV Research (2003). Available at: http://www.eurekaselect.com/91784/article. (Accessed: 10th May 2019)

22.Connor, E. M. et al. Reduction of Maternal-Infant Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 with Zidovudine Treatment. (2010). doi:10.1056/NEJM199411033311801

*23.Jackson, J. B. et al. Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: 18-month follow-up of the HIVNET 012 randomised trial. The Lancet **362**, 859–868 (2003).*

*24.The Kesho Bora Study Group. Triple antiretroviral compared with zidovudine and single-dose nevirapine prophylaxis during pregnancy and breastfeeding for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 (Kesho Bora study): a randomised controlled trial. The Lancet Infectious Diseases **11**, 171–180 (2011).*

*25.Fowler, M. G. et al. Benefits and Risks of Antiretroviral Therapy for Perinatal HIV Prevention. N Engl J Med **375**, 1726–1737 (2016).*

*26.Eshleman, S. H. et al. Selection and fading of resistance mutations in women and infants receiving nevirapine to prevent HIV-1 vertical transmission (HIVNET 012). AIDS **15**, 1951–1957 (2001).*

*27.Cunningham, C. K. et al. Development of resistance mutations in women receiving standard antiretroviral therapy who received intrapartum nevirapine to prevent perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission: a substudy of pediatric AIDS clinical trials group protocol 316. J. Infect. Dis. **186**, 181–188 (2002).*

28. Chaix, M.-L. et al. Impact of nevirapine (NVP) plasma concentration on selection of resistant virus in mothers who received single-dose NVP to prevent perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission and persistence of resistant virus in their infected children. Antimicrob. Agents Chemother. ***51****, 896–901 (2007).*

29. Palmer, S. et al. Short-course Combivir after single-dose nevirapine reduces but does not eliminate the emergence of nevirapine resistance in women. Antivir. Ther. (Lond.) ***17****, 327–336 (2012).*

30. Chaix, M.-L. et al. Low risk of nevirapine resistance mutations in the prevention of mother-to-child transmission of HIV-1: Agence Nationale de Recherches sur le SIDA Ditrame Plus, Abidjan, Cote d'Ivoire. J. Infect. Dis. ***193****, 482–487 (2006).*

31. Tolerance and viral resistance after single-dose nevirapine with tenofovir and emtricitabine to prevent vertical transmission of HIV-1: AIDS ***27****, 825–833 (2009).*

32. WHO. THE USE OF ANTIRETROVIRAL DRUGS FOR TREATING AND PREVENTING HIV INFECTION RECOMMENDATIONS FOR A PUBLIC HEALTH APPROACH SECOND EDITION 2016. WHO (2016). Available at: https://www-who-int.gate2.inist.fr/hiv/pub/arv/arv-2016/en/. (Accessed: 14th April 2019)

33. Bressy, J. Prise en charge du VIH - Recommandations du groupe d'experts. Conseil national du sida et des hépatites virales (2018).

34. Prise en charge du VIH - Recommandations du groupe d'experts - Désir d'enfant et grossesse (mai 2018). Available at: https://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/11/experts-vih_grossesse.pdf. (Accessed: 15th July 2019)

35. Sibiude, J. et al. Premature Delivery in HIV-Infected Women Starting Protease Inhibitor Therapy During Pregnancy: Role of the Ritonavir Boost? Clin Infect Dis ***54****, 1348–1360 (2012).*

36. Yanovski, J. A. et al. Endocrine and Metabolic Evaluation of Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Evidence of Protease Inhibitor-Associated Lipodystrophy. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism ***84****, 1925–1931 (1999).*

37. Powis, K. M. et al. Increased Risk of Preterm Delivery Among HIV-Infected Women Randomized to Protease Versus Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor-Based HAART During Pregnancy. J Infect Dis ***204****, 506–514 (2011).*

38. Papp, E. et al. HIV Protease Inhibitor Use During Pregnancy Is Associated With Decreased Progesterone Levels, Suggesting a Potential Mechanism Contributing to Fetal Growth Restriction. J Infect Dis ***211****, 10–18 (2015).*

39. Warszawski, J. et al. Mother-to-child HIV transmission despite antiretroviral therapy in the ANRS French Perinatal Cohort. AIDS ***22****, 289–299 (2008).*

40. Tubiana, R. et al. Factors associated with mother-to-child transmission of HIV-1 despite a maternal viral

load <500 copies/ml at delivery: a case-control study nested in the French perinatal cohort (EPF-ANRS CO1). Clin. Infect. Dis. ***50****, 585–596 (2010).*

41. Written Requests Issued | FDA. Available at: https://www.fda.gov/drugs/development-resources/written-requests-issued. (Accessed: 27th June 2019)

42. Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection | FDA. Available at: https://www.fda.gov/patients/hiv-treatment/antiretroviral-drugs-used-treatment-hiv-infection. (Accessed: 27th June 2019)

43. Isentress | European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/isentress#overview-section. (Accessed: 27th June 2019)

44. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adult and Adolescent ARV | AIDSinfo. Available at: https://aidsinfo-nih-gov.gate2.inist.fr/contentfiles/lvguidelines/adultandadolescentgl.pdf. (Accessed: 27th June 2019)

45. Prise en charge médicale des personne vivant avec le VIH. Available at: https://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/01/experts-vih_initiation.pdf. (Accessed: 27th June 2019)

46. Lolekha, R. et al. Thai national guidelines for the prevention of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus 2017. Asian Biomed (Res Rev News) ***11****, 145–159 (2017).*

47. Sayana, S. & Khanlou, H. Raltegravir: the first in a new class of integrase inhibitors for the treatment of HIV. Expert Review of Anti-infective Therapy ***6****, 419–426 (2008).*

48. Hare, S., Gupta, S. S., Valkov, E., Engelman, A. & Cherepanov, P. Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer. Nature ***464****, 232–236 (2010).*

