



**HAL**  
open science

# Modélisation Pharmacocinétique et Pharmacodynamique du Busulfan en Onco-Hématologie Pédiatrique

Michaël Philippe

► **To cite this version:**

Michaël Philippe. Modélisation Pharmacocinétique et Pharmacodynamique du Busulfan en Onco-Hématologie Pédiatrique. Pharmacologie. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1331 . tel-01772734

**HAL Id: tel-01772734**

**<https://theses.hal.science/tel-01772734>**

Submitted on 20 Apr 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : xxx

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de

**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale ED341 :**

Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation

**Spécialité de doctorat :** Pharmacologie

**Discipline :** Biométrie

Soutenue publiquement le 15/12/2017, par :

**Michaël PHILIPPE**

---

# **Modélisation Pharmacocinétique et Pharmacodynamique du Busulfan en Onco-Hématologie Pédiatrique**

---

Devant le jury composé de :

Nom, prénom grade/qualité établissement/entreprise	Président.e
CSAJKA Chantal, Professeure Associée, Université de Genève, Université de Lausanne	
	Rapporteure
JULLIEN Vincent, Praticien Hospitalier, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique Hôpitaux de Paris	Rapporteur
BERTRAND Yves, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique, Lyon	Examineur
BLEYZAC Nathalie, Praticien Hospitalier Hospices Civils de Lyon	Directrice de
	thèse
GOUTELLE Sylvain, Maître de Conférence des Universités – Praticien Hospitalier, Université Claude Bernard Lyon 1, Hospices Civils de Lyon	Invité





# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

## **M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

M. Alain HELLEU

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles

Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie

Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

# REMERCIEMENTS

---

# RESUME

---

## **Modélisation pharmacocinétique et pharmacodynamique du busulfan intraveineux en onco-hématologie pédiatrique**

La greffe de cellules souches hématopoïétiques est parfois le seul traitement curatif dans certaines pathologies pédiatriques telles que les leucémies, les sarcomes, les déficits immunitaires ou les thalassémies. Le busulfan, un alkylant myéloablatif, fait partie de nombreux protocoles de conditionnement de greffe. C'est un médicament à marge thérapeutique étroite doté d'une forte variabilité pharmacocinétique, qui fait souvent l'objet d'un suivi thérapeutique pharmacologique afin d'optimiser la prise de greffe et d'éviter les risques de maladie veino-occlusive, principale toxicité du busulfan et responsable d'une morbidité et d'une mortalité importante. L'aire sous la courbe, dont il existe un intervalle cible recommandé, est aujourd'hui le paramètre pharmacocinétique utilisé pour effectuer le suivi thérapeutique du busulfan et l'adaptation posologique pendant le conditionnement.

L'objectif de notre travail est d'étudier les relations entre la pharmacocinétique du busulfan et ses effets thérapeutiques et toxiques, en particulier la maladie veino-occlusive, et de développer des méthodes d'adaptation posologique pour optimiser l'usage de ce médicament chez l'enfant.

Nos travaux ont conduit à plusieurs innovations méthodologiques, avec le développement et la validation d'un modèle pharmacocinétique de population non-paramétrique pour l'adaptation Bayésienne des posologies de busulfan en pédiatrie, et le développement d'une nouvelle méthode de détermination de la dose initiale maximisant la probabilité d'atteindre un intervalle cible d'exposition. Sur le plan clinique, nous avons pu mettre en évidence l'absence de bénéfice clinique de l'utilisation d'un intervalle cible d'exposition plus restreint que celui recommandé. Par ailleurs, nous avons identifié que la survenue de la MVO était liée à la concentration maximale de busulfan, et non à l'aire sous la courbe des concentrations en fonction du temps.

L'ensemble de ces résultats est une contribution à l'amélioration de l'utilisation et du suivi thérapeutique pharmacologique du busulfan en onco-hématologie pédiatrique.

Mots clés : greffe de cellules souches hématopoïétiques, busulfan, modélisation, pharmacocinétique, pharmacodynamie, pédiatrie

# ABSTRACT

---

## **Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of intravenous busulfan in pediatric onco-hematology.**

Hematopoietic stem cell transplantation remains the only curative treatment in many pediatric diseases as leukemia, sarcoma, immunodeficiencies or thalassemia. Busulfan, a myeloablative alkylant, is the cornerstone of pre-transplant conditioning. It has a narrow therapeutic index and a large pharmacokinetic variability. For these reasons, therapeutic drug monitoring is required in order to optimize engraftment and avoid veno-occlusive disease, the main toxicity of busulfan which is responsible of significant morbidity and mortality. Today, the area under the curve, of which there is a target range recommended, is the pharmacokinetic parameter used to carry out therapeutic drug monitoring and dose adjustment during conditioning.

Our objective is to investigate relationships between busulfan PK and clinical outcomes, especially veno-occlusive disease, and to develop methods of dose adjustment in order to optimize the use of this medication in children.

Our work led to several methodological innovations, with the development and the validation of a non-parametric pharmacokinetic model for Bayesian dose adjustment of busulfan in pediatrics, and the development of a new method for the first dose determination maximizing the probability of achieving an exposure target range. From a clinical point a view, we highlighted the lack of clinical benefit in using an exposure target range narrower than those recommended. Furthermore, we identified that veno-occlusive incidence was correlated to the maximal concentration of busulfan, contrary to the area under the concentration-time curve.

All of these results contribute to improving use and therapeutic monitoring of busulfan in pediatric onco-hematology.

Key words: hematopoietic stem cell transplant, busulfan, modeling, pharmacokinetics, pharmacodynamic, pediatrics

Laboratoire UMR CNRS 5558

Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive

Bât. G Mendel, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France

## Table des matières

Remerciements .....	7
Résumé .....	8
Abstract .....	10
Index des abréviations .....	14
Liste des figures .....	16
Liste des tableaux .....	17
Partie bibliographique .....	18
1. Greffe de cellules souches hématopoïétiques.....	18
1. Moelle osseuse et formation des cellules souches hématopoïétiques.....	18
2. Historique de la greffe de cellules souches hématopoïétiques .....	19
3. Types de greffes.....	20
2. Indications des greffes.....	24
1. Les hémopathies malignes.....	25
2. Hémoglobinopathies .....	26
3. Maladies métaboliques .....	26
4. Déficits immunitaires .....	26
5. Aplasies médullaires.....	27
3. Conditionnement de greffe.....	28
4. Complications de la greffe .....	29
1. Précoces .....	30
2. Tardives .....	43
5. Pharmacologie du Busulfan .....	44
1. Structure chimique et relation structure / activité.....	44
2. Pharmacocinétique du busulfan.....	45
3. Toxicité du busulfan .....	49
6. Suivi thérapeutique pharmacologique du busulfan .....	51
1. Notions générales du suivi thérapeutique pharmacologique .....	51
2. Cas du busulfan .....	52
Partie Expérimentale : Présentation des Travaux de Recherche .....	57
1. Problématique du suivi thérapeutique du Busulfan.....	58

2. Pharmacocinétique de de population et adaptation posologique du busulfan IV en pédiatrie : développement d'une approche non-paramétrique .....	71
3. Optimisation de la posologie initiale du busulfan basée sur un modèle pharmacocinétique non-paramétrique.....	86
4. Modèle PKPD : étude de la relation exposition-toxicité du busulfan .....	103
Discussion générale.....	137
Conclusion.....	145
References bibliographiques .....	147
Annexes.....	161
1. Annexe 1. Communication affichée au congrès EBMT 2015.....	162
2. Annexe 2. Communication affichée au congrès SFGM 2015.....	163
3. Annexe 3. Communication affichée au congrès EBMT 2017.....	164

# INDEX DES ABBREVIATIONS

---

ADV : adénovirus

ASMR : amélioration du service médical rendu

CART : classification and regression tree

C<sub>max</sub> : concentration plasmatique maximale

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : cytomégalovirus

CNT : cellules nucléées totales

CSH : cellules souches hématopoïétiques

CV : coefficient de variation

FDA : food and drug administration

G-CSF : granocyte colony-stimulating factor

GVH : graft *versus* host disease

GVL : graft *versus* leukemia

HBPM : héparine de bas poids moléculaire

HLA : human leucocytes antigen

HNF : héparine non fractionnée

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance

HTP : hypertension portale

IATDMCT : International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology

ICT : irradiation corporelle totale

INR : international normalized ratios

IV : intraveineux

LAL : leucémies aigues lymphoblastiques

LAM : leucémies aigues myéloblastiques

MAC : myeloablative conditioning

MVO : maladie veino-occlusive

PD : pharmacodynamie

PK : pharmacocinétique

RCP : résumé des caractéristiques du produit

RIC : reduced intensity conditioning

SAL : sérum anti-lymphocytaire

STP : suivi thérapeutique pharmacologique

TNF : tumor necrosis factor

USP : unité de sang placentaire

VHR : very high risk

VEGF : vascular endothelial growth factor

VZV : virus varicelle-zona

# LISTE DES FIGURES

---

**Figure 1.** Schéma simplifié de l'hématopoïèse

**Figure 2.** Arbre décisionnel d'un projet d'allogreffe.

**Figure 3.** Répartition des indications d'allogreffe en Europe en 2012.

**Figure 4.** Principales complications immunologiques et infectieuses après une transplantation de cellules souches hématopoïétiques.

**Figure 5.** Représentation schématique de l'acinus hépatique.

**Figure 6.** Formule du chimique du busulfan

# LISTE DES TABLEAUX

---

**Tableau 1 :** Nombre d'allogreffes apparentées et non apparentées selon l'origine des cellules et le diagnostic chez les patients de moins de 18 ans, en 2010

**Tableau 2.** Stades cliniques de la GVH

**Tableau 3.** Grades de la GVH

**Tableau 4.** Graduation histologique de la GVH

**Tableau 5.** Critères diagnostiques de la maladie veino-occlusive de l'enfant de l'EBMT

**Tableau 6.** Choix de la première dose de busulfan

# PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

---

## 1. Greffe de cellules souches hématopoïétiques

### 1. Moelle osseuse et formation des cellules souches hématopoïétiques

L'hématopoïèse est le processus physiologique permettant la fabrication des cellules sanguines ou hématocytes. Elle a physiologiquement lieu chez l'adulte dans la moelle osseuse située au niveau de la cavité des os, alors qu'elle siège principalement au niveau hépatique chez l'embryon. Un switch s'opère lors de la période néonatale favorisant l'hématopoïèse intramédullaire. Ces cellules sanguines peuvent se diviser en différentes lignées : érythrocytes, polynucléaires neutrophiles, polynucléaires éosinophiles, polynucléaires basophiles, monocytes, thrombocytes, lymphocytes B et lymphocytes T.

L'hématopoïèse fait intervenir 4 types de cellules (**Figure 1**) :

- 1) Les cellules souches pluripotentes : elles ont une longue durée de vie avec des capacités d'auto-renouvellement élevées et de différenciation possible vers toutes les lignées hématopoïétiques et éventuellement vers d'autres types cellulaires. Ce sont des cellules morphologiquement indifférenciées avec l'immunophénotype CD34+ CD38-. Leur localisation est médullaire.
- 2) Les progéniteurs hématopoïétiques : ils sont déjà plus ou moins engagés vers une lignée cellulaire particulière et se différencient sous l'effet de facteurs de croissance. Ils sont morphologiquement identiques aux cellules souches pluripotentes, et ont également des capacités d'auto-renouvellement. Leur localisation est également médullaire.
- 3) Les précurseurs : ce sont les premières cellules morphologiquement identifiables par cytométrie. Ils ont des capacités de maturation et de multiplication mais ont perdu la capacité de renouvellement. Ils ont une localisation essentiellement médullaire mais peuvent aussi circuler dans le sang.
- 4) Les cellules matures sont celles que l'on trouve dans le sang.

Les polynucléaires, érythrocytes et thrombocytes ont une durée de vie limitée. Ces cellules meurent d'épuisement métabolique ou d'agression et sont donc remplacées en permanence. La régulation médullaire de la différenciation et de la maturation hématopoïétique dépend essentiellement des facteurs de croissance et de l'existence d'un microenvironnement médullaire.

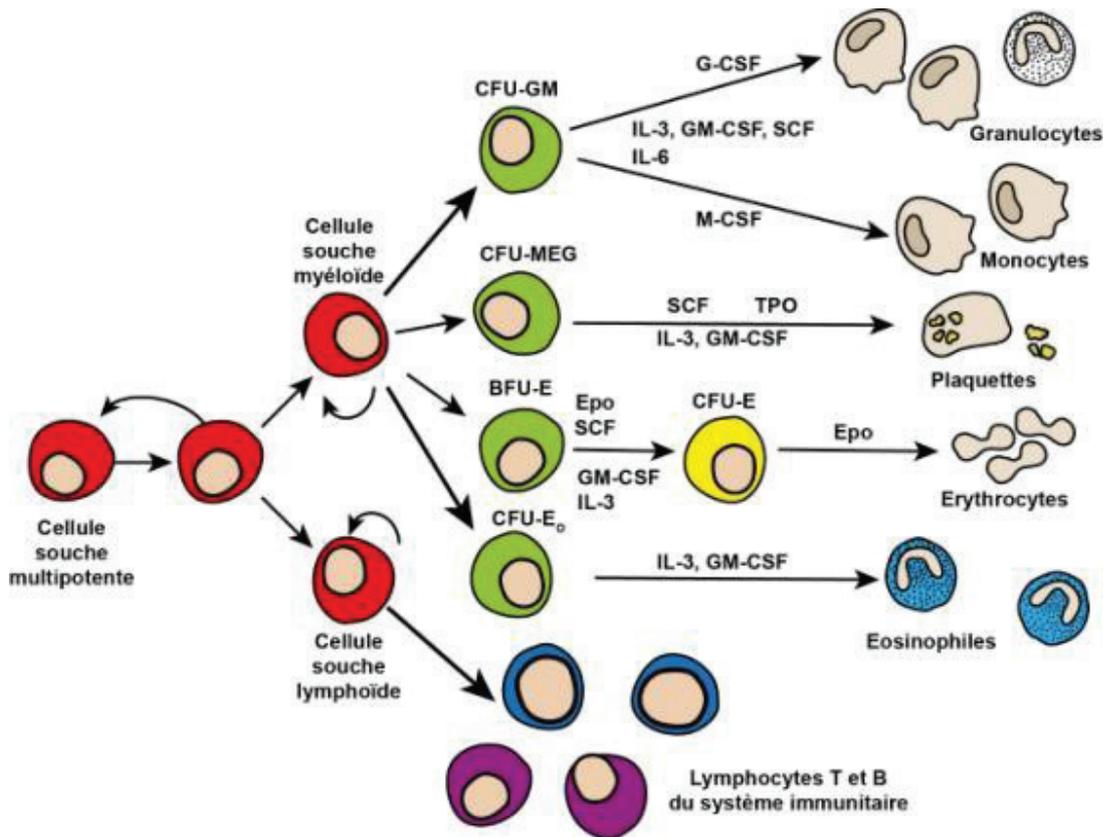


Figure 1. Schéma simplifié de l'hématopoïèse<sup>1</sup>.

## 2. Historique de la greffe de cellules souches hématopoïétiques

Historiquement, les premières tentatives de greffe de moelle osseuse sont rapportées à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle par Brown-Séquard après administration de moelle par voie orale pour des patients atteints d'anémie<sup>2</sup>. Plus d'un demi-siècle plus tard, après la description du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) par Dausset, les premières tentatives d'injection de moelle osseuse chez l'homme sont rapportées par Thomas *et al.* en 1957<sup>3</sup> puis par Mathé *et al.* en 1959<sup>4</sup>.

D'autres équipes s'engagent ensuite dans la voie de la transplantation médullaire. Malgré l'observation de la prise de greffe, ces premiers patients ont une survie limitée du fait de rechutes précoces, de la survenue d'une maladie du greffon contre l'hôte (graft versus host disease - GVH) ou d'infections. Dans les années 70, le développement des connaissances relatives au système du CMH (encore appelé système HLA pour Human Leucocytes Antigen) et la réalisation de greffes HLA identiques ainsi que la meilleure prise en charge des infections survenant au décours de la greffe permettent d'améliorer la survie des patients transplantés. Le méthotrexate est la première molécule à démontrer son efficacité dans la prévention de la GVH<sup>5</sup>. La ciclosporine est ensuite le premier immunosuppresseur non cytotoxique utilisé pour la prophylaxie et le traitement de la GVH. Storb *et al.*<sup>6</sup> démontrent l'efficacité de l'association du méthotrexate et de la ciclosporine dans la prévention de la maladie du greffon contre l'hôte.

Parallèlement, les traitements utilisés pour les conditionnements pré-greffe se diversifient. Cette étape permet d'obtenir d'une part une myélosuppression permettant au greffon de prendre la place de la moelle à remplacer et une immunosuppression d'autre part afin d'éviter que l'organisme receveur ne rejette le greffon. Les premiers conditionnements associaient une chimiothérapie (cyclophosphamide) à une irradiation corporelle totale (ICT). Santos *et al.* rapportent en 1983 l'utilisation du busulfan (8 à 20 mg/kg) en association au cyclophosphamide (200 mg/kg) sans radiothérapie dans le cadre de leucémies aiguës myéloïdes<sup>7</sup>. Cette même association est également relatée par Blazar en 1985 chez quatre enfants atteints de pathologies non malignes<sup>8</sup> puis par Antin *et al.* (avec en plus procarbazine et sérum antilymphocytaire) avant une greffe chez un enfant présentant une hémoglobinurie paroxystique nocturne<sup>9</sup>. L'emploi du busulfan lors des conditionnements pré-greffe s'est rapidement élargi à d'autres indications : leucémies aiguës de l'enfant<sup>10</sup>, bêta-thalassémie majeure<sup>11</sup>, leucémies aiguës et chroniques de l'adulte<sup>12</sup>...

### **3. Types de greffes**

Il est à différencier en premier lieu l'autogreffe de l'allogreffe. En effet l'autogreffe repose sur une greffe de cellules souches autologues, c'est-à-dire à partir des propres cellules souches du patient. La moelle osseuse du patient est récoltée lorsque celui-ci est en rémission. Le patient doit d'abord recevoir un traitement de conditionnement sous forme d'une chimiothérapie ou radiothérapie intensive pour contrôler la maladie. Ses propres cellules souches sont récoltées ou

prélevées par cytophérèse et congelées. Une fois la chimiothérapie ou radiothérapie intensive terminée, les cellules sont retournées dans le corps du patient par perfusion intraveineuse (IV).

Le but d'une autogreffe de cellules souches est de restaurer la capacité de l'organisme à fabriquer des cellules sanguines normales après une chimiothérapie ou radiothérapie à forte dose. Contrairement à l'allogreffe, l'autogreffe n'offre pas les avantages de l'effet du greffon contre la tumeur, alors que les cellules saines du donneur attaquent les cellules cancéreuses. De plus, elle ne comporte pas le risque de GVH.

Contrairement à l'autogreffe, l'allogreffe quant à elle implique le transfert de CSH à partir d'un donneur. Le donneur et le receveur étant deux personnes distinctes, il est indispensable de prendre en compte la compatibilité immunologique de la greffe. Chaque individu possède normalement des cellules immunocompétentes capables de distinguer les cellules du soi et du non-soi via la présentation d'antigènes de surface. Si ces antigènes de surface sont reconnus différents du « soi » par les cellules immunocompétentes, celles-ci vont déclencher une réaction immunitaire destinée à détruire les cellules reconnues comme étrangères. Les antigènes de surface qui seront reconnus par les cellules immunocompétentes sont les antigènes du CMH, encore appelé système HLA. Deux groupes principaux d'antigènes d'histocompatibilité ont été identifiés :

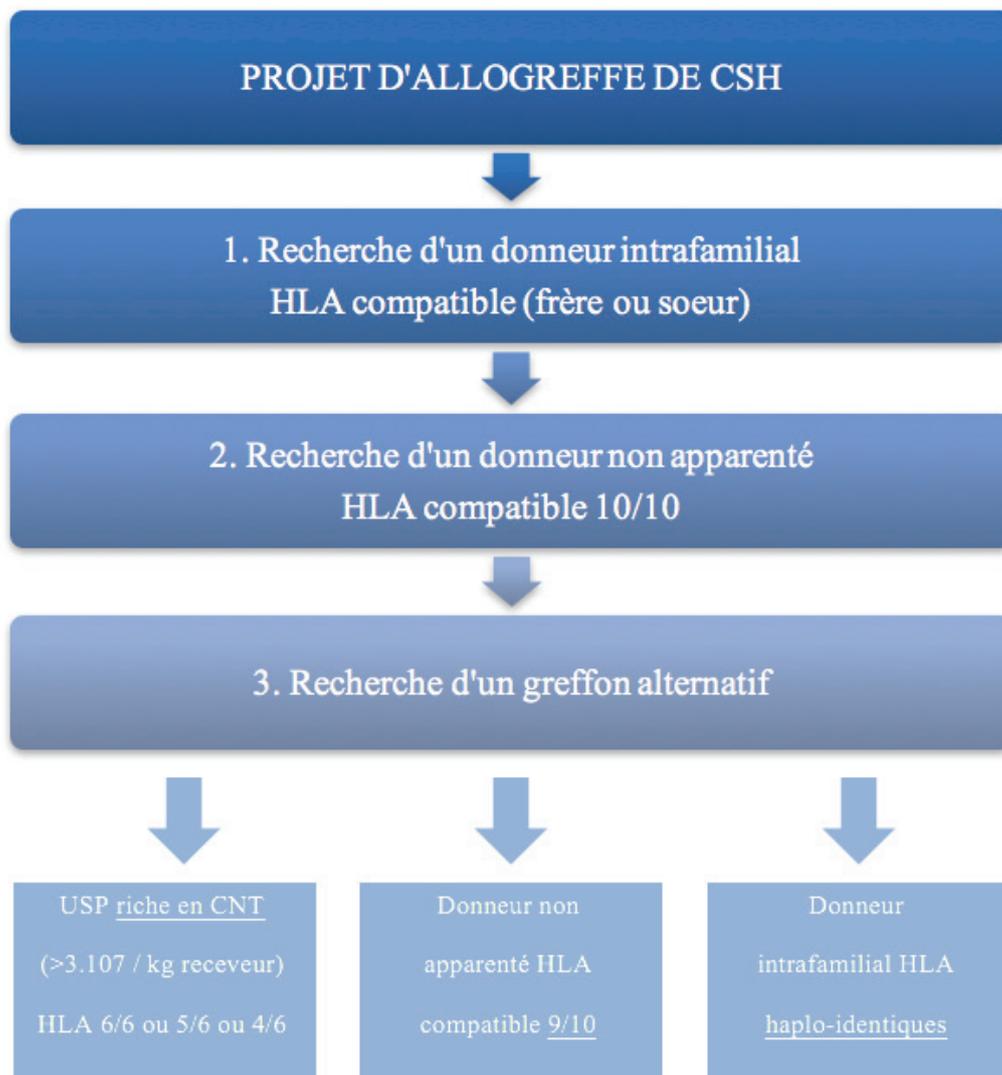
- Les antigènes de classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C), présents à la surface de la très grande majorité des cellules nucléées de l'organisme
- Les antigènes de classe II (principalement HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ), présents uniquement au niveau des lymphocytes T activés et B, des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques.

D'autres antigènes d'histocompatibilité, appelés antigènes mineurs d'histocompatibilité, interviennent également dans les réactions immunitaires survenant au décours des transplantations. Ces antigènes, encore mal identifiés, possèdent tout comme les antigènes du CMH, une forte immunogénicité malgré leur dénomination.

En tenant compte des différentes possibilités d'histocompatibilité, on distingue trois types de greffe de moelle allogénique :

- **Grefte géno-identique familiale** : le donneur est le plus souvent un frère ou une sœur du receveur, le donneur et le receveur possédant les mêmes antigènes HLA. Des différences existent néanmoins au niveau d'autres antigènes que ceux du CMH et sont impliqués dans les réactions du greffon contre l'hôte.
- **Grefte phéno-identique** : le donneur n'est généralement pas apparenté au receveur (donneur volontaire inscrit sur un fichier). On recherchera une compatibilité pour les antigènes HLA-DR, HLA-DQ, HLA-A, HLA-B et HLA-C.
- **Grefte incompatible ou « mismatch »** : la compatibilité HLA entre donneur et receveur n'est retrouvée que pour un haplotype, le second haplotype présentant une incompatibilité au niveau d'un ou plusieurs antigènes du CMH.
- **Grefte haplo-identique** : le donneur est un des parents biologiques du patient ou son enfant, qui sera par définition à moitié compatible. Initialement, ce type de greffe était considérée comme extrêmement toxique, puis grâce à des programmes adaptés de conditionnement et surtout de T-déplétion *ex vivo* par différentes méthodes, sa faisabilité et son efficacité ont été prouvées.

Aujourd'hui, la recherche d'un donneur se fera donc en première intention dans la fratrie du patient afin d'obtenir une allogreffe géno-identique (**Figure 2**). Cependant, il n'existe de donneur familial géno-identique que dans environ 25 à 30% des cas. Si l'indication d'allogreffe est tout de même retenue, il sera alors effectué une recherche d'un donneur pour une greffe phéno-identique, l'objectif étant une compatibilité 10/10<sup>ème</sup>, c'est-à-dire concernant les deux allèles des cinq antigènes majeurs du CMH (pas de prise en compte de la compatibilité DP). Plus il y aura de mismatches (allogreffe 9/10<sup>ème</sup>, 8/10<sup>ème</sup>, etc.), plus la réaction immunologique vis-à-vis du greffon sera conséquente entraînant toxicité et fort risque de non prise de greffe.



**Figure 2.** Arbre décisionnel d'un projet d'allogreffe.

*CSH : cellules souches hématopoïétiques ; HLA : human leucocytes antigen ; USP : unité de sang placentaire ; CNT : cellules nucléées totales.*

Il existe trois types de greffon selon la source de prélèvement :

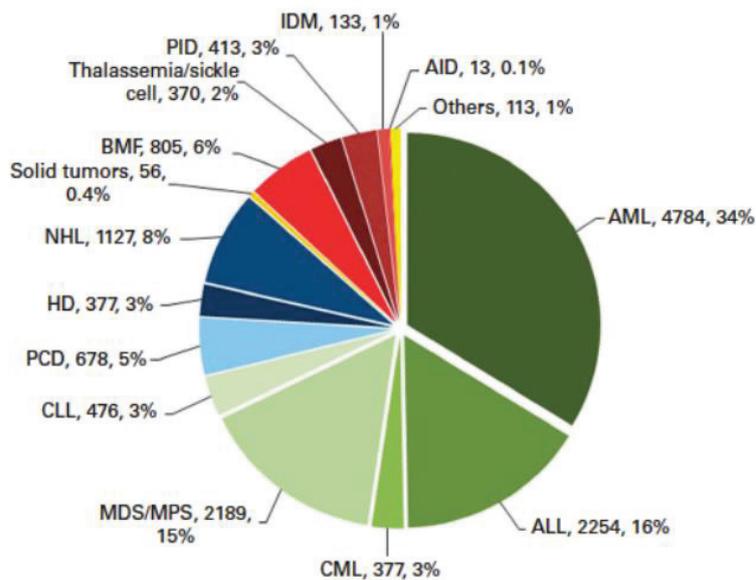
- **Le greffon médullaire** : c'est la technique historique. Elle nécessite une hospitalisation de 48 heures et une anesthésie générale pendant laquelle la moelle osseuse du donneur est

prélevée par ponctions multiples au niveau des os du bassin (crête iliaque) et éventuellement du sternum.

- **Le greffon de CSH périphériques** : les cellules sont mobilisées de la moelle osseuse vers le sang périphérique grâce à un facteur de croissance hématopoïétique, le G-CSF (Granocyte colony-stimulating factor). Le prélèvement fait appel à des techniques de tri cellulaire. Les cellules sélectionnées sont des cellules mononuclées parmi lesquelles sont identifiées les CSH. Les autres cellules et notamment les érythrocytes sont réinjectées au donneur.
- **Le greffon de cellules souches de sang de cordon** : ces cellules sont prélevées à la naissance au niveau du cordon ombilical puis anonymisées au sein d'une banque de sang de cordon. Les cellules du sang ombilical ont des capacités de prolifération et d'expansion plus grandes que celles de l'adulte et sont par ailleurs plus immatures ce qui permet de réaliser des allogreffes avec une compatibilité HLA incomplète.

## 2. Indications des greffes

La greffe de CSH devient une option thérapeutique, et le plus souvent la seule curative, notamment lorsque les cellules de la moelle osseuse d'un patient ne remplissent donc plus leur fonction. Les pathologies pour lesquelles une transplantation médullaire est préconisée chez l'enfant sont donc diverses. Une allogreffe peut être requise chez des enfants atteints d'hémopathie maligne, d'hémoglobinopathie, de certaines maladies métaboliques, de déficit immunitaire ou d'aplasie médullaire. Les autogreffes quant à elles peuvent être indiquées lors de la prise en charge de lymphomes non hodgkiniens, myélomes, et plus largement en pédiatrie pour le traitement de neuroblastomes, de sarcomes ou de tumeurs primitives neuro-ectodermiques tel que le médulloblastome.



**Figure 3.** Répartition des indications d'allogreffe en Europe en 2012<sup>13</sup>

*AML : leucémie aigue myéloblastique; ALL : leucémie aigue lymphoblastique; CML : leucémie myéloïde chronique; MDS/MPS : syndrome myélodysplasique/myéloprolifératif; CLL : leucémie lymphoïde chronique; PCD : myélomes, plasmocytomes ; NHL : lymphome non Hodgkinien ; solid tumors : tumeurs solides ; Thalassemia/sickle cell : Thalassémie, drépanocytose.*

### 1. Les hémopathies malignes

La greffe de CSH sera envisagée pour les leucémies aigues lymphoblastiques (LAL) dès l'obtention de la première rémission complète dans le cas des LAL à très haut risque (LAL VHR, very high risk) lorsqu'une possibilité de greffe géno-identique existe. Pour les LAL non VHR, une greffe est indiquée en cas de rechute et après obtention d'une seconde rémission. Elle est réalisée avec un donneur géno (préférentiellement) ou phéno-identique.

Les enfants atteints de leucémies aigues myéloblastiques (LAM) sont greffés en première rémission s'il existe un donneur géno-identique ou en seconde rémission en l'absence de donneur familial géno-identique.

Dans le cas des syndromes myélodysplasiques, la greffe est le seul traitement permettant d'espérer une guérison. Parmi les syndromes myélodysplasiques, la classification franco-américano-britannique (classification FAB) distingue les anémies réfractaires, les anémies

sidéroblastiques, les anémies réfractaires avec excès de blastes et les anémies réfractaires avec excès de blastes en transformation. Les leucémies myélomonocytaires juvéniles chroniques ont récemment été reclassées dans les syndromes myéloprolifératifs.

## **2. Hémoglobinopathies**

Les hémoglobinopathies sont des anomalies qualitatives ou quantitatives de l'hémoglobine. Les thalassémies sont caractérisées par un défaut de synthèse d'une ou plusieurs chaînes de l'hémoglobine. Les thalassémies majeures, formes retrouvées chez les sujets homozygotes sont une indication de greffe de CSH. Les premières transplantations ont été réalisées par l'équipe de Lucarelli<sup>14</sup>.

La drépanocytose, ou anémie falciforme, est une anomalie qualitative de l'hémoglobine touchant les chaînes de globine et ayant pour origine le remplacement d'un acide aminé, le glutamate, par une valine en position 6 de cette chaîne. Dans les formes graves de la maladie, la sévérité des complications thrombotiques (infarctus de localisation variée, accidents vasculaires cérébraux...) font de la greffe de moelle osseuse une thérapeutique désormais envisagée<sup>15</sup>.

## **3. Maladies métaboliques**

Cet ensemble regroupe des pathologies caractérisées par un déficit enzymatique, aboutissant à une accumulation tissulaire de substrats non dégradés. L'enzyme déficiente peut dans certains cas être apportée par des CSH. Parmi ces différentes maladies, on peut notamment citer :

- La maladie de Niemann-Pick (trouble du métabolisme des graisses dû à un déficit en sphingomyélinase, d'où l'accumulation de sphingomyéline)
- La maladie de Günther ou porphyrie (déficit en enzyme du métabolisme des porphyrines)
- L'ostéopétrose ou maladie d'Albers-Schonberg, due à un dérèglement de la résorption des ostéoclastes.

## **4. Déficits immunitaires**

La gravité des déficits immunitaires repose sur l'incapacité de l'organisme à se défendre contre les infections. La greffe de CSH doit donc être envisagée le plus rapidement possible afin d'éviter les complications liées aux infections diverses. Les déficits immunitaires combinés sévères (DICS) s'expriment par des manifestations infectieuses dès les premiers mois de la vie<sup>16</sup>. D'autres déficits immunitaires tels que le syndrome de Wiskott-Aldrich (dysgammaglobulinémie avec augmentation des IgA et diminution des IgM, perturbation de l'hypersensibilité retardée et thrombocytopenie) ont une révélation généralement plus tardive.

### 5. Aplasies médullaires

L'aplasie médullaire est définie par une atteinte du tissu myéloïde se traduisant biologiquement par une pancytopenie. Dans près de 85% des cas, aucune cause n'est retrouvée et l'on parle d'aplasie médullaire idiopathique. Dans les autres cas, outre des origines infectieuses ou toxiques, les aplasies constitutionnelles constituent 30% des aplasies diagnostiquées chez l'enfant. La maladie de Fanconi est la forme d'aplasie médullaire constitutionnelle la plus fréquemment retrouvée : on retrouve en plus des anomalies de l'hémogramme une fragilité chromosomique caractéristique et des malformations notamment au niveau des mains ainsi qu'un faciès typique.

Dans les formes sévères d'aplasie médullaire, les polynucléaires neutrophiles sont inférieurs à 0,5 G/L et les plaquettes inférieures à 20 G/L<sup>17</sup>. La greffe de CSH est le meilleur traitement des formes sévères.

**Tableau 1** : Nombre d'allogreffes apparentées et non apparentées selon l'origine des cellules et le diagnostic chez les patients de moins de 18 ans en France en 2010.<sup>18</sup>

	Moelle osseuse		Sang périphérique		Sang placentaire		Total
	Apparenté	Non apparenté	Apparenté	Non apparenté	Apparenté	Non apparenté	
Leucémie aigüe	34	32	2	10	2	43	123
Maladies non malignes	55	19	2	3	7	9	95
Autres	6	8	1	8	0	6	29
<b>Total</b>	<b>95</b>	<b>59</b>	<b>5</b>	<b>21</b>	<b>9</b>	<b>58</b>	<b>247*</b>

\* l'origine des cellules et la parenté sont manquantes pour 3 des 250 greffes

### **3. Conditionnement de greffe**

Avant de recevoir la greffe, le patient sera « préparé » : cette préparation est aussi appelée « le conditionnement ».

Ce conditionnement nécessite une hospitalisation en secteur protégé (ou secteur stérile) car le but est de détruire la moelle osseuse malade et les défenses immunitaires du patient pour permettre au greffon de s'installer, ce qui expose à un risque important d'infection. Le conditionnement est constitué d'une chimiothérapie, parfois associée à une radiothérapie. Sa durée est d'environ une semaine.

Ensuite les cellules souches du donneur sont injectées comme une simple transfusion. Les nouvelles cellules retournent naturellement dans la moelle osseuse. Il faut leur laisser le temps de s'installer et de se multiplier. Progressivement, les cellules de la moelle vont se mettre à produire de nouvelles cellules dans le sang. Il faut compter en moyenne 4 semaines après la greffe pour avoir suffisamment de défenses pour sortir du secteur stérile, et, en l'absence de complications environ 6-12 mois pour une reconstitution totale des défenses immunitaires.

L'objectif du conditionnement est double :

- Assurer une myéloablation, c'est-à-dire de supprimer la moelle osseuse malade dans le cas des leucémies et d'éliminer au maximum les cellules tumorales du receveur ;
- Réaliser une lymphoablation (supprimer les lymphocytes du donneur) pour éviter le rejet ;

On distingue aujourd'hui deux types de conditionnement en fonction qu'il soit myéloablatif ou non. Le conditionnement myéloablatif (myeloablative conditioning MAC) repose sur l'association d'une chimiothérapie lourde seule ou en association avec une ICT.

Les protocoles utilisés lors des conditionnements diffèrent notamment en fonction de l'indication de la greffe, du type de greffe (géno ou phéno-identique), de l'âge de l'enfant et du centre. Ils combinent ICT et chimiothérapie dans le cas des LAL chez l'enfant de plus de quatre ans. Les conditionnements purement chimiothérapeutiques prévalent dans les autres indications.

Le conditionnement le plus utilisé est l'association busulfan-cyclophosphamide (BuCy). Le conditionnement est débuté 7 à 10 jours avant le jour de la greffe. Pour éviter le rejet de la greffe, lorsque le greffon n'est pas géno-identique, le conditionnement comprend, le plus souvent, l'administration de sérum anti-lymphocytaire (SAL) à visée immunosuppressive.

Plus récemment a émergé le conditionnement dit d'intensité réduite (reduced intensity conditioning RIC), appelé également conditionnement non myéloablatif. En effet, la volonté de minimiser la toxicité de la greffe, notamment dans la population âgée ont conduit ces dernières années au développement de ce type de conditionnement. Ils permettent une prise de greffe rapide avec un taux de toxicité liée à la chimiothérapie très faible. L'objectif est d'obtenir une action anti leucémique centrée sur la réaction immunologique du greffon contre la leucémie (graft *versus* leukemia GVL)<sup>19,20</sup>. Les associations busulfan – fludarabine - SAL ou ICT à doses atténuées, en association ou non avec la fludarabine sont les principaux protocoles RIC utilisés aujourd'hui. Ils sont actuellement largement utilisés chez l'adulte tant en condition géno- que phéno-identique<sup>21-24</sup>.

En pédiatrie, la faisabilité est maintenant établie mais la place de ces conditionnements à intensité réduite reste à déterminer. Cette option thérapeutique peut être proposée à deux types de population. La première est celle d'enfants porteurs de pathologies malignes, pour lesquels l'allogreffe est le seul traitement curatif potentiel reconnu, mais dont les traitements antérieurs reçus ou une comorbidité associée ne permettent pas la réalisation d'un conditionnement lourd myéloablatif. La seconde est celle d'enfants porteurs de tumeurs solides ou d'hémopathies malignes en échec des thérapeutiques de référence.

#### **4. Complications de la greffe**

Les complications post-greffes de CSH sont fréquentes. Elles peuvent survenir dès le début du conditionnement et sont d'étiologies très diverses : toxiques, immunologiques ou infectieuses. Des complications à plus long terme sont également observées.

## **1. Précoces**

### **a. Graft versus Host Disease (GVH)**

La GVH est une complication fréquente et grave de l'allogreffe de CSH. L'incidence varie selon les études de 10 à 50% chez les patients recevant une greffe d'un donneur géno-identique et jusqu'à plus de 75% des patients transplantés avec un donneur phéno-identique selon les différentes études<sup>25-27</sup>. Il s'agit d'une réaction immunitaire faisant intervenir les lymphocytes T du greffon qui vont réagir contre les antigènes tissulaires du receveur non présents chez le donneur. Les antigènes tissulaires les plus immunogènes sont ceux du CMH. Les antigènes mineurs d'histocompatibilité sont également mis en cause dans les GVH puisque de telles réactions surviennent au décours de greffes géno-identiques. Le conditionnement pré-greffe provoque une immunosuppression qui rend normalement le receveur incapable de rejeter les lymphocytes T du greffon mais n'empêche pas cette GVH.

On distingue deux types de GVH<sup>28</sup> : les GVH aiguës, survenant généralement dans les deux premiers mois suivants la greffe de moelle (le plus souvent au cours des deux premières semaines) et les GVH chroniques. Ces dernières peuvent faire suite à une GVH aiguë ou survenir isolément dans un délai plus ou moins long après la greffe.

#### **• GVH aiguë**

Au cours d'une GVH aiguë, les principaux organes touchés sont la peau, le foie et le système digestif, plus précisément les intestins. On peut également observer une majoration du déficit immunitaire associée histologiquement à une atrophie et une dysplasie du thymus<sup>29</sup>. La classification de Glucksberg-Seattle<sup>30</sup>, modifiée par Thomas<sup>31</sup>, distingue quatre stades (côtés de 1 à 4 – **Tableau 2**) et quatre grades (notés de I à IV – **Tableau 3**) de gravité (**Tableau 4**).

**Tableau 2.** Stades cliniques de la GVH

Stade clinique	PEAU (éruption maculo-papuleuse)	INTESTIN	FOIE (taux de bilirubine) ( $\mu\text{mol/l}$ )
+	< 25% SC	Diarrhée > 500 ml/j (ou <b>10-15 ml/kg/j chez les &lt;12 ans</b> ) <i>ou</i> nausées, anorexie <i>ou</i> vomissements	34 - 50
++	25 - 50% SC	Diarrhée > 1000 ml/j (ou <b>16-20 ml/kg/j chez les &lt;12 ans</b> )	51 - 102
+++	> 50% SC	Diarrhée > 1500 ml/j (ou <b>21-25 ml/kg/j chez les &lt;12 ans</b> )	103 - 255
++++	Erythrodermie généralisée Nécrolyse épidermique = syndrome de Lyell	Diarrhée > 1500 ml/j (ou > <b>26 ml/kg/j chez les &lt;12 ans</b> ) <i>et</i> douleurs abdominales $\pm$ iléus $\pm$ sang dans les selles	> 255

SC : surface corporelle

**Tableau 3.** Grades de la GVH

Grade	Peau	Foie	Tube digestif	Etat clinique
I	1-2	0	0	Normal
II	1-3	1	1	Moyen
III	2-3	2-3	2-3	Très altéré
IV	2-4	2-4	2-4	Impotence complète

**Tableau 4.** Gradation histologique de la GVH

Grade	Peau	Foie	Tube digestif
1	Vacuolisation de la couche cellulaire basale	Nécrose de 25% des canaux biliaires	Nécrose focale de l'épithélium
2	Nécrose épidermique	Nécrose de 25 à 50% des canaux biliaires	Lésions diffuses d'épithélium
3	Dysjonction du derme et de l'épiderme	Nécrose de 50 à 74% des canaux biliaires	Ulcérations focales

Le grade I signe une GVH mineure, on parle de GVH modérée pour le grade II, les GVH sont sévères pour les grades III et IV, engageant le pronostic vital. Très largement utilisée, cette classification a été réévaluée lors d'une conférence de consensus suggérant notamment la réalisation de nouvelles études afin d'évaluer le devenir des patients atteints de GVH aiguës de différents grades à plus ou moins long terme<sup>32</sup>. Un autre index de sévérité des GVH a été développé par Rowlings *et al.*<sup>33</sup>. Il permet de pallier le manque de prédictivité concernant la mortalité et le risque de rejet de greffe associés au grade de GVH et a été comparé à la classification de Glucksberg<sup>34</sup>.

Le traitement prophylactique de la GVH aiguë comprend de la ciclosporine, associée ou non au méthotrexate, et/ou au mycophénolate, voire à la prednisolone dans le cas des greffes à partir de sang de cordon. Plusieurs études relatent également l'utilisation du tacrolimus en remplacement de la ciclosporine, seul ou en association au méthotrexate<sup>35,36</sup> en traitement prophylactique de la GVH. Du sérum antilymphocytaire est également utilisé en cas de greffe phéno-identique ainsi que dans les hémoglobinopathies. Martin *et al.* ont corrélé la sévérité des GVH aiguës et les concentrations sanguines résiduelles de ciclosporine mesurées au cours des deux premières semaines après la greffe<sup>37</sup>. Cette étude a ainsi permis de définir des cibles thérapeutiques lors du suivi des ciclosporinémies. Ces cibles dépendent de la pathologie initiale et sont fonction du souhait d'obtention d'une GVH de grade I-II ou non. En effet, dû à l'impact positif de l'effet GVL associé avec la GVH sur l'efficacité clinique<sup>19,20</sup>, une GVH est parfois recherchée chez les patients transplantés pour une hémopathie maligne.

Le traitement curatif de la GVH aiguë fait appel à la corticothérapie<sup>38</sup>, associée à un renforcement du traitement par ciclosporine. En cas d'échec d'une corticothérapie, il n'existe pas de consensus précis et de recommandations à donner en dehors de protocoles d'évaluation, compte tenu de l'absence de médicaments ayant une AMM dans cette indication. Les thérapeutiques utilisables sont le sérum antilymphocytaire, des médicaments anti-CD25 (basiliximab)<sup>39</sup>, la photochimiothérapie extracorporelle<sup>40</sup>, des anti-TNF (etanercept)<sup>41</sup>, l'ajout d'autres immunosuppresseurs, le rituximab<sup>42</sup>, des anti-CD52. Récemment, un inhibiteur sélectif de

l'enzyme janus kinase indiqué pour le traitement de la myélofibrose, le ruxolutinib, a montré de résultats très intéressants dans la prise en charge des GVH aigues cortico-résistantes<sup>43</sup>.

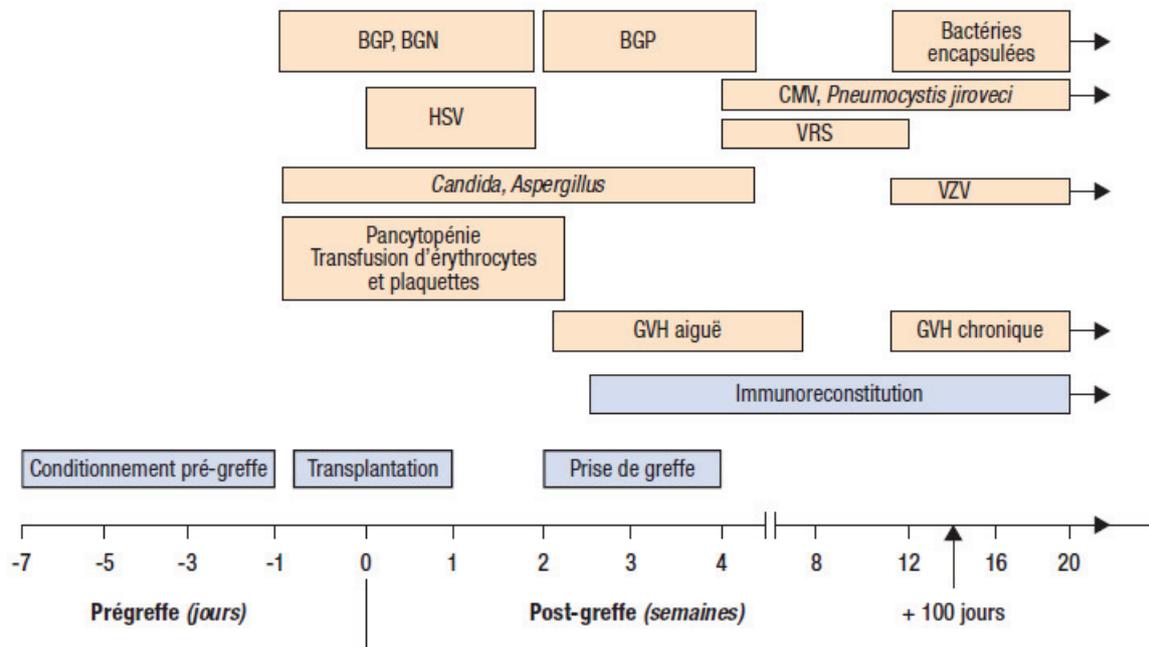
#### **b. Complications infectieuses**

Du fait de l'immunosuppression, les infections sont une cause majeure de morbidité et de mortalité après une allogreffe de CSH. Il existe trois périodes de risque distinctes après la greffe, dictées par les étapes de la reconstitution immunitaire post-greffe. De plus, les risques liés à la susceptibilité génétique pour ces infections se surajoutent vraisemblablement.

La première période, celle de la neutropénie, dure de deux à trois semaines. Les infections bactériennes, fongiques et éventuellement à virus Herpès simplex sont les plus fréquentes, les principaux facteurs de risque étant la neutropénie, la mucite et le cathéter veineux central. L'atteinte est plus souvent de type septicémique, pulmonaire ou cutané. Les septicémies à levures, en particulier du genre *Candida*, restent une préoccupation. Leur fréquence est de moins de 5 à 10 %, mais la mortalité est de 40 à 80 %.

La seconde période correspond à celle (si existante) de la GVH aiguë, avec comme principales complications infectieuses des infections et/ou maladies à cytomégalovirus (CMV), à des infections à *Aspergillus* et à parasites.

Enfin, la phase tardive, caractérisée par un déficit immunitaire humoral et cellulaire persistant, est la période de risque pour les infections à virus varicelle-zona (VZV) et à bactéries encapsulées. Ces dernières (*Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*) représentent un danger potentiellement mortel.



**Figure 4.** Principales complications immunologiques et infectieuses après une transplantation de cellules souches hématopoïétiques<sup>44</sup>

*BGP : Bactéries à Gram Positif ; BGN : Bactérie à Gram Négatif ; HSV : Herpès Simplex Virus ; CMV : CytoMégaloVirus ; VRS : Virus Respiratoire Syncytial ; GVH : maladie du greffon contre l'hôte.*

### c. Complications gastro-intestinales

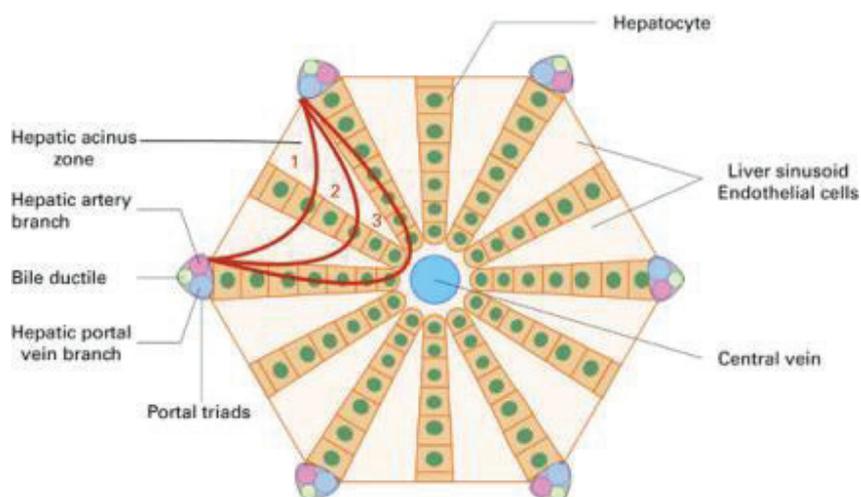
Les complications gastro-intestinales sont très fréquentes et sont en partie dues au conditionnement pré-greffe (chimiothérapique et/ou radiothérapique). Les mucites peuvent être très importantes, nécessitant des antalgiques puissants. On observe également fréquemment nausées, vomissements, douleurs abdominales et diarrhées. Ces manifestations intestinales peuvent cependant avoir pour origine une autre cause que la toxicité liée au conditionnement : GVH aiguë ou infection virale (CMV, ADV) notamment. Du fait de ces complications, une alimentation parentérale est généralement instaurée pendant la période post-greffe.

### d. Maladie veino-occlusive

Il s'agit du second effet indésirable le plus fréquent lié au conditionnement et le plus grave. C'est un syndrome potentiellement fatal, marqué par une hépatomégalie douloureuse, un ictère et une rétention liquidienne. On parle également de « syndrome d'obstruction sinusoidale ». Un récent article de l'European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT)<sup>45</sup> fait le point sur la physiopathologie, les facteurs de risque et le diagnostic de cette complication de la greffe de CSH.

- **Physiopathologie**

La MVO correspond à une atteinte des cellules endothéliales sinusoidales et des hépatocytes prédominant en zone centro-lobulaire du lobule hépatique (**Figure 5**). Histologiquement, les sinusoides apparaissent d'abord congestifs avec éventuellement des lésions de péliose. Ensuite, une fibrose centrolobulaire va pouvoir se développer entraînant une atteinte des veines centrolobulaires qui vont s'oblitérer. Il est probable que ces remaniements vasculaires puissent conduire ensuite au développement d'une hyperplasie nodulaire régénérative<sup>46-48</sup>.



**Figure 5.** Représentation schématique de l'acinus hépatique. Lors d'une maladie veino-occlusive, l'obstruction du sinusoides hépatique intervient dans la zone 3 de l'acinus hépatique<sup>49</sup>.

