

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinikapotheke

Leitung: Dr. Michael Baehr

**Pharmakokinetische Untersuchungen von Busulfan
als Teil der Konditionierungstherapie vor
allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. biol. hum.
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Adrin Dadkhah
geboren in Kiel

Hamburg 2022

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 21.12.2022**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: PD Dr. Claudia Langebrake

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Sebastian Georg Wicha

*„Jede Wissenschaft ist, unter anderem, ein Ordnen, ein Vereinfachen,
ein Verdaulichmachen des Unverständlichen für den Geist“*

Hermann Hesse

Publikationsverzeichnis

Publikation I

Dadkhah, A.; Alihodzic, D.; Broeker, A.; Kröger, N.; Langebrake, C.; Wicha, S. G. Evaluation of the Robustness of Therapeutic Drug Monitoring Coupled with Bayesian Forecasting of Busulfan with Regard to Inaccurate Documentation. Pharm. Res. 2021.

Publikation II

Essmann, S.; **Dadkhah, A.;** Janson, D.; Wolschke, C.; Ayuk, F.; Kröger, N. M.; Langebrake, C. Iron Chelation With Deferasirox Increases Busulfan AUC During Conditioning Chemotherapy Prior to Allogeneic Stem Cell Transplantation. Transplant. Cell. Ther. 2021

Publikation III

Dadkhah, A.; Wicha, S.G.; Kröger, N.; Müller, A.; Pfaffendorf, C.; Riedner, R.; Badbaran, A.; Fehse, B.; Langebrake, C. Population Pharmacokinetics of Busulfan and its metabolite Sulfolane in patients with Myelofibrosis undergoing hematopoietic stem cell transplantation. Pharmaceutics 2022

Kongressbeiträge

Dadkhah, A.; Wicha, S.G.; Kröger, N; Langebrake, C.

„Studienprotokoll: Pharmakokinetische Untersuchungen von Busulfan als Teil der Konditionierungstherapie vor allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation bei Patienten mit einer Myelofibrose“; Jahrestagung 2018 der Deutschen Gesellschaft für Klinische Pharmazie, 03./04.11.2018 in Hamburg (Poster)

Dadkhah, A.; Alihodzic, D.; Broeker, A.; Kröger, N; Langebrake, C.; Wicha, S.G.

„Evaluation of the robustness of therapeutic drug monitoring coupled with Bayesian forecasting of busulfan with regard to inaccurate documentation“; 46th Annual (Virtual) Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation / 29.08 – 01.09.2020 (Präsentation und Poster)

Wansing, E.; Langebrake, C.; Kröger, N.; Wicha, S.G.; **Dadkhah, A.**

„Limited sampling in model-informed precision dosing of Busulfan“; 48th Annual (Virtual) Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation / 19.03.-23.03.2022 (Poster)

Dadkhah, A.; Wicha, S.G.; Kröger, N.; Müller, A.; Pfaffendorf, C.; Riedner, R.; Badbaran, A.; Fehse, B.; Langebrake, C.

„Population Pharmacokinetics of Busulfan and its metabolite Sulfolane in patients with Myelofibrosis undergoing hematopoietic stem cell transplantation“; 48th Annual (Virtual) Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation / 19.03.-23.03.2022 (Präsentation)

Inhaltsverzeichnis

Publikationsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VIII

1	Synopse	1
1.1	Einleitung	1
1.1.1	Hintergrund	1
1.1.2	Pharmakokinetik von Busulfan	1
1.1.3	Therapeutisches Drug Monitoring von Busulfan	3
1.1.4	Pharmakokinetische Interaktionen	4
1.1.5	Populationspharmakokinetik	5
1.1.6	Besonderheiten bei Patienten mit einer Myelofibrose	6
1.2	Fragestellung und Zielsetzung	7
1.3	Methodik	8
1.3.1	Studiendesign	8
1.3.2	Stochastische Simulation und Schätzung	8
1.3.3	Therapeutisches Drug Monitoring und Dosisanpassung	9
1.3.4	Bioanalytik	10
1.3.5	Entwicklung eines populationspharmakokinetischen Modells	10
1.4	Ergebnisse	13
1.4.1	Charakterisierung der Studienpopulationen	13
1.4.2	Einfluss fehlerhafter Dokumentation und Anzahl verwendeter Blutspiegel auf das TDM von Busulfan	16
1.4.3	Arzneimittelinteraktion zwischen Busulfan und Deferasirox	19
1.4.4	PopPK-Modell für Patienten mit einer Myelofibrose	21
1.5	Diskussion	24
1.5.1	Robustheit des TDM von Busulfan unter Verwendung bayesscher Methoden	25
1.5.2	Einfluss von Deferasirox auf die Pharmakokinetik von Busulfan	27
1.5.3	Bestimmung patientenspezifischer Kovariaten zur Erklärung der Variabilität der Pharmakokinetik von Busulfan bei Patienten mit Myelofibrose	28
1.5.4	Limitationen	30
1.5.5	Fazit und Ausblick	31
2	Literaturverzeichnis	33

3	Publikationen	42
3.1	Evaluation of the Robustness of Therapeutic Drug Monitoring Coupled with Bayesian Forecasting of Busulfan with Regard to Inaccurate Documentation	42
3.2	Iron Chelation with Deferasirox Increases Busulfan AUC During Conditioning Chemotherapy Prior to Allogeneic Stem Cell Transplantation.....	52
3.3	Population Pharmacokinetics of Busulfan and its metabolite Sulfolane in patients with Myelofibrosis undergoing hematopoietic stem cell transplantation.....	58
4	Zusammenfassung.....	72
5	Summary.....	76
6	Erklärung des Eigenanteils an den Publikationen	80
7	Danksagung.....	81
8	Lebenslauf.....	82
9	Eidesstattliche Versicherung.....	83

Abkürzungsverzeichnis

A

AIBW	<i>adjusted ideal body weight</i>
AIC	<i>Akaike information criterion</i>
allo-HSZT	allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
AML	akute myeloische Leukämie
AUC	<i>area under the concentration time curve</i>

C

CALR	Calreticulin
cAUC	kumulative AUC
CL	Clearance
CL _{Bu}	Busulfan-Clearance
CL _{Su}	Sulfolan-Clearance
CV	Varriationskoeffizient
CYP2C9	Cytochrom P450 2C9

F

FMO3	Flavin-haltige Monooxygenase 3
------	--------------------------------

G

GOF	<i>Goodness-of-Fit</i>
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GvHD	Spender-gegen-Wirt-Reaktion, <i>graft-versus-host-disease</i>

I

IBW	ideales Körpergewicht, <i>ideal body weight</i>
IIV	interindividuelle Variabilität
IOV	intraindividuelle Variabilität, <i>inter-occasion variability</i>
IPRED	individuelle Populationsvorhersagen, <i>individual predictions</i>

J

JAK2	Januskinase 2
------	---------------

M

MAC	myeloablative Konditionierung
MDS	myelodisplastisches Syndrom
MF	metabolische Fraktion
MIPD	modellgestützte Präzisionsdosierung, <i>model-informed precision dosing</i>
MPL	<i>Myeloproliferative leukemia virus oncogene</i>

N

NCA	nicht-kompartimentelle Analyse
NLME	nichtlineare Regression unter Berücksichtigung gemischter Effekte, <i>non-linear mixed effects</i>

O

OFV	<i>objective function value</i>
-----	---------------------------------

P

PK	Pharmakokinetik
PRED	Populationsvorhersagen, <i>population predictions</i>

R

RIC	Konditionierung mit reduzierter Intensität, <i>reduced-intensity conditioning</i>
rPE	relativer Vorhersagefehler, <i>relative prediction error</i>
rRmse	Wurzel des mittleren quadratischen relativen Fehlers, <i>relative root-mean-squared error</i>

S

SIR	<i>sampling importance resampling</i>
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus, <i>single nucleotide polymorphism</i>
SOS	Sinusoidales Obstruktionssyndrom
SSE	Stochastische Simulation und Schätzung, <i>stochastic simulation and estimation</i>

T

T-ALL	T-Zell akute lymphatische Leukämie
TBW	<i>total body weight</i>
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
THT	Tetrahydrothiophen
TRM	Therapieassoziierte Mortalität, <i>treatment related mortality</i>

U

UGT1A1	UDP-Glucuronosyltransferase 1A1
UGT1A3	UDP-Glucuronosyltransferase 1A3

V

V_{Bu}	Verteilungsvolumen von Busulfan
V_d	Verteilungsvolumen
V_{Su}	Verteilungsvolumen von Sulfolan

1 Synopse

1.1 Einleitung

1.1.1 Hintergrund

Busulfan ist ein bifunktionelles Alkylans und als solches eine potente zytotoxische Substanz. Durch die Freisetzung von Methansulfonatgruppen im wässrigen Medium entstehen Carbonium-Ionen, die DNA alkylieren und vernetzen, was folglich zur Hemmung der Zellteilung führt [1]. Es ist häufig Teil der Konditionierung bei sowohl pädiatrischen als auch erwachsenen Patienten vor einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (allo-HSZT). Die Konditionierung bezeichnet die der Stammzellgabe vorangehende Chemotherapie, die in Abhängigkeit von Dosis und Wirkstoffkombination als myeloablative (*myeloablative conditioning*, MAC) bzw. nicht-myeloablative Konditionierung oder als Konditionierung mit reduzierter Intensität (*reduced intensity conditioning*, RIC) unterteilt wird [2,3].

Man hat bei vorangegangenen Untersuchungen festgestellt, dass es patientenindividuell selbst bei intravenöser Applikation eine hohe Variabilität zwischen Dosis und Plasmakonzentrationen von Busulfan gibt und es dadurch zu einer schwankenden Busulfan-Exposition kommt, was wiederum Einfluss auf das Patienten-Outcome haben kann [4]. Einerseits steigt bei einer zu niedrigen Wirkstoffexposition das Risiko für ein Rezidiv und eine Transplantatabstoßung. Andererseits führt eine Überexposition häufiger zu schwerwiegender Mucositis, Hepatotoxizität, sinusoidalem Obstruktionssyndrom (SOS) und insgesamt einer höheren therapieassoziierten Mortalität (*treatment related mortality*, TRM) [5-9]. Darüber hinaus erschwert die hohe interindividuelle Variabilität der Wirkstoffexposition die individuelle Dosisauswahl [4]. Dass eine personalisierte Busulfan-Gabe auf Grundlage eines Therapeutischen Drug Monitorings (TDM) die therapieassoziierten Risiken minimiert, erscheint daher nur logisch und wurde anhand Studien zu MAC bereits bewiesen [4,6]. Diesbezüglich gibt es zu RIC jedoch nur wenige Daten.

1.1.2 Pharmakokinetik von Busulfan

Die Pharmakokinetik (PK) bezeichnet die Gesamtheit aller Prozesse, die ein Arzneistoff nach der Applikation im Körper durchläuft. In Hinblick auf intravenöse Gaben beinhaltet dies vor

allein die Verteilung, Metabolisierung und Elimination des Arzneistoffs. Jeder Prozess für sich unterliegt patientenindividuellen Faktoren, was unterschiedlich stark ausgeprägten Einfluss auf die Exposition des Arzneistoffs im Körper haben kann. Um die Exposition zu quantifizieren, wird die Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Verlaufskurve (*area under the concentration time curve*, AUC) in PK-Modellen dargestellt.

Als zentrale Parameter zur Beschreibung der Pharmakokinetik dienen die Clearance (CL) und das Verteilungsvolumen (Vd). Die CL bezeichnet in einer plasmafokussierten Betrachtung das pro Zeiteinheit vom Arzneistoff befreite Plasmavolumen (z.B. L/h) und dient somit als wichtige Kenngröße für die Ausscheidungsrate des Arzneistoffs. Durch das Vd wird die verabreichte Arzneistoffmenge mit der Plasmakonzentration proportional in Relation gesetzt. Sie ist als fiktives Volumen zu verstehen, das Aufschluss über die Verteilung des Arzneistoffs im Körper erlaubt. So haben hydrophile Substanzen im Vergleich zu lipophilen Substanzen ein relativ kleines Verteilungsvolumen und lassen daher den Schluss zu, dass die Verteilung primär in wässrigem Medium, wie dem Plasma, erfolgt [10]. Die typische CL und das typische Vd von Busulfan (CL_{Bu} bzw. V_{Bu}) liegen bei ca. 0,2 L/h/kg Körpergewicht (KG) und 0,7 L/kg KG, respektive [4, 11].

Nach intravenöser Applikation bindet ca. 30 % des Busulfan irreversibel an Plasmaproteinen. Der ungebundene Anteil verteilt sich über passive Diffusion sowohl in die Zellen [12], wo es nach Hydrolyse die DNA alkyliert, als auch in den Liquor [13], was das erhöhte Risiko für Krampfanfälle während der Therapie erklärt [14,15].

Die Metabolisierung erfolgt primär hepatisch und beginnt durch die entweder spontane oder durch verschiedene Isoenzyme der Glutathion-S-Transferase (GST) katalysierte Konjugation von Busulfan mit Glutathion (GSH) [16,17]. Durch Umwandlung des Konjugats und weiteren oxidativen Zwischenschritten durch die Flavin-haltige Monooxygenase 3 (FMO3) [18] und Cytochrom P450 2C9 (CYP2C9) [19] entstehen letztlich die vier inaktiven Metaboliten Tetrahydrothiophen (THT), THT-1-Oxid, Sulfolan und 3-Hydroxysulfolan, welche zu 30 % innerhalb von 48 h nach Gabe über den Urin ausgeschieden werden [12].

1.1.3 Therapeutisches Drug Monitoring von Busulfan

Die selbst bei intravenöser Verabreichung auftretende hohe interindividuelle [4] Variabilität der CL von Busulfan erschwert es, verlässliche Aussagen zur Wirkstoffexposition zu treffen. Um schwerwiegende Toxizitäten zu vermeiden und den größtmöglichen Therapieerfolg zu erzielen, wird daher insbesondere bei MAC und pädiatrischen Patienten empfohlen, die Busulfan-Dosierung mithilfe eines patientenindividuellen TDM zu personalisieren [6,9,20,21]. Trotz der großen Vorteile einer PK-gesteuerten Dosisindividualisierung von Busulfan hinsichtlich der Arzneimitteltherapiesicherheit, hat eine Umfrage von Ruutu et al. unter den europäischen Transplantationszentren diesbezüglich ein sehr heterogenes Bild ergeben [22]. Zum einen sei ein TDM trotz des regelmäßigen Einsatzes von Busulfan nur in wenigen Zentren etabliert. Zum anderen werde auch die Durchführung des TDM unterschiedlich gehandhabt, was die Vergleichbarkeit erschwert. Die Unterschiede lassen sich in der Anzahl der benötigten Blutspiegel für das TDM und der Methode zur Schätzung der AUC unterteilen. Die zwei am häufigsten verwendeten Methoden zur AUC-Schätzung sind die nicht-kompartimentelle Analyse (NCA) und die modellgestützte Präzisionsdosierung (*model-informed precision dosing*, MIPD) unter Verwendung bayesscher Methoden. Beim Vergleich dieser beiden Methoden wurde festgestellt, dass MIPD nicht nur eine höhere Genauigkeit und Präzision der Schätzungen liefert, sondern auch weniger Blutspiegel zur Schätzung der AUC benötigt werden [6,9,23,24]. Darüber hinaus ermöglichen die Verwendung einer einheitlichen Methode zur Schätzung der AUC und die Harmonisierung von Busulfan-Plasma-Expositionseinheiten (BPEU) den Vergleich von patientenindividuellen Wirkstoffexpositionen und damit AUC-Zielwerten zwischen den Transplantationszentren [9,25]. Neben den unterschiedlichen Methoden zur Schätzung der AUC gibt es noch weitere potenzielle Fehlerquellen bei der PK-gesteuerten Dosisindividualisierung von Busulfan – eine davon ist die ungenaue Dokumentation der Blutentnahme- und Infusionszeiten [4].

In der klinischen Praxis werden in der Regel eher geplante als tatsächliche Zeiten für die Blutentnahme- und Infusionszeit dokumentiert, ohne sich darüber im Klaren zu sein, was diese Abweichungen für die AUC-Schätzung bedeuten könnten. Zwei vorangegangene Untersuchungen zu Antibiotika von Van der Meer et al. und Alihodzic et al. haben ergeben,

dass eine ungenaue Dokumentation die individuelle Bayes-Schätzung erheblich beeinflussen kann [26,27]. Beispielsweise kann die Genauigkeit der individuellen Schätzung des zentralen Verteilungsvolumens (V1) für Meropenem um 24,6 % abnehmen, wenn die dokumentierten Zeitpunkte der Blutentnahmen um 15 Minuten von den tatsächlichen Blutentnahmen abweichen [27]. Es liegen bis jetzt jedoch noch keine Daten zu den Auswirkungen einer fehlerhaften Dokumentation auf das TDM von Busulfan vor.

1.1.4 Pharmakokinetische Interaktionen

Pharmakokinetische Interaktionen treten dann auf, wenn ein Arzneistoff die Geschwindigkeit oder das Ausmaß der Absorption, Verteilung, Metabolisierung oder Elimination eines anderen Arzneimittels verändert und somit zu einer verminderten oder verstärkten Wirkung des Arzneistoffs führt [28]. Die häufigsten und relevantesten Interaktionen von Busulfan beziehen sich auf die Metabolisierung [29].

Bekannte klinisch relevante Arzneimittelwechselwirkungen mit Busulfan bestehen mit Paracetamol, Metronidazol und Itraconazol, welche zu supratherapeutischen, oder im Fall von Phenytoin, zu subtherapeutischen Expositionen von Busulfan führen [30-33]. Die den Interaktionen zugrundeliegende Mechanismen sind, wie der Metabolismus von Busulfan, vielschichtig und teilweise noch nicht vollständig erklärt. Grundsätzlich führen jedoch Arzneistoffe, die entweder für eine Depletion der GSH-Speicher sorgen [34] oder mit dem CYP-Enzymen 2C9 oder 3A4 (CYP3A4) inhibieren [19,29] zu einer erhöhten Busulfan-Exposition, während eine gleichzeitige Gabe von CYP3A4- oder GST-Induktoren die Plasmaspiegel senken. Darüber hinaus gibt es Fallberichte über eine reduzierte Busulfan-CL bei gleichzeitiger Gabe von Blinatumomab [35] oder Deferasirox [36,37]. Deferasirox ist ein Eisenchelator, der zur Behandlung einer chronischen Eisenüberladung zugelassen ist. Diese tritt insbesondere bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen und somit auch bei allo-HSZT-Patienten auf. Unbehandelt steigt das Risiko für Infektionen, schwerer Spender-gegen-Wirt-Reaktion (graft-versus-host-disease, GvHD), SOS und Mortalität nach Transplantation [38,39]. Die Gabe eines Eisenchelators während der Konditionierung senkt das Risiko einer Toxizität und Infektionen.

Obwohl das Risiko einer reduzierten Busulfan-CL durch die Therapie mit Deferasirox bekannt ist, wurde die Auswirkung einer gleichzeitigen Gabe auf die PK von Busulfan noch nicht vollumfänglich untersucht.

1.1.5 Populationspharmakokinetik

Die Aufgabe der Populationspharmakokinetik (PopPK) besteht darin, die typischen pharmakokinetischen Parameter eines Arzneistoffs sowie deren Variabilität für eine bestimmte Population zu ermitteln [10]. Hierfür liegt die Annahme zugrunde, dass die gesamte Variabilität der PK sich in eine interindividuelle Variabilität (IIV) oder residuale Variabilität aufteilen lässt. Die IIV beschreibt die Variabilität der PK-Parameter, während die Abweichungen der beobachteten Daten von den individuellen Modellvorhersagen durch die Residualvariabilität erklärt wird [40]. Die in Relation zur applizierten Dosis unterschiedlich verlaufenden Arzneistoffexpositionen innerhalb einer Population lassen sich somit durch patientenindividuelle demographische oder klinische Faktoren erklären [10,41].

Aufgrund der hohen patientenindividuellen Variabilität zwischen Dosis und Plasmakonzentrationen von Busulfan wurden hierfür bereits PopPK-Modelle entwickelt. Der Großteil der Untersuchungen setzte hierbei den Fokus auf pädiatrische Patienten, da die hohe Variabilität der Wirkstoffexposition bei Kindern aufgrund des unterschiedlichen Reifeprozesses der Stoffwechselwege eine besondere Herausforderung darstellt [42-46]. Allerdings wurden auch Modelle mit Patienten aus allen Altersklassen und unterschiedlichen Grunderkrankungen entwickelt, um ein möglichst repräsentatives Bild der PopPK von Busulfan zu erhalten [47-50]. Dabei wurden zur Erklärung eines Teils der Variabilität der PK von Busulfan demographische Faktoren wie Alter und Gewicht als auch genetische Komponenten, wie Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) des GST-alpha Gens, als Kovariaten identifiziert [11]. Zwei der für die CL von Busulfan am bedeutsamsten Isoenzyme sind GSTA1 und GSTM1, weshalb ihr Einfluss auf die Busulfan-CL ebenfalls Gegenstand mehrerer Untersuchungen war. Mit Ausnahme eines PopPK-Modells [51] wurde festgestellt, dass Polymorphismen mit einer Abnahme der CL korrelieren [45,46,52,53].

Darüber hinaus wurden auch intraindividuelle Veränderungen der Busulfan-CL zwischen mehreren Gaben (IOV) beobachtet [54-57].

Grundsätzlich kann der Großteil der PK-Variabilität von Busulfan mit dessen Metabolismus erklärt werden. Um den Metabolismus von Busulfan besser zu verstehen, erscheint es sinnvoll einen der Metaboliten bei der Entwicklung eines PopPK-Modells miteinzubeziehen, wodurch gegebenenfalls Unsicherheiten im Modell erklärt und folglich die Parameterschätzungen verbessert werden könnten [58]. Bisher wurde jedoch noch keiner der Metaboliten von Busulfan in ein PopPK-Modell integriert.

1.1.6 Besonderheiten bei Patienten mit einer Myelofibrose

Die Myelofibrose gehört zu den chronisch myeloproliferativen Neoplasien und kennzeichnet sich durch eine Zytokin-vermittelte intramedulläre Fibrose des blutbildenden Knochenmarks. Daraus resultiert eine extramedulläre Hämatopoese in Milz und Leber, oftmals begleitet von einer Vergrößerung beider Organe [59]. Als Ursache für diese neoplastische Erkrankung wurden genetische Aberrationen der Gene JAK2, MPL und CALR identifiziert [60] und auch im Hinblick auf die Prognose als relevant für die klinische Entscheidungsfindung erachtet [61]. Der Großteil ist auf eine JAK2-Mutation zurückzuführen, weswegen die meisten Patienten initial mit dem selektiven Hemmer von JAK1 und JAK2 Ruxolitinib therapiert werden [62].

Den einzig kurativen Therapieansatz für Patienten mit einer Myelofibrose stellt jedoch die allo-HSZT dar. Vor einer allo-HSZT werden die Patienten in Abhängigkeit von Alter und klinischem Zustand in der Regel entweder einer RIC- [63] oder MAC-Konditionierung [64,65] mit Busulfan, Fludarabin und ATG unterzogen.

Da Patienten mit Myelofibrose aufgrund der extramedullären Hämatopoese ein erhöhtes Risiko haben eine Hepatotoxizität und eingeschränkte Leberfunktion zu entwickeln, könnten die PK-Parameter von Busulfan zusätzlich beeinflusst werden. Der bisherige Stand der Wissenschaft zeigt jedoch einen deutlichen Mangel an validen Daten, welche die PK von Busulfan als Teil der Konditionierungstherapie vor allo-HSZT bei einer Myelofibrose beschreiben.

1.2 Fragestellung und Zielsetzung

Die allo-HSZT ist in der Behandlung maligner hämatologischer Erkrankungen oftmals die einzig kurative Therapieoption. Sie stellt für die Patienten eine sehr intensive Therapie dar, die aufgrund ihrer Komplexität auch ein hohes Risiko therapiebedingter Toxizität mit sich bringt. Daraus ergeben sich besonders hohe Anforderungen an die Arzneimitteltherapiesicherheit der vorgeschalteten Konditionierungs-Chemotherapie. Aufgrund der geringen therapeutischen Breite in Verbindung mit der patientenindividuell hohen Variabilität zwischen Dosis und Plasmakonzentrationen stellt die Konditionierung mit Busulfan eine besondere Herausforderung dar. Daher war es Ziel dieser Promotionsarbeit die Pharmakokinetik von Busulfan als Teil der Konditionierungstherapie vor allo-HSZT zu untersuchen. Dadurch sollten neue Erkenntnisse zum mit der Arzneimitteltherapie verbundenen TDM, pharmakokinetischen Interaktionen sowie Besonderheiten der PK einer speziellen Population, den Patienten mit Myelofibrose gewonnen werden. Es standen folgende Projekte im Rahmen dieser Arbeit im Fokus:

- I. Bewertung der Robustheit des Therapeutischen Drug Monitorings von Busulfan unter Verwendung bayesscher Methoden hinsichtlich ungenauer Dokumentation von Blutentnahme- und Infusionszeiten und der Anzahl verwendeter Blutspiegel
- II. Untersuchung des Einflusses von Deferasirox auf die Pharmakokinetik von Busulfan während einer myeloablativen Konditionierung vor allo-HSZT bei Patienten mit Eisenüberladung im Rahmen eines routinemäßigen Busulfan-TDM
- III. Entwicklung eines PopPK-Modells von Busulfan und seines Metaboliten Sulfolan durch Untersuchung bekannter und Bestimmung neuer patientenspezifischer Kovariaten zur Erklärung der Variabilität der Pharmakokinetik von Busulfan bei Patienten mit Myelofibrose

Dadurch soll die oftmals patientenindividuell beobachtete Variabilität in der PK von Busulfan besser erklärt und folglich die Arzneimitteltherapiesicherheit für Patienten, die eine Busulfan-basierte Konditionierungstherapie vor allo-HSZT durchlaufen, verbessert werden.

1.3 Methodik

1.3.1 Studiendesign

Die zur Beantwortung der Fragestellungen zu Grunde liegenden Daten entstammen einer in silico Untersuchung (I) und zwei separaten monozentrischen, prospektiven, nicht-interventionellen Beobachtungsstudien (II+III). Zur Bewertung der Robustheit des TDM von Busulfan hinsichtlich ungenauer Dokumentation von Blutentnahme- und Infusionszeiten und der Anzahl verwendeter Blutspiegel (I) wurde eine pharmakometrische Studie durch stochastische Simulation und Schätzung (*stochastic simulation and estimation, SSE*) 1000 simulierter klinischer Studien auf der Grundlage zweier veröffentlichter PopPK-Modelle durchgeführt.

Die beiden Beobachtungsstudien wurden von der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt (Nr. PV5630 und PV5842) und dienten zum einen der Untersuchung des Einflusses von Deferasirox auf die Pharmakokinetik von Busulfan während einer MAC (II) und zum anderen der Entwicklung eines PopPK-Modells von Busulfan und seines Metaboliten Sulfolan für Patienten mit einer Myelofibrose (III). Die Ein- und Ausschlusskriterien sind den jeweiligen Arbeiten zu entnehmen.

Die den Untersuchungen zu Grunde liegenden Methoden sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

1.3.2 Stochastische Simulation und Schätzung

Durch SSE-Studien können u.a. Genauigkeit und Präzision eines TDM evaluiert und somit die Robustheit gegenüber Änderungen bewertet werden.

Auf Grundlage der typischen PK-Parameter eines publizierten PopPK-Modells wird initial eine Vielzahl (z.B. $n=1000$) klinischer Studien simuliert. Und je nach Fragestellung können beispielsweise die Anzahl der entnommenen Blutspiegel oder die Entnahmezeitpunkte variiert werden. Um den Einfluss der Veränderungen auf das TDM quantifizieren zu können, werden die Daten der simulierten Studien erst mit genauen Entnahmezeiten und anschließend unter Verwendung ungenauer Entnahmezeiten neu geschätzt. Die Ergebnisse der erneuten Schätzungen werden dann mit der initialen Schätzung verglichen.

Die Bewertung der Genauigkeit und Präzision der beispielsweise individuell geschätzten AUC erfolgt durch die Berechnung des relativen Vorhersagefehlers (*relative prediction error*, rPE) und der Wurzel des mittleren quadratischen relativen Fehlers (*relative root-mean-squared error*, rRmse).

Detaillierte Informationen zur methodischen Umsetzung der SSE-Studie hinsichtlich gewählter Variablen und Berechnungen der Genauigkeit und Präzision sind in Publikation I aufgeführt [66].

1.3.3 Therapeutisches Drug Monitoring und Dosisanpassung

Um den Einfluss von Deferasirox auf die PK von Busulfan zu untersuchen, wurde bei Patienten, die aufgrund einer Eisenüberladung parallel zur MAC vor allo-HSZT 14 mg/kg KG/Tag Deferasirox erhielten, ein TDM von Busulfan durchgeführt. Die Patienten erhielten routinemäßig initial eine Busulfan-Dosis von einmal täglich 3,2 mg/kg KG bezogen auf das reale Körpergewicht (total body weight, TBW) und anschließender Dosisanpassung, mit dem Ziel eine kumulative AUC von $80 \text{ mg} \times \text{h/L}$ zu erreichen, für insgesamt vier Gaben. Übergewichtige Patienten deren TBW mit 15 kg oder mehr vom idealen Körpergewicht (ideal body weight, IBW) abwichen, erhielten eine dosisadaptierte Gabe gemäß ihrem angepassten idealen Körpergewicht (*adjusted ideal body weight*, AIBW). Auf Grundlage von vier Blutspiegeln erfolgten Dosisanpassungen gemäß MIPD, wenn die berechnete AUC nicht innerhalb des Zielbereichs von $\pm 10 \%$ der Ziel-AUC von $80 \text{ mg} \times \text{h/L}$ lag. Bei Abweichungen $> 25 \%$ wurden nach der Folgedosis neue Spiegelmessungen und AUC-Berechnungen

durchgeführt und die Dosis falls notwendig erneut angepasst. Die errechnete kumulative AUC (cAUC) sowie die im Rahmen des TDM vorgenommenen Dosisanpassungen wurden folglich einer hinsichtlich demographischer Daten, Konditionierungstherapie und Komedikation (mit Ausnahme von Deferasirox) vergleichbaren historischen Kontrollgruppe gegenübergestellt. Hierbei sei erwähnt, dass die Datenerhebung und die statistische Analyse für die Publikation II von Frau Dr. med. Sonja Essmann als Teil ihrer Dissertation [67] und die erforderlichen pharmakokinetischen Berechnungen von Frau PD Dr. Claudia Langebrake und mir durchgeführt wurden.

1.3.4 Bioanalytik

Die Quantifizierung von Busulfan für die Projekte II und III erfolgte im Institut für Rechtsmedizin des UKE mittels Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion. Sulfolan wurde gemäß der bioanalytischen Methode von McCune et al. mit einem QTRAP 5500 Massenspektrometer (SCIEX, Framingham, MA, USA), gekoppelt mit einer 1290 Infinity HPLC II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) quantifiziert [68].

Die DNA-Proben zur Bestimmung eines GSTA1-SNP oder einer GSTM1-Deletion wurden vor der Transplantation aus dem Knochenmark oder peripherem Blut gewonnen. Die Genotypisierung erfolgte durch quantitative Polymerase-Kettenreaktion auf einem LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland). Eine ausführliche Beschreibung der bioanalytischen Methode von Sulfolan sowie eine Darstellung der verwendeten Primer für die Genotypisierung findet sich im Anhang zur Publikation III.