49. Di Santo, R. Inhibiting the HIV integration process: past, present, and the future. J. Med. Chem. ***57****, 539–566 (2014).*

50. Cai, M. et al. Solution structure of the His12 --> Cys mutant of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 integrase complexed to cadmium. Protein Sci. ***7****, 2669–2674 (1998).*

51. Goldgur, Y. et al. Three new structures of the core domain of HIV-1 integrase: an active site that binds magnesium. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. ***95****, 9150–9154 (1998).*

52. Lodi, P. J. et al. Solution structure of the DNA binding domain of HIV-1 integrase. Biochemistry ***34****, 9826–9833 (1995).*

53. Craigie, R. HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics. J. Biol. Chem. ***276****, 23213–23216 (2001).*

54. Lutzke, R. A. & Plasterk, R. H. HIV integrase: a target for drug discovery. Genes Funct. ***1****, 289–307 (1997).*

*55.Engelman, A., Mizuuchi, K. & Craigie, R. HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. Cell **67**, 1211–1221 (1991).*

*56.Beese, L. S. & Steitz, T. A. Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of Escherichia coli DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. EMBO J. **10**, 25–33 (1991).*

*57.Barreca, M. L. et al. Pharmacophore-Based Design of HIV-1 Integrase Strand-Transfer Inhibitors. J. Med. Chem. **48**, 7084–7088 (2005).*

*58.Kawasuji, T. et al. A platform for designing HIV integrase inhibitors. Part 2: A two-metal binding model as a potential mechanism of HIV integrase inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry **14**, 8420–8429 (2006).*

*59.Markowitz, M. et al. Rapid and durable antiretroviral effect of the HIV-1 Integrase inhibitor raltegravir as part of combination therapy in treatment-naive patients with HIV-1 infection: results of a 48-week controlled study. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. **46**, 125–133 (2007).*

*60.Markowitz, M. et al. Antiretroviral Activity, Pharmacokinetics, and Tolerability of MK-0518, a Novel Inhibitor of HIV-1 Integrase, Dosed As Monotherapy for 10 Days in Treatment-Naive HIV-1-Infected Individuals: JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **43**, 509–515 (2006).*

*61.Perelson, A. S. et al. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. Nature **387**, 188–191 (1997).*

*62.Grinsztejn, B. et al. Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial. The Lancet **369**, 1261–1269 (2007).*

*63.Rockstroh, J. K. et al. Durable efficacy and safety of raltegravir versus efavirenz when combined with tenofovir/emtricitabine in treatment-naive HIV-1-infected patients: final 5-year results from STARTMRK. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. **63**, 77–85 (2013).*

*64.Gotuzzo, E. et al. Sustained Efficacy and Safety of Raltegravir After 5 Years of Combination Antiretroviral Therapy as Initial Treatment of HIV-1 Infection: Final Results of a Randomized, Controlled, Phase II Study (Protocol 004). Jaids Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **61**, 73–77 (2012).*

*65.Taiwo, B. et al. Efficacy of a nucleoside-sparing regimen of darunavir/ritonavir plus raltegravir in treatment-naive HIV-1-infected patients (ACTG A5262). AIDS **25**, 2113–2122 (2011).*

*66.Eron, J. J. et al. Efficacy and safety of raltegravir for treatment of HIV for 5 years in the BENCHMRK studies: final results of two randomised, placebo-controlled trials. The Lancet Infectious Diseases **13**, 587–596 (2013).*

*67.Eron, J. J. et al. Raltegravir once daily or twice daily in previously untreated patients with HIV-1: a randomised, active-controlled, phase 3 non-inferiority trial. The Lancet Infectious Diseases **11**, 907–915 (2011).*

*68.Cahn, P. et al. Raltegravir 1200 mg Once Daily vs 400 mg Twice Daily, With Emtricitabine and Tenofovir Disoproxil Fumarate, for Previously Untreated HIV-1 Infection: Week 96 Results From ONCEMRK, a Randomized, Double-Blind, Noninferiority Trial. JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **78**, 589–598 (2018).*

*69.Steigbigel, R. T. et al. Raltegravir with optimized background therapy for resistant HIV-1 infection. N. Engl. J. Med. **359**, 339–354 (2008).*

*70.Eron, J. J. et al. Switch to a raltegravir-based regimen versus continuation of a lopinavir-ritonavir-based regimen in stable HIV-infected patients with suppressed viraemia (SWITCHMRK 1 and 2): two multicentre, double-blind, randomised controlled trials. Lancet **375**, 396–407 (2010).*

*71.Martínez, E. et al. Substitution of raltegravir for ritonavir-boosted protease inhibitors in HIV-infected patients: the SPIRAL study. AIDS **24**, 1697–1707 (2010).*

*72.Kozal, M. J. et al. A nucleoside- and ritonavir-sparing regimen containing atazanavir plus raltegravir in antiretroviral treatment-naïve HIV-infected patients: SPARTAN study results. HIV Clin Trials **13**, 119–130 (2012).*

*73.Bedimo, R. J. et al. The RADAR Study: Week 48 Safety and Efficacy of RAltegravir Combined with Boosted DARunavir Compared to Tenofovir/Emtricitabine Combined with Boosted Darunavir in Antiretroviral-Naive Patients. Impact on Bone Health. PLoS One **9**, (2014).*

*74.Reynes, J. et al. Lopinavir/ritonavir combined with raltegravir or tenofovir/emtricitabine in antiretroviral-naive subjects: 96-week results of the PROGRESS study. AIDS Res. Hum. Retroviruses **29**, 256–265 (2013).*

*75.Bernardino, J. I. et al. Body composition and adipokines changes after initial treatment with darunavir-ritonavir plus either raltegravir or tenofovir disoproxil fumarate-emtricitabine: A substudy of the NEAT001/ANRS143 randomised trial. PLoS ONE **14**, e0209911 (2019).*