D'un point de vue physiopathologique, plusieurs hypothèses non mutuellement exclusives ont été avancées, faisant apparaître la cellule endothéliale sinusoidale comme la cible principale des liaisons<sup>48,50-52</sup>. Un déficit en glutathion des cellules endothéliales sinusoidales et des hépatocytes

pourrait entraîner une sensibilité accrue aux toxiques au niveau de la zone péricentrolobulaire. Des troubles de la coagulation au niveau de la microcirculation ont été rapportés comme éventuel facteur causal. Un déficit en protéine C et en antithrombine III a été décrit chez un certain nombre de malades. Le rôle des cytokines pro-inflammatoires et du facteur de croissance vasculaire endothélial (vascular endothelial growth factor VEGF) ont également été avancés notamment dans le déclenchement de la fibrinogénèse. Ces hypothèses servent de soutien au développement de nouvelles approches thérapeutiques.

La relation entre ces perturbations hépatiques et le conditionnement a longtemps été recherchée sans toutefois être très claire. Les thérapies cytoréductives à haute dose, lorsqu'elles sont administrées à un patient avec une certaine susceptibilité hépatique, produisent une atteinte endothéliale des sinusoides et des petites vénules hépatiques. Ces atteintes endothéliales semblent induire localement un état d'hypercoagulabilité en activant la cascade de coagulation et en favorisant la formation de caillots. Les agrégats de fibrine et d'autres déchets cellulaires obstruent progressivement les petits pores de la couche endothéliale. Cette occlusion provoque une obstruction du flux veineux hépatique générant une hypertension porteuse intra-hépatique post-sinusoïdal, responsable des principales manifestations cliniques de la MVO<sup>53,54</sup>.

- **Diagnostic**

Le délai moyen d'apparition de la MVO est de  $15 \pm 11$  jours<sup>55</sup> après la greffe de CSH et l'incidence estimée pour l'ensemble des greffes est de 14% (10-20%).

Avec les conditionnements atténués de type busulfan – fludarabine - SAL, l'incidence estimée d'après une étude récente est de l'ordre de 13% pour le busulfan oral et 5% pour le busulfan IV<sup>56</sup>.

Le diagnostic se base avant tout sur des critères clinico-biologiques :

- Critères diagnostiques de Mc Donald<sup>57,58</sup> : survenue avant J21 (la survenue d'un tableau de MVO après J21 n'exclut pas pour autant le diagnostic) d'au moins deux des anomalies suivantes : hyperbilirubinémie  $> 34 \mu\text{mol/L}$ , hépatomégalie ou douleur de l'hypocondre droit, ascite et/ou prise de poids  $> 2 \%$  du poids corporel consécutive à des œdèmes ;

- Critères de Baltimore<sup>59</sup> : survenue avant J21 d'une hyperbilirubinémie > 34 µmol/L associée à deux des signes suivants : hépatomégalie, prise de poids > 5 %, ascite.

Un diagnostic différentiel doit également être fait pour éliminer d'autres étiologies<sup>59,60</sup> : infection, GVH aiguë, toxicité hépatique d'un médicament hors conditionnement (ciclosporine, azolés, sulfamides, autres, alimentation parentérale), autres causes d'épanchements (insuffisance cardiaque, pancréatite, hypoalbuminémie profonde, syndrome de fuite capillaire...).

D'un point de vue purement biologique, plusieurs anomalies seront retrouvées lors du bilan permettant le diagnostic<sup>61-63</sup> :

- Hémogramme : thrombopénie avec absence d'efficacité des transfusions de plaquettes ;
- Ionogramme sanguin : hémodilution, hyponatrémie ;
- Bilan hépatique : cholestase ;
- Hémostase : allongement du TCA, diminution de certains facteurs de coagulation (VII, X et ATIII, protéine C activée). L'interprétation de ces biomarqueurs d'hémostase nécessite de disposer de valeurs de référence. L'augmentation de PAI-1 est un marqueur qui peut apporter une aide au diagnostic encore que cette anomalie puisse être retrouvée dans d'autres dysfonctionnements hépatiques. Elle ne fait donc pas encore partie des tests de routine dans le bilan de MVO<sup>64,65</sup> ;
- Autres marqueurs non-utilisables en routine : TNF, N-terminal propeptide type III collagen, acide hyaluronique, évaluation des cellules endothéliales circulantes<sup>66</sup>.

La place de l'imagerie devient de plus en plus importante. L'écho-doppler est recommandée pour le diagnostic différentiel de MVO et pour mettre en évidence une hypertension portale (HTP)<sup>67-70</sup>. Les critères de diagnostic échographique sont une hépatomégalie, une atténuation du flux dans les veines hépatiques, une splénomégalie, une reperméabilisation de la veine para-ombilicale, un

épaississement de la paroi de la vésicule biliaire, une modification de l'index de résistance de l'artère hépatique ou une inversion du flux portal.

L'EBMT a publié récemment de nouveaux critères diagnostiques de la MVO chez l'enfant (**Tableau 5**)<sup>71</sup>

**Tableau 5.** Critères diagnostiques de la maladie veino-occlusive de l'enfant de l'EBMT<sup>71</sup>

**- La présence de deux critères ou plus parmi :**

- Thrombocytopénie inexpliquée ou résistante à la transfusion
- Prise de poids inexpliquée sur 3 jours consécutifs malgré l'utilisation de diurétiques ou prise de poids > 5% par rapport au poids de référence
- Hépatomégalie (confirmée si possible par imagerie)
- Ascite (confirmée si possible par imagerie)
- Hyperbilirubinémie constatée 3 jours de suite ou bilirubinémie  $\geq 2$  mg/dl dans les 72h

**- Pas de limitation de temps dans la survenue de la MVO**

**• Pronostic**

D'après les critères de Bearman et de Mac Donald et Richardson, le pronostic de la MVO peut s'apprécier selon trois stades :

- Stade 1 (index de gravité minimale) : évolution spontanément résolutive.
- Stade 2 (index de gravité modérée) : au moins un des critères suivants parmi une bilirubinémie > 102  $\mu\text{mol/L}$  (60 mg/l), des transaminases supérieures à cinq fois les valeurs normales, une prise de poids > 5 % et une ascite.
- Stade 3 (index de gravité sévère) s'il existe un tableau de défaillance multiviscérale : détresse respiratoire ( $\text{SaO}_2 < 90\%$ ), syndrome hépato-rénal, encéphalopathie, insuffisance rénale sévère (créatinine supérieure au double de la valeur de base), bilirubine > 340  $\mu\text{mol/L}$  (ou 200 mg/L).

La sévérité est difficile à apprécier initialement. Cependant, l'évolution initiale peut être évocatrice de gravité selon différents événements : apparition rapide après la greffe, aggravation

rapide (notamment doublement de la bilirubine en moins de 24 heures), défaillance multiviscérale.

- **Traitement préventif**

Il est important d'agir sur les facteurs de risque réversibles avant la greffe, dans la mesure du possible :

- Surcharge martiale : chélation,
- Hépatite B : traitement antiviral,
- Hépatite C : traitement antiviral si charge virale positive.

Si l'on ne peut pas intervenir sur certains facteurs de risque, par exemple du fait du risque de rechute dans les hémopathies malignes, il faut envisager de diminuer l'intensité du conditionnement et éviter certaines associations (comme un conditionnement par BuCy).

Il existe un arsenal relativement large dans le traitement préventif de la MVO

**Héparine** : L'usage de l'héparine (non-fractionnée ou bas poids moléculaire), à l'ère de l'acide ursodésoxycholique et du défibrotide, est moins pertinent notamment du fait du risque hémorragique. Une méta-analyse sur 12 études (2782 patients) n'a pas démontré de diminution significative du risque de MVO avec le traitement par héparine. Ces études comportaient des héparines non fractionnées (HNF) et de bas poids moléculaire (HBPM)<sup>72</sup>. Les HNF ne sont plus recommandées dans cette indication. Dans certaines situations, on peut discuter l'utilisation d'une HBPM (notamment si antécédent thrombotique).

**Acide ursodésoxycholique** : Récemment, de nouvelles données d'efficacité de ce médicament ont été publiées<sup>64,73</sup>, notamment une étude randomisée avec une mise à jour récente (recul de 10 ans) qui retrouve une diminution de la mortalité sans rechute (28 contre 41%) et une augmentation de la survie globale (48% contre 38%) qui se confirme et se maintient dans le temps. L'acide ursodésoxycholique était utilisé jusqu'à J90. Cependant, l'étude ne retrouvait pas

clairement de modification directe de l'incidence de MVO mais une diminution du nombre de patients présentant une augmentation importante de la bilirubine. L'administration était faite dans le cadre de la greffe myéloablative<sup>74</sup>.

Compte tenu de ces données et de la faible toxicité de ce produit, on recommande son utilisation dans les conditionnements myéloablatifs mais son administration doit être discutée dans les greffes à conditionnement atténué et chez l'enfant. La durée proposée du traitement est jusqu'à J90. La posologie est de 10 à 15 mg/kg/j, sans dépasser 1 gramme par jour. Il convient de le débiter au moment du conditionnement voire, si possible, 14 jours avant ce conditionnement, comme il est mentionné dans l'étude.

**Défibrotide** : L'efficacité dans la prévention de la MVO chez l'enfant, en présence de facteurs de haut risque, a été démontrée dans une étude randomisée multicentrique à la posologie de 25 mg/kg/j en 4 injections<sup>75,76</sup>. Il n'y a pas eu d'étude randomisée chez l'adulte. Cependant, il existe deux études retrouvant des résultats similaires à ceux de l'enfant. Ces publications ne rapportent pas d'augmentation du risque hémorragique<sup>77,78</sup>. Au Royaume-Uni, il existe des recommandations d'utilisation préventive chez les adultes à haut risque (maladie hépatique, seconde greffe myéloablative, leucémie au-delà de la deuxième rechute, conditionnement avec busulfan, traitement antérieur par gemtuzumab ozogamicin, syndrome d'activation macrophagique, adrénoleucodystrophie ou ostéopétrose). Pour l'instant la HAS rappelle que l'autorisation de mise sur le marché (AMM) n'a pas été accordée en préventif<sup>79</sup>.

Au vu de ces données, l'utilisation du défibrotide en prophylaxie pourrait être discutée dans les conditionnements myéloablatifs en cas de maladie hépatique comportant les facteurs de haut risque décrits précédemment.

De plus, il convient de discuter au cas par cas son utilisation :

- Dans des conditionnements atténués avec, par exemple, des facteurs de risque majeurs ou un antécédent de première greffe myéloablative ;

- En cas de conditionnement comportant du busulfan à dose myéloablative et en association avec du melphalan ou du cyclophosphamide, en cas de présence d'autres facteurs de risque, même mineurs.

La dose recommandée est de 25 mg/kg/j en quatre perfusions. Une dose moindre pourrait être envisagée (10 mg/kg/j en 2 perfusions<sup>78</sup>). Selon les recommandations anglaises, la durée d'administration est de 14 jours à partir du début du conditionnement ou jusqu'à la prise de greffe. Il n'existe pas de données autres que celles pédiatriques pour une utilisation plus prolongée.

*Autres thérapeutiques* : Les molécules suivantes ne sont pas recommandées : N-acétylcystéine, prostaglandine E1, glutamine, pentoxifylline, danaparoïde, antithrombine, t-PA<sup>80-83</sup>.

- **Traitement curatif**

Une intervention thérapeutique se décide en fonction de la sévérité et/ou de la rapidité d'évolution. Les mesures symptomatiques restent indiquées quelle que soit la situation<sup>60,84</sup>. Le médicament de référence est le débibrotide. Il a obtenu son AMM (avec une amélioration du service médical rendu mineure, ASMR IV) en 2013 pour les formes sévères à la posologie de 25 mg/kg/j en 4 injections, pendant au moins 21 jours et à poursuivre jusqu'à ce que les symptômes et les signes de MVO sévères se soient amendés. En cas de résolution rapide, on peut envisager de raccourcir la durée d'utilisation à 14 jours<sup>60</sup>.

Cependant, il apparaît nécessaire d'envisager l'utilisation de ce produit pour les MVO modérées mais d'évolutions rapides ou stables au bout de 2-3 jours malgré la mise en place de thérapeutiques de support, et donc de ne pas attendre le stade de défaillance viscérale pour le mettre en œuvre. Dans les autres situations, il convient de rester sur une attitude « watch and wait ».

Outre le défibraté, des traitements de support sont également à mettre en place et sont indispensables en fonction de la clinique :

- En l'absence d'insuffisance rénale et d'hyponatrémie : restriction sodée et diurétiques.
- Restriction hydrique uniquement en cas d'hyponatrémie,
- Maintien d'une pression artérielle suffisante (transfusions, albumine en particulier en cas d'anasarque associé à une hypoalbuminémie sévère ou d'insuffisance rénale fonctionnelle ou de sepsis),
- Dialyse à discuter au cas par cas ; elle est rarement indiquée étant donné le pronostic péjoratif des formes très sévères associées à une insuffisance rénale terminale,
- Alimentation parentérale : arrêt des lipides, maintien des apports en acides aminés et en glucose,
- Ponctions d'ascite si celle-ci est compressive,
- Arrêt des médicaments néphrotoxiques et hépatotoxiques.

Concernant la gestion de la thrombopénie et des risques hémorragiques, la possible augmentation du risque par le défibraté reste controversée. Il y a eu environ 25% d'événements hémorragiques dans l'étude 2005-01, et 15% dans les données groupées des quatre études réalisées au cours du développement, soit 419 patients<sup>85</sup>. Cependant, ce risque pourrait être attribué à la MVO elle-même car les études en prophylaxie n'ont pas retrouvé d'augmentation des phénomènes hémorragiques. Néanmoins, selon la commission de transparence de la HAS, il convient de maintenir si possible les plaquettes à un taux minimal (35-50 G/L) lors des traitements à visée curative.

#### **e. Autres**

D'autres types de complications peuvent survenir au décours d'une greffe de CSH, avec une fréquence cependant généralement moindre que les complications mentionnées ci-dessus.

- Complications urinaires : la survenue d'une cystite hémorragique quelques jours après une greffe est généralement à mettre en relation avec la toxicité vésicale de l'acroléine, produit issu du métabolisme du cyclophosphamide. Cette toxicité est majorée lorsque le cyclophosphamide est associé au busulfan. En cas d'apparition plus tardive d'une cystite hémorragique, on recherchera préférentiellement une origine infectieuse (BK virus, CMV, adénovirus).
- Insuffisance médullaire : au cours des greffes géno ou phéno-identiques, la sortie d'aplasie survient généralement deux à trois semaines après la greffe. Une insuffisance médullaire peut néanmoins survenir après cette sortie d'aplasie et être qualitative ou quantitative. Elle peut être secondaire à une infection (CMV), à l'administration de certains médicaments présentant une toxicité médullaire tel que le ganciclovir ou compliquer l'évolution d'une GVH chronique.
- Rejet de greffe : Enfin le rejet de greffe peut se manifester par une non prise de greffe ou de façon plus tardive soit par une rechute de la maladie soit par la prédominance de cellules hématopoïétiques du receveur et disparition progressive des cellules du donneur. Son incidence reste cependant faible chez les patients transplantés pour hémopathie maligne en situation HLA-identique. Elle est plus élevée chez les patients greffés pour aplasie médullaire. Dans certains cas, une seconde greffe pourra être envisagée.

## **2. Tardives**

### **a. GVH chronique**

Deux formes cliniques sont décrites en fonction de l'extension de la maladie. Les atteintes limitées associent une atteinte cutanée localisée à type de lichen plan primitif et/ou une atteinte hépatique. Ces formes sont de bon pronostic. Les atteintes extensives ont par contre un pronostic plus réservé. L'atteinte cutanée est alors généralisée et ressemble à la sclérodermie. Elle s'accompagne d'une atteinte hépatique cholestatique, associant parfois des signes de cytolyse. Un syndrome sec ressemblant au syndrome de Sjögren est fréquent. L'atteinte du système oculaire est possible. Le système hématopoïétique est également touché dans les formes sévères, une thrombocytémie sévère étant un signe de gravité<sup>86</sup>. La présence d'une GVH chronique accentue le déficit immunitaire et retarde la reconstitution de l'immunité. Le traitement des formes cliniques

est basé sur une majoration de l'immunosuppression (avec les risques que cela comporte) avec divers agents : corticothérapie, ciclosporine, azathioprine, mycophénolate. En cas d'échec, d'autres traitements ont été proposés : thalidomide, psoralène, puvathérapie, TNF (Tumor Necrosis Factor), anticorps monoclonaux anti-CD 20<sup>35</sup>.

#### **b. Complications pulmonaires non infectieuses**

Les complications pulmonaires tardives non infectieuses sont assimilées à une réaction de GVH chronique pulmonaire et regroupent plusieurs entités dont le syndrome de bronchiolite oblitérante, la pneumonie organisée, la pneumopathie interstitielle lymphoïde, le dommage alvéolaire diffus, la pneumopathie interstitielle non spécifique et le thrombus cytolitique pulmonaire. L'incidence des complications pulmonaires non infectieuses varie entre 10 et 26% chez les patients survivants à 3 mois post-allogreffe avec une médiane de temps entre 8 et 12 mois après la greffe<sup>87</sup>. Les patients présentant une GVH chronique extra-pulmonaire auraient un risque de complications pulmonaires non infectieuses augmenté par rapport aux autres patients greffés<sup>87</sup>. Les symptômes sont insidieux et initialement non spécifiques. Leur diagnostic se fait sur la présentation clinique, l'aspect tomodensitométrique, les troubles de la fonction ventilatoire, les prélèvements pulmonaires infectieux (notamment le lavage broncho-alvéolaire) qui doivent être négatifs, et par un examen histopathologique de biopsies transbronchiques ou pulmonaires lorsque cela est possible<sup>88</sup>. Les patients ayant une complication pulmonaire non infectieuse ont un taux de mortalité supérieur à ceux ayant une complication pulmonaire infectieuse avec une survie à 5 ans de 34% pour ceux ayant fait une complication pulmonaire non infectieuse contre 65% pour les autres<sup>87</sup>.

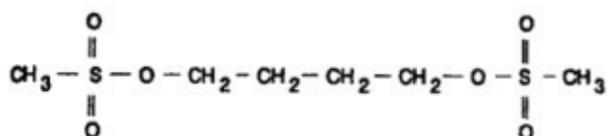
## **5. Pharmacologie du Busulfan**

### **1. Structure chimique et relation structure / activité**

Le busulfan (diméthyl-sulfonyl-1,4-diméthane), du fait de ces deux groupements méthylsulfonates nucléophiles, est un bis-alkylant (**Figure 6**). Il réagit avec les acides nucléiques

(nucléophiles) pour former des ponts inter brins et des pontages ADN-protéines. Ces lésions induisent la mort cellulaire. A faible dose, il agit plus spécifiquement sur les cellules de la lignée granulocytaire alors qu'à forte dose son action se répercute sur l'ensemble des lignées hématopoïétiques avec un très bon passage au niveau du liquide céphalo-rachidien.

Le busulfan était initialement disponible uniquement sous forme orale. En 1999, la Food and Drug Administration (FDA) a approuvé la formulation IV.



**Figure 6.** Formule chimique du busulfan

## 2. Pharmacocinétique du busulfan

La pharmacocinétique (PK) du busulfan présente une grande variabilité interindividuelle, en particulier chez les enfants. De nombreuses études ont décrit les paramètres PK de cette molécule.

### a. Absorption

Chez l'adulte, la biodisponibilité du busulfan par voie orale montre une grande variation interindividuelle, s'étendant de 47 % à 103 % (moyenne 68 %). L'AUC et la concentration plasmatique maximale (C<sub>max</sub>) du busulfan sont corrélées de façon linéaire avec la dose administrée. Après administration par voie orale d'une unique dose de 2 mg de busulfan, l'AUC et la C<sub>max</sub> du busulfan étaient de respectivement 125 ± 17ng.h/ml et 28 ± 5 ng/ml. Un délai pouvant aller jusqu'à 2 heures entre l'administration du busulfan et sa détection dans le plasma a été rapporté.

Chez l'enfant, la variabilité PK du busulfan après administration par voie orale est bien documentée avec une biodisponibilité inter-patient qui peut varier d'un facteur cinq<sup>89</sup>.

La PK du busulfan IV, quant à elle, a été étudiée chez 124 patients adultes après l'administration sur quatre jours de 16 doses en perfusion de deux heures. Après perfusion IV de busulfan, la biodisponibilité est immédiate et complète. Les expositions plasmatiques, via l'AUC, sont comparables chez les patients adultes ayant reçu du busulfan oral et du busulfan IV respectivement aux doses de 1 mg/kg et 0,8 mg/kg.

La forme IV a permis de diminuer la variabilité PK entre les patients, et de résoudre les problèmes de biodisponibilité et de variabilité dans la phase d'absorption. Une analyse de PK de population effectuée sur 102 patients adultes indique une faible variabilité inter-patient (coefficient de variation (CV) = 21%) et intra-patient (CV = 12%) de l'exposition.

#### **b. Distribution**

Le busulfan est faiblement lié aux protéines plasmatiques. Le busulfan est réversiblement lié aux protéines plasmatiques à moins de 5% alors que 30% sont irréversiblement liés<sup>90</sup>.

Plusieurs modèles de population ont étudié la PK du busulfan. La majorité d'entre eux décrivent la PK du busulfan suivant un modèle mono-compartmental même si certains modèles bi-compartmentaux ont également été décrits<sup>91</sup>. Après perfusion IV, le volume de distribution correspond au compartiment aqueux de l'organisme, et la différence entre les adultes et les enfants correspond exactement à celle rapportée pour le volume d'eau totale. Ceci peut indiquer que malgré le caractère très lipophile du busulfan, il se distribue dans l'eau totale<sup>89,92</sup>. Le volume de distribution du busulfan (normalisé au poids corporel total) est plus élevé chez les enfants que chez les adultes<sup>93</sup>.

Le busulfan à fortes doses se distribue dans le liquide céphalo-rachidien ce qui explique sa toxicité au niveau du système nerveux central<sup>92,94</sup>.

#### **c. Elimination**

Le busulfan est métabolisé principalement par conjugaison au glutathion. Cette réaction est catalysée par les glutathion-S-transférases (GST) hépatiques. Aucun des métabolites ne semble

contribuer significativement à l'efficacité et à la toxicité. Les métabolites sont éliminés par voie rénale alors que la molécule mère est éliminée par voie biliaire.

GSTA1-1 est l'isoforme de GST prédominante qui catalyse la conjugaison du busulfan avec le glutathion<sup>95</sup>. Plusieurs polymorphismes génétiques ont été identifiés au niveau de la GSTA1. Cependant, les résultats sont contradictoires sur la relation entre ces polymorphismes génétiques et la clairance du busulfan. Le génotypage GST n'est pour le moment pas recommandé<sup>96</sup>.

La clairance moyenne du busulfan, normalisée au poids corporel total, chez les enfants a été estimée à 3.62 ml/min/kg. Cette valeur est plus élevée que celle observée chez les adultes. La différence n'est pas significative quand la clairance est normalisée à la surface corporelle<sup>94</sup>.

La variabilité interindividuelle au niveau de la clairance affecte l'exposition systémique du busulfan et impacte les résultats cliniques. Ce point sera abordé plus en détail plus loin dans le manuscrit. Cette variabilité peut être expliquée par plusieurs facteurs : âge, corpulence, pathologie, biodisponibilité, fonction hépatique et rythme circadien<sup>89,94,97,98</sup>.

#### **d. Variabilité pharmacocinétique du busulfan**

Plusieurs études ont rapporté la très grande variabilité inter-individuelle observée au cours des traitements par busulfan à haute dose. Différents facteurs peuvent expliquer en partie cette variabilité notamment l'âge et la pathologie, ainsi que certaines modifications de la fonction hépatique, la corpulence ou le rythme circadien.

- **Age**

Malgré l'administration de posologies identiques (rapportées au poids corporel) entre adultes et enfants, de nombreuses études ont conclu à une exposition systémique moindre chez les enfants comparativement aux adultes. Grochow *et al.*<sup>99</sup> ont montré que les enfants de moins de cinq ans ont une clairance moyenne multipliée par 2,2 et un volume de distribution multiplié par 2,4 par rapport aux adultes (études sur 21 enfants âgés de 2 mois à 5 ans). Hassan *et al.*<sup>100</sup> ont étudié la PK du busulfan parmi trois classes d'âge : enfants de moins de 5 ans, de 5 à 16 ans et patients de 16 à 50 ans. Ils rapportent une élimination plus rapide, des concentrations plasmatiques minimales, des concentrations plasmatiques à l'équilibre et des AUC plus faibles chez les enfants

en bas âge, alors que la clairance est augmentée. D'autres études, portant sur des classes d'âge variables concluent au même type de résultats :

- Regazzi *et al.*<sup>101</sup> : augmentation significative de la clairance chez les enfants de 6 mois à 13 ans par rapport aux enfants de 7 à 19 ans ;
- Hassan *et al.*<sup>89</sup> : clairance et volume de distribution plus élevés chez les enfants de 1,5 à 6 ans que chez les patients de 13 à 60 ans ;
- Baker *et al.*<sup>102</sup> : étude parmi 3 classes d'âge (moins de 10 ans, de 10 à 17 ans et plus de 18 ans) dans laquelle il a montré que les concentrations plasmatiques minimales, maximales et l'AUC étaient plus basses et la clairance et le volume de distribution plus élevés chez les patients les plus jeunes. Les différences sont significatives pour les trois classes d'âge ;
- Jacobson *et al.* : clairance plus élevée chez les enfants de moins de trois ans, AUC et concentration à l'équilibre plus faibles ;
- Sandstrom *et al.*<sup>103</sup> : clairance et volume de distribution plus élevés chez les enfants de 1,25 à 12 ans par rapport à des patients de 14 à 59 ans.

La différence entre les valeurs de clairance entre jeunes enfants et adultes tend à devenir moins significative (voire parfois non significative) lorsque la clairance est exprimée en fonction de la surface corporelle et non plus par rapport au poids. Gibbs *et al.*<sup>104</sup> suggèrent que l'augmentation de clairance observée chez l'enfant soit la conséquence d'une plus grande capacité de conjugaison du busulfan au glutathion via une augmentation de l'expression de la glutathion-S-transférase chez les enfants.

De façon contradictoire, Pawlowska *et al.*<sup>105</sup> ne concluent pas à une influence de l'âge sur le métabolisme du busulfan mais leur étude ne porte que sur des patients thalassémiques. De même, Bostrom *et al.*<sup>106</sup> n'ont pas retrouvé de relation significative entre l'âge et l'AUC chez des patients thalassémiques, atteints de déficits immunitaires ou de maladies métaboliques alors que cette relation existe dans le cas de patients leucémiques.

#### • Pathologie

Une étude réalisée chez des enfants greffés atteints de leucémie ou de maladies congénitales<sup>94</sup> montre que la PK du busulfan peut être influencée par la pathologie sous-jacente. Ainsi l'élimination du busulfan est significativement moins rapide chez les patients leucémiques (demi-

vie d'élimination augmentée et clairance diminuée). Aucune comparaison par rapport à des témoins n'est cependant disponible.

Bertholle *et al.* ont également montré une influence de la maladie sous jacente (maladie métabolique, hémoglobinopathie, hémopathie maligne ou déficit immunitaire) sur la PK du busulfan<sup>107</sup>. Si la constante d'absorption et le volume de distribution ne différaient pas parmi ces quatre sous groupes, la clairance était différente : elle était significativement plus grande chez les patients traités pour hémoglobinopathie et plus faible pour ceux traités pour un déficit immunitaire.

Dans une autre étude menée chez des patients atteints de thalassémie majeure, la glutathion-S-transférase alpha plasmatique (impliquée dans la métabolisation du busulfan) était augmentée d'un facteur 5 à 10 par rapport aux témoins. Cette augmentation est le reflet de l'atteinte hépatique et/ou de l'augmentation de l'expression de l'enzyme liée à la pathologie<sup>98</sup>. L'activité de cette enzyme est corrélée positivement avec la clairance du busulfan et négativement avec les concentrations maximales et minimales ainsi qu'avec les AUC obtenues. Ces résultats suggèrent un rôle de l'activité de la GST hépatique dans les différences PK inter-pathologies et la variabilité inter-individuelle globale observée dans la cinétique du busulfan.

### **3. Toxicité du busulfan**

Comme pour toute chimiothérapie anticancéreuse, les effets indésirables liés au busulfan sont nombreux<sup>108</sup>. A forte dose, le busulfan provoque une aplasie médullaire, cet effet myéloablatif est recherché lors de son utilisation dans les conditionnements pré-allogreffe.

#### Toxicité digestive

Les troubles digestifs (nausées, vomissements) sont nombreux. Les mucites peuvent être extrêmement douloureuses et invalidantes, nécessitant des antalgiques puissants et une nutrition parentérale.

#### Toxicité hépatique

La survenue d'une MVO est une complication grave. L'incidence de cette dernière a été corrélée à une sur-exposition systémique au busulfan administré par voie orale. Grochow *et al.* ont été les premiers à mettre en évidence un risque augmenté de MVO en cas d'AUC supérieure à 2012  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$  lors d'une première étude<sup>109</sup>. Ce seuil a ensuite été abaissée à 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$  dans une seconde étude<sup>110</sup>. En reprenant ce seuil de 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ , Dix *et al.*<sup>111</sup> aboutirent à la même conclusion et soulignent l'intérêt d'une diminution de la posologie de busulfan lorsque l'AUC estimée est élevée. Ils n'ont cependant pas pu mettre en évidence de diminution significative de l'incidence de MVO associée à l'adaptation de posologie, probablement du fait notamment des délais nécessaires à la réalisation des dosages plasmatiques de busulfan. Dans cette étude, la Cmax du busulfan n'a pas montré d'influence sur le risque de survenue de MVO.

### Toxicité neurologique

Les crises convulsives représentent une complication caractéristique pouvant survenir au décours du traitement par busulfan. Il s'agit le plus souvent de crises tonico-cloniques, généralement de courte durée et habituellement sans séquelles. Dans une étude portant sur 123 enfants ayant reçu du busulfan à la dose de 16 mg/kg ou de 600 mg/m<sup>2</sup>, Vassal *et al.*<sup>112</sup> suggèrent que cette neurotoxicité soit dose-dépendante : les concentrations plasmatiques ainsi que les concentrations retrouvées au niveau du liquide céphalo-rachidien (LCR) des enfants ayant reçu les plus fortes doses (jusqu'à 26,5 mg/kg, dose totale) sont significativement plus élevées qu'avec une posologie de 16 mg/kg.

L'incidence des crises convulsives était par ailleurs significativement plus élevée dans le groupe recevant la posologie de 600 mg/m<sup>2</sup>. La prophylaxie anticonvulsivante par clonazépam semblait efficace : aucun des enfants de cette étude ayant reçu ce traitement n'a présenté de convulsion. Ce traitement préventif est préféré à la phénytoïne ou au phenobarbital : contrairement aux autres antiépileptiques, le clonazépam ne présente pas d'interaction avec le métabolisme hépatique du busulfan.

### Toxicité pulmonaire

Le busulfan est impliqué dans la survenue d'une toxicité pulmonaire, le plus généralement de façon tardive (plus de 100 jours après la greffe). En cas d'atteinte précoce, cette toxicité peut

compliquer l'évolution d'une MVO, avec notamment un risque d'hémorragie pulmonaire. De survenue généralement plus tardive, l'atteinte la plus fréquente est une fibrose interstitielle diffuse : l'incidence moyenne est de l'ordre de 10%, toutes causes confondues (exposition au busulfan, au cyclophosphamide, à d'autres chimiothérapies ou après irradiation corporelle totale notamment en l'absence de cache pulmonaire). Ce diagnostic est souvent difficile à poser et se fait généralement après élimination d'autres causes potentielles. Des cas de bronchiolite oblitérante ont été décrits. Alors que l'étude de Paz *et al.*<sup>113</sup> suggère que le type de conditionnement pré-greffe (chimiothérapie uniquement ou en association avec une ICT) ne soit pas un facteur de risque dans la survenue d'une bronchiolite oblitérante mais que cette complication soit fortement liée au développement d'une maladie du greffon contre l'hôte, Ringdén *et al.*<sup>114</sup> concluent à un risque accru de bronchiolite oblitérante après utilisation du busulfan versus irradiation corporelle totale.

## **6. Suivi thérapeutique pharmacologique du busulfan**

### **1. Notions générales du suivi thérapeutique pharmacologique**

Le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) est une spécialité clinique multidisciplinaire dont l'objectif est d'améliorer les soins aux patients en mesurant les concentrations et en ajustant de manière individuelle la dose des médicaments pour lesquels l'expérience clinique ou les essais cliniques ont montré que cette pratique améliorerait la réponse, soit chez tous les patients, soit dans des populations particulières<sup>115</sup>. Le STP peut être fondé sur des informations pharmacogénétiques, biométriques ou cliniques *a priori* et/ou sur la mesure *a posteriori* des concentrations sanguines des médicaments (suivi PK) ou de marqueurs biologiques d'effets, intermédiaires ou cliniques (suivi pharmacodynamique (PD)).

En effet, tous les médicaments ne sont pas éligibles au STP, et en corollaire le STP n'est pas utile au suivi de tous les médicaments. Plusieurs critères sont nécessaires pour justifier d'un STP :

- Forte variabilité PK : la même dose administrée à plusieurs patients (variabilité inter-individuelle) ou plusieurs doses au même patient (variabilité intra-individuelle) sont associées à des concentrations et/ou des effets variables ;

- Médicament à marge thérapeutique étroite : la différence entre les concentrations sanguines minimales efficaces et les concentrations sanguines toxiques est faible ;
- Relation PK–PD établie : il est possible d'établir une valeur cible de concentration sanguine à atteindre qui soit reliée à un effet pharmacodynamique mesurable (clinique, survie, etc.) ;
- Médicament dosable : technique validée de mesure de concentration dans un liquide biologique du médicament.

En pratique, le STP consiste le plus souvent à mesure de la concentration du médicament dans le sang afin d'évaluer son efficacité au regard des concentrations sanguines cibles connues puis de pouvoir effectuer une adaptation posologique au besoin.

## 2. Cas du busulfan

### a. Relations PK-PD

On dispose aujourd'hui pour le busulfan de valeurs cibles d'exposition permettant d'optimiser la probabilité de prise de greffe tout en minimisant la toxicité. Cette cible d'AUC est représentée par l'intervalle compris entre 900 et 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ , initialement établie à partir des travaux d'Andersson *et al.*<sup>116</sup>. En effet, de nombreuses anciennes études, principalement sur le busulfan *per os*, ont démontré des relations entre une sur-exposition plasmatique  $> 1500 \mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$  et la survenue de toxicité<sup>109,117–120</sup>. Inversement une exposition caractérisée par une AUC  $< 900 \mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$  a été corrélée avec un risque de rejet de greffe et de rechute<sup>120–122</sup>. Cet intervalle cible d'AUC est reporté dans le Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP).

En 2016, Bartelink *et al.* ont publié une étude démontrant qu'une cible supérieure à celle traditionnellement utilisée serait optimale afin de minimiser la toxicité et augmenter la survie : 1190 – 1540  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ <sup>123</sup>.

### b. Posologie initiale

Le schéma posologique le plus fréquent du conditionnement par busulfan consiste en dose toutes les six heures pendant quatre jours (soit un total de 16 doses), quelques fois seulement trois voire

deux jours selon l'indication. Il existe également des schémas d'administration en une seule dose quotidienne, celle-ci étant multipliée par quatre afin d'atteindre des niveaux d'expositions quotidiens équivalents.

La première dose doit donc être efficace le plus vite vite possible afin de ne pas s'exposer trop précocement à un risque de sous- ou de surdosage difficile à corriger par la suite.

Les recommandations européennes actuelles se basent sur l'étude du fabricant du busulfan injectable de Nguyen *et al.*<sup>124</sup> ayant défini un nomogramme de posologie initiale en fonction du poids de l'enfant (**Tableau 6**) permettant d'optimiser la probabilité d'être dans l'intervalle cible dès la première dose.

**Tableau 6** Choix de la première dose de busulfan

<b>Poids du patient (kg)</b>	<b>Posologie de busulfan intraveineux (mg/kg)</b>
< 9	1
9 à 16	1,2
16 à 23	1,1
23 à 34	0,95
> 34	0,8

Malgré les relativement bons résultats présentés dans cette étude (74% des patients avec une AUC dans la cible d'après des simulations), de nombreuses autres équipes ont cherché à établir de nouvelles recommandations de posologies initiales, fondées sur des travaux de PK de population, souvent basées sur le poids ou la surface corporelle du patient<sup>125-129</sup>. A titre d'exemple, les autorités sanitaires américaines (FDA), préconisent seulement deux posologies initiales : 0,8 mg/kg pour les patients avec un poids > 12 kg et 1,1 mg/kg pour ceux ayant un poids ≤ 12 kg.

Récemment, McCune *et al.* ont développé un modèle PK de population afin de prédire la première dose du busulfan en fonction de l'âge et de la taille du patient avec des résultats sensiblement similaires à l'étude de Nguyen *et al.* avec 72% des AUC simulés dans l'intervalle cible<sup>91</sup>. La particularité de leur modèle était de prendre en compte le processus de maturation

infantile sur les paramètres de distribution et d'élimination du busulfan, par application de principes généraux publiés par Anderson et Holford<sup>130,131</sup>.

### c. Pratique du suivi thérapeutique du busulfan

Le STP s'effectue à l'aide de mesures de différentes concentrations mesurées dans le sang après la perfusion IV de busulfan. À partir de ces concentrations mesurées, l'AUC et l'adaptation posologique sont effectuées selon différentes manières. La première méthode, dite non-compartimentale, ne requière pas l'appui de la modélisation. Le principal inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite un nombre conséquent de prélèvements. L'AUC, tout comme les paramètres PK, sont directement des points expérimentaux ou obtenus par l'intermédiaire d'équations mathématiques simples permettant une approche descriptive des phénomènes. L'adaptation de dose, basée sur cette méthode de calcul de l'AUC, est effectuée par une approximation de la manière suivante :

$$Dose_n = Dose_{n-1} \times AUC_{cible} / AUC_{calculée}$$

avec  $Dose_n$  la prochaine dose à perfuser au patient,  $Dose_{n-1}$  la dose donnée avant les mesures plasmatiques,  $AUC_{cible}$  la valeur de l'AUC que l'on veut atteindre et  $AUC_{calculée}$  la valeur de l'AUC calculée à partir des concentrations plasmatiques du busulfan.

La seconde méthode est l'approche compartimentale et se base sur la modélisation. Les paramètres PK individuels du patient sont calculés en fonction des données de population (valeurs moyennes et dispersion de ces paramètres) et des mesures plasmatiques du médicament effectuées chez le patient par méthode Bayésienne. L'AUC pourra alors être calculé en fonction de valeurs individuelles des paramètres PK. Cette méthode a pour principal avantage de réduire significativement le nombre de prélèvements nécessaires pour estimer l'AUC<sup>132,133</sup>. Le STP est ensuite également effectué selon l'approche Bayésienne en estimant les paramètres PK de l'enfant<sup>134</sup>. Puis des simulations de posologies sont réalisées et l'AUC moyenne estimée sur l'ensemble du conditionnement est prédite en réponse à chaque dose testée. Au final, une dose individualisée permettant d'atteindre la cible peut alors être déterminée.

Aujourd'hui, un suivi thérapeutique sur la base des concentrations plasmatiques de busulfan est recommandé chez les enfants de moins de 9 kg<sup>135</sup> du fait d'une plus grande variabilité PK. L'observatoire national français du busulfan, créé en 2005 sous l'impulsion du professeur Gilles Vassal à l'Institut Gustave Roussy de Paris et en collaboration avec les laboratoires de pharmacologie de Necker, Marseille, Strasbourg, Lyon et Bordeaux avec l'objectif d'encadrer l'utilisation du busulfan, recommande quant à lui d'effectuer un ajustement posologique dans une population plus large :

- Patients avec un poids < 9kg,
- Patients présentant une cytolyse hépatique > 1,5N,
- Patients présentant une pathologie hépatique,
- Patients recevant une seconde greffe de CSH,
- Patients obèses (indice de masse corporelle > 25 kg/m<sup>2</sup>),
- Patients ayant précédemment reçu un traitement anti-CD33,
- Patients souffrant de l'une des pathologies suivantes : lymphohistiocytose, ostéopétrose, déficit immunitaire combiné sévère, maladie de surcharge.

Tous les enfants traités par busulfan au sein de l'IHOP bénéficient quant à eux de ce STP. La pratique du STP à l'IHOP est basée sur la méthode Bayésienne. La dose initiale est calculée selon les recommandations du fabricant<sup>124</sup>. Ensuite, deux prélèvements sanguins sont effectués 30 minutes et deux heures après la fin de la première perfusion IV du busulfan<sup>132</sup>. Les concentrations plasmatiques étaient mesurées par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) jusqu'en 2010<sup>136</sup> puis par chromatographie liquide couplée à une méthode de spectrométrie de masse<sup>136,137</sup>. Comme précédemment décrit, les paramètres PK individuels sont estimés à l'aide d'un modèle mono-compartmental<sup>107</sup> et utilisés pour calculer l'AUC et déterminer la dose maximisant la probabilité d'atteindre l'AUC cible sur l'ensemble du conditionnement.



# PARTIE EXPERIMENTALE : PRESENTATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE

---

Ce travail de thèse s'inscrit dans la problématique de l'optimisation des doses de busulfan chez les enfants recevant une allogreffe de CSH. En effet, si de très nombreux travaux ont été et continuent d'être publiés sur le busulfan, les toxicités liées au conditionnement de greffe restent un problème majeur. De plus, la réalisation et les modalités du STP restent hétérogènes et la posologie initiale est un champ d'optimisation potentielle.

**L'objectif de mes travaux est d'optimiser d'un point de vue pharmacocinétique le suivi thérapeutique du busulfan, dès la première dose et pendant tout le conditionnement, afin de maximiser la probabilité de prise de greffe et de minimiser les risques de toxicités liées à cette drogue.**

## 1. Problématique du suivi thérapeutique du Busulfan

Le busulfan est la molécule la plus utilisée dans les conditionnements de greffe de CSH en pédiatrie, notamment en raison de la forte toxicité de l'ICT chez l'enfant. Cependant le busulfan, de par sa marge thérapeutique étroite, reste un médicament difficile d'utilisation.

Une trop faible exposition est associée à risque de non prise de greffe et de rechute. Slattery *et al.* ont montré chez des patients greffés dans le cadre d'une leucémie myéloïde chronique que des concentrations plasmatiques de busulfan inférieures aux valeurs moyennes étaient associées à une augmentation du taux de rechute<sup>121</sup>. McCune *et al.* ont démontré que des valeurs d'AUC inférieures à 880  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$  augmentaient la probabilité de rejet de greffe<sup>120</sup>. Bartelink *et al.* ont défini la cible d'AUC optimale pour la survie sans événement et la survie globale entre 1100 et 1220  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ <sup>122</sup> en 2009, puis plus récemment en démontrant un taux de rechute et de rejet de greffe plus important pour les patients ayant présenté  $\text{AUC} < 1200 \mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ <sup>123</sup>

Inversement, une surexposition est corrélée à une augmentation du risque de complications (en particulier la MVO) et de mortalité. Dans l'étude de Grochow *et al.* de 1989, tous les patients ayant présenté une MVO avaient une AUC supérieure à la moyenne<sup>109</sup>, et 85% dans l'étude de Dix *et al.* avaient une  $\text{AUC} > 1500 \mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ <sup>117</sup>. Les patients avec une AUC supérieure à 1100  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$  dans l'étude de Ljungman *et al.* avaient une mortalité liée à la transplantation significativement augmentée (dont les causes étaient MVO, défaillances multi-organes, infections, GVH)<sup>118</sup>. Enfin dans l'étude de Geddes *et al.*, la mortalité non liée à une rechute était corrélée à une exposition du busulfan plus élevée ( $\text{AUC} > 1500 \mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ )<sup>119</sup>.

Aujourd'hui, même si certains recommandent des cibles d'exposition plasmatique différentes<sup>138</sup>, l'intervalle cible d'AUC entre 900 et 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$  (équivalent à 3,69 et 4,92  $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$ ) par dose, établi sur la base des études présentées ci-dessus, fait consensus.

Selon les recommandations du fabricant du busulfan IV, La dose initiale du busulfan est calculée en fonction du poids de l'enfant. En effet Nguyen *et al.* ont montré, à l'aide d'une étude PK de population, que la distribution et l'élimination du busulfan chez les enfants étaient dépendantes de leur poids (fonction non linéaire)<sup>124</sup>. Ainsi, un modèle basé sur le poids a permis de déterminer

cinq niveaux de posologies initiales (de 0,8 à 1,2 mg/kg) afin de maximiser la probabilité d'atteindre l'intervalle cible d'AUC. Les plus fortes doses sont dédiées aux enfants avec un poids compris entre 9 et 23 kg, alors qu'une approche conservatrice a été adoptée pour les enfants avec un poids < 9 kg (1 mg/kg) du fait des difficultés à recruter un nombre suffisamment important de ces patients dans les essais cliniques.

Après application de cette posologie initiale, le rôle du STP est donc de contrôler que l'exposition mesurée par l'AUC est dans la cible recommandée de 900-1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$  et d'adapter la posologie si l'exposition estimée s'écarte de l'intervalle cible. Le contrôle de l'exposition au busulfan est donc devenu un objectif majeur dans la prise en charge des conditionnements de greffe.

Malgré le contrôle de l'exposition, la toxicité continue d'être observée chez des patients, même quand l'AUC se trouve bien dans l'intervalle cible<sup>139-142</sup>. Ce sont ces observations qui sont à l'origine de notre questionnement sur le rationnel des valeurs limites de l'intervalle cible recommandé, notamment la valeur haute reliée à la toxicité.

Le STP du busulfan est effectué depuis de nombreuses années au sein de l'IHOP grâce à deux prélèvements sanguins après la première dose de busulfan réalisés à des temps optimaux afin d'obtenir le plus d'information sur la PK de la molécule chez l'enfant<sup>132</sup>. Puis, à l'aide d'un modèle PK de population<sup>143</sup> permettant de conjuguer les informations PK *a priori* (issu du modèle de population) et les informations *a posteriori* individuelles du patient (issues des résultats des deux dosages plasmatiques), les paramètres PK de l'enfant peuvent être estimés (constante de vitesse d'élimination et volume de distribution) par méthode Bayésienne<sup>134</sup>. À partir de ces estimations, des simulations de posologies sont réalisées et l'AUC moyenne estimée sur l'ensemble du conditionnement est prédite en réponse à chaque dose testée. Au final, une dose individualisée permettant d'atteindre la cible peut alors être déterminée.

L'AUC cible utilisée à l'IHOP est plus restreinte que celle recommandée, entre 980 et 1250  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ . L'hypothèse sous-jacente est qu'en restreignant les valeurs d'AUC autour de la médiane de l'intervalle cela nous permettrait de diminuer la toxicité, les rejets de greffe et les rechutes. Cette hypothèse est basée sur les données de la littérature montrant que malgré le contrôle de l'exposition, la toxicité continue d'être observée chez des patients, même quand

l'AUC se trouve bien dans l'intervalle cible standard de 900 à 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ <sup>139-142</sup>. Cependant, cette hypothèse n'a jamais été confirmée par une étude.

**L'objectif de ce premier travail était d'évaluer si l'atteinte d'un intervalle d'AUC du busulfan plus restreint était associée à une meilleure réponse clinique chez des patients recevant une greffe de CSH.**

ORIGINAL ARTICLE

## Should busulfan therapeutic range be narrowed in pediatrics? Experience from a large cohort of hematopoietic stem cell transplant children

M Philippe<sup>1,2</sup>, S Goutelle<sup>2,3,4</sup>, J Guillon<sup>2,5</sup>, X Fonrose<sup>6</sup>, C Bergeron<sup>1</sup>, P Girard<sup>7</sup>, Y Bertrand<sup>1</sup> and N Bleyzac<sup>1,2</sup>

Busulfan, the corner stone of hematopoietic stem cell transplantation regimens, has a narrow therapeutic window. Therapeutic drug monitoring (TDM)-guided dosing to reach the conventional area under the concentration–time curve (AUC) target range of 900–1500 µmol·min/L is associated with better outcomes. We report our experience with busulfan TDM in a large cohort of children. The aims were to investigate the relevance of using a more restricted therapeutic range and investigate the association between busulfan therapeutic range and clinical outcome. This study includes 138 children receiving 16 doses of intravenous busulfan, with the first dose assigned based on weight and doses adjusted to a local AUC target range of 980–1250 µmol·min/L. Busulfan TDM combined with model-based dose adjustment was associated with an increased probability of AUC target attainment, for both target range: 90.8% versus 74.8% for the conventional target range and 66.2% versus 43.9% for the local target range ( $P < 0.001$ ). The median follow-up was 56.2 months. Event-free survival was 88.5%, overall survival was 91.5% and veno-occlusive disease occurred in 18.3% of patients. No difference was observed for clinical outcomes depending on the selected target range. Pharmacokinetic monitoring and individualization of busulfan dosage regimen are useful in improving target attainment, but using a restricted target range has no impact on clinical outcomes.

*Bone Marrow Transplantation* (2016) 51, 72–78; doi:10.1038/bmt.2015.218; published online 21 September 2015

### INTRODUCTION

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is used for the treatment of various malignant and non-malignant hematological diseases.<sup>1,2</sup> Busulfan, an alkylating agent developed in the 1950s, is frequently included as part of a myeloablative therapy before HSCT. It has been increasingly used in conditioning protocols as an alternative to TBI, which is often poorly tolerated in children.<sup>3–5</sup> Busulfan has a narrow therapeutic index: low drug exposure is associated with increased risk of rejection and disease relapse in transplant recipients,<sup>6,7</sup> whereas high drug exposure is associated with toxicity (that is, veno-occlusive disease (VOD)), fatalities and overall poor outcome.<sup>8–10</sup> The exposure to busulfan is measured by the area under the concentration–time curve (AUC). Adjusting busulfan doses to achieve a target AUC has been shown to lead to improved patient outcome.<sup>11</sup> When busulfan is given four times a day, the conventional AUC<sub>0–24h</sub> target range is 900–1500 µmol·min/L, whatever the patient and disease characteristics. In the last decade, the use of oral busulfan, which was complicated by variable bioavailability, has been progressively replaced by that of the IV formulation.<sup>12–14</sup> However, data on the use of IV busulfan in children are limited and considerable inter-individual variability in busulfan exposure is still observed, especially in children.<sup>15–19</sup> Controlling patient exposure has become a major issue to improve efficacy and safety of busulfan-based conditioning. Busulfan therapeutic drug monitoring (TDM) is widely used to control the

AUC target attainment and to guide dose adjustment if necessary. However, toxic events are still observed in patients, even when busulfan AUC is within the target range.<sup>20–23</sup> These observations question the rationale of the so-called therapeutic range of IV busulfan.

The aims of this study were to report our experience with busulfan TDM in a large cohort of children, investigate the relevance of using a more restricted therapeutic range and investigate the association between busulfan therapeutic range and clinical outcome.

### MATERIALS AND METHODS

#### Patients

Data were retrospectively collected from medical records of patients who received IV busulfan in the Pediatric Hematology and Oncology Units of Lyon and Grenoble between June 2006 and August 2014, and underwent busulfan TDM. The information included patients' demographics, diagnoses, busulfan dosing history, busulfan plasma concentrations and clinical outcomes.

Depending on the underlying disease and recommended international treatment protocols, busulfan was used in combination with either cyclophosphamide, fludarabine, thiotepa, melphalan or etoposide. GvHD prophylaxis consisted in cyclosporine alone or combination with anti-thymocyte globulin in patients transplanted from unrelated donors. Anti-thymocyte globulin was also used in patients transplanted for sickle cell

<sup>1</sup>Hematology Department, Institute of Pediatric Hematology and Oncology, and Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; <sup>2</sup>Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR CNRS 5558, Université Lyon 1, Villeurbanne, France; <sup>3</sup>ESPE - Faculté de Pharmacie de Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France; <sup>4</sup>Service Pharmacologique, Groupement Hospitalier de Gériatrie, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; <sup>5</sup>Laboratoire de Ciblage Thérapeutique en Cancérologie, Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud, Pierre Bénite, France; <sup>6</sup>Laboratoire de Pharmacologie, University Hospital Centre, Grenoble, France and <sup>7</sup>Clinique de Pédiatrie, Hôpital Couple Enfant, University Hospital Centre, Grenoble, France. Correspondence: Dr N Bleyzac, Hematology Department, Institute of Pediatric Hematology and Oncology, and Hospices Civils de Lyon, 1 Place Joseph Renuat, Lyon 69008, France.