1.3.5 Entwicklung eines populationspharmakokinetischen Modells

Die Entwicklung des PopPK-Modells von Busulfan für Patienten mit einer Myelofibrose erfolgte mittels nichtlinearer Regression unter Berücksichtigung gemischter Effekte (*non-linear mixed effects*, NLME) in NONMEM® (version 7.4.3, ICON, Gaithersburg, MD, USA). Der NLME-Ansatz ermöglicht es die typischen Populationsparameter für CL und Vd (feststehende Effekte) und deren Variabilität (zufällige Effekte) zu beschreiben. Darüber hinaus können

patientenindividuelle Faktoren identifiziert und deren Einfluss auf die PK ermittelt werden. Somit lässt sich ein PopPK-Modell (Abbildung 1) in drei Submodelle, bestehend aus dem Strukturmodell, dem statistischen Modell und dem Kovariatenmodell, aufteilen. Während das Strukturmodell und das statistische Modell gemeinsam das Basismodell bilden, kann das Kovariatenmodell optional hinzugenommen werden [41].

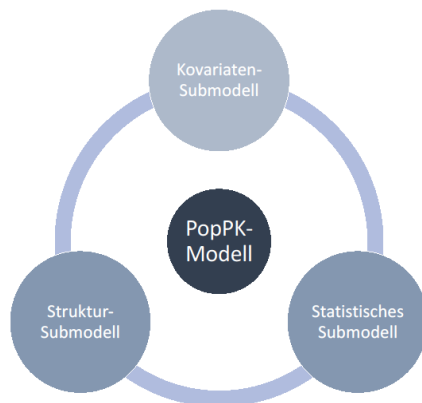


Abbildung 1 Aufbau eines PopPK-Modells

1.3.5.1 Strukturmodell

Das Strukturmodell bildet den Kern des Modells, indem es den Zusammenhang zwischen der Plasmakonzentration und unabhängigen Variablen wie Dosis und Zeit durch für die Population typische Strukturparameter wie CL und Vd beschreibt [41].

1.3.5.2 Statistisches Modell

Das statistische Modell ermöglicht es zufällige Effekte in einem PopPK-Modell zu beschreiben. Die beobachtete Variabilität wird hierbei auf zwei Ebenen, der Parameter- und der Beobachtungsebene, getrennt. Die interindividuelle Variabilität (IIV) beschreibt die Variabilität der PK Parameter, wie z.B. der CL zwischen Individuen. Darüber hinaus kann auf der PK-Parameterebene die intraindividuelle Variabilität (IOV) einbezogen werden. Sie beschreibt die Variabilität der PK zwischen unterschiedlichen Gaben innerhalb eines

Individuums. Auf der Beobachtungsebene beschreibt sie als Residualvariabilität wie stark die Beobachtungen um die Modellvorhersage streuen [69].

1.3.5.3 Kovariatenmodell

Das Kovariatenmodell kann verwendet werden, um den Einfluss patientenindividueller Faktoren, wie z.B. TBW oder Geschlecht auf die typischen PK-Parameter zu beschreiben. Sie werden im Normalfall als feststehende Effekte in das Strukturmodell eingebunden und können durch das Etablieren von Kovariatenbeziehungen die IIV reduzieren und somit die Parameterschätzungen verbessern [10].

Potenzielle Kovariaten durchlaufen initial ein Screening hinsichtlich physiologischer Plausibilität sowie eine visuelle Inspektion, um zu prüfen, ob Korrelationen mit einzelnen Schätzungen der PK-Parameter bestehen. Die anschließende Einbindung der Kovariaten in das Modell erfolgt durch Testen linearer, exponentieller oder Potenzfunktionen für die Kovariatenbeziehungen.

1.3.5.4 Modellevaluierung

Die Entwicklung eines PopPK-Modells ist ein iterativer Prozess, der eine statistische Evaluation der Zwischenschritte sowie des finalen Modells erfordert.

Um die statistische Signifikanz eines Modellparameters beurteilen zu können, werden sogenannte *nested models*, also ineinander verschachtelte Modelle, mit Hilfe des likelihood-ratio-tests miteinander verglichen. Hierbei gilt, dass bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ und einem Freiheitsgrad eine Differenz von -3,84 des objective function value (OFV) eine statistisch signifikante Verbesserung des Modells indiziert [41]. Modelle, die nicht ineinander verschachtelt sind, wie z.B. unterschiedliche Strukturmodelle, werden anhand des *Akaike information criterion* (AIC) miteinander verglichen, wobei das Modell mit dem niedrigeren Wert als überlegen gewertet wird [70].

Darüber hinaus dienen Goodness-of-Fit (GOF) Plots der visuellen Beurteilung der Anpassungsgüte eines Modells. Hierfür werden beispielsweise die individuellen (*individual*

predictions, IPRED) oder Populationsvorhersagen (*population predictions*, PRED) gegen die beobachteten Konzentrationen in Streudiagrammen aufgetragen, wobei eine gleichmäßige Verteilung der Punkte um die Winkelhalbierende auf eine gute Anpassungsgüte des Modells schließen lässt [41]. Zur weiteren visuellen Evaluation der Modelle werden prediction-corrected visual predictive checks (pcVPC) erstellt, mit deren Hilfe grafisch beurteilt werden kann, ob ein Modell den zentralen Trend als auch die Variabilität der beobachteten Daten reproduzieren kann, wenn sie gegen eine unabhängige Variable (normalerweise die Zeit) aufgetragen werden [71].

Details zur Entwicklung des Basismodells, der Auswahl möglicher Kovariaten sowie der statistischen Testung der Kovariatenbeziehungen und Modellevaluation können Publikation III entnommen werden.

1.4 Ergebnisse

1.4.1 Charakterisierung der Studienpopulationen

Während die Studienpopulation für die SSE-Studie (I) auf Grundlage zweier PopPK-Modelle simuliert wurde, erfolgten die Beobachtungsstudien der Projekte II und III an zwei unterschiedlichen erwachsenen Patientenkollektiven, die eine Konditionierungstherapie mit Busulfan vor allo-HSZT gemein hatten.

Für das Projekt II konnten insgesamt 25 Patienten eingeschlossen werden. Die Patienten erhielten im Median 3,20 mg/kg TBW oder AIBW Busulfan (3,19–3,70 mg/kg) als Initialdosis. Die geplante kumulative Busulfan-Dosis zum Erreichen der Ziel-AUC von 80 mg × h/L betrug somit 12,80 mg/kg (12,75–14,79 mg/kg). Während beim Großteil der Patienten (92 %) eine allo-HSZT aufgrund einer akuten myeloischen Leukämie (AML) indiziert war, wurden bei jeweils einem Patienten ein myelodysplastisches Syndrom (MDS) oder eine T-Zell akute lymphatische Leukämie (T-ALL) diagnostiziert. Eine Übersicht der Patientencharakteristika ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1 Patientencharakteristika Projekt II [72]

Patientencharakteristika (n=25)	Median [Spannweite] oder n (%)
Alter [Jahre]	55,2 [20,2–68,7]
Geschlecht (weiblich)	14 (56)
BMI [kg/m ²]	25 [17,2–44,4]
TBW [kg]	75 [55,6–130,4]
AIBW [kg]	70,4 [47,5–101,5]
<i>Diagnose</i>	
AML	23 (92)
MDS	1 (4)
T-ALL	1 (4)
<i>Konditionierung</i>	
Bu80/Flu160/ATG	23 (92)
Bu80/Flu150/postCY	2 (8)
<i>Gewicht für die Dosierung</i>	
TBW	18 (72)
AIBW	7 (28)
Deferasirox-Dosis [mg/kg/d]	13,9 (13,1–14,8)

AML: akute myeloische Leukämie; **ATG:** Anti-Thymozyten-Globulin; **BMI:** body mass index; **Bu:** Busulfan; **Flu:** Fludarabin; **MDS:** Myelodisplastisches Syndrom; **postCY:** post-Transplantation Cyclophosphamid; **T-ALL:** T-Zell akute lymphatische Leukämie

Zur Entwicklung eines PopPK-Modells von Busulfan und seines Metaboliten Sulfolan (Projekt III) wurden insgesamt 37 Patienten mit einer diagnostizierten Myelofibrose, die vor einer allo-HSZT eine reduzierte Konditionierungstherapie mit Busulfan erhielten, in die Studie eingeschlossen. 30 Patienten wurden in den prospektiven Teil der Studie aufgenommen. Sieben weitere Patienten erklärten sich bereit, ihre demographischen sowie klinischen Daten, die gemessenen Busulfan-Plasmakonzentrationen und DNA-Proben zur Bestimmung von SNPs der GST-alpha Gene für eine retrospektive Analyse zur Verfügung zu stellen. Die Studienpopulation bestand aus 19 weiblichen und 18 männlichen Patienten, die im Median 60 Jahre alt waren (Spannweite 37–72 Jahre) und ein mittleres TBW von 75 kg (56,6 – 113,7 kg) aufwiesen. 18 Patienten hatten eine primäre Myelofibrose, während bei neun bzw. zehn Patienten eine Post-ET- bzw. Post-PV-Myelofibrose diagnostiziert wurde.

Tabelle 2 Patientencharakteristika Projekt III [73]

Patientencharakteristika (n=37)	Median [Spannweite] oder n (%)
Alter [Jahre]	60 [37–72]
Geschlecht (weiblich)	19 (51,4)
TBW [kg]	75 [56,6–113,7]
Größe [cm]	174 [154–193]
Körperoberfläche [m ²]	1,84 [1,62–2,37]
<i>Diagnose</i>	
PMF	18 (48,7)
Post-ET MF	9 (24,3)
Post-PV MF	10 (27)
<i>Busulfan-Dosisregime</i>	
Q6H	30 (81)
Q24H	7 (19)
<i>DIPSS / MYSEC</i>	
Intermediate-1	2 (5) / 1 (3)
Intermediate-2	15 (40) / 14 (38)
High-risk	1 (3) / 4 (11)
<i>Mutation</i>	
JAK2	26 (70,3)
CALR	7 (18,9)
MPL	1 (3)
<i>Blutbild, Labormarker</i>	
AST [U/L]	21 [9,0–131,0]
ALT [U/L]	21 [9,0–267]
De-Ritis-Ratio	0,76 [0,58–1,07]
Albumin [g/L]	37,8 [28,8–46,4]
Alkalische Phosphatase [U/L]	85 [43–621]
Bilirubin [mg/dl]	0,6 [0,2–2,0]
Fibroscan [kPa]	5,6 [4,8–7]
GSTA1 52G>A	28 (75,7)
GSTM1-Deletion	19 (51,4)
Mucositis Grad 1 / 2 / 3 / 4	10 (27) / 14 (38) / 1 (2,7) / 1 (2,7)
aGvHD Grad 1 / 2 / 3	10 (27) / 7 (19) / 4 (11)
cGvHD Grad 1 / 2 / 3	12 (32) / 6 (16) / 1 (2,7)
SOS	2 (5,4)
Rezidiv	2 (5,4)
Verstorben	5 (13,5)

aGvHD: akute Spender-gegen-Wirt-Reaktion; **ALT:** Alanin Aminotransferase; **AST:** Aspartat Aminotransferase; **cGvHD:** chronische Spender-gegen-Wirt-Reaktion; **DIPSS:** Dynamic International Prognostic Scoring System; **MYSEC:** MYelofibrosis SEcondary to PV und ET; **PMF:** Primäre Myelofibrose; **Post-ET MF:** Post-Essentielle Thrombozythämie Myelofibrose; **Post-PV MF:** Post-Polycythemia Vera Myelofibrose; **SOS:** sinusoidales Obstruktionssyndrom

Bei 28 Patienten (75,7 %) wurde ein GSTA1-SNP gefunden, während bei 19 Patienten (51,4 %) eine GSTM1-Deletion festgestellt wurde und 10 Patienten (27 %) eine Kombination aus beidem aufwiesen. Insgesamt wurden 523 Plasmakonzentrationen von Busulfan und Sulfolan in die PK-Analyse einbezogen, von denen 282 Busulfan-Konzentrationen und 241 Konzentrationen des Metaboliten waren. Im Vergleich waren mehr Busulfan-Plasmakonzentrationen verfügbar, da Sulfolan-Plasmakonzentrationen nur von Patienten im prospektiven Teil der Studie gewonnen werden konnten.

Die mediane cAUC von Busulfan betrug $36,06 \text{ mg} \times \text{h/L}$ ($25,67\text{--}61,85 \text{ mg} \times \text{h/L}$). Im Vergleich zur ersten Dosis sank die individuelle Busulfan-Clearance von $17,16 \text{ L/h}$ (Median, Spannweite $10,55\text{--}22,36 \text{ L/h}$) auf $16,47 \text{ L/h}$ (Median, Spannweite: $10,05\text{--}19,27 \text{ L/h}$) nach der neunten Dosis. Eine Übersicht der Patientencharakteristika und klinischen Daten ist in Tabelle 2 dargestellt.

1.4.2 Einfluss fehlerhafter Dokumentation und Anzahl verwendeter Blutspiegel auf das TDM von Busulfan

Basierte das TDM auf einem Ein-Kompartiment-Modell (1-CMT) wurde die geschätzte AUC durch eine ungenaue Dokumentation der Blutentnahme- und der Infusionszeit bei einer einmal täglichen Busulfan-Gabe nicht wesentlich beeinflusst (Abbildung 2). Wenn nur ein Blutspiegel für die AUC-Schätzung verwendet wurde und eine Unsicherheit von 30 Minuten sowohl beim Zeitpunkt der Blutentnahme als auch bei der Infusionszeit bestand, lag der Median des rPE der geschätzten AUC bei $-1,60 \%$, was auf eine nur geringe Verzerrung hinweist. Im Vergleich dazu lag der mediane rPE bei einer Unsicherheit von 0 Minuten bei $-1,31 \%$. Bei $\pm 30 \text{ min}$ war die Streuung der rPE ($2,5./97,5.$ Perzentil) jedoch deutlich höher ($-20,12/22,91\%$) im Vergleich zu den geringen Ungenauigkeiten bei der Dokumentation der Blutentnahme- und der Infusionszeit bei $\pm 5 \text{ min}$ ($-15,84/13,26\%$). Ein Überblick über die Ergebnisse ist in Tabelle 3 zu finden.

1CMT – Q24H

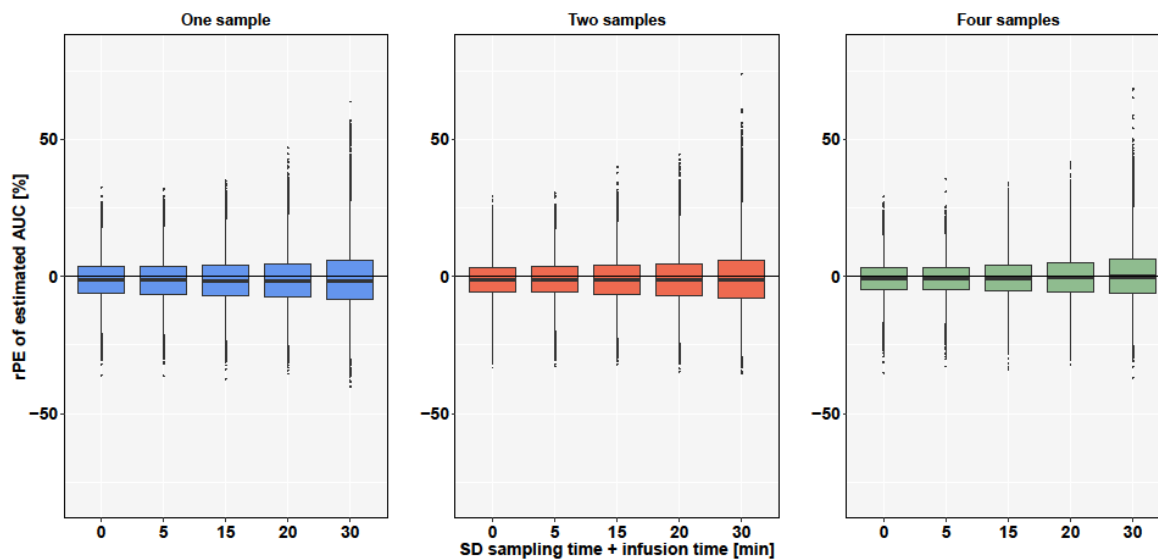


Abbildung 2 rPE der geschätzten AUC auf der Grundlage eines 1-CMT-Modells in Abhängigkeit von der Unsicherheit beim Zeitpunkt der Blutentnahme und der Infusionszeit (SD \pm 5 min bis \pm 30 min), wenn MIPD bei einer einmal täglichen Busulfan-Gabe mit einer Probe (blau), zwei Proben (orange) oder vier Proben (grün) durchgeführt wird [66].

Bei den untersuchten TDM-Plänen nimmt die Streuung der rPE bei \pm 5 min mit abnehmender Anzahl der Blutspiegel zu. Vergleichbare Ergebnisse wurden für die Präzision gefunden, wo eine abnehmende Anzahl von Blutspiegeln zu einem höheren rRmse führte.

Bei vier Blutspiegeln führte eine Abweichung von 30 min bei der Blutentnahme und der Infusionszeit zu einer rRmse von 9,85 %. Wurde das TDM dagegen mit zwei Blutspiegeln durchgeführt, stieg die rRmse leicht auf 10,78 %. Auch wenn nur ein Blutspiegel für die Schätzung der AUC verwendet wurde, lag die rRmse nicht über 11,03 %.

Somit sind die Schätzungen erwartungsgemäß etwas genauer und präziser, wenn das TDM im Vergleich zu zwei oder einer einzigen Blutprobe mit vier Blutproben durchgeführt wird.

Tabelle 3 rPE und rRmse der geschätzten AUC bei einer einmal täglichen Busulfan-Gabe [66]

Abweichung Zeitpunkt Blutentnahme + Infusionszeit [min]	Anzahl Blutspiegel - 1-CMT			Anzahl Blutspiegel - 2-CMT		
	1	2	4	1	2	4
0						
rPE median [%]	-1,31	-1,05	-0,73	-0,51	-1,11	-0,88
Streuung (2,5/97,5) [%]	(-15,61/12,88)	(-15,39/12,19)	(-14,09/11,25)	(-24,11/32,68)	(-23,12/26,08)	(-20,55/21,31)
rRmse [%]	7,41	7,06	6,39	14,54	12,60	10,66
5						
rPE median [%]	-1,33	-1,11	-0,75	-0,56	-1,16	-0,79
Streuung (2,5/97,5) [%]	(-15,84/13,26)	(-15,44/12,57)	(-14,09/11,62)	(-24,02/32,81)	(-23,45/26,45)	(-20,81/21,27)
rRmse [%]	7,53	7,20	6,48	14,61	12,73	10,74
15						
rPE median [%]	-1,47	-1,21	-0,59	-0,34	-0,92	-1,19
Streuung (2,5/97,5) [%]	(-16,85/15,83)	(-16,41/15,37)	(-14,64/14,35)	(-24,25/33,51)	(-23,56/27,84)	(-22,18/22,31)
rRmse [%]	8,43	8,12	7,33	14,82	13,14	11,22
20						
rPE median [%]	-1,55	-1,29	-0,50	-0,25	-0,97	-1,32
Streuung (2,5/97,5) [%]	(-17,73/17,96)	(-17,17/17,45)	(-15,23/16,24)	(-24,73/34,01)	(-24,18/28,61)	(-22,20/22,89)
rRmse [%]	9,13	8,86	7,96	15,07	13,50	11,48
30						
rPE median [%]	-1,60	-1,35	-0,11	-0,15	-0,17	-1,13
Streuung (2,5/97,5) [%]	(-20,12/22,91)	(-19,30/22,76)	(-16,71/21,91)	(-25,38/35,98)	(-25,20/30,96)	(-22,62/25,51)
rRmse [%]	11,03	10,78	9,85	15,60	14,32	12,28

Basierte das TDM auf einem Zwei-Kompartiment-Modell (2-CMT) sind sowohl die Streuung der rPE als auch die rRmse deutlich breiter bzw. höher. Bei Verwendung von zwei Blutspiegeln und einer Abweichung von 30 Minuten bei der Blutentnahme und der Infusionszeit stieg die Streuung der rPE auf 56,16 % (-25,20/30,96 %), was auf eine geringere Präzision der Schätzungen hinweist. Die gleiche Tendenz ist bei der Genauigkeit der AUC-Schätzungen zu beobachten. Für dasselbe Szenario betrug die rRmse der geschätzten AUC 14,32 % für das 2-CMT-Modell im Vergleich zu 10,78 % rRmse für das 1-CMT-Modell. Ein Überblick über die Ergebnisse der geschätzten AUC auf der Grundlage eines 2-CMT-Modells ist in Abbildung 3 und in der Tabelle 3 dargestellt.

2CMT – Q24H

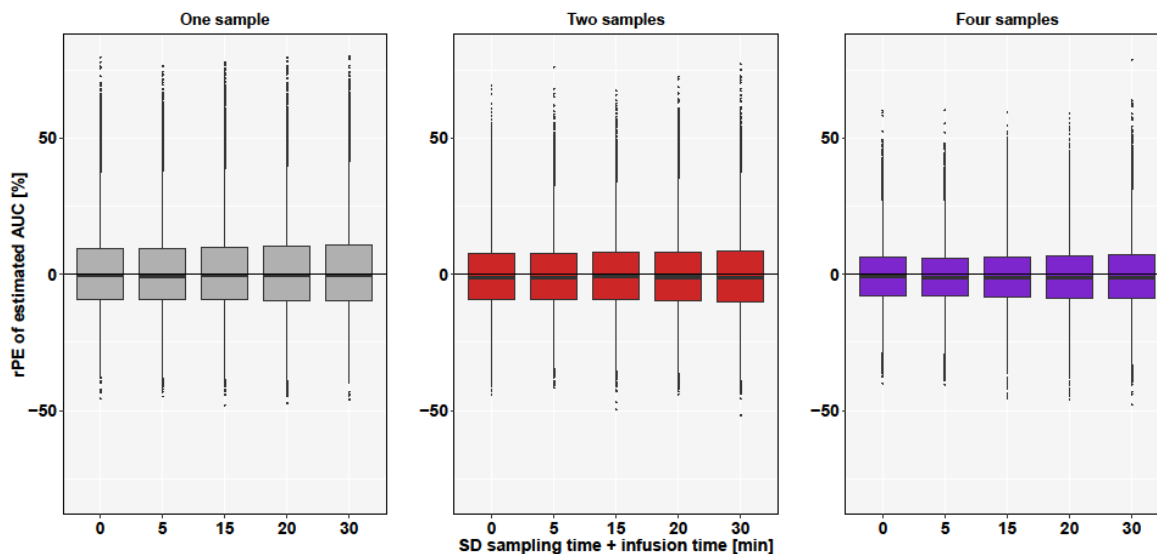


Abbildung 3 rPE der geschätzten AUC auf der Grundlage eines 2-CMT-Modells in Abhängigkeit von der Unsicherheit beim Zeitpunkt der Blutentnahme und der Infusionszeit (SD ± 5 min bis ± 30 min), wenn MIPD bei einer einmal täglichen Busulfan-Gabe mit einer Probe (grau), zwei Proben (rot) oder vier Proben (violett) durchgeführt wird [66].

Die analog berechneten rPE und rRmse bei einem Busulfan-Dosisregime mit vier täglichen Gaben (Q6H) zeigt im Vergleich zur einmal täglichen Gabe (Q24H) ein etwas geringeres Präzisions- und Genauigkeitsniveau für jedes TDM-Schema. Auch hier gilt die Tendenz, dass die Genauigkeit und Präzision mit abnehmender Anzahl verwendeter Blutspiegel abnehmen, wobei jedoch die rRmse für die geschätzte AUC nie höher als 13,26 % liegt.

1.4.3 Arzneimittelinteraktion zwischen Busulfan und Deferasirox

Patienten, die im Rahmen einer MAC vor allo-HSZT aufgrund einer Eisenüberladung 14 mg/kg KG/Tag Deferasirox erhielten, hätten im Median ohne eine Dosisanpassung rechnerisch eine cAUC von 93,7 mg \times h/L (65,1 - 151,4 mg \times h/L) erreicht, was deutlich über der Ziel-AUC von 80 mg \times h/L ± 10 % (72 - 88 mg \times h/L) gelegen hätte. Daraus ergibt sich eine mediane Abweichung von der Ziel-AUC um 13,7 mg \times h/L (-14,9 - 71,4 mg \times h/L). Insgesamt lagen 68 % der Patienten ohne Anpassung der Busulfan-Dosierung außerhalb des Zielbereichs (siehe Abbildung 1). Ohne Dosisanpassung hätten 15 Patienten (60 %) eine Busulfan-Exposition

erreicht, die oberhalb des AUC-Zielbereichs lag, und nur 2 Patienten (8 %) hätten eine Busulfan-Exposition erreicht, die unterhalb des AUC-Zielbereichs lag. Eine Dosisanpassung von Busulfan wurde bei 20 Patienten (80 %) einmal oder wiederholt vorgenommen. Die mediane Dosisanpassung betrug 17,1 % (50,0 % - 182 %) und die Patienten erhielten schließlich Busulfan mit einer medianen kumulativen Dosis von 10,60 mg/kg KG (6,38 - 15,62 mg/kg KG). Eine Reduzierung der Busulfan-Dosis war bei 19 Patienten (76 %) erforderlich, während eine Dosissteigerung nur bei einem Patienten notwendig war.

Nach der Dosisanpassung betrug die cAUC im Median 79,7 mg × h/L (62,5 - 84,2 mg × h/L) mit einer medianen Abweichung von der Ziel-AUC von 0,3 mg × h/L (-17,5 - 4,2 mg × h/L). Die mediane Busulfan-Clearance, die nach der ersten (84 %) oder zweiten (16 %) Verabreichung von Busulfan bestimmt wurde, betrug 0,134 L/h/kg TBW oder AIBW (0,084 - 0,203 L/h/kg).

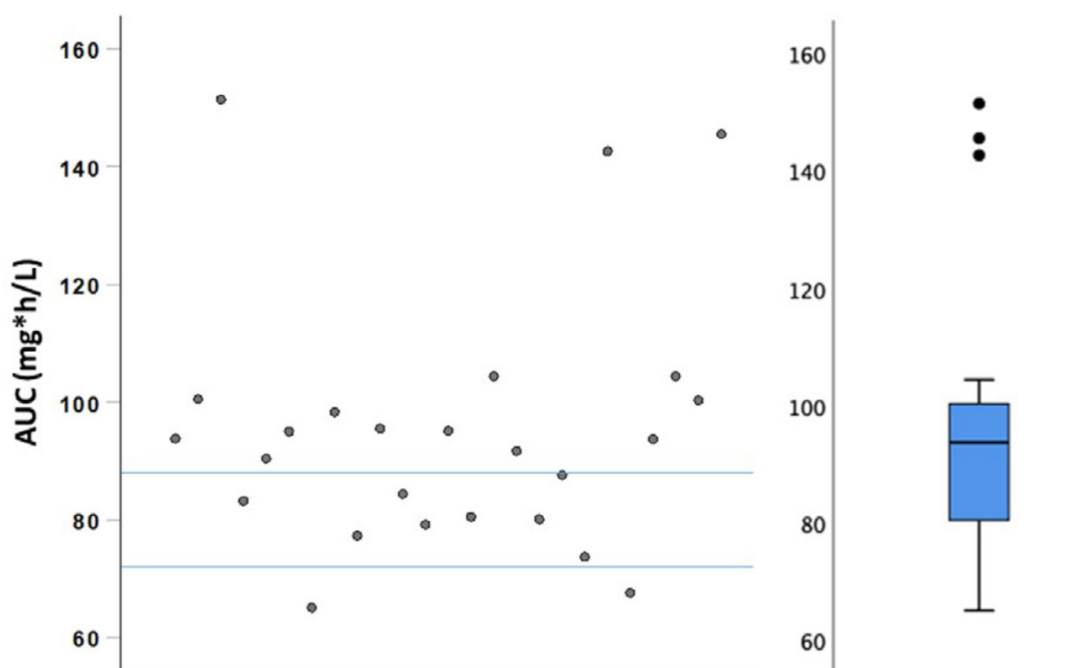


Abbildung 4 Streudiagramm und Boxplot der kumulativen AUC von Busulfan vor der Dosisanpassung; die blauen Linien indizieren den Zielbereich von $80 \text{ mg} \times \text{h/L} \pm 10 \%$ [72].

Bei einer, hinsichtlich demographischer Daten, Konditionierungstherapie und Komedikation mit Ausnahme von Deferasirox vergleichbaren historischen Kontrollgruppe war im Vergleich

zum untersuchten Patientenkollektiv eine Dosiserhöhung bei 62,2 % der Patienten nötig, um die Ziel-AUC zu erreichen. Eine Dosisreduktion war nur bei 10,5 % Patienten notwendig. Insgesamt wurde im Median die Busulfan-Dosis um 20,0 % zum Erreichen der Ziel-AUC erhöht. Die mediane CL in dieser Kohorte betrug 0,200 L/h/kg TBW oder AIBW (0,100 - 0,331 L/h/kg), was einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu unserer Studienpopulation mit gleichzeitiger Deferasirox-Behandlung darstellt ($p < 0,0001$).

1.4.4 PopPK-Modell für Patienten mit einer Myelofibrose

Die Pharmakokinetik von Busulfan und seinem Metaboliten Sulfolan wurde am besten durch ein 1-CMT-Modell mit Elimination erster Ordnung beschrieben. Das Hinzufügen eines zweiten Kompartiments führte nicht zu einer signifikanten Verbesserung des Modells, bestätigt durch das AIC (-1956,88 für 1-CMT vs. -1956,41 für 2-CMT). Dies wurde weiterhin durch keine merkliche Verbesserung der GOF-Plots bestätigt. Zur Beschreibung der Residualvariabilität wurde ein proportionales Fehlermodell verwendet. Die Kovarianz zwischen dem proportionalen Fehler von Busulfan (Prop. σ_{Bu}) und Sulfolan (Prop. σ_{Su}) wurde durch die Verwendung eines Sigma-Blocks unter Verwendung des L2-Elements implementiert. Der AIC sank um 66 Punkte, wenn das L2-Element verwendet wurde, da eine Korrelation (11,8 %) zwischen der Plasmakonzentration von Busulfan und Sulfolan vorhanden war. Die Einbeziehung der IIV sowohl für CL (CL_{Bu} und CL_{Su}) als auch für Vd (V_{Bu} und V_{Su}) von Busulfan und Sulfolan verbesserte das Modell erheblich. Vor der Implementierung der IOV wurde jede Busulfan-Gabe mit anschließender Blutentnahme als ein neues Ereignis definiert. Die Einbeziehung der IOV bei CL_{Bu} führte zu einer weiteren Verbesserung des Modells (dOFV - 8,96). Plasmakonzentrationen, die unterhalb des Quantifizierungslimits der analytischen Methoden lagen (*below limit of quantification*, BLQ) wurden in das Modell aufgenommen und durch das Fehlermodell berücksichtigt. Das in Abbildung 5 dargestellte Kompartimentmodell stellt die Plasmakonzentrations-Zeit-Profile von Busulfan und Sulfolan adäquat dar.