*76.La Rosa, A. M. et al. Raltegravir in second-line antiretroviral therapy in resource-limited settings (SELECT): a randomised, phase 3, non-inferiority study. Lancet HIV **3**, e247–e258 (2016).*

*77.Hakim, J. G. et al. Lopinavir plus nucleoside reverse-transcriptase inhibitors, lopinavir plus raltegravir, or lopinavir monotherapy for second-line treatment of HIV (EARNEST): 144-week follow-up results from a randomised controlled trial. Lancet Infect Dis **18**, 47–57 (2018).*

*78.Teppler, H. et al. Long-Term Safety from the Raltegravir Clinical Development Program. Curr HIV Res **9**, 40–53 (2011).*

*79.Miguel, R. de, Montejano, R., Stella-Ascariz, N. & Arribas, J. R. A safety evaluation of raltegravir for the treatment of HIV. Expert Opinion on Drug Safety **17**, 217–223 (2018).*

80.Barroso, S. et al. Metabolic, mitochondrial, renal and hepatic safety of enfuvirtide and raltegravir

*antiretroviral administration: Randomized crossover clinical trial in healthy volunteers. PLoS One **14**, (2019).*

*81. Brites, C. et al. Raltegravir versus lopinavir/ritonavir for treatment of HIV-infected late-presenting pregnant women. HIV Clinical Trials **19**, 94–100 (2018).*

*82. Cecchini, D. M., Martinez, M. G., Morganti, L. M. & Rodriguez, C. G. Antiretroviral Therapy Containing Raltegravir to Prevent Mother-to-Child Transmission of HIV in Infected Pregnant Women. Infect Dis Rep **9**, (2017).*

*83. Puthanakit, T. et al. Intensification of antiretroviral treatment with raltegravir for pregnant women living with HIV at high risk of vertical transmission. J Virus Erad **4**, 61–65*

*84. Gantner, P. et al. "Real life" use of raltegravir during pregnancy in France: The Coferal-IMEA048 cohort study. PLoS One **14**, (2019).*

*85. Shamsuddin, H. et al. Evaluation of Neural Tube Defects (NTDs) After Exposure to Raltegravir During Pregnancy. J Acquir Immune Defic Syndr **81**, 247–250 (2019).*

*86. Rasi, V., Cortina-Borja, M., Peters, H., Sconza, R. & Thorne, C. Brief Report: Surveillance of Congenital Anomalies After Exposure to Raltegravir or Elvitegravir During Pregnancy in the United Kingdom and Ireland, 2008-2018. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. **80**, 264–268 (2019).*

*87. Mounce, M. L., Pontiggia, L. & Adams, J. L. A Single-Center Retrospective Cohort Analysis of Maternal and Infant Outcomes in HIV-Infected Mothers Treated with Integrase Inhibitors During Pregnancy. Infect Dis Ther **6**, 531–544 (2017).*

*88. Boucoiran, I. et al. A case series of third-trimester raltegravir initiation: Impact on maternal HIV-1 viral load and obstetrical outcomes. Can J Infect Dis Med Microbiol **26**, 145–150 (2015).*

*89. van Halsema, C. et al. Five years' real-life experience with raltegravir in a large HIV centre. Int J STD AIDS **27**, 387–393 (2016).*

*90. Nóbrega, I., Travassos, A. G., Haguihara, T., Amorim, F. & Brites, C. Short Communication: Use of Raltegravir in Late-Presenting HIV-Infected Pregnant Women. AIDS Res Hum Retroviruses **29**, 1451–1454 (2013).*

*91. Adeyemo, A., Wood, C. & Govind, A. Achieving rapid reduction of HIV-1 viral load in HIV-positive pregnant women close to term – an obstetric/medical emergency: a review of three cases. Int J STD AIDS **24**, 591–592 (2013).*

*92. Clavel-Osorio, C. et al. One-Month Transplacental Pharmacokinetics of Raltegravir in a Premature Newborn after Short-Course Treatment of the HIV-1-Infected Mother. Antimicrob Agents Chemother **57**, 6393–6394 (2013).*

93. Westling, K., Pettersson, K., Kaldma, A. & Navér, L. Rapid Decline in HIV Viral Load When Introducing

*Raltegravir-Containing Antiretroviral Treatment Late in Pregnancy. AIDS Patient Care and STDs **26**, 714–717 (2012).*

*94.Hegazi, A. et al. Raltegravir in the prevention of mother-to-child transmission of HIV-1: effective transplacental transfer and delayed plasma clearance observed in preterm neonates. Aids **26**, 2421–2423 (2012).*

*95.Hoffer, L. D. et al. Use of raltegravir in a late presenter HIV-1 woman in advanced gestational age: case report and literature review. Journal of Chemotherapy **25**, 181–183 (2013).*

*96.Yaita, K. et al. An HIV-infected Pregnant Woman Treated with the Long-term Administration of Antiretroviral Therapy Including Raltegravir. Internal Medicine **55**, 2727–2730 (2016).*

*97.Simonetti, F. R. et al. Pregnancy-related changes of antiretroviral pharmacokinetics: an argument for TDM. Antiviral Therapy **22**, 361–363 (2016).*

*98.Renet, S., Closon, A., Brochet, M.-S., Bussières, J.-F. & Boucher, M. Increase in Transaminase Levels Following the Use of Raltegravir in a Woman With a High HIV Viral Load at 35 Weeks of Pregnancy. Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada **35**, 68–72 (2013).*

*99.Cha, A., Shaikh, R., Williams, S. & Berkowitz, L. L. Rapid Reduction in HIV Viral Load in Late Pregnancy with Raltegravir: A Case Report. Journal of the International Association of Providers of AIDS Care (JIAPAC) **12**, 312–314 (2013).*

*100. Hegazi, A. & Hay, P. HIV seroconversion in the third trimester of pregnancy: using raltegravir to prevent mother-to-child transmission. Int J STD AIDS **24**, 245–246 (2013).*