E-mail: nathalie.bleyzac@chu-lyon.fr

Received 23 March 2015; revised 4 August 2015; accepted 7 August 2015; published online 21 September 2015

anemia or thalassemia, to prevent graft rejection due to previous allo-immunization.

Patients received standard antiemetic drugs (ondansetron), gut decontamination and infection prophylaxis, prophylactic anticonvulsive therapy (donazepam during busulfan conditioning and 1 more month for patients with sickle cell disease) and VOD prophylaxis<sup>24</sup> (ursodeoxycholic acid and defibrotide in children with the following risk factors: pre-existing hepatic disease, second myeloablative transplant, diagnosis of primary hemophagocytic lymphohistiocytosis or prior treatment with gemtuzumab or azagamacin).

All patients were confined and cared for in high-efficiency, particle-free, air-filtered, positive-pressure isolation bedrooms.

The approval of an ethical committee was not needed for this observational study, in accordance with French legislation (French Public Health Code: Article R1121-2).

#### Busulfan dosage regimen, drug assay and pharmacokinetic analysis

M busulfan was administered four times a day for 4 days, as a 2-h infusion. Hence, each patient received a total of 16 busulfan IV infusions. The initial dose was calculated by using the manufacturer weight-based recommendations<sup>18</sup> presented in Table 1.

Before 2010, busulfan plasma concentrations were measured by HPLC with UV detection.<sup>25</sup> In 2010, the assay technique was changed and a cross-validated liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry method has been used since then. The liquid chromatography technique was derived from two methods.<sup>25,26</sup>

Two blood samples were drawn 0.5 and 2h after the end of the first infusion of busulfan in each patient. These sampling times were chosen according to optimal sampling theories.<sup>27</sup> Afterwards, individual pharmacokinetic (PK) parameter values of a one-compartment model<sup>28</sup> were estimated by using maximum *a posteriori* Bayesian modeling program included in the USC<sup>2</sup>PACK software.<sup>29</sup> Individual PK parameter estimated were used to perform subsequent estimation of busulfan plasma concentrations, calculation of the AUC after the initial dose (AUC<sub>0-0.5h</sub>) and determination of the future doses necessary to achieve an average target AUC<sub>0-24h</sub> for the rest of the regimen.

The AUC target range used in our center (980–1250 μmol/min/L) was historically more restricted than the conventional range. We started busulfan TDM before the actual and conventional range became available, following studies from Pierre Fabre Laboratories.<sup>11</sup> At this date, some pharmacokinetic studies on busulfan supported the use of a target range.<sup>30</sup> We used this target range while busulfan was only available as an oral form<sup>11</sup> and continued then when the IV form became available.

A dose adjustment was performed if the predicted average individual AUC<sub>0-24h</sub> over the entire therapy was outside the target range of 980–1250 μmol/min/L. The predicted average AUC<sub>0-24h</sub> was calculated as the total cumulative predicted AUC divided by the total number of doses (n = 16), based on the initial dose.

Busulfan plasma levels were measured only after the first dose, except in patients with thalassemia in whom concentrations were also measured on day 2, according to French recommendations.<sup>21</sup> In addition, a second busulfan monitoring was performed on day 2 in patients for whom a large dose adjustment (± 30% of the first dose) was necessary on the first day.

In order to assess the impact of busulfan TDM combined with model-based dose adjustment, we calculated and compared the AUC over the entire therapy based on the real, adjusted dosage regimen (adjAUC<sub>0-24h</sub>) and the simulated AUC if the initial dose would have been applied over the entire therapy, without any dose adjustment (AUC<sub>0-24h</sub>).

Table 1. Busulfan manufacturer dosing guidelines<sup>18</sup>

Patient weight (kg)	IV busulfan dose (mg/kg/dose)
< 9	1
9 to < 16	1.2
16 to < 23	1.1
23 to 34	0.95
> 34	0.8

#### Clinical evaluation

The main study endpoints were VOD-free survival at 1 month post transplantation and engraftment at months 1, 3 and 6. Chimerism ≥95% was considered as full donor engraftment, donor chimerism ≥10 and <95% was considered as partial engraftment, and graft rejection was defined as donor chimerism <10%. Event-free survival (EFS) and overall survival (OS) after HSCT were also evaluated for patients with a follow-up of at least 9 months. EFS was calculated from the time of transplant until death, relapse or graft failure, whichever occurred first. OS was the time between transplantation and death of any causes. VOD was diagnosed according to modified Seattle criteria.<sup>32</sup> Severity of VOD was assessed according to the system of Beaman.<sup>33</sup> VOD was the only toxicity endpoint studied.

#### Statistical analysis

The Kruskal–Wallis test was used to assess the possible differences between pharmacokinetic parameter values between the subgroups. The Student's *t*-test was used to assess the significance of bias and precision. Differences of proportions between groups were assessed using  $\chi^2$  Pearson's test. Association between busulfan exposure and endpoints (EFS, OS and VOD) were analyzed using univariate and multivariate Cox proportional hazards regression models, including the following:

- Body weight, stratified in five groups, corresponding on weight-based dosing<sup>18</sup>: < 9, 9–16, 16–23, 23–34 and > 34 kg;
- Disease, stratified in four groups (because of the small number of some of them): hematological malignant disease, hemoglobinopathies, solid malignant tumor and non-malignant disease. We also tested specific diseases known as VOD high risk: thalassemia and SCID;
- Use of defibrotide prophylaxis;
- Conditioning: test of each of the used drugs;
- Type of graft: genodetical allograft, phenodetical allograft or autologous;
- Stem cell sources: bone marrow, cord blood and peripheral blood stem cells;
- First dose AUC value: in or out the AUC target range (conventional and local);
- Total AUC value: in or out the AUC target range (conventional and local);
- Busulfan dose adaptation during the conditioning.

OS, EFS and VOD-free survival were estimated with the Kaplan–Meier method, and compared using a logrank test. All statistical analyses were performed by using SPSS for Windows (version 9.0, SPSS, Chicago, IL, USA).

## RESULTS

### Patient characteristics

A total of 138 patients treated between June 2006 and August 2014 were included in the study. Four children received two HSCT (three non-engraftments and one relapse post HSCT). Finally, 142 HSCT with busulfan-based conditioning were analyzed. Table 2 summarizes patient, disease and transplantation characteristics. Nineteen children received defibrotide (25 mg/kg/day) as VOD prophylaxis, because of individual risk factors.<sup>34</sup>

### TDM of busulfan

**Pharmacokinetic parameters.** Busulfan PK parameter values calculated by Bayesian estimation are summarized in Table 3. PK parameter distributions were not homogeneous according to weight ( $P < 0.001$ ).

**Achievement of target AUC and dose adjustment.** The mean estimated AUC without any dose adjustment (AUC<sub>0-24h</sub>) was 1115 ± 268 μmol/L min (range: 627–2341 μmol/L min). It was outside the conventional and local ranges in 25.2% and 56.1% of patients, respectively. A dose adjustment was performed after the first two doses of busulfan in 78 patients (56.1%). The dose was increased in 42 patients (mean increase: 15.8%, range: 2.0%–48.1%), whereas it was decreased in 36 patients (mean decrease: 18%, range: 1.7%–53.3%). Infants are statistically more

represented in the group with adjusted dose (19.8% vs 9.2%,  $P=0.038$ ). Patients with a dose decrease were statistically younger and were with a lower weight ( $4.5 \pm 4.3$  years,  $18.0 \pm 13.1$  kg) compared with patients with a dose increase ( $8.2 \pm 5.9$  years,  $28.3 \pm 18.4$  kg,  $P < 0.05$ ). Types of pathologies were equally displayed between the two groups.

Patient age (year), mean/median/range	6.5/5.0/0.17–21
Patient weight (kg), mean/median/range	23.6/17.7/3.2–87
No. of patients < 9 kg (%)	23 (16.2%)
<b>Diagnosis, no. of patients (%)</b>	
Hematological malignant diseases	72 (50.7)
Non-malignant diseases	30 (21.1)
Solid malignant tumors	17 (12.0)
Hemoglobinopathies	23 (16.2)
AML	43 (30.3)
ALL	13 (9.2)
SCID	12 (8.5)
Thalassemia	12 (8.5)
Neuroblastoma	11 (7.7)
Sickle cell anemia	11 (7.7)
MDS	8 (5.6)
Lymphohistiocytosis	4 (2.8)
SAA	3 (2.1)
Lymphoma	3 (2.1)
Ewing sarcoma	3 (2.1)
Others	19 (13.4)
<b>HLA compatibility, no. of patients (%)</b>	
Matched related	57 (40.1)
Mismatched related	2 (1.4)
Matched unrelated	18 (12.7)
Mismatched unrelated	47 (33.1)
Autologous	18 (12.7)
<b>Stem cell sources, no. of patients (%)</b>	
Bone marrow	92 (64.8)
Cord blood	29 (20.4)
PBSC	21 (14.8)
<b>Conditioning regimen, no. of patients (%)</b>	
Bu Cy	79 (55.6)
Bu Cy Mel	2 (1.4)
Bu Cy VP16	4 (2.8)
Bu Cy Thio	5 (3.5)
Bu Flu	22 (15.5)
Bu Flu Cy	1 (0.7)
Bu Flu Thio	11 (7.7)
Bu Thio	3 (2.1)
Bu Thio VP16	1 (0.7)
Bu Mel	14 (9.9)
Abbreviations: Bu = busulfan; Cy = cyclophosphamide; Flu = fludarabine; MDS = myelodysplastic syndrome; Mel = melphalan; SAA = severe aplastic anemia; Thio = thiotopaz; VP16 = etoposide.	

In the overall population ( $n=142$ ), the mean predicted AUC after model-based dose adjustment ( $\text{adjAUC}_{16}$ ) was  $1105 \pm 163$   $\mu\text{mol/L min}$  (range: 651–2122  $\mu\text{mol/L min}$ ). Ninety-four patients had  $\text{adjAUC}_{16}$  within our local AUC target range (66.2%), 24 had  $\text{adjAUC}_{16}$  below (16.9%) and 24 had  $\text{adjAUC}_{16}$  above (16.9%). One hundred and twenty-nine patients had  $\text{adjAUC}_{16}$  within the conventional AUC target range (90.8%), 11 had  $\text{adjAUC}_{16}$  below (7.8%) and 2 had  $\text{adjAUC}_{16}$  above (1.4%). There was no significant difference in the characteristics of patients having  $\text{adjAUC}_{16}$  below or above the target range (data not shown).

Table 4 and Figure 1 show the proportion of  $\text{AUC}_{\text{dose1}}$ ,  $\text{AUC}_{16}$  and  $\text{adjAUC}_{16}$  within the target range. Busulfan TDM combined with model-based dose adjustment was associated with an increased probability of AUC target attainment, for both target range: 90.8% versus 74.8% for the conventional target range, 66.2% versus 43.9% for the local target range ( $P < 0.001$ ,  $\chi^2$  Pearson's test). These results are similar for the children who weighed < 9 kg. Of note, the proportion of  $\text{adjAUC}_{16}$  within the local target range was significantly lower in patients with thalassemia (75%) than in patients with other diseases (92%,  $P=0.047$ ).

#### Clinical outcomes

The median follow-up was 56.2 months (range: 9–106 months). EFS was 88.5%, VOD-free survival was 81.7% and OS was 91.5%.

Data on engraftment are summarized in Table 5. Non-engraftment occurred in six children:

- Five non-malignant diseases: two SCID, one severe aplastic anemia, one adrenoleukodystrophy and one lymphohistiocytosis.
- One hematological malignant disease: juvenile myelomonocytic leukemia.

Mixed chimerism occurred in 19 children (at month 6):

- Eleven hemoglobinopathies (6 thalassemia and 5 sickle cell diseases).
- Seven non-malignant diseases (three SCID, one congenital neutropenia, one adrenoleukodystrophy, one metabolic disease and one diamond blackfan anemia).
- One chronic myelomonocytic leukemia.

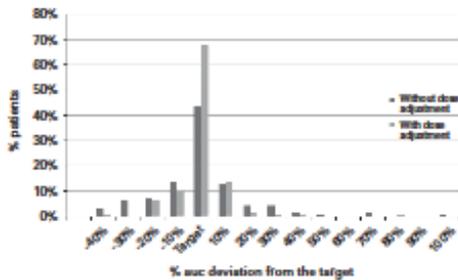
All received a graft from a mismatched unrelated donor (four cord blood and two bone marrow). VOD occurred in 26 patients (18.3%). Data on VOD are summarized in Table 6. Severity of VOD was mild, moderate and severe in 6 (4.2%), 18 (12.7%) and 2 (1.4%) patients, respectively (3 patients who experienced VOD received defibrotide for VOD prophylaxis). AML was the most frequent disease in patients with VOD (31%). The average time of VOD onset was 14 days (minimum 1 and maximum 29). Two children died from VOD (none of them received prophylactic defibrotide). No busulfan-related neurological toxicity was observed.

	Mean $\pm$ s.d.					
	All (n = 142)	< 9 kg (n = 23)	9 to < 16 kg (n = 42)	16 to < 23 kg (n = 24)	23 to 34 kg (n = 18)	> 34 kg (n = 35)
Clearance (L/h/kg)	0.23 $\pm$ 0.06	0.24 $\pm$ 0.07	0.25 $\pm$ 0.05	0.23 $\pm$ 0.06	0.24 $\pm$ 0.05	0.20 $\pm$ 0.04
Volume of distribution (L/kg)	0.62 $\pm$ 0.07	0.62 $\pm$ 0.07	0.64 $\pm$ 0.06	0.62 $\pm$ 0.05	0.63 $\pm$ 0.08	0.60 $\pm$ 0.06
Elimination half-life (h)	1.97 $\pm$ 0.43	1.88 $\pm$ 0.49	1.84 $\pm$ 0.33	2.02 $\pm$ 0.54	1.86 $\pm$ 0.24	2.19 $\pm$ 0.42
$\text{AUC}_{\text{dose1}}$ ( $\mu\text{mol/L min}$ )	1007 $\pm$ 215	951 $\pm$ 195	1117 $\pm$ 217	1078 $\pm$ 229	912 $\pm$ 141	900 $\pm$ 154
$\text{adjAUC}_{16}$ ( $\mu\text{mol/L min}$ )	1105 $\pm$ 163	1085 $\pm$ 151	1132 $\pm$ 149	1137 $\pm$ 237	1027 $\pm$ 124	1107 $\pm$ 139

**Table 4.** Achievement of AUC target range

	% Achievement of target AUC (% below; % above)	
	Conventional target range 900–1500 µmol/min/L	Local target range 980–1250 µmol/min/L
<b>AUC<sub>0-24h</sub></b>		
Overall (n = 142)	67.6 (29.5, 2.9)	43.9 (43.2, 12.9)
< 9 kg (n = 23)	56.2 (43.8, 0)	34.8 (52.2, 13)
<b>AUC<sub>1-6</sub></b> <sup>a</sup>		
Overall (n = 142)	74.8 (18.0, 7.2)	43.9 (30.2, 25.9)
< 9 kg (n = 23)	69.6 (30.4, 0)	26.1 (47.8, 26.1)
<b>adjAUC<sub>1-6</sub></b> <sup>b</sup>		
Overall (n = 142)	90.8 (7.8, 1.4)	66.2 (16.9, 16.9)
< 9 kg (n = 23)	82.6 (17.4, 0)	56.4 (21.8, 21.8)

Abbreviation: AUC = area under the concentration-time curve. <sup>a</sup>Comparison of AUC<sub>1-6</sub> and adjAUC<sub>1-6</sub> for conventional and local target range (overall and < 9 kg). <sup>b</sup> $\chi^2$  Pearson's test: statistically significant ( $P < 0.001$ ).



**Figure 1.** Mean total AUC deviation from the local target range (980–1250 µmol/min/L).

Relationship between busulfan exposure and clinical outcome  
Tables 5 and 7 show the achievement of target AUC in relation to various clinical outcomes.

No difference in percentage of target attainment rate (local or conventional) was observed among chimerism groups (full, partial or rejection) and study periods (1, 3 and 6 months).

No difference in adjAUC<sub>1-6</sub> was observed according to VOD (1127 ± 134 and 1100 ± 171 µmol/min/L,  $P = 0.57$ ) or full engraftment (1117 ± 144 and 1110 ± 256 µmol/min/L,  $P = 0.87$ ). Among the patients with no full donor engraftment at 1 month ( $n = 22$ ), only 2 (9.1%) had an adjAUC<sub>1-6</sub> < 900 µmol/min/L. All patients with VOD had an adjAUC<sub>1-6</sub> < 1500 µmol/min/L.

The rates of mixed chimerism (34.0% vs 1.1%,  $P < 0.01$ ) and rejection (9.4% vs 1.1%,  $P = 0.02$ ) were higher in patients with non-malignant diseases than in patients with malignancies.

In multivariate Cox regression analysis, only one risk factor, body weight < 9 kg, significantly influenced the onset of VOD (relative risk = 3.3, IC<sub>95%</sub> 1.1–10.6). No correlation was found between AUC (AUC<sub>0-24h</sub> and adjAUC<sub>1-6</sub>) and VOD.

Twenty-eight patients had an adjAUC<sub>1-6</sub> within the bounds of the conventional and out of the bounds of the local AUC target range (that is, AUCdiff = 900–980 µmol/min/L or 1250–1500 µmol/min/L). No difference was observed between these patients and patients with an adjAUC<sub>1-6</sub> within the local AUC target range for OS ( $P = 0.87$ ) and VOD-free survival ( $P = 0.85$ ).

**Table 5.** Engraftment: percentage of donor chimerism at day 30, 60 and 90 post transplantation and corresponding percentage of target attainment

	Engraftment		
	Day 30	Day 60	Day 90
Patients (n)	116	98	91
% Full donor chimerism	80.2	81.6	80.2
Conventional/local PTA <sup>a</sup>	93.5/66.7	92.5/67.5	93.2/68.5
% Mixed donor chimerism	14.6	18.4	19.8
Conventional/local PTA <sup>a</sup>	88.2/70.6	88.9/66.7	83.3/61.1
% Rejection	5.2	0	0
Conventional/local PTA <sup>a</sup>	80.0/60.0	—	—

Abbreviation: PTA = percentage of target attainment for AUC<sub>1-6</sub>. <sup>a</sup>The  $\chi^2$  Pearson's test: there was no significant difference in the percentage of target attainment.

Relapses occurred in 15.7% of patients with malignancies. There was a higher probability of relapse for patients with an adjAUC<sub>1-6</sub> below the conventional AUC target range (< 900 µmol/min/L, 42.9%) than for patients with an adjAUC<sub>1-6</sub> within the conventional AUC target range (13.4%,  $P = 0.04$ ).

**DISCUSSION**

The conditioning regimen before HSCT aims at facilitating engraftment and eradicating malignant disease, but it may be associated with toxicity. Indeed, busulfan has a narrow therapeutic index. In addition, busulfan displays large inter-individual PK variability. This variability is partly explained by several factors such as age, underlying disease, liver status and genetic polymorphisms of glutathione S-transferase.<sup>17,20,34–36</sup> Since the early 2000s, the use of the intravenous formulation of busulfan has been associated with less inter- and intra-individual variability in busulfan exposure than the use of the oral formulation. However, this study confirms that significant variability is still observed with IV busulfan, which need to be controlled in order to prevent under- and overdosing.

Controlling drug exposure allows optimizing myeloablation and managing toxicity: based on a large experience in adults and adolescents, a standard therapeutic AUC range of 900–1500 µmol/min/L/dose has been defined.<sup>7–10,27</sup> Low drug exposure has been associated with increased risk of graft rejection or relapse,<sup>6,7</sup> whereas high drug exposure has been associated with increased toxicity.<sup>8–10</sup> Achieving this target seems to provide a higher rate of successful engraftment and a lower incidence of VOD. Nguyen et al.<sup>18</sup> have shown that IV busulfan clearance correlates with childrens' body weights, but in a nonlinear manner. This finding led to the development of a weight-based dosing nomogram in children who has then been approved in Europe.<sup>18</sup> Simulations based on the nonlinear weight-based dosing strategy from Nguyen and colleagues predicted a 75% probability of achieving the target AUC range of 900–1500 µmol/min/L/dose, which was significantly better than various other dosing methods. Since then, several clinical studies have confirmed this finding, with proportion of AUC target achievement ranging from 71.2% to 78% when using this dosing strategy.<sup>19,22,38,39</sup> In our study, if no dose adjustment had been performed, it was predicted that the mean AUC<sub>1-6</sub> would have been in the conventional target range in 74.8% of patients, which is also consistent with previous published studies. This means that one out of four patients might experience busulfan under- or overdosing if the recommended dosage regimen is used over the entire therapy, without any dose adjustment.

**Table 6. Patients' characteristics with VOD**

ID	Age	BW (kg)	Indication	Disease classification	Conditioning	DF prophylaxis
1	12.0	8.7	AML	Hematological malignant disease	Bu Cy ATG	N
2	5.0	15.1	ALL	Hematological malignant disease	Flu Bu ATG	N
3	2.0	11.3	JMML	Hematological malignant disease	Bu Cy Mel	N
4	3.0	15.1	Thalassemia	Hemoglobinopathy	Bu Cy ATG	N
5	3.0	13.1	ALL	Hematological malignant disease	Flu Bu Thio	N
6	0.0	7.9	ALL	Hematological malignant disease	Bu Cy VP16	N
7	2.0	15.4	AML	Hematological malignant disease	Bu Cy ATG	N
8	1.0	7	JMML	Hematological malignant disease	Bu Cy ATG	N
9	19.0	54.4	AML	Hematological malignant disease	Bu Cy	N
10	15.0	55.6	CML	Hematological malignant disease	Bu Cy	N
11	13.0	28.7	Sickle Cell	Hemoglobinopathy	Bu Cy ATG	N
12	0.0	8	AML	Hematological malignant disease	Bu Cy	N
13	21.0	6.0	AML	Hematological malignant disease	Bu Cy ATG	N
14	12.0	28.9	SCD	Non-malignant disease	Flu Bu ATG	N
15	9.0	36.7	Thalassemia	Hemoglobinopathy	Bu Cy ATG	N
16	14.0	39.8	AML	Hematological malignant disease	Bu Cy ATG	N
17	1.0	7.7	Neuroblastoma	Solid malignant tumor	Bu Mel	N
18	2.0	1.0	Neuroblastoma	Solid malignant tumor	Bu Mel	Y
19	2.0	10.175	AML	Hematological malignant disease	Bu Cy ATG	N
20	1.0	7.67	LH	Non-malignant disease	Bu Cy VP16	Y
21	13.0	4.0	AML	Hematological malignant disease	Bu Cy Thio ATG	N
22	10.0	25.8	MDS	Hematological malignant disease	Flu Bu Thio ATG	N
23	1.0	5.8	ALL	Hematological malignant disease	Bu Cy Mel	N
24	2.0	11.8	ALL	Hematological malignant disease	Flu Bu Thio	N
25	3.0	14.8	Sickle cell	Hemoglobinopathy	Bu Cy ATG	N
26	0.0	4.56	LH	Non-malignant disease	Bu Cy VP16	Y

Abbreviations: ATG=antithymocyte globulin; BW=body weight; Cy=cyclophosphamide; DF=defibrotide; Flu=fludarabine; LH=lymphohyctocytosis; MDS=myelodysplastic syndrome; Mel=melphalan; N=no; Thio=thiotepa; VOD=veno-occlusive disease; VP16=etoposide; Y=yes.

**Table 7. Achievement of target AUC<sub>16</sub> according to the outcome**

Event	% Achievement of target AUC		
	Yes	No	P-value
Full engraftment at 1 month	93.5	86.4	0.439
VOD	88.5	91.4	0.413

Abbreviations: adjAUC<sub>16</sub>=conventional target range; AUC=area under the concentration-time curve; VOD=veno-occlusive disease.

It has been suggested that the ability to achieve the busulfan AUC target range can be improved by using TDM. In the study of Malär *et al.*,<sup>21</sup> 62% of patients achieved the AUC target interval of 9000–12 000 ng/mL/h (busulfan was administered twice daily as a 4-h infusion) using the above weight-based nomogram and TDM (dose adjustment was assessed after the first dose), whereas only 26% of patients had achieved the AUC target range after the first dose. In two other studies, TDM performed between the first and the ninth dose was associated with more patients with AUC within the target range (increase from 19%<sup>40</sup> to 22%). Dose adjustment based on TDM results was necessary to achieve the target AUC range in 40%–68% of patients.<sup>21,25,35,40–42</sup> In our study, the influence of TDM combined with model-based dose adjustment on the attainment of the conventional AUC target range was very significant. The proportion of target attainment for adjAUC<sub>16</sub> was 90.8%, compared with only 74.8% if the manufacturer dosing schedule would have been applied throughout the therapy. We found a similar impact of TDM on the proportion of patients achieving AUC<sub>16</sub> within the local target range (66.2% vs 43.9%).

Bleyzac *et al.*<sup>41</sup> showed that TDM combined with model-based adjustment of busulfan dose regimens could improve clinical outcome in HSCT children. In our study, OS was 91.5%. In other

studies, with a smaller number of children than our cohort, OS was lower (from 70% to 83%<sup>40,42,43</sup>). Only one study reported a rate of OS as high as ours (91% at day +100).<sup>35</sup> Less than 5% of allografted patients had no engraftment. This is consistent with previous studies that reported engraftment of 90%–100%.<sup>17,22,40,43</sup> Our results confirm the importance of TDM to enhance engraftment. Moreover, in our center, almost all children have reached the conventional AUC target range, because TDM is realized very soon, so that dose adjustment can be performed early if necessary (third dose). As literature review has clearly demonstrated, we can consider the AUC target range as clinically relevant despite these results.

In our clinical practice, an AUC target range narrower than the conventional one has been used for years. It was assumed that such a target range could optimize the graft outcome. However, no difference related to clinical outcomes was observed between patients within the local AUC target range and those within the AUCdiff target range (that is, 900–980 or 1250–1500 µmol min/L). This suggests that a more restrictive AUC target range around the median seems not to be relevant to improve clinical outcomes.

In this study, 18.3% of patients experienced VOD, but only 7.7% of those VOD were severe. These results are consistent with those recently published.<sup>21–23,35,39,40,42</sup> Age and/or weight have been found to be risk factors of VOD.<sup>21,44,45</sup> PK and pharmacodynamics of drugs in infants can differ widely between children and adults, owing to developmental changes in physiological and metabolic processes, which may alter drug disposition.<sup>46,47</sup> In the study of Nguyen *et al.*,<sup>18</sup> only four patients weighed <9 kg (16.7%) and none weighed <7.1 kg. This raises questions about the adequacy of the recommended dose in this group of very young children. The simulation study analysis<sup>18</sup> demonstrated that this fixed dose enabled only 54% of infants to achieve the target AUC range (vs 75% of target achievement in children >10 kg). Other studies have confirmed these poor results, which are probably due to a higher inter-individual PK variability of busulfan in infants

compared with older children.<sup>19,20,22,24,48</sup> Savic et al.<sup>50</sup> proposed a model-dosing strategy based on age for infants and children weighing  $\leq 12$  kg, to achieve a target of 900–1250  $\mu\text{mol min/L}$ .<sup>49</sup> According to their model, a 1.7-fold increase in busulfan clearance would occur between the ages of 6 weeks and 2 years. Busulfan is largely metabolized by glutathione S-transferase. The maturation of glutathione S-transferase enzyme activity seems to be the main determinant of this age-dependent clearance change in the first 2 years of life.<sup>46,49,51</sup> In our study, we found that children < 9 kg are approximately three times more likely to develop VOD.

To adequately manage the risk of VOD, the relevance of AUC as marker of this toxicity may be questioned. In previous clinical studies using the IV formulation of busulfan in children, no relationship could be found between busulfan AUC and the occurrence of VOD.<sup>19–22,23,49,42</sup> Our study results are in agreement, as all patients with VOD showed an AUC < 1500  $\mu\text{mol min/L}$ . However, even if no statistically significant correlation was found between VOD incidence and AUC (% of target range achievement or mean AUC), we have to be cautious with these results because of the little proportion of VOD in our cohort. Other criteria than AUC as potential predictor of VOD should be explored.

**CONCLUSION**

In conclusion, our findings indicate that TDM allows increasing the proportion of AUC within the target range and that all children should benefit from TDM. However, using a restricted busulfan AUC target range has no superior impact on clinical outcomes compared with using the conventional AUC target range. It could be due to the lack of AUC relevance, especially for VOD. Another more specific PK criterion should be studied to predict efficacy and safety.

**CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

**REFERENCES**

- 1 Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, Saral R, Beschoner WE, Blas WB et al. Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N Engl J Med* 1983; **309**: 1347–1353.
- 2 Schuler US, Renner UD, Woschinsky F, Johna C, Jenka A, Naumann R et al. Intravenous busulfan for conditioning before autologous or allogeneic human blood stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2001; **114**: 944–950.
- 3 Cohen A, Békássy AN, Galero A, Faraci M, Zecca S, Tichelli A et al. Endocrinological late complications after hematopoietic SCT in children. *Bone Marrow Transplant* 2009; **41**: 543–548.
- 4 Faraci M, Batta S, Cohen A, Lanino E, Grisdia F, Milano M et al. Very late nonfatal consequences of fractionated TB in children undergoing bone marrow transplant. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; **63**: 1568–1575.
- 5 Faraci M, Békássy AN, De Fazio V, Tichelli A, Dini GEBMT Paediatric and Late Effects Working Parties. Non-endocrine late complications in children after allogeneic haematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2008; **41**: 549–557.
- 6 McCune JS, Godoy T, Gibbs JP, Sanders JE, Petersdorf BW, Appelbaum FR et al. Busulfan concentration and graft rejection in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; **30**: 167–173.
- 7 Sletteny JT, Sanders JE, Budtner CD, Schaffer RL, Lambert KW, Langer FP et al. Graft rejection and toxicity following bone marrow transplantation in relation to busulfan pharmacokinetics. *Bone Marrow Transplant* 1995; **16**: 31–42.
- 8 Copelan EA, Bichsel TP, Avalos BR, Eder PJ, Ezzone SA, Scholl MD et al. Busulfan levels are influenced by prior treatment and are associated with hepatic veno-occlusive disease and early mortality but not with delayed complications following marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; **27**: 1121–1124.
- 9 Grochow LB, Jones RJ, Brundrett RB, Braine HG, Chan TL, Saral R et al. Pharmacokinetics of busulfan: correlation with veno-occlusive disease in patients undergoing bone marrow transplantation. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; **25**: 55–61.

- 10 Dir SP, Wingard JR, Mullins RE, Jankovic I, Davidson TG, Gilmore CE et al. Association of busulfan area under the curve with veno-occlusive disease following BMT. *Bone Marrow Transplant* 1996; **17**: 225–230.
- 11 Bloyzac N, Souillet G, Magron P, Janoly A, Martin P, Bertrand Y et al. Improved clinical outcome of paediatric bone marrow recipients using a test dose and Bayesian pharmacokinetic individualization of busulfan dosage regimens. *Bone Marrow Transplant* 2001; **28**: 743–751.
- 12 De Lima M, Coufal D, Thall PF, Wang X, Madden T, Jones R et al. Once-daily intravenous busulfan and flutamide clinical and pharmacokinetic results of a myeloblastic, reduced-toxicity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in AML and MDS. *Blood* 2004; **104**: 857–864.
- 13 Gaddes M, Kangaroo SB, Naveed F, Quinlan D, Chaudhry MA, Stewart D et al. High busulfan exposure is associated with worse outcomes in a daily IV busulfan and flutamide allogeneic transplant regimen. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; **14**: 220–228.
- 14 Hassan M, Ljungman P, Bdrme F, Ringdén O, Sprácková Z, Békássy A et al. Busulfan bioavailability. *Blood* 1994; **86**: 2144–2150.
- 15 Andersson BS, Thall PF, Madden T, Coufal D, Wang X, Tran HT et al. Busulfan systemic exposure relative to regimen-related toxicity and acute graft-versus-host disease: defining a therapeutic window for IV Busulfan in chronic myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; **8**: 477–485.
- 16 Cremas S, Schoemaker R, Bredius R, den Hartogh J, Ball L, Twiss J et al. Pharmacokinetics of intravenous busulfan in children prior to stem cell transplantation. *Br J Clin Pharmacol* 2002; **58**: 386–389.
- 17 Tran H, Petropoulos D, Worth L, Mullen CA, Madden T, Andersson B et al. Pharmacokinetics and individualized dose adjustment of intravenous busulfan in children with advanced hematologic malignancies undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; **10**: 805–812.
- 18 Nguyen L, Fuller D, Lennon S, Lager F, Puzozzo C. IV busulfan in pediatrics: a novel dosing to improve safety/efficacy for hematopoietic progenitor cell transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant* 2004; **33**: 979–987.
- 19 Vassal G, Michel G, Espérou H, Genot JC, Valteau-Couanet D, Duc F et al. Prospective validation of a novel IV busulfan fixed dosing for paediatric patients to improve therapeutic AUC targeting without drug monitoring. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; **61**: 113–123.
- 20 Zvonilov J, Bredius RGM, Cremas SCLM, Ball LM, Lankester AC, Trape-Twiss IM et al. Intravenous busulfan in children prior to stem cell transplantation: study of pharmacokinetics in association with early clinical outcome and toxicity. *Bone Marrow Transplant* 2005; **35**: 17–23.
- 21 Mallé R, Spö F, Rentsch K, Hassan M, Güngör T. Therapeutic drug monitoring is essential for intravenous busulfan therapy in pediatric hematopoietic stem cell recipients. *Pediatr Transplant* 2011; **15**: 580–588.
- 22 Michel G, Valteau-Couanet D, Genot JC, Espérou H, Sodé G, Michineau F et al. Weight-based strategy of dose administration in children using intravenous busulfan: Clinical and pharmacokinetic results. *Pediatr Blood Cancer* 2012; **58**: 90–97.
- 23 Tesfaye H, Branova R, Klaplova E, Prusa R, Janecikova D, Rihá P et al. The importance of therapeutic drug monitoring (TDM) for parenteral busulfan dosing in conditioning regimen for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children. *Ann Transplant* 2014; **19**: 214–224.
- 24 Dignan FL, Wynn RF, Hadzik N, Kazani J, Quaglin A, Progluca A et al. BCSH/BSMT guideline: diagnosis and management of veno-occlusive disease (sinusoidal obstruction syndrome) following haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2013; **163**: 444–457.
- 25 Bloyzac N, Barou P, Aulagnier G. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for busulfan assay in plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000; **742**: 427–432.
- 26 Dos Reis ED, Manna-Jorge R, Suarez-Kurtz G, Lima EL, da S, Azevedo D de A. Development of a rapid and specific assay for detection of busulfan in human plasma by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005; **19**: 1666–1674.
- 27 D’Argenio DZ. Optimal sampling times for pharmacokinetic experiments. *J Pharmacokinetics Biopharm* 1981; **9**: 739–756.
- 28 Bertholle-Bonnet V, Bloyzac N, Galamban C, Mikbu V, Bertrand Y, Souillet G et al. Influence of underlying disease on busulfan disposition in pediatric bone marrow transplant recipients: a nonparametric population pharmacokinetic study. *Ther Drug Monit* 2007; **29**: 177–184.
- 29 Jelliffe RW. The USC\*PACK PC programs for population pharmacokinetic modeling, modeling of large kinetic/dynamic systems, and adaptive control of drug dosage regimens. *Proc Annu Symp Comput Appl Med Care* 1991: 922–924.
- 30 Tran HT, Madden T, Petropoulos D, Worth LL, Felix EA, Sprigg-Sanz HA et al. Individualizing high-dose oral busulfan: prospective dose adjustment in a pediatric population undergoing allogeneic stem cell transplantation for advanced hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplant* 2000; **26**: 463–470.

- 31 Galambun C, Pondani C, Bertrand Y, Louadou A, Bardigoni P, Frange P et al. French multicenter 22-year experience in stem cell transplantation for beta-thalassemia major: lessons and future directions. *Bol Blood Marrow Transplant* 2013; **19**: 62–68.
- 32 McDonald GB, Hinds MS, Fisher LD, Schoch HG, Wolford J, Bana J et al. Veno-occlusive disease of the liver and multiorgan failure after bone marrow transplantation: a cohort study of 355 patients. *Ann Intern Med* 1993; **118**: 255–267.
- 33 Baaman S. The syndrome of hepatic veno-occlusive disease after marrow transplantation. *Blood* 1995; **85**: 3005–3020.
- 34 Nath CE, Shaw PJ. Busulfan in blood and marrow transplantation: dose, route, frequency and role of therapeutic drug monitoring. *Curr Clin Pharmacol* 2007; **2**: 75–91.
- 35 Schachter T, Finkelshtain Y, Doyle J, Varje Z, Moretti M, Koren G et al. Pharmacokinetic disposition and clinical outcomes in infants and children receiving intravenous busulfan for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bol Blood Marrow Transplant* 2007; **13**: 307–314.
- 36 Zrawling J, dan Harigh J, Lankester AC, Guchelaar HJ, Egeler RM, Brodus RG et al. Onco-daily intravenous busulfan in children prior to stem cell transplantation: study of pharmacokinetics and early clinical outcomes. *Anticancer Drugs* 2006; **17**: 1099–1105.
- 37 Ljungman P, Hassan M, Békássy AN, Ringdén O, Öberg G. High busulfan concentrations are associated with increased transplant-related mortality in allogeneic bone marrow transplant patients. *Bone Marrow Transplant* 1997; **20**: 909–913.
- 38 Red A, Vassal G, Moshous D, Dalle JH, Blayzac N, Navein B et al. Pharmacokinetic behavior and appraisal of intravenous busulfan dosing in infants and older children: the results of a population pharmacokinetic study from a large pediatric cohort undergoing hematopoietic stem-cell transplantation. *Ther Drug Monit* 2012; **34**: 198–208.
- 39 Okamoto Y, Nagatoshi Y, Kowata Y, Kikuchi A, Rato S, Kigasawa H et al. Prospective pharmacokinetic study of intravenous busulfan in hematopoietic stem cell transplantation in 25 children. *Pediatr Transplant* 2014; **18**: 294–301.
- 40 Bamielnik IH, Biedus RGM, Baliser SV, Sutrop MM, Bierings M, Knibbe CAJ et al. Association between busulfan exposure and outcome in children receiving intravenous busulfan before hematologic stem cell transplantation. *Bol Blood Marrow Transplant* 2009; **15**: 231–241.
- 41 Buffery PJ, Allen KM, Chin PKL, Moore GA, Barclay ML, Bagg EJ. Thirteen years' experience of pharmacokinetic monitoring and dosing of busulfan: can the strategy be improved? *Ther Drug Monit* 2014; **36**: 86–92.
- 42 Ansari M, Thioet Y, Rezgui MA, Pates C, Maziani S, Desjean C et al. Association between busulfan exposure and outcome in children receiving intravenous busulfan before hematopoietic stem cell transplantation. *Ther Drug Monit* 2014; **36**: 93–99.
- 43 Wall DA, Chan KW, Niader ML, Hayashi RI, Yeager AM, Kadota R et al. Safety, efficacy, and pharmacokinetics of intravenous busulfan in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 2010; **54**: 291–298.
- 44 Casaro S, Rilón M, Talenti E, Toffidusti T, Cabre E, Tiddello G et al. A prospective survey on incidence, risk factors and therapy of hepatic veno-occlusive disease in children after hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2005; **90**: 1396–1404.
- 45 Cheuk DKL, Wang P, Lee TL, Chiang AIS, Ha SY, Lau YL et al. Risk factors and mortality predictors of hepatic veno-occlusive disease after pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; **40**: 935–944.
- 46 Keams GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Blowey DL, Laeder JS, Kauffman RE. Developmental pharmacology—drug disposition, action, and therapy in infants and children. *N Engl J Med* 2003; **349**: 1157–1167.
- 47 Hines RN. The ontogeny of drug metabolism enzymes and implications for adverse drug events. *Pharmacol Ther* 2008; **118**: 250–267.
- 48 Kim AH, Tse JC, Ikeda A, Moore TB. Evaluating pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous busulfan in pediatric patients receiving bone marrow transplantation. *Pediatr Transplant* 2009; **13**: 971–976.
- 49 Gibbs JP, Murray G, Risler L, Chien JY, Daw R, Slatery JT. Age-dependent tetrahydrothiophenium ion formation in young children and adults receiving high-dose busulfan. *Cancer Res* 1997; **57**: 5509–5516.
- 50 Savic RM, Cowan MJ, Dvonik CC, Pai S-Y, Penzla L, Barsliuk IH et al. Effect of weight and maturation on busulfan clearance in infants and small children undergoing hematopoietic cell transplantation. *Bol Blood Marrow Transplant* 2013; **19**: 1608–1614.
- 51 Gibbs JP, Liacouris CA, Baldissero RN, Slatery JT. Up-regulation of glutathione S-transferase activity in enterocytes of young children. *Drug Metab Dispos Bol Res Chem* 1990; **22**: 1466–1469.

## Discussion

Une première conclusion de ce travail est la confirmation de l'intérêt du STP suivi d'une adaptation Bayésienne selon la méthode utilisée à l'IHOP de Lyon pour contrôler l'exposition au busulfan chez les enfants recevant un conditionnement par busulfan pour une greffe de CSH. Sur la base des simulations réalisées, si la posologie initiale calculée avec le poids de l'enfant était appliquée sur tout le conditionnement sans ajustement par le STP Bayésien, plus d'un quart des patients présenteraient une AUC en dehors de l'intervalle 900 – 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ . Avec le STP, plus de 90% des enfants de notre cohorte ont obtenu une AUC dans l'intervalle cible recommandé. De plus, 66% d'entre eux ont montré une AUC dans l'intervalle restreint ciblé à l'IHOP (980 - 1250  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ ). En comparaison avec la littérature, aucune étude utilisant du STP non Bayésien n'obtient de si bons résultats, avec seulement 51 à 74% d'atteinte de l'intervalle<sup>144</sup>.

Le second résultat important est l'absence de bénéfice clinique associé à l'atteinte de cet intervalle restreint d'AUC. En effet, il n'a pas été mis en évidence de différence significative sur les critères cliniques (toxicité et survie) entre les patients avec une AUC dans la cible restreinte et ceux avec une AUC en dehors de cette cible restreinte mais dans la cible conventionnelle (à savoir entre 900 et 980 ou entre 1250 et 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ ). De plus, en regardant spécifiquement les relations PK-toxicité, tous les patients ayant eu une MVO avaient des AUC inférieures à 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ . Ces résultats viennent donc infirmer notre hypothèse de l'intérêt d'une cible plus étroite pour l'AUC du busulfan, résultat néanmoins important pour la pratique clinique.

Aucune autre étude n'a évalué l'impact d'un intervalle cible plus restreint équivalent. Très récemment, Bartelink *et al.* ont démontré qu'un intervalle plus restreint mais également plus haut (1190 - 1540  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ ) prédisait un meilleur taux de survie qu'un intervalle plus faible (880 - 1300  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ )<sup>138</sup>.

Par ailleurs, l'absence de relation observée entre la survenue de la MVO et la surexposition au busulfan pose la question de la pertinence de l'AUC en tant que paramètre prédictif de la toxicité du busulfan et confirme l'intérêt d'une étude examinant d'autres déterminants plus spécifiques de cette toxicité.

Par ailleurs, l'examen de la littérature monte une hétérogénéité et des imprécisions dans les pratiques de dosages du busulfan, d'estimation des paramètres PK et du calcul de posologie. Toutes ces problématiques sont illustrées à travers la publication de Zao *et al.*<sup>144</sup> à laquelle nous avons répondu (lettre ci-dessous)<sup>145</sup>, où les auteurs ont comparé 12 méthodes de détermination de la posologie initiale du busulfan en pédiatrie<sup>144</sup>. Parmi ces méthodes, certaines étaient fondées sur des modèles PK avec un calcul de la clairance alors que d'autres se basaient sur des covariables comme le poids, la surface corporelle ou l'âge.

Ils ont évalué les performances des différentes méthodes dans leur capacité à atteindre l'intervalle cible en simulant chacun des schémas thérapeutiques des différentes méthodes pour les 111 patients de leur cohorte rétrospective afin de calculer leurs AUC.

Le premier problème portait sur la méthodologie employée pour estimer l'AUC. Les auteurs indiquaient avoir utilisé deux méthodes, l'une basée sur un modèle mono-compartmental (sans préciser la méthode d'estimation des paramètres PK) et l'autre basée sur une équation de régression. De plus, il n'y avait pas de justification du fait d'avoir utilisé ni d'indication sur celle finalement retenue dans les résultats présentés.

De plus, les auteurs ne précisaient pas le nombre d'échantillons sanguins prélevés pour l'estimation de l'AUC. D'un point de vue analytique, aucune information n'était donnée sur la méthode de dosage du busulfan ni sur la précision de cette méthode de dosage alors qu'il a été montré que la reproductibilité peut varier d'un facteur deux et peut donc avoir un impact certain dans les résultats et donc les AUC estimées<sup>146-151</sup>. Enfin, les AUC simulées ne prenaient pas en compte le phénomène d'accumulation en utilisant une relation linéaire entre les doses de busulfan et l'AUC estimée après la première dose.

Notre lettre a permis d'exposer les bases méthodologiques du STP et de l'adaptation Bayésienne tels qu'ils sont pratiqués à l'IHOP, reposant sur un traitement rapide des échantillons sanguins, une méthode de dosage chromatographique validée, l'analyse Bayésienne de deux concentrations sanguines mesurées après la première dose à des temps bien déterminés, et le calcul de posologie permettant de prédire l'AUC cumulée sur l'intégralité du conditionnement de façon rigoureuse<sup>134,148,152,153</sup>.

## Pharmacokinetic and Analytical Issues in Busulfan Area Under the Curve Estimation and Simulation



Michael Philippe<sup>1,2,3</sup>, Nathalie Bleyzac<sup>1,2,3</sup>, Sylvain Goutelle<sup>2,3,4</sup>

<sup>1</sup> Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique, Lyon, France

<sup>2</sup> Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

<sup>3</sup> Université Lyon 1, UMR CNRS 5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, Villeurbanne, France

<sup>4</sup> Université Lyon 1, ISPB-Faculté de Pharmacie de Lyon, Lyon, France

### Article history:

Received 9 September 2015

Accepted 10 September 2015

### To the Editor:

We read with interest the recently published article by Zao et al. [1]. In this study they compared the performance of different guidelines for initial dosing of intravenous busulfan in children. Their results indicated that 12 identified guidelines vary in their ability to achieve the conventional therapeutic target range (900 to 1500  $\mu\text{M}/\text{min}$ ) of busulfan area under the concentration time curve (AUC). We have several concerns regarding the methods used in their study, and several points should be clarified for correct interpretation of their results by readers.

First, they used the AUC estimated in 111 children as the reference value for all simulations of dosing guidelines. Therefore, the precision of the AUC estimation in those 111 children is critical in this work. However, the authors provide little information on this point. Apparently, they used 2 methods to estimate the individual AUC: a 1-compartment model implemented in WinNonLin and a previously published regression equation based on limited-sampling strategy. Several points are unclear:

- Why did the author use 2 methods instead of 1?
- Which method was used for the estimation of pharmacokinetic parameters with the 1-compartment model?

Also, the number of samples per patient, the sample day, the sampling times, and the type of AUC (AUC from time 0 to 6 hours or from 0 to infinity) are unknown but are all important in the precision of AUC estimation. The performance of each method in estimating the AUC should also be provided, because a precise and unbiased estimation is required for performing subsequent simulations based on those AUC values.

Second, no information is provided about the busulfan assay method. The precision of the assay method is not provided, even though it has been shown that the between-run precision can vary by a factor of 2 (from 7% to 15% [2–7]). This can influence the AUC estimation. Moreover, no information has been provided about the storage of plasma samples. Busulfan plasma samples need to be placed in an ice bath at 4°C for a 24-hour maximum delay and then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until the assay [4,8].

Third, Zao et al. simulated the AUC achieved with the initial dosing regimen of busulfan recommended by various

guidelines. For each patient simulated busulfan AUCs were calculated using a linear relationship between dose and AUC as follows:

$$\text{AUC}_{\text{simulated}} = \frac{\text{Dose}_{\text{proposed}}}{\text{Dose}_{\text{initial}}} \times \text{AUC}_{\text{observed}}$$

where  $\text{Dose}_{\text{proposed}}$  is the dose proposed by the dosing guidelines and  $\text{AUC}_{\text{observed}}$  is the busulfan AUC calculated with the  $\text{Dose}_{\text{initial}}$  (from their retrospective chart review) and either a 1-compartment model or a limited-sampling strategy.

There is a lack of important details on this calculation of the simulated AUC. Is it the AUC per administration ( $\text{AUC}_{0-6}$ ) reached at the steady state or the mean of 16  $\text{AUC}_{0-6}$ ? It is noteworthy that this calculation is valid only if  $\text{AUC}_{\text{simulated}}$  is the AUC during a dose interval at the steady state and if  $\text{AUC}_{\text{observed}}$  is the AUC from time 0 to infinity after a single dose [9]. Because there is a substantial accumulation of busulfan after repeated i.v. administrations, the  $\text{AUC}_{0-6}$  observed over the first dosing interval is significantly lower than that at the steady state and should never be used in such calculation.

The objective of the study from Zao et al. was valuable and clinically relevant. It is likely that the author's conclusion that AUC target attainment rates substantially vary between the various dosing guidelines of busulfan is correct. However, important details on the pharmacokinetic calculations performed with both the real and simulated dataset are lacking, and this makes the validity of the results uncertain.

### REFERENCES

- Zao JH, Schechter T, Liu WJ, et al. Performance of busulfan dosing guidelines for pediatric hematopoietic stem cell transplant conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21:1471–1478.
- Heggie JR, Wu M, Burns RB, et al. Validation of a high-performance liquid chromatographic assay method for pharmacokinetic evaluation of busulfan. *J Chromatogr B Biomed Sci App*. 1997;692:437–444.
- Quermin MH, Poonkuzhali B, Médard Y, et al. High-performance liquid chromatographic method for quantification of busulfan in plasma after derivatization by tetrafluorobiphenol. *J Chromatogr B Biomed Sci App*. 1999;721:147–152.
- Bleyzac N, Barou P, Aulagner G. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for busulfan assay in plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci App*. 2000;742:427–432.
- Pichini S, Altieri L, Bacosi A, et al. High-performance liquid chromatographic-mass spectrometric assay of busulfan in serum and cerebrospinal fluid. *J Chromatogr*. 1992;581:143–146.
- Quermin MH, Duval M, Utalen C, et al. Quantification of busulfan in plasma by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry. Application to pharmacokinetic studies in children. *J Chromatogr B Biomed Sci App*. 2001;763:61–69.
- Jenle A, Renner U, Schuler US, et al. Improved assay for determination of busulfan by liquid chromatography using postcolumn photolysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004;805:147–153.
- Balasubramanian P, Srivastava A, Chandy M. Stability of busulfan in frozen plasma and whole blood samples. *Clin Chem*. 2001;47:766–768.
- Rowland M, Tozer TN. *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics—concepts and applications*, 4th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2010.

DOI of original article: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.09.023>.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.09.023>  
 1088-8791/© 2016 American Society for Blood and Marrow Transplantation.

## 2. Pharmacocinétique de de population et adaptation posologique du busulfan IV en pédiatrie : développement d'une approche non-paramétrique

L'AUC est reconnue comme le paramètre PK d'intérêt pour le STP du busulfan dans le conditionnement de greffe de CSH chez l'enfant.