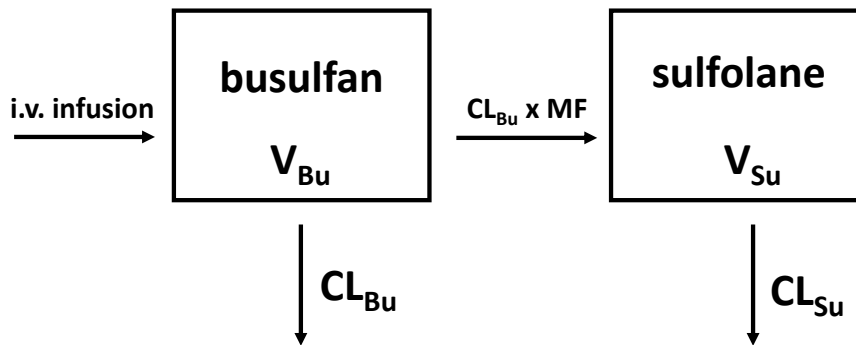


Abbildung 5 Kompartimentmodell zur Beschreibung der Konzentrations-Zeit-Profile von Busulfan und Sulfolan im Plasma. CL_{Bu} : Busulfan-Clearance = Gesamtclearance; V_{Bu} : Verteilungsvolumen von Busulfan; MF: metabolische Fraktion; CL_{Su} : Sulfolan-Clearance; V_{Su} : Verteilungsvolumen von Sulfolan [73].

Für die Entwicklung des Kovariatenmodells wurden 39 demografische oder klinische Variablen als mögliche Kandidaten identifiziert. Nach visueller Inspektion der Daten blieben noch zwölf potenzielle Kovariaten, die dann separat in das Modell aufgenommen wurden. Von allen getesteten Kandidaten zeigten sieben Kovariaten (TBW, JAK2-Mutation, GSTA1-SNP, GSTM1-Deletion, De-Ritis-Quotient, Alkalische Phosphatase (AP) und Bilirubin) einen statistisch signifikanten Abfall des OFV ($\alpha \leq 0,05$) im Vorwärtseinschluss-Schritt (*forward inclusion step*). Die Kovariaten-Beziehung zwischen TBW und V_{Bu} verbesserte das Basismodell sowohl statistisch von einem OFV von -2655,3 auf -2686,8 (dOFV -31,5) als auch grafisch und reduzierte die IIV auf V_{Bu} von 18,5 % auf 10,4 %. Eine Kovariaten-Beziehung zwischen GSTA1 und CL_{Su} führte zu einer Verringerung um 10,7 Punkte (OFV: -2697,5) und reduzierte die IIV für CL_{Su} von 136,3 % auf 112,8 %. Eine zusätzliche Beziehung zwischen AP oder Bilirubin und CL_{Bu} war im Vorwärtseinschluss-Schritt statistisch signifikant (dOFV -5,56 und -5,23), reduzierte aber weder die IIV auf CL_{Bu} wesentlich, noch zeigte sie eine nennenswerte Verbesserung der GOF-Plots. Daher wurde die Beziehung im Rückwärtseinschluss-Schritt (*backward elimination step*) verworfen.

Für das finale Modell betragen die typische CL_{Bu} und V_{Bu} für einen 75 kg schweren Patienten 16,3 L/h (IIV: 21,5 % CV) bzw. 61,5 L (IIV: 10,0 % CV). CL und V_d von Sulfolan wurden auf 1,61 L/h (IIV: 112,8 % CV) und 48,8 L (IIV: 77,6 % CV) geschätzt. Die IOV für CL_{Bu} betrug 7,6 %. Die Parameter-Schätzwerte des finalen Modells sowie die durch *sampling importance resampling* (SIR) ermittelten 95% Konfidenzintervalle sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 2 Parameter-Schätzwerte des finalen PK-Modells und die Ergebnisse des SIR [73]

Parameter	Finales Modell			SIR (M/m = 5000/1000)
	Schätzwert	RSE (%)	Shrinkage (%)	95% CI
CL_{Bu} [L/h]	16,3	3,6	-	15,18–17,35
V_{Bu} [L]	61,5	2	-	59,37–63,78
CL_{Su} [L/h]	1,61	37	-	0,84–2,24
V_{Su} [L]	48,8	35,2	-	30,75–78,46
MF	0,0704	28,6	-	0,0463–0,1029
COV_ V_{Bu} _TBW [kg]	0,854	11,6	-	0,665–1,059
COV_ CL_{Su} _GSTA1	1,43	43,6	-	0,63–2,40
IIV CL_{Bu} [CV %]	21,5	14,8	2	16,4–27,4
IIV V_{Bu} [CV %]	10,0	12	18	7,2–12,1
IIV CL_{Su} [CV %]	112,8	26,1	22	80,3–206,2
IIV V_{Su} [CV %]	77,6	14,2	18	59,2–106,4
IOV CL_{Bu} [CV %]	7,6	13,5	39	5,6–9,1
Prop. σ_{Bu} [CV %]	7,1	12,8	14	6,3–8,2
Prop. σ_{Su} [CV %]	36,2	7,2	12	32,6–40,1

CL_{Bu} : Busulfan-Clearance; CL_{Su} : Sulfolan-Clearance; COV_ CL_{Su} _GSTA1: typischer PK-Parameter für die Kovariate GSTA1 auf CL_{Su} ; COV_ V_{Bu} _TBW: typischer PK-Parameter für die Kovariate TBW auf V_{Bu} ; CV: Variationskoeffizient (%CV=sqrt(exp(OMEGA)-1)*100); IIV: inter-individuelle Variabilität; IOV: intra-individuelle Variabilität (inter-occasion variability); MF: Metabolische Fraction; OFV: objective function value; Prop. σ_{Bu} : residuale Variabilität von Busulfan berechnet als proportionaler Fehler; Prop. σ_{Su} : residual Variabilität von Sulfolan berechnet als proportionaler Fehler; RSE: relativer Standardfehler; SIR: sampling importance resampling; V_{Bu} : Verteilungsvolumen von Busulfan; V_{Su} : Verteilungsvolumen von Sulfolan

Die GOF-Plots für das finale Modell zeigen sowohl für die individuellen Vorhersagen als auch die Populationsvorhersagen gegen die beobachteten Konzentrationen eine gleichmäßige Verteilung um die Winkelhalbierende.

Der pcVPC zeigte Überlappungen zwischen den beobachteten Konzentrationen und den Vorhersagen für Busulfan (Abbildung 6A) und Sulfolan (Abbildung 6B).

Insgesamt lässt die grafische Evaluierung eine gute Vorhersageleistung und Robustheit des finalen Modells vermuten.

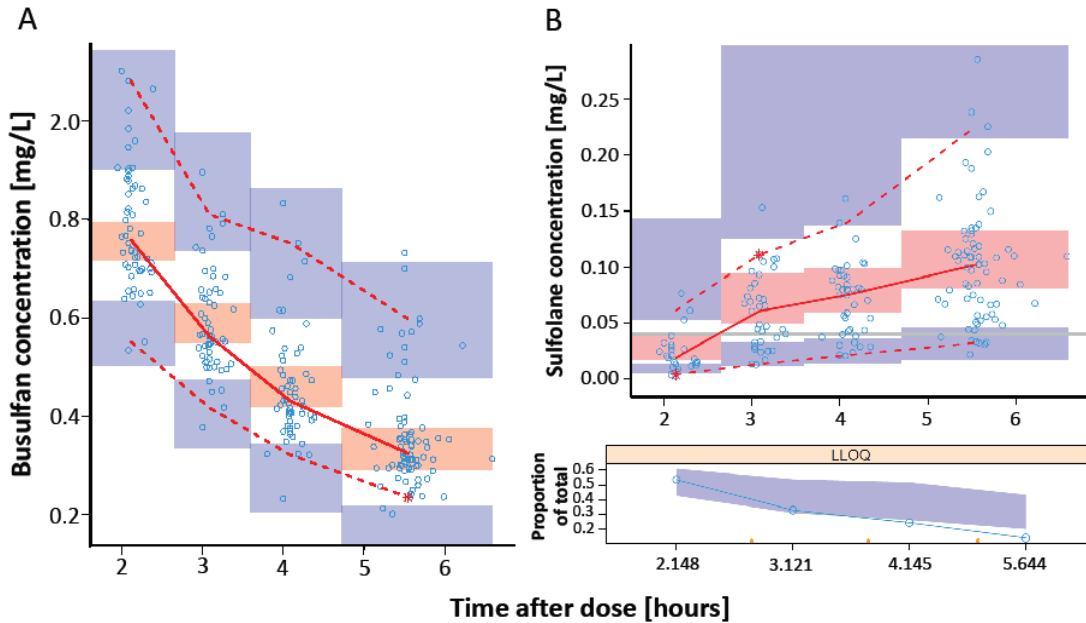


Abbildung 6 Prediction-corrected visual predictive check des finalen Modells von Busulfan (A) und Sulfolan (B). Offene Punkte stellen die vorhersagekorrigierte beobachtete Plasmakonzentration dar; durchgezogene rote Linie = Median der beobachteten Konzentrationen im Zeitverlauf; gestrichelte rote Linien = 5 und 95 % Quartile der beobachteten Konzentration im Zeitverlauf; blau schraffierte Fläche = 90 % KI der 5 % und 95 % Vorhersagen; rot schraffierte Fläche = 90 % KI der Medianvorhersagen; horizontale graue Linie in (B) = LLOQ von Sulfolan (0,04 mg/L); untere Teil in (B) zeigt den Anteil der BLQ-Sulfolan-Konzentrationen [73].

1.5 Diskussion

Die Konditionierungs-Chemotherapie mit Busulfan stellt aufgrund der sehr geringen therapeutischen Breite in Verbindung mit einer patientenindividuell hohen Variabilität zwischen Dosis und Plasmakonzentrationen eine besondere Herausforderung dar. Daher war es Ziel dieser Arbeit, die Pharmakokinetik von Busulfan als Teil der Konditionierungstherapie vor allo-HSZT zu untersuchen, um neue Erkenntnisse zum mit der Arzneimitteltherapie verbundenen TDM, pharmakokinetischen Interaktionen sowie Besonderheiten der PK von Patienten mit einer Myelofibrose zu gewinnen. Folglich soll so die

Arzneimitteltherapiesicherheit für Patienten, die eine Busulfan-basierte Konditionierungstherapie vor allo-HSCT durchlaufen erhöht werden.

1.5.1 Robustheit des TDM von Busulfan unter Verwendung bayesscher Methoden

Die Daten der pharmakometrischen Studie belegen, dass es sowohl bei einer einmal täglichen als auch bei viermal täglichen Busulfan-Gaben nur dann zu nennenswerten Verringerungen der Genauigkeit und Präzision kommt, wenn die dokumentierte Blutentnahme und Infusionszeit bis zu 30 Minuten von den tatsächlichen Zeiten abweichen. Dies kann im klinischen Alltag aber als eher unwahrscheinlich betrachtet werden. Die Tatsache, dass der mediane rPE der geschätzten AUC in keinem Szenario über 5 % lag, belegt eine für die Dosisindividualisierung von Busulfan hinreichende Genauigkeit und Robustheit von MIPD.

Ein Vergleich zwischen Q24H und Q6H in Hinsicht auf die Genauigkeit der geschätzten AUC zeigt einen etwas höheren Einfluss der Unsicherheit auf Q6H. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei einer Infusionszeit von zwei Stunden im Vergleich zu drei Stunden bei Q24H die Ungenauigkeit der Infusionszeit von 20 Minuten bei Q6H relativ gesehen höher ist (17 % bei Q6H gegenüber 11 % bei Q24H). Grundsätzlich lässt sich feststellen, dass die Genauigkeit und Präzision der AUC-Schätzungen abnehmen, wenn nur zwei Proben oder eine Probe für die Schätzung verwendet werden.

Die Ergebnisse dieser Studie waren aus zwei Gründen nur bedingt vorhersehbar: Einerseits hat Busulfan eine relativ kurze Halbwertszeit von zwei bis drei Stunden, so dass eine Abweichung beim Zeitpunkt der Blutentnahme von 30 Minuten beziehungsweise 17 bis 25 % der Halbwertszeit erhebliche Auswirkungen auf die Schätzung der AUC haben könnte. Andererseits handelt es sich bei den meisten PopPK-Modellen von Busulfan um 1-CMT-Modelle. So kann davon ausgegangen werden, dass das pharmakokinetische Verhalten von Busulfan nicht so komplex ist wie z. B. von Meropenem oder Vancomycin, welche häufig in 2-CMT-Modellen beschrieben werden [74,75]. Für Meropenem und Caspofungin wurden beispielsweise aufgrund der komplexeren Modellstruktur gezeigt, dass die Schätzungen für das zentrale Verteilungsvolumen (V_1), die interkompartimentelle Clearance (Q) und das

periphere Verteilungsvolumen (V_2) durch eine ungenaue Dokumentation der Blutentnahme- und der Infusionszeiten erheblich beeinträchtigt werden kann [27]. Doch auch wenn die PK von Busulfan in einem 2-CMT-Modell beschrieben wird [48] und daher die Genauigkeit und Präzision der individuell geschätzten AUC im Vergleich zu AUC-Schätzungen auf der Grundlage eines 1-CMT-Modells geringer ausfällt, deuten die berechneten rPE und rRMse auf eine Robustheit für das TDM von Busulfan unabhängig von der Modellkomplexität hin. Auch wenn bei Verwendung von nur einer Probe innerhalb von Q6H die Streuung der rPE 70,8 % beträgt und daher die geschätzte AUC mit entsprechender Vorsicht betrachtet werden sollte, ist eine zuverlässige Schätzung der AUC generell auch mit einer einzigen Probe möglich, da die Ungenauigkeit (ausgedrückt als rRMse) nicht mehr als 18,82 % beträgt.

Im Allgemeinen sind Schätzungen, die auf PopPK-Modellen unter Verwendung bayesscher Methoden beruhen, der NCA in Bezug auf Genauigkeit und Präzision überlegen [9,23,24]. Daher ist davon auszugehen, dass das MIPD von Busulfan sich in den meisten Transplantationszentren als Standard etablieren wird, und somit die Bewertung der Robustheit im Hinblick auf die Herausforderungen des klinischen Alltags einen wichtigen Beitrag zur Arzneimitteltherapiesicherheit leistet. Darüber hinaus ist durch die Durchführung von MIPD für Busulfan eine ausreichend genaue Schätzung der AUC mit nur wenigen Blutspiegeln möglich [6]. Im Vergleich zur NCA, wo die meisten TDM-Protokolle fünf Blutproben umfassen [23,76,77], kann MIPD, wie die Ergebnisse der Untersuchung bestätigen, selbst bei ungenauer Dokumentation, mit nur einer Blutprobe durchgeführt werden. Für eine zuverlässige Schätzung der AUC ist es jedoch empfehlenswert mindestens zwei Blutproben zu entnehmen, falls eine von ihnen, beispielsweise aufgrund von Messfehlern, nicht verwendet werden kann. Die Reduktion der benötigten Proben führt nicht nur zu einer geringeren Belastung der Patienten, da weniger Blut abgenommen werden muss, sondern senkt auch die Kosten der Analytik. Laut Palmer et al. liegen die Kosten für die Bioanalytik pro Probe zwischen 125 und 225 US-Dollar, was je nach Anzahl der pro Jahr durchgeführten TDMs eine erhebliche Kostensenkung bedeuten könnte [6].

1.5.2 Einfluss von Deferasirox auf die Pharmakokinetik von Busulfan

Anhand eines Kollektivs von 25 Patienten konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Behandlung mit Busulfan und Deferasirox während der Konditionierungstherapie vor einer allo-HSZT zu einer erhöhten Busulfan-Exposition führt. Die Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit eines Busulfan-TDM, insbesondere im Falle einer Komedikation, die einen bisher wenig bekannten Einfluss auf die Busulfan-Exposition haben kann. Ohne routinemäßiges TDM hätten drei Viertel der Patienten eine kumulative Busulfan-AUC oberhalb des Zielbereichs erreicht, ein Viertel der Patienten sogar eine AUC über $100 \text{ mg} \times \text{h/L}$, welche als Obergrenze der optimalen kumulativen Busulfan-AUC im Hinblick auf die Toxizität gilt [9]. Daher leisten die Studienergebnisse einen wertvollen Beitrag zur Arzneimitteltherapiesicherheit. Im Vergleich zur historischen Kontrollgruppe ohne Deferasirox lässt sich aus dem untersuchten Studienkollektiv schließen, dass die Einnahme von Deferasirox zu einem deutlichen Anstieg der Busulfan-AUC führt. Die Busulfan-Exposition bei gleichzeitiger Behandlung mit Deferasirox ist im Vergleich zu einer Behandlung ohne Deferasirox schätzungsweise um 35 % bis 40 % höher. Der Grund für die erhöhte Busulfan-Exposition liegt vermutlich in einer Verringerung der Busulfan-Clearance, die beim Studienkollektiv bei gleichzeitiger Behandlung mit Deferasirox im Median $0,134 \text{ l/h/kg}$ betrug. In PK-Studien ohne gleichzeitige Deferasirox-Therapie wurde für intravenös verabreichtes Busulfan bei Erwachsenen eine durchschnittliche Clearance von $0,2 \text{ L/h/kg}$ berichtet [4,76,78]. In Anwesenheit von Deferasirox ist die Busulfan-Clearance in unserer Kohorte also um rund ein Drittel reduziert.

Die Interaktion zwischen Busulfan und Deferasirox ist noch nicht vollständig geklärt. Busulfan wird hepatisch durch GST mit GSH konjugiert und anschließend wahrscheinlich durch CYP-Enzyme und FMO weiter metabolisiert [16-19].

Im Vergleich dazu wird Deferasirox hauptsächlich durch Glucuronidierung über die Glucuronosyltransferasen UGT1A1 und UGT1A3 abgebaut. Die Beteiligung von Oxidasen wie CYP-Enzyme gilt als eher unwahrscheinlich [79]. Interaktionsstudien haben jedoch eine moderate Induktion von CYP3A4 und eine moderate bis schwache Hemmung von CYP2C8 und CYP1A2 durch Deferasirox gezeigt [80]. Folglich könnte eine durch Deferasirox induzierte

Inhibition verschiedener CYP-Enzyme eine reduzierte oxidative Metabolisierung der Busulfan-GSH-Konjugate bedingen somit eine reduzierte Busulfan-Clearance erklären. Gleichwohl sind die für die Metabolisierung der Busulfan-Metaboliten relevanten CYP-Unterformen noch nicht vollständig bestimmt.

1.5.3 Bestimmung patientenspezifischer Kovariaten zur Erklärung der Variabilität der Pharmakokinetik von Busulfan bei Patienten mit Myelofibrose

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Populationspharmakokinetik von Busulfan bei Patienten mit Myelofibrose beschrieben, die eine allo-HSZT durchlaufen. Außerdem wurde erstmals Sulfolan in ein PopPK-Modell von Busulfan eingebunden, um eine Beziehung zwischen dessen Metaboliten und patientenspezifischen Kovariaten zu etablieren.

Die Ergebnisse legen nahe, dass die PK von Busulfan und dessen Metaboliten Sulfolan am besten durch ein 1-CMT-Modell mit Elimination erster Ordnung beschrieben wird. Dies stimmt mit den meisten veröffentlichten PK-Analysen von Busulfan überein, obwohl es auch einige wenige 2-CMT-Modelle für Busulfan gibt [46,48,83,84]. Die meisten veröffentlichten PopPK-Modelle für Busulfan legen den Schwerpunkt entweder auf pädiatrische Patienten, da die IIV sowie die IOV der Busulfan-PK bei Kindern und jungen Erwachsenen noch schwieriger vorherzusagen sind [56,57]. Andere Studien konzentrieren sich auf große Studienpopulationen, die eine Vielzahl maligner Erkrankungen umfassen [9,48]. Bislang gibt es jedoch kein PopPK-Modell, das sich ausschließlich auf Patienten mit Myelofibrose konzentriert. In Anbetracht der Tatsache, dass Patienten mit einer Myelofibrose einerseits ein erhöhtes Risiko für Hepatotoxizität und eine eingeschränkte Leberfunktion aufgrund einer extramedullären Hämatopoese mit sich bringen und eine eingeschränkte Leberfunktion andererseits mit einer geringeren Überlebensrate verbunden ist [83], war die Ermittlung der interindividuellen pharmakokinetischen Variabilität von Busulfan bei Patienten mit einer Myelofibrose längst überfällig.

Die Spannweite der cAUC von Busulfan (25,67 - 61,85 mg × h/L) zeigt eine individuell bis zu 2,4-fach unterschiedliche Busulfan-Exposition und bestätigt damit die auch aus der Literatur bekannte hohe IIV der Wirkstoffexposition. Obwohl Busulfan/Fludarabin im Rahmen von RIC

oder MAC häufig verwendet werden, gibt es noch immer keinen definierten therapeutischen Bereich für Patienten mit einer Myelofibrose. Zudem gibt es nur wenige PopPK-Modelle für Busulfan, in denen ausschließlich erwachsene Patienten eingeschlossen wurden. Wie McCune et al. gezeigt haben, findet bei pädiatrischen Patienten ein Reifeprozess der Clearance statt [48], so dass der in der Literatur angegebene Bereich für typische CL-Werte sehr groß ist. Die für die Studienpopulation ermittelten Werte für CL_{Bu} (16,3 L/h) und V_{Bu} (61,5 L) für einen Patienten mit einem TBW von 75 kg liegen im Bereich der aus der Literatur bekannten Werte. Sie unterscheiden sich jedoch von denen von Choi et al., die für ihre erwachsenen Patienten (typischer Patient mit 60 kg Körpergewicht) eine CL von 11 L/h und ein V_d von 42,4 L berichten [52]. Da Choi et al. in ihrem Modell verschiedene Erkrankungen einbezogen haben, könnten die unterschiedlichen Schätzungen ein Hinweis auf die Notwendigkeit gezielterer PK-Analysen für spezielle Patientenpopulationen sein. Hinsichtlich patientenspezifischer Kovariaten wird, vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Studie, der Einfluss von körpergrößenbezogenen Kovariaten und einem GSTA1-SNP auf die PK von Busulfan am häufigsten beschrieben. Allerdings wurde in der vorliegenden Studie zum ersten Mal Sulfolan in ein PopPK-Modell für Busulfan eingebunden. Hierbei konnte für das Studienkollektiv keine wie von Uppugunduri et al. beschriebene Korrelation zwischen dem Verhältnis von Busulfan zu Sulfolan ≥ 5 und einer höheren Rate an Transplantatversagen oder einem verringerten Ereignis-freien Überleben (*event free survival*, EFS) beobachtet werden [84]. Die Tatsache, dass unsere Daten eine IIV auf CL_{Su} von 112,8 % CV zeigen, unterstreicht jedoch die Komplexität des Metabolismus von Busulfan und erfordert weitere Untersuchungen hinsichtlich der Auswirkungen der Metaboliten auf das Patienten-Outcome. Die in unserem Modell etablierte Beziehung zwischen GSTA1 und der Clearance des Metaboliten mag auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinen, da Sulfolan nicht mit GSH konjugiert wird. Da jedoch mehrere intermediäre Metabolite, die von unterschiedlich Enzymen umgewandelt werden, für den Stoffwechselweg von Busulfan beschrieben sind, ist es durchaus denkbar, dass sich eine Veränderung der Aktivität eines der jeweiligen Enzyme möglicherweise auf die Ausscheidung von Sulfolan auswirken könnte [11].

1.5.4 Limitationen

Die unterschiedlichen Studiendesigns bedingen einige Limitationen, die im Folgenden diskutiert werden sollen.

Grundsätzlich ermöglichen SSE-Studien eine ressourcenschonende sowie ethisch unbedenkliche Untersuchung klinisch relevanter Fragestellungen, ohne den Aufwand einer vergleichbaren klinischen Studie betreiben zu müssen. Dabei darf jedoch nicht vernachlässigt werden, dass es sich um einen rein theoretischen Ansatz handelt, der nicht alle Aspekte einer klinischen Studie abdeckt. Des Weiteren basieren die durchgeführten Simulationen und Schätzungen auf den PopPK-Modellen von Choi et al. und McCune et al. [48,52], wodurch die ermittelten Parameter als spezifisch für die untersuchte Population betrachtet werden müssen. Darüber hinaus sind die Ergebnisse auch von der Qualität der dort erhobenen Daten abhängig. Die Ergebnisse der SSE-Studie zeigen zwar, dass MIPD-basierte AUC-Schätzungen gegenüber Abweichungen in der Dokumentation robust sind. Jedoch ist anzunehmen, dass das PopPK-Modell, auf dem das TDM basiert, im hohen Maße auf genau dokumentierte Daten angewiesen ist [27]. In manchen Fällen erfolgt die Modellentwicklung mit einer Vielzahl von Blutspiegeln im Rahmen eines gezielten und kontrollierten Studiendesigns [45]. In anderen Fällen werden TDM-Daten aus der klinischen Routine für die Modellentwicklung verwendet [85], so dass es sein kann, dass das Bewusstsein für eine genaue Dokumentation nicht gegeben war.

Aufgrund des Konzepts als Beobachtungsstudie für die Untersuchung des Einflusses von Deferasirox auf die Pharmakokinetik von Busulfan wurde keine direkte Kontrollgruppe vorgesehen. Die retrospektive Analyse einer hinsichtlich demographischer Daten, Konditionierungstherapie und Komedikation mit Ausnahme von Deferasirox vergleichbaren historischen Kontrollgruppe erlaubt es jedoch einen aussagekräftigen Vergleich zu ziehen. Weitere Limitationen ergeben sich aus möglichen anderen Arzneimittelinteraktionen zwischen Busulfan und der weiteren Komedikation. Kein Patient wurde vor oder während der Konditionierung mit Metronidazol, Itraconazol, oder Phenytoin behandelt. Jedoch erhielten vier Patienten bei Aufnahme Voriconazol oder Posaconazol, was zwar bei zwei Patienten vor Start der Konditionierung abgesetzt, bei den anderen zwei Patienten jedoch auch während

der Behandlung mit Busulfan fortgeführt wurde. Darüber hinaus wurde sieben Patienten weniger als 72h vor oder während der Konditionierung eine Einmalgabe mit Paracetamol verabreicht.

Auch für das entwickelte PopPK-Modell für Patienten mit einer Myelofibrose gibt es Limitationen, die berücksichtigt werden müssen. Zunächst ist es aufgrund des relativ kleinen Kollektivs von 37 Patienten möglicherweise nicht möglich, die Beziehungen zwischen Kovariaten und PK-Parametern ausreichend zu charakterisieren – insbesondere wenn die Auswirkungen der Kovariaten auf die PK-Parameter eine eher geringe Effektgröße aufweisen. Darüber hinaus ist die Verwendung eines PopPK-Modells, das auf einem verhältnismäßig kleinen Patientenkollektiv basiert, für das MIPD nur bedingt geeignet, da die quantitative Beziehung zwischen einer Kovariate und ihrem jeweiligen PK-Parameter ungenau sein und daher zu verzerrten Schätzungen der Arzneimittelexposition führen könnte [86]. Zusätzlich konnte aufgrund des retrospektiven Einschlusses von sieben Patienten keine Sulfolan-Plasmakonzentrationen für diese Patienten in das Modell einbezogen werden. Und zuletzt war es aus technischen Gründen nicht möglich, bei 14 Patienten einen Fibroscan durchzuführen, so dass eine Beziehung zwischen der Kovariate und den PK-Parametern nicht ausreichend untersucht werden konnte.

1.5.5 Fazit und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es die Pharmakokinetik von Busulfan als Teil der Konditionierungstherapie vor allo-HSCT zu untersuchen, um neue Erkenntnisse zum mit der Arzneimitteltherapie verbundenen TDM, zu pharmakokinetischen Interaktionen sowie zu Besonderheiten der PK bei Patienten mit Myelofibrose zu gewinnen.

Es konnte gezeigt werden, dass das TDM von Busulfan unter Verwendung bayesscher Methoden robust gegenüber Ungenauigkeiten bei der Dokumentation ist und mit einer geringen Anzahl von Proben durchgeführt werden kann. Da die durchgeführte SSE-Studie aufgrund des theoretischen Ansatzes jedoch nicht alle Aspekte einer klinischen Studie

abdecken kann sollten die gefundenen Ergebnisse idealerweise anhand eines größeren Patientenkollektivs validiert werden.

Hinsichtlich pharmakokinetischer Interaktionen von Busulfan wurde demonstriert, dass die gleichzeitige Behandlung mit Deferasirox aufgrund einer verringerten Clearance zu einer signifikanten Erhöhung der Busulfan-Exposition führt. Eine kontrollierte Vergleichsstudie mit einem größeren Patientenkollektiv ist jedoch nötig, um das genaue Ausmaß der Interaktion quantifizieren zu können.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit das erste PopPK-Modell zur Beschreibung der Pharmakokinetik von Busulfan bei Patienten mit Myelofibrose entwickelt. Als wichtigste Kovariate wurde das TBW ermittelt. Die Einbeziehung des Metaboliten Sulfolan in das Modell ermöglichte es nicht nur, die Kovariatenbeziehung zwischen GSTA1 und der Clearance des Metaboliten zu charakterisieren, sondern offenbarte auch eine hohe IIV für CL_{Su} . Weitere, zum Beispiel multizentrische Studien, mit größeren Patientenkollektiven sind notwendig, um weitere Kovariaten zu finden, die die hohe IIV der Sulfolan-CL erklären, und um gegebenenfalls eine geeignete cAUC für Patienten mit Myelofibrose ermitteln.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegende Arbeit zu einem besseren Verständnis der oftmals beobachteten Variabilität der Busulfan-PK beiträgt und folglich die Arzneimitteltherapiesicherheit für Patienten, die eine Busulfan-basierte Konditionierungstherapie vor allo-HSZT durchlaufen, verbessert.