*101. Mckeown, D. et al. High neonatal concentrations of raltegravir following transplacental transfer in HIV-1 positive pregnant women. Aids **24**, 2416–2418 (2010).*

*102. Croci, L. et al. Pharmacokinetic and safety of raltegravir in pregnancy. European Journal of Clinical Pharmacology **68**, 1231–1232 (2012).*

*103. Taylor, N. et al. Raltegravir in pregnancy: a case series presentation. Int J STD AIDS **22**, 358–360 (2011).*

*104. Pinnetti, C. et al. Rapid HIV-RNA decline following addition of raltegravir and tenofovir to ongoing highly active antiretroviral therapy in a woman presenting with high-level HIV viraemia at week 38 of pregnancy. J. Antimicrob. Chemother. **65**, 2050–2052 (2010).*

*105. Jaworsky, D. et al. Use of newer antiretroviral agents, darunavir and etravirine with or without raltegravir, in pregnancy: a report of two cases. Antiviral Therapy **15**, 677–680 (2010).*

*106. Croxtall, J. D., Lyseng-Williamson, K. A. & Perry, C. M. Raltegravir. Drugs **68**, 131–138 (2008).*

*107. Brown, A. N., Adams, J. R., Baluya, D. L. & Drusano, G. L. Pharmacokinetic Determinants of Virological Response to Raltegravir in the In Vitro Pharmacodynamic Hollow-Fiber Infection Model System. Antimicrob Agents Chemother **59**, 3771–3777 (2015).*

108. Isentress®. Merck & Co. Available at: https://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/i/isentress/isentress_pi.pdf. (Accessed: 17th July 2019)

*109. Burger, D. M. Raltegravir: a review of its pharmacokinetics, pharmacology and clinical studies. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology **6**, 1151–1160 (2010).*

*110. Arab-Alameddine, M. et al. Population Pharmacokinetic Analysis and Pharmacogenetics of Raltegravir in HIV-Positive and Healthy Individuals. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **56**, 2959–2966 (2012).*

*111. Moss, D. M., Siccardi, M., Back, D. J. & Owen, A. Predicting intestinal absorption of raltegravir using a population-based ADME simulation. Journal of Antimicrobial Chemotherapy **68**, 1627–1634 (2013).*

*112. Moss, D. M. et al. Divalent Metals and pH Alter Raltegravir Disposition In Vitro. Antimicrob Agents Chemother **56**, 3020–3026 (2012).*

*113. Iwamoto, M. et al. Effects of Omeprazole on Plasma Levels of Raltegravir. Clin Infect Dis **48**, 489–492 (2009).*

*114. Brainard, D. M. et al. Effect of Low-, Moderate-, and High-Fat Meals on Raltegravir Pharmacokinetics. The Journal of Clinical Pharmacology **51**, 422–427 (2011).*

*115. Charman, W. N., Porter, C. J. H., Mithani, S. & Dressman, J. B. Physicochemical and Physiological Mechanisms for the Effects of Food on Drug Absorption: The Role of Lipids and pH. Journal of Pharmaceutical Sciences **86**, 269–282 (1997).*

*116. Kiser, J. J. et al. Effect of Antacids on the Pharmacokinetics of Raltegravir in Human Immunodeficiency Virus-Seronegative Volunteers. Antimicrob Agents Chemother **54**, 4999–5003 (2010).*

*117. Krishna, R. et al. Effect of metal-cation antacids on the pharmacokinetics of 1200 mg raltegravir. J. Pharm. Pharmacol. **68**, 1359–1365 (2016).*

*118. Hinderling, P. H. & Hartmann, D. The pH dependency of the binding of drugs to plasma proteins in man. Ther Drug Monit **27**, 71–85 (2005).*

*119. Barau, C. et al. Characterization of Binding of Raltegravir to Plasma Proteins. Antimicrob Agents Chemother **57**, 5147–5150 (2013).*

*120. Farrugia, A. Albumin Usage in Clinical Medicine: Tradition or Therapeutic? Transfusion Medicine Reviews **24**, 53–63 (2010).*

*121. Yilmaz, A. et al. Raltegravir Cerebrospinal Fluid Concentrations in HIV-1 Infection. PLoS One **4**,*

(2009).

*122. Croteau, D. et al. Total Raltegravir Concentrations in Cerebrospinal Fluid Exceed the 50-Percent Inhibitory Concentration for Wild-Type HIV-1. Antimicrob Agents Chemother **54**, 5156–5160 (2010).*

*123. Calcagno, A. et al. Raltegravir Penetration in Seminal Plasma of Healthy Volunteers. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **54**, 2744–2745 (2010).*

*124. Moltó, J. et al. Plasma and Intracellular (Peripheral Blood Mononuclear Cells) Pharmacokinetics of Once-Daily Raltegravir (800 Milligrams) in HIV-Infected Patients. Antimicrob Agents Chemother **55**, 72–75 (2011).*

*125. Fayet Mello, A. et al. Cell disposition of raltegravir and newer antiretrovirals in HIV-infected patients: high inter-individual variability in raltegravir cellular penetration. J Antimicrob Chemother **66**, 1573–1581 (2011).*

*126. Hoque, M. T., Kis, O., De Rosa, M. F. & Bendayan, R. Raltegravir Permeability across Blood-Tissue Barriers and the Potential Role of Drug Efflux Transporters. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **59**, 2572–2582 (2015).*

*127. Hashiguchi, Y. et al. Role of P-glycoprotein in the efflux of raltegravir from human intestinal cells and CD4+ T-cells as an interaction target for anti-HIV agents. Biochemical and Biophysical Research Communications **439**, 221–227 (2013).*

*128. Kis, O., Robillard, K., Chan, G. N. Y. & Bendayan, R. The complexities of antiretroviral drug–drug interactions: role of ABC and SLC transporters. Trends in Pharmacological Sciences **31**, 22–35 (2010).*