Il existe différentes méthodes d'estimation de cette AUC et la méthode utilisée peut influencer le résultat. Elle peut notamment être estimée sans l'utilisation de la modélisation, par la méthode traditionnelle dite non-compartimentale. Le principal inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite un nombre conséquent de prélèvements, source d'inconfort pour le patient et augmente la charge de travail pour le personnel médical et le coût des analyses biologiques. De plus, l'adaptation de dose, basée sur cette méthode de calcul de l'AUC, est effectuée par une approximation de la manière suivante :

$$Dose_n = Dose_{n-1} \times AUC_{cible}/AUC_{calculée}$$

avec  $Dose_n$  la prochaine dose à perfuser au patient,  $Dose_{n-1}$  la dose donnée avant les mesures plasmatiques,  $AUC_{cible}$  la valeur de l'AUC que l'on veut atteindre et  $AUC_{calculée}$  la valeur de l'AUC calculée à partir des concentrations plasmatiques du busulfan.

Certains centres comme l'IHOP utilisent la méthode Bayésienne pour adapter la posologie du busulfan. Cette méthode présente des avantages théoriques et pratiques sur la méthode traditionnelle, en réduisant notamment le nombre de prélèvements nécessaires pour estimer l'AUC<sup>132,133</sup>. Cette méthode d'adaptation posologique nécessite un modèle PK de population qui est construit par approche de population. Cette approche se base sur la connaissance de la variabilité PK de la molécule au sein d'un groupe d'individus « semblables ». Dans le cas du busulfan et de notre étude par exemple, ce groupe s'apparentera à la population pédiatrique devant recevoir une greffe de CSH. Mais il peut être beaucoup plus restreint et se composer par exemple de patients âgés traités pour une pathologie spécifique et avec une fonction rénale dégradée.

Le modèle de population va prendre en compte les résultats de toutes concentrations mesurées du médicament dans ce groupe de patients puis estimer une valeur moyenne des paramètres PK (par exemple la clairance d'élimination et le volume de distribution pour les modèles les plus simples) et leur variance/covariance<sup>154</sup>. L'étude de différentes covariables (poids, sexe, pathologie sous-jacente, polymorphisme génétique, etc.) permet ensuite d'expliquer une partie de la variabilité inter-individuelle<sup>155-157</sup>. Toutes ces connaissances acquises sur la PK et sa variabilité forment les informations *a priori* pouvant ensuite être utilisées dans l'adaptation Bayésienne<sup>158,159</sup>. On connaît donc « en moyenne » le comportement PK de la molécule au sein de la population. En fonction des covariables décrites dans le travail de modélisation on peut alors calculer des paramètres individuels *a priori* et proposer une posologie initiale se basant sur la valeur individuelle pour le patient à traiter de la ou les covariable(s) d'intérêt, par exemple son poids, et la valeur moyenne des paramètres PK tous les sujets ayant un poids similaire.

Le STP Bayésien peut s'effectuer ensuite en couplant les informations *a priori* de population et les informations individuelles des patients (concentrations du médicament mesurées). Des valeurs *a posteriori* des paramètres PK peuvent être calculées par méthode Bayésienne et prises en compte pour calculer la posologie future en vue d'atteindre une cible d'exposition<sup>158,159</sup>.

Bien que la méthode Bayésienne soit reconnue comme la méthode de référence pour l'adaptation posologique d'autres médicaments<sup>160</sup>, elle n'avait jamais été officiellement validée à la méthode de référence dans l'adaptation posologique du busulfan.

**L'objectif du travail présenté dans l'article de Neely *et al.*<sup>161</sup> était de développer un modèle PK de population du busulfan chez l'enfant pour la pratique clinique et le STP et de valider cette approche à l'approche traditionnelle du STP.**

## Accurately Achieving Target Busulfan Exposure in Children and Adolescents With Very Limited Sampling and the BestDose Software

Michael Neely, MD,\* Michael Philippe, MSc,†‡§ Teresa Rushing, PharmD,¶ Xiaowei Fu, PhD,||  
Michael van Guilder, PhD,\* David Bayard, PhD,\* Alan Schumitzky, PhD,\*  
Nathalie Bleyzac, PharmD, PhD,†‡§ and Sylvain Goutelle, PharmD, PhD†§

**Background:** Busulfan dose adjustment is routinely guided by plasma concentration monitoring using 4–9 blood samples per dose adjustment, but a pharmacometric Bayesian approach could reduce this sample burden.

**Methods:** The authors developed a nonparametric population model with Pmetrics. They used it to simulate optimal initial busulfan dosages, and in a blinded manner, they compared dosage adjustments using the model in the BestDose software to dosage adjustments calculated by noncompartmental estimation of area under the time–concentration curve at a national reference laboratory in a cohort of patients not included in model building.

**Results:** Mean (range) age of the 53 model-building subjects was 7.8 years (0.2–19.0 years) and weight was 26.5 kg (5.6–78.0 kg), similar to nearly 120 validation subjects. There were 16.7 samples (6–26 samples) per subject to build the model. The BestDose cohort was also diverse: 10.2 years (0.25–18 years) and 46.4 kg (5.2–110.9 kg). Mean bias and imprecision of the 1-compartment model-predicted busulfan concentrations were 0.42% and 9.2%, and were similar in the validation cohorts. Initial dosages to achieve average concentrations of 600–900 ng/mL were 1.1 mg/kg ( $\leq 12$  kg, 67% in the target range) and 1.0 mg/kg ( $>12$  kg, 76% in the target range). Using all 9 concentrations after dose 1 in the Bayesian estimation of dose requirements, the mean (95% confidence interval) bias of BestDose calculations for the third dose was 0.2% (–2.4% to

2.9%,  $P = 0.85$ ), compared with the standard noncompartmental method based on 9 concentrations. With 1 optimally timed concentration 15 minutes after the infusion (calculated with the authors' novel MMopt algorithm) bias was –9.2% (–16.7% to –1.5%,  $P = 0.02$ ). With 2 concentrations at 15 minutes and 4 hours bias was only 1.9% (–0.3% to 4.2%,  $P = 0.08$ ).

**Conclusions:** BestDose accurately calculates busulfan intravenous dosage requirements to achieve target plasma exposures in children up to 18 years of age and 110 kg using only 2 blood samples per adjustment compared with 6–9 samples for standard noncompartmental dose calculations.

**Key Words:** busulfan, therapeutic drug monitoring, population pharmacokinetics, children, Bayesian

(*Ther Drug Monit* 2016;38:332–342)

### INTRODUCTION

Busulfan is an alkylating agent used in conditioning regimens before hematopoietic stem cell transplantation. Dosing by intravenous administration is now the preferred route in many centers. Despite intravenous dosing, numerous studies have documented highly variable pharmacokinetics (PK) and plasma exposures between patients.<sup>1–4</sup> Moreover, there is a considerable body of evidence that the target exposure for busulfan is narrow, such that there is a small difference between higher plasma concentrations associated with increased risk of toxicity<sup>5,6</sup> and lower concentrations associated with increased risk of graft failure because of residual host immune cells.<sup>7–9</sup>

Busulfan therapeutic drug monitoring and management is routinely recommended and practiced at pediatric transplantation centers because of the unpredictability of concentrations for a given dose and the need to maximize chances of successful therapy within a narrow exposure range. In the United States, initial busulfan dosing, according to the package insert approved by the Food and Drug Administration, is 0.8 mg/kg IV every 6 hours for patients  $>12$  kg, and 1.1 mg/kg for those  $\leq 12$  kg. However, as reported in the insert, based on population modeling and simulated probability of target attainment, this dosing is expected to achieve the proper exposure in only 60% of patients. European Medicine Agency guidelines, based on a continuous log-linear function

Received for publication November 8, 2015; accepted January 4, 2016.

From the \*Laboratory of Applied Pharmacokinetics and Bioinformatics, Division of Pediatric Infectious Diseases, University of Southern California Children's Hospital Los Angeles; †Institute of Pediatric Hematology and Oncology; ‡Pharmacy department, Institute of Pediatric Hematology and Oncology, Hospices Civils de Lyon; §Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR CNRS 5558, Université Lyon 1, Villeurbanne, France; ¶Pharmacy Department; and ||Pathology and Laboratory Medicine, University of Southern California Children's Hospital Los Angeles.

Supported by the National Institute of Child Health and Development (NICHD R01 HD070886) and the CHLA Clinical Trial Unit, which is part of the University of Southern California Clinical and Translational Science Institute funded by the National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS) at the National Institutes of Health (UL1TR000130).

The authors declare no conflict of interest.

Correspondence: Michael Neely, MD, 4650 Sunset Boulevard, MS#30, Los Angeles, CA 90027 (e-mail: mneely@chla.usc.edu).  
Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

between busulfan clearance and body weight,<sup>3</sup> are also associated with suboptimal target attainment.<sup>10</sup>

To adjust dosing, most centers seem to use several measured busulfan concentrations obtained after the first dose, typically 4–9 samples.<sup>11</sup> From these, they estimate the area under the time–concentration curve (AUC)<sub>0–∞</sub> or steady-state AUC<sub>0–t</sub>, where *t* is the dosing interval, by noncompartmental methods, including trapezoidal approximation. From this estimate, dosing is adjusted by simple proportionality according to the equation  $Dose_{new} = Dose_{given} \times AUC_{desired}/AUC_{measured}$ . For example, this method is used by the Seattle Cancer Care Alliance Pharmacokinetics Laboratory (SCCAPL, Seattle, WA),<sup>12</sup> which serves as a reference center for busulfan measurement, interpretation, and dosing adjustments in the United States. According to their report, SCCAPL fit all concentrations for a patient using a single-compartment, first-order elimination model in WinNonlin (Pharsight Corporation, Mountain View, CA) to estimate AUC.

A major problem with the calculation of AUC from the first dose will arise if accumulation of drug until steady state is neglected, which would cause an underestimation of total AUC, and overestimation of the required dosages.<sup>13</sup> Another problem with this approach is the large number of blood samples that must be obtained during a single dosing interval to estimate AUC. The package insert recommends a minimum of 3, and preferably 4 (or more). Our own hospital (Children's Hospital Los Angeles) uses 9 samples to precisely calculate AUC within a 6-hour window. This is very burdensome to nurses, phlebotomists, laboratory personnel, and the patients, who must be dedicated to obtaining the required results in a timely manner to permit any necessary dose adjustments. For this reason, centers are beginning to turn toward population modeling (also known as pharmacometrics) as a means to tailor initial dosing more finely than available in the package US and European inserts and to adjust subsequent dosing to achieve the target exposure with fewer blood samples.

Several population models of busulfan PK have been published in the past 3 years,<sup>14–20</sup> and alternative methods for calculating the initial dose of busulfan have been proposed, based on these models.<sup>10,21</sup> Recently, the group from the University of San Francisco has begun to develop a tool to use a model for dose optimization.<sup>14</sup> They rightly point out that most population models are complex and not conducive to use in the average clinical setting, which we feel is an important area for great improvement with the field of pharmacometrics. However, their tool is an Excel spreadsheet that currently is only designed to choose the initial dose based on the mean population parameter values and the patient's age and weight.

Despite the abundant literature describing the PK of busulfan, a simple and accurate tool is still needed to rapidly adjust busulfan dosage early in the course of therapy, to use the fewest samples possible, and to achieve the target exposure most accurately and precisely. Therefore, we reviewed our own busulfan dosing and monitoring practice at the Children's Hospital Los Angeles, with the goal of developing a nonparametric population model of busulfan PK, and including this model within the BestDose software for individual patient therapeutic drug dose management ([www.lapk.org](http://www.lapk.org)).

## MATERIALS AND METHODS

### Study Design

This was a quality improvement project at the Children's Hospital Los Angeles (CHLA). The project was to review busulfan dosing and sampling practice with a goal of reducing the number of blood samples obtained from each patient by using a population modeling approach. The CHLA Institutional Review Board approved publication of the results and a waiver of informed consent, as we only used existing clinical data, which we de-identified for this project.

### Subjects

Any patient receiving busulfan as part of their standard care at CHLA, a large tertiary-care facility, was eligible for inclusion. At the time of model building in early 2013, we generated a convenience sample of 53 patients with available records who had been admitted in the years 2010, 2011, and the first part of 2013. Records from 2012 were not assembled at the time. After developing the model, we used an additional 11 patients admitted in the latter part of 2013, who were not included in the model-building cohort, to form an external validation group.

As another validation cohort, we also used the busulfan dosing history and measured concentrations from 105 pediatric patients managed at the University Hospitals of Lyon (Hospices Civils de Lyon), France from June 2006 to September 2012.

Finally, to validate the application of the model in our BestDose software for multiple-model Bayesian adaptive control of therapeutic drug dosing,<sup>22–25</sup> we used an additional 20 patients admitted to CHLA from the end of 2013 through 2014, who were not part of any other cohort.

### Busulfan Dosing and Target Concentrations

Patients at CHLA were administered intravenous busulfan with a starting dose of 1 mg/kg, infused over 2 hours. Doses were administered every 6 hours, for a total of 16 doses over 4 days.

The target exposure may be expressed in various ways (Table 1). We used the average concentration ( $C_{avg}$ ), which is obtained by dividing the area under the time–concentration curve (AUC) by its corresponding interval, eg,  $AUC_{0-96}/96$ .  $C_{avg}$  is expressed in nanogram per milliliter (Table 1). Clinicians at CHLA targeted a busulfan  $C_{avg}$  of 700–900 ng/mL from 0 to 96 hours.

### Sample Collection

The standard protocol at CHLA was to collect 9 blood samples for measurement of plasma busulfan with the first dose and every dose that was different from the previous dose. The samples were collected just before and at 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2.5, 3.5, and 4 hours after the end of a 2-hour infusion.

In the Lyon cohort, 2 blood samples were drawn 0.5 and 2 hours after the end of the first busulfan infusion in each patient. Afterward, individual PK parameter values of a 1-compartment model<sup>26</sup> were estimated using the maximum a posteriori Bayesian modeling program included in the USC\*PACK software.<sup>27</sup> Individually estimated (Bayesian

**TABLE 1.** Different PK Targets Used in the Clinical TDM of Busulfan in Children

Target Type (Units)	Time Span (h)	Target Range
AUC ( $\mu\text{M} \times \text{min}$ )		
AUC <sub>0-6</sub>	0-6	877-1315
AUC <sub>24</sub>	0-24	3508-5260
AUC <sub>96</sub>	0-96	14,032-21,048
AUC (mg $\times$ h/L)		
AUC <sub>0-6</sub>	0-6	3.6-5.4
AUC <sub>24</sub>	0-24	14.4-21.6
AUC <sub>96</sub>	0-96	57.6-86.1
C <sub>ave</sub> (ng/mL)	0-96	600-900

C<sub>ave</sub>, Average Concentration.

posterior) PK parameters were used to perform calculation of the AUC after the initial dose, subsequent estimation of busulfan plasma concentrations, and adjustment of the future doses necessary to achieve the target range for the rest of the regimen. According to the results, additional blood samples could be drawn for confirmation of the subsequent dosage regimen to achieve the target concentrations.

### Sample Analysis

All samples from CHLA were assayed for busulfan in the Special Chemistry Laboratory, a Clinical Laboratory Improvement Amendments–certified laboratory, using a validated HPLC assay.<sup>28</sup> Busulfan plasma concentrations from Lyon were measured by HPLC with UV detection for data before 2010,<sup>29</sup> and by an updated, cross-validated liquid chromatography–tandem mass spectrometry method after 2010.<sup>30</sup> All assays used were linear from 20 to 2000 ng/mL with an interday imprecision of <10%.

### Population Modeling

We constructed a nonparametric population model of busulfan PK using the Nonparametric Adaptive Grid<sup>31,32</sup> algorithm in the Pmetrics package for R<sup>33</sup> and the individual patient busulfan dosing history, concentrations, and covariates.

We tested 1-compartment models consisting of an infusion into a central compartment with volume  $V$  and elimination  $K_e$ , with differing initial ranges for both parameters. We also tested models with an additional peripheral compartment and transfer of drug to the peripheral compartment from the central and the reverse. To construct a unified pediatric and adult model, and based on superior predictions early in the modeling process, we scaled  $V$  and  $K_e$  for body size allometrically in all subsequent models by using fixed exponents on body weight of  $-0.25$  for  $K_e$  and of  $1$  for  $V$ .<sup>34</sup> Subsequent to inclusion of allometrically scaled weight, we tested the effect of age on model likelihood and predictions. Age and weight, actual body weight (ABW) or ideal bodyweight (IBW) calculated using the Traub and Johnson formula<sup>35</sup> were the only covariates that we included in the model-building process. Busulfan is not eliminated in the urine, so we did not include a renal function descriptor. Although some data have suggested that genetic polymorphisms of busulfan metabolizing enzyme

may influence the drug PK, this was not investigated, as we did not have any pharmacogenomic patient data available to us.<sup>36</sup>

For the fitting procedure, to weight the concentrations with the Fisher information of  $1/SD^2$ , where  $SD$  is the standard deviation of the measured concentration, we used an error polynomial of the form,  $SD = 0.0019 + 0.021 \times (conc) - 0.017 \times (conc)^2$ , where  $conc$  is the busulfan concentration. We estimated the coefficient values based on the reported intraassay standard concentrations and standard deviations of 6 replicates of the assay used at CHLA,<sup>28</sup> fitted to zero- to third-degree polynomials with the *makeErrorPoly* function in Pmetrics. For the Lyon cohort, the polynomial was  $SD = 0.0007 + 0.056 \times (conc) - 0.019 \times (conc)^2$ , based on their assays.<sup>30</sup> Both second-degree polynomials fitted their respective assay validation data with an  $R^2$  of >0.99.

Additionally, during the modeling process, we allowed Pmetrics to fit a fixed but unknown additive lambda term, such that concentrations were weighted by  $[(SD + \lambda)^2]^{-1}$ , where lambda is representative of additional noise such as errors in sample timing or model misspecification. The final cycle value of lambda was 0.058, about half of the lowest measured concentration (0.11 mg/L), indicating very low error beyond measurement noise and very low model misspecification.

We chose the final model primarily to minimize the bias and imprecision of the predictions versus observations, but we also evaluated the Akaike information criterion,<sup>37</sup> which is a function of the log-likelihood penalized for over-parameterization, residual plots, and visual and numerical predictive checks. Bias was the mean error of the difference between predictions ( $pred_i$ ) and observations ( $obs_i$ ), ie,  $Bias = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (pred_i - obs_i)$ , where  $N$  is the total number of observations. Imprecision was the square root of variance of prediction error, ie, bias-adjusted root mean squared error

calculated by  $\sqrt{\left[ \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (pred_i - obs_i)^2 \right] - Bias^2}$ . The visual

predictive checks was based on 1000 simulated profiles for each subject, using his/her own weight, busulfan dosing history over 4 days, sampling schedule, and the final population model parameter value means and covariances as the prior from which each simulated set of parameter values was randomly sampled. All simulated profiles were combined and concentration times were binned in 12-minute intervals to adjust for minor differences in sampling times across the patient population and to smooth the 2.5th, median, and 97.5th quantiles of the simulated concentrations. Finally, observed concentrations were plotted over the simulated quantiles. We visually checked that their distribution was similar to the simulated quantiles, and we also numerically checked with a binomial test to determine the probability that the proportion of observed concentrations below each quantile differed from the expected by chance.

As we did for our voriconazole model,<sup>22</sup> we summarized parameter values in the final model as weighted medians for central tendencies of a nonparametric distribution with a 95% confidence interval (95% CI) around the median, and the median absolute weighted deviation from the median as a measure of the variance of a nonparametric distribution, with its

95% CI. These estimates correspond to weighted mean, 95% CI of the mean, variance, and 95% CI of the variance, respectively, for a sample from a normal distribution.

### Validation Against External Cohorts

Using the final model, we calculated the nonparametric Bayesian posterior parameter value distributions for each of the 105 French patients and the 11 additional CHLA patients using their own busulfan dosing, concentrations and weights.

We calculated bias, imprecision, and linear regression descriptors for the observations versus predictions, with predictions for each subject based on the median of his/her Bayesian posterior parameter value distribution.

### Calculation of Optimal Sampling Times

Our Multiple Model optimal (MMopt) sampling algorithm chooses the sample times which minimize the risk of misrepresenting the patient as the wrong set of support points in the model, ie, estimating the wrong set of PK parameters for the patient.<sup>38</sup> For this analysis, we used the latest version of our algorithm, which is a weighted MMopt (wMMopt), tuned in this case to specifically ensure that we could estimate the patient's busulfan AUC most reliably.<sup>39</sup> We tested  $n = 1$  or  $2$  for the number of optimal samples, restricted to the available sample times after dose 1. However, we excluded the immediate postinfusion sample at time 2 hours, as our experience clinically has been that this concentration is the most likely to be falsely elevated due to contamination in the line from residual busulfan and inadequate flushing before sampling.

### Optimal Initial Dosage

From the final model, we simulated 1000 time-concentration profiles for several dosage amounts of busulfan administered every 6 hours for 96 hours. To generate a realistic simulated population, we included weight and age as described in the Pmetrics User Manual ([www.lapk.org](http://www.lapk.org)). Because weight and age were not parameters in the original model, we could not take advantage of Pmetrics' ability to simulate from the discrete nonparametric before,<sup>40</sup> but rather used the option for a unimodal, multivariate prior with the parameter means and covariances from the population model augmented with the means and covariances for weight and age derived from the model-building population. For each dosage amount, we determined the proportion of simulated 96-hour  $C_{ave}$  that were between 600 and 900 ng/mL, selecting the dosage with the highest proportion as a reasonable initial dose. We then used CDC growth tables (<http://www.cdc.gov/growthcharts/1977charts.htm>) to calculate the starting dose in milligram per kilogram for a range of ages and weights.

### Busulfan Software Dosing Controller Construction and Validation

We incorporated the final model into our busulfan multiple-model Bayesian adaptive dosing controller,<sup>23,24,41</sup> which we call a software "cartridge" in our BestDose computer program for individual patient therapeutic drug dose optimization. The busulfan cartridge included the structural model equations relating input (busulfan dosing and patient's covariates)

to output (busulfan plasma concentrations), and the discrete joint probability distribution of the values of the equation pharmacokinetic parameters in the population, consisting of support points in the final model. BestDose uses the cartridge and each patient's covariates (eg, weight and age) and busulfan dosing and concentration data to find the least biased and most precise dosage regimen relative to a target patient drug exposure (ie, busulfan AUC) as previously described for voriconazole.<sup>42</sup> We found during the development process that when patients were below their IBW, ABW provided a better fit.

To validate the busulfan dosing strategy (BestDose cartridge), for the 20 patients who were not part of any other cohort, the CHLA laboratory provided all busulfan concentrations and the patients' IBW/ABW. All 20 patients had a prespecified  $C_{ave}$  target, either 700 ng/mL ( $n = 4$ ) or 800 ng/mL ( $n = 16$ ). We were also provided the doses each patient had actually received. All patients except for 2 had 3 sets of 9 samples; the remaining 2 patients had only 2 sets. Our task was to use BestDose to make 3 dose recommendations to achieve the overall target  $C_{ave}$ : (1) for doses 3–16 based on sampling after dose 1 and the first 2 doses given; (2) for doses 7–16 based on sampling after doses 1 and 5 and the first 6 doses given; (3) for doses 11–16 based on sampling after doses 1, 5, and 9 and the first 10 doses given. We first used all available concentrations for a given patient to generate the Bayesian posterior from which we used BestDose to calculate the doses that achieved the target  $C_{ave}$ . In BestDose, it is possible to directly target an AUC, so in each case we used  $AUC_{0-96}$  as the target and divided it by 96 to get  $C_{ave}$ . We then repeated this process using only the samples at the 1 or 2 wMMopt times in each sampling period to generate the Bayesian posteriors for dose calculations.

The exact same data and targets were sent to the Seattle Cancer Care Alliance Pharmacokinetics Laboratory (SCCAPL). We were blinded to their dose recommendations when generating BestDose recommendations from either the full set of measured concentrations for each patient (18–27 samples), or the reduced MMopt set (4–6 samples). After generating all BestDose recommendations, we computed percentage bias (%bias) and imprecision, analogous to those used in the modeling process described above, compared with the SCCAPL dose recommendations. We defined %bias as  $(\text{BestDose} - \text{SCCAPL})/\text{SCCAPL}$ , and mean percent bias as  $MPB = \frac{1}{D} \sum_{i=1}^D \%bias_i$ , where  $D$  is the total number of dose recommendations. This means that a positive %bias indicates BestDose recommendations were higher than SCCAPL recommendations. Imprecision was the square root of variance in %bias (root mean bias-adjusted percent squared error), ie,

$$\sqrt{\left(\frac{1}{D} \sum_{i=1}^D \%bias_i^2\right) - MPB^2}.$$

## RESULTS

### Population Characteristics

The characteristics of the various populations used in this project are shown in Table 2. The model building and

TABLE 2. Characteristics of the Patient Cohorts

Cohort	Model Building	Validation 1	Validation 2	BestDose
Source	CHLA	Lyon	CHLA	CHLA
Number	53	105	11	20
Age (yrs)	7.8 (0.2–19.0)	5.6 (0.1–21)	5.8 (0.5–14.2)	10.2 (0.25–18)
Weight (kg)	26.5 (5.6–78.0)	20.3 (3.4–59.6)	22.7 (5.2–53.4)	46.4 (5.2–110.9)
All doses (mg/kg)	1.1 (0.7–1.8)	1.2 (0.6–5.2)	1.2 (0.9–1.5)	0.83 (0.5–1.3)
Samples/patient	16.7 (6–26)	3.3 (1–13)	15.9 (8–26)	25.2 (17–26)
$C_{max}$ (ng/mL)	750 (390–1190)	750 (390–1860)	780 (550–950)	714 (564–914)

Data are presented as mean (range).

validation populations were similar in age and weight, but the French cohort had far fewer busulfan blood samples per patient by design (see Materials and Methods). The BestDose cohort was heavier than the others, because the pharmacy and laboratory deliberately selected patients with a wide range of weights for the validation.

#### Busulfan Population Pharmacokinetic Model

We tested 1 and 2-compartment models with and without allometric scaling for body size, using the lesser of ideal body weight and actual body weight. In addition to body size, we also found a relationship between age and both busulfan elimination and volume of distribution, as shown in Figure 1. Based on the shape of trend curve, we used Pmetrics to fit zero to third-order polynomials to the median posterior values of elimination and volume, adjusted for size, for each patient and their age. The plots of these polynomials are included in Figure 1.

Model comparisons are shown in Table 3. Considering all 6 candidate models divided into 3 pairs of 1 and 2-compartment models without covariates, with size scaling, and with size plus age scaling, respectively, within each model pair, the 2-compartment model had the best (lowest) likelihood and Akaike information criterion. Overall, the pair of 1 or 2-compartment allometric + age models were the most likely. Within this pair, the 2-compartment model was more likely. However, based on lower prediction bias and parsimony, we chose the 1-compartment, allometrically and age-scaled model (5 in Table 3) as the final structural model, with equations and population parameter values shown in Table 4. The marginal probability densities of the 29 support points are shown in Figure 2.

The visual predictive check is shown in Figure 3. Numerically, 2.9% of the observed concentrations were below the 2.5th percentile of simulated concentrations ( $P = 0.51$ , binomial test), 43.8% were below the median ( $P = 0.0003$ ),

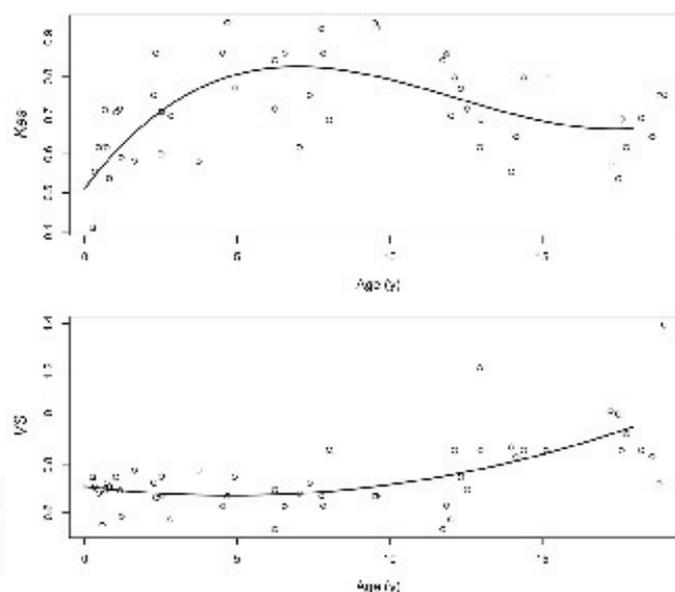


FIGURE 1. Relationship between (top)  $Ke_5$  (elimination adjusted allometrically for body size) and (bottom)  $VS$  (volume adjusted allometrically for body size) and age. Equations for the polynomials are shown in the legend for Table 4.

**TABLE 3.** Comparison of Candidate Models, All After 100 Cycles

Model No.	Comp	Parameters	$-2 \times LL$	AIC	Bias	Imprecision
1	1	$K_e, V$	-1944	-1938	0.003	0.076
2	2	$K_e, V, K_{CP}, K_{PC}$	-2172	-2162	0.000	0.072
3	1	No. 1 + allometric	-1982	-1976	-0.001	0.069
4	2	No. 2 + allometric	-2370	-2360	-0.012	0.058
5	1	No. 3 + age	-2012	-2006	-0.003	0.070
6	2	No. 4 + age	-2436	-2426	-0.008	0.056

Bias and imprecision are calculated as reported in the text, based on the median population parameter values for each model. Models are reported in order of complexity, with allometric indicating allometric scaling of model parameter values for body size, and age indicating the addition of an age polynomial to allometrically scaled models, as described in the text. Based on the discussion in the text, we chose model 5 to develop further.

AIC, Akaike information criterion; Comp, number of compartments; KCP, transfer rate from central to peripheral compartment;  $K_e$ , elimination from central compartment;  $V$ , volume of central compartment; KPC, transfer rate from peripheral to central compartment; LL, log-likelihood.

The bold line is the model selected for further development.

and 98.3% were below the 97.5th percentile ( $P = 0.16$ ). This numerical check indicates that the model central tendency of predictions is slightly below the observations but that the variability in the model represents the variability in the population well. This conclusion is also supported by the residual plot of population predictions in Figure 4, which are largely clustered within 2 standard deviations of 0, but show a slight under-prediction at later time points. This is likely due to a small decline in clearance over time in some patients,<sup>43</sup> such that measured busulfan concentrations can be slightly higher than predicted. However, this interoccasion change in clearance is typically on the order of 10% and not explained by any covariate,<sup>15,17,19</sup> and thus we did not feel that inclusion in our model was necessary for accurate dose calculations. Indeed, the predicted busulfan concentrations, based either on population or Bayesian posterior medians, were well matched to their corresponding measured concentrations, as shown in Figure 5. The Bayesian posterior bias (mean prediction error) was  $-3.2$  ng/mL with an imprecision (root mean bias-adjusted squared error) of 70 ng/mL. To put these in context, the mean observed concentration was 758 ng/mL; therefore, the mean bias is only 0.42% of this, with an imprecision of 9.2%.

**Validation Against External Cohorts**

Using the model as the previous and the 0-cycle option in Pmetrics, we calculated Bayesian posterior parameter value

distributions for both the French and CHLA validation cohorts to determine how well the model could predict concentrations in patients who did not contribute to the model. From each subject's median Bayesian posterior parameter values, we calculated the predicted busulfan concentrations and compared them with the measured values. For the French cohort ( $n = 105$ ), the bias was  $-4.6$  ng/mL and imprecision was 124 ng/mL. The intercept of the regression line for observations versus predictions was 21.4 (95% CI,  $-9.3$  to 52.1) and the slope was 0.98 (95% CI, 0.94–1.01), indicating that neither were significantly different from their ideal values of 0 and 1, respectively. The regression coefficient of determination ( $R^2$ ) was 0.89. For the CHLA validation cohort ( $n = 11$ ), prediction bias was 16.4 ng/mL and imprecision was 119 ng/mL. The intercept of the regression line for observations versus predictions was  $-6.9$  (95% CI,  $-46.0$  to 32.2) and the slope was 1.03 (95% CI, 0.99–1.08).  $R^2$  was 0.92.

**wMMopt Limited Sample Times**

For a 1-sample design, the wMMopt time was 2.25 hours after starting a 2-hour infusion, or 15 minutes after the end of the infusion. For the 2-sample design, the wMMopt times were 2.25 and 6 hours after the start of the infusion, or 15 minutes and 4 hours after the end of the infusion, ie, a peak and trough.

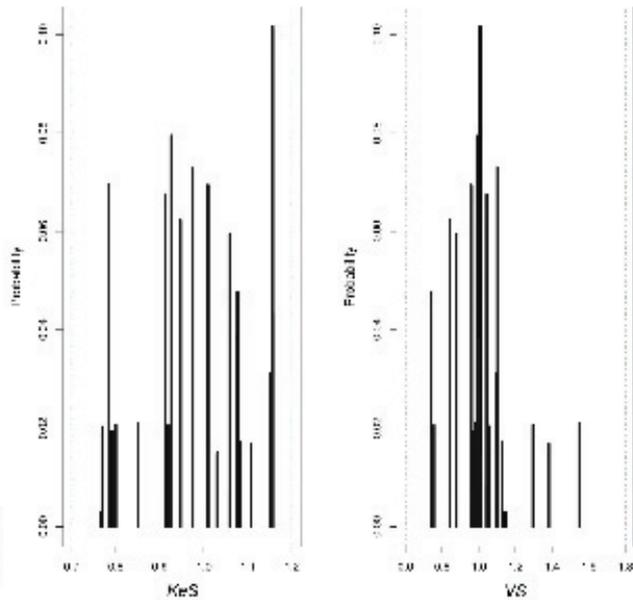
**Probability of Target Attainment and Initial Dosing Matrix**

Simulations of doses of 4, 4.5, 5, 5.5, and 6 mg per age-adjusted, allometrically scaled kilogram resulted in target attainment rates of 68%, 77%, 64%, 46%, and 27%, respectively. Using 4.5 as the best dose, we calculated the dose in milligram per kilogram for all combinations of weights from 0 to 100 kg in 2.5 kg increments, and ages from 0 to 18 years in 1-year increments. We excluded weight-for-age combinations <5th percentile and >95th percentile by CDC criteria. The range of doses was 0.88 to 1.24 mg/kg, with the highest doses in the lightest 5- to 6-year-olds, and the lowest doses in the heaviest teenagers. The mean in those  $\leq 12$  kg was 1.1 mg/kg and in those  $> 12$  kg was 1.0 mg/kg, with 67% and 76% predicted to achieve a 96-hour  $C_{ave}$  of 600 to 900 ng/mL, respectively. These doses can be

**TABLE 4.** Population Parameter Value Summaries in the Final Model

Parameter	Median (95% CI)	MAWD (95% CI)	Range
$KeS$	1.01 (0.93–1.07)	0.084 (0.050–0.113)	0.76–1.16
$VS$	1.01 (0.98–1.04)	0.052 (0.021–0.11)	0.74–1.55

MAWD is the median absolute weighted deviation, analogous to variance for a normal distribution (see text). In the model,  $Ke = KeS \cdot ibw^{-0.233} \cdot (C_0 + C_1 \cdot [age] + C_2 \cdot [age]^2 + C_3 \cdot [age]^3)$  and  $V = VS \cdot ibw \cdot (C_0 + C_1 \cdot [age] + C_2 \cdot [age]^2)$ , where  $Ke$  is the elimination rate constant from the central compartment in  $h^{-1}$ ,  $KeS$  is the scaled  $Ke$ ,  $ibw$  is ideal bodyweight in kg, calculated using the Traub and Johnson formula<sup>44</sup>;  $V$  is the volume of the central compartment in L; and  $VS$  is the scaled volume.  $C_0, \dots, C_3$  are the coefficients describing the age dependence of  $Ke$  and  $V$ , which were fixed in the final model. For  $Ke$ ,  $C_0 = 0.51$ ,  $C_1 = 0.10$ ,  $C_2 = -0.010$ ,  $C_3 = 0.00029$ . For  $V$ ,  $C_0 = 0.71$ ,  $C_1 = -0.016$ ,  $C_2 = 0.0017$ .



**FIGURE 2.** Marginal plots of population parameter value distributions for busulfan  $KeS$  (elimination adjusted allometrically for body size and age) and  $VS$  (volume adjusted allometrically for body size and age).

considered as reasonable starting doses in the absence of a tool like BestDose, which we describe in the next section.

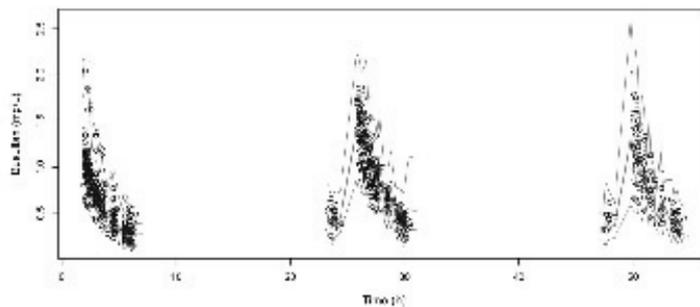
recommendations also had very low bias of only 1.7% and an imprecision of 8.8%.

**BestDose Busulfan Dosing Strategy Validation**

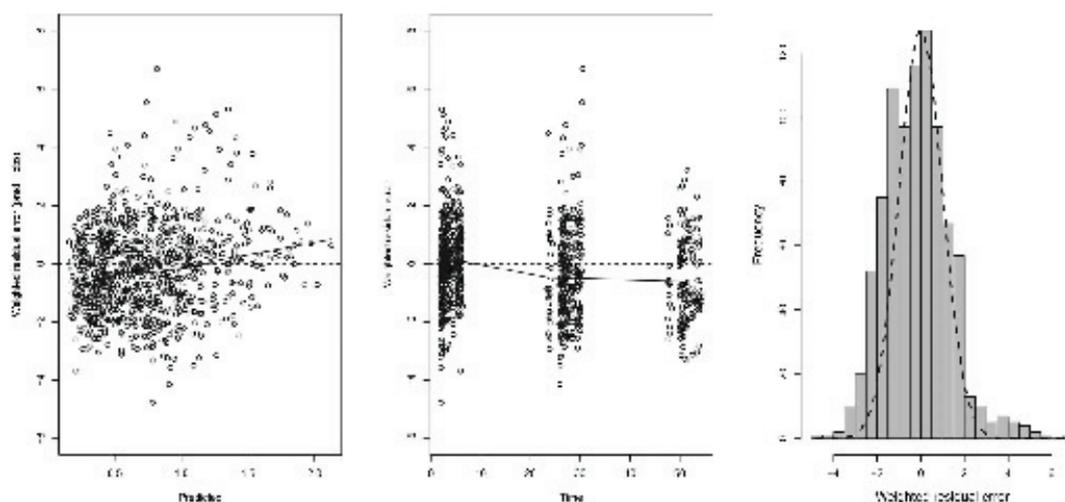
Table 5 shows the summaries of dose recommendations from SCCAPL compared with the BestDose recommendations using the full set of concentrations or the wMMopt subsets to generate the Bayesian posteriors, as well as the bias and imprecision. Using all available data to generate the Bayesian posterior resulted in dose calculations by BestDose that had negligible overall bias across all dose recommendations of 0.1%, relative to the calculations by SCCAPL, and a very low imprecision of 9.0%. The 1-sample wMMopt schedule tended toward low-dose recommendations, with an average bias of -10.3%, and with greater imprecision of 18.1%. The 2-sample wMMopt dose

**DISCUSSION**

For this project to examine our busulfan monitoring practice with the goal of reducing the number of samples per patient, we first developed a nonparametric population pharmacokinetic model of intravenous busulfan in 53 children of diverse ages and weights. We specifically chose a nonparametric model because we intended to use it in the multiple-model Bayesian control algorithm in BestDose. A 1-compartment model with age and weight dependence adequately described the data in the model-building population. For the average age in the population of 8 years and an ideal body weight of 26.7 kg,  $Ke$  is  $0.36\text{ h}^{-1}$ ,  $V$  is  $0.69\text{ L/kg}$ , and



**FIGURE 3.** Visual predictive check for the final model. Circles are measured concentrations, the lower and upper lines are the 2.5th and 97.5th percentiles of simulated concentrations, and the central line is the median of the simulated concentrations.



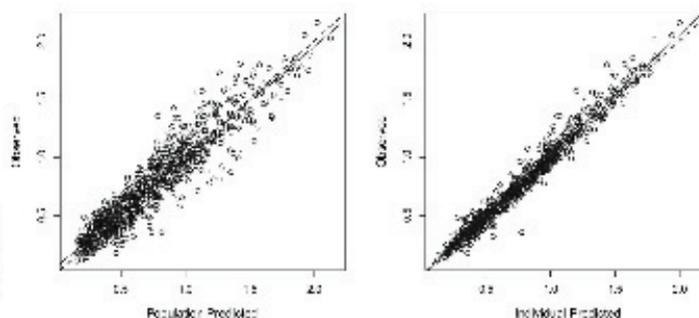
**FIGURE 4.** Residual plot for the model predictions, based on the median population parameter values. In the residual plot, there is a tendency to slightly underpredict later concentrations as seen in the middle panel. In the right panel is shown a histogram of the residuals with an ideal normal distribution as a dashed line.

clearance is  $4.14 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ , which agree well with clearance and volume in the package insert of  $0.64 \text{ L/kg}$  and  $3.37 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ , respectively as well as in other reports.<sup>17,43,44</sup>

Our model includes weight and age as significant covariates that are independently associated with busulfan PK across the entire pediatric age range. Other models have included an age function only in the youngest children,<sup>10,26</sup> whereas the model of Long-Boyle et al<sup>14</sup> also included age effects across the entire pediatric age range, defined by an increasing rate of allometrically scaled clearance up to a fixed age of 12 years, after which clearance declined. We did not fix our age function in any way, preferring to simply fit a continuous age-related polynomial to avoid a uniform maturation breakpoint applied to all patients. Investigating age-related changes resulting from maturation of physiological processes is one of the biggest challenges in

pediatric PK modeling, and weight and maturation are of course highly correlated.<sup>45</sup> By first scaling weight allometrically, we were able to discern the additional age relationship to busulfan elimination and volume of distribution, but despite the quality of the model fit, it is an empiric fit, and mechanistic interpretation of the polynomial relationship between age and PK parameters is limited. Without further data in adults, this model should only be used for the pediatric population up to age 18 years.

We have verified the ability of the model to closely predict busulfan concentrations in nearly 120 additional children who were not included in the model-building data set. Most importantly, we then incorporated that model as a software cartridge in the BestDose computer program for optimizing target-oriented doses of busulfan using our multiple-model, Bayesian adaptive control algorithm. In a blinded comparison, we have shown that with only 2



**FIGURE 5.** Observed versus predicted plots for busulfan. Predictions were based on the median population parameter values (left) or the medians of the individual Bayesian posterior parameter values (right).

**TABLE 5.** Bias and Imprecision of Dose Calculations Made With BestDose, Multiple-Model Adaptive Control, and the Final Population Model, Compared With Recommendations Made by the Seattle Cancer Care Alliance Pharmacokinetics Laboratory (SCCAPL) Using Noncompartmental Estimation of Busulfan AUC

	SCCAPL	Full	MMopt1	MMopt2
<b>Dose 3</b>				
Mean (range) dose mg	35.7 (6.0-60.0)	35.7 (6.1-63.0)	32.3 (6.1-58.0)	36.5 (6.1-68)
Mean (95% CI) bias	—	0.2% (-2.4 to 2.9, <i>P</i> = 0.85)	-9.2% (-16.7 to -1.5, <i>P</i> = 0.02)	1.9% (-0.3 to 4.2, <i>P</i> = 0.08)
Imprecision (%)	—	5.5	15.7	4.6
<b>Dose 7</b>				
Mean (range) dose mg	32.1 (4.8-57.0)	31.9 (4.5-61.0)	29.1 (3.9-57.5)	32.1 (4.6-61.5)
Mean (95% CI) bias	—	-1.3% (-6.1 to 3.5, <i>P</i> = 0.57)	-10.8% (-18.6 to -3.0, <i>P</i> = 0.01)	-0.7% (-5.5 to 4.0, <i>P</i> = 0.75)
Imprecision (%)	—	9.9	16.4	9.9
<b>Dose 11</b>				
Mean (range) dose mg	31.3 (4.8-66.0)	32.4 (4.6-82.0)	28.7 (3.6-73.6)	32.7 (4.8-81.6)
Mean (95% CI) bias	—	1.6% (-4.0 to 7.3, <i>P</i> = 0.55)	-11.1% (-21.8 to -0.6, <i>P</i> = 0.04)	4.0% (-1.8 to 9.9, <i>P</i> = 0.16)
Imprecision (%)	—	11.6	22.1	12.1

A negative bias indicates that the BestDose calculation was less than the SCCAPL dose. Full, all data points were used to generate the individual patient's Bayesian posterior parameter value distribution from the population model; MMopt1, only the concentrations 15 minutes after the end of the infusion were used to generate the Bayesian posterior; MMopt2, only concentrations 15 minutes and 4 hours after the end of the infusion (ie, a peak and trough) were used to generate the Bayesian posterior.

Bold values are statistically significant results.

optimally timed samples using our MMopt algorithm, this model can very closely match busulfan dose recommendations based on noncompartmental analysis that requires 6–9 concentrations. This is only the second study describing a limited sampling strategy for IV busulfan in pediatrics. Dupuis et al<sup>6</sup> recommended a 3-sample strategy to calculate AUC with an acceptable level of precision and a lack of bias. However, their strategy was based on multiple linear regression after the first dose only, and its applicability after that is unknown. Our wMMopt times (15 minutes and 4 hours after the end of any infusion, ie, a peak and trough) are easy to remember, fit well into common drug monitoring paradigms, and could reduce problems related to the timing of the blood samples. Even 1 sample, should the other be lost or contaminated, is sufficient to make a reasonable estimate of AUC. Furthermore, Bayesian approaches are generally more accurate than nomograms,<sup>47,48</sup> and they are robust enough to provide interpretable results when sample times deviate from a schedule, which is not true for nomograms. The implementation of the tools and limited sampling strategies presented in this work in clinical practice can greatly reduce the burden and cost of the traditional approach of busulfan monitoring in many centers treating stem-cell transplant children while preserving accurate estimation of drug exposure and dose requirements.

We have also provided initial busulfan dose recommendations based on weight  $\leq 12$  or  $>12$  kg. With 1.1 mg/kg IV every 6 hours for 16 doses, 67% of the lighter patients are expected to be within a  $C_{min}$  of 600–900 ng/mL. For the heavier patients, 76% will be in this range with 1.0 mg/kg IV every 6 hours for 16 doses. Our dose recommendations are very similar but somewhat simpler than those of Long-Boyle et al,<sup>14</sup> and we also found that older, heavier individuals need a slightly higher dose on average than in the package insert. Zao et al<sup>9</sup> found that of 111 pediatric patients, 66% of the patients achieved a  $C_{min}$  within the prespecified target range after the first dose. They also noted that existing algorithms may be less applicable

in very overweight or very young populations, both of which were represented in our cohorts (Table 2).

However, we must emphasize that targeted exposures may need to be more tailored than this broad range, and it is impossible to know beforehand whether a patient lies within the 24%–33% who will be outside the therapeutic range. For this drug, therapeutic drug monitoring clearly remains mandatory.

The major limitation of our project is the general availability of BestDose. We are looking at ways to possibly make the software commercially available as a web-based clinical service supported by expert review. However, at this time, we are happy to discuss use of BestDose on an individual basis. As for other limitations, one can always criticize the sample size of a pharmacokinetic study. Because traditional sample size calculations are based on comparisons between groups, proposed sample size calculations for phase I studies are based on estimation of parameter values with a tolerable imprecision, eg, 95% confidence interval of the mean within  $\pm 20\%$ .<sup>50</sup> The parameters in our model are estimated with  $<10\%$  imprecision. Furthermore, we have validated sufficient diversity of the study population by testing the model in as many ways possible: internally by simulation methods, externally on additional cohorts, and in a blinded fashion to calculate dosages.

## CONCLUSIONS

We developed a population PK model for busulfan in pediatrics with an original methodology-based limited sampling strategy using only 2 points (peak and trough). We have validated its ability to predict concentrations in independent cohorts of patients, as well as to accurately and precisely calculate busulfan dosages to achieve desired concentrations when used in the BestDose software.

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the support of the clinical laboratory staff at Children's Hospital Los Angeles for analyzing the clinical samples in this report.