2 Literaturverzeichnis

1. Huez-Diaz P, S. Uppugunduri C, Tyagi A, Krajinovic M, Ansari M. Pharmacogenetic Aspects of Drug Metabolizing Enzymes in Busulfan Based Conditioning Prior to Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children. *Curr Drug Metab.* 31. April 2014;15(3):251–64.
2. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralto S, Lazarus H, Ho V, u. a. Defining the Intensity of Conditioning Regimens: Working Definitions. *Biol Blood Marrow Transplant.* Dezember 2009;15(12):1628–33.
3. McLornan DP, Yakoub-Agha I, Robin M, Chalandon Y, Harrison CN, Kroger N. State-of-the-art review: allogeneic stem cell transplantation for myelofibrosis in 2019. *Haematologica.* April 2019;104(4):659–68.
4. McCune JS, Holmberg LA. Busulfan in hematopoietic stem cell transplant setting. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* August 2009;5(8):957–69.
5. Andersson BS, Thall PF, Valdez BC, Milton DR, Al-Atrash G, Chen J, u. a. Fludarabine with pharmacokinetically guided IV busulfan is superior to fixed-dose delivery in pretransplant conditioning of AML/MDS patients. *Bone Marrow Transplant.* April 2017;52(4):580–7.
6. Palmer J, McCune JS, Perales MA, Marks D, Bubalo J, Mohty M, u. a. Personalizing Busulfan-Based Conditioning: Considerations from the American Society for Blood and Marrow Transplantation Practice Guidelines Committee. *Biol Blood Marrow Transplant.* November 2016;22(11):1915–25.
7. Perkins J, Field T, Kim J, Kharfan-Dabaja MA, Ayala E, Perez L, u. a. Pharmacokinetic targeting of iv BU with fludarabine as conditioning before hematopoietic cell transplant: the effect of first-dose area under the concentration time curve on transplant-related outcomes. *Bone Marrow Transplant.* 2011;46(11):1418.
8. Philippe M, Neely M, Rushing T, Bertrand Y, Bleyzac N, Goutelle S. Maximal concentration of intravenous busulfan as a determinant of veno-occlusive disease: a pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis in 293 hematopoietic stem cell transplanted children. *Bone Marrow Transplant.* März 2019;54(3):448–57.
9. Bartelink IH, Lalmohamed A, van Reij EML, Dvorak CC, Savic RM, Zwaveling J, u. a. Association of busulfan exposure with survival and toxicity after haemopoietic cell transplantation in children and young adults: a multicentre, retrospective cohort analysis. *Lancet Haematol.* November 2016;3(11):e526–36.
10. Derendorf H, Gramatté T, Schäfer HG, Staab A. *Pharmakokinetik: Einführung in die Theorie und Relevanz für die Arzneimitteltherapie ; 29 Tabellen.* 2., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges; 2002. 336 S.
11. Lawson R, Staatz CE, Fraser CJ, Hennig S. Review of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intravenous Busulfan in Paediatric Patients. *Clin Pharmacokinet*

- [Internet]. 30. Oktober 2020 [zitiert 3. Dezember 2020]; Verfügbar unter: <http://link.springer.com/10.1007/s40262-020-00947-2>
12. Hassan M, Öberg G, Ehrsson H, Ehrnebo M, Wallin I, Smedmyr B, u. a. Pharmacokinetic and metabolic studies of high-dose busulphan in adults. *Eur J Clin Pharmacol.* 1989;36(5):525–30.
 13. Hassan M, Ehrsson H, Smedmyr B, Tötterman T, Wallin I, Öberg G, u. a. Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of busulfan during high-dose therapy. *Bone Marrow Transplant.* Januar 1989;4(1):113–4.
 14. Vassal G, Deroussent A, Hartmann O, Challine D, Benhamou E, Valteau-Couanet D, u. a. Dose-dependent neurotoxicity of high-dose busulfan in children: a clinical and pharmacological study. *Cancer Res.* 1. Oktober 1990;50(19):6203–7.
 15. Akiyama K, Kume T, Fukaya M, Shiki I, Enami T, Tatara R, u. a. Comparison of levetiracetam with phenytoin for the prevention of intravenous busulfan-induced seizures in hematopoietic cell transplantation recipients. *Cancer Chemother Pharmacol.* Oktober 2018;82(4):717–21.
 16. Czerwinski M, Gibbs JP, Slattery JT. Busulfan conjugation by glutathione S-transferases alpha, mu, and pi. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* September 1996;24(9):1015–9.
 17. Gibbs JP, Liacouras CA, Baldassano RN, Slattery JT. Up-regulation of glutathione S-transferase activity in enterocytes of young children. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* Dezember 1999;27(12):1466–9.
 18. El-Serafi I, Terelius Y, Abedi-Valugerdi M, Naughton S, Saghafian M, Moshfegh A, u. a. Flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) role in busulphan metabolic pathway. *Passi AG, Herausgeber. PLOS ONE.* 9. November 2017;12(11):e0187294.
 19. Uppugunduri CRS, Rezgui MA, Diaz PH, Tyagi AK, Rousseau J, Daali Y, u. a. The association of cytochrome P450 genetic polymorphisms with sulfolane formation and the efficacy of a busulfan-based conditioning regimen in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Pharmacogenomics J.* Juni 2014;14(3):263–71.
 20. Russell JA, Kangaroo SB. Therapeutic Drug Monitoring of Busulfan in Transplantation. :14.
 21. Gurlek Gokcebay D, Arman Bilir O, Şahin S, Ok Bozkaya İ, Ozbek NY. Role of therapeutic drug monitoring of intravenous Busulfan for prevention of sinusoidal obstructive syndrome in children. *Pediatr Transplant [Internet].* 28. März 2022 [zitiert 27. Mai 2022]; Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/petr.14266>

22. Ruutu T, van der Werf S, van Biezen A, Backman JT, Peczynski C, Kröger N, u. a. Use of busulfan in conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults: a survey by the Transplant Complications Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 3. Juni 2019 [zitiert 7. Oktober 2019]; Verfügbar unter: <http://www.nature.com/articles/s41409-019-0579-0>
23. Salinger DH, Vicini P, Blough DK, O'Donnell PV, Pawlikowski MA, McCune JS. Development of a Population Pharmacokinetics-Based Sampling Schedule to Target Daily Intravenous Busulfan for Outpatient Clinic Administration. *J Clin Pharmacol*. November 2010;50(11):1292–300.
24. Shukla P. Assessment of a Model-Informed Precision Dosing Platform Use in Routine Clinical Care for Personalized Busulfan Therapy in the Pediatric Hematopoietic Cell Transplantation (HCT) Population. *Front Pharmacol*. 2020;11:8.
25. McCune JS, Quinones CM, Ritchie J, Carpenter PA, van Maarseveen E, Yeh RF, u. a. Harmonization of Busulfan Plasma Exposure Unit (BPEU): A Community-Initiated Consensus Statement. *Biol Blood Marrow Transplant*. September 2019;25(9):1890–7.
26. van der Meer AF, Touw DJ, Marcus MAE, Neef C, Proost JH. Influence of Erroneous Patient Records on Population Pharmacokinetic Modeling and Individual Bayesian Estimation: *Ther Drug Monit*. Oktober 2012;34(5):526–34.
27. Alihodzic D, Broeker A, Baehr M, Kluge S, Langebrake C, Wicha SG. Impact of Inaccurate Documentation of Sampling and Infusion Time in Model-Informed Precision Dosing. *Front Pharmacol*. 3. März 2020;11:172.
28. Palleria C, Di Paolo A, Giofrè C, Caglioti C, Leuzzi G, Siniscalchi A, u. a. Pharmacokinetic drug-drug interaction and their implication in clinical management. *J Res Med Sci Off J Isfahan Univ Med Sci*. Juli 2013;18(7):601–10.
29. Myers AL, Kawedia JD, Champlin RE, Kramer MA, Nieto Y, Ghose R, u. a. Clarifying busulfan metabolism and drug interactions to support new therapeutic drug monitoring strategies: a comprehensive review. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2. September 2017;13(9):901–23.
30. Glotzbecker B, Duncan C, Alyea E, Campbell B, Soiffer R. Important drug interactions in hematopoietic stem cell transplantation: what every physician should know. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. Juli 2012;18(7):989–1006.
31. Chung H, Yu KS, Hong KT, Choi JY, Hong CR, Kang HJ, u. a. A Significant Influence of Metronidazole on Busulfan Pharmacokinetics: A Case Report of Therapeutic Drug Monitoring. 2017;3.

32. Buggia I, Zecca M, Alessandrino EP, Locatelli F, Rosti G, Bosi A, u. a. Itraconazole can increase systemic exposure to busulfan in patients given bone marrow transplantation. GITMO (Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo). *Anticancer Res.* August 1996;16(4A):2083–8.
33. Hassan M, Fasth A, Gerritsen B, Haraldsson A, Syrůcková Z, van den Berg H, u. a. Busulphan kinetics and limited sampling model in children with leukemia and inherited disorders. *Bone Marrow Transplant.* November 1996;18(5):843–50.
34. Langenhorst JB, Boss J, Kesteren C, Lalmohamed A, Kuball J, Egberts ACG, u. a. A semi-mechanistic model based on glutathione depletion to describe intra-individual reduction in busulfan clearance. *Br J Clin Pharmacol.* 10. März 2020;bcp.14256.
35. Sweiss K, Quigley JG, Oh A, Lee J, Ye R, Rondelli D, u. a. A novel drug interaction between busulfan and blinatumomab. *J Oncol Pharm Pract.* Januar 2019;25(1):226–8.
36. Sweiss K, Patel P, Rondelli D. Deferasirox increases BU blood concentrations. *Bone Marrow Transplant.* Februar 2012;47(2):315–6.
37. Kwiatkowski J, Duffner U, Abdel-Mageed A. Deferasirox Decreases Busulfan Clearance. *Ann Pharmacother.* Mai 2018;52(5):497–8.
38. Armand P, Kim HT, Rhodes J, Sainvil MM, Cutler C, Ho VT, u. a. Iron Overload in Patients with Acute Leukemia or MDS Undergoing Myeloablative Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* Juni 2011;17(6):852–60.
39. Leitch HA, Fibach E, Rachmilewitz E. Toxicity of iron overload and iron overload reduction in the setting of hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* Mai 2017;113:156–70.
40. Karlsson MO, Sheiner LB. The importance of modeling interoccasion variability in population pharmacokinetic analyses. *J Pharmacokinet Biopharm.* Dezember 1993;21(6):735–50.
41. Owen JS, Fiedler-Kelly J. Introduction to Population Pharmacokinetic / Pharmacodynamic Analysis with Nonlinear Mixed Effects Models: Owen/Introduction to Population Pharmacokinetic / Pharmacodynamic Analysis with Nonlinear Mixed Effects Models [Internet]. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2014 [zitiert 22. Mai 2019]. Verfügbar unter: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118784860>
42. 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.* 1. November 2011;17(21):6867–77.

43. Long-Boyle J, Savic R, Yan S, Bartelink I, Musick L, French D, u. a. 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. 2016;26.
44. Alsultan A, Albassam AA, Alturki A, Alsultan A, Essa M, Almuzzaini B, u. a. Population pharmacokinetics of busulfan in Saudi pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Clin Pharm* [Internet]. 5. März 2020 [zitiert 7. April 2020]; Verfügbar unter: <http://link.springer.com/10.1007/s11096-020-00989-3>
45. Nava T, Kassir N, Rezgui MA, Uppugunduri CRS, Huezo-Diaz Curtis P, Duval M, u. a. Incorporation of *GSTA1* genetic variations into a population pharmacokinetic model for IV busulfan in paediatric hematopoietic stem cell transplantation: *GSTA1* -based busulfan population pharmacokinetic model in children. *Br J Clin Pharmacol*. Juli 2018;84(7):1494–504.
46. Ben Hassine K, Nava T, Théoret Y, Nath CE, Daali Y, Kassir N, u. a. Precision dosing of intravenous busulfan in pediatric hematopoietic stem cell transplantation: Results from a multicenter population pharmacokinetic study. *CPT Pharmacomet Syst Pharmacol*. September 2021;10(9):1043–56.
47. Sandström M, Karlsson M, Ljungman P, Hassan Z, Jonsson E, Nilsson C, u. a. Population pharmacokinetic analysis resulting in a tool for dose individualization of busulphan in bone marrow transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant*. Oktober 2001;28(7):657–64.
48. 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*. 1. Februar 2014;20(3):754–63.
49. Wu X, Xie H, Lin W, Yang T, Li N, Lin S, u. a. Population pharmacokinetics analysis of intravenous busulfan in Chinese patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Mai 2017;44(5):529–38.
50. Kawazoe A, Funaki T, Kim S. Population Pharmacokinetic Analysis of Busulfan in Japanese Pediatric and Adult HCT Patients. *J Clin Pharmacol*. September 2018;58(9):1196–204.
51. Zwaveling J, Press RR, Bredius RGM, van derStraaten TRJHM, den Hartigh J, Bartelink IH, u. a. Glutathione S-transferase Polymorphisms Are Not Associated With Population Pharmacokinetic Parameters of Busulfan in Pediatric Patients. *Ther Drug Monit*. August 2008;30(4):504–10.
52. Choi B, Kim MG, Han N, Kim T, Ji E, Park S, u. a. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of busulfan with *GSTA1* polymorphisms in patients undergoing

- allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pharmacogenomics*. September 2015;16(14):1585–94.
53. Ansari M, Curtis PHD, Uppugunduri CRS, Rezgui MA, Nava T, Mlakar V, u. a. GSTA1 diplotypes affect busulfan clearance and toxicity in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a multicenter study. *Oncotarget*. 27. August 2017;8(53):90852–67.
54. Bartelink IH, Boelens JJ, Bredius RGM, Egberts ACG, Wang C, Bierings MB, u. a. Body Weight-Dependent Pharmacokinetics of Busulfan in Paediatric Haematopoietic Stem Cell Transplantation Patients: Towards Individualized Dosing. *Clin Pharmacokinet*. Mai 2012;51(5):331–45.
55. Lee JW, Kang HJ, Lee SH, Yu KS, Kim NH, Yuk YJ, u. a. Highly Variable Pharmacokinetics of Once-Daily Intravenous Busulfan When Combined with Fludarabine in Pediatric Patients: Phase I Clinical Study for Determination of Optimal Once-Daily Busulfan Dose Using Pharmacokinetic Modeling. *Biol Blood Marrow Transplant*. Juni 2012;18(6):944–50.
56. Marsit H, Philippe M, Neely M, Rushing T, Bertrand Y, Ducher M, u. a. Intra-individual Pharmacokinetic Variability of Intravenous Busulfan in Hematopoietic Stem Cell-Transplanted Children. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 11. März 2020 [zitiert 7. April 2020]; Verfügbar unter: <http://link.springer.com/10.1007/s40262-020-00877-z>
57. Lawson R, Staats CE, Fraser CJ, Ramachandran S, Teague L, Mitchell R, u. a. Population Pharmacokinetic Model for Once Daily Intravenous Busulfan in Paediatric Subjects Describing TIME-ASSOCIATED Clearance. *CPT Pharmacomet Syst Pharmacol*. 25. Mai 2022;psp4.12809.
58. Bertrand J, Laffont CM, Mentré F, Chenel M, Comets E. Development of a Complex Parent-Metabolite Joint Population Pharmacokinetic Model. *AAPS J*. September 2011;13(3):390–404.
59. Farhadfar N, Cerquozzi S, Patnaik M, Tefferi A. Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Myelofibrosis: A Practical Review. *J Oncol Pract*. Juli 2016;12(7):611–21.
60. Cazzola M, Kralovics R. From Janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 12. Juni 2014;123(24):3714–9.
61. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, Guglielmelli P, Martínez-Trillos A, Casetti I, u. a. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood*. 14. August 2014;124(7):1062–9.
62. McLornan DP, Malpassuti V, Lippinkhof-Kozijn A, Potter V, Beelen D, Bunjes D, u. a. Outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in myeloproliferative

- neoplasm, unclassifiable: a retrospective study by the Chronic Malignancies Working Party of the EBMT. *Br J Haematol.* August 2020;190(3):437–41.
63. Kroger N, Holler E, Kobbe G, Bornhauser M, Schwerdtfeger R, Baurmann H, u. a. Allogeneic stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning in patients with myelofibrosis: a prospective, multicenter study of the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood.* 17. Dezember 2009;114(26):5264–70.
64. Jain T, Kunze KL, Temkit M, Partain DK, Patnaik MS, Slack JL, u. a. Comparison of reduced intensity conditioning regimens used in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Bone Marrow Transplant.* Februar 2019;54(2):204–11.
65. Popat U, Mehta RS, Bassett R, Kongtim P, Chen J, Alousi AM, u. a. Optimizing the Conditioning Regimen for Hematopoietic Cell Transplant in Myelofibrosis: Long-Term Results of a Prospective Phase II Clinical Trial. *Biol Blood Marrow Transplant.* August 2020;26(8):1439–45.
66. Dadkhah A, Alihodzic D, Broeker A, Kröger N, Langebrake C, Wicha SG. Evaluation of the Robustness of Therapeutic Drug Monitoring Coupled with Bayesian Forecasting of Busulfan with Regard to Inaccurate Documentation. *Pharm Res [Internet].* 18. Oktober 2021 [zitiert 28. Oktober 2021]; Verfügbar unter: <https://link.springer.com/10.1007/s11095-021-03115-8>
67. Essmann, Sonja, „Eisenchelation mit Deferasirox unter Konditionierung vor allogener Stammzelltransplantation“, Universität Hamburg, Hamburg, 2021. [Online]. Verfügbar unter: [urn:nbn:de:gbv:18-ediss-97409](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:gbv:18-ediss-97409)
68. J. McCune, D. D. Shen, L. Shireman, und B. Phillips, „Bioanalytical Method: Tetrahydrothiophene-1-oxide and Sulfolane and 3-Hydroxysulfolane in Plasma“, University of Washington School of Pharmacy, BAM217; National Cancer Institute [R01 CA182963] (to J.S.M.).
69. Bonate PL. *Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation [Internet].* Boston, MA: Springer US; 2011 [zitiert 3. Februar 2022]. Verfügbar unter: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-9485-1>
70. Savic RM, Karlsson MO. Importance of Shrinkage in Empirical Bayes Estimates for Diagnostics: Problems and Solutions. *AAPS J.* September 2009;11(3):558–69.
71. Bergstrand M, Hooker AC, Wallin JE, Karlsson MO. Prediction-Corrected Visual Predictive Checks for Diagnosing Nonlinear Mixed-Effects Models. *AAPS J.* Juni 2011;13(2):143–51.
72. Essmann S, Dadkhah A, Janson D, Wolschke C, Ayuk F, Kröger NM, u. a. Iron Chelation With Deferasirox Increases Busulfan AUC During Conditioning Chemotherapy Prior to

- Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Transplant Cell Ther.* November 2021;S2666636721013646.
73. Dadkhah A, Wicha SG, Kröger N, Müller A, Pfaffendorf C, Riedner M, u. a. Population Pharmacokinetics of Busulfan and Its Metabolite Sulfolane in Patients with Myelofibrosis Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 2022;13.
74. Usman M. Population pharmacokinetics of meropenem in elderly patients: dosing simulations based on renal function. *Eur J Clin Pharmacol.* 2017;10.
75. Goti V, Chaturvedula A, Fossler MJ, Mok S, Jacob JT. Hospitalized Patients With and Without Hemodialysis Have Markedly Different Vancomycin Pharmacokinetics: A Population Pharmacokinetic Model-Based Analysis. *Ther Drug Monit.* April 2018;40(2):212–21.
76. Salman B, Al-Za'abi M, Al-Huneini M, Dennison D, Al-Rawas A, Al-Kindi S, u. a. Therapeutic drug monitoring-guided dosing of busulfan differs from weight-based dosing in hematopoietic stem cell transplant patients. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* Juni 2017;10(2):70–8.
77. de Castro FA, Piana C, Simões BP, Lanchote VL, Della Pasqua O. Busulfan dosing algorithm and sampling strategy in stem cell transplantation patients: Busulfan sampling strategy in stem cell transplantation. *Br J Clin Pharmacol.* Oktober 2015;80(4):618–29.
78. Buffery PJ, Allen KM, Chin PKL, Moore GA, Barclay ML, Begg EJ. Thirteen Years' Experience of Pharmacokinetic Monitoring and Dosing of Busulfan: Can the Strategy be Improved? *Ther Drug Monit.* Februar 2014;36(1):86–92.
79. Galanello R, Campus S, Origa R. Deferasirox: pharmacokinetics and clinical experience. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* Januar 2012;8(1):123–34.
80. Tanaka C. Clinical Pharmacology of Deferasirox. *Clin Pharmacokinet.* August 2014;53(8):679–94.
81. Kim B, Lee JW, Hong KT, Yu KS, Jang IJ, Park KD, u. a. Pharmacometabolomics for predicting variable busulfan exposure in paediatric haematopoietic stem cell transplantation patients. *Sci Rep [Internet].* Dezember 2017 [zitiert 2. April 2019];7(1). Verfügbar unter: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-01861-7>
82. Neroutsos E, Nalda-Molina R, Paisiou A, Zisaki K, Goussetis E, Spyridonidis A, u. a. Development of a Population Pharmacokinetic Model of Busulfan in Children and Evaluation of Different Sampling Schedules for Precision Dosing. *Pharmaceutics.* 15. März 2022;14(3):647.

83. Wong KM, Atenafu EG, Kim D, Kuruvilla J, Lipton JH, Messner H, u. a. Incidence and Risk Factors for Early Hepatotoxicity and Its Impact on Survival in Patients with Myelofibrosis Undergoing Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. Oktober 2012;18(10):1589–99.
84. Uppugunduri C, Rezgui M, Huezio-Diaz C, Nava T, Mlakar S, Théoret Y, u. a. P97 Busulfan/sulfolane metabolic ratio on the third day of conditioning may predict the event-free survival in children receiving busulfan based conditioning prior to hematopoietic stem-cell transplantation. *Arch Dis Child*. Juni 2019;104(6):e57.2-e58.
85. Broeker A, Nardecchia M, Klinker KP, Derendorf H, Day RO, Marriott DJ, u. a. Towards precision dosing of vancomycin: a systematic evaluation of pharmacometric models for Bayesian forecasting. *Clin Microbiol Infect*. Oktober 2019;25(10):1286.e1-1286.e7.
86. Broeker A, Wicha SG. Assessing parameter uncertainty in small-n pharmacometric analyses: value of the log-likelihood profiling-based sampling importance resampling (LLP-SIR) technique. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. Juni 2020;47(3):219–28.

3 Publikationen

3.1 Evaluation of the Robustness of Therapeutic Drug Monitoring Coupled with Bayesian Forecasting of Busulfan with Regard to Inaccurate Documentation

Autoren: Adrin Dadkhah, Dzenefa Alihodzic, Astrid Broecker, Nicolaus Kröger,
Claudia Langebrake, Sebastian G. Wicha

Journal: Pharmaceutical Research

Impact Factor: 4.580 (2021)



RESEARCH PAPER

Evaluation of the Robustness of Therapeutic Drug Monitoring Coupled with Bayesian Forecasting of Busulfan with Regard to Inaccurate Documentation

Adrin Dadkhah^{1,2} · Dzenefa Alihodzic¹ · Astrid Broecker² · Nicolaus Kröger³ · Claudia Langebrake^{1,3} · Sebastian G. Wicha²

Received: 25 May 2021 / Accepted: 20 September 2021
© The Author(s) 2021

ABSTRACT

Background Inaccurate documentation of sampling and infusion times is a potential source of error in personalizing busulfan doses using therapeutic drug monitoring (TDM). Planned times rather than the actual times for sampling and infusion time are often documented.

Therefore, this study aimed to evaluate the robustness of a limited sampling TDM of busulfan with regard to inaccurate documentation.

Methods A pharmacometric analysis was conducted in NONMEM® 7.4.3 and “R” by performing stochastic simulation and estimation with four, two and one sample(s) per patient on the basis of a one-compartment- (1CMT) and two-compartment (2CMT) population pharmacokinetic model. The dosing regimens consisted of i.v. busulfan (0.8 mg/kg) every 6 h (Q6H) or 3.2 mg/kg every 24 h (Q24H) with a 2 h- and 3 h infusion time,

respectively. The relative prediction error (rPE) and relative root-mean-square error (rRmse) were calculated in order to determine the accuracy and precision of the individual AUC estimation.

Results A noticeable impact on the estimated AUC based on a 1CMT-model was only observed if uncertain documentation reached ± 30 min (1.60% for Q24H and 2.19% for Q6H). Calculated rPEs and rRmse for Q6H indicate a slightly lower level of accuracy and precision when compared to Q24H. Spread of rPE's and rRmse for the 2CMT-model were wider and higher compared to estimations based on a 1CMT-model.

Conclusions The estimated AUC was not affected substantially by inaccurate documentation of sampling and infusion time. The calculated rPEs and rRmses of estimated AUC indicate robustness and reliability for TDM of busulfan, even in presence of erroneous records.

KEY WORDS busulfan · pharmacometrics · sampling · therapeutic drug monitoring

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11095-021-03115-8>.

✉ Adrin Dadkhah
a.dadkhah@uke.de

¹ Hospital Pharmacy, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany

² Dept. of Clinical Pharmacy, Institute of Pharmacy, University of Hamburg, Hamburg, Germany

³ Department of Stem Cell Transplantation, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

INTRODUCTION

In allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), busulfan-based conditioning regimens are commonly used for adult and pediatric patients. For myeloablative conditioning (MAC), there has been extensive research on the matter of determining if there is a correlation between busulfan drug exposure and patient outcome after allo-HSCT. It was shown that on the one hand under-exposure leads to higher risks of relapse and graft rejection, and on the other hand over-exposure results more often in organ toxicity, sinusoidal obstructive syndrome (SOS), acute

graft-*versus*-host-disease (aGvHD) and overall higher treatment-related mortality (TRM) (1–4). Moreover, high inter-patient variability in drug exposure, even after intravenous application, makes individual dose selection challenging and therefore using therapeutic drug monitoring (TDM) is advisable in order to ensure that drug exposure is maintained within the narrow therapeutic range (5, 6).

A recent survey by Ruutu *et al.* showed that there is a lack of consistency regarding pharmacokinetic (PK)-guided dose adjustment practices. This not only applies to target parameters but also to the performance of TDM itself (7). Table S1 (Supplementary) provides an overview of published TDM-protocols as performed by different transplant centers, with the main difference lying in the number of blood samples used and the method of estimating the area under the curve (AUC). The two most commonly used methods for AUC-estimation are non-compartmental analysis (NCA) and model-informed precision dosing (MIPD) using Bayesian forecasting. Comparing these methods, it was found that MIPD does not only deliver higher accuracy and precision of estimations but enables the establishment of limited sampling strategies (LSS) as well (2, 4, 8, 9). Moreover, the use of only one method for AUC-estimation and the harmonization of busulfan plasma exposure units (BPEU) facilitates the comparison of TDM-based exposure data and therefore AUC-targets between transplant centers (4, 10).

Besides the deviations between TDM-protocols, there are several other potential sources of error in personalizing busulfan doses – one of them is the inaccurate documentation of sampling and infusion times (5). In clinical practice, planned times rather than the actual times for sampling and infusion rate are often documented, without being fully aware of what these deviations might implicate for AUC estimation. Two previous studies with antibiotics by Van der Meer *et al.* and Alihodzic *et al.* found that inaccurate documentation may significantly affect individual Bayesian estimation (11, 12). For instance, the accuracy of the individual estimation of central volume of distribution (V1) for meropenem can decrease by 24.6% if documented sampling times deviate 15 min from actual sampling times (12).

However, there is no data regarding the impact of erroneous records on TDM of busulfan.

Therefore, this study aims to evaluate the robustness of a limited sampling TDM coupled with Bayesian forecasting of busulfan with regard to inaccurate documentation of sampling and infusion times.

MATERIALS AND METHODS

Study Design and Dataset Generation in „R“

A pharmacometric study was conducted in NONMEM® (version 7.4.3, ICON, Gaithersburg, MD, USA) and “R” by performing stochastic simulation and estimation (SSE) of 1000 clinical trial simulations comprising 100 patients each on the basis of two different published population pharmacokinetic (popPK) models (13, 14). The dosing regimens consisted of i.v. busulfan with 0.8 mg/kg every 6 h (Q6H) or 3.2 mg/kg every 24 h (Q24H) with a 2 h and 3 h infusion rate, respectively. Simulations and estimations were based on the scenarios of four, two or only one blood sample per patient for both Q24H and Q6H. The sampling times for each sampling design were determined beforehand by performing simulation and estimation, assuring that the sampling designs were unbiased themselves. As a starting point we used our local TDM-sampling design for Q24H, consisting of four blood samples at 3.08, 4, 5 and 6.5 h after start of infusion. The sampling times for Q6H and subsequently for the limited sampling designs for Q24H and Q6H were derived from our local TDM-protocol and examined to be unbiased as well. An overview of the utilized sampling times is shown in Table I.

Population Pharmacokinetic Models

The popPK models of Choi *et al.* (13) and McCune *et al.* (14) served as a basis for this pharmacometric study. The one-compartment (1CMT) model of Choi *et al.* (13) was developed based on 101 busulfan blood samples from 36 adult patients undergoing allo-HSCT. While 15 patients received 16 doses of i.v. busulfan (0.8 mg/kg) every 6 h with a 2 h infusion rate (Q6H), the other 21 patients were dosed with four busulfan infusions with 3.2 mg/kg every 24 h with a 3 h infusion rate (Q24H). Blood samples were drawn at pre-infusion, 2, 4, and 6 h after beginning of the first infusion, regardless of the dosing regimen. In comparison, the popPK model of McCune *et al.* (14) was best described as a two-compartment (2CMT) model. It was built on 12,380 busulfan plasma concentrations obtained from 1387 patients with a Q6H- and 166 patients with a Q24H regimen.

Table I Utilized Sampling Times after Start of Infusion

Number of samples	Q24H [h]	Q6H [h]
4	3.08, 4, 5, 6.5	2.08, 3, 4, 5.5
2	3.5, 6.5	2.5, 5.5
1	6.5	5.5

Simulation and Estimation in NONMEM

Stochastic simulation and estimation was conducted in NONMEM® using the final model parameter estimates of the popPK model of Choi *et al.* (13) for a 1CMT-model and from the model of McCune *et al.* (14) for a 2CMT-model. In order to evaluate the impact of inaccurate documentation, uncertainties, hence the deviation from actual and planned sampling and infusion times, were randomly added in R to the planned sampling and infusion times with a standard deviation of ± 5 to ± 30 min before simulation. Adding uncertainties was achieved by using the “rnorm”-function as a first step, which generates a vector of normally distributed random numbers, followed by the exclusion and resampling of time points before application of the infusion. Hence, the uncertainty was individually added for each time point around the planned time. For the 1CMT-model, patient characteristics for the covariates total body weight (TBW) and GSTA1 status were randomly added by using lognormal distribution (mean 57.3 kg, SD 0.12) for TBW and the “rbinom”-function with a probability of 29% for a GSTA1 polymorphism, respectively. For the 2CMT-model, to avoid generation of artifacts, we used the typical covariates reported for this model, since the covariates which were included in the model were partly correlated.

Subsequently, 1000 virtual clinical trials containing 100 patients each were simulated by including sampling and infusion times, which correspond to the accurately documented times. Following, estimation was done by using both accurately documented and planned times for sampling and for infusion time, as well as for the combination of both.

Impact on Estimated AUC

The results of the stochastic simulation and estimation were evaluated by comparing the estimated patient-individual area under the curve (AUC) from both accurate and planned sampling and infusion times to the true individual AUC from the stochastic simulation step. AUC was calculated by integration of the concentration over time, using the individual estimates for each patient.

In order to determine accuracy and precision of the individual AUC estimation and for better comparison between the two dosing regimens, the relative prediction error (rPE) and the relative root-mean-square error (rRmse) were calculated as follows:

$$rPE[\%] = \frac{estimated_i - true_i}{true_i} \times 100$$

$$rRmse[\%] = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_1^i \frac{(estimated_i - true_i)^2}{true_i^2}} \times 100$$

with ‘estimated_i’ or ‘true_i’ representing the i’th estimated or true individual AUC.

RESULTS

Impact of Inaccurate Documentation of Sampling and Infusion Time for Q24H

For the 1-CMT-model, the estimated AUC was not substantially affected by inaccurate documentation of sampling and infusion time for the Q24H scenario (Fig. 1). When only one sample was used for AUC estimation and there was an uncertainty of 30 min both in sampling and infusion time, the median rPE of estimated AUC was -1.60% indicating only a minor bias. In comparison, with 0 min uncertainty, the median rPE was -1.31%. However, at $SD \pm 30$ min the spread of the rPE’s (2.5th/97.5th percentile) was distinctly higher (-20.12/22.91%) compared to the minor inaccuracies in documentation of sampling and infusion time at $SD \pm 5$ min (-15.84/13.26%). An overview of the results is provided in Table II.