*129. Kassahun, K. et al. Metabolism and disposition in humans of raltegravir (MK-0518), an anti-AIDS drug targeting the human immunodeficiency virus 1 integrase enzyme. Drug Metab. Dispos. **35**, 1657–1663 (2007).*

*130. Fortuna, S. et al. Variability of Raltegravir Plasma Levels in the Clinical Setting. Pharmacology **92**, 43–48 (2013).*

*131. Watts, D. H. et al. Raltegravir pharmacokinetics during pregnancy. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. **67**, 375–381 (2014).*

*132. Blonk, M. I. et al. Raltegravir in HIV-1–Infected Pregnant Women: Pharmacokinetics, Safety, and Efficacy. Clin Infect Dis **61**, 809–816 (2015).*

*133. Barau, C. et al. Pharmacokinetic Study of Raltegravir in HIV-Infected Patients With End-Stage Liver Disease: The LIVERAL-ANRS 148 Study. Clinical Infectious Diseases **59**, 1177–1184 (2014).*

*134. Calza, L. et al. Plasma concentrations of efavirenz, darunavir/ritonavir and raltegravir in HIV-HCV-coinfected patients without liver cirrhosis in comparison with HIV-monoinfected patients. Infectious Diseases **47**, 625–636 (2015).*

135. Iwamoto, M. et al. Lack of a clinically important effect of moderate hepatic insufficiency and severe renal insufficiency on raltegravir pharmacokinetics. Antimicrob. Agents Chemother. ***53****, 1747–1752 (2009).*

136. Calza, L. et al. Plasma trough concentrations of darunavir/ritonavir and raltegravir in older patients with HIV-1 infection. HIV Medicine ***18****, 474–481 (2017).*

137. Clarke, D. F. et al. Prevention and treatment of HIV infection in neonates: evidence base for existing WHO dosing recommendations and implementation considerations. Expert Review of Clinical Pharmacology ***11****, 83–93 (2018).*

138. Iwamoto, M. et al. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Raltegravir After Single and Multiple Doses in Healthy Subjects. Clinical Pharmacology & Therapeutics ***83****, 293–299 (2008).*

139. Wohl, D. A. et al. Raltegravir Pharmacokinetics in Treatment-Naive Patients Is Not Influenced by Race: Results from the Raltegravir Early Therapy in African-Americans Living with HIV (REAL) Study. Antimicrob Agents Chemother ***57****, 784–788 (2013).*

140. Anderson, M. S. et al. Effect of raltegravir on estradiol and norgestimate plasma pharmacokinetics following oral contraceptive administration in healthy women. Br J Clin Pharmacol ***71****, 616–620 (2011).*

141. Fulco, P. P., Hynicka, L. & Rackley, D. Raltegravir-based HAART regimen in a patient with large B-cell lymphoma. Ann Pharmacother ***44****, 377–382 (2010).*

142. pubmeddev & AL, A. T. and T. Interactions between antiretrovirals and antineoplastic drug therapy. - PubMed - NCBI. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15656694. (Accessed: 22nd July 2019)

143. van Luin, M. et al. Drug-drug interactions between raltegravir and pravastatin in healthy volunteers. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. ***55****, 82–86 (2010).*

144. Bickel, M. et al. Daily dosing of tacrolimus in patients treated with HIV-1 therapy containing a ritonavir-boosted protease inhibitor or raltegravir. J Antimicrob Chemother ***65****, 999–1004 (2010).*

145. Burger, D. M., Magis-Escurra, C., van den Berk, G. E. & Gelinck, L. B. S. Pharmacokinetics of double-dose raltegravir in two patients with HIV infection and tuberculosis. AIDS ***24****, 328–330 (2010).*

146. Moreno, A. et al. Safe co-administration of raltegravir, pegylated-interferon and, ribavirin in HIV individuals with hepatitis C virus-related liver damage. AIDS ***24****, 1231–1233 (2010).*

147. Hanley, W. D. et al. Effect of tipranavir-ritonavir on pharmacokinetics of raltegravir. Antimicrob. Agents Chemother. ***53****, 2752–2755 (2009).*

148. Iwamoto, M. et al. Minimal Effects of Ritonavir and Efavirenz on the Pharmacokinetics of Raltegravir. Antimicrob Agents Chemother ***52****, 4338–4343 (2008).*

149. Barrail-Tran, A. et al. Pharmacokinetics of etravirine, raltegravir and darunavir/ritonavir in treatment

*experienced patients. AIDS **24**, 2581–2583 (2010).*

*150. Zhu, L. et al. Pharmacokinetics and safety of twice-daily atazanavir 300 mg and raltegravir 400 mg in healthy individuals. Antivir. Ther. (Lond.) **15**, 1107–1114 (2010).*

151. Reyataz 150 mg Hard Capsules - Summary of Product Characteristics (SmPC) - (eMC). Available at: https://www.medicines.org.uk/emc/product/49/smpc. (Accessed: 31st August 2019)

152. Telzir 700 mg film-coated tablets - Summary of Product Characteristics (SmPC) - (eMC). Available at: https://www.medicines.org.uk/emc/product/5555/smpc. (Accessed: 31st August 2019)

153. Anderson, M., Sekar, V., Tomaka, F., Mabalot, J. & Mack, R. Pharmacokinetic (PK) Evaluation of Darunavir/Ritonavir (DRV/r) and Raltegravir (RAL) in Healthy Subjects. 48th Annual ICAAC / IDSA 46th Annual Meeting,October 25-28,2008. Washinton,DC, Abstract A-962

154. Rhame, F., Long, M. C. & Acosta, E. P. RAL-KAL: pharmacokinetics of coadminsitered raltegravir and lopinavir/ritonavir in healthy subjects. 17th International AIDS Conference,August 3-8,2008. Mexico City, Mexico, Abstract TuPe0075

*155. Andrews, E. et al. Assessment of the pharmacokinetics of co-administered maraviroc and raltegravir. Br J Clin Pharmacol **69**, 51–57 (2010).*