## REFERENCES

- Vassal G, Michel G, Espérou H, et al. Prospective validation of a novel IV busulfan fixed dosing for paediatric patients to improve therapeutic AUC targeting without drug monitoring. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008;61:113-123.
- Schlechter T, Finkelstein Y, Doyle J, et al. Pharmacokinetic disposition and clinical outcomes in infants and children receiving intravenous busulfan for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2007;13:307-314.
- Nguyen L, Fuller D, Lennon S, et al. IV busulfan in pediatrics: a novel dosing to improve safety/efficacy for hematopoietic progenitor cell transplantation recipients. *Bone Marrow Transpl*. 2004;33:979-987.
- Cremers S, Schoemaker R, Bredius R, et al. Pharmacokinetics of intravenous busulfan in children prior to stem cell transplantation. *Br J Clin Pharm*. 2002;53:386-389.
- Dix SP, Wingard JR, Mullins RE, et al. Association of busulfan area under the curve with veno-occlusive disease following BMT. *Bone Marrow Transpl*. 1996;17:225-230.
- Grochow LB, Jones RJ, Brundrett RB, et al. Pharmacokinetics of busulfan: correlation with veno-occlusive disease in patients undergoing bone marrow transplantation. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989;25:55-61.
- McCune JS, Gooley T, Gibbs JP, et al. Busulfan concentration and graft rejection in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl*. 2002;30:167-173.
- Bolinger AM, Zangwill AB, Slattery JT, et al. Target dose adjustment of busulfan in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transpl*. 2001;28:1013-1018.
- Slattery JT, Sanders JE, Buckner CD, et al. Graft-rejection and toxicity following bone marrow transplantation in relation to busulfan pharmacokinetics. *Bone Marrow Transpl*. 1995;16:31-42.
- McCune JS, Bemer MJ, Barrett JS, et al. Busulfan in infant to adult hematopoietic cell transplant recipients: a population pharmacokinetic model for initial and Bayesian dose personalization. *Clin Cancer Res*. 2014;20:754-763.
- McCune JS, Baker KS, Blough DK, et al. Variation in prescribing patterns and therapeutic drug monitoring of intravenous busulfan in pediatric hematopoietic cell transplant recipients. *J Clin Pharmacol*. 2013;53:264-275.
- Maheshwari S, Kassim A, Yeh RP, et al. Targeted Busulfan therapy with a steady-state concentration of 600-700 ng/mL in patients with sickle cell disease receiving HLA-identical sibling bone marrow transplant. *Bone Marrow Transpl*. 2013;49:366-369.
- Phillipe M, Bleyzac N, Gostelle S. Pharmacokinetic, Analytical Issues In busulfan area under the curve estimation and simulation. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2016;22:185.
- Long-Boyle JR, Savic R, Yan S, et al. Population pharmacokinetics of busulfan in pediatric and young adult patients undergoing hematopoietic cell transplant: a model-based dosing algorithm for personalized therapy and implementation into routine clinical use. *Ther Drug Monit*. 2015;37:236-245.
- Diensthorst C, Boos J, McCune JS, et al. Population pharmacokinetics of intravenous busulfan in children: revised body weight-dependent NON-MEM model to optimize dosing. *Eur J Clin Pharmacol*. 2014;70:839-847.
- Savic RM, Cowan MJ, Dvonk CC, et al. Effect of weight and maturation on busulfan clearance in infants and small children undergoing hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2013;19:1608-1614.
- Veal GJ, Nguyen L, Paci A, et al. Busulfan pharmacokinetics following intravenous and oral dosing regimens in children receiving high-dose myeloablative chemotherapy for high-risk neuroblastoma as part of the HR-NBL-1/SIOPEN trial. *Eur J Cancer*. 2012;48:3063-3072.
- Bartelink IH, van Kesteven C, Boelens JJ, et al. Predictive Performance of a Busulfan Pharmacokinetic Model in Children and Young Adults. *Ther Drug Monit*. 2012;34:574-583.
- Bartelink IH, Boelens JJ, Bredius RGM, et al. Body weight-dependent pharmacokinetics of busulfan in paediatric Haematopoietic stem cell transplantation patients. *Clin Pharmacokinet*. 2012;51:331-345.
- Paci A, Vassal G, Moshous D, et al. Pharmacokinetic behavior and appraisal of intravenous busulfan dosing in infants and older children: the results of a population pharmacokinetic study from a large pediatric cohort undergoing hematopoietic stem-cell transplantation. *Ther Drug Monit*. 2012;34:198-208.
- Bleyzac N. The use of pharmacokinetic models in paediatric oncology: effects on clinical outcome through the examples of busulfan and cyclosporine. *Fludam Clin Pharmacol*. 2008;22:605-608.
- Neely M, Margol A, Fu X, et al. Achieving target voriconazole concentrations more accurately in children and adolescents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:3090-3097.
- Neely M, Jelliffe R. Practical therapeutic drug management in HIV-infected patients: use of population pharmacokinetic models supplemented by individualized Bayesian Dose Optimization. *J Clin Pharmacol*. 2008;48:1081-1091.
- Jelliffe R, Bayard D, Milman M, et al. Achieving target goals most precisely using nonparametric compartmental models and "multiple model" design of dosage regimens. *Ther Drug Monit*. 2000;22:346-353.
- Jelliffe RW, Schumitzky A, Bayard D, et al. Model-based, goal-oriented, individualized drug therapy. Linkage of population modelling, new "multiple model" dosage design, bayesian feedback and individualised target goals. *Clin Pharmacokinet*. 1998;34:57-77.
- Bleyzac N, Souillet G, Magron P, et al. Improved clinical outcome of paediatric bone marrow recipients using a test dose and Bayesian pharmacokinetic individualization of busulfan dosage regimens. *Bone Marrow Transpl*. 2001;28:743-751.
- Jelliffe RW. The USC\*PACK PC programs for population pharmacokinetic modeling, modeling of large kinetic/dynamic systems, and adaptive control of drug dosage regimens. *Proc Annu Symp Comput Appl Med Care*. 1991;922-924. PMID: PMC2247677.
- Peris JE, Latorre JA, Castel V, et al. Determination of busulfan in human plasma using high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization and fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999;730:33-40.
- Bleyzac N, Barou P, Aulagner G. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for busulfan assay in plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2000;742:427-432.
- Reis dos EO, Vianna-Jorge R, Suarez-Kurtz G, Lima ELDS, Azevedo D de A. Development of a rapid and specific assay for detection of busulfan in human plasma by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2005;19:1666-1674.
- Yamada WM, Bartoff J, Bayard DS, et al. *The Nonparametric Adaptive Grid Algorithm for Population Pharmacokinetic Modeling [Internet]*. 2014. Report No.: TR-2014-1. Available at: <http://www.lapk.org/techReports.php>. Accessed November 1, 2015.
- Tatarinova T, Neely M, Bartoff J, et al. Two general methods for population pharmacokinetic modeling: non-parametric adaptive grid and non-parametric Bayesian. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2013;40:189-199.
- Neely MN, van Guilder MG, Yamada WM, et al. Accurate detection of outliers and subpopulations with Pmetrics, a nonparametric and parametric pharmacometric modeling and simulation package for R. *Ther Drug Monit*. 2012;34:467-476.
- Anderson BJ, Holford NHG. Mechanistic basis of using body size and maturation to predict clearance in humans. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2009;24:25-36.
- Trub SI, Johnson CE. Comparison of methods of estimating creatinine clearance in children. *Am J Hosp Pharm*. 1980;37:195-201.
- Brink ten MH, Zwaveling J, Swen JJ, et al. Personalized busulfan and treosulfan conditioning for pediatric stem cell transplantation: the role of pharmacogenetics and pharmacokinetics. *Drug Discov Today*. 2014;19:1572-1586.
- Burnham KP, Anderson DR. *Model Selection, Multi-Model Inference*. New York: Springer; 2010.
- Bayard DS, Jelliffe RW, Neely MN. *Bayes Risk as an Alternative to Fisher Information in Determining Experimental Designs for Nonparametric Models*. PODE 2012. Surrey, UK: Windlesham; 2013.

39. Bayard DS, Jelliffe RW, Neely MN. *Experiment Design Based on Bayes Risk and Weighted Bayes Risk with Application to Pharmacokinetic Systems*. Population Optimum Design of Experiment. Basel, Switzerland: 2014.
40. Goutelle S, Bouguignon L, Maire PH, et al. Population modeling and Monte Carlo simulation study of the pharmacokinetics and antituberculosis pharmacodynamics of rifampin in lungs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:2974–2981.
41. Bayard DS, Milman MH, Schumitzky A. Design of dosage regimens: a multiple model stochastic control approach. *Int J Biomed Comput*. 1994;36:103–115.
42. Hope WW, Vanguilder M, Donnelly JP, et al. Software for dosage individualization of voriconazole for immunocompromised patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57:1888–1894.
43. Gaziev J, Nguyen L, Puzozzo C, et al. Novel pharmacokinetic behavior of intravenous busulfan in children with thalassemia undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a prospective evaluation of pharmacokinetic and pharmacodynamic profile with therapeutic drug monitoring. *Blood*. 2010;115:4597–4604.
44. Wall DA, Chan KW, Nieder ML, et al. Safety, efficacy, and pharmacokinetics of intravenous busulfan in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54:291–298.
45. Meibohm B, Laer S, Panetta JC, et al. Population pharmacokinetic studies in pediatric: issues in design and analysis. *AAPS J*. 2005;7: E475–E487.
46. Dupuis LL, Sibbald C, Schechter T, et al. IV busulfan dose individualization in children undergoing hematopoietic stem cell transplant: limited sampling strategies. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2008;14:576–582.
47. Sime FB, Roberts MS, Roberts JA. Optimization of dosing regimens and dosing in special populations. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21:886–893.
48. Hennig S, Holthouse F, Statz CE. Comparing dosage adjustment methods for once-daily tobramycin in paediatric and adolescent patients with cystic fibrosis. *Clin Pharmacokinet*. 2015;54:409–421.
49. Zao JH, Schechter T, Liu WJ, et al. Performance of busulfan dosing guidelines for pediatric hematopoietic stem cell transplant conditioning. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2015;21:1471–1478.
50. Aarons L, Ogungbenro K. Optimal design of pharmacokinetic studies. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010;106:250–255.

## Discussion

Un modèle PK non-paramétrique de population a été développé pour l'estimation Bayésienne des paramètres PK et l'adaptation de posologie du busulfan en pédiatrie avec une méthodologie basée sur seulement deux prélèvements sanguins. Ce travail présente des avancées sur les plans méthodologique et clinique.

Les covariables permettant d'expliquer une grande partie de la variabilité PK du busulfan dans ce modèle étaient le poids et l'âge de l'enfant. Une approche mixte, à la fois empirique et semi-mécanistique a été utilisée pour prendre en compte les relations entre les covariables âge et poids et les paramètres PK. Pour l'âge, une fonction polynomiale a été utilisée, tandis qu'une approche allométrique, aujourd'hui classique en pharmacologie pédiatrique, a été utilisée pour le poids. Cette fonction polynomiale a permis de s'adapter de manière continue à la variation d'âge en évitant un point de rupture uniforme appliqué à tous les patients. Des approches avaient déjà été initiées notamment pour le busulfan dans l'étude de Long-Boyle *et al*<sup>127</sup> où la fonction liant la clairance et l'âge était définie par une augmentation de la clairance jusqu'à un âge de 12 ans après quoi la clairance diminuait.

Ce modèle PK est également original par l'approche non paramétrique sur laquelle il se base. Cette approche possède plusieurs avantages par rapport à l'approche classique paramétrique pour ce genre d'application. Le premier, conceptuel, est de ne faire sur aucune hypothèse (gaussienne ou log-normale) quant à la forme de la distribution des valeurs des paramètres PK. L'approche paramétrique traditionnelle, résume ainsi la distribution d'un paramètre par sa moyenne et son écart-type, alors qu'il est admis que cette hypothèse ne peut être vérifiée la plupart du temps<sup>162</sup>. L'approche non paramétrique quant à elle n'émet aucune hypothèse statistique initiale et va décrire la variabilité d'un paramètre PK à l'aide d'une distribution discrète, ce qui permet aussi d'identifier des paramètres pour les sous-populations ou les sujets ayant des valeurs de paramètres extrêmes (outliers)<sup>163</sup>. Le second avantage de cette approche est de pouvoir directement utiliser le modèle construit pour le contrôle optimal des posologies dans le logiciel BestDose<sup>163</sup>.

Ce travail a confirmé la pratique locale en montrant qu'une stratégie avec seulement deux prélèvements (15 minutes et 4h après la fin de la perfusion de busulfan) était aussi performante

pour prédire les valeurs de l'AUC que la méthode traditionnelle avec l'analyse compartimentale basée sur quatre à neuf prélèvements. Par conséquent, il n'y a plus de justification à réaliser ces multiples prélèvements et dosages pour le STP du busulfan.

Sur le plan clinique, il s'agit du premier modèle du busulfan en pédiatrie validé en termes de concentrations prédites et de recommandations posologiques *versus* une méthode de référence (méthode non-compartimentale au Centre de Référence de Seattle).

Enfin, ce modèle PK non paramétrique a également permis d'élaborer des recommandations de posologies initiales basées sur le poids de l'enfant : 1,1 mg/kg toutes les six heures pour les patients avec un poids inférieur ou égale à 12 kg ou moins et 1 mg/kg pour les patients de plus de 12 kg. Ces recommandations permettraient à 67 à 76% des patients d'atteindre l'intervalle cible de 880 – 1320  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ , d'après les simulations réalisées.

Au final, cette étude a fourni un outil et une méthode d'application pour le STP Bayésien du busulfan et a validé ses performances. Cet article a reçu en 2017 le prix Patsalos décerné par l'association internationale de STP (IATDMCT) du meilleur article publié dans le journal *Therapeutic Drug Monitoring* sur la période 2015-2016.

### 3. Optimisation de la posologie initiale du busulfan basée sur un modèle pharmacocinétique non-paramétrique

Le modèle PK de Neely *et al.*<sup>161</sup> est le premier et unique modèle non paramétrique du busulfan IV publié à ce jour. Outre les avantages apportés par cette méthode décrits dans la discussion de l'article, l'approche non paramétrique ouvre des perspectives très intéressantes pour optimiser l'atteinte de l'intervalle cible d'AUC avec la posologie initiale.

En effet, un modèle PK de population peut être utilisé afin de calculer une posologie initiale pour atteindre une cible donnée. Si on prend l'exemple d'une AUC cible à atteindre à l'équilibre pharmacocinétique, la posologie initiale sera déterminée à l'aide de la formule suivante :  $Dose_{calculée} = AUC_{cible} \times Cl_i$  avec  $Dose_{calculée}$  la posologie initiale,  $AUC_{cible}$  l'AUC que l'on veut atteindre avec cette dose et  $Cl_i$  la clairance individuelle estimée du patient. Cette clairance est la valeur la plus probable pour cet individu. Si l'approche paramétrique est utilisée, cette clairance sera donc la clairance médiane ou moyenne (l'information *a priori* du modèle de population). L'approche paramétrique permet ainsi de maximiser la probabilité d'atteindre une valeur cible définie d'AUC.

Cependant, en pratique clinique, la cible que l'on vise se traduit majoritairement sous la forme d'un intervalle et non d'une valeur ponctuelle : ainsi n'importe quelle valeur à l'intérieur de celui-ci est présumée avoir le même rapport bénéfice risque pour le patient, la borne inférieure étant associée à la limite d'efficacité et la borne supérieure à la limite de toxicité, comme c'est le cas pour le busulfan.

Les modèles PK paramétriques ne permettent pas de répondre de façon optimale à cet objectif. Ils ne permettent de viser qu'une seule valeur située dans l'intervalle cible, la valeur centrale étant le plus souvent choisie. A l'inverse, les modèles non-paramétriques sont adaptés pour cette tâche. La distribution des paramètres PK d'un modèle non paramétrique est formée de multiples points de support (jusqu'à un par patient étudié dans la population d'origine), chacun d'entre eux supportant une valeur estimée de chaque paramètre du modèle associée à une probabilité. En corollaire, une distribution discrète des valeurs d'AUC en réponse à une posologie initiale peut être calculée. Une posologie optimisant la distribution des AUC dans l'intervalle cible peut être calculée.

**L'objectif de ce travail était de développer une méthode de calcul de la posologie initiale de busulfan maximisant la probabilité d'atteindre l'intervalle cible d'exposition et de comparer ses performances aux approches classiques en pédiatrie.**

## A Nonparametric Method to Optimize Initial Drug Dosing and Attainment of a Target Exposure Interval: Concepts and Application to Busulfan in Pediatrics

Michaël Philippe<sup>1,2</sup> · Michael Neely<sup>3</sup> · Yves Bertrand<sup>1</sup> · Nathalie Bleyzac<sup>1,2</sup> · Sylvain Goutelle<sup>2,4,5</sup>

Published online: 1 September 2016  
© Springer International Publishing Switzerland 2016

**Abstract** The traditional approach for model-based initial dosing is based on the use of a single vector of typical population parameters for targeting a specific exposure. This approach is theoretically ill-suited for targeting a range of exposure. The objective of this work was to develop a general approach for optimal (OPT) targeting of a drug exposure interval. After methodological purposes, we applied our method to the busulfan case. We used a nonparametric population pharmacokinetic model of intravenous busulfan to estimate the individual pharmacokinetic parameters of 163 bone marrow-transplanted children. Then, an array of 151 doses of busulfan ranging from 0.5 to 2 mg/kg was simulated a priori in each patient. For each dose, 29 possible busulfan plasma concentration

profiles, corresponding to the nonparametric prior, each associated with a probability, were obtained. The multiple-model-based, OPT dose was identified as the dose maximizing the a priori probability of achieving the busulfan target area under the concentration-time curve (AUC). Two AUC targets were considered: 900–1500 (conventional) or <1500  $\mu\text{M min}^{-1}$ . Finally, the OPT dose was individually simulated in each patient. We compared the ability of this method to achieve the target exposure interval with that of three other traditional model-based methods and one based on the non-parametric approach. When targeting the busulfan conventional AUC range, the OPT dose provided better attainment than the best of the three other methods after one dose (82.2 vs. 41.7 %,  $p < 0.005$ ), two doses (79.1 vs. 65.0 %,  $p < 0.005$ ), and at the end of therapy (80.4 vs. 76.7 %,  $p < 0.42$ ). The approach provided a balanced distribution between under- (10.4 %) and over-exposure (9.2 %), while other approaches showed higher rates of underexposure ( $\geq 19$  %). When targeting an AUC <1500  $\mu\text{M min}$ , the OPT dose was successful in minimizing overexposure as 0 % of children showed simulated AUC >1500  $\mu\text{M min}^{-1}$ . Our approach has been designed to optimize the targeting of an exposure interval. When applied to busulfan in children, it outperformed the traditional model-based dosing approach, with earlier and better achievement of busulfan target AUC. The approach can be applied for OPT dosing of many drugs, when the target objective is an interval.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s40262-016-0448-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Michaël Philippe  
michael.philippe@chu-lyon.fr

<sup>1</sup> Institute of Pediatric Hematology and Oncology, Place Professeur Joseph Renaut, 69008 Lyon, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR CNRS 5558, Université Lyon 1, Villeurbanne, France

<sup>3</sup> Laboratory of Applied Pharmacokinetics and Bioinformatics, Division of Pediatric Infectious Diseases, University of Southern California Children's Hospital Los Angeles, Los Angeles, CA, USA

<sup>4</sup> ISPB-Faculté de Pharmacie de Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France

<sup>5</sup> Service Pharmaceutique, Groupement Hospitalier de Gériatrie, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France



### Key Points

A general approach based on nonparametric pharmacokinetic models has been specifically designed to target an exposure interval.

The approach has been applied to a priori model-based dosing of busulfan in children and compared with traditional model-based methods based on the target concentration intervention principles, by using simulations based on real patients' data.

The nonparametric approach was successful in maximizing the target interval attainment and minimizing overexposure in the case of busulfan.

## 1 Introduction

A number of drugs are characterized by a narrow therapeutic margin, which means that the range of exposure associated with an acceptable high rate of the desired outcome and an acceptable low rate of toxicity is limited. Examples of drugs with a narrow therapeutic margin include immunosuppressants, lithium, digoxin, theophylline, anti-epileptic drugs, as well as several anticoagulants, anti-cancer, and anti-infective agents [1]. For such drugs, a target exposure index has been defined, depending on the pharmacokinetics/pharmacodynamics of each agent. Examples of commonly used exposure indexes are the peak concentration (e.g., aminoglycosides), the trough concentration (e.g., lithium, glycopeptides), and the area under the concentration-time curve (AUC, e.g., mycophenolate, busulfan). Most of the time, the target values for those indexes are defined as ranges: any value inside that range is assumed to achieve the same desired risk-benefit ratio, while values below and above the range are considered as markers of under- and overdosing, respectively. Clinicians usually aim at achieving an exposure index value within the range. Determining the individual drug dosage regimen that is necessary to achieve the target range of exposure is a meaningful objective of clinical therapy with such agents. This may be challenging when inter-individual pharmacokinetic (PK) variability is large, which is very common for such drugs, as the same dose given to all patients can result in large variability in individual drug exposures and poor target attainment.

When the drug to be used in a patient has a narrow therapeutic margin and large inter-individual PK variability, dose individualization is necessary to optimize the attainment of the target exposure. There are various

methods for dose individualization. This paper will focus on dose individualization based on PK models. The principles of model-based dose individualization, also called target concentration intervention have been described elsewhere [2, 3]. This approach uses PK parameter values obtained from population PK studies to estimate the most probable individual PK parameters for a new patient. Then, the individual dosage regimen could be calculated to achieve a defined target. A more complete description of this approach will be detailed in Sect. 2.

There are two distinct ways to perform model-based dose individualization: a priori and a posteriori. A priori dose individualization (without blood drug concentration measurement) is only based on the population PK information, which can be somewhat individualized by some patient's covariates when those covariates (e.g., body weight, renal function, sex) are included into the population model. A posteriori dose individualization is based on both the population information and individual PK information provided by drug concentrations collected during therapeutic drug monitoring (TDM). The Bayesian approach is a state-of-the-art method to combine both sources of information and derive individual parameter estimates [4].

Most studies on model-based drug dosing have focused on targeting a specific value of the exposure index [5]. To the best of our knowledge, no study has evaluated the ability of model-based approaches to target an exposure interval instead of a precise value, especially for initial dosing (a priori), i.e., before measuring any drug concentration. The objectives of this paper are: (1) to present the principles and limitations of current model-based approaches for initial drug dosing; (2) to introduce a multiple-model approach specifically designed to target a range of exposure; and (3) to compare the performance of the traditional and multiple-model approaches for targeting a systemic exposure range for busulfan in a cohort of pediatric patients

## 2 Traditional Model-Based Approach for Initial Dosing

Current PK modeling approaches used for dose determination are based on two principles: (1) the target is a specific concentration or AUC, usually the mean or median of a pre-defined therapeutic window and (2) the most probable set of PK parameter estimates are used to calculate the dosage regimen to reach this target.

In this work, the AUC is chosen as the PK target exposure index to be optimized, although the principles can be applied for other indexes. For a drug with linear pharmacokinetics, the maintenance dose to be given in a patient



on each administration can be calculated with the following equation:

$$\text{Dose} = \text{Target AUC}_{\text{optimal}} \times \text{CL}_{\text{estimated}}, \quad (1)$$

where  $\text{Target AUC}_{\text{optimal}}$  is the target AUC value at the steady state chosen for this drug for a given dose interval and  $\text{CL}_{\text{estimated}}$  is an estimate of the patient's total body clearance [3].

The estimated clearance depends on the prior distribution and individual data. When the prior distribution is parametric (normal or lognormal) and no concentration data are available, the clearance estimate is usually a point estimate, the mean, or the median of the distribution. However, it is mathematically possible to discretize the continuous (parametric) distribution to obtain a discrete distribution, as shown by Katz and colleagues [6, 7]. When drug concentrations are available, the point estimate is the maximum a posteriori (MAP) estimate. Individualizing drug dosage regimens based on TDM and MAP estimation, also known as Bayesian forecasting [8], has been implemented for various drugs with narrow therapeutic margins in the last 40 years and has shown some clinical benefits [9–12].

Model-based initial dosing as presented in Eq. 1 has received less attention so far. This approach has been advocated for the determination of the initial dose of busulfan in pediatrics [13–16]. Busulfan is an alkylating agent mainly used for conditioning before bone marrow transplantation (a more complete description of this drug, its use, and dosing is provided in the case study below). The clinical limitations of model-based initial dosing of busulfan have been highlighted in a recent study from Zao et al. [17]. They compared the performance of different guidelines and PK models for initial dosing of busulfan in children to achieve the conventional therapeutic target range of busulfan AUC (900–1500  $\mu\text{M min}$ ). The proportion of patients with an AUC within the target range ranged from 51 to 74 % (45–64 % in infants). These results raise questions on the performance of model-based initial dosing.

Initial drug dosing performed as presented in Eq. 1 with parametric PK models has three major methodological drawbacks, which are the consequences of what is called the separation principle [18, 19]:

1. One can only target a single value of the AUC, not a range of values. It is impossible to optimize the probability to achieve an interval, and to minimize the probability of under- or overexposure.
2. No criterion is optimized in the dose regimen calculation.
3. The variability and imprecision of target attainment is unseen. While population studies provide variability of

PK parameters, this variability is neglected in the dosage calculation and only a single point estimate of clearance is considered. It is assumed that this point estimate is the true value in the individual. As a consequence, one has the (false) impression that the target will certainly be achieved, while this will only be true if the patient has a clearance strictly equal to the population mean or median.

Indeed, with the parametric population approach,  $\text{CL}_i$  for an individual  $i$  may be modeled as follows:

$$\text{CL}_i = \text{TV}_{\text{CL}} + \eta_{\text{CL},i}, \quad (2)$$

where  $\text{TV}_{\text{CL}}$  is the typical (mean) value of the clearance in the population and  $\eta_{\text{CL},i}$  is a random variable quantifying the variation from the typical (average) individual. When the model is applied to initial dose calculation, only  $\text{TV}_{\text{CL}}$  is considered, while the variability  $\eta_{\text{CL},i}$  is neglected.

The Laboratory of Applied Pharmacokinetics and Bioinformatics has developed alternative model-based dosing methods based on nonparametric PK models [2, 5]. As there is a finite number of parameter values in a nonparametric distribution, each one with a given probability, the entire distribution can be used in the dosage calculation. Parameter variability is taken into account and an optimization criterion is incorporated into the process. Therefore, this approach called multiple-model or stochastic control addresses the last two issues presented above. However, the ability of this approach to target an exposure interval has received little attention so far.

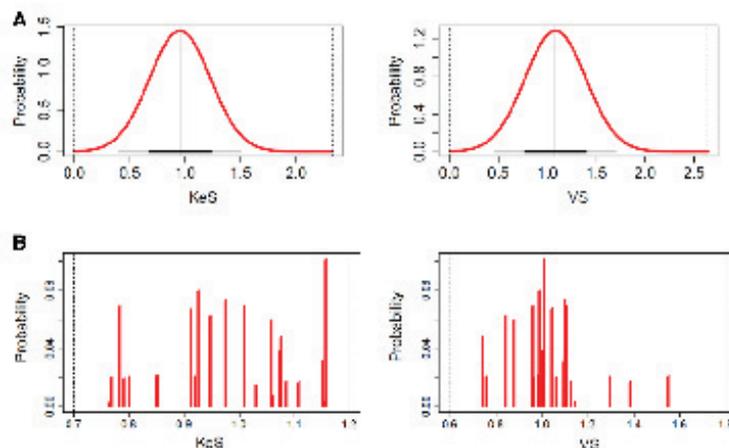
### 3 Multiple-Model Optimal Approach

#### 3.1 Nonparametric/Stochastic Approach

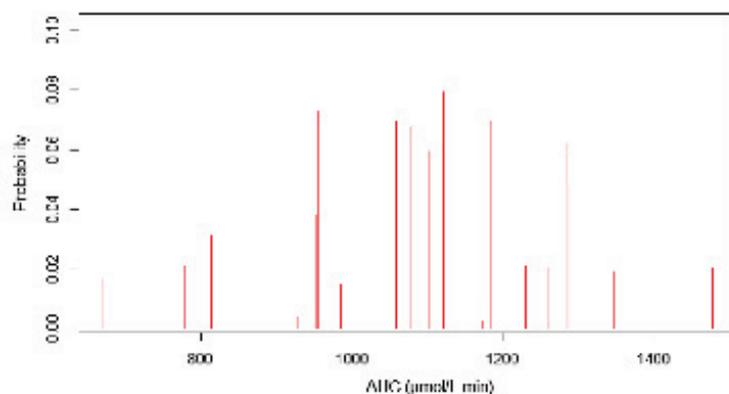
Instead of estimating only means and covariances of parameter distributions, nonparametric PK modeling methods estimate the entire discrete parameter distributions. The nonparametric PK approach is based on the theorems of Lindsay [20] and Mallet [21]. A nonparametric model parameter distribution consists of multiple discrete points (support points), up to one per patient studied in the original population. Each discrete support point consists of an estimated value for each model parameter, along with an estimate of the probability of that parameter value in the population [22]. Figure 1a, b show the distribution of two PK parameters, as obtained from parametric and nonparametric approaches, respectively. When a non-parametric distribution is used, this results in a discrete nonparametric distribution of the exposure, as shown in Fig. 2.



**Fig. 1** Parametric (a) and non-parametric (b) population pharmacokinetic approaches: parameter distribution of  $K_{eS}$  (elimination rate constant) and  $V_S$  (volume of distribution) for a drug X, described by a one-compartment model. In the parametric plot (a), the horizontal black line is the width of the standard deviation, and the gray line is the 5th-95th percentile distance



**Fig. 2** Prior AUC distributions obtained from a nonparametric model of busulfan. Example of a 10-year-old boy weighing 20 kg with a dose of 22 mg [39]. AUC area under the concentration-time curve



### 3.2 A Priori Dose Optimization for Targeting an Area under the Concentration-Time Curve Interval

Schumitzky et al. [18, 23] first introduced the stochastic control theory and the multiple-model approach to optimal (OPT) design of dosage regimen. Then, D'Argenio et al. applied the stochastic control theory to the problem of targeting the systemic exposure of a drug, using teniposide as a theoretical example [19]. The approach has also been compared with the MAP approach for a posteriori optimization of aminoglycosides and teicoplanin concentrations, based on real data [7, 24]. Therefore, those questions are not new, but there have been very few applications of the a priori stochastic control of a target AUC interval based on real patient data.

In contrast with the traditional model-based approach, when a nonparametric population model is used for initial dosing [21, 25], a finite number of PK parameter sets are available, each having its probability. Each parameter set can be used to simulate a candidate dosage regimen and thus multiple predicted PK profiles with their probabilities can be made, instead of only one.

Let us consider an intravenous (IV) drug with one-compartment kinetics described by a nonparametric population PK model with two PK parameters, the elimination rate constant and volume of distribution ( $K_e$  and  $V_d$ ). Let us suppose that this nonparametric PK model has  $n$  support points, and that the assumed AUC target range is defined by a lower ( $L$ ) and an upper ( $U$ ) bound. Based on the prior distribution described by the support points and their probabilities, any patient can possibly have  $n$  a priori

values of PK parameters, each one associated with a probability ( $\text{prob}_i$ ). For a given dosage regimen,  $n$  PK profiles can be simulated, using the  $n$  probable PK parameter values. For each set of parameters ( $K_e$ ,  $V_i$ ) among the discrete collection of  $n$ , the plasma concentration at any time is a function of those parameters as well as dose and time (for the sake of simplicity, we assume that the infusion time is constant, thus only the dose influences the administration rate):

$$C_i(t) = f(\text{dose}, K_e, V_i, t). \quad (3)$$

For each profile, an AUC can be calculated, as follows:

$$\text{AUC}_{i,t_1-t_2} = \int_{t_1}^{t_2} C_i(t) \times dt, \quad (4)$$

where each AUC $_i$  has a probability  $\text{prob}_i$ .

The prior probability that the AUC is within the target range for this dose is the sum of the probabilities, for each set of the  $n$  support points, that the AUC calculated belongs to the target range defined as  $[L; U]$ :

$$\sum_{i=0}^n \text{prob}_i(\text{AUC}_i \in [L; U]), \quad (5)$$

where  $\text{prob}_i$  are the probabilities related to each support point of the nonparametric model and  $\text{AUC}_i$  is the AUC calculated for one given dose in one given individual using one possible set of PK parameter values associated with the  $\text{prob}_i$ .

Our goal is to maximize the prior probability to achieve the target AUC interval  $[L, U]$ . Mathematically, this translates as follows:

$$\text{Optimal dose} = \arg\{\max_{\text{dose}}[S]\}. \quad (6)$$

Thus, each given dosage regimen is associated with a probability of achieving the AUC target range. The Optimal dose is defined as the dose with the highest probability to get an AUC within the target interval  $[L, U]$ .

As presented above and previously by D'Argenio and colleagues [19], targeting an interval is a straightforward application of the stochastic, multiple-model control approach. This basically consists in selecting the dose that maximizes the coverage area between the prior AUC distribution and the target AUC interval. The a priori probability of achieving the target interval with the OPT dose is calculated, thus one has an estimate of the uncertainty associated with the dosage regimen proposed. This probability depends on both the prior parameter distribution and the target interval width.

Additionally, this model allows flexibility at several levels:

1. Any target type, pharmacokinetics and even pharmacodynamics can be optimized, at any time, as long as it can be calculated from the model equations.
2. Any bounds and width can be used for the interval. One can select an unconventional interval if desired for a given patient.
3. Importantly, it is also possible to target a unilateral interval. For example, find the largest dose possible with minimum probability of exceeding an upper target (emphasize safety), or conversely find the smallest dose possible with minimum probability to fall short of a lower target (emphasize efficacy). Obviously, this is not possible with the traditional approach based on a point estimate of PK parameters. An application of this latter point will be presented in the case study.

### 3.3 Case Study: Application to Busulfan

High-dose IV busulfan is widely used in conditioning regimens as an alternative to total body irradiation prior to hematopoietic stem cell transplantation in adults and children. Busulfan is a bifunctional alkylating agent that is characterized by a relatively narrow therapeutic window and a high PK variability. An extensive body of literature indicates an association between clinical outcomes and busulfan systemic exposure. Busulfan AUC  $<900 \mu\text{M min}$  has been correlated with graft failure and disease recurrence [26–28], whereas high busulfan systemic exposure  $>1500 \mu\text{M min}$  has been associated with increased toxicity, especially hepatic toxicity (veno-occlusive disease) [29, 30]. As a consequence, plasma AUC per dosing interval at the steady state in the range of  $900\text{--}1500 \mu\text{M min}$  is commonly used as the therapeutic objective. Controlling busulfan exposures in children is more difficult than in adults owing to a larger PK variability [15, 31–33] and to the observed influence of age and weight on the apparent drug clearance, and the use of different dose levels is necessary. Many transplant centers perform TDM-based dose individualization to enable each patient to achieve exposure within this therapeutic window during the 16-dose treatment. TDM has proven its benefits in controlling busulfan exposure during therapy [34, 35]. However, it cannot be performed without concentration measurements, and thus the initial dose is based on official guidelines. Furthermore, TDM practice is not officially recommended by the manufacturer and health authorities in all children. Centers that do not perform busulfan TDM use the recommended initial dose throughout therapy. For these reasons, OPT methods for initial dosing of this drug are desirable.



A number of pediatric dosing guidelines have been developed to assist in determining the initial dose of IV busulfan. In 2004, Nguyen et al. [15] showed that a continuous log-linear function between busulfan clearance and actual body weight best explained the age-related variation of IV busulfan clearance in children. Based on this model, a dosing guideline with five body weight strata and a different dose in mg/kg for each stratum (range 0.8–1.2 mg/kg) has been defined. The European Medicine Agency (EMA) dose recommendations are based on this study. Since then, several studies have proposed other dosing algorithms to improve the target range attainment [13, 14, 16, 36].

We chose to apply the previously described model-based dosing approach to optimize the achievement of the target exposure interval of busulfan in pediatrics.

## 4 Material and Methods

### 4.1 Population and Pharmacokinetic Model

Data from 163 bone marrow transplanted children [age  $6.1 \pm 5.0$  years, ideal body weight (IBW)  $20.9 \pm 13.9$  kg] treated with IV busulfan in Lyon (France) between June 2006 and March 2015 for malignant and nonmalignant diseases were used in this study. The patients' characteristics are described in Table 1. This population study has been described in detail in a previous publication, for its most part, although a few more patients were included in the present analysis [35]. This was a non-interventional study without any additional procedure. Busulfan TDM and data collection were part of routine patient care. For these reasons, no institutional review board or ethics committee approval was required, in accordance with the French regulation on biomedical research [37, 38].

We used the nonparametric population PK model of IV busulfan published by Neely et al. [39] to estimate the individual PK parameters of all patients. This is a one-compartment model with two parameters,  $V_d$  and  $K_{el}$ , both scaled to IBW and age. The nonparametric distribution of busulfan PK parameters consists of 29 discrete support points. The model characteristics are shown in Table 2.

This model has been used as the prior to calculate the individual PK parameters and predicted concentrations, using Bayesian estimation within the Pmetrics software [40]. To determine the predictive ability of the model in our cohort, we calculated bias, imprecision, and linear regression descriptors for the predictions vs. observations, with predictions for each subject based on the median of the Bayesian posterior parameter value distribution. However, predicted concentrations were not used in the subsequent dosing calculations, which were only based on

**Table 1** Patients' characteristics ( $n = 163$ )

Age (years), mean/median/range	6.1/5.0/0.17–21
ABW (kg), mean/median/range	22.7/16.9/3.2–87
No. of patients <9 kg (%)	30 (18.4)
IBW <sup>a</sup> (kg), mean/median/range	20.9/16.5/3.2–59.6
No. of patients <9 kg (%)	30 (18.4)
Diagnosis, no. of patients (%)	
AML	47 (28.8)
SCID	17 (10.4)
ALL	16 (9.8)
Neuroblastoma	13 (8.0)
Sickle cell anemia	12 (7.4)
Thalassemia	12 (7.4)
MDS	8 (4.9)
Lymphohistiocytosis	6 (3.7)
SAA	4 (2.5)
Other	28 (17.2)

ABW actual body weight, ALL acute lymphoblastic leukemia, AML acute myeloid leukemia, IBW ideal body weight, MDS myelodysplastic syndrome, SAA severe aplastic anemia, SCID severe combined immunodeficiency

<sup>a</sup> Calculated using the Traub and Johnson formula [52]

prior parameter distributions. As predictions of busulfan concentrations provided by this model were excellent (Sect. 4), the individual parameters obtained with this model were considered as the “true” parameters of each subject and were used for all subsequent dosing simulations.

### 4.2 Calculation of Model-Based a Priori Optimal Dose Regimen

This nonparametric model has been used to calculate the individual OPT doses for each patient using the procedure explained above (Eqs. 3–6).

We tested an array of 151 doses of busulfan ranging from 0.5 to 2 mg/kg with an increment of 0.01 mg/kg for each patient. Based on the 29 support points of the model, 29 possible busulfan plasma concentration profiles, each associated with a probability could be simulated for each patient (according to their IBW and age) and each dose. Assuming an every 6-h dosing schedule (16 doses) with a 2-h IV infusion, busulfan plasma concentrations were calculated for each dose tested and each of the 29 parameter sets, as follows: During the first infusion:

$$C(t) = \frac{k_0}{K_{el} \times V_d} \times (1 - e^{-K_{el} \times t}), \quad (7)$$

After the end of the infusion:

$$C(t) = C_{2h} \times e^{-K_{el} \times t}, \quad (8)$$



**Table 2** Parameter values of the busulfan population pharmacokinetic model from Neely et al. [39]

Parameter	Median (95 % CI)	MAWD (95 % CI)	Range
$K_e S$ ( $\text{kg}^{0.25} \text{h}^{-1}$ )	1.01 (0.93–1.07)	0.084 (0.050–0.13)	0.76–1.16
VS ( $\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	1.01 (0.98–1.04)	0.052 (0.021–0.11)	0.74–1.55

Ideal bodyweight (IBW) and age influence the  $K_e S$  and VS as follows:  $K_e = K_e S \times \text{IBW}^{-0.25} \times (C_0 + C_1 \times \text{Age} + C_2 \times \text{Age}^2 + C_3 \times \text{Age}^3)$ ,  $V = \text{VS} \times \text{IBW} \times (C_0 + C_1 \times \text{Age} + C_2 \times \text{Age}^2)$ , where  $K_e$  is the elimination rate constant from the central compartment in  $\text{h}^{-1}$ ,  $K_e S$  is the scaled  $K_e$ ,  $\text{IBW}$  is ideal bodyweight in kg calculated using the Traub and Johnson formula [52],  $V$  is the volume of the central compartment in L, and VS is the scaled volume.  $C_0$ ,  $C_1$ ,  $C_2$ , and  $C_3$  are the coefficients describing the age dependence of  $K_e$  and  $V$ , which were fixed in the final model. For  $K_e$ ,  $C_0 = 0.51$ ,  $C_1 = 0.10$ ,  $C_2 = -0.010$ , and  $C_3 = 0.00029$ . For  $V$ ,  $C_0 = 0.71$ ,  $C_1 = -0.016$ , and  $C_2 = 0.0017$ .

The age factor derived from the polynomials may be viewed as a scalar term, thus the units of  $K_e S$  and VS are  $\text{kg}^{0.25} \text{h}^{-1}$  and  $\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ , respectively, with kg meaning kilogram of IBW.

CI confidence interval,  $K_e S$  elimination rate constant, MAWD median absolute weighted deviation, analogous to variance for a normal distribution, VS volume of distribution

After multiple doses:

$$C_n(t) = C_{n-1} \times e^{-k_e \times t} + \frac{k_0}{k_e \times V_d} (1 - e^{-k_e \times t}), \quad (9)$$

where  $C(t)$  is the concentration at the time  $t$ ,  $R$  is the infusion rate (dose/2h),  $k_0$  is the constant rate infusion,  $K_e$  is the individual elimination rate constant,  $V_d$  is the volume of distribution,  $C_{2h}$  is the concentration at the end of the 2-h infusion ( $C_{\text{max}}$ ), and  $C_n(t)$  is the concentration after the  $n$ th infusion, with a 6-dosing interval.

Then, the AUC was calculated as follows:

$$\text{AUC}_{t_1 \rightarrow t_2} = \int_{t_1}^{t_2} C \times dt. \quad (10)$$

The a priori OPT dose, which optimized the attainment of the target AUC interval was identified for each patient using the multiple-model optimization procedure described above (Eqs. 3–6); see Electronic Supplementary material for the different steps of this process of dose optimization.

Using this approach, we were able to target various AUC interval ranges, at various times during busulfan therapy: after the first dose, the second dose, and after the end of busulfan therapy (96 h, 16 doses).

#### 4.2.1 Comparison with Other Busulfan Dosing Methods

To assess the performance of this method, we have compared its ability to achieve different AUC target ranges with that of other methods of initial dose determination used for busulfan in pediatrics: from the Nguyen et al. PK model [15], based on a relationship between weight (BW) and clearance, as follows:

$$\text{CL}_i = \theta_1 + 4.57 \times [\ln(\text{BW}) - 3], \quad (11)$$

where  $\theta_1$  is the typical clearance value in the population.

From the Paci et al. PK model [14], also based on a relationship between weight and clearance:

$$\text{CL}_i = \theta_1 \times \left( \frac{\text{BW}}{9} \right)^{\theta_2}, \quad (12)$$

where  $\theta_1$  is the typical clearance value in the population and  $\theta_2$  is the scaling exponent for clearance in children.

From the McCune et al. PK model [13]:

$$\text{CL}_i = \theta_1 \times F_{\text{mat}} \times F_{\text{size}} \times F_{\text{sex}}, \quad (13)$$

where  $\theta_1$  is the typical clearance value in the population,  $F_{\text{mat}}$  is the fraction of the adult busulfan clearance value,  $F_{\text{size}}$  is the fractional difference in allometrically scaled size compared with a 70-kg normal fat mass individual, and  $F_{\text{sex}}$  is a binary covariate related to the sex.

For each of these parametric models, Eq. 1 was used for initial dosing determination (respectively named “EMA dose”, “PACI dose”, and “MAC dose”) to achieve a 1200- $\mu\text{M}$  min target, the median of the recommended target interval of 900–1500  $\mu\text{M}$  min.

In addition, we evaluated the nonparametric model of Neely et al., but used in the traditional way, i.e., targeting the point target of 1200  $\mu\text{M}$  min. In this case, initial dosing has been determined using the multiple-model, Bayesian adaptive dosing controller in BestDose software [2, 5, 41–43].

Finally, to evaluate the performance of all five model-based dosing methods (OPT, EMA, PACI, MAC, and multiple-model doses), the administration of the dose calculated with each approach was simulated in each patient using its individual PK parameter estimates and AUC values have been calculated using PK Eqs. (7)–(10) and compared with target values.

Two different AUC target ranges were considered to illustrate the flexibility of the approach: (1) the conventional AUC target range: 900–1500  $\mu\text{M}$  min (Target 1) and (2) a single bound interval: AUC <1500  $\mu\text{M}$  min (Target 2). This target could only be tested for the OPT method.

In this last case, the optimization procedure was slightly modified. It consisted of testing an increasing dose starting



from 0.5 mg/kg and identifying the largest busulfan dose still associated with an a priori probability of achieving  $AUC \geq 1500 \mu\text{M min}$  equal to zero, so that the identified dose, while still preserving efficacy, can strictly minimize toxicity.

As explained above, TDM may be used to individualize the busulfan dosing regimen. When TDM can be performed, the a priori optimization is desirable before TDM results are known, i.e., for the first two doses in general. When TDM cannot be performed, the initial dose is applied throughout therapy and clinicians aim at achieving an average AUC within the target interval. For this reason, the attainment of the target AUC interval was evaluated at various times during busulfan therapy: after the first dose (AUC1), after the second dose (AUC2, the mean AUC after two doses), and at the end of the 16-dose therapy (AUC16, the mean AUC after 16 doses).

With our multiple-model approach, we specifically calculated the OPT dose to achieve the AUC target interval at those specific times, according to Eq. (4) with  $t_1$  equal to 0 and  $t_2$  being equal to 6 h (AUC1), 12 h (AUC2), or 96 h (AUC16). This yielded to different OPT doses for each endpoint. For the other methods, only a single-dose regimen was derived using Eq. 1, which corresponds to targeting the steady-state AUC, which is the current practice.

#### 4.2.2 Computation and Statistical Analysis

All optimization calculations and PK simulations were performed with the Matlab software (version 7.8; The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, USA).

The difference in the percentage of target interval attainment (PTIA) between the five dosing methods was evaluated with a Chi-square test. Statistical significance was set at  $p < 0.05$  for all tests.

## 5 Results

### 5.1 Pharmacokinetic Model Performance in the Patient Population

Using the model of Neely et al. [39] as the prior and the 0-cycle option in Pmetrics, we calculated Bayesian posterior parameter estimates ( $K_e$  and  $V$ ) for each patient in our cohort.

From each subject's parameter values, we calculated the predicted busulfan concentrations and compared them with the measured values. The plot of predicted vs. observed busulfan concentrations is shown in Fig. 3. The bias (mean prediction error) was  $-6.4 \text{ ng/mL}$  (0.9 % of the mean observed concentrations) and imprecision (bias-adjusted mean weighted squared error) was  $121 \text{ ng/mL}$ . The

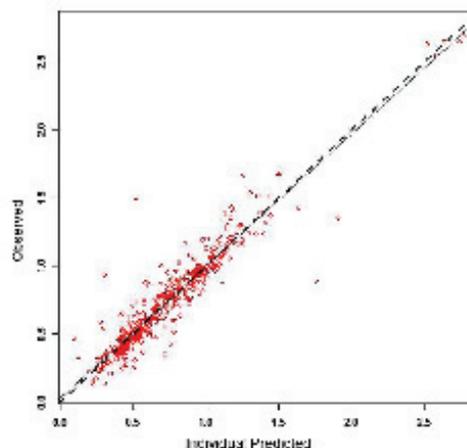


Fig. 3 Individual predictions vs. busulfan observed concentrations. The black line is the identity line; the dotted line is the regression line (concentration unit is mg/L)

intercept of the regression line for observations vs. predictions was  $29.5 \text{ ng/mL}$  (95 % confidence interval 3.8–55.2) and the slope was 0.97 (95 % confidence interval 0.94–1.00). The regression coefficient of determination ( $R^2$ ) was 0.89. These results indicated that the population model adequately described the individual data and that individual parameters could be used adequately for subsequent simulations.

### 5.2 Calculation of a Priori (Initial) Dose Regimen

The mean OPT doses calculated with our multiple-model approach are described in Table 3. On average, OPT doses were higher than the other methods, whatever the chosen target range and timepoint. The PTIA associated with the five model-based dosing methods are shown in Table 4.

#### 5.2.1 Target Range 1

The a priori probabilities achieved for each of these OPT doses were from 94 to 96 %. The PTIA of OPT doses was significantly greater than the highest PTIA of the three other parametric methods for AUC1 (82.2 vs. 41.7 %,  $p < 0.005$ ) and AUC2 (79.1 vs. 65.0 %,  $p < 0.005$ ) but not for AUC16 (80.4 vs. 76.7 %,  $p < 0.42$ ). The classical multi-model approach provided a higher PTIA than the three other parametric models for AUC1 and AUC2, but not for AUC16.

As seen in the Table 4, our stochastic method allows a well-balanced distribution of the AUC around the target

**Table 3** Initial dose regimen based on the OPT approach

Dose (mg/kg) <sup>a</sup>	AUC1	AUC2	AUC16
Target range 1: 900–1500 $\mu\text{M min}$			
Mean $\pm$ SD	1.36 $\pm$ 0.06	1.27 $\pm$ 0.06	1.16 $\pm$ 0.08
Range	1.23–1.81	1.11–1.63	0.99–1.45
Target range 2: AUC <1500 $\mu\text{M min}$			
Mean $\pm$ SD	1.34 $\pm$ 0.06	1.21 $\pm$ 0.05	1.08 $\pm$ 0.06
Range	1.24–1.82	1.07–1.58	0.91–1.33

AUC area under the concentration-time curve, OPT optimal, SD standard deviation

<sup>a</sup> The dose indicated is the dose for each 2-h intravenous infusion of busulfan, for a 6-h dosing schedule during 4 days (16 doses)

The rates of under- and overexposure are quite similar for the various time-points. By contrast, all the other methods provided low rates of overexposure but resulted in significant underexposure, especially over the first two doses (AUC1 and AUC2).

Among the patients with an AUC higher than the upper limit using the OPT dose, more than 80 % had an AUC between 1500 and 1800  $\mu\text{M min}$  (>20 % higher than *U*) whatever the timepoint (AUC1, AUC2, and AUC16).

Considering children weighing under 9 kg ( $n = 30$ ), 73.3 % of them had an adequate exposure regarding their AUC (same results obtained for AUC1, AUC2, and AUC16) using OPT doses, 16.7 % were under-dosed and 10 % over-dosed. PTIA was 23.3, 50.0, and 63.3 % for AUC1, AUC2, and AUC16, respectively, with European recommendation-based doses (EMA), 46.7, 60.0, and 83.3 % using doses from the Paci et al. PK model, and 33.3, 60.0, and 70.0 % using the McCune et al. PK model.

### 5.2.2 Target Range 2 (Optimal Only)

Using the highest dose allowing an a priori 100 %-probability to get an AUC <1500  $\mu\text{M min}$  (non-toxic dose), 85.3, 84.0, and 71.2 % of patients had an AUC1 (mean dose 1.34 mg/kg, range 1.24–1.82), AUC2 (mean dose 1.21 mg/kg, range 1.07–1.58), and AUC16 (mean dose 1.08 mg/kg, range 0.91–1.33) within the recommended target interval (900–1500  $\mu\text{M min}$ ), respectively. No patients had an AUC higher than the upper limit (Table 4).

The results were even better in children weighing under 9 kg because 89.6, 85.9, and 86.5 % achieved the 900- to 1500- $\mu\text{M min}$  interval for AUC1, AUC2, and AUC16, respectively, with 0 % of overexposure.

## 6 Discussion

A major application of population pharmacokinetics is to design adequate dosage regimens of drugs to optimize the efficacy and safety, especially those with a narrow therapeutic margin in individual patients. The traditional approach of a model-based dose design is to use a point estimate from a parametric distribution of PK parameters and target a specific exposure value within a target interval [3]. While this approach is simple and intuitive, it is not OPT. As a consequence of the separation principle, no performance criterion is used and the PK variability is ignored in the process of dose calculation. The a priori probability of achieving the target is unseen, yielding a false impression of accuracy.

For most drugs with a narrow therapeutic margin, an interval of OPT exposure has been defined. Clinicians

**Table 4** Percentage of AUC target interval attainment provided by the various dosing approaches

First dose	AUC1			AUC2			AUC16		
	% Inside	% Below (% dev.)	% Above (% dev.)	% Inside (% dev.)	% Below (% dev.)	% Above (% dev.)	% Inside (% dev.)	% Below (% dev.)	% Above (% dev.)
Target range 1: 900–1500 $\mu\text{M min}$									
OPT	82.2 <sup>a</sup>	11.7 (–15.9)	6.1 (+1.8)	79.1 <sup>a</sup>	11.7 (–13.5)	9.2 (+4.2)	80.4	10.4 (–10.9)	9.2 (+10.1)
EMA	31.9	68.1 (–17.6)	0	54.0	44.8 (–15.5)	1.2 (+0.2)	72.4	25.2 (–13.9)	0.6 (+8.0)
PACI	26.4	73.6 (–18.0)	0	46.6	52.8 (–14.6)	0.6 (1.1)	69.9	28.2 (–14.4)	1.8 (+6.1)
MAC	41.7	58.3 (–15.7)	0	65.0	35.0 (–14.5)	0	76.7	19.0 (–3.7)	4.3 (+4.6)
MM	57.7 <sup>a</sup>	42.3 (–14.4)	0	73.0 <sup>a</sup>	23.3 (–15.7)	3.7 (+2.1)	75.5	16.0 (–12.3)	8.5 (+8.7)
Target range 2: AUC <1500 $\mu\text{M min}$									
OPT	85.3	14.7 (+8.2%)	0	84.0	16.0 (+14.2%)	0	71.2	28.8 (+9.2%)	0

AUC area under the concentration-time curve, EMA European Medicines Agency, MAC first dose based on McCune et al. PK model [13], MM multiple-model, MM % dev. mean percentage of deviation of the calculated AUC from the lower or upper bound, OPT optimal, PACI first dose based on Paci et al. PK model [14]

<sup>a</sup> Compared with the highest percentage in the three model-based methods from Nguyen et al. [15], Paci et al. [14], and McCune et al. [13];  $p < 0.05$

usually aim at achieving any drug exposure within this interval for patients, not a specific value. For example, the recommended target interval of the vancomycin trough concentration is 15–20 mg/L [44]. There is no scientific evidence supporting that any precise value within that range is more appropriate than another one.

Targeting an exposure interval is a specific objective, distinct from targeting a value. The traditional model-based approach based on a point estimate of PK parameters is ill-suited to address this task. Stochastic control of a target range appears to be a more natural extension of nonparametric models in the PK community, as the discrete distribution of PK parameters directly results in a discrete distribution of the control objective. However, it is noteworthy that parametric models can also deal with such an objective, but additional steps are necessary, e.g., a discrete approximation [45, 46]. Targeting the center of the interval is an intuitive but suboptimal solution, as shown for busulfan in our case study. If the a priori distribution of the target exposure is not symmetrical but heavy tailed, which is often the case, this dosing approach may result in suboptimal over- or underexposure.

Targeting an exposure interval is a natural extension of the multiple-model, stochastic control approach based on non-parametric, discrete population models [5]. As the entire prior information on the population PK parameters is used in the dose design process, the issues associated with the traditional approaches are properly addressed, and, in addition, both bilateral and unilateral target intervals can be optimally targeted. While original nonparametric population PK models are the natural prior to be used in such an approach, parametric models can also be used after a discretization step, as shown by D'Argenio et al. [19].