As for the different sampling schedules, the spread of rPE’s at $SD \pm 5$ min increases with the decreasing number of sampling times. Similar results were found for the imprecision, where a decreasing number of samples resulted in a higher rRmse. If four samples were used, an uncertainty of 30 min in sampling and infusion time resulted in a rRmse of 9.85%. In comparison, if TDM was conducted with two samples, rRmse slightly increased to 10.78%. Even if only one sample was used for the estimation of AUC, rRmse did not exceed 11.03%.

Thus, as expected, estimations are slightly more accurate and precise if TDM is conducted with four blood samples compared to two or a single blood sample.

For the 2CMT-model, both the spread of rPE’s and the rRmse are considerably wider and higher, respectively. If two samples were used and there was a deviation of 30 min in sampling and infusion times, the spread of rPE’s increased to 56.16% (25.20/30.96%), which indicates a lower level of accuracy for the 2CMT-estimations. The same trend can be observed for the

1CMT – Q24H

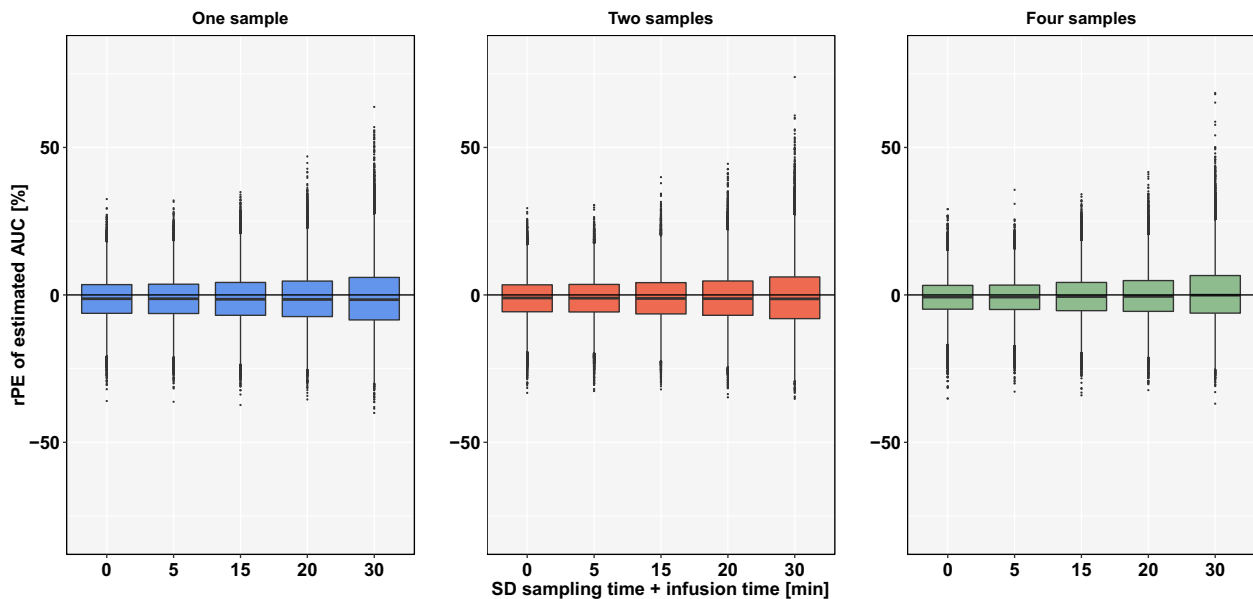


Fig. 1 rPE of estimated AUC based on a **1CMT-model** by uncertainty in sampling and infusion time ($SD \pm 5$ min to ± 30 min) if TDM coupled with Bayesian forecasting within **Q24H** is conducted with 1 sample (blue), 2 samples (orange) or 4 samples (green) using planned sampling times.

Table II rPE and rmse of Estimated AUC for **Q24H**

SD sampling time + SD infusion time [min]	No. of samples—1CMT			No. of samples—2CMT			
	1	2	4	1	2	4	
0	rPE median [%]	-1.31	-1.05	-0.73	-0.51	-1.11	-0.88
	spread (2.5 th /97.5 th) [%]	28.49	27.58	25.34	56.79	49.20	41.68
		(-15.61/12.88)	(-15.39/12.19)	(-14.09/11.25)	(-24.11/32.68)	(-23.12/26.08)	(-20.55/21.31)
	rRmse [%]	7.41	7.06	6.39	14.54	12.60	10.66
5	rPE median [%]	-1.33	-1.11	-0.75	-0.56	-1.16	-0.79
	spread (2.5 th /97.5 th) [%]	29.1	28.01	25.71	56.83	49.90	42.08
		(-15.84/13.26)	(-15.44/12.57)	(-14.09/11.62)	(-24.02/32.81)	(-23.45/26.45)	(-20.81/21.27)
	rRmse [%]	7.53	7.20	6.48	14.61	12.73	10.74
15	rPE median [%]	-1.47	-1.21	-0.59	-0.34	-0.92	-1.19
	spread (2.5 th /97.5 th) [%]	32.68	31.78	28.99	57.76	51.40	44.49
		(-16.85/15.83)	(-16.41/15.37)	(-14.64/14.35)	(-24.25/33.51)	(-23.56/27.84)	(-22.18/22.31)
	rRmse [%]	8.43	8.12	7.33	14.82	13.14	11.22
20	rPE median [%]	-1.55	-1.29	-0.50	-0.25	-0.97	-1.32
	spread (2.5 th /97.5 th) [%]	35.69	34.62	31.47	58.74	52.79	45.09
		(-17.73/17.96)	(-17.17/17.45)	(-15.23/16.24)	(-24.73/34.01)	(-24.18/28.61)	(-22.20/22.89)
	rRmse [%]	9.13	8.86	7.96	15.07	13.50	11.48
30	rPE median [%]	-1.60	-1.35	-0.11	-0.15	-0.17	-1.13
	spread (2.5 th /97.5 th) [%]	43.03	42.06	38.62	61.36	56.16	48.13
		(-20.12/22.91)	(-19.30/22.76)	(-16.71/21.91)	(-25.38/35.98)	(-25.20/30.96)	(-22.62/25.51)
	rRmse [%]	11.03	10.78	9.85	15.60	14.32	12.28

2CMT – Q24H

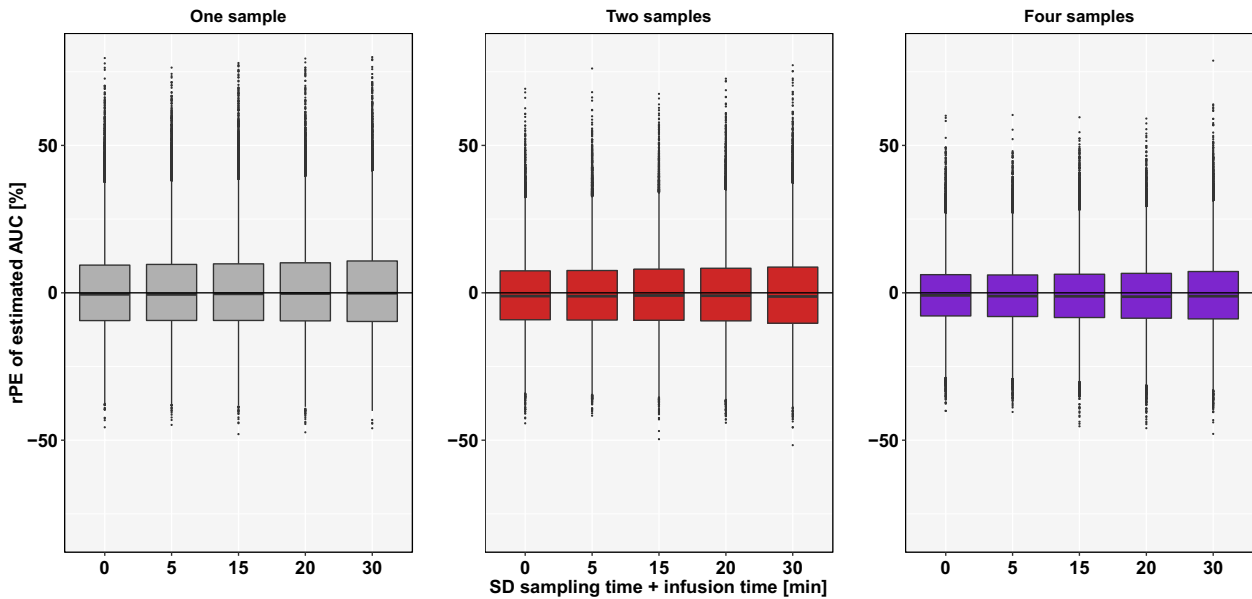


Fig. 2 rPE of estimated AUC based on a **2CMT-model** by uncertainty in sampling time and infusion time ($SD \pm 5$ min to ± 30 min) if TDM coupled with Bayesian forecasting within **Q24H** is conducted with 1 sample (grey), 2 samples (red) or 4 samples (purple) using planned sampling times.

precision of AUC-estimations. For the same scenario, the rRmse of estimated AUC was 14.32% for the 2CMT-model compared to 10.78% rRmse for the 1CMT-model. An overview of the results of the estimated AUC based on a 2CMT-model is shown in Fig. 2 and Table II.

Impact of Inaccurate Documentation of Sampling and Infusion Time for Q6H

For the 1CMT-model, the spread of rPE's of the estimated AUC for 1-point-sampling at an uncertainty

1CMT – Q6H

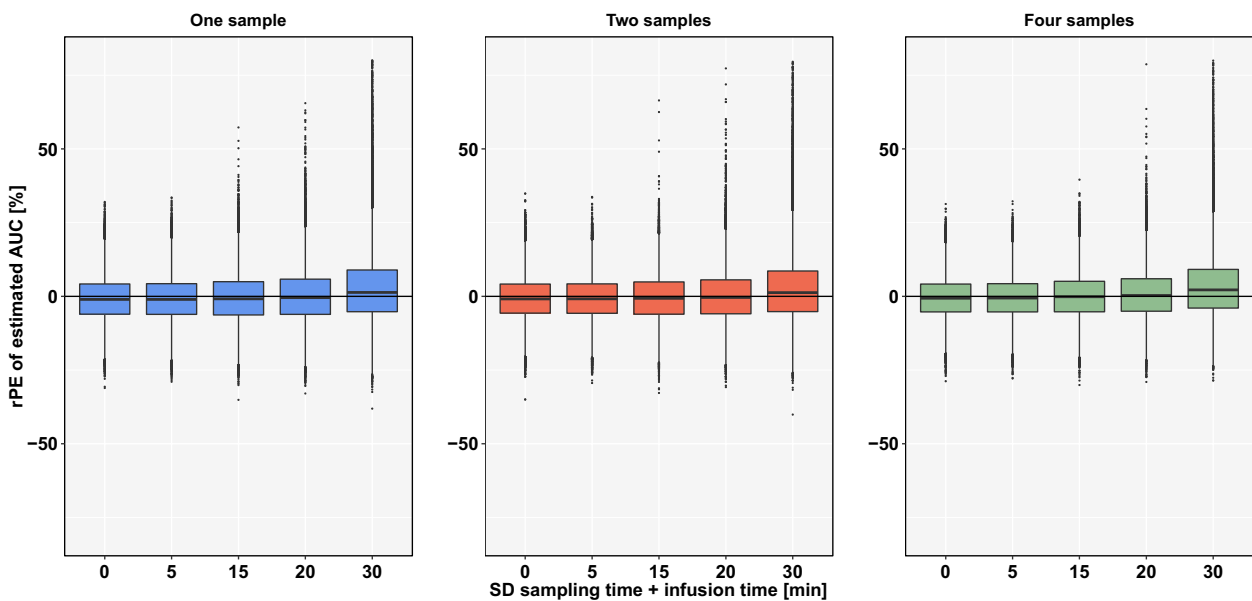


Fig. 3 rPE of estimated AUC based on a **1CMT-model** by uncertainty in sampling and infusion time ($SD \pm 5$ min to ± 30 min) if TDM coupled with Bayesian forecasting within **Q6H** is conducted with 1 sample (blue), 2 samples (orange) or 4 samples (green) using planned sampling times.

Table III rPE and rmse of Estimated AUC for **Q6H**

SD sampling time + SD infusion time [min]	No. of samples—1CMT			No. of samples—2CMT			
	1	2	4	1	2	4	
0	rPE median [%]	-1.03	-0.87	-0.63	0.54	0.29	0.34
	spread (2.5 th /97.5 th) [%]	30.17 (-15.27/14.90)	28.96 (-14.74/14.22)	27.41 (-13.86/13.55)	70.77 (-27.45/43.32)	68.14 (-26.82/41.32)	64.14 (-25.44/38.70)
	rRmse [%]	7.71	7.42	7.01	18.32	17.71	16.56
5	rPE median [%]	-1.06	-0.83	-0.59	0.75	0.39	0.18
	spread (2.5 th /97.5 th) [%]	30.41 (-15.38/15.03)	29.51 (-15.09/14.42)	27.64 (-13.84/13.80)	71.21 (-27.21/44.00)	68.41 (-26.73/41.68)	63.85 (-25.58/38.27)
	rRmse [%]	7.81	7.51	7.09	18.48	17.68	16.50
15	rPE median [%]	-0.83	-0.69	-0.16	0.87	0.53	0.20
	spread (2.5 th /97.5 th) [%]	33.12 (-16.11/17.01)	32.12 (-15.71/16.41)	29.91 (-14.14/15.77)	71.52 (-27.31/44.21)	68.71 (-26.86/41.85)	63.96 (-25.74/38.22)
	rRmse [%]	8.48	8.23	7.66	18.49	17.77	16.50
20	rPE median [%]	-0.44	-0.37	0.28	0.71	0.68	0.15
	spread (2.5 th /97.5 th) [%]	36.40 (-16.41/19.99)	34.82 (-15.75/19.07)	32.47 (-14.38/18.09)	71.22 (-27.32/43.90)	68.29 (-26.70/41.59)	64.77 (-25.78/38.99)
	rRmse [%]	9.30	8.91	8.35	18.40	17.79	16.67
30	rPE median [%]	1.35	1.28	2.19	1.40	1.02	0.59
	spread (2.5 th /97.5 th) [%]	49.09 (-16.30/32.79)	47.37 (-16.05/31.32)	43.20 (-14.15/29.05)	72.05 (-27.02/45.03)	69.10 (-26.45/42.65)	73.69 (-25.60/39.04)
	rRmse [%]	13.26	12.82	11.90	18.82	18.06	16.76

of ± 30 min was 49.09%, which is a substantial increase compared to $SD \pm 0$ (30.17%). The median rPE was 1.35% indicating almost no bias. Figure 3 shows that the general trend of increasing spread of rPE's with increasing uncertainty in documentation is confirmed for Q6H as well.

Also, the spread of rPE's for Q6H indicate a slightly lower accuracy for each sampling schedule when compared to Q24H. At 0 min uncertainty, for Q6H the spread of rPE's was 27.41% (-13.86/13.55%) when AUC was estimated with 4 samples, whereas for Q24H the spread was smaller with 25.34%

(-14.09/11.25%). A further comparison at $SD \pm 20$ min with 2-point-sampling shows a spread of rPE's of 34.62% (-17.17/17.45%) for Q24H and 34.82% (-15.75/19.07%) for Q6H.

Nevertheless, even with increasing spread of rPE's, a noticeable impact on the median rPE of estimated AUC can only be observed if uncertain documentation of sampling and infusion times reaches ± 30 min (2.19%). The calculated rRmse for Q6H indicates a slightly lower level of precision for each sampling schedule when compared to Q24H (Table II). Again, the tendency

of increasing imprecision with decreasing number of samples applies to Q6H, in which the rRmse for the estimated AUC does not exceed 13.26%.

Regarding the impact of either uncertainty in sampling time or infusion time independently (Supplementary Figures S1-S4), for both Q24H and Q6H higher prediction errors occurred if the documented sampling time was erroneous. For instance, within Q24H with two samples, the spread of rPE's was 27.95% (-15.63/12.32%) if the documented infusion time deviated 30 min from the actual infusion time. For the same scenario, the spread of wrongly estimated AUC increased if the sampling time had an uncertainty of 30 min instead (42.18%).

For the 2CMT-model, there was also an increase in spread of rPE's and the rRmse compared to AUC-estimations based on a 1CMT-model. For instance, if two samples were used, an uncertainty of 30 min in sampling and infusion time resulted in a spread of rPE's of 69.10% and rRmse of 18.06% compared to 47.37% and 12.82% for the 1CMT-model, respectively. An overview of the results for the 2CMT-model can be found in Table III and Fig. 4.

2CMT – Q6H

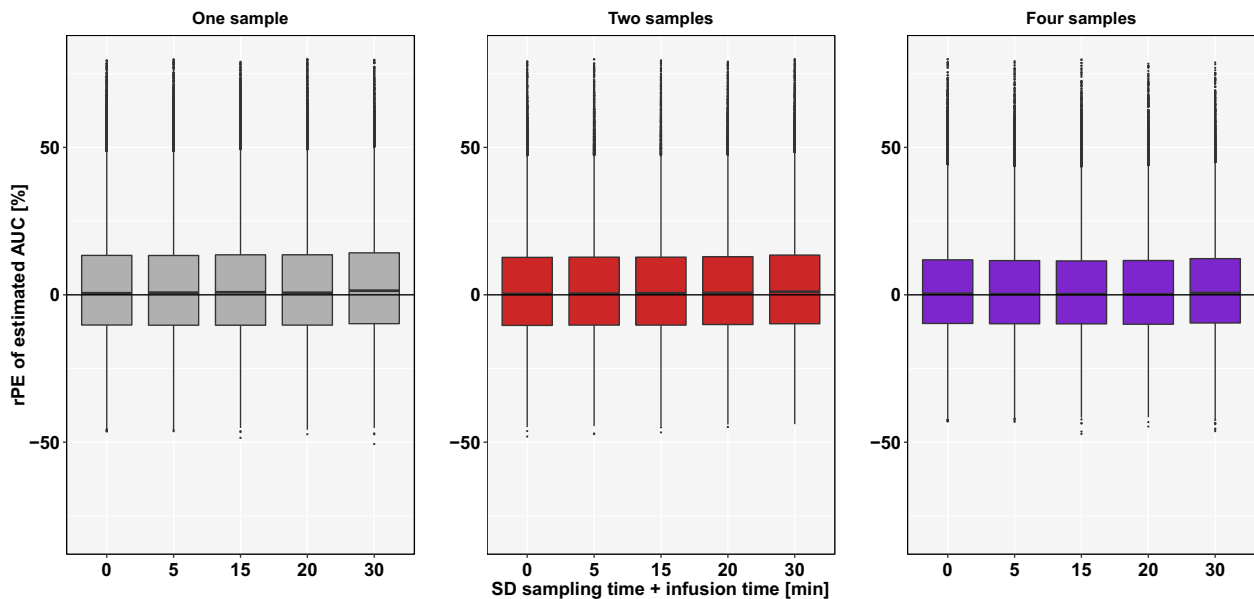


Fig. 4 rPE of estimated AUC based on a **2CMT-model** by uncertainty in sampling time and infusion time ($SD \pm 5$ min to ± 30 min) if TDM coupled with Bayesian forecasting within **Q6H** is conducted with 1 sample (grey), 2 samples (red) or 4 samples (purple) using planned sampling times.

DISCUSSION

This is the first study to evaluate and confirm the robustness of TDM coupled with Bayesian forecasting of busulfan with regard to inaccurate documentation of sampling and infusion times in a simulation study. Furthermore, it shows that TDM with a limited sampling strategy is reliable even if erroneous records, which in clinical practice presumably tend to occur, are taken into account.

The data of our pharmacometric study show that for both Q24H and Q6H notable decreases in accuracy and precision only occur if documented sampling and infusion times deviate from actual times as far as 30 min, which in practice can be considered as rather exaggerated. The fact that for no sampling schedule the median rPE of estimated AUC exceeded 5% demonstrates robustness and a sufficient accuracy for personalized dosing of busulfan.

A comparison of the dosing regimens Q24H and Q6H in terms of accuracy of the estimated AUC shows a slightly higher impact on Q6H. This might be due to the fact that with an infusion time of 2 h compared to 3 h within Q24H, for instance 20 min of uncertainty in infusion time is relatively higher for Q6H (17% for Q6H *vs.* 11% for Q24H).

In general, we can see that the accuracy and precision of AUC estimations decreases if only two samples

or even one sample are used for the estimation. However, in some cases, for instance for 4-point-sampling within Q24H (Fig. 1), we can observe the median rPE tending towards zero with increasing uncertainty. This of course does not mean that TDM is more accurate with higher uncertainty but is due to the fact that uncertainties are added randomly with the possibility of over- or underestimating the AUC and in this case at some point the estimations evened out in the process of 1000 virtual estimations.

On an overall basis, the outcome of this study was hardly predictable for two reasons: on the one hand, busulfan has a rather short elimination half-life of 2–3 h, hence an uncertainty in sampling time of 30 min or in other words 17–25% of its half-life elimination might suggest the impact on estimating the AUC would be significant, since time is a main factor. On the other hand, most popPK models for busulfan are 1-compartment models, thus it is assumed that the pharmacokinetic behavior of busulfan is not as complex as i.e. of vancomycin, which is often described in 2-compartmental models (15) and compared to busulfan, central volume of distribution (V_1), distribution clearance (Q) and peripheral volume of distribution (V_2) of meropenem and caspofungin were considerably affected by inaccurate documentation of sampling and infusion times due to the more complex model structure (12). However, even if the popPK-model of busulfan is

described as a 2CMT-model (14) and therefore accuracy and precision of the individually estimated AUC is considerably lower in comparison to AUC-estimations based on a 1CMT-model, the calculated rPE's and rRmse's (Table II + III) indicate robustness for TDM of busulfan independent of the model complexity. Even though the spread of rPE's is 70.77% if only one sample was used within Q6H and therefore the estimated AUC should be considered carefully, unbiased estimation of AUC is generally possible even with a single sample since imprecision (expressed as rRmse) does not exceed 18.82%. Interestingly, the impact of inaccurate documentation on AUC-estimations based on a 2CMT-model is less noticeable.

Generally, estimations based on popPK models using Bayesian forecasting are superior to the NCA in terms of accuracy and precision (4, 8, 9). Therefore, we are convinced that MIPD of busulfan will become standard operating procedure in the majority of centers and consequently the evaluation of its robustness regarding the challenges of daily clinical practice was already overdue.

In addition, performing TDM coupled with Bayesian forecasting enables the use of limited sampling strategies (2). Compared to the NCA, where most TDM protocols consist of five blood samples (8, 16, 17), MIPD can be performed with as little as one blood sample, as our data confirm, even with inaccurate documentation.

However, for a reliable TDM we recommend a sampling schedule with at least two blood samples in case one of them cannot be used due to mishandling in processing. Reducing the number of samples needed not only lessens stress for patients due to fewer blood draws, but also decreases cost by requiring fewer bioanalytical assays. According to Palmer *et al.* the cost for bioanalysis per sample ranges from \$125-\$225, which depending on the number of TDMs performed per year, could mean a substantial reduction of cost if fewer samples are used in clinical practice (2).

Nevertheless, there are few limitations that need to be kept in mind. Even though our results show that MIPD based AUC estimation itself is robust with regard to inaccurate documentation, the popPK model that TDM coupled with Bayesian forecasting is based on, heavily relies on accurately documented data (12). In some cases, model building is conducted with rich sampling schedules that were specifically designed for the purpose of pharmacokinetic analysis (18). In other cases, data from clinical routine TDM is used for model development (19) and therefore it might have been the case that awareness for accurate documentation was not given.

Furthermore, the estimated AUC is based on sampling schedules that we initially examined to be

unbiased and therefore the results of our study only apply to the sampling times that are presented in Table I.

In summary, this work shows that TDM coupled with Bayesian forecasting of busulfan is robust with regard to inaccurate documentation and can be conducted with limited sampling. Moreover, confirming robustness for MIPD of busulfan is a further step towards medication safety in HSCT patients.

However, the importance of accurate documentation should not be disregarded, as it is essential to Bayesian forecasting and therefore essential to personalizing busulfan doses.

ACKNOWLEDGMENTS AND DISCLOSURES

There are no conflicts of interest to declare.

Author Contributions AD, DA, AB, and SW contributed to the conception, study design, pharmacometric analysis and interpretation of the data. CL, and NK provided clinical input and interpretation of the data. AD, SW and CL drafted the manuscript. SW, CL, DA, AB, and NK revised the manuscript for intellectual content. AD, DA, AB, NK, CL, and SW approved the final version to be published. All authors agreed to be accountable for all aspects of the work.

Declarations

Ethics approval Not applicable.

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

REFERENCES

1. Andersson BS, Thall PF, Valdez BC, Milton DR, Al-Atrash G, Chen J, *u. a.* Fludarabine with pharmacokinetically guided IV busulfan is superior to fixed-dose delivery in pretransplant conditioning of AML/MDS patients. *Bone Marrow Transplant.* April 2017;52(4):580–7.
2. Palmer J, McCune JS, Perales M-A, Marks D, Bubalo J, Mohty M, *u. a.* Personalizing busulfan-based conditioning:

- considerations from the american society for blood and marrow transplantation practice guidelines committee. *Biol Blood Marrow Transplant*. November 2016;22(11):1915–25.
3. Perkins J, Field T, Kim J, Kharfan-Dabaja MA, Ayala E, Perez L, u. a. Pharmacokinetic targeting of iv BU with fludarabine as conditioning before hematopoietic cell transplant: the effect of first-dose area under the concentration time curve on transplant-related outcomes. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46(11):1418.
 4. Bartelink IH, Lalmohamed A, van Reij EML, Dvorak CC, Savic RM, Zwaveling J, u. a. Association of busulfan exposure with survival and toxicity after haemopoietic cell transplantation in children and young adults: a multicentre, retrospective cohort analysis. *Lancet Haematol*. November 2016;3(11):e526–36.
 5. McCune JS, Holmberg LA. Busulfan in hematopoietic stem cell transplant setting. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2009;5(8):957–69.
 6. Marsit H, Philippe M, Neely M, Rushing T, Bertrand Y, Ducher M, u. a. Intra-individual pharmacokinetic variability of intravenous busulfan in hematopoietic stem cell-transplanted children. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 11. März 2020 [zitiert 7. April 2020]; Verfügbar unter: <http://link.springer.com/https://doi.org/10.1007/s40262-020-00877-z>
 7. Ruutu T, van der Werf S, van Biezen A, Backman JT, Peczynski C, Kröger N, u. a. Use of busulfan in conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults: a survey by the Transplant Complications Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 3. Juni 2019 [zitiert 7. Oktober 2019]; Verfügbar unter: <http://www.nature.com/articles/s41409-019-0579-0>
 8. Salinger DH, Vicini P, Blough DK, O'Donnell PV, Pawlikowski MA, McCune JS. Development of a population pharmacokinetics-based sampling schedule to target daily intravenous busulfan for outpatient clinic administration. *J Clin Pharmacol*. 2010;50(11):1292–300.
 9. Shukla P, Goswami S, Keizer RJ, Winger BA, Kharbanda S, Dvorak CC, u. a. Assessment of a model-informed precision dosing platform use in routine clinical care for personalized busulfan therapy in the pediatric hematopoietic cell transplantation (HCT) population. *Front Pharmacol*. 2. Juli 2020;11:888.
 10. McCune JS, Quinones CM, Ritchie J, Carpenter PA, van Maarseveen E, Yeh RF, u. a. Harmonization of busulfan plasma exposure unit (BPEU): a community-initiated consensus statement. *Biol Blood Marrow Transplant*. September 2019;25(9):1890–7.
 11. van der Meer AF, Touw DJ, Marcus MAE, Neef C, Proost JH. Influence of erroneous patient records on population pharmacokinetic modeling and individual Bayesian estimation: *Ther Drug Monit*. Oktober. 2012;34(5):526–34.
 12. Alihodzic D, Broeker A, Baehr M, Kluge S, Langebrake C, Wicha SG. Impact of Inaccurate Documentation of Sampling and Infusion Time in Model-Informed Precision Dosing. *Front Pharmacol*. 3. März 2020;11:172.
 13. Choi B, Kim MG, Han N, Kim T, Ji E, Park S, u. a. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of busulfan with *GSTA1* polymorphisms in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pharmacogenomics*. September 2015;16(14):1585–94.
 14. 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*. 2014;20(3):754–63.
 15. Broeker A, Nardecchia M, Klinker KP, Derendorf H, Day RO, Marriott DJ, u. a. Towards precision dosing of vancomycin: a systematic evaluation of pharmacometric models for Bayesian forecasting. *Clin Microbiol Infect*. Oktober 2019;25(10):1286.e1–1286.e7.
 16. Salman B, Al-Za'abi M, Al-Huneini M, Dennison D, Al-Rawas A, Al-Kindi S, u. a. Therapeutic drug monitoring-guided dosing of busulfan differs from weight-based dosing in hematopoietic stem cell transplant patients. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. Juni 2017;10(2):70–8.
 17. de Castro FA, Piana C, Simões BP, Lanchote VL, Della PO. Busulfan dosing algorithm and sampling strategy in stem cell transplantation patients: Busulfan sampling strategy in stem cell transplantation. *Br J Clin Pharmacol* Oktober. 2015;80(4):618–29.
 18. Nava T, Kassir N, Rezgui MA, Uppugunduri CRS, Huezo-Diaz Curtis P, Duval M, u. a. Incorporation of *GSTA1* genetic variations into a population pharmacokinetic model for IV busulfan in paediatric hematopoietic stem cell transplantation: *GSTA1*-based busulfan population pharmacokinetic model in children. *Br J Clin Pharmacol* [Internet]. 22. Februar 2018 [zitiert 7. März 2018]; Verfügbar unter: <http://doi.wiley.com/https://doi.org/10.1111/bcp.13566>
 19. Broeker A, Wicha SG, Dorn C, Kratzer A, Schleibinger M, Kees F, u. a. Tigecycline in critically ill patients on continuous renal replacement therapy: a population pharmacokinetic study. *Crit Care*. Dezember 2018;22(1):341.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**3.2 Iron Chelation with Deferasirox Increases Busulfan AUC During Conditioning
Chemotherapy Prior to Allogeneic Stem Cell Transplantation**

Autoren: Sonja Essmann, [Adrin Dadkhah](#), Dietlinde Janson, Christine Wolschke, Francis Ayuk,
Nicolaus Kröger, Claudia Langebrake

Journal: Transplantation and Cellular Therapy

Impact Factor: 5.609 (2021)



Iron Chelation With Deferasirox Increases Busulfan AUC During Conditioning Chemotherapy Prior to Allogeneic Stem Cell Transplantation

Sonja Essmann¹, Adrin Dadkhah², Dietlinde Janson¹, Christine Wolschke¹, Francis Ayuk¹, Nicolaus M Kröger¹, Claudia Langebrake^{1,2,*}

¹ University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Department of Stem Cell Transplantation, Hamburg, Germany

² University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hospital Pharmacy, Hamburg, Germany

Article history:

Received 8 September 2021

Accepted 3 November 2021

Key Words:

Busulfan

Deferasirox

Drug-drug interaction

A B S T R A C T

The negative effects of iron overload caused by repetitive blood transfusions and iron release during cytotoxic chemotherapy might be ameliorated by early treatment with an iron chelator. However, in the setting of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), chelation therapy is often postponed until the late post-transplantation period because of potential drug interactions. Therefore we systematically investigated the influence of iron chelation with deferasirox on the pharmacokinetics of intravenous busulfan in adult patients in the context of routine therapeutic drug monitoring (TDM) before HSCT. We conducted a single-center, prospective, observational study in 25 adult patients with planned allogeneic HSCT after myeloablative, busulfan-based, TDM-guided conditioning chemotherapy. Busulfan was administered intravenously over 3 hours with an initial dose of 3.2 mg/kg once daily (based on adjusted ideal body weight [AIBW] in overweight patients). Four consecutive dosages were planned to achieve a cumulative area under the curve (AUC) of 80 mg · h/L. Patients received deferasirox for transfusional iron overload as per approval from the start of conditioning until day 3 after transplantation. Model-based calculation of the busulfan AUC was carried out by means of Bayesian prediction based on a population pharmacokinetic model after the first or second dose of busulfan, and dose adjustments were performed accordingly. Calculated median cumulative AUC before dose adjustment was 93.7 mg · h/L (65.1–151.4 mg · h/L), which was considerably above the target AUC of 80 mg · h/L ± 10%. Median dose adjustment was –17.1% (–50.0% to 18.2%), and patients ultimately received busulfan with a median cumulative dose of 10.60 mg/kg (6.38 – 15.62) mg/kg. A busulfan dose reduction was necessary in 19 patients (76%) whereas a dose increase was only needed in 1 patient. After dose adjustment the median AUC was 79.7 mg/L · h (62.5 – 84.2 mg/L · h). Median busulfan clearance was 0.134 L/h/kg (0.084 – 0.203 L/h/kg), which is significantly lower than the average clearance of 0.2 L/h/kg reported in the literature, whereas volume of distribution was not altered. We were able to demonstrate, that TDM is the key point to facilitate a safe co-administration of both medications, because the intake of deferasirox leads to a considerable increase in the busulfan AUC of about 35% to 40%. The reason for the increase in busulfan AUC is a reduction in busulfan clearance by about one third; therefore a lower initial dose of busulfan followed by TDM could be considered in patients with comedication with deferasirox.