*156. Taburet, A.-M. et al. Pharmacokinetics of Raltegravir in HIV-Infected Patients on Rifampicin-Based Antitubercular Therapy. Clinical Infectious Diseases **61**, 1328–1335 (2015).*

*157. Hernández-Novoa, B. et al. Raltegravir pharmacokinetics in HIV/HCV-coinfected patients with advanced liver cirrhosis (Child-Pugh C). J. Antimicrob. Chemother. **69**, 471–475 (2014).*

*158. Furlan, V., Demirdjian, S., Bourdon, O., Magdalou, J. & Taburet, A. M. Glucuronidation of drugs by hepatic microsomes derived from healthy and cirrhotic human livers. J. Pharmacol. Exp. Ther. **289**, 1169–1175 (1999).*

*159. Hoyumpa, A. M. & Schenker, S. Is glucuronidation truly preserved in patients with liver disease? Hepatology **13**, 786–795 (1991).*

*160. Lavan, A. H. & Gallagher, P. Predicting risk of adverse drug reactions in older adults. Ther Adv Drug Saf **7**, 11–22 (2016).*

*161. Elzagallaai, A. A., Greff, M. J. E. & Rieder, M. J. Adverse Drug Reactions in Children: The Double-Edged Sword of Therapeutics. Clinical Pharmacology & Therapeutics **101**, 725–735 (2017).*

*162. Vera, J. H. et al. The pharmacokinetic profile of raltegravir-containing antiretroviral therapy in HIV-infected individuals over 60 years of age. HIV Clinical Trials **16**, 39–42 (2015).*

163. Nachman, S. et al. Pharmacokinetics, Safety, and 48-Week Efficacy of Oral Raltegravir in HIV-1–

Infected Children Aged 2 Through 18 Years. Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America ***58****, 413 (2014).*

164. Nachman, S. et al. Pharmacokinetics and 48-Week Safety and Efficacy of Raltegravir for Oral Suspension in Human Immunodeficiency Virus Type-1-Infected Children 4 Weeks to 2 Years of Age. J Pediatric Infect Dis Soc ***4****, e76–e83 (2015).*

165. Nachman, S. et al. Safety and efficacy at 240 weeks of different raltegravir formulations in children with HIV-1: a phase 1/2 open label, non-randomised, multicentre trial. Lancet HIV ***5****, e715–e722 (2018).*

166. Clarke, D. F. et al. IMPAACT P1110: raltegravir pharmacokinetics and safety in HIV-1 exposed neonates:dose-finding study. CROI 2017,February 13-16,2017. Seattle. Abstract 757

167. H.J. Krekels, E., Danhof, M., Tibboel, D. & A.J. Knibbe, C. Ontogeny of Hepatic Glucuronidation; Methods and Results. CDM ***13****, 728–743 (2012).*

168. Parry, E., Shields, R. & Turnbull, A. C. Transit time in the small intestine in pregnancy. J Obstet Gynaecol Br Commonw ***77****, 900–901 (1970).*

169. Costantine, M. M. Physiologic and pharmacokinetic changes in pregnancy. Front Pharmacol ***5****, (2014).*

170. Roustit, M., Jlaiel, M., Leclercq, P. & Stanke-Labesque, F. Pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of antiretrovirals in pregnant women. Br J Clin Pharmacol ***66****, 179–195 (2008).*

171. Hytten, F. E. & Paintin, D. B. Increase in plasma volume during normal pregnancy. J Obstet Gynaecol Br Emp ***70****, 402–407 (1963).*

172. Osiyemi, O. et al. Pharmacokinetics, Antiviral Activity, and Safety of Rilpivirine in Pregnant Women with HIV-1 Infection: Results of a Phase 3b, Multicenter, Open-Label Study. Infectious Diseases and Therapy ***7****, 147–159 (2018).*

173. Mahat, M. Y. A. et al. Pregnancy influences the plasma pharmacokinetics but not the cerebrospinal fluid pharmacokinetics of raltegravir: A preclinical investigation. European Journal of Pharmaceutical Sciences ***65****, 38–44 (2014).*

174. JEONG, H., CHOI, S., SONG, J. W., CHEN, H. & FISCHER, J. H. Regulation of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 by progesterone and its impact on labetalol elimination. Xenobiotica ***38****, 62–75 (2008).*

175. Usui, T., Kuno, T. & Mizutani, T. Induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 by cortisol-GR. Mol. Biol. Rep. ***33****, 91–96 (2006).*

176. Zhang, F., Xue, J., Shao, J. & Jia, L. Compilation of 222 drugs' plasma protein binding data and guidance for study designs. Drug Discovery Today ***17****, 475–485 (2012).*

*177. Wright, J. D., Boudinot, F. D. & Ujhelyi, M. R. Measurement and analysis of unbound drug concentrations. Clin Pharmacokinet **30**, 445–462 (1996).*

*178. Di, L., Umland, J. P., Trapa, P. E. & Maurer, T. S. Impact of Recovery on Fraction Unbound Using Equilibrium Dialysis. Journal of Pharmaceutical Sciences **101**, 1327–1335 (2012).*

*179. Nilsson, L. B. The bioanalytical challenge of determining unbound concentration and protein binding for drugs. Bioanalysis **5**, 3033–3050 (2013).*

*180. Illamola, S. M., Hirt, D., Tréluyer, J. M., Urien, S. & Benaboud, S. Challenges regarding analysis of unbound fraction of highly bound protein antiretroviral drugs in several biological matrices: lack of harmonisation and guidelines. Drug Discovery Today **20**, 466–474 (2015).*

*181. Dong, W., Zhang, Z., Jiang, X., Sun, Y. & Jiang, Y. Effect of volume ratio of ultrafiltrate to sample solution on the analysis of free drug and measurement of free carbamazepine in clinical drug monitoring. European Journal of Pharmaceutical Sciences **48**, 332–338 (2013).*