D'Argenio and colleagues first presented the principles of targeting an exposure interval with a stochastic control approach [19]. Unfortunately, this approach has received little attention in clinical practice since then.

In the present study, this approach has been applied to the case of busulfan in pediatrics. OPT initial dosing of busulfan in children is critical: the treatment is short, with limited time to adjust the dosage if inadequate, and the consequences of over- and under-exposure can be serious. The results show important conclusions regarding model-based busulfan dosing and in general.

First, our multiple-model, stochastic control approach of initial dosing performed better than the official EMA dosing algorithm and two other recent model-based dosing methods (all based in the traditional approach) in achieving the conventional target range of busulfan AUC of 900–1500  $\mu\text{M min}$ . It was markedly superior for achieving this AUC target interval early during the therapy (after dose one or two), but it also outperformed the other methods in achieving this goal if the initial dose calculated would be

used throughout therapy, with 10 % more patients achieving the target interval compared with the EMA guidelines. Importantly, our approach also performed well in the very young children weighing under 9 kg: achieving adequate exposure in this special population is challenging, as reported in previous studies [13, 14, 47, 48].

To evaluate the ability of our approach, it seemed logical to also compare PTIA with the classical multiple-model approach. In this way, we determined the initial OPT dose allowed to hit the 1200- $\mu\text{M min}$  target for the entire conditioning (AUC16), as made for the three parametric first-dose determination methods. Although it is possible to determine the a priori OPT dose for any chosen target time (AUC1, AUC2, and AUC16) using the classical multiple-model approach, this choice has been made to keep the same settings as the parametric models and perform a fair comparison.

While our results are based on simulations, performances of the EMA, PACI, and MAC dosing methods observed are consistent with previous reports. Zao et al., who evaluated a number of busulfan dosing methods in children by simulation reported that 51–74 % of the patients had an average AUC within the recommended target range (900–1500  $\mu\text{M min}$ ) [17]. Nguyen et al. [15] reported a probability of target attainment (PTA) equal to 74 % with their approach. Using their nomogram dosing (EMA dose), we have found that only 64.4 % of the AUC would be within the recommended target range, and Zao et al. [17] have estimated this proportion at about 70 %. In the study of Zao, assessing the performance of different busulfan dosing [17], they reported a simulation-based PTA of 72 and 74 % using the respective initial dosing from Paci et al. [14] and McCune et al. studies. [13] Initial reports from Paci et al. [14] and McCune et al. [13] studies have shown that their ability to target the AUC window was respectively, 71 and 72 %. Using our approach and initial dose regimens from Paci et al. and McCune et al., we found that the PTA would be approximately 60 % [14] and 70 %, respectively [13].

One of the strengths of our dosing method is the ability to achieve the busulfan AUC target early during therapy. Better target attainment can be obtained with multiple-model-based doses, which are substantially higher than standard doses. This was expected, as the other dosing methods were not specifically designed to hit the therapeutic range after the first dose, but on average over the 16-dose therapy. Using EMA, PACI, or MAC strategies, more than half of the patients are underexposed after the first dose. These results are consistent with previous studies: 56.1 % of patients receiving the initial EMA recommended dose required dose adjustment after the first two doses in a previous study from our group [35], 74 % in the Malär et al. study, [48] 54 % in the Tesfaye et al. study [49], and 67 % in the Buffery et al. study [50].



The better results obtained with our dosing approach for busulfan are in accordance with the theoretical principles of the multiple-model approach, as it is specifically designed to hit a target range of exposure, while parametric approach-based methods require a discretization of the probability density function for changing continuous distribution into discrete distribution. These results indicate that this busulfan dosing approach may be valuable in any case, whether TDM is performed or not. If TDM is planned, this approach can permit earlier and better target achievement before TDM is performed for subsequent dose individualization. If TDM cannot be performed and the initial dose is administered throughout therapy, this dosing approach would still result in more patients with an average AUC within the range of 900–1500  $\mu\text{M min}$  than current standards of busulfan dosing methods. Although the ability of reaching more precisely a target range seems to be established with our approach, specific studies are required to investigate if this method is also capable of improving clinical outcomes.

The busulfan case study also illustrates the general performance and flexibility advantages of this model-based dosing approach over the traditional method. It can accommodate any interval, large or narrow, although the magnitude of the interval obviously influences the target attainment rates. It provides the a priori probability to achieve the target interval for a given patient and a given dosing regimen. It is also possible to target a single bound interval, to maximize efficacy or minimize toxicity.

As shown for busulfan in Table 1, when targeting the conventional AUC interval of 900–1500  $\mu\text{M min}$ , our dosing approach results in a well-balanced proportion of under- and overexposure, while the three other methods provided higher rate of underexposure and lower rates of overexposure. In clinical practice, one may want to prioritize the lower or upper bound of the interval, and especially avoid overexposure associated with potentially life-threatening toxicity. The multiple-dosing approach can also deal adequately with such an objective, as shown in the simulations targeting an AUC <1500  $\mu\text{M min}$ . It is possible to minimize busulfan overexposure, initially or throughout therapy, while preserving efficacy in an OPT way.

This study has a number of limitations that one should take into account. It was based on real PK data collected in quite a large number of children from a single center. An evaluation of this approach on a larger group of patients from several centers needs to be performed to confirm these preliminary results. Additionally, the assessment of the dosing approaches was performed by simulation, not in real patients. A clinical study with the real use of the a priori OPT dose identified would be necessary to confirm that this dosing approach performs better than conventional dosing for this drug.

The number and the relevance of the covariates incorporated in the model may have an impact on the ability to reach a target exposure when using the model for drug dosing. Because covariate inclusion usually results in a decrease in parameter prior variances, precision of the model-based dosing should be increased compared with a model without covariates. As a result, differences in covariate models may influence the comparative performance in exposure targeting of the models compared in this study. Actually, all the models compared in our study included a size descriptor based on body weight. It has been shown that body weight has a major influence on busulfan pharmacokinetics in children, explaining more than 60 % of inter-individual variability in busulfan clearance and  $V_d$ , respectively [36]. However, the other covariates included in the models were somewhat different and this point must be taken into account in the interpretation.

We believe that this approach, owing to its theoretical advantages, may be relevant for the dosage design of many other drugs, both a priori and a posteriori. Virtually all drugs with a predefined PK target interval of exposure are candidates for such dosing. The approach can also be extended to PK-pharmacodynamic models for targeting a pharmacodynamic target interval, such as the international normalized ratio used in the monitoring of vitamin K antagonists [51].

## 7 Conclusion

The general properties of a multiple-model, stochastic control approach in targeting a drug exposure interval have been presented. When applied to a simulation study of busulfan dosing in bone marrow-transplanted children, this approach outperformed traditional model-based dosing approaches, with earlier and better achievement of busulfan target AUC. The approach can be applied for OPT dosing of many drugs, when the target objective is an interval.

### Compliance with Ethical Standards

**Funding** No sources of funding were used for this work. This work was not supported by any academic, company, or sponsor funds.

**Conflict of interest** Michael Philippe, Yves Bertrand, Nathalie Bleyzac, and Sylvain Goutelle declare that they have no conflicts of interest. Michael Neely is partly supported by NIH-NIGMS R01 GM068968 and NIH-NICHD R01 HD070886.

**Ethical approval** This was a non-interventional study without any additional procedure than those used in routine patient care. For these reasons, no institutional review board or ethics committee approval was required, in accordance with the French regulation on biomedical research.



## References

- Burton ME, Shaw LM, Schentag JJ, Evans WE. Applied pharmacokinetics and pharmacodynamics: principles of therapeutic drug monitoring. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 257–812.
- Jelliffe RW, Schumitzky A, Bayard D, et al. Model-based, goal-oriented, individualised drug therapy: linkage of population modelling, new “multiple model” dosage design, Bayesian feedback and individualised target goals. *Clin Pharmacokinet*. 1998;34:57–77.
- Holford NH. Target concentration intervention: beyond Y2K. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;52(Suppl. 1):55S–9S.
- Tod MM, Padoin C, Petitjean O. Individualising aminoglycoside dosage regimens after therapeutic drug monitoring: simple or complex pharmacokinetic methods? *Clin Pharmacokinet*. 2001;40:803–14.
- Jelliffe R, Bayard D, Milman M, et al. Achieving target goals most precisely using nonparametric compartmental models and “multiple model” design of dosage regimens. *Ther Drug Monit*. 2000;22:346–53.
- Katz D, D’Argenio DZ. Discrete approximation of multivariate densities with application to Bayesian estimation. *Comput Stat Data Anal*. 1984;2:27–36.
- Katz D, D’Argenio DZ. Implementation and evaluation of control strategies for individualizing dosage regimens, with application to the aminoglycoside antibiotics. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1986;14:523–37.
- Sheiner LB, Beal S, Rosenberg B, Marathe VV. Forecasting individual pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther*. 1979;26:294–305.
- Rousseau A, Marquet P, Dehond J, et al. Adaptive control methods for the dose individualisation of anticancer agents. *Clin Pharmacokinet*. 2000;38:315–33.
- van Lent-Evens NA, Mathôt RA, Geus WP, et al. Impact of goal-oriented and model-based clinical pharmacokinetic dosing of aminoglycosides on clinical outcome: a cost-effectiveness analysis. *Ther Drug Monit*. 1999;21:63–73.
- Le Meur Y, Büchler M, Thierry A, et al. Individualized mycophenolate mofetil dosing based on drug exposure significantly improves patient outcomes after renal transplantation. *Am J Transplant*. 2007;7:2496–503.
- Evans WE, Relling MV, Rodman JH, et al. Conventional compared with individualized chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1998;338:499–505.
- McCune JS, Bemer MJ, Barrett JS, et al. Busulfan in infant to adult hematopoietic cell transplant recipients: a population pharmacokinetic model for initial and Bayesian dose personalization. *Clin Cancer Res*. 2014;20:754–63.
- Paci A, Vassal G, Moshous D, et al. Pharmacokinetic behavior and appraisal of intravenous busulfan dosing in infants and older children: the results of a population pharmacokinetic study from a large pediatric cohort undergoing hematopoietic stem-cell transplantation. *Ther Drug Monit*. 2012;34:198–208.
- Nguyen L, Fuller D, Lennon S, et al. I.V. busulfan in pediatrics: a novel dosing to improve safety/efficacy for hematopoietic progenitor cell transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2004;33:979–87.
- Long-Boyle JR, Savic R, Yan S, et al. Population pharmacokinetics of busulfan in pediatric and young adult patients undergoing hematopoietic cell transplant: a model-based dosing algorithm for personalized therapy and implementation into routine clinical use. *Ther Drug Monit*. 2015;37:236–45.
- Zao JH, Schechter T, Liu WJ, et al. Performance of busulfan dosing guidelines for pediatric hematopoietic stem cell transplant conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21:1471–8.
- Schumitzky A. Stochastic control of pharmacokinetic systems. In: Maronde RF, editor. *Clin Pharmacol Ther*. New York: Springer; 1986. p. 13–25. Available from: [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-4864-4\\_2](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-4864-4_2). Accessed 15 Sept 2015.
- D’Argenio DZ, Rodman JH. Targeting the systemic exposure of teniposide in the population and the individual using a stochastic therapeutic objective. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1993;21:223–51.
- Lindsay BG. The geometry of mixture likelihoods: a general theory. *Ann Stat*. 1983;11:86–94.
- Mallet A. A maximum likelihood estimation method for random coefficient regression models. *Biometrika*. 1986;73:645–56.
- Jelliffe R, Schumitzky A, Van Gaelder M. Population pharmacokinetics/pharmacodynamics modeling: parametric and non-parametric methods. *Ther Drug Monit*. 2000;22:354–65.
- Schumitzky A. Application of stochastic control theory to optimal design of dosage regimens. In: D’Argenio DZ, editor. *Adv Methods Pharmacokinet Pharmacodyn Syst Anal*. New York: Springer; 199. p. 137–52. Available from: [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-9021-4\\_13](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-9021-4_13). Accessed 15 Sept 2015.
- Tod M, Alet P, Lortholary O, Petitjean O. Implementation and evaluation of a stochastic control strategy for individualizing teicoplanin dosage regimen. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1997;25:695–712.
- Schumitzky A. Nonparametric EM algorithms for estimating prior distributions. *Appl Math Comput*. 1991;45:143–57.
- Slattery JT, Sanden JE, Buckner CD, et al. Graft-rejection and toxicity following bone marrow transplantation in relation to busulfan pharmacokinetics. *Bone Marrow Transplant*. 1995;16:31–42.
- Bolinger AM, Zangwill AB, Slattery JT, et al. Target dose adjustment of busulfan in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001;28:1013–8.
- McCune JS, Gooley T, Gibbs JP, et al. Busulfan concentration and graft rejection in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2002;30:167–73.
- Grochow LB, Jones RJ, Brundrett RB, et al. Pharmacokinetics of busulfan: correlation with veno-occlusive disease in patients undergoing bone marrow transplantation. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989;25:55–61.
- Dix SP, Wingard JR, Mullins RE, et al. Association of busulfan area under the curve with veno-occlusive disease following BMT. *Bone Marrow Transplant*. 1996;17:225–30.
- Cremers S, Schoemaker R, Bredius R, et al. Pharmacokinetics of intravenous busulfan in children prior to stem cell transplantation. *Br J Clin Pharmacol*. 2002;53:386–9.
- Tan H, Petropoulos D, Worth L, et al. Pharmacokinetics and individualized dose adjustment of intravenous busulfan in children with advanced hematologic malignancies undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2004;10:805–12.
- Vassal G, Michel G, Espéron H, et al. Prospective validation of a novel IV busulfan fixed dosing for paediatric patients to improve therapeutic AUC targeting without drug monitoring. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008;61:113–23.
- Bleyzac N, Souillet G, Magron P, et al. Improved clinical outcome of paediatric bone marrow recipients using a test dose and Bayesian pharmacokinetic individualization of busulfan dosage regimens. *Bone Marrow Transplant*. 2001;28:743–51.
- Philippe M, Goutelle S, Guillon J, et al. Should busulfan therapeutic range be narrowed in pediatrics? Experience from a large

- cohort of hematopoietic stem cell transplant children. *Bone Marrow Transplant*. 2015;51:72–8.
36. Bartelink I, Boelens JJ, Bredius RGM, et al. Body weight-dependent pharmacokinetics of busulfan in paediatric haematopoietic stem cell transplantation patients. *Clin Pharmacokinet*. 2012;51:331–45.
  37. French Code of Public Health—Article L.1121-1.
  38. French Code of Public Health—Article L.1121-2.
  39. Neely M, Philippe M, Rushing T, et al. Accurately achieving target busulfan exposure in children and adolescents with very limited sampling and the BestDose software. *Ther Drug Monit*. 2016;38:332–42.
  40. Neely MN, van Guilder MG, Yamada WM, et al. Accurate detection of outliers and subpopulations with Pmetrics, a non-parametric and parametric pharmacometric modeling and simulation package for R. *Ther Drug Monit*. 2012;34:467–76.
  41. Neely M, Margol A, Fu X, et al. Achieving target voriconazole concentrations more accurately in children and adolescents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:3090–7.
  42. Neely M, Jelliffe R. Practical therapeutic drug management in HIV-infected patients: use of population pharmacokinetic models supplemented by individualized Bayesian dose optimization. *J Clin Pharmacol*. 2008;48:1081–91.
  43. Bayard DS, Milman MH, Schumitzky A. Design of dosage regimens: a multiple model stochastic control approach. *Int J Biomed Comput*. 1994;36:103–15.
  44. Rybak M, Lomaestro B, Rotschafer JC, et al. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Am J Health Syst Pharm*. 2009;66:82–98.
  45. Gaillet J, Steimer JL, Mallet AJ, et al. A priori lithium dosage regimen using population characteristics of pharmacokinetic parameters. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1979;7:579–628.
  46. Gomeni R, Pineau G, Mentré F. Population kinetics and conditional assessment of the optimal dosage regimen using the P-PHARM software package. *Anticancer Res*. 1994;14:2321–6.
  47. Dalle JH, Wall D, Theoret Y, et al. Intravenous busulfan for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in infants: clinical and pharmacokinetic results. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32:647–51.
  48. Malir R, Sjöo F, Rentsch K, et al. Therapeutic drug monitoring is essential for intravenous busulfan therapy in pediatric hematopoietic stem cell recipients. *Pediatr Transplant*. 2011;15:580–8.
  49. Tesfaye H, Branova R, Klapkova E, et al. The importance of therapeutic drug monitoring (TDM) for parenteral busulfan dosing in conditioning regimen for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children. *Ann Transplant*. 2014;19:214–24.
  50. Buffery PJ, Allen KM, Chin PKL, et al. Thirteen years' experience of pharmacokinetic monitoring and dosing of busulfan: can the strategy be improved? *Ther Drug Monit*. 2014;36:86–92.
  51. Wright DFB, Duffull SB. A Bayesian dose-individualization method for warfarin. *Clin Pharmacokinet*. 2013;52:59–68.
  52. Traub SL, Johnson CE. Comparison of methods of estimating creatinine clearance in children. *Am J Hosp Pharm*. 1980;37:195–201.

## Discussion

Une des applications majeures de la PK de population est la détermination de la posologie initiale des médicaments, notamment pour ceux à marge thérapeutique étroite. La méthode traditionnelle de la détermination de dose avec un modèle PK est basée sur une estimation ponctuelle à partir d'une distribution paramétrique des paramètres PK ainsi qu'une valeur précise de cible. Cette approche n'est cependant pas optimale étant donné qu'elle ne prend notamment pas en compte toute la variabilité PK du médicament dans le calcul de la dose. D'autre part, c'est l'atteinte d'un intervalle cible d'exposition, et non une valeur précise, qui est l'objectif cliniquement pertinent pour la plupart des médicaments à marge thérapeutique étroite.

Cibler cet intervalle est une application naturelle des modèles non paramétriques. Nous avons donc appliqué cette méthodologie au cas spécifique du busulfan en pédiatrie en déterminant individuellement une posologie initiale optimale et en comparant sa capacité à atteindre l'intervalle cible à des stratégies traditionnelles de détermination de la dose *a priori* fondées sur des modèles paramétriques. Les résultats des simulations montrent une proportion d'atteinte de cet intervalle cible plus grande mais également une atteinte plus rapide, dès les deux premières doses. De plus, les patients avec une AUC en dehors de l'intervalle sont plus équitablement répartis de part et d'autres de celui-ci : il n'y a donc pas de tendance marquée au sous- ou au surdosage. Par ailleurs, cette approche est la seule qui permet de gérer de façon optimale une cible d'exposition définie par une borne unilatérale, c'est-à-dire de minimiser la probabilité de sous-dosage ou de surdosage.

Cette approche, développée à travers cet exemple du busulfan, ouvre de nombreux champs dans le domaine du STP. En effet, pour cette même molécule, le clinicien pourrait en fonction de son patient, de ses propres facteurs de risque, définir des bornes de l'intervalle cible plus ou moins élevées, voire même asymétriques s'il lui semble que l'objectif majeur pour ce patient est d'éviter une toxicité ou au contraire d'assurer l'efficacité à tout prix. Il pourra ainsi obtenir la dose *a priori* la plus probable pour atteindre cet intervalle cible « sur mesure ».

Cette méthode reste à évaluer prospectivement pour confirmer les avantages montrés par la simulation. Malgré les limites de ce travail, basé uniquement sur des simulations et données rétrospectives monocentriques, nous pouvons penser que cette méthodologie pourrait s'appliquer

à de nombreuses molécules pour lesquelles une cible PK a été définie par un intervalle, mais également étendue aux modèles PK-PD pour le ciblage de d'intervalles cibles PD. On peut donner par exemple le cas de la warfarine, un anti-vitamine K utilisé dans la prévention des évènements thromboemboliques chez les patients atteints de fibrillation auriculaire. En effet, ce médicament possède une très grande variabilité PK nécessitant des dosages plasmatiques réguliers, ainsi qu'une cible PD connue qui est un INR (international normalized ratios) entre 2 et 3 pour assurer la protection du patient et éviter le risque hémorragique<sup>164</sup>. La construction d'un modèle PK-PD non paramétrique pourrait être utilisée pour déterminer la première dose puis les suivantes permettant d'optimiser l'atteinte de cette cible.

#### 4. Modèle PKPD : étude de la relation exposition-toxicité du busulfan

La principale toxicité du busulfan est la MVO, une atteinte des cellules endothéliales sinusoidales et des hépatocytes, entraînant une obstruction des petites veines hépatiques. Elle touche environ 15 à 20% des enfants recevant un conditionnement par busulfan et est responsable d'une forte morbidité et d'un taux de mortalité atteignant jusqu'à 90% dans les formes sévères<sup>165</sup>. Sa prise en charge s'est nettement améliorée grâce au défibrotide<sup>85,166</sup> et l'amélioration des traitements symptomatiques et de réanimation, mais cette complication reste aujourd'hui toujours la principale crainte des cliniciens.

Comme nous l'avons précédemment explicité, l'AUC est le critère PK de choix pour apprécier l'exposition plasmatique du busulfan. L'intervalle cible 900 - 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$  reste aujourd'hui la référence, bien que de récentes études préconisent d'autres cibles. Bartelink *et al.* par exemple préconisent une cible plus haute, 1190 - 1540  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ , afin d'améliorer la survie des patients<sup>138</sup>.

Dans notre première étude, nous avons rapporté que près de 90% des patients ayant développé une MVO avaient une AUC dans la cible 900 - 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ . Ce résultat remet en question la valeur prédictive de cet intervalle pour le risque de MVO. Historiquement cette valeur fut associée au risque de MVO dans d'anciennes études où le busulfan s'administrait par voie orale<sup>109,117,167</sup>. Cependant, depuis la commercialisation de la forme IV, aucune étude n'a mis en évidence une corrélation nette entre des AUC supérieures à 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$  et la survenue de la MVO<sup>122,125,139,141,168</sup>. Plus précisément, 100%, 83%, 75% et 70% des patients ayant présenté une MVO avaient une AUC < 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$  selon les études respectives de Malär *et al.*<sup>140</sup>, Vassal *et al.*<sup>125</sup>, Okamoto *et al.*<sup>169</sup> et de Michel *et al.*<sup>141</sup>. Toutes ces données remettent donc en question l'intérêt de l'AUC pour la prévention de la MVO.

**L'objectif de ce travail est donc d'étudier les relations entre différents indices PK busulfan et la toxicité par MVO afin d'identifier les déterminants plus spécifiques de la survenue de la MVO dans une large population pédiatrique. L'objectif secondaire était d'analyser les déterminants de la prise de greffe chez ces mêmes sujets.**

**Maximal concentration of intravenous busulfan as a determinant of veno-occlusive disease :  
a pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis in 293 bone marrow transplanted children**

Michaël Philippe<sup>1,2</sup>, Michael Neely<sup>3,4</sup>, Teresa Rushing<sup>4</sup>, Yves Bertrand<sup>1</sup>, Nathalie Bleyzac<sup>5,6</sup>,  
Sylvain Goutelle<sup>2,7,8</sup>

<sup>1</sup> Institute of Pediatric Hematology and Oncology, Lyon, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR CNRS 5558, Université Lyon 1, Villeurbanne, France

<sup>3</sup> Laboratory of Applied Pharmacokinetics and Bioinformatics, Division of Pediatric Infectious Diseases, University of Southern California Children's Hospital Los Angeles, Los Angeles, USA.

<sup>4</sup> Pharmacy Department, University of Southern California Children's Hospital Los Angeles, Los Angeles, USA.

<sup>5</sup> Pharmacotoxicologie, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

<sup>6</sup> EMR 3738 PK/PD modeling in oncology and hematology, Lyon, France

<sup>7</sup> Université Lyon 1, ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon, Lyon, France

<sup>8</sup> Service Pharmaceutique, Groupement Hospitalier de Gériatrie, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

*Manuscrit soumis au journal **Biology of Bone and Marrow Transplantation** en octobre 2017*



## Abstract

Veno-occlusive disease (VOD) is a severe adverse reaction to busulfan-containing regimens used in the preparation of children for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). While the clinical response to intravenous busulfan has been associated with area under the concentration-time curve (AUC), little is known about the influence of busulfan pharmacokinetics (PK) on VOD occurrence. We conducted a retrospective analysis of data from two pediatric HSCT centers to examine determinants of VOD in children who received IV busulfan for HSCT conditioning.

Busulfan pharmacokinetic parameters as well as various indices (maximal concentration – C<sub>max</sub>, AUC) were estimated using a validated Bayesian approach. The influence of available PK, demographic, and clinical variables on the incidence of VOD was evaluated by using logistic regression and classification and regression tree (CART) analyses.

Among the 293 patients included, the median (minimum – maximum) age was 4 (0.2 – 21) years and the median body weight was 17.8 (3.2 – 137) kg. The incidence of VOD was 25.6%. Busulfan C<sub>max</sub> as well as weight <9kg or age <3 years were identified as independent predictors of VOD in logistic regression analysis. CART analysis identified busulfan C<sub>max</sub> over the entire regimen as the strongest predictor of VOD; a cut-off C<sub>max</sub> value  $\geq 1.88$  mg/L was associated with a greater incidence of VOD (63.3% versus 21.3%,  $p < 0.001$ ).

This study suggests that busulfan-associated VOD is in part a concentration-dependent reaction. In addition, the youngest children showed the highest risk of VOD. These findings may have important implications for busulfan dosing and therapeutic drug monitoring practice in HSCT children.

## Introduction

Busulfan is an alkylating agent used as myeloablative therapy prior to hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) (1,2). It has been increasingly used in conditioning protocols as an alternative to total body irradiation, which is often poorly tolerated in children (3,4).

Busulfan is known for having a narrow therapeutic index and large inter-individual pharmacokinetic (PK) variability, which makes its use challenging, especially in children. Low exposure has been associated with non-engraftment (5,6) whereas over-exposure has been associated with transplantation-related complications and death (7). The main toxicity of busulfan is veno-occlusive disease (VOD), also known as sinusoidal obstruction syndrome, which is a life-threatening vascular disease of the liver (8).

A large review has estimated the overall incidence of VOD after HSCT in patients of all ages to be 14.6% for the 1994 to 2007 period (9). Patients with severe VOD resulting in multi-organ failure have an estimated mortality rate of 84.3% (4). VOD remains a major complication in patients receiving conditioning regimens with busulfan before HSCT.

For busulfan, the area under the concentration-time curve (AUC) is considered as the main PK determinant of drug response. The conventional AUC target of busulfan is 900-1500  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$  per dose for a dosing regimen consisting of 2-hour infusions administered every 6 hours over 4 days. Several studies have confirmed a higher risk of graft failure in patients with AUC values lower than 900  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$  (5,6). Furthermore, VOD has also been associated with busulfan AUC when the drug was administered by the oral route (10,11), however most centers in Western countries now use the intravenous formulation of busulfan. To our knowledge, no study has demonstrated a clear relationship between busulfan overexposure ( $\text{AUC} > 1500 \mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ ) and VOD occurrence in patients who were administered IV busulfan (12–15). In addition, the incidence of VOD is significant in patients whose plasma busulfan AUC is within the conventional target range, which suggests that busulfan AUC may not be the strongest determinant of VOD.

In this context it would be desirable to identify the determinants of VOD in patients receiving busulfan and to thoroughly assess the potential relationships between busulfan pharmacokinetics and VOD occurrence.

**The primary objective of this study was therefore to identify determinants of busulfan-induced VOD in a large cohort of HSCT children with available busulfan PK profiles. A secondary objective was to analyze determinants of engraftment in a subset of subjects.**

## **Material and methods**

### ***Setting and Study Population***

Data were collected retrospectively from medical records of patients who received IV busulfan as a part of preconditioning regimen before HSCT for malignant and non-malignant disease between June 2006 and June 2015 in two centers : the pediatric hematology and oncology units of the Hospices Civils de Lyon and the Children's Hospital of Los Angeles (CHLA). Busulfan was mostly administered over 4 consecutive days as a 2-hour infusion administered every 6 hours. Ten patients received busulfan under a once-daily regimen (3 hour infusion) and one under a twice-daily regimen. Therapeutic drug monitoring of busulfan and dose individualization was performed for all patients in order to achieve the conventional AUC target of 900-1500  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$  (3.7-6.1  $\text{mg}\cdot\text{h/L}$ ) per dose. The data collected included patient demographic data, diagnoses, conditioning- and graft-related data, busulfan dosing history, busulfan plasma concentrations, and clinical outcomes. Of note, part of these study data have been used for a population PK analysis previously published by our group (16). This was a non-interventional study, using existing data collected during routine patient care. Both the CHLA Institutional Review Board and the ethics committee of Hospices Civils de Lyon approved the project and a waiver of informed consent was obtained, as we only used existing clinical data that were de-identified for this project.

### ***Pharmacokinetic model***

Busulfan concentrations measured in patients were used to derive various PK estimates by using a Bayesian approach. We used a validated nonparametric population PK model of IV busulfan previously published by our group (16) for Bayesian estimation of busulfan PK parameters in all individuals. This is a one-compartment model with two parameters, the volume of the distribution  $V$  and the elimination rate constant  $K_e$ , both scaled to ideal body weight (IBW) and age. Details on model building and its validation are available in the article by Neely *et al* (16).

First, this model was used as prior to calculate the individual PK parameters and full busulfan PK profiles over the entire therapy, using Bayesian estimation in the Pmetrics R package (17). The

model fits the individual data very well, with no significant bias and low imprecision as shown in a previous publication from our group (18).

Second, we used these individual PK profiles to derive several PK variables for each patient : AUC after the first dose ( $AUC_1$ ), the first two doses ( $AUC_2$ ), and the cumulative AUC over the entire therapy ( $AUC_{cum}$ ); Maximal concentration after the first dose ( $C_{max_1}$ ), the second dose ( $C_{max_2}$ ), and over the first, second, third and fourth day ( $C_{max_{day1}}$ ,  $C_{max_{day2}}$ ,  $C_{max_{day3}}$ , and  $C_{max_{day4}}$ , respectively) and the entire therapy ( $C_{max_{all}}$ ); Minimal concentration after the first dose ( $C_{min_1}$ ) and over the entire therapy and ( $C_{min_{all}}$ ); Proportion (%) of time spent above a given concentration threshold (for example, “ $T>1000$ ” as the proportion of time spent above 1000 ng/mL).

### ***Outcomes***

The primary outcome analyzed was busulfan-associated VOD. VOD was diagnosed according to modified Seattle criteria in both centers (19). Severity of VOD was assessed according to the system of Bearman (20).

The secondary outcome was the engraftment at month 1. Chimerism  $\geq 95\%$  was considered as full donor engraftment, donor chimerism  $\geq 10$  and  $< 95\%$  was considered as partial engraftment, and graft rejection was defined as donor chimerism  $< 10\%$ .

### ***Descriptive statistics and logistic regression analysis***

First, the characteristics of patients with and without VOD were compared. The Chi-squared test was used to compare categorical variables and the Student t-test or the Mann-Whitney U test was used for continuous variables, as appropriate. All tests were two-tailed with statistical significance set at 0.05.

Logistic regression analysis was performed to investigate the variables associated with VOD occurrence. The tested variables were : all PK variables (as described above), patient characteristics (sex, height, age, actual and ideal body weight, each tested as a continuous

variable and as a binary variable with different cut-off values for age and weight), disease characteristics (hematological malignant diseases, hemoglobinopathies, solid malignant diseases, non-malignant diseases), graft characteristics (allo/autograft, number of mismatches, source of cells) and conditioning drugs associated with busulfan.

A stepwise procedure was carried out. All variables were first tested in univariate logistic regression. The statistical significance of the regression coefficient associated with each variable was assessed using the Wald test. Variables with a p value  $<0.10$  in the univariate analyses were included in the multivariate model. A backward stepwise procedure was then applied. Only variables associated with a p value  $<0.05$  were retained in the final model. Adjusted odds ratios (OR) and their associated 95% confidence intervals (CIs) were calculated. The final model was chosen based on statistical results and predictive performance as assessed by receiver operating characteristic (ROC) curve analysis of the final model. A similar procedure was applied to analyze determinants of engraftment. All analyses were conducted using R software, version 3.3.2 (21).

### **Classification and regression tree analysis**

Predictors of VOD were also assessed by using classification and regression tree (CART) analysis. As the variable to be predicted (VOD) is a binary variable, a classification tree was obtained. However, the conventional abbreviation CART will be used throughout the paper for sake of clarity.

CART is a nonparametric, data mining and machine-learning approach. It is a binary recursive partitioning technique, splitting predictors at nodes into two groups of maximum inner homogeneity and between-group heterogeneity. The partitioning is done automatically through all possible predictors and values in order to identify the most significant variables and the optimal cut-off value for continuous variables at each node. CART was performed using the Matlab software (version 2011b, The Mathworks, Natick, MA, USA). A total of 30 variables were examined as potential predictors of VOD.

The minimal number of observations per tree leaf was fixed at 30, i.e. about 10% of the population sample size. Pruning was set to compute the full tree and the optimal sequence of pruned subtrees. The Gini's diversity index was used as criterion for optimal splitting. Ten-fold cross-validations were performed to assess the misclassification cost of the tree and its standard error.

Then, ROC curve analysis implemented in the Matlab software was carried out. The ROC curve was defined as the plot of the true positive rate (sensitivity) versus the false positive rate (1 - specificity) for classification by the classification tree. Ninety-five percent pointwise confidence bounds for the AUC of the ROC curve were obtained by a bootstrap procedure (n = 1000 replicates). In addition, Fisher's exact test was used to compare the rates of VOD between tree leaves and derive OR associated with the node variable for the two strongest predictors. For Fisher's test, statistical significance was set at 0.05.

## Results

### *Patients, disease, and PK characteristics*

**Table 1** summarizes data from the 293 children according to VOD status.

Mean age was 6.5 years, mean body weight was 26.3 kg; 51 children weighed < 9 kg. There were more patients weighing < 9 kg in the VOD group (29.3%) than in the group without VOD (13.3%,  $p<0.01$ ). A graft obtained from a matched, unrelated donor was also more frequent in the patients who developed VOD (32.0% versus 16.1%,  $p<0.01$ ). Fifty-eight percent of patients received cyclophosphamide as a companion conditioning drug and 77.8% of grafts used bone marrow as stem cell source. No significant difference was observed in the use of VOD prophylaxis with defibrotide between the two groups.

The mean number of dose changer per patient was 168 (57.3%) after the second dose. Among them, 71 patients underwent a second dose change after the sixth dose (42.3%). The mean (standard deviation) percent difference between first and last dose amounts was 8.6% ( $\pm 13.9\%$ ).

Mean  $AUC_1$  was 959  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$  and  $AUC_{\text{cum}}$  was 16648  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ , with a wide interpatient variability (coefficient of variation of 42.8% and 17.0%, respectively).  $AUC_1$  was significantly higher in the VOD group (1155  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ ) as compared to patients without VOD (892  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ ;  $p<0.01$ ), as was  $C_{\text{max,all}}$  (1670 versus 1384 ng/mL,  $p<0.01$ ; Table 1).

### *VOD incidence and risk factors*

The overall incidence of VOD was 25.6%, and it occurred after a mean interval of 15.5 days after HSCT. Among the 58 patients with available data for VOD grade, 18 had grade 1 VOD (31.0%), 33 grade 2 (56.9%), and 7 grade 3 (12.1%).

### *Univariate logistic regression*

Univariate analysis found that age was associated with VOD occurrence, both as a continuous variable (OR=0.95,  $p=0.054$ ) and a binary variable (age < 1 year, OR=2.78,  $p=0.002$ , age < 3 years, OR=2.70,  $p < 0.001$ ; age < 5 years, OR=2.17,  $p=0.005$ ). Weight, considered as a binary variable, was also associated with VOD occurrence (< 9 kg, OR=2.7,  $p=0.002$ ). Having a severe combined immunodeficiency or a lymphohistiocytosis (OR=1.79,  $p=0.09$ ), and a conditioning regimen containing etoposide ( $p=0.03$ , OR=6.08) were also associated with VOD. There was no significant association between allograft, autograft or autologous HSCT and the occurrence of VOD. Among PK variables, early exposure indices (AUC<sub>1</sub> : OR=1.42,  $p<10^{-5}$ ; AUC<sub>2</sub> : OR=1.25,  $p<10^{-4}$ ) were significantly associated with VOD occurrence, whereas overall exposure (AUC<sub>cum</sub>) was not. Maximal concentration-related variables (Cmax<sub>1</sub> : OR=3.19,  $p<10^{-4}$ ; Cmax<sub>2</sub> : OR=2.10,  $p=0.08$ ) and Cmax<sub>all</sub> (OR=3.53,  $p=0.08$ ) were significant or near-significant predictors of VOD. The proportion of time spent above 1300 ng/mL ( $p=0.003$ , OR=2.05) was also found to be associated with VOD occurrence.

#### Multivariate logistic regression

Four different models predicted VOD similarly. All included a PK variable related to the peak concentration (Cmax<sub>all</sub> or Cmax<sub>1</sub>) and weight or age as binary variables (Table 2). This result is not surprising considering that Cmax and Cmax<sub>1</sub>, as well as weight and age were highly correlated.

As an example, Figure 1 shows the ROC curve corresponding to the model with the following covariates : Cmax<sub>1</sub> and actual body weight (9 kg cut-off). The ROC curve AUC was 0.618 with a positive predictive value (PPV) and a negative PV (NPV) of 92.3% and 77.5%, respectively.

#### CART analysis

The final classification tree of predictors of VOD is shown in Figure 2. The receiver Operating Characteristic (ROC) curve associated with the classification tree-based prediction of busulfan-induced VOD had an AUC of 0.76, significantly different from 0.50 (95% confidence bounds, 0.70 – 0.82 (Figure 3).

The strongest predictor of VOD occurrence was the estimated maximal concentration of busulfan over the entire therapy ( $C_{max_{all}}$ ), with a threshold estimated at 1.88 mg/L. Children with a  $C_{max_{all}}$  value over this threshold showed a significantly higher rate of VOD than children with  $C_{max_{all}} < 1.88$  mg/L (63.3 versus 21.3%,  $p < 0.001$ ). This difference corresponded to an approximated 6-fold greater risk of VOD. In patients with  $C_{max_{all}} < 1.88$  mg/L, the second predictor of VOD occurrence was height. Patients smaller than 74.8 cm had a significantly greater rate of VOD than patients who were 74.8 cm tall or greater (39.0 versus 18.0%,  $p = 0.006$ ). This height threshold was associated with an almost 3-fold difference in VOD risk between the two sub-groups. In patients with  $C_{max_{all}} < 1.88$  mg/L and height  $\geq 74.8$  cm, a subtree was obtained with various predictors including  $C_{max_{day1}}$ , type of disease (hematological malignancies *versus* other diseases),  $AUC_{cum}$ , and  $C_{max2}$ . It is noteworthy that various  $C_{max}$  indices were found as predictors of VOD in the tree leaves, with a somewhat surprising influence. While  $C_{max_{all}}$  was the strongest predictor of VOD in the entire population, with increased VOD rate for values greater than the identified cut-off, the rates of VOD appeared to decrease for  $C_{max_{day1}}$  and  $C_{max2}$  values greater than the identified cut-off of these two variables (1.43 and 1.10 mg/L, respectively) in some subpopulations of patients described by the tree. Investigation of the observed rates of VOD as a function of  $C_{max_{all}}$  found that the patients with the highest  $C_{max}$  values (median 1.79 mg/L) had the highest rate of VOD (43%) and that the patients with the lowest  $C_{max}$  values (median of 1.02 mg/L) had substantially greater VOD rate (26%) than the three other groups of patients with intermediate  $C_{max}$  values (VOD rates of 21, 19 and 19%, respectively Figure 4).

## **Engraftment**

Data from 154 patients were available for the analysis of engraftment outcome, all from the Lyon center. Full engraftment occurred in 124 children (80.5%) at month 1.

In the univariate analysis, all the variables related to patient weight and age were correlated to probability of success. In addition, hematological malignant disease (OR=16.95,  $p < 10^{-7}$ ), co-administration of cyclophosphamide (OR=3.61,  $p=0.02$ ) were also significantly associated with success, whereas co-administration of fludarabine was significantly associated with non-

engraftment (OR=0.24,  $p < 10^{-4}$ ). Among PK parameters, only  $AUC_{cum}$  was significantly associated with engraftment (OR=1.06,  $p=0.007$ ); whereas  $AUC_1$ ,  $AUC_2$ ,  $C_{max1}$  and  $C_{maxall}$  were not.

In the multivariate analysis,  $AUC_{cum}$  was positively correlated (OR=1.0002,  $p=0.023$ ) and non-malignant disease negatively correlated (OR=0.17,  $p=0.0001$ ) with engraftment. The linear model was as follows :

$$\text{logit } p^* = \ln \frac{p}{1-p} = -1.84 + 0.00024 \times AUC_{cum}^{\S} - 1.73 \times NMD^{\square}$$

\*  $p$  = probability of engraftment

$\S$  Cumulative AUC over the entire therapy ( $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ )

$\square$  Nonmalignant disease as underlying disease

Regarding relative risks associated with these covariates, an increase of  $AUC_{tot}$  of 1000  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$  over the entire conditioning (which would correspond to an increase of 62.5  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}/\text{dose}$  for a 16-dose procedure) was associated with an increase in the probability of engraftment of 27%. As the same way, suffering from a non-malignant disease multiplies the risk of non-engraftment by 5.64.

## Discussion

In this study, we aimed to examining variables associated with VOD, a major complication of busulfan-containing drug regimen used for conditioning before HSCT in a large cohort of children from two centers. A number of plasma exposure metrics could be examined, thanks to Bayesian estimation of individual PK parameters based on a previously validated PK population model. Two statistical approaches were used and the study has provided several important results.

The rate of VOD herein was somewhat similar to that found previously in other pediatric studies (12,15,22-26). This confirms that VOD remains a frequent complication in HSCT children.

Previous studies focused on the cumulative AUC to study relationships between busulfan exposure and both efficacy and toxicity outcomes. Here, we considered that different PK indices could be independent determinants of each outcome. Indeed, our analysis confirms that the determinants of VOD and engraftment may not be the same.

Regarding VOD, we found that maximal concentration of busulfan, but not the AUC, was a significant predictor of this event, using two different statistical models.

Interestingly, the concentration-effect relationship appeared to be partly non-linear (U-shape) with a lower risk of VOD for intermediate C<sub>max</sub> values and a greater risk for low and especially high C<sub>max</sub> values. The CART analysis provided a C<sub>max</sub> cut-off of 1.88 mg/L associated with a high risk of VOD, and nearly two-thirds of patients with a C<sub>max</sub> higher than 1.88 mg/L developed VOD, all of grade 2 or 3. Although further research is necessary to confirm this finding, this value may be used as a toxicity target (upper limit of C<sub>max</sub>) for busulfan therapeutic drug monitoring (TDM). The other determinants of VOD were younger age, lower weight, and lower height, depending on the model used. As these variables are highly correlated in children, these findings are in agreement and confirm that the youngest children have a greater risk of VOD.

The absence of a relationship between AUC and the occurrence of VOD suggests that AUC should not be considered as the only PK index to be optimized in children.

The influence of C<sub>max</sub> on the occurrence of VOD raises questions about the optimal initial dosing of busulfan. A high busulfan C<sub>max</sub> is more likely to occur after the first two doses, before

TDM results are available. In addition, the weight-based dosage of busulfan currently recommended has been designed to optimize the average AUC over the entire conditioning (27); it has not been designed to prevent a potentially high initial C<sub>max</sub>. In the future, it may be interesting to design dosage regimens of busulfan to optimize two different targets, the AUC for efficacy and C<sub>max</sub> for toxicity.

The results also raise questions about the safety of an extended dosing interval for busulfan administration. Based on the results of the present study, once-daily administration should result in higher busulfan C<sub>max</sub> and increased rate of VOD compared with four-times daily dosage. Among the eleven patients who received busulfan once or twice daily, VOD occurred in 9 children (81.8%) with a median C<sub>max</sub> of 3.3 mg/L. Data from the literature are, however, conflicting on this point. No significant difference in VOD rates was found between four-times daily *versus* once-daily intravenous busulfan in the study reported by Ryu *et al.*; however, 5 VOD occurred in the “once-daily” group *versus* 3 with the classical administration scheme (28). Moreover, this study was conducted only in adults and most of conditioning regimens combined busulfan and fludarabine, which is considered to be less toxic than busulfan and cyclophosphamide (29-34). In another study conducted in children, VOD occurred significantly more frequently in the IV once-daily dosing group than in the oral four-times daily group : 11/30 *versus* 4/30 (OR = 3.76,  $p = 0.044$ ) (35). Further research is required to assess the comparative safety of various dosing schedule of IV busulfan in adults and children.

Regarding the secondary outcome, our results confirm the influence of cumulative AUC on engraftment, which is consistent with many prior studies (10,11,36). Suffering from non-malignant disease was also identified as a risk factor of non-engraftment. Non-malignant diseases (severe combined immunodeficiency disease, severe aplastic anemia, adrenoleukodystrophy, Niemann-pick disease, chronic granulomatous disease) mostly required fludarabine-based conditioning regimens which is known to be less myeloablative than cyclophosphamide. This could explain the poorer performance on engraftment.

This study has a number of limitations that one should take into account. First, we performed a retrospective data analysis which has inherent biases. As suggested above, a controlled clinical

study comparing various dosage designs of IV busulfan would help to confirm the relationship between busulfan PK and VOD incidence. Moreover, PK data were sparse and obtained in routine conditions. While the modeling approach used to estimate PK quantities has proven its performance, a study with rich PK data would be useful to confirm the concentration-dependent characteristic of VOD.

Overall, the results of the present study indicate that two PK indices may be relevant for busulfan dosing and TDM in children : the AUC, which correlates with engraftment, and Cmax, which appears to predict VOD risk. Although the concentration-dependent characteristic of VOD needs to be clinically confirmed, these findings suggest that busulfan dosing regimens and TDM practices may need to be revised in order to control those two objectives. A goal-oriented, model-based dosing approach as developed by our group may be helpful in such task (18).

## **Conclusion**

Maximal concentration of IV busulfan was found to be a significant predictor of VOD in this study; the C<sub>max</sub> should be kept below 1.88 mg/L to minimize VOD risk. The youngest children showed the highest risk of VOD. Those results support the need for busulfan TDM and target-oriented, model-based dosing approach to optimize both efficacy and safety of IV busulfan in this special population.

## **Acknowledgments**

Michael Philippe and Teresa Rushing collected data.

Michael Philippe, Michael Neely and Teresa Rushing performed the research.

Michael Philippe, Sylvain Goutelle, Michael Neely and Nathalie Bleyzac designed the research study.

Michael Philippe, Sylvain Goutelle and Teresa Rushing analysed the data.

Michael Philippe and Sylvain Goutelle wrote the paper.

## Bibliography

1. Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, Saral R, Beschorner WE, Bias WB, et al. Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N Engl J Med.* 1983;309 :1347–53.
2. Schuler US, Renner UD, Kroschinsky F, Johne C, Jenke A, Naumann R, et al. Intravenous busulphan for conditioning before autologous or allogeneic human blood stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2001;114 :944–50.
3. Cohen A, Békássy AN, Gaiero A, Faraci M, Zecca S, Tichelli A, et al. Endocrinological late complications after hematopoietic SCT in children. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41 Suppl 2 :S43-48.
4. Faraci M, Békássy AN, De Fazio V, Tichelli A, Dini G, EBMT Paediatric and Late Effects Working Parties. Non-endocrine late complications in children after allogeneic haematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41 Suppl 2 :S49-57.
5. McCune JS, Gooley T, Gibbs JP, Sanders JE, Petersdorf EW, Appelbaum FR, et al. Busulfan concentration and graft rejection in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002;30 :167–73.
6. Slattery JT, Sanders JE, Buckner CD, Schaffer RL, Lambert KW, Langer FP, et al. Graft-rejection and toxicity following bone marrow transplantation in relation to busulfan pharmacokinetics. *Bone Marrow Transplant.* 1995;16 :31–42.
7. Bartelink IH, Lalmohamed A, van Reij EML, Dvorak CC, Savic RM, Zwaveling J, et al. Association of busulfan exposure with survival and toxicity after haemopoietic cell transplantation in children and young adults : a multicentre, retrospective cohort analysis. *Lancet Haematol.* 2016;3 :e526–36.
8. Kumar S, DeLeve LD, Kamath PS, Tefferi A. Hepatic veno-occlusive disease (sinusoidal obstruction syndrome) after hematopoietic stem cell transplantation. *Mayo Clin Proc.* 2003;78 :589–98.

9. Coppel JA, Richardson PG, Soiffer R, Martin PL, Kernan NA, Chen A, et al. Hepatic Venous-Occlusive Disease following Stem Cell Transplantation : Incidence, Clinical Course, and Outcome. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16 :157–68.
10. Dix SP, Wingard JR, Mullins RE, Jerkunica I, Davidson TG, Gilmore CE, et al. Association of busulfan area under the curve with veno-occlusive disease following BMT. *Bone Marrow Transplant.* 1996;17 :225–30.
11. Grochow LB, Jones RJ, Brundrett RB, Braine HG, Chen TL, Saral R, et al. Pharmacokinetics of busulfan : correlation with veno-occlusive disease in patients undergoing bone marrow transplantation. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989;25 :55–61.
12. Bartelink IH, Bredius RGM, Belitser SV, Suttorp MM, Bierings M, Knibbe CAJ, et al. Association between busulfan exposure and outcome in children receiving intravenous busulfan before hematologic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* 2009;15 :231–41.
13. Vassal G, Michel G, Espérou H, Gentet JC, Valteau-Couanet D, Doz F, et al. Prospective validation of a novel IV busulfan fixed dosing for paediatric patients to improve therapeutic AUC targeting without drug monitoring. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008;61 :113–23.
14. Geddes M, Kangaroo SB, Naveed F, Quinlan D, Chaudhry MA, Stewart D, et al. High busulfan exposure is associated with worse outcomes in a daily i.v. busulfan and fludarabine allogeneic transplant regimen. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* 2008;14 :220–8.
15. Michel G, Valteau-Couanet D, Gentet J-C, Esperou H, Socié G, Méchinaud F, et al. Weight-based strategy of dose administration in children using intravenous busulfan : Clinical and pharmacokinetic results. *Pediatr Blood Cancer.* 2012;58 :90–7.
16. Neely M, Philippe M, Rushing T, Fu X, van Guilder M, Bayard D, et al. Accurately achieving target busulfan exposure in children and adolescents with very limited sampling and the BestDose software. *Ther Drug Monit.* 2016;38 :332–42.

17. Neely MN, van Guilder MG, Yamada WM, Schumitzky A, Jelliffe RW. Accurate detection of outliers and subpopulations with Pmetrics, a nonparametric and parametric pharmacometric modeling and simulation package for R. *Ther Drug Monit.* 2012;34 :467–76.
18. Philippe M, Neely M, Bertrand Y, Bleyzac N, Goutelle S. A Nonparametric Method to Optimize Initial Drug Dosing and Attainment of a Target Exposure Interval : Concepts and Application to Busulfan in Pediatrics. *Clin Pharmacokinet.* 2017;56 :435–47.
19. McDonald GB, Hinds MS, Fisher LD, Schoch HG, Wolford JL, Banaji M, et al. Venooclusive disease of the liver and multiorgan failure after bone marrow transplantation : a cohort study of 355 patients. *Ann Intern Med.* 1993;118 :255–67.
20. Bearman SI. The syndrome of hepatic veno-occlusive disease after marrow transplantation. *Blood.* 1995;85 :3005–20.
21. R Development Core Team (2005). *R : A language and environment for statistical computing.* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL : <http://www.R-project.org>.
22. Malär R, Sjö F, Rentsch K, Hassan M, Gungör T. Therapeutic drug monitoring is essential for intravenous busulfan therapy in pediatric hematopoietic stem cell recipients. *Pediatr Transplant.* 2011;15 :580–8.
23. Tesfaye H, Branova R, Klapkova E, Prusa R, Janeckova D, Riha P, et al. The importance of therapeutic drug monitoring (TDM) for parenteral busulfan dosing in conditioning regimen for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children. *Ann Transplant.* 2014;19 :214–24.
24. Schechter T, Finkelstein Y, Doyle J, Verjee Z, Moretti M, Koren G, et al. Pharmacokinetic disposition and clinical outcomes in infants and children receiving intravenous busulfan for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* 2007;13 :307–14.
25. Okamoto Y, Nagatoshi Y, Kosaka Y, Kikuchi A, Kato S, Kigasawa H, et al. Prospective pharmacokinetic study of intravenous busulfan in hematopoietic stem cell transplantation in 25 children. *Pediatr Transplant.* 2014;18 :294–301.