© 2021 The American Society for Transplantation and Cellular Therapy. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Busulfan is an alkylating agent commonly used as part of the conditioning chemotherapy in both pediatric and adult allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-

HSCT). Because of its narrow therapeutic index, over- or underexposure results in either toxic adverse effects and higher transplantation-related mortality or higher rates of graft rejection or relapse rates [1]. Therefore it has been recommended to personalize busulfan dosing using a patient-individual therapeutic drug monitoring (TDM), especially in children and those patients receiving myeloablative conditioning regimens [2]. However, busulfan TDM is not widely established among European transplantation centers, despite wide use of conventional doses of busulfan [3].

Financial disclosure: See Acknowledgments on page XXXX.

*Correspondence and reprint requests: Claudia Langebrake, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hospital Pharmacy and Department of Stem Cell Transplantation, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany.

E-mail address: c.langebrake@uke.de (C. Langebrake).

<https://doi.org/10.1016/j.tct.2021.11.003>

2666-6367/© 2021 The American Society for Transplantation and Cellular Therapy. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Busulfan is extensively metabolized in the liver. The main step is spontaneous or glutathione-S-transferase (GST)–derived conjugation with endogenous glutathione (GSH) with subsequent metabolism via the mercapturic acid pathway or dissociation and further oxidation steps or further binding with GSH [4]. Presumably none of the metabolites contributes significantly to efficacy or toxicity. Known clinically relevant drug-drug interactions with busulfan exist with acetaminophen, metronidazole, azoles, or phenytoin resulting in sub-therapeutic or supratherapeutic exposures [5]. Therefore either these combinations should be avoided or a monitoring for busulfan concentrations is recommended. Furthermore, there are case reports about reduced busulfan clearance with simultaneous administration of deferasirox [6,7] or blinatumomab [8]. However, no clinical or pharmacokinetic studies at larger cohorts to confirm this drug-drug interaction between deferasirox and busulfan have been performed.

Deferasirox is an iron chelator that is approved for the treatment of chronic iron overload. Iron overload is common in allo-HSCT patients, especially in those with hematologic malignancies, and has been associated with increased rates of infection, severe graft-versus-host disease, sinusoidal obstruction syndrome, and mortality after transplantation [9,10]. Furthermore, there are associations between the occurrence of non-transferrin-bound iron and labile plasma iron (LPI) during conditioning chemotherapy and higher rates of infection and toxicity [11]. Iron chelation after HSCT has been shown to reduce serum ferritin levels and is associated with superior disease free and overall survival [10]. Although the intake of an iron chelator during conditioning could be beneficial due to suppression of LPI and subsequent assumed reduction of toxicity and infection, data on iron chelation during conditioning therapy are sparse [12]. Therefore the aim of our study was to systematically investigate the influence of deferasirox on busulfan pharmacokinetics during myeloablative busulfan-based conditioning before allo-HSCT in adult patients with iron overload in the context of routine busulfan TDM.

METHODS

Between November 2018 and August 2020, adult patients with documented iron overload (serum ferritin > 1000 µg/L) and planned allo-HSCT after myeloablative, busulfan-based, TDM-guided conditioning chemotherapy at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf were enrolled in this single-center, prospective, observational study after patient education and written informed consent. One of the two primary endpoints was to evaluate the influence of deferasirox on the pharmacokinetics of busulfan. The other primary endpoint of the study was to investigate the influence of iron chelation with deferasirox during conditioning chemotherapy on the appearance of LPI. The results of the latter endpoint, as well as the secondary endpoints (tolerability, infections and toxicity), are going to be reported separately. Exclusion criteria included impaired renal function (creatinine clearance < 60 mL/min), impaired liver function (≥ Child-Pugh B), as well as concurrent administration of strong UGT inducers (eg, phenytoin, rifampicin, phenobarbital, ritonavir). Patients received 14 mg/kg/d deferasirox (coated tablet) from the first day of conditioning until day 3 after allo-HSCT. Busulfan was administered intravenously over 3 hours with an initial dose of 3.2 mg/kg (in overweight patients based on AIBW, calculated as ideal body weight + 0.25 · [total body weight – ideal body weight]) once daily. Four consecutive dosages were planned to achieve a cumulative area under the curve (AUC) of 80 mg · h/L. TDM was done on the first or second day of application and the busulfan dose was adjusted based on the results.

Busulfan plasma levels were drawn according to a local sampling schedule at the times 5 minutes, 1 hour, 2 hours, and 3 hours after the end of busulfan infusion, although the exact times of blood sampling were documented. Quantification took place at the Department of Legal Medicine at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf using a validated gas chromatography with mass spectrometric detection method. Subsequently, the model-based calculation of the AUC was carried out in the hospital pharmacy by means of Bayesian prediction based on a population pharmacokinetic model using pharmacokinetics software (MW-Pharm, Version 3.60). If the calculated AUC was not within a target range of ± 10% of the target AUC of 80 mg · h/L, the

busulfan dose was adjusted accordingly. In the case of deviations >25%, new level measurements and AUC calculations were carried out after the following dose, and, if necessary, a repeated dose adjustment was made. All patients received concomitant anticonvulsive prophylaxis with levetiracetam. The trial was approved by the Ethics Committee of the Ärztekammer Hamburg (number PV5630) and registered at the German Clinical Trials Register, number DRKS00015498, on October 10, 2018.

The statistical analysis was carried out with the help of IBM SPSS Statistics software version 26. Discrete variables were expressed as counts (percentage) and continuous variables as median and range of the values. Pharmacokinetic parameters were compared to a retrospective analysis of a patient population comprising 95 patients who received 3.2 mg/kg total body weight (TBW) or AIBW busulfan once daily followed by TDM for 3 to 4 days as part of various conditioning regimes (FLAMSA/Bu/Flu, Bu/Cy, Bu/Flu, Bu/Thiotepa ± Flu) before allogeneic stem cell transplantation at our center [13]. For group comparisons of categorical variables, chi-square, or Fisher's exact tests were used as appropriate. Continuous (but skewed) variables were analyzed using Mann-Whitney-U-Test. A *P* value < .05 was defined as statistically significant.

RESULTS

In total, 25 patients were enrolled in our study. Patient characteristics are shown in Table 1. Patients received a median of 3.20 mg/kg TBW or AIBW busulfan (3.19 – 3.70 mg/kg) as an initial single dose. The planned cumulative busulfan dose to reach the target AUC of 80 mg · h/L was thus 12.80 mg/kg (12.75 – 14.79 mg/kg).

The calculated median cumulative AUC before dose adjustment was 93.7 mg · h/L (65.1 – 151.4 mg · h/L), which was considerably above the target AUC of 80 mg · h/L ± 10% (72 – 88 mg · h/L). The median deviation from the target AUC was 13.7 mg · h/L (–14.9 – 71.4 mg · h/L). Seventeen patients (68%) were outside the target range without adjustment of the busulfan dosage (see Figure 1). Without dose adjustment, 15 patients (60%) would have reached a busulfan exposition that

Table 1
Patient Characteristics

Age (y), median (range)	55.2 (20.2–68.7)
Gender	
Male	11 (44%)
Female	14 (56%)
Diagnoses	
AML	23 (92%)
MDS	1 (4%)
T-ALL	1 (4%)
Remission status	
1. CR	20 (80%)
2. CR	3 (12%)
Blast persistence	1 (4%)
Relapse	1 (4%)
BMI (kg/m ²), median (range)	25.0 (17.2–44.4)
TBW (kg), median (range)	75.0 (55.6–130.4)
AIBW (kg), median (range)	70.4 (47.5–101.5)
Weight used for busulfan dosing	
TBW	18 (72%)
AIBW	7 (28%)
Conditioning regime	
Bu80/Flu160/postCy	2 (8%)
Bu80/Flu150/ATG	23 (92%)
Start conditioning (days before HSCT), median (range)	6 (6–8)
Deferasirox dose (mg/kg/d), median (range)	13.9 (13.1–14.8)

ATG indicates anti-thymocyte globulin; BMI, body mass index; Bu, busulfan; CR, complete remission, Flu, fludarabine; postCy, post-transplantation cyclophosphamide.

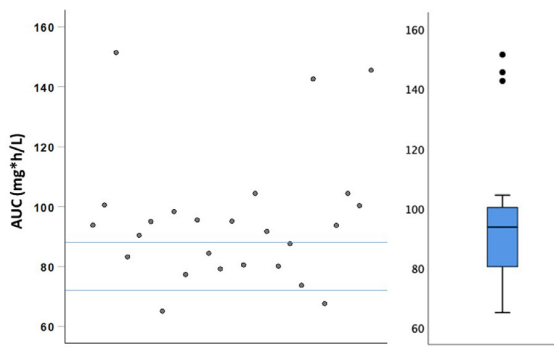


Figure 1. Scatter plot and box blot of the cumulative AUC of busulfan before dose adjustment; the blue lines mark the range of the target dose of 80 mg · h/L \pm 10%.

was above the AUC target, and only 2 patients (8%) would have reached a busulfan exposition that was below the AUC target. Busulfan dose adjustment was conducted once or repeatedly in 20 patients (80%). The median dose adjustment was -17.1% (-50.0% - 182%), and patients ultimately received busulfan with a median cumulative dose of 10.60 mg/kg (6.38 - 15.62 mg/kg). A busulfan dose reduction was necessary in 19 patients (76%), whereas a dose increase was only necessary in one patient. After dose adjustment the median AUC was 79.7 mg · h/L (62.5 - 84.2 mg · h/L) with a median deviation from the planned AUC of -0.3 mg · h/L (-17.5 - 4.2 mg · h/L) and 23 patients (92%) reaching the targeted dose of AUC 80 mg · h/L \pm 10%. Accordingly, no unexpected toxicity was observed, all patients engrafted in a timely manner, and deferasirox was well tolerated without major or unexpected toxicity. Median busulfan clearance determined after the first (84%) or second (16%) administration of busulfan was 0.134 L/h/kg TBW or AIBW (0.084 - 0.203 L/h/kg).

As compared to a historic patient collective, in whom regular busulfan TDM was performed in our center ($n = 95$), the patients' characteristics were comparable in terms of age, weight, and the weight used for initial dose calculation (Table 2). Regarding concomitant medication, the two groups were also comparable, as per local standards levetiracetam was used as anticonvulsant prophylaxis in this cohort, whereas

no azoles or metronidazole were allowed during busulfan treatment, except for the treatment of previously diagnosed invasive fungal disease. Also, as in this population, the majority of patients (74.7%, $n = 71$) underwent busulfan dose adjustment. However, in contrast to the results of the present study, an increase (64.2%, $n = 61$) was mostly necessary to reach the target AUC and a dose reduction was only necessary in some cases (10.5%, $n = 10$). Overall, dose adjustment to reach the target AUC corresponded to a 20.0% increase in the busulfan dose. Median clearance in this cohort was 0.200 L/h/kg TBW or AIBW (0.100 - 0.331 L/h/kg) representing a significant difference compared to our study population with concomitant deferasirox treatment ($P < .0001$). Volume of distribution was not different between the two cohorts.

DISCUSSION

For the first time the present study systematically investigates the influence of deferasirox on the pharmacokinetics of busulfan in patients undergoing myeloablative conditioning. In a collective of 25 patients with iron overload, we could show that the simultaneous intake of deferasirox during conditioning therapy before allo-HSCT leads to increased busulfan exposure.

Our data underline the importance of a busulfan TDM, especially in the case of comedication, which may have a previously unknown or little known influence on busulfan exposure. Without routine TDM, three quarters of the patients would have had achieved a cumulative busulfan AUC above the target range, one quarter of the patients even an AUC above 100 mg · h/L, that has been reported to be the upper limit of the optimal cumulative busulfan AUC in terms of toxicity [1]. Therefore our results make a valuable contribution to drug therapy safety. This is true for all centers, not only those performing routine busulfan TDM, because an initial reduction of busulfan dose in the context of deferasirox treatment could be reasonable to avoid overexposure already at the first dose.

From the comparison of our study collective to the historical control group without deferasirox, it can be concluded that the intake of deferasirox leads to a considerable increase in the busulfan AUC. Exposure to busulfan in the presence of deferasirox is estimated to be about 35% to 40% higher than in the absence of comedication with deferasirox. The reason for the

Table 2
Comparison of Patient Characteristics, Dose Adjustments, and Busulfan Clearance to Historical Control

	Current Study	Historical Control	P Value
Number of patients	25	95	
Age (y), median (range)	55.2 (20.2 - 68.7)	58.4 (19.7 - 73.1)	NS
Gender			NS
Male	11 (44%)	44 (46.3%)	
Female	14 (56%)	51 (53.7%)	
BMI (kg/m ²), median (range)	25.0 (17.2 - 44.4)	25.1 (15.6 - 36.0)	NS
TBW (kg), median (range)	75.0 (55.6 - 130.4)	75.0 (46.6 - 126.0)	NS
AIBW (kg), median (range)	70.4 (47.5 - 101.5)	68.6 (45.0 - 95.6)	NS
Weight used for busulfan dosing			NS
TBW	18 (72%)	62 (65.3%)	
AIBW	7 (28%)	33 (34.7%)	
Dose adjustment, n (%) increase	1 (4%)	61 (64.2%)	<.0001
Decrease	19 (76%)	10 (10.5%)	
Relative dose adjustment (%), median (range)	-17.1 (-50.0 to 18.2)	20.0 (-25.0 to 69.1)	<.0001
Busulfan			
Clearance (L/h/kg)	0.134 (0.084 - 0.203)	0.200 (0.100 - 0.331)	<.0001
Volume of distribution (L/kg)	0.75 (0.46 - 0.98)	0.77 (0.50 - 1.36)	NS

increase in busulfan AUC is presumably a reduction in busulfan clearance, which in the collective studied here was 0.134 L/h/kg on average when taking deferasirox. According to the manufacturer, the observed busulfan clearance is between 0.135 to 0.164 L/h/kg. However, in pharmacokinetic studies without concomitant deferasirox therapy, the average clearance reported for intravenous busulfan in adults is 0.2 L/h/kg, with a high interpatient variability of an up to 3-fold range reported in large studies [14–16]. Thus in the presence of deferasirox, the busulfan clearance in our cohort is reduced by about one third.

To the best of our knowledge, there are only 2 case reports describing a pharmacokinetic interaction between deferasirox and busulfan. Sweiss et al. [6] report the case of a 59-year-old female patient who, when comedicated with deferasirox, had a 1.5-fold higher busulfan exposure because of a significantly reduced clearance (0.104 L/h/kg versus 0.165 L/h/kg) than after discontinuation of deferasirox. Kwiatkowski et al. [7] present the case of an 8-year-old female patient with a comedication of deferasirox and methylphenidate, who experienced a significant increase of >50% in the initially strongly reduced busulfan clearance (0.086 L/h/kg versus 0.188 L/h/kg) after discontinuation of deferasirox over the course of 19 days. Based on these case reports, the European Medicines Agency decided in March 2020 to update the product information for busulfan and recommends monitoring the busulfan plasma concentration and, if necessary, adjusting the busulfan dose in patients who are being or have recently been treated with deferasirox.

The way in which busulfan interacts with deferasirox has not been conclusively clarified. Busulfan is spontaneously - or catalyzed by GST - conjugated with GSH and subsequently further metabolized in the liver. The involvement of various human oxidases such as cytochrome P450 (CYP) and flavin-dependent mono-oxygenase (FMO) in the further degradation of the various metabolites seems likely. Excretion of the metabolites and also small amounts of unchanged busulfan are mainly renal. An induction of CYP2A6 and CYP2E1 by high busulfan doses is suspected according to animal studies. Further effects on the activity of other CYP enzymes have not yet been demonstrated [4]. Deferasirox, on the other hand, is metabolized mainly by glucuronidation through the glucuronyltransferases UGT1A1 and UGT1A3. Oxidative metabolism via CYP450 plays a minor role. It is secreted via the bile and is subject to enterohepatic circulation. Deferasirox is excreted mainly in the feces in largely unchanged form and in smaller amounts in the form of its metabolites. A smaller proportion is also eliminated renally. Interaction studies have demonstrated moderate induction of CYP3A4 and moderate or weak inhibition of CYP2C8 and CYP1A2 by deferasirox [17]. A reduced oxidative metabolism of the busulfan-GSH conjugates with simultaneous administration of deferasirox could thus explain a reduced busulfan clearance, although the cytochrome P450 subforms relevant for the metabolism of the busulfan metabolites have not yet been determined.

Limitations of the study presented here result from potential pharmacokinetic interactions of busulfan with other drugs. In the present study, none of the patients received antibiotic therapy with metronidazole during conditioning. The antimycotic drug itraconazole was also not used. However, four patients had antifungal prophylaxis or therapy with another azole (voriconazole or posaconazole) on admission, which was discontinued in two patients before the start of conditioning therapy and continued for all days of conditioning therapy in

the other two patients. The recommended anticonvulsant prophylaxis during busulfan conditioning chemotherapy was levetiracetam. Phenytoin was not used in any of the patients. In seven patients, the administration of acetaminophen <72 hours before or during the conditioning chemotherapy with busulfan was documented. However, this was a single dose in each case. Changes in busulfan clearance can also be caused by genetic polymorphisms of the enzymes involved in the metabolism of busulfan. For example, there are several isoenzymes of glutathione S-transferase for which polymorphisms are known that lead to a reduction or loss of enzyme activity [18]. In the present study, only 3 patients who showed very low busulfan clearance or extreme fluctuations in clearance on repeated PK measurements were genotyped for the A1 and M1 isoenzymes of glutathione S-transferase. From the 2 patients with the lowest busulfan clearance (0.084 and 0.088 L/h/kg), one patient had both a GSTA1 SNP and a GSTM1 deletion, whereas the other patient had no polymorphisms in GSTA1 and GSTM1. In another patient with an initially high busulfan clearance (0.189 L/h/kg), which, however, dropped by more than 40% (0.110 L/h/kg) on the following day, a GSTA1-SNP was also detected. These findings show that even if a lower enzyme activity of GST caused by gene polymorphisms possibly contributes to a reduced busulfan clearance and thus higher busulfan exposure in some patients, this cannot be explained by the presence of a SNP alone.

In conclusion, a significant increase in busulfan exposure due to reduced clearance can be demonstrated by comedication with deferasirox. To investigate the exact extent of the interaction between deferasirox and busulfan, controlled pharmacokinetic studies taking into account concomitant medication and pharmacogenetics are necessary.

Conflict of interest statement: There are no conflicts of interest to report.

REFERENCES

- Bartelink IH, Lalmohamed A, van Reij EM, 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–e536.
- Palmer J, McCune JS, Perales MA, 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):1915–1925.
- Ruutu T, van der Werf S, van Biezen A, et al. Use of busulfan in conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults: a survey by the Transplant Complications Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant*. 2019;54(12):2013–2019.
- Myers AL, Kawedia JD, Champlin RE, et al. Clarifying busulfan metabolism and drug interactions to support new therapeutic drug monitoring strategies: a comprehensive review. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2017;13:901–923.
- Glantzbecker B, Duncan C, Alyea E, Campbell B, Soiffer R. Important drug interactions in hematopoietic stem cell transplantation: what every physician should know. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18:989–1006.
- Sweiss K, Patel P, Rondelli D. Deferasirox increases BU blood concentrations. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47:315–316.
- Kwiatkowski J, Duffner U, Abdel-Mageed A. Deferasirox Decreases Busulfan Clearance. *Ann Pharmacother*. 2018;52:497–498.
- Sweiss K, Quigley JG, Oh A, et al. A novel drug interaction between busulfan and blinatumomab. *J Oncol Pharm Pract*. 2019;25:226–228.
- Armand P, Kim HT, Rhodes J, et al. Iron overload in patients with acute leukemia or MDS undergoing myeloablative stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17:852–860.
- Leitch HA, Fibach E, Rachmilewitz E. Toxicity of iron overload and iron overload reduction in the setting of hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;113:156–170.
- Hilken A, Langebrake C, Wolschke C, et al. Impact of non-transferrin-bound iron (NTBI) in comparison to serum ferritin on outcome after allogeneic stem cell transplantation (ASCT). *Ann Hematol*. 2017;96:1379–1388.

12. Fritsch A, Langebrake C, Nielsen P, et al. Deferasirox (Exjade) given during conditioning regime (FLAMSA/Bu) reduces the appearance of labile plasma iron in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2011;118:3023.
13. Langebrake C, Wolschke C, Christopheit M, Müller A, Kröger N. Busulfan PK-guided dose-adjustment in adult allogeneic stem cell transplantation—single-center experience. *Bone Marrow Transplantation*. London: Nature Publishing Group; 2018.
14. Buffery PJ, Allen KM, Chin PK, Moore GA, Barclay ML, Begg EJ. Thirteen years' experience of pharmacokinetic monitoring and dosing of busulfan: can the strategy be improved? *Ther Drug Monit*. 2014;36:86–92.
15. McCune JS, Holmberg LA. Busulfan in hematopoietic stem cell transplant setting. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2009;5:957–969.
16. Salman B, Al-Za'abi M, Al-Huneini M, et al. Therapeutic drug monitoring-guided dosing of busulfan differs from weight-based dosing in hematopoietic stem cell transplant patients. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2017;10:70–78.
17. Tanaka C. Clinical pharmacology of deferasirox. *Clin Pharmacokinet*. 2014;53:679–694.
18. Huezo-Diaz P, Uppugunduri CR, Tyagi AK, Krajcinovic M, Ansari M. Pharmacogenetic aspects of drug metabolizing enzymes in busulfan based conditioning prior to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children. *Curr Drug Metab*. 2014;15:251–264.

3.3 Population Pharmacokinetics of Busulfan and its metabolite Sulfolane in patients with Myelofibrosis undergoing hematopoietic stem cell transplantation

Autoren: Adrin Dadkhah, Sebastian G. Wicha, Nicolaus Kröger, Alexander Müller, Christoph Pfaffendorf, Maria Riedner, Anita Badbaran, Boris Fehse, Claudia Langebrake

Journal: Pharmaceutics

Impact Factor: 6.525 (2022)

Article

Population Pharmacokinetics of Busulfan and Its Metabolite Sulfolane in Patients with Myelofibrosis Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation

Adrin Dadkhah ^{1,*}, Sebastian Georg Wicha ², Nicolaus Kröger ³, Alexander Müller ⁴, Christoph Pfaffendorf ², Maria Riedner ⁵, Anita Badbaran ³, Boris Fehse ³ and Claudia Langebrake ^{1,3}

¹ Hospital Pharmacy, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20251 Hamburg, Germany; clangebrake@uke.de

² Department of Clinical Pharmacy, Institute of Pharmacy, University of Hamburg, 20146 Hamburg, Germany; sebastian.wicha@uni-hamburg.de (S.G.W.); christoph.pfaffendorf@uni-hamburg.de (C.P.)

³ Department of Stem Cell Transplantation, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20251 Hamburg, Germany; n.kroeger@uke.de (N.K.); badbaran@uke.de (A.B.); fehse@uke.de (B.F.)

⁴ Department of Legal Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20251 Hamburg, Germany; alexander.mueller@uke.de

⁵ Technology Platform Mass Spectrometry, University of Hamburg, 20146 Hamburg, Germany; maria.riedner@uni-hamburg.de

* Correspondence: a.dadkhah@uke.de; Tel.: +49-40-7410-58517

Citation: Dadkhah, A.; Wicha, S.G.; Kröger, N.; Müller, A.; Pfaffendorf, C.; Riedner, M.; Badbaran, A.; Fehse, B.; Langebrake, C. Population Pharmacokinetics of Busulfan and Its Metabolite Sulfolane in Patients with Myelofibrosis Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1145. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061145>

Academic Editor: Monica M. Jablonski

Received: 27 April 2022

Accepted: 25 May 2022

Published: 27 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: For patients with myelofibrosis, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) remains the only curative treatment to date. Busulfan-based conditioning regimens are commonly used, although high inter-individual variability (IIV) in busulfan drug exposure makes individual dose selection challenging. Since data regarding the IIV in patients with myelofibrosis are sparse, this study aimed to develop a population pharmacokinetic (PopPK) model of busulfan and its metabolite sulfolane in patients with myelofibrosis. The influence of patient-specific covariates on the pharmacokinetics of drug and metabolite was assessed using non-linear mixed effects modeling in NONMEM[®]. We obtained 523 plasma concentrations of busulfan and its metabolite sulfolane from 37 patients with myelofibrosis. The final model showed a population clearance (CL) and volume of distribution (V_d) of 0.217 L/h/kg and 0.82 L/kg for busulfan and 0.021 L/h/kg and 0.65 L/kg for its metabolite. Total body weight (TBW) and a single-nucleotide polymorphism of glutathione-S-transferase A1 (GSTA1 SNP) displayed a significant impact on volume of distribution and metabolite clearance, respectively. This is the first PopPK-model developed to describe busulfan's pharmacokinetics in patients with myelofibrosis. Incorporating its metabolite sulfolane into the model not only allowed the characterization of the covariate relationship between GSTA1 and the clearance of the metabolite but also improved the understanding of busulfan's metabolic pathway.

Keywords: busulfan; sulfolane; myelofibrosis; population pharmacokinetics

1. Introduction

Myelofibrosis is a chronic myeloproliferative disorder that is characterized by a cytokine-mediated fibrosis of the bone marrow. This results in extramedullary hematopoiesis in the liver and spleen, often accompanied by enlargement of both organs [1]. Genetic aberrations of the genes JAK2, MPL and CALR were identified as the cause of this myeloproliferative disorder [2] and deemed relevant to clinical decision-making with regard to prognosis as well [3]. Since comprehensive mutational profiling has shown that most patients carry a JAKV617F mutation, initial therapy with the JAK1/JAK2 inhibitor ruxolitinib may reduce splenomegaly and improve performance status [4].

However, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) remains the only curative treatment to date. Prior to allo-HSCT, patients typically undergo either reduced intensity conditioning (RIC) [5] or myeloablative conditioning (MAC) [6,7] with busulfan and fludarabine.

Regarding other neoplastic diseases, the relationship between busulfan drug exposure and patient outcome after allo-HSCT has been investigated extensively. On the one hand, under-exposure is associated with higher risks of relapse and graft rejection, and on the other hand, over-exposure more frequently results in organ toxicity, sinusoidal obstructive syndrome (SOS), acute graft-versus-host disease (aGvHD) and overall higher treatment-related mortality (TRM) [8–11]. It is also known that busulfan has a high inter-individual variability (IIV) considering the ratio of dose and drug exposure, which makes individual dose selection challenging. Therefore, to maintain the narrow therapeutic range, it is recommended to conduct therapeutic drug monitoring (TDM) for higher dose busulfan in MAC conditioning regimens [9,12].

Studies that have investigated other neoplastic diseases found that patient-specific covariates such as age, weight, body surface area or co-medication might affect the clearance (CL) or volume of distribution (Vd) of busulfan and, therefore, may explain the IIV [13–18] as well as the inter-occasion variability (IOV) [14,19,20].

Since patients with myelofibrosis have an elevated risk of hepatotoxicity and impaired liver function due to extramedullary hematopoiesis, PK parameters of busulfan might additionally be affected. However, data describing the pharmacokinetic variability of busulfan prior to allo-HSCT in patients with myelofibrosis are sparse.

Overall, the pharmacokinetics of busulfan are complex, considering that its metabolic pathway is still not fully understood. Lawson et al. describe the conjugation of busulfan with glutathione through different isoenzymes of glutathione-S-transferase (GST), which eventually results in the four major metabolites: tetrahydrothiophene (THT), THT-1-oxide, sulfolane and 3-hydroxysulfolane [21]. Two of the most prominent isoenzymes are GSTA1 and GSTM1, and therefore, their impact on busulfan CL was subject to several investigations. In every population pharmacokinetic (PopPK) model, except one [22], it was found that polymorphisms correlate with a decrease in CL [23–26].

In order to get a better understanding of busulfan's metabolic pathway, joint PK-modeling of the parent drug and its metabolite seems sensible as it might account for uncertainties in the model and consequently improve the parameter estimations [27]. Moreover, a metabolic ratio of busulfan/sulfolane ≥ 5 is associated with a higher rate of graft failure and decreased event-free survival (EFS) [28]. However, none of busulfan's metabolites have yet been incorporated into a PopPK model.

Therefore, this study aimed to develop a PopPK model of busulfan and its metabolite sulfolane by examining known and determining new patient-specific covariates to explain busulfan's inter-individual variability in patients with myelofibrosis.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Data Collection

Patients of both sexes aged ≥ 18 years with diagnosed myelofibrosis that were scheduled for allo-HSCT with previous reduced intensity busulfan/fludarabine conditioning therapy at the University Medical Center Hamburg–Eppendorf between November 2018 and June 2020 were included after written informed consent. We also obtained written consent from patients who already underwent allo-HSCT between October 2016 and October 2017 and met the same criteria for enrollment. The single-center, prospective and partly retrospective, observational study was approved by the local Ethics Committee of the Hamburg Chamber of Physicians on 16 October 2018 (approval number: PV5842) and registered at the German Clinical Trials Register, number DRKS00015217, on 31 October 2018.

Patient demographics and routine clinical data, such as levels of aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), bilirubin, alkaline phosphatase (AP), results of elastography by Fibroscan, and genetic and other diagnostic markers, were obtained from the electronic patient record before busulfan administration. Scores according to the Dynamic International Prognostic Scoring System (DIPSS) for primary myelofibrosis and myelofibrosis secondary to PV and ET (MYSEC) for post-polycythemia vera (Post-PV) and post-essential thrombocythemia (Post-ET) myelofibrosis were determined to predict patient outcomes [29–31]. Treatment-related adverse events and outcomes (mucositis, aGvHD, cGvHD, SOS, relapse, death) were evaluated for one year after allo-HSCT.