*182. Zhang, J. & Musson, D. Investigation of high-throughput ultrafiltration for the determination of an unbound compound in human plasma using liquid chromatography and tandem mass spectrometry with electrospray ionization. Journal of Chromatography B **843**, 47–56 (2006).*

*183. McMillin, G. A., Juenke, J. & Dasgupta, A. Effect of Ultrafiltrate Volume on Determination of Free Phenytoin Concentration: Therapeutic Drug Monitoring **27**, 630–633 (2005).*

*184. Alshammari, T. M., Al-Hassan, A. A., Hadda, T. B. & Aljofan, M. Comparison of different serum sample extraction methods and their suitability for mass spectrometry analysis. Saudi Pharmaceutical Journal **23**, 689–697 (2015).*

*185. Archibald, T. L., Murrell, D. E. & Brown, S. D. Chromatographic methods in HIV medicine: Application to therapeutic drug monitoring. Biomedical Chromatography **32**, e4170 (2018).*

*186. Bourgogne, E. & Wagner, M. [Sample preparation and bioanalysis in mass spectrometry]. Ann. Biol. Clin. (Paris) **73**, 11–23 (2015).*

*187. Abe, E., Delyle, S. G. & Alvarez, J. C. Extraction liquide-liquide : théorie, applications, difficultés. Annales de Toxicologie Analytique **22**, 51–59 (2010).*

*188. Pragst, F. Application of solid-phase microextraction in analytical toxicology. Anal Bioanal Chem **388**, 1393–1414 (2007).*

*189. van Andel, L. et al. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for the quantification of lurbinectedin in human plasma and urine. J Pharm Biomed Anal **158**, 160–165 (2018).*

190. Eslami, Z. et al. Simple and Sensitive Quantification of Ghrelin Hormone in Human Plasma Using

SBSE-HPLC/DAD-MS. J Chromatogr Sci (2016). doi:10.1093/chromsci/bmw125

191. FDA. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. U.S. Food and Drug Administration (2019). Available at: http://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry. (Accessed: 4th July 2019)

192. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation 2011. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf. (Accessed: 3rd June 2019)

*193. Hartmann, C., Smeyers-Verbeke, J., Massart, D. L. & McDowall, R. D. Validation of bioanalytical chromatographic methods. J Pharm Biomed Anal **17**, 193–218 (1998).*

*194. Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L. & Chavez-Eng, C. M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC−MS/MS. Analytical Chemistry **75**, 3019–3030 (2003).*

195. Urien, S. La pharmacocinétique de population, aspects fondamentaux. La Lettre du Pharmacologue 97–102 (2003).

*196. Foissac, F. et al. Pharmacokinetics and Virological Efficacy after Switch to Once-Daily Lopinavir-Ritonavir in Treatment-Experienced HIV-1-Infected Children. Antimicrob. Agents Chemother. **55**, 4320–4325 (2011).*

*197. Charbe, N. et al. Development of an HPLC–UV assay method for the simultaneous quantification of nine antiretroviral agents in the plasma of HIV-infected patients. J Pharm Anal **6**, 396–403 (2016).*

*198. Djerada, Z. et al. Validation of a fast method for quantitative analysis of elvitegravir, raltegravir, maraviroc, etravirine, tenofovir, boceprevir and 10 other antiretroviral agents in human plasma samples with a new UPLC-MS/MS technology. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **86**, 100–111 (2013).*

*199. Simiele, M. et al. UPLC–MS/MS method for the simultaneous quantification of three new antiretroviral drugs, dolutegravir, elvitegravir and rilpivirine, and other thirteen antiretroviral agents plus cobicistat and ritonavir boosters in human plasma. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **138**, 223–230 (2017).*

*200. Fayet, A. et al. A LC–tandem MS assay for the simultaneous measurement of new antiretroviral agents: Raltegravir, maraviroc, darunavir, and etravirine. Journal of Chromatography B **877**, 1057–1069 (2009).*

*201. Bollen, P. D. J., de Graaff-Teulen, M. J. A., Schalkwijk, S., van Erp, N. P. & Burger, D. M. Development and validation of an UPLC-MS/MS bioanalytical method for simultaneous quantification of the antiretroviral drugs dolutegravir, elvitegravir, raltegravir, nevirapine and etravirine in human plasma. Journal of Chromatography B **1105**, 76–84 (2019).*

202. Parsons, T. L. & Marzinke, M. A. Development and validation of a liquid chromatographic-tandem

*mass spectrometric method for the multiplexed quantification of etravirine, maraviroc, raltegravir, and rilpivirine in human plasma and tissue. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **131**, 333–344 (2016).*

*203. Stek, A. et al. Pharmacokinetics of Once Versus Twice Daily Darunavir in Pregnant HIV-Infected Women: JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **70**, 33–41 (2015).*

*204. Jourdil, J.-F., Tonini, J. & Stanke-Labesque, F. Simultaneous quantitation of azole antifungals, antibiotics, imatinib, and raltegravir in human plasma by two-dimensional high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. **919–920**, 1–9 (2013).*

*205. ter Heine, R. et al. Quantification of the HIV-integrase inhibitor raltegravir and detection of its main metabolite in human plasma, dried blood spots and peripheral blood mononuclear cell lysate by means of high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **49**, 451–458 (2009).*

*206. Wang, L.-Z. et al. Simultaneous determination of raltegravir and raltegravir glucuronide in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometric method. Journal of Mass Spectrometry **46**, 202–208 (2011).*

*207. Poirier, J.-M., Robidou, P. & Jaillon, P. Quantification of the HIV-integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. **867**, 277–281 (2008).*

*208. Goldwirt, L., Barrail-Tran, A., Da Cruz, M., Taburet, A.-M. & Furlan, V. Quantification of raltegravir (MK0518) in human plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. **878**, 456–460 (2010).*

*209. Long, M. C., Bennetto-Hood, C. & Acosta, E. P. A sensitive HPLC-MS-MS method for the determination of raltegravir in human plasma. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. **867**, 165–171 (2008).*

*210. Mosnier-Thoumas, S. et al. A sensitive liquid chromatography coupled with mass spectrometry method for the intracellular and plasma quantification of raltegravir after solid-phase extraction. J. Pharm. Pharmacol. **63**, 1559–1565 (2011).*

*211. Rezk, N. L., White, N. & Kashuba, A. D. M. An accurate and precise high-performance liquid chromatography method for the rapid quantification of the novel HIV integrase inhibitor raltegravir in human blood plasma after solid phase extraction. Analytica Chimica Acta **628**, 204–213 (2008).*

*212. Notari, S. et al. Simultaneous determination of maraviroc and raltegravir in human plasma by HPLC-UV. IUBMB Life **61**, 470–475 (2009).*

*213. Merschman, S., Vallano, P., Wenning, L., Matuszewski, B. & Woolf, E. Determination of the HIV integrase inhibitor, MK-0518 (raltegravir), in human plasma using 96-well liquid–liquid extraction and HPLC-MS/MS. Journal of Chromatography B **857**, 15–24 (2007).*

*214. Talameh, J. A., Rezk, N. L. & Kashuba, A. D. M. Quantifying the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir in female genital tract secretions using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. **878**, 92–96 (2010).*

*215. D'Avolio, A. et al. A HPLC-MS method for the simultaneous quantification of fourteen antiretroviral agents in peripheral blood mononuclear cell of HIV infected patients optimized using medium corpuscular volume evaluation. J Pharm Biomed Anal **54**, 779–788 (2011).*

216. WHO | Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. WHO Available at: http://www.who.int/hiv/pub/arv/arv-2016/en/. (Accessed: 2nd July 2019)

217. WHO. Updated recommendations on first-line and second-line antiretroviral regimens and post-exposure prophylaxis and recommendations on early infant diagnosis of HIV. WHO (2018). Available at: https://apps-who-int.gate2.inist.fr/iris/bitstream/handle/10665/277395/WHO-CDS-HIV-18.51-eng.pdf?ua=1. (Accessed: 21st August 2019)

218. DHHS. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents with HIV. AIDSinfo (2018). Available at: https://aidsinfo.nih.gov/guidelines/html/1/adult-and-adolescent-arv/37/whats-new-in-the-guidelines-. (Accessed: 31st July 2019)

*219. Capetti, A. F. et al. A dual regimen of ritonavir/darunavir plus dolutegravir for rescue or simplification of rescue therapy: 48 weeks' observational data. BMC Infect. Dis. **17**, 658 (2017).*

*220. Calza, L. et al. Dual Raltegravir–Darunavir/Ritonavir Combination in Virologically Suppressed HIV-1-Infected Patients on Antiretroviral Therapy Including a Ritonavir-Boosted Protease Inhibitor Plus Two Nucleoside/Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors. HIV Clinical Trials **17**, 38–47 (2016).*

221. WHO. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: recommendations for a public health approach. (World Health Organization, 2016).

*222. Metsu, D. et al. Determination of dolutegravir's unbound fraction in human plasma using validated equilibrium dialysis and LC-MS/MS methods. Clin. Chim. Acta **479**, 56–65 (2018).*

*223. Rittweger, M. & Arasteh, K. Clinical Pharmacokinetics of Darunavir: Clinical Pharmacokinetics **46**, 739–756 (2007).*

*224. Dasgupta, A. Clinical utility of free drug monitoring. Clin. Chem. Lab. Med. **40**, 986–993 (2002).*

*225. Liu, Z., Li, F. & Huang, Y. Determination of unbound drug concentration and protein–drug binding fraction in plasma. Biomedical Chromatography **13**, 262–266 (1999).*

226. Musteata, F. M. Clinical Utility of Free Drug Monitoring. in Therapeutic Drug Monitoring 75–101 (Elsevier, 2012). doi:10.1016/B978-0-12-385467-4.00004-X

227. Rakhmanina, N. Y. & la Porte, C. J. L. Therapeutic Drug Monitoring of Antiretroviral Drugs in the Management of Human Immunodeficiency Virus Infection. in Therapeutic Drug Monitoring 373–396 (Elsevier, 2012). doi:10.1016/B978-0-12-385467-4.00017-8

*228. Mirochnick, M. et al. Lopinavir Exposure With an Increased Dose During Pregnancy. J Acquir Immune Defic Syndr **49**, 485–491 (2008).*

*229. Fayet-Mello, A. et al. Free and total plasma levels of lopinavir during pregnancy, at delivery and in postpartum: implication for dosage adjustments in pregnant women. Antiviral Therapy **18**, 171–182 (2012).*

*230. Crauwels, H. M. et al. Pharmacokinetics of once-daily darunavir/ritonavir in HIV-1–infected pregnant women. HIV Medicine **17**, 643–652 (2016).*

*231. Ramgopal, M. et al. Pharmacokinetics of Total and Unbound Etravirine in HIV-1–Infected Pregnant Women: JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **73**, 268–274 (2016).*

*232. Jeong, H., Choi, S., Song, J. W., Chen, H. & Fischer, J. H. Regulation of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 by progesterone and its impact on labetalol elimination. Xenobiotica **38**, 62–75 (2008).*

*233. Belkhir, L. et al. Impact of UGT1A1 polymorphisms on Raltegravir and its glucuronide plasma concentrations in a cohort of HIV-1 infected patients. Sci Rep **8**, 7359 (2018).*

*234. Clarke, D. F. et al. Raltegravir Pharmacokinetics in Neonates Following Maternal Dosing: JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **67**, 310–315 (2014).*

*235. Schalkwijk, S. et al. Evaluating darunavir/ritonavir dosing regimens for HIV-positive pregnant women using semi-mechanistic pharmacokinetic modelling. Journal of Antimicrobial Chemotherapy **74**, 1348–1356 (2019).*