26. Ansari M, Théoret Y, Rezgui MA, Peters C, Mezziani S, Desjean C, et al. Association between busulfan exposure and outcome in children receiving intravenous busulfan before hematopoietic stem cell transplantation. *Ther Drug Monit.* 2014;36 :93–9.
27. Nguyen L, Fuller D, Lennon S, Leger F, Puozzo C. I.V. busulfan in pediatrics : a novel dosing to improve safety/efficacy for hematopoietic progenitor cell transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2004;33 :979–87.
28. Ryu S-G, Lee J-H, Choi S-J, Lee J-H, Lee Y-S, Seol M, et al. Randomized Comparison of Four-Times-Daily versus Once-Daily Intravenous Busulfan in Conditioning Therapy for Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13 :1095–105.
29. Russell JA, Tran HT, Quinlan D, Chaudhry A, Duggan P, Brown C, et al. Once-daily intravenous busulfan given with fludarabine as conditioning for allogeneic stem cell transplantation : study of pharmacokinetics and early clinical outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* 2002;8 :468–76.
30. de Lima M, Couriel D, Thall PF, Wang X, Madden T, Jones R, et al. Once-daily intravenous busulfan and fludarabine : clinical and pharmacokinetic results of a myeloablative, reduced-toxicity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in AML and MDS. *Blood.* 2004;104 :857–64.
31. Russell JA, Savoie ML, Balogh A, Turner AR, Larratt L, Chaudhry MA, et al. Allogeneic transplantation for adult acute leukemia in first and second remission with a novel regimen incorporating daily intravenous busulfan, fludarabine, 400 CGY total-body irradiation, and thymoglobulin. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* 2007;13 :814–21.
32. Andersson BS, de Lima M, Thall PF, Wang X, Couriel D, Korbling M, et al. Once daily i.v. busulfan and fludarabine (i.v. Bu-Flu) compares favorably with i.v. busulfan and cyclophosphamide (i.v. BuCy2) as pretransplant conditioning therapy in AML/MDS. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* 2008;14 :672–84.

33. Pidala J, Kim J, Anasetti C, Kharfan-Dabaja MA, Field T, Perkins J, et al. Targeted i.v. BU and fludarabine (t-i.v. BU/Flu) provides effective control of AML in adults with reduced toxicity. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46 :641–9.
34. Perkins JB, Kim J, Anasetti C, Fernandez HF, Perez LE, Ayala E, et al. Maximally tolerated busulfan systemic exposure in combination with fludarabine as conditioning before allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2012;18 :1099–107.
35. Bartelink IH, Bredius RGM, Ververs TT, Raphael MF, Kesteren C van, Bierings M, et al. Once-Daily Intravenous Busulfan with Therapeutic Drug Monitoring Compared to Conventional Oral Busulfan Improves Survival and Engraftment in Children Undergoing Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14 :88–98.
36. Copelan EA, Bechtel TP, Avalos BR, Elder PJ, Ezzone SA, Scholl MD, et al. Busulfan levels are influenced by prior treatment and are associated with hepatic veno-occlusive disease and early mortality but not with delayed complications following marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001;27 :1121–4.

Tables.

Table 1. Patient characteristics

	<b>Patients with VOD (n = 75)</b>	<b>Patients without VOD (n = 218)</b>	<b>Statistics</b>
<b>Centre 1 / Centre 2</b>	43 / 32	135 / 83	p = NS
<b>Age (years), mean (min - max)</b>	5.4 (0.2 – 21)	6.9 (0.2 – 20.7)	p = 0.599
<b>Sex (M :F), n</b>	42 / 33	103 / 115	p = NS
<b>ABW (kg), mean (min - max)</b>	23.8 (4.6 – 137.3)	27.1 (3.2 – 120)	p = NS
<b>≤ 9 kg, number (percentage)</b>	22 (29.3)	29 (13.3)	p = 0.0015
<b>Height (cm), mean (min - max)</b>	101 (50 - 175)	109 (50 - 190)	p=NS
<b>Underlying disease, n (%)</b>			
<i>Hematological malignant disease</i>	31 (41.3)	94 (43.2)	p = NS
<i>Hemoglobinopathies</i>	9 (12)	35 (16.1)	p = NS
<i>Solid malignant tumor</i>	12 (16)	33 (15.1)	p = NS
<i>Non-malignant disease</i>	23 (30.7)	56 (25.7)	p = NS
<i>Thalassemia</i>	4 (5.3)	14 (6.4)	p = NS
<i>Sickle cell</i>	5 (6.7)	21 (9.6)	p = NS
<i>Neuroblastoma</i>	11 (14.7)	26 (11.9)	p = NS
<i>DICS / LHF</i>	12 (16.0)	21 (9.6)	p = NS
<b>Conditioning, n (%)</b>			
<i>Cyclophosphamide</i>	42 (56.0)	127 (58.2)	p = NS
<i>Fludarabine</i>	29 (38.7)	72 (33.0)	p = NS
<i>Melphalan</i>	18 (24.0)	44 (20.2)	p = NS
<i>Thiotepan</i>	6 (8.0)	18 (8.3)	p = NS
<i>Etoposide</i>	4 (5.3)	2 (0.9)	p = NS
<b>Donor, n (%)</b>			
<i>Matched sibling</i>	18 (24)	76 (34.9)	p = NS
<i>Mismatched sibling</i>	0 (-)	3 (1.4)	p = NS
<i>Matched unrelated</i>	24 (32.0)	35 (16.1)	p = 0.0029
<i>Mismatched unrelated</i>	19 (25.3)	64 (29.3)	p = NS
<i>Autologous</i>	14 (18.7)	40 (18.3)	p = NS

<b>Source of graft, n (%)</b>			
<i>Bone Marrow</i>	51 (68.0)	135 (61.9)	p = NS
<i>PBSC</i>	17 (22.7)	45 (20.6)	p = NS
<i>Cord blood</i>	7 (9.3)	38 (17.4)	p = NS
<b>Use of prophylactic debifrotide, n (%)</b>	5 (6.7)	18 (8.3)	p = NS
<b>PK variables, mean (min - max)</b>			
<i>AUC<sub>1</sub> (μmol/L.min)</i>	1155 (529 – 3361)	892 (483 – 2885)	p = 1.16.10 <sup>-6</sup>
<i>AUC<sub>cum</sub> (μmol/L.min)</i>	16648 (3429 – 23271)	16686 (7265 – 24546)	p = NS
<i>Cmax<sub>all</sub> (ng/mL)</i>	1670 (590 – 3826)	1384 (901 – 3348)	p = 2.06.10 <sup>-6</sup>

NS : non significant

**Table 2. Final logistic regression models for VOD**

Model	Covariates	AIC	OR	95%CI	Equation
0	None	363			-
1	Cmax <sub>1</sub> (ng/mL)	315	2.54	1.37 – 4.70	$logit(VOD)^* = -1.78 + 0.351 \times Cmax_1 + 0.74 \times A_{3y}^{\S}$
	3 years of age		0.48	0.27 – 0.84	
2	Cmax <sub>all</sub> (ng/mL)	313	2.88	1.53 – 5.43	$logit(VOD)^* = -2.23 + 1.056 \times Cmax + 0.74 \times A_{3y}^{\S}$
	3 years of age		0.47	0.27 – 0.84	
3	Cmax <sub>1</sub> (ng/mL)	317	2.85	1.55 – 5.24	$logit(VOD)^* = -2.48 + 1.047 \times Cmax_1 + 0.87 \times W_{9kg}^{\#}$
	9 kg		2.20	1.12 – 4.29	
4	Cmax <sub>all</sub> (ng/mL)	314.8	3.16	1.69 – 5.92	$logit(VOD)^* = -3.96 + 0.558 \times Cmax + 0.09 \times W_{9kg}^{\#}$
	9 kg		2.17	1.11 – 4.26	

\*  $logit(VOD)^* = \ln(p/1-p)$  with p = probability of VOD

$\S A_{3y} = 1$  if age < 3 years, 0 otherwise

$\# W_{9kg} = 1$  if body weight < 9kg, 0 otherwise

AIC : Akaike information criterion

OR : odds ratio

95%CI : 95% confidence interval

Cmax<sub>all</sub> : maximal concentration over the entire therapy

Cmax<sub>1</sub> : maximal concentration after the first dose

VOD : veno-occlusive disease

Figures.

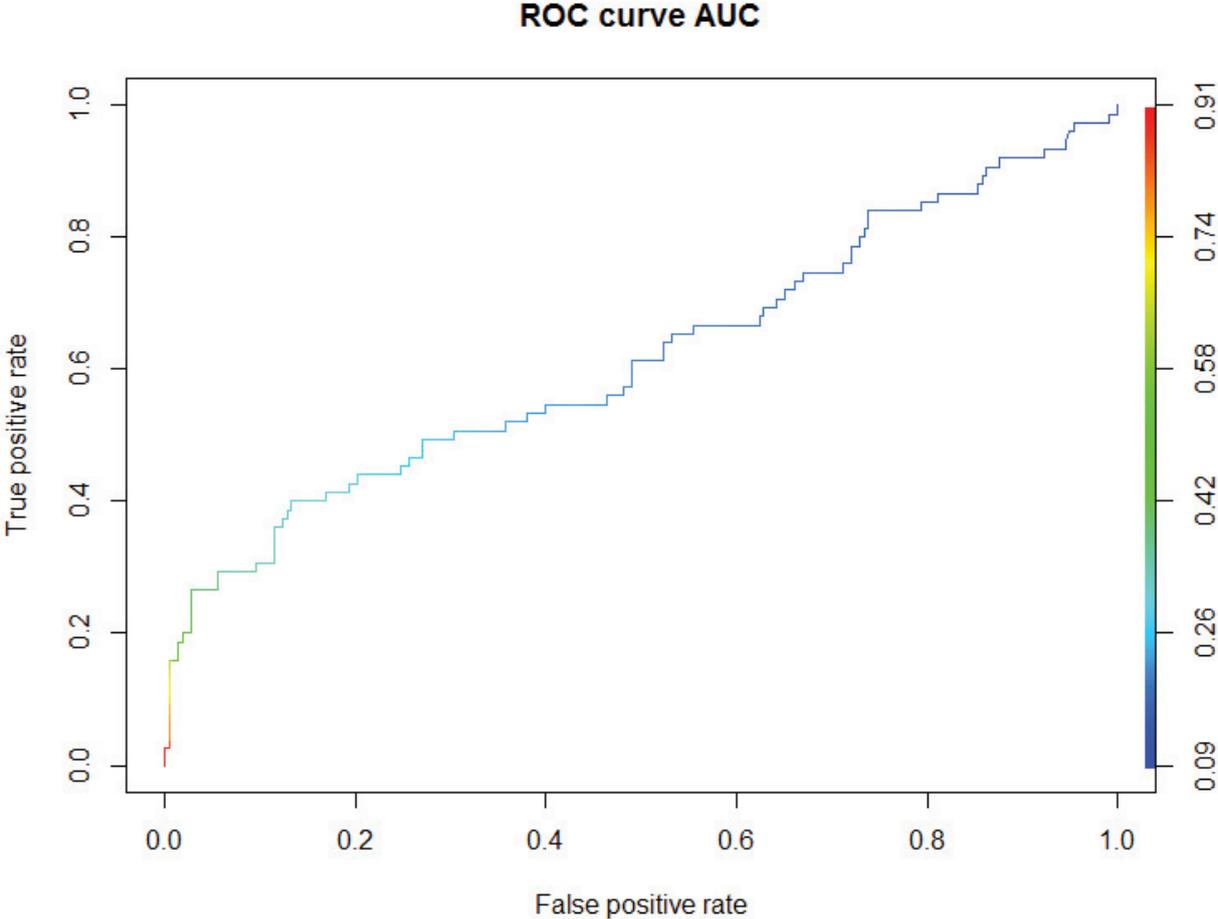
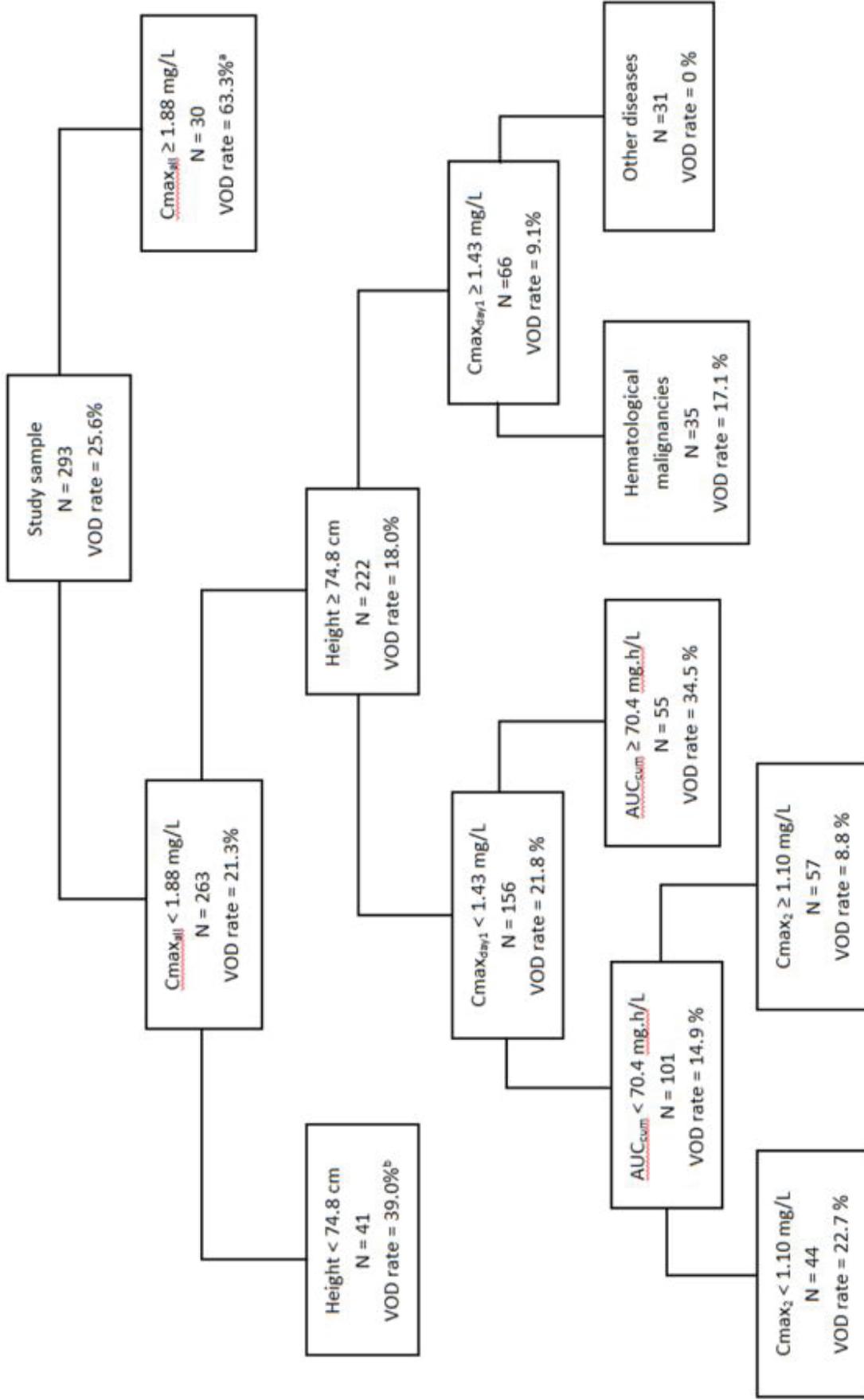


Figure 1. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve of the Cmax<sub>1</sub> and ABW final model.



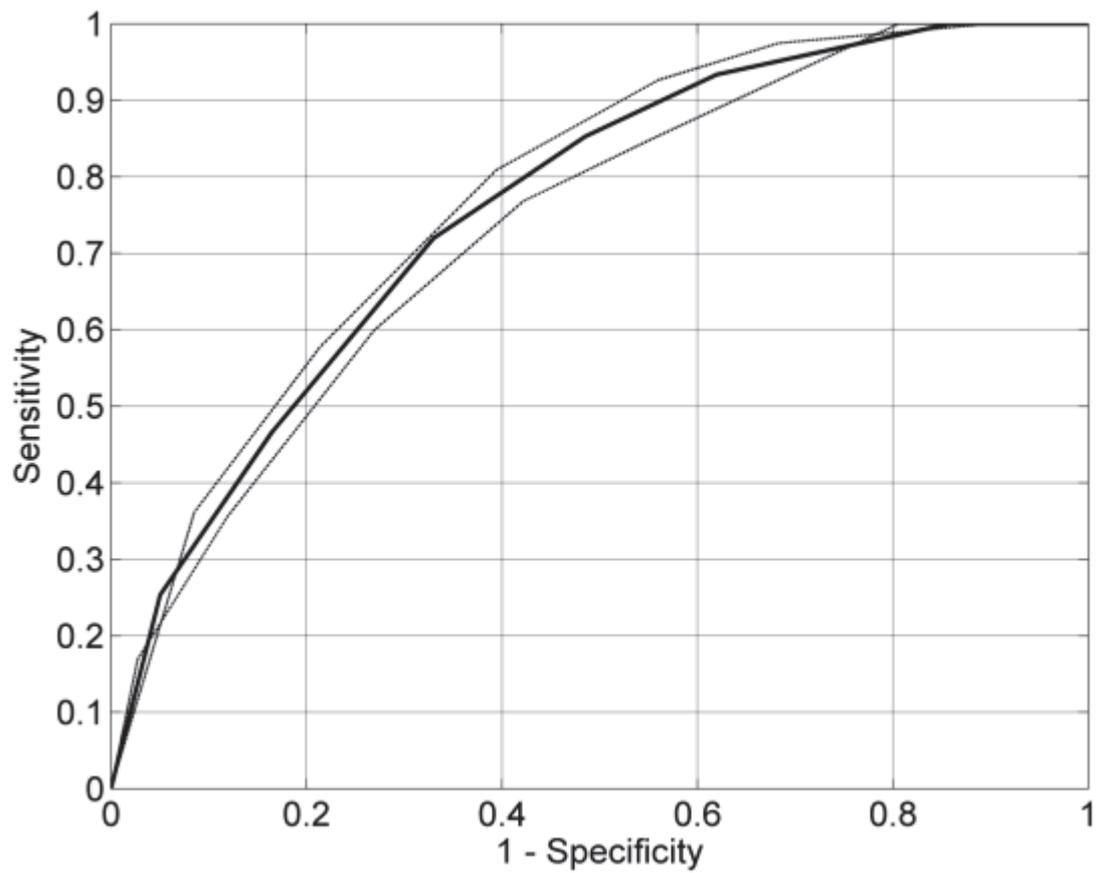
**Figure 2** : Classification tree of predictors of busulfan-induced veno-occlusive disease

Abbreviations :  $C_{max_{all}}$ , estimated busulfan maximal concentration over the entire therapy,  $C_{max_2}$ , estimated busulfan maximal concentration after the second dose,  $C_{max_{day1}}$ , estimated busulfan maximal concentration over the first day of therapy, VOD, veno-occlusive disease.

Comparison of VOD proportion between opposite tree leaves (Fisher exact test)

<sup>a</sup> OR = 6.3 (95% CI, 2.7 – 15.7),  $p < 0.001$

<sup>b</sup> OR = 2.9 (95% CI, 1.3 – 6.3),  $p = 0.006$



**Figure 3.** Receiver Operating Characteristic (ROC) curve associated with the classification tree-based prediction of busulfan-induced veno-occlusive disease. The black solid line is the estimated ROC curve, the dotted lines are 95% bootstrap confidence bounds. The area under the curve (AUC) is 0.76 (95% CI, 0.70 – 0.82)

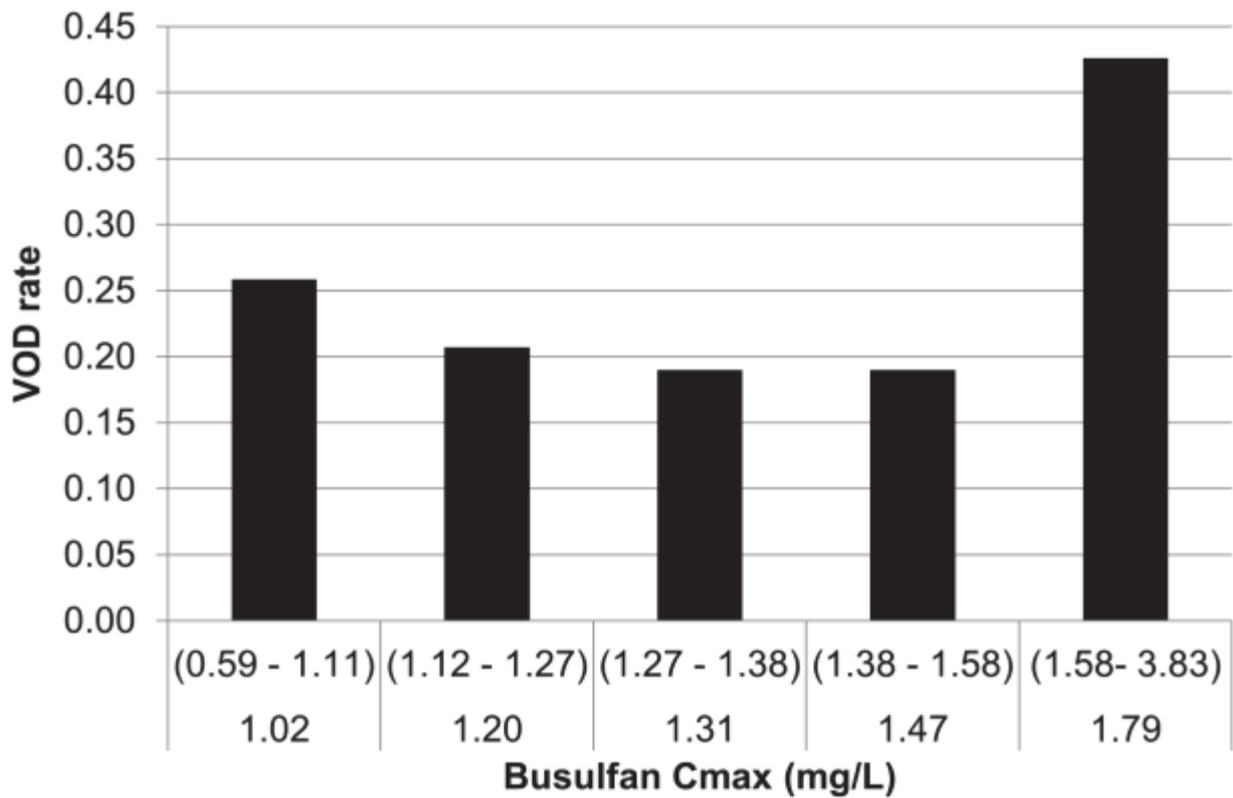


Figure 4. Rate of busulfan-induced veno-occlusive disease (VOD) as a function of estimated busulfan maximal concentration over the entire therapy (Cmax). Each bar represents the observed frequency of VOD in groups of ascending busulfan Cmax. All groups have the same size (n = 58), except the highest Cmax group (n = 61). The x label shows the (min-max) and median values of busulfan Cmax for each group.

## Discussion

La MVO est la principale complication du conditionnement de greffe de CSH chez l'enfant. Il est désormais admis que le busulfan est un facteur de risque certain, mais que d'autres variables rentrent également en compte dans sa survenue<sup>170</sup>. Le STP du busulfan est basé sur l'atteinte de l'intervalle cible d'AUC 900 - 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ , les deux bornes de cet intervalle étant supposément corrélées, pour la borne inférieure, à la prise de greffe et le risque de rechute, et pour la borne supérieure, au risque de MVO. Une analyse de la littérature, notamment depuis la commercialisation de la forme IV, et de nos données rétrospectives suggèrent que la survenue de la MVO n'est pas associée à une AUC supra-thérapeutique. Nous avons recherché les déterminants de la survenue de MVO, en examinant en particulier divers indices PK (l'AUC moyen sur tout le conditionnement, l'AUC après la première dose, la concentration maximum, minimum, le temps passé au dessus de certaines valeurs de concentrations seuils), dans une large cohorte rétrospective.

Parmi les 293 patients inclus de deux différentes cohortes, le modèle PK précédemment décrit<sup>161</sup> nous a permis d'obtenir différents paramètres PK autres que l'AUC classiquement utilisé. On voit ici au passage l'intérêt de la modélisation dans ce type d'étude qui permet de fournir des données non-directement mesurées comme la concentration maximale et minimale de busulfan.

Le résultat principal est que la Cmax du busulfan, et non l'AUC, était un prédicteur significatif de la survenue de la MVO, avec une valeur 1,88 mg/l à un surcroît de risque maximum. A notre connaissance, c'est la première fois qu'un lien établi entre la concentration maximale du busulfan et la toxicité par MVO est établi, et qu'une valeur seuil de Cmax associée à un risque toxique est identifiée.

D'autres variables ont été également été significativement corrélées à la MVO et inclus dans le modèle logistique multivarié, à savoir l'âge et le poids. Les plus jeunes enfants ont un risque accru de MVO par rapport au plus âgés, indépendamment des concentrations atteintes.

Par ailleurs, comme la littérature abondante l'indiquait déjà, la prise de greffe est apparue corrélée à l'AUC.

Ces résultats mettent donc en avant la possibilité que deux critères PK différents puissent définir l'efficacité et la toxicité du busulfan. Bien que d'autres études devront être menées pour confirmer ces résultats, notre étude suggère de considérer désormais pour le STP du busulfan une cible de Cmax à ne pas dépasser pour limiter le risque de MVO.

Ce travail pose également la question de la gestion du risque toxique lors du choix de la dose initiale. La posologie du fabricant et celles alternatives proposées par de nombreux travaux ont été uniquement conçues pour atteindre l'AUC cible, pas pour contrôler la Cmax. La survenue d'une forte concentration maximale dès les premières doses est possible, et peut conduire à un risque accru de MVO d'après nos résultats. Ce risque pourrait ne pas être réduit par le STP et l'adaptation posologique contrairement à l'AUC cumulée, si les lésions de MVO sont déjà produites.

De nouveaux schémas posologiques conçus pour contrôler à la fois l'AUC et la Cmax semblent donc à développer pour optimiser davantage l'efficacité et la sécurité des conditionnements de greffe de CSH à base de busulfan.

La place des nouveaux schémas d'administration du busulfan IV, plus souvent utilisés chez l'adulte que chez l'enfant, avec une seule administration quotidienne au lieu de quatre est également à investiguer de plus près. En effet, la dose étant quatre fois supérieure, la probabilité d'obtenir une Cmax élevée potentiellement toxique est augmentée, ce que suggèrent notre étude et certaines données publiées<sup>171,172</sup>.

## DISCUSSION GENERALE

---

Le busulfan est aujourd'hui fréquemment utilisé dans les protocoles de conditionnement de greffe de CSH en pédiatrie, notamment du fait de la toxicité des conditionnements à base d'ICT. Le busulfan est un médicament à marge thérapeutique étroite avec une forte variabilité PK interindividuelle. Le principal risque lié à son utilisation est la MVO hépatique, également appelé syndrome d'obstruction sinusoidal, qui touche près de 20% des enfants traités et jusqu'à 60% pour les enfants à haut risque<sup>45</sup>. Depuis le début des années 2000, une nouvelle formulation IV du busulfan a permis de réduire significativement la variabilité PK par rapport à la forme orale utilisée auparavant. Cependant, l'incidence des toxicités ne diminue pas et le risque de rejet de greffe et de rechute est toujours une problématique majeure dans la prise en charge de ces pathologies.

Le STP est recommandé pour pouvoir contrôler l'exposition plasmatique du busulfan et adapter les doses suivantes si besoin et semble justifié par les relations PK/PD établies. De nombreuses études ont démontré l'intérêt de contrôler cette exposition plasmatique en ciblant une AUC entre 900 et 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ . En effet, la probabilité de non prise de greffe est étroitement corrélée avec une exposition inférieure à 900  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ <sup>120,122,123</sup>, alors que la toxicité a été reliée à une surexposition en busulfan<sup>117-119,173</sup>. Cependant, aucune étude depuis la commercialisation de la forme IV n'a mis en évidence une corrélation nette entre des AUC supérieures à 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$  et la survenue de la MVO<sup>122,125,139,141,168</sup>.

Le contrôle de l'exposition au busulfan est donc devenu un objectif majeur dans la prise en charge des conditionnements de greffe. Le choix de la première dose est primordial étant donné la courte durée de traitement (4 jours). La posologie recommandée par le fabricant du busulfan IV est basée sur un travail de modélisation de Nguyen *et al.* de 2004 décrivant cinq niveaux de doses qui permettent normalement, en fonction du poids de l'enfant, de maximiser la probabilité d'atteindre l'intervalle cible d'AUC<sup>124</sup>. Beaucoup d'études montrent que l'atteinte de cet intervalle cible d'AUC cible reste un challenge<sup>134,140,142</sup>. Depuis ce travail de N'Guyen *et al.*, de nombreuses équipes ont publié des études PK de population du busulfan en pédiatrie et proposé des méthodes alternatives de calcul de posologie<sup>91,126-128,168,174,175</sup>. Cependant, peu ou pas d'études ont remis en cause la cible elle-même, ni n'ont validé les performances de leur modèle pour l'adaptation posologique. Enfin la MVO et des déterminants PK n'ont jamais été spécifiquement considérés.

**Dans ce travail, nous avons pour objectif d'optimiser la prise en charge des enfants recevant un conditionnement par busulfan IV pour une greffe de CSH en étudiant les relations entre l'exposition du busulfan et ses effets thérapeutiques et toxiques au moyen de la modélisation PK. Les problématiques étaient diverses et comprenaient notamment le choix de la dose initiale, l'amélioration du suivi thérapeutique et de l'adaptation posologique à l'aide de la modélisation et la détermination de critères et de cibles pertinents pour effectuer ce suivi, avec pour finalité une optimisation de la prise de greffe et la prévention de la toxicité.**

Historiquement, une forte expérience du STP Bayésien existe à Lyon, à l'IHOP, que ce soit pour le busulfan mais également pour d'autres médicaments à marge thérapeutique étroite utilisés chez les patients atteints de pathologies malignes ou non (immunosuppresseurs, anti-infectieux). Dans le cas précis du busulfan, près de 150 patients ont été traités au sein de l'IHOP entre 2006 et 2014 pour un conditionnement de greffe de CSH. Plusieurs travaux ont déjà apporté la preuve de l'apport du STP dans la prise en charge par busulfan, notamment les études de McCune et al.<sup>93</sup> et de Bleyzac *et al.*<sup>152,153,176</sup> démontrant un impact direct sur la toxicité et la réussite de la greffe.

Malgré cette pratique répandue du STP du busulfan et le nombre de publications à ce sujet, des questions cliniques et méthodologiques subsistent.

- Premièrement, le STP est utilisé de façon hétérogène selon les centres. La question de la systématisation du STP pour tous les enfants traités se pose, le fabricant du busulfan ne le recommandant que pour les enfants avec un poids inférieur à 9 kg<sup>135</sup>.
- Deuxièmement, la question de l'intervalle cible sur lequel le STP se base, 900 – 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ , est-il optimal ?
- Ensuite, la question de la méthodologie est également centrale. Certains centres se basent encore sur une analyse non compartimentale avec des prélèvements multiples alors que d'autres utilisent les méthodes Bayésiennes.
- Peut-on améliorer l'atteinte de la cible sans dosage, notamment pour la dose initiale ?

- Enfin, la toxicité par MVO persiste malgré le contrôle de l'AUC, y-a-t-il d'autres déterminants PK à celle-ci ?

Ce travail de thèse a donc eu pour objectif de répondre ou d'apporter la matière scientifique pour répondre à ces problématiques. Toutes ces questions sont à l'origine de nos travaux, effectués d'une part à l'IHOP avec toute l'expérience de leur équipe médicale et pharmaceutique sur l'utilisation du busulfan et du STP, mais également en étroite collaboration avec le laboratoire de pharmacocinétique appliquée du Children's Hospital de Los Angeles au sein duquel j'ai pu effectuer une partie de mon travail au cours d'un stage.

Nos travaux ont donc débuté par une analyse des données rétrospectives d'utilisation du busulfan chez les enfants pris en charge à l'IHOP. Le premier point qui a pu être mis en avant dans ce travail était la confirmation de l'apport du STP pour l'atteinte de l'intervalle cible<sup>177</sup>. En effet, plus de 90% des patients ont obtenu une AUC dans la cible conventionnelle, résultat supérieur aux études publiées où cette atteinte se situe plus aux alentours de 75% sans STP mais avec seulement l'utilisation d'une posologie initiale basée sur la modélisation<sup>124,125,141,169,174</sup>. L'importance du STP est donc démontré, étant donné que sans l'utilisation de ce dernier, un quart des patients traités aurait été sous ou surdosé sur l'ensemble du conditionnement (en dehors de l'intervalle cible). Ces patients ayant nécessité un ajustement de dose n'avaient pas de spécificités significatives relatives à leur poids, leur âge ou leur pathologie, indiquant donc que tous les enfants devraient bénéficier du STP.

L'autre questionnement à l'origine de ce travail était celui sur le choix de cet intervalle cible. Cet intervalle est basé sur des études publiées avec les années 2000 avec une utilisation du busulfan par voie orale notamment<sup>117,120,167,173</sup> et est repris continuellement dans tous les articles publiés sans jamais le remettre en question. Nous avons donc comparé les résultats cliniques, tant du point de vue de la prise de greffe que de celui de la toxicité, des patients ayant une AUC au plus près de la médiane de l'intervalle cible (correspondant à notre intervalle cible locale 980 - 1250  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ ) à ceux ayant une AUC située à l'extérieur de cet intervalle cible restreint mais toujours entre les bornes 900 - 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ . Il n'a pas pu être mis en évidence de différence significative entre ces deux groupes de patients. La

cible, et la précision avec laquelle elle est atteinte n'a donc pas l'influence escomptée dans la prise de greffe et l'incidence de la MVO. Cibler un intervalle plus restreint n'améliore donc pas le devenir clinique<sup>177</sup>.

Nous avons également objectivé, à l'aide de cette cohorte rétrospective de patients traités dans notre centre, l'impression existante qu'un STP efficace, maximisant la proportion de patients avec un AUC dans l'intervalle cible, ne suffisait pas à réduire l'incidence de la MVO. Malgré un intervalle cible atteint, l'incidence de la MVO n'était pas inférieure à celle retrouvée dans la littérature. En effet, la majorité des patients ayant développé une MVO dans notre étude avaient une AUC comprise dans l'intervalle cible recommandé et aucune relation statistique n'a pu être mise en avant entre la valeur de l'AUC et la MVO. La MVO n'est donc pas corrélée à l'AUC<sup>177</sup>. Ce premier travail confirme donc le questionnement à la base du projet initial auquel les futurs travaux devront répondre: est-il possible d'améliorer le STP ? La cible est-elle optimale pour la toxicité ?

Le second travail concernait le développement et de la validation d'une méthode Bayésienne non-paramétrique complète. Cette approche non-paramétrique a donc été utilisée à la fois pour le développement d'un modèle PK de population ainsi que pour le développement d'un modèle de détermination de la dose initiale, faisant l'originalité de nos travaux. Le modèle PK non-paramétrique construit sur les données issues de deux cohortes d'enfants traités par busulfan IV (IHOP et Children's Hospital of Los Angeles)<sup>161</sup> était décrit de façon mono-compartimental (et donc deux paramètres PK, le volume de distribution et la constante d'élimination) et 29 points de supports. Ces 29 points de support représentent 29 valeurs possibles de ces paramètres PK, associées chacune à une probabilité. L'autre originalité de ce modèle est la relation des covariables, âge et poids, avec les paramètres PK, avec notamment une relation polynomiale pour la covariable âge reflétant la maturation physiologique des organes chez l'enfant et donc la variation de la valeur de ces paramètres avec le temps.

Les performances du modèle ont été vérifiées en prédisant avec une grande précision les concentrations de busulfan chez 120 enfants non inclus dans la construction du modèle. De plus, les performances de ce modèle ont été validées au regard d'une méthode de référence. Il a permis de simuler plusieurs stratégies de prélèvements sanguins afin d'optimiser la précision du calcul de l'AUC: nous avons montré qu'une stratégie avec seulement deux points combinée à l'algorithme non-paramétrique apportait d'aussi bons résultats que les stratégies

utilisées jusqu'alors utilisant entre 6 et 9 prélèvements. Ce modèle PK, basé sur l'approche non-paramétrique améliore donc la faisabilité du STP : le nombre de prélèvements sanguins à effectuer chez l'enfant est significativement réduit, et la précision dans l'estimation de l'AUC et dans l'adaptation posologique est meilleure.

Le STP permet donc, avec l'adaptation Bayésienne des doses basée sur un modèle PK performant, d'améliorer l'atteinte de l'intervalle cible d'AUC. Afin de poursuivre cette idée d'optimisation de l'atteinte de la cible, l'idée de concevoir une méthode exclusivement dédiée à cet effet sans dosage (notamment pour la dose initiale) était la suite logique de notre réflexion. Tout comme le STP, la détermination de la première dose à donner à l'enfant est également basée sur une approche paramétrique. En effet, le modèle PK de population est sous-jacent dans la posologie préconisée par le fabricant<sup>135</sup>. Bien que ce soit une dose en fonction du poids de l'enfant, elle est basée sur le modèle PK paramétrique de Nguyen *et al.* ayant déterminé les différents niveaux de dose selon la relation log-linéaire entre le poids et la clairance d'élimination du busulfan<sup>124</sup>.

Cela comprend donc les mêmes limites, à savoir qu'une valeur ponctuelle de la clairance d'élimination estimée pour un patient en vue de calculer la posologie initiale optimale pour atteindre la cible, qui elle-même ne peut être qu'une valeur ponctuelle (la plupart du temps la médiane de l'intervalle cible). La connaissance du modèle non-paramétrique et de ses propriétés (discrétisation de la distribution, prise en compte de toute la variabilité PK) couplée à une cible représentée par un intervalle, c'est-à-dire plusieurs valeurs cibles possibles encadrées par deux bornes, nous ont donc permis de développer ce modèle original de détermination de la dose *a priori*. Cette approche avait déjà été abordée par D'Argenio *et al.* qui avait appliqué cette théorie du contrôle stochastique à la problématique du ciblage d'un intervalle cible d'exposition d'un médicament en travaillant sur le téniposide, molécule anciennement utilisée en cancérologie<sup>178</sup>. Notre étude fût cependant la première en tant qu'application sur des données PK réelles issues de patients. Notre méthode s'articule autour de l'idée que n'importe quelle valeur d'AUC comprise dans l'intervalle possède la même probabilité d'être liée à un événement clinique donné (efficacité, toxicité). Elle s'oppose à l'approche traditionnelle (paramétrique) qui est de cibler la médiane de l'intervalle en espérant que l'exposition sera distribuée de façon homogène autour de cette médiane.

Les résultats de ce travail montrent trois points importants. Premièrement, cette méthode permet la détermination de la dose individuelle *a priori* en prenant en compte toute la variabilité PK de la molécule. Ensuite, les performances dans l'atteinte de l'intervalle cible sont meilleures que celles des approches classiques: la proportion de patients avec une AUC dans la cible est plus grande et ce dès les premières doses. Cette notion de vitesse d'atteinte de l'intervalle cible est très importante, notamment dans la problématique de l'utilisation du busulfan. En effet, le conditionnement par busulfan ne dure que quatre jours. Les prélèvements sanguins, leur envoi au laboratoire de pharmacologie, le dosage puis le rendu des résultats entraînent une adaptation posologique seulement possible pour la troisième dose, c'est-à-dire 12h après l'initiation du traitement. S'assurer une probabilité maximale que la dose initiale choisie entraîne une AUC dans l'intervalle cible est donc une aide significative pour le clinicien. Ces résultats doivent tout de même être mis en regard des autres méthodes de détermination de la dose *a priori* qui, elles, étaient élaborées dans l'objectif d'atteindre l'intervalle cible d'AUC moyenne sur l'ensemble du conditionnement. Un autre résultat important de cette étude est la distribution homogène des AUC en dehors de l'intervalle sans tendance particulière et sans valeurs aberrantes. Enfin ce travail ouvre de belles perspectives tant au niveau de son application sur d'autres molécules, qu'à sa souplesse d'utilisation. Toutes les molécules dont la cible PK est définie par un intervalle peuvent donc se voir définir une dose initiale à partir de cette approche, la condition préalable étant la construction d'un modèle PK non-paramétrique pour connaître l'information *a priori* issue de la population. On peut prendre l'exemple de la ciclosporine, un immunosuppresseur utilisé dans la prévention de la GVH post-allogreffe de CSH. Chez l'adulte comme chez l'enfant, un intervalle cible est recommandé afin de maximiser l'immunosuppression nécessaire à la prise de greffe tout en évitant la GVH. Un autre exemple est la vancomycine, antibiotique de choix pour les infections à staphylocoques, possède une cible de concentrations résiduelles entre 15 et 20 mg/l<sup>179</sup> afin d'avoir une action bactéricide tout en évitant la néphrotoxicité. Outre son application sur d'autres molécules, la capacité de pouvoir cibler un ensemble de cible permet également d'ajuster l'intervalle cible à souhait et de privilégier pour le clinicien la probabilité de ne pas être toxique, ou au contraire l'efficacité comme objectif majeur.

La dernière partie de ce travail de thèse aborde la problématique de la toxicité et les relations entre la PK du busulfan et la MVO. Lors du STP, on cherche à maintenir une AUC moyenne sur l'ensemble du conditionnement entre 900 et 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$ . Cependant, l'AUC

moyenne ne reflète pas systématiquement une possible surexposition ponctuelle (sur une ou deux doses par exemple) notamment du fait du STP et de sa capacité à équilibrer la valeur moyenne de l'AUC sur l'ensemble du conditionnement. Les profils PK individuels (fluctuations des concentrations au cours du temps) peuvent être complètement différents d'un patient à l'autre en ayant pourtant la même AUC moyenne dans l'intervalle cible. Nous nous sommes donc questionnés sur la pertinence l'AUC comme paramètre à cibler.

Dans un premier temps, le mécanisme propre d'une toxicité médicamenteuse peut amener à penser qu'une lésion induite par ce médicament peut être la conséquence d'une surexposition ponctuelle, et donc non d'une exposition moyenne sur plusieurs jours. De nombreux médicaments ont ce type de mécanisme d'action toxique. L'approche consistant donc à obtenir une AUC moyenne dans la cible peut être discutable. De plus, une analyse bibliographique nous a permis de confirmer l'absence de relation AUC – MVO pour le busulfan IV<sup>117,120,167,173</sup>, confirmée également par notre étude initiale montrant que tous les patients ayant subi une MVO avaient une AUC moyenne dans l'intervalle cible<sup>177</sup>.

Le résultat principal était que la Cmax du busulfan, et non l'AUC, représentait donc un prédicteur significatif de la survenue de la MVO. En revanche, la prise de greffe est bien corrélée à l'AUC moyenne sur l'ensemble du conditionnement ce qui rend encore plus important le rôle du STP pour cette molécule: s'assurer une exposition moyenne dans l'intervalle cible tout en évitant des concentrations sanguines trop élevées.

La série de travaux publiée dans le cadre de cette thèse a permis de remettre en question beaucoup de principes relatifs à l'utilisation du busulfan dans le conditionnement de greffe de CSH. Bien que de très nombreuses études soient régulièrement publiées sur cette molécule, peu apportent quelque chose de novateur et sont seulement publiés de « nouveaux » modèles PK de population et de « nouvelles » recommandations de doses initiales, toutes basées sur la même approche. Notre approche s'est au contraire basée sur une méthodologie novatrice. L'approche non-paramétrique nous a apporté des outils différents et qui se sont montrés plus efficaces et plus pertinents dans le domaine du suivi thérapeutique, du choix de la première dose jusqu'à l'adaptation de ces doses durant le traitement du patient, afin de maximiser ses chances d'être dans la cible. La remise en question du choix de la cible était également nécessaire dans le questionnement du STP du busulfan. Les seuls travaux à ce sujet portaient sur des valeurs plus ou moins différentes des bornes de l'intervalle. Nous nous sommes

intéressés à la possibilité que d'autres marqueurs pouvaient être prédictifs et avons mis en avant que deux cibles devaient être pris en compte pour l'optimisation du STP du busulfan : l'AUC moyenne et la Cmax.

Cependant, de nombreuses questions restent à explorer concernant l'optimisation du conditionnement de greffe. La PK du busulfan doit encore être étudiée, notamment sa variabilité intra-individuelle. En effet nos travaux ont permis de décrire la variabilité interindividuelle, c'est-à-dire la différence dans les concentrations mesurées chez différents patients recevant la même dose (expliquée par les covariables d'intérêt en grande partie), cependant demeure la problématique des variations de concentrations et d'AUC chez un même patient au cours du temps : les paramètres PK d'un patient peuvent se modifier et ce malgré la faible durée du traitement par busulfan<sup>107,180,181</sup>.

Enfin, l'autre point très important à investiguer est l'intérêt du STP des autres cytotoxiques. Le busulfan est toujours utilisé en association dans les conditionnements de greffe, les molécules les plus utilisées étant le cyclophosphamide et la fludarabine. Pour une prise en charge optimale, la totalité de la stratégie thérapeutique doit être alors prise en compte. Pour le cas précis de la MVO par exemple, le cyclophosphamide est un facteur de risque que l'on peut retrouver dans la littérature<sup>45,56,73,165</sup>, tout comme l'état hépatique pré-conditionnement de l'enfant et les mutations génotypiques portant sur les enzymes de métabolisation du busulfan<sup>182-184</sup>. Pareillement, la prise de greffe et la prévention du rejet sont étroitement liées au busulfan, à sa PK, mais également aux autres molécules utilisées. L'étude de la PK de ses autres médicaments et des relations PK – efficacité / toxicité permettraient un STP optimal dans la prise en charge du médicament chez l'enfant conditionné pour une greffe de CSH. Des études ont déjà présenté des résultats sur les relations entre la PK du cyclophosphamide<sup>185,186</sup>, de la fludarabine<sup>187-190</sup> ou de l'étoposide<sup>191</sup> avec leur effet ou leur toxicité dans le conditionnement de greffe de CSH.

## CONCLUSION

---

La greffe de cellules souches hématopoïétique est parfois le seul traitement curatif pour des enfants atteints d'hémopathies malignes, d'hémoglobinopathies, de déficits immunitaires ou de certaines tumeurs solides. La réalisation de cette greffe nécessite un conditionnement avec l'utilisation du busulfan, un cytotoxique myéloablatif avec une forte variabilité pharmacocinétique et une marge thérapeutique étroite. Sa toxicité principale, la maladie veino-occlusive hépatique, est responsable d'une morbi-mortalité conséquente. La mise en place d'un suivi thérapeutique basé sur les informations pharmacocinétiques moyennes de la population pédiatrique ainsi que sur les informations propres au patient, résultats de dosages plasmatiques du busulfan, permettent de maintenir l'exposition au busulfan dans un intervalle cible optimal pour assurer la prise de greffe et limiter la toxicité. Cependant, l'incidence de cette toxicité reste conséquente et le suivi thérapeutique suboptimal.

Dans ce travail, nous avons présenté une approche de modélisation pharmacocinétique de population originale, basée sur une méthode non paramétrique. Notre travail initial a mis en évidence d'une part l'apport du suivi thérapeutique dans l'amélioration de l'atteinte de l'intervalle cible et d'autre part l'absence de relation entre l'atteinte de cette cible et la survenue de la maladie veino-occlusive. Dans un second travail, un modèle pharmacocinétique de population a été développé. C'est le premier modèle validé pour le suivi thérapeutique Bayésien du busulfan et disponible sur un logiciel d'adaptation posologique. Il a également permis de faciliter le suivi thérapeutique en minimisant le nombre de prélèvements sanguins nécessaire à une estimation précise de l'exposition au busulfan. Ce modèle a ensuite été utilisé pour développer un modèle de détermination de la dose initiale. Contrairement aux approches classiques fondées sur des modèles, l'ensemble de la variabilité pharmacocinétique a pu être pris en compte grâce à l'approche non paramétrique. L'originalité de ce travail résulte dans la capacité à cibler un intervalle cible d'exposition, et non pas une valeur cible unique. Ce modèle possède des applications larges pour la détermination de la dose *a priori* pour le busulfan (individualisation de l'intervalle et de la valeur des bornes selon les caractéristiques propres du patient) mais également pour de nombreuses molécules pour lesquelles une cible pharmacocinétique a été définie par un intervalle. Enfin, un modèle pharmacocinétique – pharmacodynamique a été élaboré afin d'établir les relations entre divers critères pharmacocinétiques et la survenue de la maladie

veino-occlusive. Ce travail nous a permis de confirmer l'AUC comme marqueur de l'exposition prédictif de la prise de greffe, mais a surtout mis en avant un nouveau marqueur de la toxicité, la concentration maximale. Ces résultats modifient donc la façon d'effectuer le suivi thérapeutique en prenant en compte deux critères pharmacocinétiques dans l'optimisation du conditionnement de greffe.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

1. Hématopoïèse [Internet]. [cited 2017 Sep 20]; Available from: <http://www.celgene.fr/Hematopoiese%20Introduction.aspx>
2. Quine W. The remedial application of bone marrow. *JAMA* 26:2012–3.
3. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous Infusion of Bone Marrow in Patients Receiving Radiation and Chemotherapy. *N Engl J Med* 1957;257(11):491–6.
4. Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, et al. Bone marrow graft in man after conditioning by antilymphocytic serum. *Transplant Proc* 1971;3(1):325–32.
5. Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, et al. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1977;49(4):511–33.
6. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, et al. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med* 1986;314(12):729–35.
7. Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, et al. Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N Engl J Med* 1983;309(22):1347–53.
8. Blazar BR, Ramsay NK, Kersey JH, Krivit W, Arthur DC, Filipovich AH. Pretransplant conditioning with busulfan (Myleran) and cyclophosphamide for nonmalignant diseases. Assessment of engraftment following histocompatible allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 1985;39(6):597–603.
9. Antin JH, Ginsburg D, Smith BR, Nathan DG, Orkin SH, Rapoport JM. Bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: eradication of the PNH clone and documentation of complete lymphohematopoietic engraftment. *Blood* 1985;66(6):1247–50.
10. Michel G, Maraninchi D, Perrimon H, et al. Allogeneic bone marrow transplantation in the treatment of acute leukemias of children. Study of 26 patients. *Arch Fr Pediatr* 1986;43(10):769–74.
11. Frappaz D, Freycon F, Richard O, et al. Major beta-thalassemia and bone marrow allograft. Two cases and a study of the literature. *Pediatric* 1987;42(8):637–44.
12. Tutschka PJ, Copelan EA, Klein JP. Bone marrow transplantation for leukemia following a new busulfan and cyclophosphamide regimen. *Blood* 1987;70(5):1382–8.
13. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* 2001;411(6835):385–9.
14. Lucarelli G, Polchi P, Galimberti M, et al. Marrow transplantation for thalassaemia following busulphan and cyclophosphamide. *Lancet Lond Engl* 1985;1(8442):1355–7.
15. Vermylen C, Fernandez Robles E, Ninane J, Cornu G. Bone marrow transplantation in five children with sickle cell anaemia. *Lancet Lond Engl* 1988;1(8600):1427–8.

16. Stephan JL, Vlekova V, Le Deist F, et al. Severe combined immunodeficiency: a retrospective single-center study of clinical presentation and outcome in 117 patients. *J Pediatr* 1993;123(4):564–72.
17. Camitta BM, Storb R, Thomas ED. Aplastic anemia (first of two parts): pathogenesis, diagnosis, treatment, and prognosis. *N Engl J Med* 1982;306(11):645–52.
18. Agence de Biomédecine, “Le rapport médical et scientifique du prélèvement et de la greffe en France.”
19. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* 1979;300(19):1068–73.
20. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990;75(3):555–62.
21. Sengsayadeth S, Savani BN, Blaise D, Malard F, Nagler A, Mohty M. Reduced intensity conditioning allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult acute myeloid leukemia in complete remission - a review from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. *Haematologica* 2015;100(7):859–69.
22. Le Bourgeois A, Labopin M, Blaise D, et al. Reduced-intensity versus reduced-toxicity myeloablative fludarabine/busulfan-based conditioning regimens for allografted non-Hodgkin lymphoma adult patients: a retrospective study on behalf of the Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2017;28(9):2191–8.
23. Reshef R, Porter DL. Reduced-intensity conditioned allogeneic SCT in adults with AML. *Bone Marrow Transplant* 2015;50(6):759–69.
24. Bornhäuser M, Kienast J, Trenschel R, et al. Reduced-intensity conditioning versus standard conditioning before allogeneic haemopoietic cell transplantation in patients with acute myeloid leukaemia in first complete remission: a prospective, open-label randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;13(10):1035–44.
25. Lee S-E, Cho B-S, Kim J-H, et al. Risk and prognostic factors for acute GVHD based on NIH consensus criteria. *Bone Marrow Transplant* 2013;48(4):587–92.
26. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2005;11(12):945–56.
27. Jagasia M, Arora M, Flowers MED, et al. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2012;119(1):296–307.
28. Kaitin KI. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 1991;325(5):357–8.
29. Lum LG. The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood* 1987;69(2):369–80.
30. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 1974;18(4):295–304.
31. Thomas ED, Storb R, Clift RA, et al. Bone-Marrow Transplantation. *N Engl J Med* 1975;292(17):895–902.

32. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 1995;15(6):825–8.
33. Rowlings PA, Przepiorka D, Klein JP, et al. IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade. *Br J Haematol* 1997;97(4):855–64.
34. Martino R, Romero P, Subirá M, et al. Comparison of the classic Glucksberg criteria and the IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease following HLA-identical sibling stem cell transplantation. *International Bone Marrow Transplant Registry. Bone Marrow Transplant* 1999;24(3):283–7.
35. Ratanatharathorn V, Ayash L, Lazarus HM, Fu J, Uberti JP. Chronic graft-versus-host disease: clinical manifestation and therapy. *Bone Marrow Transplant* 2001;28(2):121–9.
36. Nash RA, Antin JH, Karanes C, et al. Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood* 2000;96(6):2062–8.
37. Martin P, Bleyzac N, Souillet G, et al. Relationship between CsA trough blood concentration and severity of acute graft-versus-host disease after paediatric stem cell transplantation from matched-sibling or unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* 2003;32(8):777–84.
38. Weisdorf D, Haake R, Blazar B, et al. Treatment of moderate/severe acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation: an analysis of clinical risk features and outcome. *Blood* 1990;75(4):1024–30.
39. Wang JZ, Liu KY, Xu LP, et al. Basiliximab for the treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease after unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Proc* 2011;43(5):1928–33.
40. Kitko CL, Levine JE. Extracorporeal photopheresis in prevention and treatment of acute GVHD. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis* 2015;52(2):151–6.
41. Park JH, Lee HJ, Kim SR, et al. Etanercept for steroid-refractory acute graft versus host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Korean J Intern Med* 2014;29(5):630–6.
42. Clavert A, Chevallier P, Guillaume T, et al. Safety and efficacy of rituximab in steroid-refractory chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2013;48(5):734–6.
43. Zeiser R, Burchert A, Lengerke C, et al. Ruxolitinib in corticosteroid-refractory graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: a multi-center survey. *Leukemia* 2015;29(10):2062–8.
44. Mikulska M, Del Bono V, Viscoli C. Bacterial infections in hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Curr Opin Hematol* 2014;21(6):451–8.
45. Corbacioglu S, Carreras E, Ansari M, et al. Diagnosis and severity criteria for sinusoidal obstruction syndrome/veno-occlusive disease in pediatric patients: a new classification from the European society for blood and marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2017;
46. Geller SA, Dubinsky MC, Poordad FF, et al. Early hepatic nodular hyperplasia and submicroscopic fibrosis associated with 6-thioguanine therapy in inflammatory bowel disease. *Am J Surg Pathol* 2004;28(9):1204–11.

47. Al-Mukhaizeem KA, Rosenberg A, Sherker AH. Nodular regenerative hyperplasia of the liver: an under-recognized cause of portal hypertension in hematological disorders. *Am J Hematol* 2004;75(4):225–30.
48. DeLeve LD, McCuskey RS, Wang X, et al. Characterization of a reproducible rat model of hepatic veno-occlusive disease. *Hepatology* 1999;29(6):1779–91.
49. al MM et. Sinusoidal obstruction syndrome/veno-occlusive disease: current situation and perspectives—a position statement from the European Society for Blood... - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2017 Sep 30]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25798682>
50. Wang X, Kanel GC, DeLeve LD. Support of sinusoidal endothelial cell glutathione prevents hepatic veno-occlusive disease in the rat. *Hepatology* 2000;31(2):428–34.
51. Bearman SI. Avoiding hepatic veno-occlusive disease: what do we know and where are we going? *Bone Marrow Transplant* 2001;27(11):1113–20.
52. Wadleigh M, Ho V, Momtaz P, Richardson P. Hepatic veno-occlusive disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Curr Opin Hematol* 2003;10(6):451–62.
53. Carreras E. Veno-occlusive disease of the liver after hemopoietic cell transplantation. *Eur J Haematol* 2000;64(5):281–91.
54. Cesaro S, Pillon M, Talenti E, et al. A prospective survey on incidence, risk factors and therapy of hepatic veno-occlusive disease in children after hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2005;90(10):1396–404.
55. Lee JL, Gooley T, Bensinger W, Schiffman K, McDonald GB. Veno-occlusive disease of the liver after busulfan, melphalan, and thiotepa conditioning therapy: incidence, risk factors, and outcome. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 1999;5(5):306–15.
56. Tsirigotis PD, Resnick IB, Avni B, et al. Incidence and risk factors for moderate-to-severe veno-occlusive disease of the liver after allogeneic stem cell transplantation using a reduced intensity conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant* 2014;49(11):1389–92.
57. McDonald GB, Sharma P, Matthews DE, Shulman HM, Thomas ED. Venocclusive Disease of the Liver after Bone Marrow Transplantation: Diagnosis, Incidence, and Predisposing Factors. *Hepatology* 1984;4(1):116–22.
58. McDonald GB. Veno-occlusive Disease of the Liver and Multiorgan Failure after Bone Marrow Transplantation: A Cohort Study of 355 Patients. *Ann Intern Med* 1993;118(4):255.
59. Jones RJ, Lee K, Beschoner WE, et al. Venocclusive disease of the liver following bone marrow transplantation. *Transplantation* 1987;44(6):778–83.
60. Carreras E. How I manage sinusoidal obstruction syndrome after haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol* 2015;168(4):481–91.
61. Faioni EM, Krachmalnicoff A, Bearman SI, et al. Naturally occurring anticoagulants and bone marrow transplantation: plasma protein C predicts the development of venocclusive disease of the liver. *Blood* 1993;81(12):3458–62.
62. Lee JH, Lee KH, Kim S, et al. Relevance of proteins C and S, antithrombin III, von Willebrand factor, and factor VIII for the development of hepatic veno-occlusive disease in patients

- undergoing allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplant* 1998;22(9):883–8.
63. Tabbara IA, Ghazal CD, Ghazal HH. Early Drop in Protein C and Antithrombin III Is a Predictor for the Development of Venooclusive Disease in Patients Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Hematother* 1996;5(1):79–84.
  64. Dignan FL, Wynn RF, Hadzic N, et al. BCSH/BSBMT guideline: diagnosis and management of veno-occlusive disease (sinusoidal obstruction syndrome) following haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2013;163(4):444–57.
  65. Salat C, Holler E, Kolb H-J, et al. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Confirms the Diagnosis of Hepatic Veno-Occlusive Disease in Patients With Hyperbilirubinemia After Bone Marrow Transplantation. *Blood* 1997;89(6):2184–8.
  66. Moiseev IS, Babenko EV, Sipol AA, Vavilov VN, Afanasyev BV. Measurement of circulating endothelial cells to support the diagnosis of veno-occlusive disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Lab Hematol* 2014;36(4):e27–9.
  67. Hashiguchi M, Okamura T, Yoshimoto K, et al. Demonstration of reversed flow in segmental branches of the portal vein with hand-held color Doppler ultrasonography after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005;36(12):1071–5.
  68. Lassau N, Leclère J, Auperin A, et al. Hepatic veno-occlusive disease after myeloablative treatment and bone marrow transplantation: value of gray-scale and Doppler US in 100 patients. *Radiology* 1997;204(2):545–52.
  69. McCarville MB, Hoffer FA, Howard SC, Goloubeva O, Kauffman WM. Hepatic veno-occlusive disease in children undergoing bone-marrow transplantation: usefulness of sonographic findings. *Pediatr Radiol* 2001;31(2):102–5.
  70. Teefey SA, Brink JA, Borson RA, Middleton WD. Diagnosis of venoocclusive disease of the liver after bone marrow transplantation: value of duplex sonography. *Am J Roentgenol* 1995;164(6):1397–401.
  71. al CS et. Diagnosis and severity criteria for sinusoidal obstruction syndrome/veno-occlusive disease in pediatric patients: a new classification from the Eur... - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2017 Sep 30]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28759025>
  72. Imran H, Tleyjeh IM, Zirakzadeh A, Rodriguez V, Khan SP. Use of prophylactic anticoagulation and the risk of hepatic veno-occlusive disease in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Bone Marrow Transplant* 2006;37(7):677–86.
  73. Johnson DB, Savani BN. How can we reduce hepatic veno-occlusive disease–related deaths after allogeneic stem cell transplantation? *Exp Hematol* 2012;40(7):513–7.
  74. Ruutu T, Juvonen E, Remberger M, et al. Improved Survival with Ursodeoxycholic Acid Prophylaxis in Allogeneic Stem Cell Transplantation: Long-Term Follow-Up of a Randomized Study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(1):135–8.
  75. Corbacioglu S, Cesaro S, Faraci M, et al. Defibrotide for prophylaxis of hepatic veno-occlusive disease in paediatric haemopoietic stem-cell transplantation: an open-label, phase 3, randomised controlled trial. *The Lancet* 2012;379(9823):1301–9.

76. Richardson PG, Ho VT, Giralt S, et al. Safety and efficacy of defibrotide for the treatment of severe hepatic veno-occlusive disease. *Ther Adv Hematol* 2012;3(4):253–65.
77. Chalandon Y, Roosnek E, Mermillod B, et al. Prevention of veno-occlusive disease with defibrotide after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004;10(5):347–54.
78. Dignan F, Gujral D, Ethell M, et al. Prophylactic defibrotide in allogeneic stem cell transplantation: minimal morbidity and zero mortality from veno-occlusive disease. *Bone Marrow Transplant* 2007;40(1):79–82.
79. Commission de la Transparence - DEFITELIO 80 mg/ml [Internet]. HAS - Direction de l'Evaluation Médicale, Economique et de Santé Publique; 2014 [cited 2017 Aug 16]. Available from: [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-13383\\_DEFITELIO\\_PIC\\_INS\\_Avis3\\_CT13383.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-13383_DEFITELIO_PIC_INS_Avis3_CT13383.pdf)
80. Barkholt L, Remberger M, Hassan Z, et al. A prospective randomized study using N-acetyl-L-cysteine for early liver toxicity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2008;41(9):785–90.
81. Bearman SI, Shen DD, Hinds MS, Hill HA, McDonald GB. A phase I/II study of prostaglandin E1 for the prevention of hepatic veno-occlusive disease after bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1993;84(4):724–30.
82. Gluckman E, Jolivet I, Scrobohaci ML, et al. Use of prostaglandin E1 for prevention of liver veno-occlusive disease in leukaemic patients treated by allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1990;74(3):277–81.
83. Clift RA, Bianco JA, Appelbaum FR, et al. A randomized controlled trial of pentoxifylline for the prevention of regimen-related toxicities in patients undergoing allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1993;82(7):2025–30.
84. Chao N. How I treat sinusoidal obstruction syndrome. *Blood* 2014;123(26):4023–6.
85. Richardson PG, Riches ML, Kernan NA, et al. Phase 3 trial of defibrotide for the treatment of severe veno-occlusive disease and multi-organ failure. *Blood* 2016;127(13):1656–65.
86. Sullivan KM, Witherspoon RP, Storb R, et al. Prednisone and azathioprine compared with prednisone and placebo for treatment of chronic graft-v-host disease: prognostic influence of prolonged thrombocytopenia after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1988;72(2):546–54.
87. Patriarca F, Skert C, Bonifazi F, et al. Effect on survival of the development of late-onset non-infectious pulmonary complications after stem cell transplantation. *Haematologica* 2006;91(9):1268–72.
88. Patriarca F, Poletti V, Costabel U, et al. Clinical presentation, outcome and risk factors of late-onset non-infectious pulmonary complications after allogeneic stem cell transplantation. *Curr Stem Cell Res Ther* 2009;4(2):161–7.
89. Hassan M, Ljungman P, Bolme P, et al. Busulfan bioavailability. *Blood* 1994;84(7):2144–50.
90. Hassan M, Ehrsson H, Smedmyr B, et al. Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of busulfan during high-dose therapy. *Bone Marrow Transplant* 1989;4(1):113–4.

91. McCune JS, Bemer MJ, Barrett JS, Scott Baker K, Gamis AS, Holford NHG. Busulfan in infant to adult hematopoietic cell transplant recipients: a population pharmacokinetic model for initial and Bayesian dose personalization. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2014;20(3):754–63.
92. Vassal G, Gouyette A, Hartmann O, Pico JL, Lemerle J. Pharmacokinetics of high-dose busulfan in children. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989;24(6):386–90.
93. McCune JS, Gibbs JP, Slattery JT. *Clin Pharmacokinet* 2000;39(2):155–65.
94. Hassan M, Ehrsson H, Ljungman P. Aspects concerning busulfan pharmacokinetics and bioavailability. *Leuk Lymphoma* 1996;22(5–6):395–407.
95. Czerwinski M, Gibbs JP, Slattery JT. Busulfan conjugation by glutathione S-transferases alpha, mu, and pi. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* 1996;24(9):1015–9.
96. Palmer J, McCune JS, Perales M-A, et al. Personalizing Busulfan-Based Conditioning: Considerations from the American Society for Blood and Marrow Transplantation Practice Guidelines Committee. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016;22(11):1915–25.
97. al VG et. Chronopharmacology of high-dose busulfan in children. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2017 Sep 28]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Chronopharmacology+of+high-dose+busulfan+in+children.+Cancer+Res.+1993>
98. Poonkuzhali B, Chandy M, Srivastava A, Dennison D, Krishnamoorthy R. Glutathione S-transferase activity influences busulfan pharmacokinetics in patients with beta thalassemia major undergoing bone marrow transplantation. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* 2001;29(3):264–7.
99. Grochow LB, Krivit W, Whitley CB, Blazar B. Busulfan disposition in children. *Blood* 1990;75(8):1723–7.
100. Hassan M, Oberg G, Bekassy AN, et al. Pharmacokinetics of high-dose busulphan in relation to age and chronopharmacology. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991;28(2):130–4.
101. Regazzi MB, Locatelli F, Buggia I, et al. Disposition of high-dose busulfan in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 1993;54(1):45–52.
102. Baker KS, Bostrom B, DeFor T, Ramsay NK, Woods WG, Blazar BR. Busulfan pharmacokinetics do not predict relapse in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2000;26(6):607–14.
103. Sandström M, Karlsson MO, Ljungman P, et al. Population pharmacokinetic analysis resulting in a tool for dose individualization of busulphan in bone marrow transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant* 2001;28(7):657–64.
104. Gibbs JP, Murray G, Risler L, Chien JY, Dev R, Slattery JT. Age-dependent tetrahydrothiophenium ion formation in young children and adults receiving high-dose busulfan. *Cancer Res* 1997;57(24):5509–16.
105. Pawlowska AB, Blazar BR, Angelucci E, Baronciani D, Shu XO, Bostrom B. Relationship of plasma pharmacokinetics of high-dose oral busulfan to the outcome of allogeneic bone marrow transplantation in children with thalassemia. *Bone Marrow Transplant* 1997;20(11):915–20.

106. Bostrom B, Enockson K, Johnson A, Bruns A, Blazar B. Plasma pharmacokinetics of high-dose oral busulfan in children and adults undergoing bone marrow transplantation. *Pediatr Transplant* 2003;7 Suppl 3:12–8.
107. Bertholle-Bonnet V, Bleyzac N, Galambrun C, et al. Influence of underlying disease on busulfan disposition in pediatric bone marrow transplant recipients: a nonparametric population pharmacokinetic study. *Ther Drug Monit* 2007;29(2):177–84.
108. Dossiers du Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament Médicaments utilisés en cancérologie (4ème édition). 2001 ; XXII, 1-2.
109. Grochow LB, Jones RJ, Brundrett RB, et al. Pharmacokinetics of busulfan: correlation with veno-occlusive disease in patients undergoing bone marrow transplantation. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989;25(1):55–61.
110. Grochow LB. Busulfan disposition: the role of therapeutic monitoring in bone marrow transplantation induction regimens. *Semin Oncol* 1993;20(4 Suppl 4):18–25; quiz 26.
111. Dix SP;Wingard JR;Mullins RE;Jerkunica I;Davidson TG;Gilmore CE;York RC;Lin LS;Devine SM;Geller RB;Heffner LT;Hillyer CD;Holland HK;Winton EF;Sara R. Association of busulfan area under the curve with veno-occlusive disease following BMT. *Bone Marrow Transplant* 1996;17(2):225–30.
112. Vassal G, Deroussent A, Hartmann O, et al. Dose-dependent neurotoxicity of high-dose busulfan in children: a clinical and pharmacological study. *Cancer Res* 1990;50(19):6203–7.
113. Paz HL, Crilley P, Topolsky DL, Coll WX, Patchefsky A, Brodsky I. Bronchiolitis obliterans after bone marrow transplantation: the effect of preconditioning. *Respir Int Rev Thorac Dis* 1993;60(2):109–14.
114. Ringdén O, Remberger M, Ruutu T, et al. Increased risk of chronic graft-versus-host disease, obstructive bronchiolitis, and alopecia with busulfan versus total body irradiation: long-term results of a randomized trial in allogeneic marrow recipients with leukemia. *Nordic Bone Marrow Transplantation Group. Blood* 1999;93(7):2196–201.
115. Marquet P. Suivi thérapeutique pharmacologique pour l'adaptation de posologie des médicaments. *Pharm Hosp Clin* 2008;143(173):114.
116. Andersson BS, Kashyap A, Gian V, et al. Conditioning therapy with intravenous busulfan and cyclophosphamide (IV BuCy2) for hematologic malignancies prior to allogeneic stem cell transplantation: a phase II study. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2002;8(3):145–54.
117. Dix SP, Wingard JR, Mullins RE, et al. Association of busulfan area under the curve with veno-occlusive disease following BMT. *Bone Marrow Transplant* 1996;17(2):225–30.
118. Ljungman P, Hassan M, Békássy AN, Ringdén O, Oberg G. High busulfan concentrations are associated with increased transplant-related mortality in allogeneic bone marrow transplant patients. *Bone Marrow Transplant* 1997;20(11):909–13.
119. Geddes M, Kangaroo SB, Naveed F, et al. High busulfan exposure is associated with worse outcomes in a daily i.v. busulfan and fludarabine allogeneic transplant regimen. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2008;14(2):220–8.

120. McCune JS, Gooley T, Gibbs JP, et al. Busulfan concentration and graft rejection in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002;30(3):167–73.
121. Slattery JT, Clift RA, Buckner CD, et al. Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: the influence of plasma busulfan levels on the outcome of transplantation. *Blood* 1997;89(8):3055–60.
122. Bartelink IH, Bredius RGM, Belitser SV, et al. Association between busulfan exposure and outcome in children receiving intravenous busulfan before hematologic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2009;15(2):231–41.
123. Bartelink IH, Lalmohamed A, van Reij EML, et al. Association of busulfan exposure with survival and toxicity after haemopoietic cell transplantation in children and young adults: a multicentre, retrospective cohort analysis. *Lancet Haematol* 2016;3(11):e526–36.
124. Nguyen L, Fuller D, Lennon S, Leger F, Puozzo C. I.V. busulfan in pediatrics: a novel dosing to improve safety/efficacy for hematopoietic progenitor cell transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant* 2004;33(10):979–87.
125. Vassal G, Michel G, Espérou H, et al. Prospective validation of a novel IV busulfan fixed dosing for paediatric patients to improve therapeutic AUC targeting without drug monitoring. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008;61(1):113–23.
126. Wall DA, Chan KW, Nieder ML, et al. Safety, efficacy, and pharmacokinetics of intravenous busulfan in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 2010;54(2):291–8.
127. Long-Boyle JR, Savic R, Yan S, et al. Population pharmacokinetics of busulfan in pediatric and young adult patients undergoing hematopoietic cell transplant: a model-based dosing algorithm for personalized therapy and implementation into routine clinical use. *Ther Drug Monit* 2015;37(2):236–45.
128. Savic RM, Cowan MJ, Dvorak CC, et al. Effect of weight and maturation on busulfan clearance in infants and small children undergoing hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2013;19(11):1608–14.
129. Meibohm B, Läer S, Panetta JC, Barrett JS. Population pharmacokinetic studies in pediatrics: issues in design and analysis. *AAPS J* 2005;7(2):E475–487.
130. Anderson BJ, Holford NHG. Mechanism-based concepts of size and maturity in pharmacokinetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008;48:303–32.
131. Anderson BJ, Holford NHG. Mechanistic basis of using body size and maturation to predict clearance in humans. *Drug Metab Pharmacokinet* 2009;24(1):25–36.
132. D’Argenio DZ. Optimal sampling times for pharmacokinetic experiments. *J Pharmacokinet Biopharm* 1981;9(6):739–56.
133. Tod M, Mentré F, Merlé Y, Mallet A. Robust optimal design for the estimation of hyperparameters in population pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Biopharm* 1998;26(6):689–716.
134. Bleyzac N. Suivi thérapeutique pharmacologique du busulfan. *EM-Consulte* 2016;11(4):1–3.

135. Résumé des Caractéristiques du Produit : Busilvex®.
136. Bleyzac N, Barou P, Aulagner G. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for busulfan assay in plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci App* 2000;742(2):427–32.
137. dos Reis EO, Vianna-Jorge R, Suarez-Kurtz G, Lima EL da S, Azevedo D de A. Development of a rapid and specific assay for detection of busulfan in human plasma by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM* 2005;19(12):1666–74.
138. Bartelink IH, Lalmohamed A, van Reij EML, et al. A New Harmonized Approach to Estimate Busulfan Exposure Predicts Survival and Toxicity after Hematopoietic Cell Transplantation in Children and Young Adults: a Multicenter Retrospective Cohort Analysis. *Lancet Haematol* 2016;3(11):e526–36.
139. Zwaveling J, Bredius RGM, Cremers SCLM, et al. Intravenous busulfan in children prior to stem cell transplantation: study of pharmacokinetics in association with early clinical outcome and toxicity. *Bone Marrow Transplant* 2005;35(1):17–23.
140. Malär R, Sjö F, Rentsch K, Hassan M, Güngör T. Therapeutic drug monitoring is essential for intravenous busulfan therapy in pediatric hematopoietic stem cell recipients. *Pediatr Transplant* 2011;15(6):580–8.
141. Michel G, Valteau-Couanet D, Gentet J-C, et al. Weight-based strategy of dose administration in children using intravenous busulfan: Clinical and pharmacokinetic results. *Pediatr Blood Cancer* 2012;58(1):90–7.
142. Tesfaye H, Branova R, Klapkova E, et al. The importance of therapeutic drug monitoring (TDM) for parenteral busulfan dosing in conditioning regimen for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children. *Ann Transplant* 2014;19:214–24.
143. Jelliffe RW. The USC\*PACK PC programs for population pharmacokinetic modeling, modeling of large kinetic/dynamic systems, and adaptive control of drug dosage regimens. *Proc Annu Symp Comput Appl Sic Med Care Symp Comput Appl Med Care* 1991;922–4.
144. Zao JH, Schechter T, Liu WJ, et al. Performance of Busulfan Dosing Guidelines for Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant Conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21(8):1471–8.
145. Philippe M, Bleyzac N, Goutelle S. Pharmacokinetic and Analytical Issues in Busulfan Area Under the Curve Estimation and Simulation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2016;22(1):185.
146. Heggie JR, Wu M, Burns RB, et al. Validation of a high-performance liquid chromatographic assay method for pharmacokinetic evaluation of busulfan. *J Chromatogr B Biomed Sci App* 1997;692(2):437–44.
147. Quernin MH, Poonkuzhali B, Médard Y, et al. High-performance liquid chromatographic method for quantification of busulfan in plasma after derivatization by tetrafluorothiophenol. *J Chromatogr B Biomed Sci App* 1999;721(1):147–52.
148. Bleyzac N, Barou P, Aulagner G. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for busulfan assay in plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci App* 2000;742(2):427–32.

149. Pichini S, Altieri I, Bacosi A, et al. High-performance liquid chromatographic-mass spectrometric assay of busulfan in serum and cerebrospinal fluid. *J Chromatogr* 1992;581(1):143–6.
150. Quernin MH, Duval M, Litalien C, Vilmer E, Aigrain EJ. Quantification of busulfan in plasma by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry. Application to pharmacokinetic studies in children. *J Chromatogr B Biomed Sci App* 2001;763(1–2):61–9.
151. Jenke A, Renner U, Schuler US, et al. Improved assay for determination of busulfan by liquid chromatography using postcolumn photolysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;805(1):147–53.
152. Bleyzac N. The use of pharmacokinetic models in paediatric onco-haematology: effects on clinical outcome through the examples of busulfan and cyclosporine. *Fundam Clin Pharmacol* 2008;22(6):605–8.
153. Bleyzac N, Souillet G, Magron P, et al. Improved clinical outcome of paediatric bone marrow recipients using a test dose and Bayesian pharmacokinetic individualization of busulfan dosage regimens. *Bone Marrow Transplant* 2001;28(8):743–51.
154. Beal SL, Sheiner LB. Methodology of population pharmacokinetics. Drug fate and metabolism. New York, NY: Garret ER, Hirtz J; 1985.
155. Mandema JW, Verotta D, Sheiner LB. Building population pharmacokinetic--pharmacodynamic models. I. Models for covariate effects. *J Pharmacokinet Biopharm* 1992;20(5):511–28.
156. Mentré F, Mallet A. Handling covariates in population pharmacokinetics. *Int J Biomed Comput* 1994;36(1–2):25–33.
157. Wade JR, Beal SL, Sambol NC. Interaction between structural, statistical, and covariate models in population pharmacokinetic analysis. *J Pharmacokinet Biopharm* 1994;22(2):165–77.
158. el Desoky E, Meinshausen J, Bühl K, et al. Generation of pharmacokinetic data during routine therapeutic drug monitoring: Bayesian approach vs. pharmacokinetic studies. *Ther Drug Monit* 1993;15(4):281–8.
159. Thomson AH, Whiting B. Bayesian parameter estimation and population pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 1992;22(6):447–67.
160. Tod MM, Padoin C, Petitjean O. Individualising aminoglycoside dosage regimens after therapeutic drug monitoring: simple or complex pharmacokinetic methods? *Clin Pharmacokinet* 2001;40(11):803–14.
161. Neely M, Philippe M, Rushing T, et al. Accurately achieving target busulfan exposure in children and adolescents with very limited sampling and the BestDose software. *Ther Drug Monit* 2016;38(3):332–42.
162. Jelliffe R, Schumitzky A, Van Guilder M. Population pharmacokinetics/pharmacodynamics modeling: parametric and nonparametric methods. *Ther Drug Monit* 2000;22(3):354–65.
163. Neely MN, van Guilder MG, Yamada WM, Schumitzky A, Jelliffe RW. Accurate detection of outliers and subpopulations with Pmetrics, a nonparametric and parametric pharmacometric modeling and simulation package for R. *Ther Drug Monit* 2012;34(4):467–76.

164. Wright DFB, Duffull SB. A Bayesian dose-individualization method for warfarin. *Clin Pharmacokinet* 2013;52(1):59–68.
165. Cheuk DKL, Wang P, Lee TL, et al. Risk factors and mortality predictors of hepatic veno-occlusive disease after pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007;40(10):935–44.
166. Richardson PG, Ho VT, Giralt S, et al. Safety and efficacy of defibrotide for the treatment of severe hepatic veno-occlusive disease. *Ther Adv Hematol* 2012;3(4):253–65.
167. Copelan EA, Bechtel TP, Avalos BR, et al. Busulfan levels are influenced by prior treatment and are associated with hepatic veno-occlusive disease and early mortality but not with delayed complications following marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;27(11):1121–4.
168. Ansari M, Théoret Y, Rezgui MA, et al. Association between busulfan exposure and outcome in children receiving intravenous busulfan before hematopoietic stem cell transplantation. *Ther Drug Monit* 2014;36(1):93–9.
169. Okamoto Y, Nagatoshi Y, Kosaka Y, et al. Prospective pharmacokinetic study of intravenous busulfan in hematopoietic stem cell transplantation in 25 children. *Pediatr Transplant* 2014;18(3):294–301.
170. Yakushijin K, Atsuta Y, Doki N, et al. Sinusoidal obstruction syndrome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Incidence, risk factors and outcomes. *Bone Marrow Transplant* 2016;51(3):403–9.
171. Ryu S-G, Lee J-H, Choi S-J, et al. Randomized Comparison of Four-Times-Daily versus Once-Daily Intravenous Busulfan in Conditioning Therapy for Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13(9):1095–105.
172. Bartelink IH, Bredius RGM, Ververs TT, et al. Once-Daily Intravenous Busulfan with Therapeutic Drug Monitoring Compared to Conventional Oral Busulfan Improves Survival and Engraftment in Children Undergoing Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(1):88–98.
173. Grochow LB, Jones RJ, Brundrett RB, et al. Pharmacokinetics of busulfan: correlation with veno-occlusive disease in patients undergoing bone marrow transplantation. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989;25(1):55–61.
174. Paci A, Vassal G, Moshous D, et al. Pharmacokinetic behavior and appraisal of intravenous busulfan dosing in infants and older children: the results of a population pharmacokinetic study from a large pediatric cohort undergoing hematopoietic stem-cell transplantation. *Ther Drug Monit* 2012;34(2):198–208.
175. Trame MN, Bergstrand M, Karlsson MO, Boos J, Hempel G. Population pharmacokinetics of busulfan in children: increased evidence for body surface area and allometric body weight dosing of busulfan in children. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2011;17(21):6867–77.
176. Bertolle V, Martin P, Bleyzac N, Aulagner G. Intérêt clinique de l'adaptation des posologies du busulfan et de la ciclosporine chez des enfants greffés de moelle osseuse. [/data/revues/00034509/00620003/165/](http://www.em-consulte.com/en/article/87824) [Internet] 2008 [cited 2017 Oct 12]; Available from: <http://www.em-consulte.com/en/article/87824>

177. Philippe M, Goutelle S, Guitton J, et al. Should busulfan therapeutic range be narrowed in pediatrics? Experience from a large cohort of hematopoietic stem cell transplant children. *Bone Marrow Transplant* 2015;51(1):72–8.
178. D'Argenio DZ, Rodman JH. Targeting the systemic exposure of teniposide in the population and the individual using a stochastic therapeutic objective. *J Pharmacokinet Biopharm* 1993;21(2):223–51.
179. Rybak M, Lomaestro B, Rotschafer JC, et al. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Am J Health Syst Pharm* 2009;66(1):82–98.
180. Lindley C, Shea T, McCune J, et al. Intraindividual variability in busulfan pharmacokinetics in patients undergoing a bone marrow transplant: assessment of a test dose and first dose strategy. *Anticancer Drugs* 2004;15(5):453–9.
181. Gaziev J, Nguyen L, Puozzo C, et al. Novel pharmacokinetic behavior of intravenous busulfan in children with thalassemia undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a prospective evaluation of pharmacokinetic and pharmacodynamic profile with therapeutic drug monitoring. *Blood* 2010;115(22):4597–604.
182. Navarro SL, Randolph TW, Shireman LM, Raftery D, McCune JS. Pharmacometabonomic Prediction of Busulfan Clearance in Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *J Proteome Res* 2016;15(8):2802–11.
183. Nava T, Rezgui MA, Uppugunduri CRS, et al. GSTA1 Genetic Variants and Conditioning Regimen: Missing Key Factors in Dosing Guidelines of Busulfan in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2017;
184. Lin YS, Kerr SJ, Randolph T, Shireman LM, Senn T, McCune JS. Prediction of Intravenous Busulfan Clearance by Endogenous Plasma Biomarkers Using Global Pharmacometabolomics. *Metabolomics Off J Metabolomic Soc* 2016;12(10).
185. McCune JS, Batchelder A, Deeg HJ, et al. Cyclophosphamide following targeted oral busulfan as conditioning for hematopoietic cell transplantation: pharmacokinetics, liver toxicity, and mortality. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2007;13(7):853–62.
186. Kim I-W, Yun H, Choi B, et al. Population pharmacokinetics analysis of cyclophosphamide with genetic effects in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Clin Pharmacol* 2013;69(8):1543–51.
187. Mohanan E, Panetta JC, Lakshmi KM, et al. Population pharmacokinetics of fludarabine in patients with aplastic anemia and Fanconi anemia undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2017;52(7):977–83.
188. Sanghavi K, Wiseman A, Kirstein MN, et al. Personalized fludarabine dosing to reduce nonrelapse mortality in hematopoietic stem-cell transplant recipients receiving reduced intensity conditioning. *Transl Res J Lab Clin Med* 2016;175:103–115.e4.
189. McCune JS, Mager DE, Bemer MJ, Sandmaier BM, Storer BE, Heimfeld S. Association of fludarabine pharmacokinetic/dynamic biomarkers with donor chimerism in nonmyeloablative HCT recipients. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015;76(1):85–96.

190. Bornhauser M, Storer B, Slattery JT, et al. Conditioning with fludarabine and targeted busulfan for transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells. *Blood* 2003;102(3):820–6.
191. Tazawa Y, Shigematsu A, Kasashi K, et al. Pharmacokinetics and dose adjustment of etoposide administered in a medium-dose etoposide, cyclophosphamide and total body irradiation regimen before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Pharm Health Care Sci* 2016;2:18.

# ANNEXES

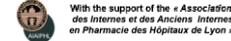
---

# 1. Annexe 1. Communication affichée au congrès EBMT 2015

P653

## Should all the pediatric HSCT patients benefit from busulfan therapeutic drug monitoring? Experience on a large cohort

M. Philippe<sup>1</sup>, S. Goutelle<sup>2</sup>, J. Guillon<sup>3</sup>, Y. Bertrand<sup>4</sup>, N. Bleyzac<sup>1</sup>



<sup>1</sup>Pharmacy Department, Pediatric Hematology and Oncology Unit, IHOP, France ; <sup>2</sup>Pharmacy Department, Groupement hospitalier de gériatrie, Lyon, France ; <sup>3</sup>Chemotherapy Targeting in Oncology Laboratory, Hospices Civils de Lyon ; <sup>4</sup>Transplantation Unit, Pediatric Hematology and Oncology Unit, IHOP, Lyon, France.

### Introduction

Busulfan (Bu) used prior to hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) presents a **narrow therapeutic index**: low drug exposure is associated with increased risk of graft rejection or relapse, and high drug exposure with toxicity (in particular veno-occlusive disease VOD). **Therapeutic drug monitoring (TDM)** and dose adjustment to achieve a target of area under the concentration-time curve (AUC) of **900 to 1500 µM.min** has been shown to improve the outcome.

**The aim of this study was to assess the impact of Bu TDM in a large cohort of children.**

### Materials and methods

**142 HSCT** corresponding to 138 patients receiving **IV Bu 4 times a day for 4 days** were analyzed. The first dose was adjusted to the patients' **body weight (BW)** as recommended by Bu manufacturer<sup>1</sup>.

Two blood samples were drawn 2.5h and 4.5h after the first dose.

Afterwards, Bu PK parameter values (one-compartment model) and AUC were estimated by using **Bayesian estimation** implemented in the USC-PACK software<sup>2</sup> and were used to predict future Bu plasma levels, subsequent individual AUC and to calculate the doses needed to reach the target AUC range.

The main clinical endpoints were **engraftment** (full engraftment if donor chimerism ≥ 95%) and **occurrence of VOD**. Event-free survival (EFS) and overall survival (OS) after HSCT were evaluated for patients with a follow up of at least 6 months

< 9 kg	9 – 16 kg	16 – 23 kg	23 – 34 kg	> 34 kg
1.0 mg/kg	1.2 mg/kg	1.1 mg/kg	0.95 mg/kg	0.8 mg/kg

### Results

Bu AUC were within the AUC target range in 68% of children after the first dose and the mean predicted AUC for the 16 doses would have been in the target range in 74.8% of children if the initial dose was maintained.

Bu dose adjustment was performed in 54.9% of patients, whatever were the weight and pathology. At least one dose adjustment higher than 30% was necessary in each weight and pathology group. **Dose individualization increased the probability to achieve the AUC target to 91% after the 16 doses (p<0.001)**. Achieving the target in thalassemia patients (75%) was less easy than other (92.3%, p=0.047).

Patients characteristics	
Follow up (months) , median (range)	54 (9 – 104)
Age, mean (range)	6.5 (0.2-21)
Weight, mean (range)	23.6 (3.2-87)
< 9 kg, no (%)	23 (16.7)
Allogeneic HSCT, no (%)	88
Autologous HSCT, no (%)	12
<b>Underlying disease (%)</b>	
Hematological malignant diseases	51
Non malignant diseases	21
Solid malignant tumors	12
Hemoglobinopathies	16

% Achievement of AUC target range (% below ; % above)		
After the 1 <sup>st</sup> dose		67.6 (29.5; 2.9)
Mean predicted AUC for the 16 doses	Without TDM	74.8 <sup>†</sup> (18.0; 7.2)
	With TDM	90.8 <sup>†</sup> (7.8; 1.4)

<sup>†</sup>: p<0.001 Chi-2 Pearson test

Event	Mean busulfan AUC/dose (µg/mL.h) of total course (± standard deviation)			
	No.*	Yes	No	p-value <sup>§</sup>
VOD	142	4.62 (0.55)	4.51 (0.70)	0.57
Full engraftment	115	4.58 (0.59)	4.55 (1.05)	0.87
Relapse <sup>†</sup>	110	4.40 (0.57)	4.57 (0.71)	0.40

\*Number of evaluable patients; <sup>§</sup>Student's t-test; <sup>†</sup>Relapse post full or partial engraftment

Full engraftment occurred in **80.1%** of children, while 4.3% experienced rejection. EFS was 88.5% and OS was 92%.

VOD occurred in 26 patients (**18.3%**), none of whom showed a Bu AUC less than 1500 µM.min.

In multivariate Cox regression analysis, **BW <9kg** was found to influence the onset of VOD.

No correlation was found between Bu AUC and VOD occurrence.

Multivariate Cox regression analysis		
Risk factor of VOD	Relative Risk	IC <sub>95%</sub>
Hematological malignant diseases	1.43	[0.3 – 6.9]
Non malignant tumors	0.45	[0.1 – 3.2]
Hemoglobinopathies	2.94	[0.5 – 16.5]
<b>Weight &lt; 9 kg</b>	<b>3.3</b>	<b>[1.1 – 10.6]</b>
AUCtot within target range	1.82	[0.7 – 4.9]

### Conclusion

This study confirms the importance of **TDM** and **PK-based dose individualization** for safe and effective Bu use prior to HSCT for all children and not only a restricted population as usually done. **However, further research is necessary to identify a PK criterion linked more specifically than AUC with VOD.**

<sup>1</sup> Nguyen et al. Bone Marrow Transplant 2004;33(10):979–87.

<sup>2</sup> Laboratory of Applied Pharmacokinetics. USC\* Pack P.C. University of Southern California, School of Medicine, Los Angeles, CA, 1995.

## 2. Annexe 2. Communication affichée au congrès SFGM 2015

P40

### OPTIMISATION DE LA DOSE INITIALE DE BUSULFAN EN ONCO-HEMATOLOGIE PEDIATRIQUE: UNE NOUVELLE METHODE AUGMENTANT LE NOMBRE DE PATIENTS DANS LA CIBLE THERAPEUTIQUE

Michael Philippe<sup>1,2</sup>, Nathalie Bleyzac<sup>1,2</sup>, Yves Bertrand<sup>1</sup>, Michael Neely<sup>3,4</sup>, Sylvain Goutelle<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup>Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique, Lyon; <sup>2</sup>UMR CNRS 5558 - Equipe Evaluation et Modélisation des Effets Thérapeutiques; <sup>3</sup>Laboratory of applied pharmacokinetics; <sup>4</sup>Children's Hospital of Los Angeles, Los Angeles, États-unis; <sup>5</sup>Groupement hospitalier de gériatrie, Hôpital Pierre Garraud, Hospices Civils de Lyon

#### Introduction

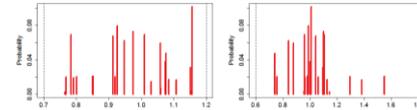
Le busulfan IV est largement utilisé comme agent myélo-ablatif dans le conditionnement des greffes de cellules souches hématopoïétiques chez l'enfant. C'est un médicament à marge thérapeutique étroite, dont l'exposition quantifiée par l'aire sous la courbe des concentrations en fonction du temps (AUC) doit être comprise entre **900 et 1500 µM.min/dose**. L'Agence Européenne du Médicament (EMA) propose un nomogramme pour le calcul de la dose initiale du busulfan IV en fonction du poids de l'enfant, fondé sur une étude pharmacocinétique (PK) de population [1]. Plusieurs travaux ont mis en évidence que ce schéma posologique ne permettait d'atteindre l'intervalle cible que chez une proportion limitée de patients [2,3]. Ces études ont proposé d'autres schémas posologiques fondés sur de nouveaux modèles PK de population, mais aucune méthode n'a été spécialement conçue pour optimiser le pourcentage de patients dans l'intervalle cible d'AUC.

**L'objectif de ce travail est de mettre au point et d'évaluer une nouvelle méthode PK de calcul de la dose initiale de busulfan chez l'enfant, spécialement conçue pour maximiser la probabilité d'atteinte de l'intervalle cible d'AUC.**

#### Matériel et Méthodes

→ Méthode basée sur un modèle PK non-paramétrique de population du busulfan développé par Neely *et al.* chez l'enfant [4].

**Juin 2006 – Mars 2015: 163 enfants** (âge= 6.2 ± 5.4 ans, poids idéal= 22.7 ± 16.6 kg)  
Pathologies malignes / non malignes



Distribution des paramètres PK par 31 valeurs discrètes associées à leur probabilité

**1** Calcul des **paramètres individuels** par méthode Bayésienne **KeS / VS**

**2** Pour 1 patient donné (âge/poids) et chaque dose testée (de 0.5 à 2 mg/kg, pas=0.01)  
→ 31 valeurs possible de **KeS / VS**  
→ 31 profils de concentrations possibles } Associés à 1 **probabilité**  
→ 31 AUC possibles

Dose optimale **individuelle** (OPT dose) associée à la probabilité maximale d'atteindre l'intervalle cible d'AUC après:  
- La 1<sup>ère</sup> dose (AUC1)  
- La 2<sup>ème</sup> dose (AUC2)  
- La dernière dose (AUC16)

Pour chaque dose → Calcul de la probabilité **a priori** que l'AUC soit dans l'intervalle cible

**3** **Simulations**

Les AUC individuelles après 1, 2 et 16 doses ont été simulées pour les 163 patients en utilisant les paramètres PK individuels estimés dans la 1<sup>ère</sup> étape pour chacune des **4 méthodes de détermination de la 1<sup>ère</sup> dose suivantes**:

1) OPT dose    2) dose EMA [1]    3) Modèle PK de Paci [2]    4) Modèle PK de McCune [3]

Les différentes AUC calculées ont ensuite été comparées à l'intervalle cible **900 - 1500 µM.min**

La différence de pourcentage d'atteinte de l'AUC cible entre les méthodes a été évaluée à l'aide du test de Chi-2.

#### Résultats

La **dose moyenne OPT** permettant d'atteindre l'intervalle cible était de **1.49 mg/kg** (min – max: 1.22 – 1.92) pour l'**AUC1**, de **1.37 mg/kg** (1.08 – 1.76) pour l'**AUC2** et de **1.16 mg/kg** (0.84 – 1.73) pour l'**AUC16**. En moyenne, la dose OPT était 29.2% supérieure aux autres méthodes pour l'AUC1, 22.9% supérieure pour l'AUC2 et 8.3% supérieure pour l'AUC16.

Table 2. AUC target range attainment

1 <sup>st</sup> Dose	AUC1			AUC2			AUC16		
	% Inside	% Below	% Above	% Inside	% Below	% Above	% Inside	% Below	% Above
Target range: 900 - 1500 µM.min									
OPT	76.1*	10.4	13.5	76.1*	10.4	13.5	74.9*	9.8	15.3
EMA	41.7	58.3	0	51.5	46.6	1.8	64.4	31.9	3.7
PACI	36.2	63.8	0	51.5	47.9	0.6	58.9	36.2	4.9
MAC	46.6	53.4	0	60.1	38.0	1.8	68.7	24.5	6.8

\* p<0.01

Table 1. Patients' characteristics (n=163)

Patient age (year), mean/median/range	6.1 / 5.0 / 0.17 - 21
Patient IBW (kg), mean/median/range	20.9 / 16.5 / 3.2 - 59.6
No. of patients < 9 kg (%)	30 (18.4%)
Diagnosis, no. of patients (%)	
AML	47 (28.8)
SCID	17 (10.4)
ALL	16 (9.8)
Neuroblastoma	13 (8.0)
Sickle cell anemia	12 (7.4)
Thalassemia	12 (7.4)
MDS	8 (4.9)
Lymphohistocytosis	6 (3.7)
SAA	4 (2.5)
Other	28 (17.2)

ABW, actual body weight; IBW, ideal body weight; AML, acute myeloid leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome; SCID, severe combined immunodeficiency; SAA, severe aplastic anemia.

Quelque soit la cible choisie (AUC1, AUC2 ou AUC16), la dose OPT calculée à partir de ce nouveau modèle permet d'atteindre de manière significative l'intervalle cible dans une plus grande proportion.

#### Conclusion

Une méthode originale de calcul de la dose initiale de busulfan utilisant un modèle non-paramétrique a été spécialement développée pour optimiser l'atteinte de l'intervalle cible d'AUC du busulfan en onco-hématologie pédiatrique. D'après les simulations effectuées, cette approche permet d'augmenter significativement la proportion d'atteinte de la cible et d'atteindre celle-ci plus rapidement en comparaison à la dose recommandée par le fabricant et celles dérivées d'autres modèles PK. Cette méthode permettrait également d'optimiser l'atteinte de la cible sur la totalité du conditionnement, dans le cas où un suivi thérapeutique n'est pas réalisé (AUC16). Ce travail étant basé principalement sur des simulations, l'intérêt de la méthode reste à valider de manière prospective par une étude clinique.

<sup>1</sup> Nguyen et al. Bone Marrow Transplant 2004;33(10):979-87; <sup>2</sup> Paci et al. Ther Drug Monit 2012;34:198-208  
<sup>3</sup> Mc Cune et al. Clinical Cancer Research 2013;20(3):754-63; <sup>4</sup> Neely et al. ACCP 2014 Annual Meeting

### 3. Annexe 3. Communication affichée au congrès EBMT 2017



## Maximal concentration of intravenous busulfan is a determinant of veno-occlusive disease in bone marrow transplanted children

Michaël Philippe<sup>1</sup>, Michael Neely<sup>2</sup>, Teresa Rushing<sup>2</sup>, Yves Bertrand<sup>1</sup>, Nathalie Bleyzac<sup>1</sup>, Sylvain Goutelle<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Pediatric Hematology and Oncology, Lyon, France.

<sup>2</sup> Laboratory of Applied Pharmacokinetics and Bioinformatics University of Southern California Children's Hospital Los Angeles, Los Angeles, USA.

### INTRODUCTION

Veno-occlusive disease (VOD) is a potentially fatal adverse event caused by intravenous (IV) busulfan used in bone marrow transplantation (BMT) conditioning. The objective of this study was to identify determinants of VOD in children treated by IV busulfan.?

### PATIENTS AND METHODS

This was a retrospective analysis of data collected in 293 children from two BMT centers over 10 years. VOD was diagnosed according to modified Seattle criteria.

Individual pharmacokinetic data, including busulfan area under the concentration-time curve (AUC) and maximal concentration (C<sub>max</sub>) were estimated in all children by using a validated Bayesian approach [1].

We examined the relationships between the occurrence of VOD and available data in a learning (n=243 patients) and validation set (n=50 patients) obtained by random splitting.

Logistic regression was used as a continuous statistical model. In addition, we used classification and regression tree (CART) analysis, a machine learning and binary partitioning technique, to identify determinants of VOD and their optimal cut-off values. The predictive performance of variables within both models was assessed by statistical tests and receiver operating characteristics (ROC) curve analysis.

### RESULTS

178 children were treated at the Institute of Pediatric Hematology and Oncology of Lyon and 115 at the Children's Hospital of Los Angeles.

Most of them received busulfan as 16 doses divided every 6 hours over 4 days (96%). Only 11 children received busulfan once daily.

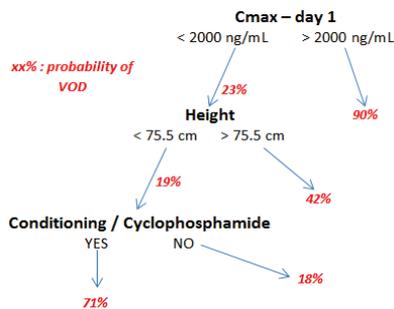
Median AUC was 69.8 mg.h/L (16.3 – 100.6) and C<sub>max</sub> was 1350 ng/ml (590 – 3830).

	Learning sample (n=243)	Test sample (n=50)	Total (n=293)
Age (μ ± sd)	6.4 ± 5.8	7.2 ± 5.7	6.5 ± 5.7
ABW (μ ± sd)	26.0 ± 22.1	27.2 ± 23.4	26.2 ± 22.3
≤ 9 kg (%)	18.5%	12%	17.4%
Malignant disease	57.2%	60%	57.7%
VOD	25.5%	26%	25.6%

The overall incidence of VOD was 26.2%. In the learning sample, the final logistic regression model included two variables associated with VOD: an ideal body weight (IBW) < 9kg (OR=2.30) and busulfan C<sub>max</sub> over the entire conditioning (OR=3.25).

This model had a ROC curve AUC of 0.618, a positive predictive value (PPV) of 90% and a negative PV (NPV) of 77.3% respectively.

In the validation set, this model showed similar results: ROC AUC of 0.612, a PPV of 100% and a NPV 77.1%.



The CART analysis identified 12 binary variables predictive of VOD in the learning set. The three strongest predictors of VOD were :

- C<sub>max</sub> ≥ 2000 ng/ml on the first day of therapy (OR = 30)
- Height < 75.5 cm (OR = 3.1)
- Use of cyclophosphamide in the conditioning (OR = 10.5).

The AUC of the ROC curve associated with this predictive tree was 0.89 in the learning set and 0.63 in the validation set.

### CONCLUSION

Maximal concentration of IV busulfan is a significant predictor of VOD in BMT children. Those results support the need for busulfan therapeutic drug monitoring and target-oriented dosing approach [2].

### REFERENCES

[1] M. Neely et al. Accurately achieving target busulfan exposure in children and adolescents with very limited sampling and the BestDose software. Ther Drug Monit. 2016 Jun;38(3):332-42.

[2] M. Philippe et al. A Nonparametric Method to Optimize Initial Drug Dosing and Attainment of a Target Exposure Interval: Concepts and Application to Busulfan in Pediatrics. Clin Pharmacokinet. 2017;56: 435.