Continuous variables are reported as medians with interquartile ranges (IQR) and discrete variables as counts (percentages).

2.2. Dosing, Pharmacokinetic Sampling and Quantification

Depending on the therapy standards at the time of enrollment, patients received either 10 doses of i.v. busulfan (0.8 mg/kg) every 6 h with a 2 h infusion rate (Q6H) or were dosed with three busulfan infusions every 24 h with an initial dose of 3.2 mg/kg and a 3 h infusion rate, followed by dose adjustment if necessary to achieve a cumulative area under the curve (cAUC) of 50 mg × h/L (Q24H). Furthermore, all patients received fludarabine and anti-thymocyte globulin (ATG) as part of the conditioning chemotherapy and levetiracetam as anticonvulsant prophylaxis. Comedications that are commonly known for their drug–drug interactions with busulfan, such as phenytoin, metronidazole, or azoles, were not administered during busulfan treatment.

For Q6H, blood samples were drawn 2.08, 3, 4 and 5.5 h after the start of the first and ninth infusion with an additional trough sample 5.5 h after start of the fifth infusion. For Q24H, sampling was conducted at 3.08, 4, 5 and 6.5 h after the start of the first infusion. Blood samples were drawn into serum tubes, immediately stored at 2–8 °C and centrifuged (2000 rpm, 10 min at 4 °C) shortly after. Supernatant plasma was separated into two aliquots and stored at –80 °C until analysis.

Busulfan was quantified at the Department of Legal Medicine at the University Medical Center Hamburg–Eppendorf using a validated gas chromatography with mass spectrometric detection method. The quantification of sulfolane was conducted according to the bioanalytical method of McCune et al. using a QTRAP 5500 mass spectrometer (SCIEX, Framingham, MA, USA) coupled with a 1290 Infinity HPLC II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) [32] at the Dept. of Clinical Pharmacy, Institute of Pharmacy, University of Hamburg. A detailed description of the bioanalytical method is provided in the Supplementary Materials.

2.3. Genotyping

DNA samples were obtained from bone marrow or peripheral blood samples before transplantation. Genotyping was performed by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) on a LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany).

In order to find the GSTA1 * B haplotype, which was reported to have a significantly decreased promoter activity [33], we analyzed the DNA for the single-nucleotide polymorphism (SNP) –52G > A (rs3957356) according to the method published by Ansari et al. [24]. GSTM1 deletion was detected as described by Choi et al. [23]. The primer sets used for the genotyping assays are reported in the Supplementary Materials.

2.4. PopPK Analysis

PopPK modeling was carried out in NONMEM® (version 7.4.3, ICON, Gaithersburg, MD, USA) using non-linear mixed-effect modeling. First-order conditional estimation with interaction (FOCE-I) between inter-individual and residual random effects was used throughout the process. Pirana version 3.0.1 (Certara, Princeton, NJ, USA) was used as run manager [34] and R version 4.1.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna,

Austria) was used for the exploratory data analysis and graphical postprocessing of the NONMEM® output.

Nested models were compared using the likelihood-ratio test ($\alpha = 0.05$, one degree of freedom), where a drop in objective function value (OFV) of 3.84 was considered as a significant improvement. Non-nested models were compared by the Akaike information criterion (AIC), for which superior models are indicated by a lower score [35]. Goodness-of-fit (GOF) plots, such as observed vs. population-predicted (PRED) and individual-predicted concentrations (IPRED) or conditional weighted residuals vs. time after dose and PRED, as well as eta shrinkage, were used for evaluation. A shrinkage below 30% was deemed acceptable [36].

Additive and proportional residual error models, as well as a combination of both, were tested to describe residual variability of both busulfan and sulfolane. Since intra-individual variability in busulfan pharmacokinetics is frequently observed during therapy [20], we also tested IOV on both CL and Vd of busulfan and sulfolane. The L2 data item in NONMEM® was used in order to test the correlation between the parent drug and its metabolite concentration measurements.

2.5. Covariate Model

After an initial screening for physiological plausibility and subsequent visual inspection to evaluate if there were correlations with individual estimates of the PK parameters, potential covariates were incorporated into the model using linear, exponential or power functions where appropriate. Statistical evaluation was carried out by a stepwise covariate modeling approach with $\alpha \leq 0.05$ ($\Delta\text{OFV} \geq -3.84$) in the forward inclusion step and $\alpha \leq 0.01$ ($\Delta\text{OFV} \geq 6.64$) in the backward elimination step.

Categorical covariates (GSTA1 SNP, GSTM1 deletion, sex, driver mutations) were coded as 0 or 1, whereas continuous variables (age, weight, height, BSA, serum levels, Fibroscan) were centered around their median value. Missing values for Fibroscan were imputed using the population median.

Eventually, the cAUC of all patients, as well as the clearance of busulfan after the first and ninth dose, were calculated by using the individual estimates of the final model for each patient.

2.6. Model Evaluation

Evaluation of the final model was performed by using a prediction-corrected visual predictive check (pcVPC) [37] with 1000 simulations and stratification based on predicted concentrations of the parent and metabolite as well as on the dosing regimen. Subsequently, the sampling-importance resampling (SIR) method ($M/m = 5000/1000$) was used to evaluate model robustness and determine the 95% confidence intervals (CI) of the estimated parameters [38].

3. Results

3.1. Patients and Data

In total, 37 patients diagnosed with myelofibrosis undergoing reduced conditioning chemotherapy with busulfan prior to allo-HSCT were included in this study. Thirty patients were included in the prospective part of the study and seven more patients consented to provide their data, measured busulfan plasma concentrations and remaining DNA samples for genotyping for retrospective analysis. The study population consisted of 19 female and 18 male patients, typically aged 60 years (median, IQR 53.5–65.5 years), with a median total body weight (TBW) of 75 kg (IQR 64.05–88.25 kg). Briefly, 18 patients had primary myelofibrosis, whereas 9 and 10 patients were diagnosed with Post-ET or Post-PV myelofibrosis, respectively.

A GSTA1 SNP was found in 28 patients (75.7%), whereas a GSTM1 deletion was detected in 19 patients (51.35%), and 10 patients (27%) had a combination of both. Overall,

523 plasma concentrations of busulfan and sulfolane were included in the PK analysis, from which 282 were parent drug and 241 were metabolite concentrations. In comparison, there were more busulfan plasma concentrations available, since sulfolane plasma concentrations could only be obtained from patients in the prospective part of the study.

In total, seven plasma concentrations were excluded from the analysis due to mis-handling or implausible concentrations, and 70 sulfolane plasma concentrations (13.4% of all plasma concentrations) were below the limit of quantification (BLQ, lower limit of quantification = 0.04 mg/L). The median cAUC of busulfan was 36.06 mg × h/L (range: 25.67–61.85 mg × h/L). Individual busulfan clearance (Figure S1) decreased from 17.16 L/h after the first dose (median, range: 10.55–22.36 L/h) to 16.47 L/h (median, range: 10.05–19.27 L/h) after the ninth dose. An overview of patient characteristics and clinical data is presented in Table 1.

Table 1. Patient demographic and clinical data.

Patient Characteristics (n = 37)	Median [IQR] or n (%)
Age [years]	60 [53.5–65.5]
Sex [female/male]	19 (51.4)/18 (48.6)
Weight [kg]	75 [64.05–88.25]
Height [cm]	174 [168–181]
BSA [m ²]	1.84 [1.75–2.07]
<i>Diagnosis</i>	
PMF	18 (48.7)
Post-ET MF	9 (24.3)
Post-PV MF	10 (27)
<i>Dosing regime</i>	
Q6H	30 (81)
Q24H	7 (19)
<i>DIPSS/MYSEC</i>	
Intermediate-1	2 (5)/1 (3)
Intermediate-2	15 (40)/14 (38)
High Risk	1 (3)/4 (11)
<i>Mutation</i>	
JAK2	26 (70.3)
CALR	7 (18.9)
MPL	1 (3)
TET2	9 (24.3)
ASXL1	13 (35.1)
<i>Blood chemistry, serum levels</i>	
AST [U/L]	21 [15.5–31.5]
ALT [U/L]	21 [18.5–47.5]
De Ritis Ratio	0.76 [0.58–1.07]
Albumin [g/L]	37.8 [34.6–41.4]
Alkaline Phosphatase [U/L]	85 [63–115]
Bilirubin [mg/dL]	0.6 [0.5–0.8]
Fibroscan [kPa]	5.6 [4.8–7]
Missing Data	14 (37.8)
GSTA1 52G > A	28 (75.7)
GSTM1 Deletion	19 (51.35)
Mucositis Grade 1/2/3/4	10 (27)/14 (38)/1 (2.7)/1 (2.7)
aGvHD Grade 1/2/3	10 (27)/7 (19)/4 (11)
cGvHD Grade 1/2/3	12 (32)/6 (16)/1 (2.7)

SOS	2 (5.4)
Relapse	2 (5.4)
Death	5 (13.5)

aGvHD: acute graft-versus-host-disease; **ALT**: alanine transaminase; **AST**: aspartate transaminase; **cGvHD**: chronic graft-versus-host disease; **DIPSS**: Dynamic International Prognostic Scoring System; **MYSEC**: myelofibrosis secondary to PV and ET; **PMF**: primary myelofibrosis; **Post-ET MF**: post-essential thrombocythemia myelofibrosis; **Post-PV MF**: post-polycythemia vera myelofibrosis; **SOS**: sinusoidal obstructive syndrome.

3.2. Base Model

The pharmacokinetics of busulfan and its metabolite sulfolane were best described by a one-compartment (1CMT) model with first-order elimination. The addition of a second compartment (2CMT) did not significantly improve the model, as indicated by their AIC (−1956.88 for 1CMT vs. −1956.41 for 2CMT) and lack of improvement in GOF plots. A proportional error model was used to describe the residual variability, since a mixed error model led to high eta shrinkage. The co-variance between the proportional error of busulfan (Prop. σ_{Bu}) and sulfolane (Prop. σ_{Su}) was implemented by using a sigma block employing the L2 data item. AIC dropped by 66 points when the L2 data item was used, as the concentration between parent drug and its metabolite measurements was correlated (11.8%). The inclusion of IIV on both CL (CL_{Bu} and CL_{Su}) and Vd (V_{Bu} and V_{Su}) of busulfan and sulfolane considerably improved the model. Before including IOV, each administration, followed by blood sampling, was defined as a new occasion. The implementation of IOV on CL_{Bu} further improved the model ($\Delta OFV -8.96$). BLQ observations were included into the model and accounted for by the error model.

Overall, busulfan and sulfolane plasma concentration–time profiles were adequately described by the compartmental model presented in Figure 1.

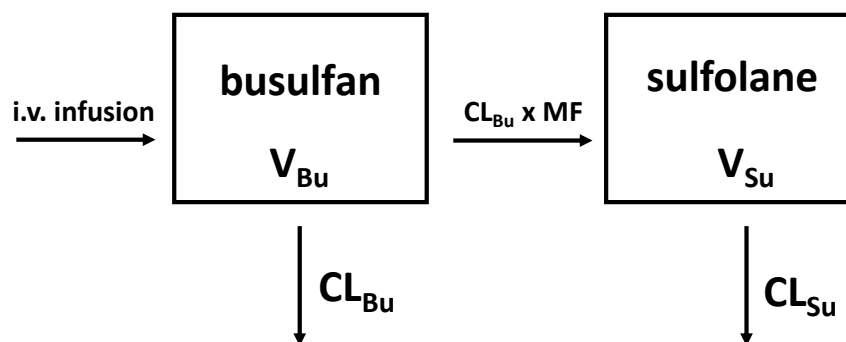


Figure 1. Compartmental model used to describe busulfan and sulfolane plasma concentration–time profiles. CL_{Bu} : busulfan clearance, representing the total clearance; V_{Bu} : volume of distribution of busulfan; MF: metabolic fraction; CL_{Su} : sulfolane clearance; V_{Su} : volume of distribution of sulfolane; formation of sulfolane as part of the total clearance.

3.3. Covariate Model

Initially, 39 demographic or clinical variables were identified as candidates for testing. Graphical exploration revealed 12 of them to be potential covariates, which then were incorporated separately into the model. Lastly, seven covariates (TBW, JAK2 mutation, GSTA1 SNP, GSTM1 deletion, De Ritis ratio, AP and bilirubin) showed a statistically significant drop in OFV ($\alpha \leq 0.05$) in the forward inclusion step.

Establishing a powered relationship between TBW and V_{Bu} improved the base model statistically from an OFV of −2655.3 to −2686.8 ($\Delta OFV -31.5$), as well as graphically, and reduced the IIV on V_{Bu} from 18.5% to 10.4%. Incorporating JAK2 mutation on CL_{Su} into the model reduced the OFV by 12.6 points to −2699.4; however, parameter estimates then be-

came physiologically implausible, and therefore, it was discarded. The exponential relationship between GSTA1 and CL_{Su} yielded in a drop by 10.7 points (OFV: -2697.5) and reduced the IIV on CL_{Su} from 136.3% to 112.8%. A further reduction by 7.61 points was achieved by including the De Ritis ratio on CL_{Bu} . However, this resulted in high relative standard errors of the PK parameters and thus the relationship was not retained in the model. An additional powered relationship between either AP or bilirubin and CL_{Bu} was statistically significant in the forward inclusion step (ΔOFV -5.56 and -5.23) but neither reduced the IIV on CL_{Bu} substantially nor showed notable improvement in GOF plots and, therefore, was eliminated within the backward elimination step.

The final covariate relationship on V_{Bu} (1) and CL_{Su} (2) can be expressed as:

$$V_{Bu} = V_{Bu\text{-typ}} \times \left(\frac{TBW}{75}\right)^{0.854} \quad (1)$$

$$CL_{Su} = CL_{Su\text{-typ}} \times e^{1.43} \text{ (for GSTA1)} \quad (2)$$

$$CL_{Su} = CL_{Su\text{-typ}} \text{ (for non - GSTA1)}$$

where $V_{Bu\text{-typ}}$ and $CL_{Su\text{-typ}}$ are the typical values of V_{Bu} and CL_{Su} , 0.854 and 1.43, and describe the effect of TBW and GSTA1 on V_{Bu} and CL_{Su} , respectively.

For the final model, the typical CL_{Bu} and V_{Bu} for a 75 kg patient were 16.3 L/h (IIV: 21.5% CV) and 61.5 L (IIV: 10% CV), respectively. CL and Vd of sulfolane were estimated to be 1.61 L/h (IIV: 112.8% CV) and 48.8 L (IIV: 77.6% CV). IOV on CL_{Bu} was 7.6%. The final model estimates and their 95% CI determined by SIR are provided in Table 2.

Table 2. Parameter estimates of the final busulfan and sulfolane PK model and SIR results.

Parameters	Final Model			SIR (M/m = 5000/1000)
	Estimate	RSE (%)	Shrinkage (%)	95% CI
CL_{Bu} [L/h]	16.3	3.6	-	15.18–17.35
V_{Bu} [L]	61.5	2	-	59.37–63.78
CL_{Su} [L/h]	1.61	37	-	0.84–2.24
V_{Su} [L]	48.8	35.2	-	30.75–78.46
MF	0.0704	28.6	-	0.0463–0.1029
COV_ V_{Bu} _TBW [kg]	0.854	11.6	-	0.665–1.059
COV_ CL_{Su} _GSTA1	1.43	43.6	-	0.63–2.40
IIV CL_{Bu} [CV%]	21.5	14.8	2	16.4–27.4
IIV V_{Bu} [CV%]	10	12	18	7.2–12.1
IIV CL_{Su} [CV%]	112.8	26.1	22	80.3–206.2
IIV V_{Su} [CV%]	77.6	14.2	18	59.2–106.4
IOV CL_{Bu} [CV%]	7.6	13.5	39	5.6–9.1
Prop. σ_{Bu} [CV%]	7.1	12.8	14	6.3–8.2
Prop. σ_{Su} [CV%]	36.2	7.2	12	32.6–40.1

CL_{Bu} : busulfan clearance; CL_{Su} : sulfolane clearance; COV_ CL_{Su} _GSTA1: typical pharmacokinetic parameter for the covariate GSTA1 on CL_{Su} ; COV_ V_{Bu} _TBW: typical pharmacokinetic parameter for the covariate BTW on V_{Bu} ; CV: coefficient of variation (%CV = $\sqrt{\exp(\text{OMEGA})-1} \times 100$); IIV: inter-individual variability; IOV: inter-occasion variability; MF: metabolic fraction; OFV: objective function value; Prop. σ_{Bu} : residual variability of busulfan calculated as a proportional error; Prop. σ_{Su} : residual variability of sulfolane calculated as a proportional error; RSE: relative standard error; SIR: sampling-importance resampling; V_{Bu} : volume of distribution of busulfan; V_{Su} : volume of distribution of sulfolane.

3.4. Model Evaluation

An overview of the GOF plots for the final model is shown in Figure 2. Plots of individual predictions (Figure 2A) as well as population predictions (Figure 2B) against observations depict an even distribution around the identity line. The conditional weighted

residuals (CWRES) show a normal distribution around the x -axis when plotted against population predictions (Figure 2C) and time after dose (Figure 2D).

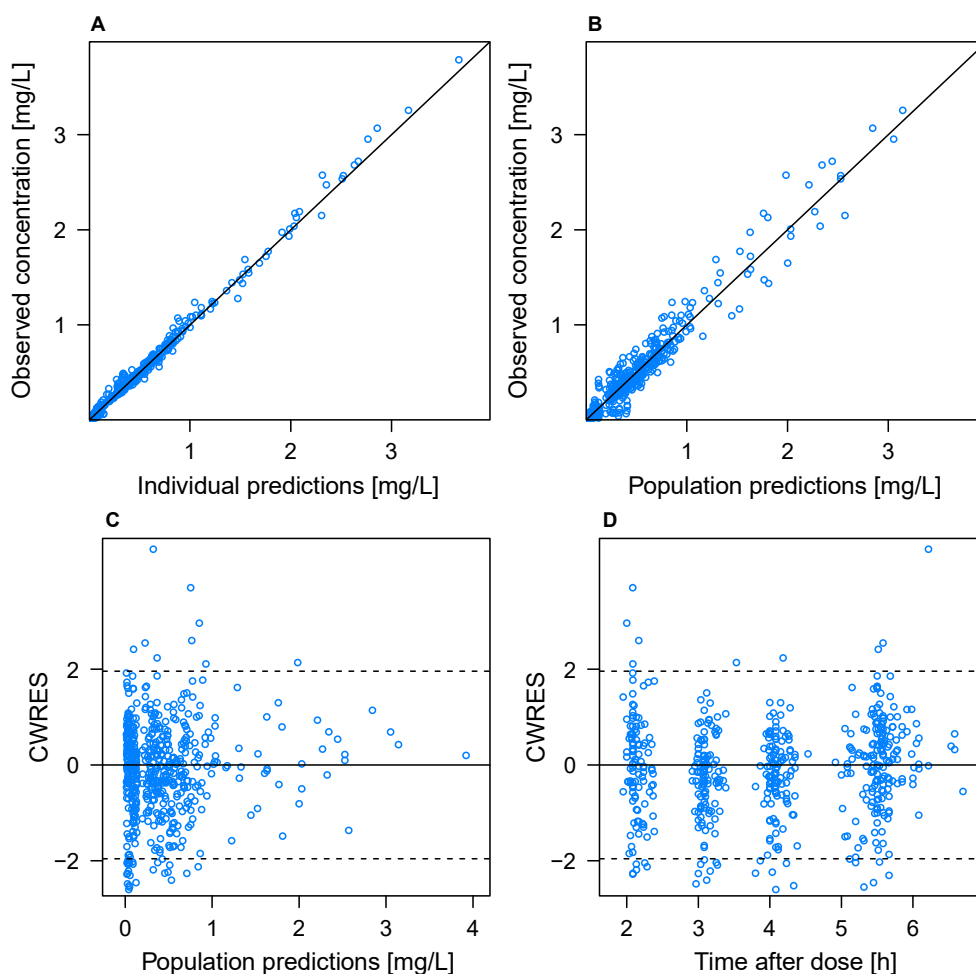


Figure 2. Goodness-of-fit (GOF) plots of the final PK model for busulfan and sulfolane. Observed concentration versus (A) individual predicted concentrations, and (B) population predicted concentrations; solid line = line of identity. Conditional weighted residuals (CWRES) versus population predicted concentration (C) and time after first dose (D).

SIR was performed with a M/m ratio of 5000/1000 and revealed adequate diagnostic plots with a proposal distribution close to the true distribution (Figure S2) and a horizontal trend for the observed resampling proportion (Figure S4). The pcVPC with stratification on Q6H showed overlapping observations and predictions for both busulfan (Figure 3A) and sulfolane (Figure 3B). The pcVPC plot with stratification on Q24H is provided in the Supplementary Materials (Figure S5).

Overall, the plots indicate a good predictive performance and robustness of the final model.

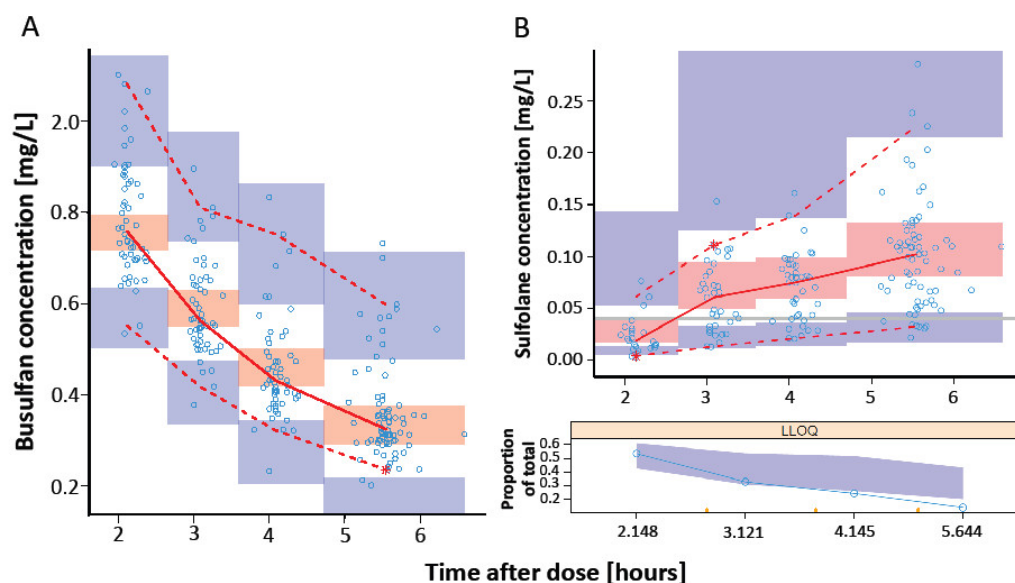


Figure 3. Prediction-corrected visual predictive check of the final model of busulfan (A) and sulfolane (B) with stratification on Q6H. Open dots represent prediction-corrected observed plasma concentration; solid red line = median observed concentration over time; dashed red lines = 5 and 95% quartiles of observed concentration over time; the * represent outliers at that timepoint; blue shaded area = 90% CI of 5% and 95% predictions; red shaded area = 90% CI of median predictions; horizontal grey line in (B) = the LLOQ of sulfolane (0.04 mg/L); lower panel in (B) shows the fraction of BQL sulfolane data.

4. Discussion

This is the first study to describe population pharmacokinetics of busulfan in patients with myelofibrosis undergoing allo-HSCT. Moreover, this is the first study to incorporate sulfolane into a PopPK model of busulfan in order to establish a relationship between its metabolite and patient-specific covariates.

Our data suggests that the pharmacokinetics of busulfan and its metabolite sulfolane are best described by a one-compartment model with first-order elimination. This lies in accordance with most of the published PK analyses of busulfan, even though there are few two-compartmental models for busulfan reported as well [13,26,39,40]. Most published PopPK models of busulfan set the focus either on pediatric patients as the IIV as well as the IOV of busulfan PK in children and young adults are even more difficult to predict [20,21] or on large study populations including various malignancies [11,13]. However, there is no PopPK analysis solely focused on patients with myelofibrosis to date. Considering that patients with myelofibrosis have an elevated risk of hepatotoxicity and impaired liver function due to extramedullary hematopoiesis on the one hand, and the fact that an impaired liver function is associated with adverse impact on survival on the other hand [41], determining the inter-individual pharmacokinetic variability of busulfan in patients with myelofibrosis was overdue. The range of cAUC of busulfan (25.67–61.85 mg × h/L) in our study shows a up to 2.4-fold difference in busulfan exposure and, therefore, confirms the high IIV in drug exposure that is known from the literature as well. Additionally, even though busulfan/fludarabine, as either RIC or MAC, are commonly used conditioning regimens, there is still no defined therapeutic window for myelofibrosis.

There are only a few PopPK models of busulfan that solely include adult patients. As McCune et al. showed, there is a maturation of clearance in pediatric patients [13] and, consequently, the reported range for typical values of CL in the literature is considerably wide. Our results for CL_{Bu} (16.3 L/h) and V_{Bu} (61.5 L) for a typical patient with 75 kg TBW

are generally within the range of the estimates reported in the literature. However, they differ from those of Choi et al., who found a CL of 11 L/h and V of 42.4 L for their adult patients (typical patient weighing 60 kg) [23]. Since Choi et al. included various malignancies in their analysis, the difference in population estimates might be an indicator of the necessity for more focused PK analyses on special patient populations.

Regarding patient-specific variables, body size-related covariates and GSTA1 are, similar to our findings, most often reported to have a significant impact on the PK of busulfan. However, our study is the first to incorporate sulfolane into a PopPK model of busulfan. Although our findings did not confirm that a metabolic ratio of busulfan/sulfolane ≥ 5 is associated with a higher rate of graft failure and decreased event-free survival (EFS) [28], the fact that our data indicates an IIV on CL_{Su} of 112.8% CV underlines the complexity of busulfan's metabolic pathway and calls for further investigations regarding the impact of metabolites on patient outcome as well. Moreover, the established relationship between GSTA1 and the clearance of the metabolite in our model may seem counter-intuitive at first since sulfolane is not conjugated with glutathione. However, there are several intermediate metabolites within the pathway that are transitioned by different enzymes, and a change in any of the respective enzymes' activity could potentially impact the excretion of sulfolane [21].

There are a few limitations to this study that need to be kept in mind. First, the rather small cohort of 37 patients might not allow us to adequately characterize the relationships between covariates and PK parameters, in particular if the covariate effects on PK parameters are of a small effect size. In addition, using a PopPK model based on a relatively small patient cohort for model-informed precision dosing (MIPD) is not advisable since the quantitative relationship between a covariate and its respective PK parameter might be imprecise and, therefore, lead to biased estimations of drug exposure [42]. Second, due to the nature of including seven patients retrospectively, we could not obtain sulfolane plasma concentrations for those patients in order to include them in the model. Third, for technical reasons, we were unable to conduct a Fibroscan in 14 patients, and therefore, a covariate relationship could not be sufficiently investigated.

5. Conclusions

To the best of our knowledge, this is the first PopPK model developed to describe busulfan's pharmacokinetics in patients with myelofibrosis. TBW was identified as the most significant covariate. Incorporating its metabolite sulfolane into the model not only allowed us to characterize the covariate relationship between GSTA1 and the clearance of the metabolite but it also showed that there is a high inter-individual variability regarding CL_{Su} as well. Further (multi-centric) studies with larger cohorts are required in order to find further covariates that explain the high IIV of sulfolane CL and possibly determine a sensible therapeutic window for patients with myelofibrosis.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics14061145/s1>, Figure S1: Individual busulfan clearance after the first and ninth dose; Figure S2: SIR diagnostic plot; Figure S3: SIR diagnostic plot: Adequacy of proposal density; Figure S4: SIR diagnostic plot: Exhaustion of samples; Figure S5: pcVPC with stratification on Q24H.

Author Contributions: A.D., C.L., S.G.W. and N.K. made substantial contributions to the conception, study design and data collection. A.M. measured the busulfan blood samples using GC-MS. A.D., M.R. and C.P. measured the sulfolane blood samples using LC-MS/MS. A.D., A.B. and B.F. carried out PCR analysis for genotyping. A.D. and S.G.W. performed the pharmacometric analysis and interpretation of the PK data. C.L., S.G.W., N.K. and B.F. provided clinical input and interpretation of the data. A.D. drafted the manuscript. C.L. and S.G.W. substantively revised the manuscript. N.K., A.M., C.P., M.R., A.B. and B.F. revised the manuscript for intellectual content. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the local Ethics Committee of the Hamburg Chamber of Physicians (approval number: PV5842).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available for reasons of privacy.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Farhadfar, N.; Cerquozzi, S.; Patnaik, M.; Tefferi, A. Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Myelofibrosis: A Practical Review. *J. Oncol. Pr.* **2016**, *12*, 611–621. <https://doi.org/10.1200/jop.2016.013268>.
- Cazzola, M.; Kralovics, R. From Janus kinase 2 to calreticulin: The clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Blood* **2014**, *123*, 3714–3719. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-530865>.
- Rumi, E.; Pietra, D.; Pascutto, C.; Guglielmelli, P.; Martínez-Trillos, A.; Casetti, I.; Colomer, D.; Pieri, L.; Pratcorona, M.; Rotunno, G.; et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood* **2014**, *124*, 1062–1069. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-578435>.
- McLornan, D.P.; Malpassuti, V.; Lippinkhof-Kozijn, A.; Potter, V.; Beelen, D.; Bunjes, D.; Sengeloev, V.; Radujkovic, A.; Passweg, J.; Chalandon, Y.; et al. Outcome of allogeneic haemato-poietic stem cell transplantation in myeloproliferative neoplasm, unclassifiable: A retrospective study by the Chronic Malignancies Working Party of the EBMT. *Br. J. Haematol.* **2020**, *190*, 437–441.
- Kröger, N.; Holler, E.; Kobbe, G.; Bornhäuser, M.; Schwerdtfeger, R.; Baurmann, H.; Nagler, A.; Bethge, W.; Stelljes, M.; Uharek, L.; et al. Allogeneic stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning in patients with myelofibrosis: A prospective, multicenter study of the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* **2009**, *114*, 5264–5270. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-234880>.
- Jain, T.; Kunze, K.L.; Temkit, M.; Partain, D.K.; Patnaik, M.S.; Slack, J.L.; Khera, N.; Hogan, W.J.; Roy, V.; Noel, P.; et al. Comparison of reduced intensity conditioning regimens used in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Bone Marrow Transplant.* **2019**, *54*, 204–211.
- Popat, U.; Mehta, R.S.; Bassett, R.; Kongtim, P.; Chen, J.; Alousi, A.M.; Anderlini, P.; Ciurea, S.; Hosing, C.; Jones, R.B.; et al. Optimizing the Conditioning Regimen for Hematopoietic Cell Transplant in Myelofibrosis: Long-Term Results of a Prospective Phase II Clinical Trial. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2020**, *26*, 1439–1445.
- Andersson, B.S.; Thall, P.F.; Valdez, B.C.; Milton, D.R.; Alatrash, G.; Chen, J.; Gulbis, A.; Chu, D.; Martinez, C.; Parmar, S.; et al. Fludarabine with pharmacokinetically guided IV busulfan is superior to fixed-dose delivery in pretransplant conditioning of AML/MDS patients. *Bone Marrow Transplant.* **2016**, *52*, 580–587. <https://doi.org/10.1038/bmt.2016.322>.
- Palmer, J.; McCune, J.S.; Perales, M.-A.; Marks, D.; Bubalo, J.; Mohty, M.; Wingard, J.R.; Paci, A.; Hassan, M.; Bredeson, C.; 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*, 1915–1925.
- Perkins, J.; Field, T.; Kim, J.; Kharfan-Dabaja, M.A.; Ayala, E.; Pérez, L.; Fernandez, H.; Fancher, K.; Tate, C.; Shaw, L.M.; et al. Pharmacokinetic targeting of i.v. BU with fludarabine as conditioning before hematopoietic cell transplant: The effect of first-dose area under the concentration time curve on transplant-related outcomes. *Bone Marrow Transplant.* **2010**, *46*, 1418–1425. <https://doi.org/10.1038/bmt.2010.315>.
- Bartelink, I.H.; Lalmohamed, A.; van Reij, E.M.L.; Dvorak, C.; Savic, R.M.; Zwaveling, J.; Bredius, R.G.M.; Egberts, T.; Bierings, M.; Kletzel, M.; 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–e536. [https://doi.org/10.1016/s2352-3026\(16\)30114-4](https://doi.org/10.1016/s2352-3026(16)30114-4).
- McCune, J.S.; Holmberg, L.A. Busulfan in hematopoietic stem cell transplant setting. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2009**, *5*, 957–969. <https://doi.org/10.1517/17425250903107764>.
- McCune, J.S.; Bemer, M.J.; Barrett, J.S.; Baker, K.S.; Gamis, A.S.; Holford, N. Busulfan in Infant to Adult Hematopoietic Cell Transplant Recipients: A Population Pharmacokinetic Model for Initial and Bayesian Dose Personalization. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *20*, 754–763. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-13-1960>.
- Bartelink, I.H.; Boelens, J.J.; Bredius, R.G.M.; Egberts, A.C.G.; Wang, C.; Bierings, M.B.; Shaw, P.J.; Nath, C.E.; Hempel, G.; Zwaveling, J.; et al. Body Weight-Dependent Pharmacokinetics of Busulfan in Paediatric Haematopoietic Stem Cell Transplantation Patients: Towards Individualized Dosing. *Clin. Pharmacokinet.* **2012**, *51*, 331–345.
- Trame, M.N.; Bergstrand, M.; Karlsson, M.O.; 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.* **2011**, *17*, 6867–6877.
- Long-Boyle J, Savic R, Yan S, Bartelink I, Musick L, French D; 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.* **2016**, *26*, 236.

17. Takahashi, T.; Illamola, S.M.; Jennissen, C.A.; Long, S.E.; Lund, T.C.; Orchard, P.J.; Gupta, A.O.; Long-Boyle, J.R. Busulfan dose Recommendation in Inherited Metabolic Disorders: Population Pharmacokinetic Analysis. *Transplant. Cell. Ther.* **2021**, *28*, 104–104. <https://doi.org/10.1016/j.jtct.2021.11.018>.
18. Essmann, S.; Dadkhah, A.; Janson, D.; Wolschke, C.; Ayuk, F.; Kröger, N.M.; Langebrake, C. Iron Chelation with Deferasirox Increases Busulfan AUC During Conditioning Chemotherapy Prior to Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Transplant. Cell. Ther.* **2021**, *28*, 115–115. <https://doi.org/10.1016/j.jtct.2021.11.003>.
19. Lee, J.W.; Kang, H.J.; Lee, S.H.; Yu, K.-S.; Kim, N.H.; Yuk, Y.J.; Jang, M.K.; Han, E.J.; Kim, H.; Song, S.H.; et al. Highly Variable Pharmacokinetics of Once-Daily Intravenous Busulfan When Combined with Fludarabine in Pediatric Patients: Phase I Clinical Study for Determination of Optimal Once-Daily Busulfan Dose Using Pharmacokinetic Modeling. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2012**, *18*, 944–950. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2011.11.025>.
20. Marsit, H.; Philippe, M.; Neely, M.; Rushing, T.; Bertrand, Y.; Ducher, M.; Leclerc, V.; Guitton, J.; Bleyzac, N.; Goutelle, S. Intra-individual Pharmacokinetic Variability of Intravenous Busulfan in Hematopoietic Stem Cell-Transplanted Children. *Clin. Pharmacokinet.* **2020**, *59*, 1049–1061. <https://doi.org/10.1007/s40262-020-00877-z>.
21. Lawson, R.; Staats, C.E.; Fraser, C.J.; Hennig, S. Review of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intravenous Busulfan in Paediatric Patients. *Clin. Pharmacokinet.* **2020**, *60*, 17–51. <https://doi.org/10.1007/s40262-020-00947-2>.
22. Zwaveling, J.; Press, R.R.; Bredius, R.G.M.; van Derstraaten, T.R.J.H.M.; Hartigh, J.D.; Bartelink, I.H.; Boelens, J.J.; Guchelaar, H.-J. Glutathione S-transferase Polymorphisms Are Not Associated with Population Pharmacokinetic Parameters of Busulfan in Pediatric Patients. *Ther. Drug Monit.* **2008**, *30*, 504–510. <https://doi.org/10.1097/ftd.0b013e3181817428>.
23. Choi, B.; Kim, M.G.; Han, N.; Kim, T.; Ji, E.; Park, S.; Kim, I.-W.; Oh, J.M. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of busulfan with *GSTA1* polymorphisms in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pharmacogenomics* **2015**, *16*, 1585–1594. <https://doi.org/10.2217/pgs.15.98>.
24. Ansari, M.; Curtis, P.H.-D.; Uppugunduri, C.R.S.; Rezugui, M.A.; Nava, T.; Mlakar, V.; Lesne, L.; Theoret, Y.; Chalandon, Y.; Dupuis, L.L.; et al. *GSTA1* diplotypes affect busulfan clearance and toxicity in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A multicenter study. *Oncotarget* **2017**, *8*, 90852–90867. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20310>.
25. Nava, T.; Kassir, N.; Rezugui, M.A.; Uppugunduri, C.R.S.; Huezio-Diaz Curtis, P.; Duval, M.; Theoret, Y.; Daudt, L.E.; Litalien, C.; Ansari, M.; Ansari, M.; et al. Incorporation of *GSTA1* genetic variations into a population pharmacokinetic model for IV busulfan in paediatric hematopoietic stem cell transplantation: *GSTA1*-based busulfan population pharmacokinetic model in children. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2018**, *84*, 1494–1504.
26. Hassine, K.B.; Nava, T.; Théoret, Y.; Nath, C.E.; Daali, Y.; Kassir, N.; Lewis, V.; Bredius, R.G.M.; Shaw, P.J.; Shaw, P.J.; et al. Precision dosing of intravenous busulfan in pediatric hematopoietic stem cell transplantation: Results from a multicenter population pharmacokinetic study. *CPT Pharmacomet. Syst. Pharmacol.* **2021**, *10*, 1043–1056.
27. Bertrand, J.; Laffont, C.M.; Mentré, F.; Chenel, M.; Comets, E. Development of a Complex Parent-Metabolite Joint Population Pharmacokinetic Model. *AAPS J.* **2011**, *13*, 390–404. <https://doi.org/10.1208/s12248-011-9282-9>.
28. Uppugunduri, C.R.S.; Rezugui, M.A.; Diaz, P.H.; Tyagi, A.K.; Rousseau, J.; Daali, Y.; Duval, M.; Bittencourt, H.; Krajcinovic, M.; Ansari, M. The association of cytochrome P450 genetic polymorphisms with sulfolane formation and the efficacy of a busulfan-based conditioning regimen in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Pharmacogenomics J.* **2013**, *14*, 263–271. <https://doi.org/10.1038/tpj.2013.38>.
29. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A; et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: A study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neo-plasms Research and Treatment). *Blood* **2010**, *115*, 1703–1708.
30. Passamonti, F.; Giorgino, T.; Mora, B.; Guglielmelli, P.; Rumi, E.; Maffioli, M.; Rambaldi, A.; Caramella, M.; Komrokji, R.; Gotlib, J.; et al. A clinical-molecular prognostic model to predict survival in patients with post polycythemia vera and post essential thrombocythemia myelofibrosis. *Leukemia* **2017**, *31*, 2726–2731. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.169>.
31. Gagelmann, N.; Eikema, D.-J.; de Wreede, L.C.; Koster, L.; Wolschke, C.; Arnold, R.; Kanz, L.; McQuaker, G.; Marchand, T.; Socié, G.; et al. Comparison of Dynamic International Prognostic Scoring System and MYelofibrosis SECondary to PV and ET Prognostic Model for Prediction of Outcome in Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia Myelofibrosis after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2019**, *25*, e204–e208. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2019.03.024>.
32. McCune, J.; Shen, D.D.; Shireman, L.; Phillips, B. *Bioanalytical Method: Tetrahydrothiophene-1-oxide and Sulfolane and 3-Hydroxysulfolane in Plasma*; Report No.: BAM217; National Cancer Institute, University of Washington School of Pharmacy: Seattle, WA, USA, 2017.
33. Coles, B.F.; Morel, F.; Rauch, C.; Huber, W.W.; Yang, M.; Teitel, C.H.; Green, B.; Lang, N.; Kadlubar, F.F. Effect of polymorphism in the human glutathione S-transferase A1 promoter on hepatic *GSTA1* and *GSTA2* expression. *Pharmacogenetics* **2001**, *11*, 663–669.
34. Keizer, R.J.; van Bentem, M.; Beijnen, J.H.; Schellens, J.H.; Huitema, A.D. Piraña and PCluster: A modeling environment and cluster infrastructure for NONMEM. *Comput. Methods Programs Biomed.* **2011**, *101*, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2010.04.018>.
35. Bonate, P.L. *Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation*, 2nd ed.; Springer: Boston, MA, USA, 2011; <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9485-1>.
36. Savic, R.M.; Karlsson, M.O. Importance of Shrinkage in Empirical Bayes Estimates for Diagnostics: Problems and Solutions. *AAPS J.* **2009**, *11*, 558–569. <https://doi.org/10.1208/s12248-009-9133-0>.

37. Bergstrand, M.; Hooker, A.C.; Wallin, J.E.; Karlsson, M.O. Prediction-Corrected Visual Predictive Checks for Diagnosing Non-linear Mixed-Effects Models. *AAPS J.* **2011**, *13*, 143–151.
38. Dosne, A.-G.; Bergstrand, M.; Harling, K.; Karlsson, M.O. Improving the estimation of parameter uncertainty distributions in nonlinear mixed effects models using sampling importance resampling. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* **2016**, *43*, 583–596. <https://doi.org/10.1007/s10928-016-9487-8>.
39. Ms, A.K.; Funaki, T.; Kim, S. Population Pharmacokinetic Analysis of Busulfan in Japanese Pediatric and Adult HCT Patients. *J. Clin. Pharmacol.* **2018**, *58*, 1196–1204. <https://doi.org/10.1002/jcph.1120>.
40. Neroutsos, E.; Nalda-Molina, R.; Paisiou, A.; Zisaki, K.; Goussetis, E.; Spyridonidis, A.; Kitra, V.; Grafakos, S.; Valsami, G.; Dokoumetzidis, A. Development of a Population Pharmacokinetic Model of Busulfan in Children and Evaluation of Different Sampling Schedules for Precision Dosing. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 647. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030647>.
41. Wong, K.M.; Atenafu, E.G.; Kim, D.; Kuruvilla, J.; Lipton, J.H.; Messner, H.; Gupta, V. Incidence and Risk Factors for Early Hepato-toxicity and Its Impact on Survival in Patients with Myelofibrosis Undergoing Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2012**, *18*, 1589–1599.
42. Broeker, A.; Nardecchia, M.; Klinker, K.; Derendorf, H.; Day, R.; Marriott, D.; Carland, J.; Stocker, S.; Wicha, S. Towards precision dosing of vancomycin: A systematic evaluation of pharmacometric models for Bayesian forecasting. *Clin. Microbiol. Infect.* **2019**, *25*, 1286.e1–1286.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.02.029>.

4 Zusammenfassung

Hintergrund

Im Rahmen der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (allo-HSZT) wird bei erwachsenen und pädiatrischen Patienten häufig eine Konditionierungstherapie mit Busulfan durchgeführt. Aufgrund der hohen Variabilität der Wirkstoffexposition zwischen den Patienten, selbst nach intravenöser Verabreichung, stellt die individuelle Festlegung der Dosis eine Herausforderung dar. Um sicherzustellen, dass die Wirkstoffexposition innerhalb des engen therapeutischen Fensters bleibt, ist die Durchführung eines Therapeutischen Drug Monitoring (TDM) ratsam.

Es gibt eine Vielzahl möglicher Gründe für die oftmals beobachtete hohe inter-individuelle Variabilität der Busulfan-Exposition. Eine Ursache könnte die ungenaue Dokumentation der Blutentnahme- und Infusionszeiten sein. In der klinischen Praxis werden häufig eher geplante als tatsächliche Zeiten für die Blutentnahme- und Infusionszeit dokumentiert, ohne sich darüber im Klaren zu sein, was diese Abweichungen für die AUC-Schätzung bedeuten könnten. Bis jetzt liegen jedoch keine Daten zu den Auswirkungen einer fehlerhaften Dokumentation auf das TDM von Busulfan vor.

Die pharmakokinetische Variabilität von Busulfan ist jedoch in den meisten Fällen auf Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln oder auf physiologische Abweichungen im Stoffwechsel zurückzuführen. Klinisch relevante Wechselwirkungen mit Busulfan, welche zu supratherapeutischen oder subtherapeutischen Expositionen führen können, bestehen beispielsweise mit Paracetamol, Metronidazol, Azolen oder Phenytoin. Außerdem gibt es Fallberichte über eine verringerte Busulfan-Clearance bei gleichzeitiger Verabreichung von Deferasirox. Es wurden jedoch keine klinischen oder pharmakokinetischen Studien an größeren Kohorten durchgeführt, um diese Wechselwirkung zwischen Deferasirox und Busulfan zu bestätigen.

Weitere Abweichungen in der Busulfan-Metabolisierung könnten auf krankheitsbedingte physiologische Veränderungen zurückzuführen sein. Die Myelofibrose ist durch eine Zytokin-vermittelte Fibrose des Knochenmarks gekennzeichnet, die zu einer extramedullären

Hämatopoese in Leber und Milz führt und in der Folge ein erhöhtes Risiko für Hepatotoxizität und eine eingeschränkte Leberfunktion mit sich bringt. Dadurch könnten die PK-Parameter von Busulfan zusätzlich verändert sein. Der bisherige Stand der Wissenschaft zeigt jedoch einen deutlichen Mangel an validen Daten, welche die PK von Busulfan als Teil der Konditionierungstherapie vor allo-HSCT bei einer Myelofibrose beschreibt.

Daher war es Ziel dieser Promotionsarbeit die Pharmakokinetik von Busulfan als Teil der Konditionierungstherapie vor allo-HSCT zu untersuchen. Folgende Projekte standen hierbei im Fokus:

I. Bewertung der Robustheit des Therapeutischen Drug Monitorings von Busulfan unter Verwendung bayesscher Methoden hinsichtlich ungenauer Dokumentation von Blutentnahme- und Infusionszeiten und der Anzahl verwendeter Blutspiegel

II. Untersuchung des Einflusses von Deferasirox auf die Pharmakokinetik von Busulfan während einer myeloablativen Konditionierung vor allo-HSCT bei Patienten mit Eisenüberladung im Rahmen eines routinemäßigen Busulfan-TDM

III. Entwicklung eines PopPK-Modells von Busulfan und seines Metaboliten Sulfolan durch Untersuchung bekannter und Bestimmung neuer patientenspezifischer Kovariaten zur Erklärung der Variabilität der Pharmakokinetik von Busulfan bei Patienten mit Myelofibrose

Methodik

Die Daten wurden im Rahmen einer In-silico-Studie (I) und zweier separaten monozentrischen, prospektiven, nicht-interventionellen Beobachtungsstudien erhoben.

Um die Robustheit des Therapeutischen Drug Monitorings von Busulfan hinsichtlich ungenauer Dokumentation von Blutentnahme- und Infusionszeiten und der Anzahl verwendeter Blutspiegel zu evaluieren, wurde eine pharmakometrische Studie durch Stochastische Simulation und Schätzung (SSE) 1000 simulierter klinischer Studien auf Grundlage zweier veröffentlichter PopPK-Modelle durchgeführt. Die SSE erfolgten für sowohl

einmal tägliche (Q24H) als auch viermal tägliche Gaben (Q6H). Die Bewertung von Genauigkeit und Präzision der individuell geschätzten AUC erfolgt durch die Berechnung des relativen Vorhersagefehlers (rPE) und der Wurzel des mittleren quadratischen relativen Fehlers (rRmse).

Um den Einfluss von Deferasirox auf die Pharmakokinetik von Busulfan (II) zu untersuchen, wurde bei Patienten, die aufgrund einer Eisenüberladung Deferasirox 14 mg/kg/Tag als Teil der MAC vor einer allo-HSCT erhielten, ein TDM von Busulfan durchgeführt. Auf der Grundlage von vier Blutspiegeln wurden nach dem TDM Dosisanpassungen vorgenommen, wenn die berechnete AUC nicht innerhalb des Zielbereichs von 10 % der Ziel-AUC von 80 mg × h/L lag. Der Einfluss patientenspezifischer Kovariaten auf die Pharmakokinetik von Busulfan und seinem Metaboliten Sulfolan (III) wurde – mithilfe nicht-linearer Regression unter Berücksichtigung gemischter Effekte – mit NONMEM® untersucht. Die statistische Auswertung der Kovariaten-Beziehungen erfolgte durch Anwendung des Vorwärtseinschluss-/Rückwärtsausschluss-Verfahrens. Der Einfluss patientenspezifischer Kovariaten auf die Pharmakokinetik von Busulfan und seinem Metaboliten Sulfolan (III) wurde mithilfe nicht-linearer Regression unter Berücksichtigung gemischter Effekte mit NONMEM® untersucht. Die statistische Auswertung der Kovariaten-Beziehungen erfolgte Anwendung der SCM-Methode. Die Modellevaluierung erfolgte mithilfe prediction-corrected visual predictive checks (pcVPC), um die Vorhersagegenauigkeit zu prüfen. Die Sampling-Importance-Resampling-Methode (SIR) wurde genutzt um die Präzision der abgeschätzten Modellparameter zu bestimmen.

Ergebnisse

Hinsichtlich der Robustheit des TDM unter Verwendung bayesscher Methoden von Busulfan (I) wurden nennenswerte Abweichung von der geschätzten AUC erst bei Abweichungen in der Dokumentation von ± 30 min festgestellt (1,60 % für Q24H und 2,19 % für Q6H bei 1CMT). Die berechneten rPEs und rRmse für Q6H deuten im Vergleich zu Q24H auf ein etwas geringeres Maß an Genauigkeit und Präzision hin. Die Streuung der rPEs und rRmse für das 2CMT-Modell war breiter und höher im Vergleich zu Schätzungen auf Grundlage eines 1CMT-Modells.

Bei Patienten, die Deferasirox erhielten (II), wurde im Median eine Dosisanpassung von -17,1 % (-50,0 %–18,2 %) vorgenommen. Nach der Dosisanpassung betrug die mediane AUC 79,7 mg × h/L (62,5–84,2 mg × h/L). Die mediane Busulfan-Clearance betrug 0,134 L/h/kg (0,084–0,203 L/h/kg).

Das PopPK-Modell für Patienten mit Myelofibrose (III) ergab eine Populations-Clearance (CL) und ein Verteilungsvolumen (Vd) von 0,217 L/h/kg und 0,82 L/kg für Busulfan und 0,021 L/h/kg und 0,65 L/kg für Sulfolan. Das Körpergewicht (TBW) und ein Einzelnukleotid-Polymorphismus der Glutathion-S-Transferase A1 (GSTA1 SNP) hatten einen signifikanten Einfluss auf das Verteilungsvolumen bzw. die Clearance des Metaboliten.

Schlussfolgerung

Es konnte gezeigt werden, dass das TDM von Busulfan unter Verwendung bayesscher Methoden robust gegenüber Dokumentationsfehlern ist, und mit einer geringen Anzahl an Blutspiegeln durchgeführt werden kann.

Im Hinblick auf pharmakokinetische Wechselwirkungen von Busulfan wurde nachgewiesen, dass die gleichzeitige Behandlung mit Deferasirox aufgrund einer verringerten Clearance zu einer signifikanten Erhöhung der Busulfan-Exposition führt.

Zudem wurde im Rahmen dieser Arbeit das erste PopPK-Modell zur Beschreibung der Pharmakokinetik von Busulfan bei Patienten mit Myelofibrose entwickelt. Als bedeutsamste Kovariate wurde das TBW ermittelt. Die Einbeziehung des Metaboliten Sulfolan in das Modell ermöglichte nicht nur die Charakterisierung der Kovariatenbeziehung zwischen GSTA1 und der Clearance des Metaboliten, sondern ergab auch eine hohe IIV für CL_{Su} .

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegende Arbeit zu einem besseren Verständnis der oftmals beobachteten Variabilität der Busulfan-PK beiträgt und folglich die Arzneimitteltherapiesicherheit für Patienten, die eine Busulfan-basierte Konditionierungstherapie vor allo-HSZT durchlaufen, verbessert.

5 Summary

Background

In allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), busulfan-based conditioning regimens are commonly used for adult and pediatric patients. A high inter-patient variability in drug exposure, even after intravenous application, makes individual dose selection challenging and therefore using therapeutic drug monitoring (TDM) is advisable in order to ensure that drug exposure is maintained within the narrow therapeutic range.

There are numerous potential reasons for a high IIV in observed drug-exposure. One could be as simple as the inaccurate documentation of sampling and infusion times. In clinical practice, planned times rather than the actual times for sampling and infusion rate are often documented, without being fully aware of what these deviations might implicate for AUC estimation. However, there is no data regarding the impact of erroneous records on TDM of busulfan.

However, the pharmacokinetic variability of busulfan is most often due to drug-drug interactions or physiological deviations in metabolism. For instance, known clinically relevant drug-drug interactions with busulfan exist with acetaminophen, metronidazole, azoles, or phenytoin resulting in supratherapeutic or subtherapeutic exposures. Furthermore, there are case reports about reduced busulfan clearance with simultaneous administration of deferasirox. However, no clinical or pharmacokinetic studies at larger cohorts to confirm this drug-drug interaction between deferasirox and busulfan have been performed yet.

Further deviations in busulfan-metabolism may be due to disease-related physiological changes. Myelofibrosis is characterized by a cytokine-mediated fibrosis of the bone marrow, which leads to extramedullary hematopoiesis in the liver and spleen and consequently results in an elevated risk of hepatotoxicity and impaired liver function. Thus, PK parameters of busulfan might additionally be affected. However, data describing the pharmacokinetic variability of busulfan prior to allo-HSCT in patients with myelofibrosis are sparse.

Therefore, the aim of the presented studies was to investigate the pharmacokinetics of busulfan as part of conditioning therapy prior to allo-HSCT by:

- I. Evaluating the robustness of a limited sampling TDM coupled with Bayesian forecasting of busulfan with regard to inaccurate documentation of sampling and infusion times.
- II. Investigating the influence of deferasirox on busulfan pharmacokinetics during myeloablative busulfan based conditioning.
- III. Developing a PopPK model of busulfan and its metabolite sulfolane by examining known and determining new patient-specific covariates to explain busulfan's inter-individual variability in patients with myelofibrosis.

Methods

Data were obtained from an in-silico study (I) and two separate monocentric, prospective, non-interventional observational studies.

To evaluate the robustness of a limited sampling TDM of busulfan with regard to inaccurate documentation (I), a pharmacometric analysis was conducted in NONMEM[®] 7.4.3 and "R" by performing stochastic simulation and estimation with four, two and one sample(s) per patient on the basis of a one-compartment- (1CMT) and two-compartment (2CMT) population pharmacokinetic model. The dosing regimens consisted of i.v. busulfan (0.8 mg/kg) every 6 h (Q6H) or 3.2 mg/kg every 24 h (Q24H) with a 2 h- and 3 h infusion time, respectively. The relative prediction error (rPE) and relative root-mean-square error (rRmse) were calculated in order to determine the accuracy and precision of the individual AUC estimation.

To investigate the influence of deferasirox on the pharmacokinetics of busulfan (II), a TDM of busulfan was performed in patients receiving deferasirox 14 mg/kg/day as part of MAC before allo-HSCT due to iron overload. Based on four blood levels, dose adjustments were made after TDM when the calculated AUC was not within the target range of 10% of the target AUC of 80 mg × h/L.

The influence of patient-specific covariates on the pharmacokinetics of busulfan and its metabolite sulfolane (III) was assessed using non-linear mixed effects modeling in NONMEM[®].

Statistical evaluation of covariate relationships was carried out by a stepwise covariate modeling approach. Model evaluation was performed by using a prediction-corrected visual predictive check (pcVPC) as well as the sampling-importance resampling (SIR) method.

Results

Regarding the robustness of TDM coupled with Bayesian forecasting of busulfan (I) it was found that a noticeable impact on the estimated AUC based on a 1CMT-model was only observed if uncertain documentation reached an SD of ± 30 min (1.60% for Q24H and 2.19% for Q6H). Calculated rPEs and rRmse for Q6H indicate a slightly lower level of accuracy and precision when compared to Q24H. Spread of rPE's and rRmse for the 2CMT-model were wider and higher compared to estimations based on a 1CMT-model.

For patients who received deferasirox (II), median dose adjustment was -17.1% (-50.0%–18.2%). After dose adjustment, the median AUC was 79.7 mg \times h/L (62.5–84.2 mg \times h/L). Median busulfan clearance was 0.134 L/h/kg (0.084–0.203 L/h/kg).

The PopPK-model for patients with myelofibrosis (III) showed a population clearance (CL) and volume of distribution (Vd) of 0.217 L/h/kg and 0.82 L/kg for busulfan and 0.021 L/h/kg and 0.65 L/kg for its metabolite. Total body weight (TBW) and a single-nucleotide polymorphism of glutathione-S-transferase A1 (GSTA1 SNP) displayed a significant impact on volume of distribution and metabolite clearance, respectively.

Conclusion

It was shown that the TDM of busulfan coupled with Bayesian forecasting is robust against inaccuracies in documentation and can be performed with a small number of samples.

Regarding pharmacokinetic interactions of busulfan, it has been demonstrated that concomitant treatment with deferasirox leads to a significant increase in busulfan exposure due to a decreased clearance.

Furthermore, the first PopPK model describing the pharmacokinetics of busulfan in patients with myelofibrosis was developed as part of this work. TBW was determined to be the most significant covariate. Inclusion of the metabolite sulfolane in the model not only allowed to

characterize the covariate relationship between GSTA1 and the clearance of the metabolite, but also revealed a high IIV for CL_{Su} .

In conclusion, the present work contributes to a better understanding of the high inter-individually observed variability of busulfan PK and consequently improves drug therapy safety for patients undergoing busulfan-based conditioning therapy prior to allo-HSCT.

6 Erklärung des Eigenanteils an den Publikationen

Ich habe die Doktorarbeit in der Klinikapotheke des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf im Rahmen des PhD-Programms für Nicht-Mediziner, unter der Betreuung von Frau PD Dr. Claudia Langebrake durchgeführt. Die Konzeption der Studienidee sowie der erste Studienentwurf wurden von Frau PD Dr. Claudia Langebrake und mir gemeinsam entwickelt. An der Weiterentwicklung bis zum fertigen Studienentwurf haben zusätzlich noch meine beiden weiteren Betreuer Herr Prof. Dr. Sebastian Wicha und Herr Prof. Dr. Nicolaus Kröger mitgewirkt. Die pharmakometrische Analyse mittels SSE-Studie zur Beurteilung der Robustheit des TDM von Busulfan (Publikation I), sowie die Entwicklung des PopPK-Modells von Busulfan und seines Metaboliten Sulfolan für Patienten mit Myelofibrose (Publikation III) wurden durch mich durchgeführt. Die Quantifizierung von Busulfan erfolgte im Institut für Rechtsmedizin des UKE. Die Methodvalidierung und Quantifizierung von Sulfolan sowie die Analyse der GST-Polymorphismen wurden durch mich durchgeführt. Die Datenerhebung, sowie die statistische Analyse zur Untersuchung des Einflusses von Deferasirox auf die Pharmakokinetik von Busulfan (Publikation II) erfolgte durch Frau Dr. med. Sonja Essmann. Die für die Publikation II erforderlichen pharmakokinetischen Berechnungen erfolgten durch Frau PD Dr. Claudia Langebrake und mich. Die Manuskripte sowie die verwendeten Abbildungen und Tabellen für die eingeschlossenen Publikationen I und III wurden durch mich und für die Publikation II von Frau PD Dr. Langebrake verfasst. Ebenfalls wurde die zusammenfassende Darstellung der Publikationen im Rahmen der Synopse durch mich erstellt.

7 Danksagung

Ich habe das große Glück während meiner Promotionszeit von einer Vielzahl unterstützender Personen begleitet worden zu sein, denen ich an dieser Stelle meinen großen Dank aussprechen möchte.

Dieser gilt allen voran meiner Doktormutter Frau PD Dr. Claudia Langebrake. Vielen Dank nicht nur für das Bereitstellen des sehr spannenden Themas und die hervorragende Betreuung. Vielen Dank vor allem für die vielen fachlich wertvollen Diskussionen, konstruktiven Ideen und das Hervorbringen meiner Begeisterung am Forschen und dem wissenschaftlichen Arbeiten. Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Sebastian G. Wicha für die intensive Betreuung, das Heranführen an das höchst interessante Feld der Pharmakometrie und vor allem für die Offenheit und ansteckende Art neue Fragestellungen anzugehen.

Ebenfalls möchte ich Herrn Prof. Dr. Nicolaus Kröger für den fachlichen Input, das Ermöglichen der Studie und dadurch den gewährten Einblick in das spannende Fach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation danken.

Herrn Dr. Michael Baehr danke ich herzlichst für das Ermöglichen meines Promotionsvorhabens und die ständige Förderung.

Den (ehemaligen) ärztlichen Kolleginnen und Kollegen der Klinik für Stammzelltransplantation, insbesondere Frau Dr. med. Sonja Essmann, möchte ich für das Identifizieren und Rekrutieren der Studienpatienten danken. Ebenfalls danke ich den pflegerischen Kolleginnen und Kollegen für die vielen erfolgten Blutentnahmen und Dokumentation.

Stellvertretend für das Institut für Rechtsmedizin danke ich Herrn Dr. Alexander Müller für die zuverlässige Quantifizierung von Busulfan aus den Studienproben.

Frau Anita Badbaran und Herrn Prof. Dr. Boris Fehse danke ich für die Unterstützung beim Bestimmen der Polymorphismen.

Frau Dr. Maria Riedner und Herrn Christoph Pfaffendorf danke ich für den Einsatz beim Etablieren der bioanalytischen Methode zum Quantifizieren von Sulfolan.

Vielen Dank an meine Mitdoktoranden der Klinikapotheke und des AK Wicha für die vielen hilfreichen Gespräche und Tipps, wenn es mal irgendwo gehakt hat.

Für das kritische Lesen des Manuskripts und die hilfreichen Anmerkungen und Vorschläge danke ich Caro, Jackie und Maria.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern Ardashir und Molok, Damun und Julia danken. Eure Liebe, bedingungslose Unterstützung und die Freude über jeden erfolgten Schritt haben mich motiviert und bestärkt. Danke.

8 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: