



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia

Estudi de Doctorat en Farmacologia, UAB

**OPTIMIZACIÓN MEDIANTE ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO DEL
TRATAMIENTO DE BUSULFÁN EN DOS POBLACIONES ESPECÍFICAS
DE PACIENTES ONCO-HEMATOLÓGICOS**

Tesis doctoral presentada por:

Ana Clopés Estela

Tesis doctoral dirigida por:

M^a Antònia Mangues Bafalluy

Jordi Sierra Gil

Dolors Soy Muner

Tesis doctoral tutorizada por

Marta Valle Cano

Barcelona, Noviembre 2015



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia

Estudi de Doctorat en Farmacologia, UAB

M^a Antònia Mangués Bafalluy, Jordi Sierra Gil y Dolors Soy Muner, en calidad de Directores de la tesis doctoral y Marta Valle Cano en calidad de Tutora de la tesis doctoral cuyo título es *OPTIMIZACIÓN MEDIANTE ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO DEL TRATAMIENTO DE BUSULFÁN EN DOS POBLACIONES ESPECÍFICAS DE PACIENTES ONCO-HEMATOLÓGICOS* realizada por la Licenciada en Farmacia Ana Clopés Estela, consideran concluido el trabajo y autorizan su presentación a fin de poder ser evaluado por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, firman la presente en Barcelona a 30 de noviembre de 2015

Fdo: M^a Antònia Mangués Bafalluy

Fdo: Jordi Sierra Gil

Fdo: Dolors Soy Muner

Fdo: Marta Valle Cano

Fdo: Ana Clopés Estela

A Juan, Joan y Martí

A Ramón y Asunción

No basta saber, se debe también aplicar.

No es suficiente querer, se debe también hacer.

Johann Wolfgang Goethe

AGRADECIMIENTOS

Desearía empezar la memoria del presente trabajo de investigación mostrando mi agradecimiento por todos aquellos que dedican sus esfuerzos a disminuir el impacto del cáncer en nuestra sociedad. Este trabajo desea humildemente ser uno más de los granos de arena con los que estamos construyendo un presente y un futuro mejor. Por ello gracias a todos los profesionales que trabajan en la asistencia y investigación del cáncer. Y en especial a mis compañeros de los hospitales en los que he trabajado en mi carrera profesional y el hospital dónde me formé y he desarrollado este trabajo, el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, y el hospital en el que he podido aplicar también los conocimientos generados, el Institut Català d'Oncologia. A mis compañeros de los servicios de farmacia de ambas instituciones, por lo que he aprendido, aprendo y aprenderé de ellos, tanto científicamente como humanamente, y con los que hemos crecido y creceremos en esta profesión, gracias.

A mis directores de tesis, que me han aportado sus conocimientos y sus valores. A M^a Antònia por su orientación de la práctica asistencial al paciente y sus ánimos en el proyecto en toda su larga trayectoria, a Jordi por sus facilidades y de su equipo en ver un proyecto hecho realidad, a Dolors por su optimismo mezclado con perfeccionismo y generosidad. Gracias a los tres.

A Candela por su apoyo en la decisión final de presentar la tesis, cuando se me hacía más difícil y ella me ayudo en la decisión, gracias.

A mi familia, Juan, Joan y Martí, por darme vuestras horas sin preguntar, por apoyarme y mucho más. A mis padres, por su ejemplo de vida, a mis hermanos, especialmente Asunción y Oscar, porque saben que la introducción va especialmente dedicada.

Y finalmente mi agradecimiento a los pacientes, por los que este esfuerzo y el de muchos, de aplicar la frase de JW Goethe, de aplicar lo sabido y hacer lo debido, tiene su sentido en su mejora presente y futura, gracias.

ÍNDICE

1. Introducción

- 1.1. Descripción del medicamento
- 1.2. Utilización clínica de busulfán en regímenes de acondicionamiento para trasplante de progenitores hematopoyéticos
 - 1.2.1. Contexto de busulfán en los regímenes de acondicionamiento para trasplante de progenitores hematopoyéticos
 - 1.2.2. Busulfán en regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida
 - 1.2.3. Busulfán en regímenes de intensificación y posterior trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos
- 1.3. Aspectos farmacológicos
 - 1.3.1. Grupo terapéutico
 - 1.3.2. Mecanismo de acción
 - 1.3.3. Actividad antitumoral
 - 1.3.4. Aspectos farmacocinéticos
 - a) Absorción
 - b) Distribución
 - c) Metabolismo y excreción
 - d) Comparativa farmacocinética de busulfán oral vs IV
 - 1.3.5. Aspectos farmacogenéticos. Polimorfismos
 - 1.3.6. Farmacocinética poblacional de busulfán
 - a) Introducción a los principios de la farmacocinética poblacional

- b) Estudios farmacocinéticos poblacionales
- c) Revisión bibliográfica de farmacocinética poblacional de busulfán

- 1.4. Interacciones medicamentosas
- 1.5. Efectos adversos
 - 1.5.1. Toxicidad hematológica
 - 1.5.2. Toxicidad gastrointestinal
 - 1.5.3. Enfermedad veno-oclusiva hepática (EVOH)
 - 1.5.4. Toxicidad neurológica
 - 1.5.5. Toxicidad pulmonar
 - 1.5.6. Toxicidad genitourinaria
 - 1.5.7. Toxicidad endocrina
 - 1.5.8. Otras toxicidades
 - 1.5.9. Teratogenicidad y efectos en el embarazo y lactancia
- 1.6. Relación entre la farmacocinética y la farmacodinamia de busulfán
 - 1.6.1. Relación entre exposición a busulfán y toxicidad
 - a) Relación entre exposición a busulfán y EVOH
 - b) Relación entre otras toxicidades y exposición a busulfán
 - 1.6.2. Relación entre la exposición a busulfán y eficacia
- 1.7. Justificación de la investigación

2. Hipótesis

3. Objetivos del trabajo de investigación

4. Material y métodos

- 4.1. Pacientes
 - 4.1.1. Población adulta con mieloma múltiple que reciben busulfán asociado a melfalán en regímenes de intensificación y posterior trasplante de progenitores hematopoyéticos

- 4.1.2. Población adulta que recibe busulfán asociado a fludarabina en un contexto de régimen de acondicionamiento de intensidad reducida
- 4.2. Determinación de concentraciones plasmáticas de busulfán
- 4.3. Metodología analítica de busulfán
- 4.4. Estudio farmacocinético individual y diseño posológico
- 4.5. Factores de variabilidad
- 4.6. Evaluación de toxicidad
- 4.7. Evaluación de efectividad
- 4.8. Estrategia estadística para estudiar la caracterización farmacocinética individual y el análisis de la toxicidad y efectividad del tratamiento y su relación con la exposición a busulfán
- 4.9. Modelo farmacocinético poblacional

5. Resultados

- 5.1. Sub-estudio Población adulta con mieloma múltiple (MM) que recibe busulfán asociado a melfalán en regímenes de intensificación y posterior trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos
 - 5.1.1. Caracterización farmacocinética individual de cada paciente a través de un método de regresión no lineal
 - 5.1.2. Análisis de la toxicidad y la efectividad del tratamiento y su relación con la exposición a busulfán
 - 5.1.3. Caracterización del comportamiento farmacocinético poblacional de busulfán, identificando y cuantificando la variabilidad observada, y validación del modelo farmacocinético poblacional desarrollado en un nuevo grupo de pacientes

- 5.2. Sub-estudio Población adulta que recibe busulfán asociado a fludarabina en un contexto de régimen de acondicionamiento para un trasplante de intensidad reducida (AloTIR)
 - 5.2.1. Caracterización farmacocinética individual de cada paciente a través de un método de regresión no lineal
 - 5.2.2. Análisis de la toxicidad y la efectividad del tratamiento y su relación con la exposición a busulfán
 - 5.2.3. Caracterización del comportamiento farmacocinético poblacional de busulfán, identificando y cuantificando la variabilidad observada, y validación del modelo farmacocinético poblacional desarrollado en un nuevo grupo de pacientes

6. Discusión

- 6.1. Análisis de la validez interna y limitaciones del diseño
- 6.2. Comparación de los resultados con otros estudios publicados
- 6.3. Identificación de necesidades futuras de investigación
- 6.4. Análisis de la utilidad práctica de los resultados y propuesta de actuación

7. Conclusiones

8. Bibliografía

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Artículos publicados en que se describe el comportamiento farmacocinético de busulfán administrado por vía oral en pacientes adultos.

Tabla 2. Artículos publicados en que se describe el comportamiento farmacocinético de busulfán administrado por vía oral en pacientes pediátricos.

Tabla 3. Artículos publicados en que se describe el comportamiento farmacocinético de busulfán administrado por vía intravenosa.

Tabla 4. Características farmacocinéticas comparadas entre busulfán oral y IV en el ensayo clínico fase I de Busilvex®.

Tabla 5. Características farmacocinéticas comparadas entre busulfán oral y IV en los ensayos clínicos fase II de Busilvex® y el recalcu realizado por FDA y presentado en su informe de evaluación.

Tabla 6. Estudios publicados de farmacocinética poblacional de busulfán en acondicionamiento de TPH en adultos

Tabla 7. Análisis de los factores de riesgo de desarrollo de EVOH en el estudio de McDonald y cols (análisis de regresión logístico).

Tabla 8. Incidencia de EVOH descrita en diferentes estudios que incluían busulfán en el régimen de acondicionamiento

Tabla 9. Análisis de los factores de riesgo de desarrollo de EVOH en el estudio de Meresse y cols (análisis de regresión logístico) .

Tabla 10. Comparativa de incidencia de efectos adversos observados en ensayo clínico OMC-BUS-3 y bibliografía de busulfán oral (fuente FDA. Medical Review. NDA Reviews).

Tabla 11. Comparativa de incidencia de efectos adversos observados en ensayo clínico OMC-BUS-4 y bibliografía de busulfán oral (fuente FDA. Medical Review. NDA Reviews).

Tabla 12. Estudios que analizan la relación entre exposición a busulfán oral y incidencia de EVOH

Tabla 13. Estudios que analizan la relación entre exposición a busulfán IV y incidencia de EVOH

Tabla 14. Estudios que comparan la relación entre exposición a busulfán oral y IV y incidencia de EVOH

Tabla 15. Estudios que analizan la relación entre exposición a busulfán y fallo de implante.

Sub-estudio Población MM

Tabla 16. Características al diagnóstico y al trasplante de los pacientes con mieloma múltiple (n=44).

Tabla 17. Parámetros farmacocinéticos individuales de busulfán estimados tras la primera dosis de 0.75mg/kg (n= 44).

Tabla 18. Toxicidades extrahematológicas grado \geq II tras el trasplante (n=44).

Tabla 19. Reconstitución hematológica y el tiempo de hospitalización tras trasplante.

Tabla 20. Estimación de los parámetros farmacocinéticos poblacionales del modelo final

Tabla 21. Datos de la validación interna por bootstrapping

Tabla 22. Características de los pacientes y de las concentraciones plasmáticas de busulfán de las poblaciones del grupo referencia (n=23) y del grupo validación (n=21).

Sub-estudio población AloTIR

Tabla 23 . Características de los pacientes (n=32).

Tabla 24. Parámetros farmacocinéticos de busulfán estimados tras la primera dosis de 1mg/kg (n= 32).

Tabla 25. Distribución de pacientes según margen terapéutico tras la primera dosis

Tabla 26. Dosis total media recibida tras las 10 administraciones.

Tabla 27. Toxicidades extrahematológicas grado \geq II tras el trasplante (n=32).

Tabla 28. Reconstitución hematológica y el tiempo de hospitalización tras trasplante (en días) (n=32)

Tabla 29. incidencia de enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), tanto aguda (EICHa) como crónica (EICHc) (n=32).

Tabla 30. Supervivencia global y la tasa de recaída de la enfermedad de base

Tabla 31. Estimación de los parámetros farmacocinéticos poblacionales del modelo final

Tabla 32. Datos de la validación interna por bootstrapping

Tabla 33. Características clínicas y demográficas de los pacientes incluidos en la construcción del modelo (grupo referencia, n=31) y en la validación del mismo (grupo validación, n=16).

ÍNDICE FIGURAS

Sub-estudio Población MM

Figura 1. Comparación entre la concentración plasmática observada tras la dosis 15 y la C_{ss} individual para cada paciente ($n=27$) ($r^2=0.753$; $p<0.01$).

Figura 2. Relación entre la edad y exposición expresada como el área bajo la curva de concentraciones plasmáticas en el estado de equilibrio estacionario (AUC_{ss}) estimada tras la primera dosis de 0.75mg/kg ($n=44$) ($r^2=0.3510$; $p<0.05$).

Figura 3. Relación entre gravedad de la mucositis y concentraciones en equilibrio estacionario (C_{ss}) de busulfán ($n=44$) ($r_s=0.387$; $p<0.01$).

Figura 4. Gráfica de bondad de ajuste para el modelo poblacional final. Se incluye gráfica de acuerdo entre concentraciones plasmáticas observadas vs predichas y gráfico de predicciones vs residuales y residuales condicionales.

Figura 5. Evaluación del modelo final: comparación entre los percentiles 5^o, 50^o (línea marcada) y 95 de las simulaciones para paciente representativo,

Figura 6. Box-plots del porcentaje de error (PE-pred: para concentraciones estimadas poblacionales; PE-ipred: para concentraciones estimadas individuales (MAP Bayesian)) y error absoluto de predicción (APE-pred: para concentraciones estimadas poblacionales; APE-ipred: para concentraciones estimadas individuales (MAP Bayesian)) de los datos del grupo validación.

Sub-estudio población AloTIR

Figura 7. Comparación entre la concentración plasmática observada tras la dosis 9 y la C_{ss} individual para cada paciente ($n=20$) ($r^2=0.7013$; $p<0.01$).

Figura 8. Gráfica de bondad de ajuste para el modelo poblacional final. Se incluye gráfica de acuerdo entre concentraciones plasmáticas observadas vs predichas y gráfico de predicciones vs residuales y residuales condicionales.

Figura 9. Evaluación del modelo final: comparación entre los percentiles 5^o, 50^o (línea marcada) y 95 de las simulaciones para el paciente representativo,

Figura 10. Box-plots del porcentaje de error (PE-pred: para concentraciones estimadas poblacionales; PE-ipred: para concentraciones estimadas individuales (MAP Bayesian)) y error absoluto de predicción

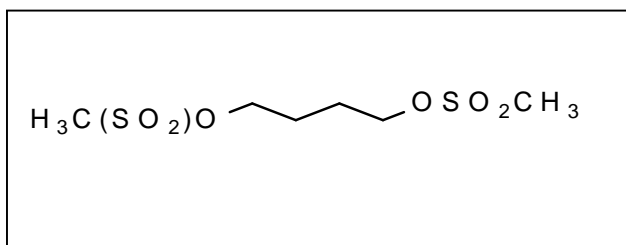
1.INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción del medicamento

Busulfán es un agente alquilante conocido químicamente como 1,4-butanediol dimetanosulfonato, cuya molécula consiste en dos grupos metanosulfato unidos a una cadena de 4 alquiles (Figura 1). Busulfán no es una estructura análoga de las mostazas nitrogenadas.

Estructura química de busulfán



Su peso molecular es 246,32 y presenta una muy baja solubilidad en agua.

En la actualidad está comercializado en nuestro país en dos presentaciones:

a. Comprimidos 2 mg (Busulfán GSK®)

Excipientes: Estearato magnésico, cloruro sódico

Laboratorio: Glaxo Smithkline

b. Ampolla 60mg 10ml solución (Busilvex®)

Excipientes: polietilenglicol (PEG400), dimetilacetamida (DMA)

Laboratorio: Pierre Fabre.

1.2. Utilización clínica de busulfán en regímenes de acondicionamiento para trasplante de progenitores hematopoyéticos

1.2.1. Contexto de busulfán en los regímenes de acondicionamiento para trasplante de progenitores hematopoyéticos

La función de los fármacos utilizados como acondicionamiento de trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) es ejercer su función antitumoral y en el caso de trasplantes alogénicos, generar inmunosupresión suficiente que permita el implante en el paciente. Al inicio de la realización de TPH en el tratamiento de las enfermedades malignas, se administraban agentes alquilantes, asociados o no a irradiación corporal total (ICT o ~~%~~total body irradiation), a dosis mieloablativas para conseguir ambos efectos. El busulfán originariamente había sido un fármaco utilizado para el tratamiento de la LMC, pero se empezó a utilizar en TPH para sustituir la ICT en regímenes mieloablativos con el objetivo de limitar las toxicidades de la ICT, especialmente el retraso del crecimiento en niños^{1, 2, 3}. En la última década se ha comercializado una presentación de busulfán de administración intravenosa (IV). Ante ello se han adaptado esquemas de administración con dicha formulación^{4, 5}.

1.2.2. Busulfán en regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida

El trasplante alogénico es actualmente el tratamiento estándar de consolidación de la respuesta en pacientes con neoplasias mieloides agudas, incluyendo síndromes mielodisplásicos y leucemia mieloide aguda. Los protocolos mieloablativos convencionales constaban de la combinación de ciclofosfamida y irradiación corporal total (TBI) o busulfán oral, asociados con mortalidad relacionada con el procedimiento (TRM) a los 100 días entre 10 y 40%. En el caso de pacientes mayores y con morbilidades estos regímenes de acondicionamiento mieloablativo convencional son intolerablemente tóxicos⁶. La introducción de regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida (AloTIR) ha permitido mantener en estos pacientes el beneficio del efecto antitumoral del injerto contra la leucemia (ICL) y simultáneamente disminuir la mortalidad tóxica⁷.

El efecto antitumoral del injerto contra la enfermedad (ICL) o efecto $\% \text{graft-versus-leukemia+}$ (GVL) fue identificado inicialmente por Horowitz⁸ y posteriormente confirmado por los resultados de las infusiones de leucocitos del donante en pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) y otras enfermedades hematológicas malignas que habían recaído tras el trasplante^{9, 10}. Ante estos datos, diferentes grupos de trabajo han desarrollado regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida^{11, 12, 13, 14, 15, 16}. El primer protocolo con la combinación de fludarabina (Flu) y busulfán (Bu) fue publicado por Slavin et al¹³, en que utilizaban dosis de Flu de 180mg/m² combinado con Bu 8mg/kg y inmunoglobulina antitimocítica, aunque posteriormente se ha publicado estudios que indican que esta inmunoglobulina no sería esencial para conseguir el implante estable¹⁷. En nuestro entorno, los resultados de un estudio prospectivo realizado en varios centros del grupo español de trasplante hematopoyético (GETH) indican que el AtoTIR en pacientes con LMA y SMD tiene una mortalidad relacionada con el trasplante reducida, sin observarse fallo de implante, induciendo un quimerismo completo precoz en la mayoría de casos, y consiguiendo una supervivencia libre de enfermedad del 67% al año^{18, 19}. El protocolo ensayado en estos estudios prospectivos consistente en busulfán (dosis total 10mg/kg) y fludarabina (150mg/m² dosis total), se ha establecido como el estándar asistencial de acondicionamiento para AtoTIR en pacientes con neoplasias mieloides en nuestro medio, e incluye fludarabina IV y busulfán VO (Protocolos *LAM-AIR03* y *CETLAM-2003*).

1.2.3. Busulfán en regímenes de intensificación y posterior trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

El mieloma múltiple (MM) es el prototipo de gammapatía monoclonal maligna y se caracteriza por la proliferación de células de estirpe linfoide B situadas en el último estadio madurativo-células plasmáticas. El MM constituye la neoplasia de células plasmáticas más frecuente, con una incidencia de 3 a 5 casos nuevos por cada 100.000 habitantes y año, representando el 1% de todas las neoplasias y alrededor del 10% de las hemopatías malignas²⁰. Es una enfermedad del adulto, con una incidencia máxima en la década de los

60-70 años. Sólo un 15% de los pacientes tienen menos de 50 años en el momento del diagnóstico, y esta incidencia baja al 2% por debajo de los 40 años, siendo excepcional (0,3% de los casos) en sujetos menores de 30 años. En general, no se encuentran diferencias significativas de incidencia en cuanto a su distribución por sexos.

Antes de disponer de los agentes alquilantes, la mediana de supervivencia de los pacientes con MM era inferior a un año. La introducción del melfalán representó el primer avance en el tratamiento de esta enfermedad. Con el empleo de melfalán, bien aislado o bien combinado con corticoides, la proporción de respuestas se situó alrededor del 50% y la mediana de supervivencia desde el inicio del tratamiento oscila entre 2 a 3 años. Estos resultados se han intentado mejorar utilizando combinaciones de diferentes citostáticos con melfalán, como por ejemplo ciclofosfamida, vincristina o adiramicina. Con estas poliquimioterapias se consiguió un incremento de las tasas de respuesta objetivas pero en general no se consigue una prolongación significativa de la supervivencia comparada con el tratamiento con melfalán y corticoides. En este contexto se han introducido recientemente fármacos con nuevos mecanismos de acción, como son talidomida, lenalidomida y bortezomib y sus combinaciones con corticoides, como VTD.

La limitada eficacia del tratamiento convencional con citostáticos ha hecho que se investiguen tratamientos más intensivos que incluyan quimioterapia a dosis elevada seguida de rescate con progenitores hematopoyéticos. Tanto en el caso del trasplante alogénico como del singénico, las limitaciones de disponibilidad de donante y las limitaciones de edad, hacen que este tipo de trasplantes sean sólo aplicables a una minoría de pacientes con MM. El trasplante autólogo a partir de progenitores obtenidos de sangre periférica se puede aplicar a un mayor número de pacientes ya que no se precisa donante y la edad se puede ampliar hasta 70 años. Con este tipo de trasplante se consiguen tasas de respuesta de hasta 80%, y lo que es más importante, un 25-40% de remisiones completas demostradas por inmunofijación. Por otra parte la mortalidad relacionada con el procedimiento es inferior al 3%. Los pacientes primariamente resistentes al tratamiento quimioterápico convencional son los que más se pueden beneficiar de un autotrasplante mientras que el paciente los pacientes con enfermedad progresiva y

sintomática bajo el tratamiento quimioterápico convencional la eficacia del trasplante es cuestionable. En pacientes en recaída resistentes, el tratamiento intensivo produce una elevada tasas de respuesta pero la duración de esta respuesta es corta además con una alta toxicidad relacionada con el procedimiento, por esta razón se desaconseja en autotrasplante en esta situación.

Los esquemas de acondicionamiento más empleados en el trasplante en MM son melfalán en monoterapia, melfalán asociado a ICT, la combinación de ciclofosfamida, etopósido y carmustina. La combinación de dos agents alquilantes, busulfán y melfalán, ha demostrado una superioridad marginal respecto a otros protocolos de acondicionamiento en términos de respuesta completa tras el trasplante, según publicó el Grupo Español de Mieloma²¹. Pero posteriormente, este mismo grupo en una población que recibieron esta combinación sin individualización posológica de busulfán, observaron una incidencia de EVOH de 7,6%²², tras lo cual decidieron cambiar a melfalán en monoterapia.

1.3. Aspectos farmacológicos

1.3.1 Grupo terapéutico ATC:

L01AB01

1.3.2. Mecanismo de acción

La reacción primaria a nivel molecular de la actividad del busulfán se considera que se produce con la liberación de los grupos metanosulfonato, las proteínas y, de manera más importante, porque las bases nucleicas que son alquiladas, en particular en la posición N de la guanina, pero también en otras posiciones del DNA. Consecuentemente se forman puentes inter e intracatenarios en la doble hélice del DNA, provocando interferencias importantes en los procesos de transcripción y replicación de este DNA.

El busulfán, de igual manera que otros fármacos alquilantes, se ha definido clásicamente como de acción en cualquier fase del ciclo celular. Pese a ello diferentes estudios han mostrado que las células se veían afectadas de diferentes manera según el momento del ciclo celular. Por ejemplo en el estudio de Wheeler las células eran más sensibles en la fase G1 final y la progresión del ciclo celular se bloqueaba en la fase G2²³.

En estudios in vitro, el busulfán induce la muerte celular, pero con resultados contradictorios en el proceso sufrido en el mecanismo. Según el experimento de Ijiri y col²⁴ en células de intestino delgado de ratón y den líneas de células B malignas, busulfán induciría la apoptosis. Pero según el trabajo de Thiele²⁵ realizado con biopsias de pacientes tratados con busulfán por LMC, no se detectan incrementos de la actividad apoptótica.

Hassan y cols²⁶ estudiaron los efectos farmacodinámicos de busulfán in vitro en un modelo en líneas celulares, con el objetivo de evaluar el efecto de varias dosis y tiempos de exposición en la capacidad clonogénica, la proliferación y la apoptosis. Las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de busulfán (rango de 10 a 100 g/ml), se estimaron las áreas bajo la curva (AUC) para las diferentes concentraciones y tiempos de incubación. Se observó que

en todos los casos el busulfán afectaba a las células de una manera AUC-dependiente. Así la disminución en la capacidad de proliferación y clonogenicidad procedía de una afectación del ciclo celular en la fase G2 y en el desarrollo de apoptosis. Bioquímicamente, los cambios apoptóticos fueron los típicos inducidos por la quimioterapia, con activación de las caspasas. Clínicamente, se considera que el busulfán es más citotóxico en los tejidos de rápida proliferación y, en particular, en las células de la serie blanca de la médula ósea.

1.3.3. Actividad antitumoral

La primera descripción de la actividad de busulfán en leucemia mieloide crónica fue realizada por Galton²⁷, aunque había ausencia de actividad en leucemias linfocíticas, tanto agudas como crónicas. Esta fue la indicación inicial de este fármaco y en la que se ha empleado más en dosis convencionales, que en tumores sólidos donde no presentan actividad. El busulfán a dosis altas, principalmente asociado a ciclofosfamida, se utiliza como régimen de preparación a trasplante de progenitores hematopoyéticos en leucemias, linfomas y tumores pediátricos sólidos avanzados (ver apartado 1.2.).

1.3.4. Aspectos farmacocinéticos

El comportamiento farmacocinético de busulfán utilizado en dosis altas como acondicionamiento para trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) ha sido extensamente estudiado y descrito en numerosos artículos científicos, tanto del comportamiento del fármaco administrado **oralmente** (Tabla 1 y 2) y por vía **intravenosa (IV)** (Tabla 3), en adultos y en niños.

Tabla 1. Artículos publicados en que se describe el comportamiento farmacocinético de busulfán administrado por vía oral en pacientes adultos.

Referencia	Dosis Bu	Población	AUC (ng*h/ml)	Cl/F (ml/min/kg)	t1/2 (h)	Observaciones
Grochow 1989 ²⁸	1mg/kg/6h	Adulta	8.260±5.021	2,5±1,4	2,3	Correlación entre AUC y EVOH
Grochow 1990 ²⁹	1mg/kg/6h	Adulta	8.938±4.920	2,5±1,4		
Hassan 1989 ³⁰	1mg/kg/6h	Adulta	7.590±2.180	2,4±0,6	2,3±0,3	
Hassan 1991 ³¹	1mg/kg/6h	Adulta	6.520±1.905	2,6±0,6	2,7±0,6	
Hassan 1994 ³²	2mg	Adulta		3,6±1,3	2,68	Estudio biodisponibilidad de busulfán (adm oral vs IV) en adultos y niños
Schuler 1994 ³³	1mg/kg/6h	Adulta	4.310±960			
Gibbs 1999 ³⁴	0,44- 1,8mg/kg/6h	Adulta/ Obesa y no obesa		No obesa 2,9±0,62 Obesa 2,56±0,55		Determinantes de Cl/F fueron peso actual, peso ajustado y peso ideal.

				Muy obesa 2,30±0,51		Recomendación individualización de dosis.
Bostrom 2003 ³⁵	1-4mg/kg primera dosis	Adulta y Pediátrica	3.977±3854	8,7±10	3,4±8,4	

Bu: busulfán; AUC: área bajo la curva concentración-tiempo; Cl/F: aclaramiento ; t1/2: semivida de eliminación

Tabla 2. Artículos publicados en que se describe el comportamiento farmacocinético de busulfán administrado por vía oral en pacientes pediátricos.

Referencia	Dosis Bu	Población	AUC (ng*h/ml)	Cl/F (ml/min/kg)	t1/2 (h)	Observaciones
Grochow 1990 ³⁶	1mg/kg/6h	Pediátrica	2.931±988	8,4±4,3		
Hassan 1991 ³¹	1mg/kg/6h	Pediátrica				Observan diferencias entre poblaciones de edad
Hassan 1994 ³²	2mg	Pediátrica		5,2±2,1	2,74	Estudio biodisponibilidad de busulfán (adm oral vs IV) en adultos y niños
Hassan 1996 ³⁷	4 a 6mg/kg/dia (en dosis única o dividida cada 6h)	Pediátrica	Leucemia 5.527±2.671 E.congénita 2.768±1.925	4,22±3,14 13,87±18,16	3,16±0,78 1,93±0,94	Población con leucemia y enfermedad congénita.
Poonkuzhali 1999 ³⁸	1mg/kg/6h o 150mg/m ² /6h	Pediátrica	3.167±878 6.287±1.194	5,66±1,06 4,15±1,06	1,92±0,42 2,17±0,55	Pacientes con talasemia
Regazzi 1993 ³⁹	1mg/kg/6h	Pediátrica	2.154±813	8,9±3,7	2,4±0,8	Observan diferencias entre subgrupos

						poblacionales de diferentes edades pediátricas.
Shaw 1994 ⁴⁰ y 2004 ⁴¹	4mg/kg/día o 150mg/m ² /día	Pediátrica	4mg/kg 8.686±3.936	3,9±1,0	2,3±0,3	
			150mg/m ² 30.504±8.610	3,4±1,1	2,5±0,5	
Yeager 1992 ⁴²	40mg/m ² /6h con monitorización concentraciones plasmáticas	Pediátrica	4.530 (rango 3.239 a 8.528)			Propuesta de dosificación en base a SC.
Vassal 1989 ⁴³	1mg/kg/6h	Pediátrica		119±54 ml/min/m ²	2,33	
Vassal 1993 ⁴⁴	0,9-2,6mg/kg/6h	Pediátrica		6,8 (rango 2,1 a 13,4)		Pacientes con enfermedad lisosomal
Bostrom 2003 ³⁵	1-4mg/kg primera dosis	Adulta y Pediátrica	3.977±3854	8,7±10	3,4±8,4	
Veal 2012 ⁴⁵	1,45-1,55mg/kg/6h	Pediátrica	3.907±1.189	7,3±2,9		Pacientes con neuroblastoma

Bu: busulfán; AUC: área bajo la curva concentración-tiempo; Cl/F: aclaramiento ; t1/2: semivida de eliminación

Tabla 3. Artículos publicados en que se describe el comportamiento farmacocinético de busulfán administrado por vía intravenosa.

Referencia	Dosis Bu	Población n	AUC (ng*h/ml)	Cl/F (ml/min/kg)	t1/2 (h)	Observaciones
Schuler 2001 (n=45) ⁴⁶	2,8-3,1mg/kg dosis única día x 4 días	Adultos	2,8mg/kg 23.200±5.70 (n=9) 3,1mg/kg 20.600±3.800 (n=19)	2,64±0,56	2,87±0,64	Excipiente DMSO
Andersson 2002 (n=61) ⁵	0,8 mg/kg/6 horas x 16 dosis	Adultos	4.785 ±319 (en la 9 dosis)	2,52±0,62	2,99±0,56	Ensayo clínico Fase II
Russell 2002 (n=70) ⁴⁷	3,2 mg/kg dosis única día x 4 días	Adultos	4.866±771	106,77±16,68 ml/min/m ²	2,57±0,44	Asociado a fludarabina
Fernandez 2002 (n=12) ⁴⁸	Grupo A 1,6mg/kg/12 horas x 4 días Grupo B 3,2mg/kg/dosis	Adultos	A 13.899 B 22.800	A 1,9 B 2,37	A 3,35 B 2,59	

	única x 4 días					
Dalle 2003 (n=14) ⁴⁹	0,8-1mg/kg x 16 dosis con monitorización concentraciones plasmáticas	Pediátrica	5.018±1.189	3,6±0,64		
De Lima 2004 (n=96) ⁵⁰	130mg/m2 1 vez al día x 4 dosis	Adultos	20.052 (rango 12.017 a 33.911)	109 ml/min/m2	2,7 (CV 27,5%)	Dosis 1 vez al día Asociado a fludarabina
Shaughnessy 2006 ⁵¹	3,2mg/kg 1 vez al día días -10 y -9	Adultos	25.673 (rango 20.648 a 30.676)	3,37 (rango 2,54 a 4,00)		En Minialo en pacientes c. renal. AUC mayor de la esperada si se extrapola a dosis dividida en 4 dosis.
Nath 2008 (n=40) ⁵²	120mg/m2 (n=3) 130mg/m2 (n=34) 3,2mg/kg (n=3)	Pediátrica		3,83±1,33		Se observa una alta variabilidad inter y intra- paciente en el Cl y exposición, que sugiere la necesidad de la monitorización de concentraciones.
Kim 2009 (n=21) ⁵³		Pediátrica	< 4 años 4.092±927	<4 años 4,1±1 >4 años 3,1±0,7		Ningún paciente <4 años desarrollo EVOH y 38% de los pacientes >4 años si

			>4 años 4.735±750			desarrollaron.
Veal 2012 ⁴⁵	0,8-1,2mg/kg/6h	Pediátrica	4.699±767	4,6±2,5		Pacientes con neuroblastoma

Bu: busulfán; AUC: área bajo la curva concentración-tiempo; Cl/F: aclaramiento ; t1/2: semivida de eliminación

a) Absorción

La absorción gastrointestinal de busulfán tras su administración por vía oral, a pesar de su pobre solubilidad, es adecuada aunque presenta variabilidad. Dicha absorción fue estudiada por el grupo de Hassan en dos trabajos publicados en 1994 y 1996^{32, 54}. En el estudio publicado en 1994³² se comparó la biodisponibilidad del fármaco en dos grupos de pacientes: niños entre 1,5 y 6 años y adultos y niños >6 años comparando los parámetros farmacocinéticos tras la administración oral y IV. La biodisponibilidad se calculó comparando las áreas bajo la curva concentración-tiempo (AUC) de la administración oral y IV de cada individuo, siendo los resultados $0,80 \pm 0,19$ en adultos y $0,68 \pm 0,31$ en niños. La semivida de absorción tras la administración oral fue de $0,21 \pm 0,21$ horas en adultos y $0,37 \pm 0,41$ en niños. Tras la administración oral se observó una alta variabilidad interindividual tanto en la semivida de absorción como en AUC. Los niños mostraron una menor absorción, aunque no significativa, respecto a los adultos. Esta diferencia, según los autores, podría ser explicada por diferencias en el tiempo de tránsito gastrointestinal.

A partir de estos datos de variabilidad, se inició la controversia respecto a su relación con efectividad del tratamiento y las propuestas de utilizar la monitorización de concentraciones plasmáticas para la dosificación, a la vez que la utilización de la vía parenteral. Todo ello se desarrolla a lo largo de este trabajo de investigación.

b) Distribución

Busulfán es una molécula pequeña, altamente lipófila, que presenta una baja unión reversible a proteínas (2,7 a 14%)³⁰, mientras que se ha observado que tras la administración IV la unión irreversible fue del 32% aproximadamente. Aún con estas características, el volumen aparente de distribución descrito en los artículos está comprendido entre 0,56 y 1,62 l/kg, siendo mayor en niños que en adultos^{32, 36}, y aún mayor en niños con enfermedades metabólicas³⁷.

Los valores de concentración de busulfán en el líquido cefalorraquídeo son equiparables a los del plasma, aunque probablemente son insuficientes para una actividad antineoplásica^{55, 56}. Esta distribución en líquido cefalorraquídeo

implica el riesgo de convulsiones cuando se utiliza busulfán en dosis altas, haciendo necesario la profilaxis con anticonvulsivantes⁵⁷.

c) Metabolismo y excreción

La metabolización de busulfán se realiza a nivel hepático por conjugación con glutathione a través del sistema enzimático glutathione-S-transferasa (GST)^{58, 59}. Esta vía de metabolización podría estar influida por factores genéticos (ver apartado correspondiente, 1.3.5 Aspectos farmacogenéticos). El conjugado con glutathione es a continuación metabolizado por oxidación en el hígado. Se considera que ninguno de los metabolitos contribuye significativamente a la eficacia o a la toxicidad⁵⁶.

Se ha estudiado ampliamente la variabilidad en la metabolización de busulfán, pudiéndose resumir que los estudios publicados indican que los factores serían la edad, obesidad, enfermedad de base, alteraciones en la función hepática y interacción con fármacos, especialmente los anticonvulsivantes. A continuación se desarrollan dichas variables.

c.1. Edad

La edad es uno de los factores más importantes relacionados con la variabilidad en la metabolización de busulfán, presentando los niños una mayor metabolización que los adultos y requiriendo mayores dosis para conseguir exposiciones similares^{39, 29, 31, 35}. Los datos de aclaramiento plasmático de los diferentes estudios se pueden observar en la Tabla 1 y 2. Estas diferencias en el aclaramiento entre adultos y niños podría ser atribuido al mayor tamaño del hígado en los niños cuando se relaciona con la superficie corporal, sin embargo en estudios que han estudiado y/o dosificado el fármaco en base a la superficie corporal, no se ha observado diferencias entre niños y adolescentes, sugiriendo una posible relación con la expresión de GST. Vassal y cols⁶⁰ analizaron el comportamiento farmacocinético de busulfán en 27 niños a los que se administró el fármaco en base a superficie corporal (600mg/m²) en vez de dosificación por peso, como es habitual en la mayoría de protocolos utilizados. Los datos de este estudio mostraron que la exposición era mayor cuando se

utilizaba la superficie corporal aunque la variabilidad seguía siendo alta, indicando que se seguía requiriendo un acercamiento más individualizado.

c.2. Obesidad

El estudio realizado por Gibbs y cols³⁴, mostró que la obesidad tiene un impacto en el aclaramiento de busulfán. En dicho estudio, analizaron la farmacocinética de busulfán en 279 pacientes y observaron que los muy obesos (IMC>35 kg/m²) tenían un menor aclaramiento plasmático, entre un 17 a 32% menor, que aquellos con un IMC normal. El ajuste de la dosis a peso ideal puede corregir estas diferencias en la eliminación, aunque sigue existiendo variabilidad, y ciertamente es un tema de debate²⁹, es otro dato que orientaría hacia una mayor individualización⁶¹.

c.3. Enfermedad de base

Determinados estudios han analizado las diferencias en el comportamiento farmacocinético de busulfán entre pacientes con diferentes enfermedades. Vassal y cols⁴⁴ observaron que el aclaramiento era mayor en niños con enfermedades lisosomales que en niños con enfermedades malignas. En otros estudios realizados por Bertholle-Bonnet y cols⁶² y Poonkuzhali y cols³⁸ presentaron datos mostrando que en los niños con talasemia también el aclaramiento era mayor que en el resto de patologías, y incluso relacionándolo con una mayor proporción de fallo del implante en la utilización de dosis estándar y no individualizadas³⁸. También se han observado diferencias entre pacientes con diferentes tumores, y así Gibbs y cols mostró que los pacientes con LNH tenían un aclaramiento menor que los pacientes con LMC³⁴.

c.4. Función hepática e interacción con fármacos

Debido a que el busulfán es metabolizado en el hígado, la alteración de su funcionalidad puede modificar el comportamiento farmacocinético y incluso se ha relacionado con pacientes que han recibido muchos tratamientos previos al TPH⁶³. A su vez las vías metabólicas hepáticas se pueden ver alteradas por la administración de otros fármacos, produciéndose modificaciones en el

comportamiento farmacocinético (ver apartado 1.4. Interacciones medicamentosas).

d) Comparativa farmacocinética de busulfán oral vs IV

Ante la variabilidad en el comportamiento farmacocinético del busulfán oral, sobre todo en la absorción, se desarrolló y comercializó la forma farmacéutica para administración IV (en España en el año 2005). Este hecho ha generado discusión en el medio académico si la utilización de busulfán IV asegura una menor variabilidad que hacía evitable la individualización posológica tras determinación de concentraciones plasmáticas^{64, 65}.

En apartados anteriores se han descrito los estudios de análisis de la farmacocinética del fármaco oral y IV de manera independiente. A continuación se analizan aquellos estudios que comparan directamente en una misma población el comportamiento farmacocinético de busulfán oral y IV.

- ❖ Schuler US, Ehram M, Schneider A, Schmidt H, Deeg J, Ehninger G. Pharmacokinetics of intravenous busulfan and evaluation of the bioavailability of the oral formulation in conditioning for haematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 1998 Aug;22(3):241-4.⁶⁶

Es el primer estudio en que se comparó la administración de busulfán oral (1mg/kg) y IV (0,5 mg/kg) en 11 pacientes. En este caso los autores tras realizar el estudio en animales, analizaron la biodisponibilidad del fármaco y por ello administraron una única dosis de la forma IV y las 15 restantes oral, aunque una de ellas a la misma dosis que la IV (0,5mg/kg). Se utilizó como solvente principal DMSO, a diferencia de los estudios posteriores realizado con la forma farmacéutica comercializada que utilizan DMA y PEG-400 como co-solventes. Se describió una biodisponibilidad de la forma oral del 69% (rango 44-94%). Los autores indicaron que no pueden demostrar una disminución de la variabilidad interpaciente debido a que la n era pequeña.

- ❖ Andersson BS, Madden T, Tran HT, Hu WW, Blume KG, Chow DS, Champlin RE, Vaughan WP. Acute safety and pharmacokinetics of intravenous busulfan when used with oral busulfan and cyclophosphamide as pretransplantation conditioning therapy: a phase I study. Biol Blood Marrow Transplant. 2000;6(5A):548-54.⁶⁷

Ensayo clínico fase I (también denominado OMC BUS 2) de determinación de la seguridad y dosis de busulfán IV para su posterior utilización en el ensayo clínico fase II. La primera dosis se escala desde 0,2mg/kg a 0,4mg/kg y finalmente 0,8mg/kg en cohortes de 3 pacientes en la dosis primera y las restantes 15 dosis se administran oral, determinándose concentraciones plasmáticas en la dosis IV y en la 4 dosis oral. De los 15 incluidos en el estudio, sólo son analizables 10. La biodisponibilidad media fue de 69% (CV 40,5% y rango 10,8 a 100). En la tabla a continuación (Tabla 4) se describen los resultados comparados.

Tabla 4. Características farmacocinéticas comparadas entre busulfán oral y IV en el ensayo clínico fase I de Busilvex®.

	Via adm	Media	CV (%)
AUC * (ng*h/ml)	Oral (AUC0-∞)	4.653	37,4
	IV (AUC0-t)	4.875	19
Cl/F/kg (ml/min/kg)	Oral	3,9	49,7
	IV	2,5	31,2
Vd/F/kg (l/kg)	Oral	0,56	55,4
	IV	0,44	71
T1/2 (h)	Oral	1,58	41,5
	IV	4,1	41,5

*Sólo se utiliza los datos que recibieron la dosis de 0,8mg/kg (n=5).

La conclusión del estudio fue que la dosis a realizar el ensayo clínico fase II debía ser 0,8mg/kg.

- ❖ FDA. Center for Drug Evaluation and Research. Medical Review. Application Number 20-954. NDA 20-954 Busulfex (busulfan). Clinical pharmacology and biopharmaceutics NDA Reviews⁶⁸.

En los ensayos clínicos fase II OMC-BUS-3 y 4 de desarrollo del fármaco busulfán IV (Busilvex ®), se incluyó una adenda para analizar la farmacocinética comparada de la forma farmacéutica IV vs oral. Se incluyeron entre ambos ensayos 12 pacientes, de los cuales 3 fueron excluidos del análisis. Se les administró la dosis inicial 1mg/kg oral seguidas de las 15

restantes 0,8mg/kg IV. Con los datos aportados por el promotor se podría deducir que se observa mayor variabilidad en la vía oral que en la IV. Pero en el informe de la FDA se criticó la metodología utilizada, ya que consideraron que es inválida la comparación de la farmacocinética en la dosis 1 con la dosis 9 en que se ha alcanzado el estado de equilibrio estacionario (en la dosis 1 con intervalo 6 horas no se ha alcanzado al tener que ser como mínimo 3 semividas). Los expertos de la FDA consideraron que en la dosis 1:

$$AUC_{total} (0-\infty) = AUC_{0-t} + AUC_{t-\infty}$$

Y que la extrapolación a AUC total a partir de AUC_{0-t} es inválida.

Ante ello los expertos de la FDA utilizaron los datos de la vía oral de la adenda de OMC BUS 3 y 4 y los datos sin extrapolar de la dosis 1 IV del resto de pacientes de OMB BUS 3 (n=38) y OMC BUS 4 (n=59), realizando una comparación entre poblaciones, en vez de comparación dentro de la misma población, pero en igualdad de comparación respecto a datos no extrapolados, es decir en la dosis 1 (Tabla 5). Con ello los expertos de la FDA concluyeron que la variabilidad es similar entre la forma farmacéutica oral y la IV.

Tabla 5. Características farmacocinéticas comparadas entre busulfán oral y IV en los ensayos clínicos fase II de Busilvex® y el recalcuado realizado por FDA y presentado en su informe de evaluación.

	Vía adm	Datos promotor Adenda OMC BUS 3 y 4 (n=9)		Datos FDA Adenda OMC BUS 3 y 4 para oral (n=9) y OMC BUS 3 para IV (n=59)	
		Media	CV (%)	Media	CV (%)
AUC (ng*h/ml)	Oral	5.724	23,8	3.254	17,3
	IV	4.739	13,7	3.214	17,0
Cmax (ng/ml)	Oral	870,4	29,9	870,4	29,9
	IV	1166,6	12,1	901	19,1
Cl/F/ABW (ml/min/kg)	Oral	2.503	18,2	4,48	12,5
	IV	2.363	12,9	3,48	18,1
Vd/F/ABW (l/kg)	Oral	0,732	16,9	0,8	18,8
	IV	0,634	17	0,63	23,8
T1/2 (h)	Oral	3,55	33	3,56	33,4
	IV	3,11	10,3	3,33	30,9

1.3.5. Aspectos farmacogenéticos: Polimorfismos

Estudios realizados in vitro e in vivo muestran controversia y discordancia en la asociación de la exposición de busulfán y la presencia de diversos polimorfismos de los diferentes isoenzimas de GST, que son GSTA1, GSTM1, GSTP1 y GSTT1, siendo GSTA1 la forma más activa de GST en humanos y la de mayor importancia en el metabolismo de busulfán. Abbasi y cols observaron en una población de 152 individuos que la frecuencia de haplotipos de GSTA1 era 38% *A*A, 48% *A*B y 14% *B*B⁶⁹.

Los datos in vitro sugieren que el polimorfismo GSTA1, no se asocia con la actividad de GSTA o con alteración de la expresión hepática de la proteína, evaluado a través de la formación de conjugados de glutatión⁷⁰.

Tras la revisión de la literatura, se encuentran 8 estudios in vivo que estudian la influencia de los polimorfismos de GST y la farmacocinética de busulfán y obtienen resultados positivos, pero el problema es que no hay concordancia entre que polimorfismos y que isoenzima están relacionados a la vez que hay discordancia entre los estudios que analizan la población que recibe busulfán oral o IV^{71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 69}. La mayoría de dichos estudios se realizan con poblaciones pequeñas (de 22 a 77 pacientes), excepto el estudio de Abbasi y cols que analiza una población de mayor tamaño (n=152).

Kusama y cols⁷¹ observaron que los pacientes heterocigotos para GSTA1 (GSTA1*A*B), tenían una eliminación más lenta de busulfán administrado oral que aquellos que tenían la variante común (%wild-type+, GSTA1*A*A) homocigota. Un estudio realizado en pacientes con talasemia (n=114)⁷² (sugiere que el aclaramiento de busulfán oral es mayor en pacientes con genotipo GSTM1 nulo comparado con aquellos que tenían positivo, relacionándolo a su vez con un menor riesgo de enfermedad veno-oclusiva hepática (18,3% vs 46,5%, p=0,01). Tanto el trabajo de Johnson y cols,⁷³ como el de ten Brink y cols⁷⁷ también estudiaron la cinética de busulfán IV y observaron que el aclaramiento era menor en los portadores del polimorfismo GSTA1*B y no estaba asociado con polimorfismos GSTM1 o P1.

En cambio en el estudio de Zwaveling y cols⁷⁹ en que el busulfán se administraba por vía IV a 77 niños, la farmacocinética no se vio modificada en relación a los polimorfismos de GSTA1, GSTM1, GSTP1 o GSTT1.

Se han propuesto diferentes hipótesis sobre los datos contradictorios de los estudios, incluyendo la diferentes expresión de GSTA1 a nivel intestinal, que podrían afectar a la diferencia de los datos entre busulfán oral y IV.

Así en el estudio de Abbasi y cols⁶⁹ observan que el aclaramiento de busulfán administrado oral se asocia con los genotipos de GSTA1 ($p=0,008$), pero en cambio no hay dicha asociación en la población a los que se administra IV ($p=0,21$). De esta manera los autores defienden que la personalización de la dosis de busulfán, ya sea oral o IV, no se puede simplificar en base al genotipo.

1.3.6. Farmacocinética poblacional de busulfán

a) Introducción a los principios de la farmacocinética poblacional

El desarrollo de los principios farmacocinéticos y su posterior aplicación en la evaluación del perfil de disposición de los fármacos ha permitido caracterizar adecuadamente sus procesos de absorción, distribución y eliminación. La experiencia acumulada de estos estudios ha permitido apreciar la gran variabilidad que presentan los parámetros farmacocinéticos dentro de una población de pacientes. Ello ha dado lugar a estudios cuyo objetivo es cuantificar la variabilidad y cuantificar los efectos de los factores, como edad, peso etc, tienen sobre los procesos de disposición, con el fin de minimizar la extensión de esa variabilidad, en principio inexplicable. Esta evolución ha conducido a un nuevo enfoque de los estudios farmacocinéticos, así la estimación de parámetros farmacocinéticos individuales ha dado paso a la determinación del comportamiento cinético de una población determinada. De esta manera surge el concepto de farmacocinética poblacional, que se puede definir como el estudio de la variabilidad inter e intraindividual de las concentraciones séricas que alcanzan los fármacos cuando se administran en regímenes de dosificación estándar a un grupo amplio de pacientes con características fisiopatológicas y clínicas definidas^{80, 81}.

Los objetivos fundamentales de la farmacocinética poblacional podrían resumirse en los siguientes: la determinación del comportamiento cinético medio de la población, la evaluación de la variabilidad farmacocinética inter e intraindividual y la determinación de la variabilidad inexplicable, y por último la Identificación de los factores que puedan modificar los procesos.

La variabilidad farmacocinética se ve afectada por varios factores, que pueden ser⁸²:

1. Demográficos: género, peso o superficie corporal, edad, y raza;
2. Medioambientales: hábitos tabáquicos, dieta y exposición a contaminantes, entre otros;
3. Fenotipo genético que afecta el aclaramiento de fármacos vía metabolismo hepático por las isoformas del citocromo P450 (ej. CYP2D6, 2C19, 2C9, 2A6);
4. Interacciones farmacológicas;
5. Factores fisiológicos y fisiopatológicos como pueden ser el embarazo, insuficiencia renal y hepática, y otros estados de enfermedad;
6. Otros factores adicionales (ej. Ritmo circadiano, adherencia, efecto y ritmo de las comidas, actividad, postura).

La aplicación de modelo farmacocinéticos poblacionales en la práctica clínica juega actualmente un papel crucial en la atención al paciente ya que estos modelos son útiles para el diseño de estrategias de dosificación. Se pueden emplear en la aproximación Bayesiana para la estimación de parámetros farmacocinéticos individuales aplicables a la monitorización terapéutica en la práctica clínica.

El análisis de los datos farmacocinéticos de los fármacos onco-hematológicos utilizando una aproximación poblacional ha representado diversas ventajas respecto a los métodos tradicionales, incluyendo la potencialidad para la individualización de la dosis y la definición de algoritmos para la estimación de dosis en determinadas condiciones del paciente, como podría ser alteraciones orgánicas o asociaciones de quimioterapia⁸³. Los modelos farmacocinéticos poblacionales que incluyen co-variables han conducido a una mejora en la comprensión de la farmacología de diferentes fármacos onco-hematológicos, ya sean factores orgánicos como por ejemplo superficie corporal, sexo, función

hepática o renal, como genéticos, como por ejemplo el caso de mercaptopurina⁸⁴.

b) Estudios farmacocinéticos poblacionales

Para conseguir una correcta caracterización de los parámetros cinéticos de la población a estudio es necesario disponer de suficiente información, tanto farmacológica (incluyendo las concentraciones del fármaco en fluidos biológicos) como características demográficas y clínicas de los pacientes. Estos datos formarán parte de un análisis farmacocinético poblacional, aunque la fiabilidad de los resultados dependerá de la proporción en que se encuentren los distintos tipos de datos incluidos y del número de parámetros estimados⁸¹.

A diferencia del modelo individual, para analizar los datos de manera poblacional, se requieren modelos estadísticos complejos. Para formular el modelo, se tiene en cuenta que el conjunto de la variabilidad observada en los datos observados (respuesta) en una muestra de individuos refleja tanto el error de medida como la variabilidad inter-individual., y así la respuesta en un determinado individuo en el marco de los modelos poblacionales no-lineales de efectos mixtos puede describirse:

$$y_{ij} = f_{ij}(x_{ij}) + \epsilon_{ij} \quad \text{Ecuación 1}$$

y_{ij} para $i=1, \dots, n_j$ equivalen a los datos observados para el individuo j .

El modelo o ecuación 1 se define para todos los individuos

$j = 1, \dots, N$, donde N es el número total de individuos de la muestra,

f_{ij} corresponde a una determinada función predictiva de la respuesta i en el sujeto j (p.ej.: uno o varios exponenciales),

ϵ_{ij} corresponde al error de la observación i en el individuo j , y

x_{ij} valores de los parámetros.

De las anotaciones anteriores, se deduce que el modelo poblacional no es más que la recopilación de modelos para observaciones individuales. Las funciones y_{ij} variarán a través de los individuos.

En cambio, es realista asumir desde un punto de vista cualitativo que el conjunto de parámetros estructurales subyacentes, en este caso parámetros farmacocinéticos, es el mismo para todos los individuos y que los parámetros varían cuantitativamente entre individuos. Matemáticamente, puede escribirse como:

$$y_{ij} = g(\mu, z_j) + \epsilon_{ij} \quad \text{Ecuación 2}$$

g es una función conocida que describe el valor esperado de y_{ij} como la función de covariables individuales z_j conocidas y específicas, y por último el vector de parámetros poblacionales μ .

Por cuestiones de simplificación, se asume que las covariables son constantes para un mismo individuo. Sin embargo, al permitir que los parámetros farmacocinéticos individuales dependan de i como también de j , también se pueden incorporar variables tiempo-dependientes en el modelo. ϵ_{ij}

representa la variación aleatoria de los vectores y_{ij} indicando este modelo paramétricos individuales alrededor de la predicción poblacional.

Si traducimos este modelo matemático en el significado de cada concepto, podemos decir que el perfil cinético de un fármaco en una determinada población se caracteriza por tres tipos de parámetros poblacionales⁸¹:

1. Parámetros de efectos fijos. Cuantifican el comportamiento cinético del fármaco en la población mediante la caracterización de parámetros farmacocinéticos medios y de sus posibles relaciones con ciertos factores fisiopatológicos y clínicos.
2. Parámetros de efectos aleatorios interindividuales. Cuantifican la magnitud de la variabilidad cinética interindividual, es decir, describen el tipo de dispersión de los parámetros farmacocinéticos en relación a sus

valores medios y determinan, mediante las varianzas, la magnitud de la misma. Por ejemplo la distribución del aclaramiento puede ser logaritmo normal con un coeficiente de variación del 50%.

3. Parámetros de efectos aleatorios intraindividuales. Cuantifican la magnitud de la variabilidad residual que incluye, entre otras, la variabilidad cinética intraindividual, el error analítico, los posibles errores en la especificación del modelo etc

El desarrollo de métodos para analizar estos datos procedentes de la rutina clínica ha sido muy activo y uno de los más utilizados es el análisis través de modelos de efectos mixtos no lineales. Este tipo de análisis se basa en el principio de que los parámetros farmacocinéticos de un individuo particular surgen de una distribución de dichos parámetros en la población, pudiéndose describir esta población por una media y una varianza interindividual, siendo la unidad de análisis la población y no el individuo.

NONMEM (NONlinear Mixed Effects Model)⁸⁵ es un programa ampliamente utilizado, y posiblemente el más contrastado y evaluado, en el que se considera este modelo de efectos mixtos no lineales y que utiliza una aproximación paramétrica, es decir que asume que los parámetros individuales presentan distribución normal o logarítmico normal.

A continuación se describen las ventajas y desventajas de NONMEM según Farré⁸⁶:

- Ventajas del NONMEM:
 1. Cálculo de los parámetros farmacocinéticos poblacionales con un número relativamente pequeño de sujetos y permiten incluir datos de individuos de los que tan sólo se dispone de una observación (en este caso no permite obtener la variabilidad interindividual de los parámetros farmacocinéticos).

2. Permite la utilización de datos de la rutina clínica (datos observacionales), así como los procedentes de los ensayos clínicos en fases III y IV (pocas restricciones en el diseño).
 3. Los datos utilizados proceden de la población que recibe el fármaco con fines terapéuticos.
 4. Ofrece la posibilidad de introducir directamente factores fisiopatológicos y relacionados con el tratamiento en el modelo farmacostatístico diseñado, con el objetivo de obtener una caracterización más precisa de la población.
 5. Proporciona mejores estimados de las variabilidades inter- e intraindividuales que los métodos tradicionales.
 6. Permite combinar datos procedentes de diferentes estudios o fuentes
- Desventajas del NONMEM:
1. El error asociado a los datos es significativamente superior al verificado en los datos procedentes de protocolos experimentales.
 2. Aumento del número de parámetros a estimar (mayores requerimientos de información).
 3. Dificultades inherentes al software de manejo muy poco intuitivo

La selección del modelo más adecuado se realiza en tres etapas ⁸⁶:

1ª etapa: Consiste en la selección del denominado modelo poblacional básico. Este modelo se caracteriza por describir adecuadamente los datos objeto de estudio, pero sin relacionar parámetros farmacocinéticos con indicadores individuales.

Los valores de concentración de fármaco en plasma pueden describirse en base al siguiente modelo:

$$C_{ij}=f(PK_i, D_i, t_j) + \text{pkij} \quad \text{Ecuación 3}$$

C_{ij} representa la concentración plasmática observada en el individuo i a tiempo j . Esta concentración depende (a) del modelo farmacocinético seleccionado, representado por f , (b) de los parámetros farmacocinéticos individuales, PK_i , (c) de la dosis, D_i , administrada, y (d) de la variabilidad residual.

En la expresión anterior ϵ_{pkij} , representa la desviación entre la concentración plasmática predicha y la concentración observada. Se asume que el conjunto de todos los valores de desviación siguen una distribución normal de media 0 y varianza σ^2 . El valor de σ^2 hace referencia a la variabilidad residual (intraindividual).

A su vez, los parámetros farmacocinéticos se estiman de la siguiente manera:

$$p_{ki} = p_k * e^{\epsilon_{pki}} \quad \text{Ecuación 4}$$

p_{ki} y p_k , representan el valor de un determinado parámetro farmacocinético en el individuo i , y su valor típico (medio) poblacional, respectivamente. ϵ_{pki} , representa la desviación entre el valor típico del parámetro farmacocinético y su valor en el individuo i . Se asume que el conjunto de todas las desviaciones individuales para un determinado parámetro ($\epsilon_{pki...j}$) sigue una distribución normal, de media 0 y varianza σ_{pk}^2 . Las varianzas $\sigma_{p1}^2...m$, siendo m el número de parámetros farmacocinéticos estimados, forman los elementos en posición diagonal de la matriz varianza-covarianza, y hacen referencia a la variabilidad interindividual.

2ª etapa: En esta etapa se realiza la selección preliminar de los indicadores individuales que pueda afectar los procesos de distribución y eliminación. Esta selección puede no ser realizada utilizando NONMEM, sino de forma externa con otros programas estadísticos.

Tras una primera pre-selección, se exploran diferentes modelos incluyendo combinaciones de uno, dos o más indicadores individuales, seleccionándose los más importantes, así como el tipo de relación existente entre parámetro e indicador (lineal vs no-lineal), en base al criterio de información de Akaike.

3ª etapa: La significación estadística de los resultados obtenidos en la etapa anterior se analiza de nuevo con NONMEM, seleccionándose el modelo poblacional final. Para evaluar dicha significación estadística, se compara la diferencia entre el valor mínimo de la función objetiva (OBJ) proporcionado por NONMEM entre dos modelos -incluyendo o no un determinado indicador individual- con una distribución χ^2 . Es necesario considerar también, aparte del valor de OBJ, la disminución en el estimado de variabilidad interindividual de un determinado parámetro al incluir el indicador en el modelo. Durante los procesos de selección de modelos en las etapas primera y tercera, además de los criterios mencionados anteriormente (valor de OBJ y descenso de la variabilidad interindividual), deben explorarse diferentes gráficas de residuales y prestar atención a la precisión.

Además del NONMEM, que es el programa utilizado en el trabajo de investigación presentado, se han desarrollado otros programas que incluyen modelos de efectos mixtos con aproximación paramétrica, como POPKAN y P-PHARM, y estrategias no paramétricas como NPEM (Non Parametric Expectation Maximization)⁸⁷. En los métodos no paramétricos no se realizan asunciones sobre la forma de la distribución poblacional y consecuentemente permiten estudiar distribuciones no normales y multimodales, pero a su vez son métodos complejos y de difícil interpretación.

c) Revisión bibliográfica de farmacocinética poblacional de busulfán

Tras una revisión bibliográfica, se puede observar que el análisis de farmacocinética poblacional de busulfán ha sido un campo de investigación y publicación importante, en población infantil^{88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 45, 62, 73} vs población adulta^{99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106} y en la utilización de busulfán en su combinación con ciclofosfamida.

A continuación en la Tabla 6 se describen los estudios de farmacocinética poblacional de busulfán en población adulta, al ser la población objeto del trabajo de investigación presentado en esta tesis.

Tabla 6. Estudios publicados de farmacocinética poblacional de busulfán en acondicionamiento de TPH en adultos

Estudio (n pacientes)	Población	Protocolo acondicionamiento	Busulfán oral o IV	Modelo poblacional básico/Software/Método de estimación	Covariables incluidas en modelo final	Validación externa (si/no)
Sandström 2001 ⁹⁹ (n=76)	Adulta (n=64) y niños (n=12)	Bu-ICT	Oral	Monocompartimental con eliminación primer orden/NONMEM/. FOCE %centered+	ABW , ALT y administración de fenitoina en CI Peso en Vc	No
Nguyen 2006 ¹⁰¹ (n=127)	Adultos	Bu-Cy	IV	Monocompartimental con eliminación primer orden/NONMEM/ FOCE	ABW en Vc SC en CI	Sí (datos de 24 pacientes)
Takama ¹⁰⁰ 2006 (n=30)	Adultos (n=27) y niños (n=3)	Bu-Cy	IV	Monocompartimental/NONMEM/ FOCE INTERACTION	Peso en CI y Vc	No (utiliza %bootstrapping+)

Salinger ¹⁰² 2010 (n=37)	Adultos (rango edad 19- 66 años)	Bu-Flu-Tim (n=35), Bu-Cy (n=1), Bu-Mel (n=1) (Bu en dosis única diaria)	IV	Monocompartimental con eliminación primer orden/NONMEM/NA	No	Sí
Takamatsu ¹⁰³ 2010 (n=71)	Adultos (rango edad 16- 67 años)	Diversos (no descritos)	Oral	Monocompartimental con eliminación primer orden/NONMEM/NA	Peso en CI	No
Hadjibabaie ¹⁰⁴ 2011 (n=30)	Adultos (rango edad 15- 43 años)	Bu en diversas combinaciones (Cy, melfalán, tiotepa, Flu, etoposido)	Oral	Monocompartimental con eliminación primer orden/MONOLIX	Tipo de enfermedad (Maligna o no) en CI Peso en Vc	No
Choe ¹⁰⁵	Adultos	Bu-Cy; Bu-Flu-Tim	IV	Monocompartimental con eliminación primer	ABW en CI y Vc y Sexo en	No (utiliza

2012 (n=60)	(>15 años)	y Bu monoterapia		orden/NONMEM/FOC INTERACTION	Vc	%bootstrapping+
McCune 2013 ¹⁰⁶ (n=1610)	Adultos y niños (92%<20 años y 44%<4 años)	Diversos (no descritos)	IV	Bicompartmental/NONMEM/ FOCE INTERACTION	No	No

ABW: peso corporal actual; ALT: alanina transaminaa sérica; Bu-Flu-Tim: busulfán+fludarabina+timoglobulina; Bu-ICT= busulfán+irradiación corporal total; Bu-Cy: busulfán+ciclofosfamida; Cl: aclaramiento; FOCE: método de estimación condicional con primer orden (First Order with Conditional Estimation+); SC: superficie corporal; Vc: volumen de distribución; NONMEM: Non-Linear mixed effects modelling; NA: no disponible la información en el artículo.

En resumen de los estudios publicados de farmacocinética poblacional de busulfán en adultos, se puede indicar que hay 8 estudios publicados, de los cuales 5 son exclusivamente en población adulta. Respecto a la vía de administración de busulfán, 3 artículos la administración es oral y 5 es IV. Los protocolos de administración son diversos, incluyendo By-Cy, Bu-ICT, Bu-Flu-Tim y otros en muy menor proporción. Respecto a las co-variables incluidas en el modelo de farmacocinética poblacional, se incluyen en 6 estudios, siendo el peso la co-variable más importante ya que que influyen en el CI en 4 estudios y en V en 5 estudios. Otras co-variables descritas en los estudios son ALT, administración de fenitoina, SC, tipo de enfermedad en CL y sexo en Vc. Se realiza validación externa en sólo 2 de los 8 estudios publicados.

1.4. Interacciones medicamentosas

Se identifica que ocurre una interacción cuando los efectos de un fármaco se modifican por la presencia de otro fármaco, alimento o agente químico ambiental, pudiendo conducir a una modificación de la eficacia o de los efectos adversos. En el caso de busulfán, se pueden observar interacciones en ambos sentidos. A continuación se presenta un resumen con las interacciones de busulfán, destacándose aquellas relacionadas con la utilización de busulfán en el contexto de trasplante de progenitores hematopoyéticos:

** Antimicóticos azólicos.*

Se comparó la farmacocinética de busulfán en 13 pacientes a los que se les realizó un trasplante de médula ósea y tratados con busulfán e itraconazol con 13 individuos tratados con fluconazol y 26 pacientes que no recibieron antimicóticos. El aclaramiento de busulfán disminuyó un 20% con itraconazol pero no con fluconazol. La hipótesis de los autores del estudio iba orientado a una interacción a nivel del metabolismo hepático¹⁰⁷.

** Ciclofosfamida*

La asociación de busulfán y ciclofosfamida es una de las combinaciones prioritarias de busulfán en el contexto de acondicionamiento pre trasplante de progenitores hematopoyético. Hassan y cols¹⁰⁸ estudiaron el efecto del intervalo de tiempo entre ambos fármacos sobre la farmacocinética de ciclofosfamida y de su metabolito 4-hidroxilado y la presencia de EVOH y mucositis. La conclusión fue que si la ciclofosfamida se administra como mínimo 24 horas después de la última dosis de busulfán, apenas se afectan sus concentraciones séricas, mientras que si el intervalo es breve, las concentraciones séricas de ciclofosfamida aumentarán de un modo notable. Por ello, esta información es de interés a la hora de planificar el régimen de acondicionamiento.

* *Fenitoina*

En 7 pacientes tratados con dosis alta de busulfán oral (1 mg/kg en 16 dosis) previo a trasplante de médula ósea, se observó un aumento del aclaramiento (de 2,8 a 3,32 ml/min/kg), un AUC menor (de 6,475 a 5,412 ng/ml.h) y una semivida más corta (de 3,94 a 3,03) entre la primera y la última dosis, cuando se les administró fenitoina. En cambio no se observaron cambios en los parámetros farmacocinéticos en 8 pacientes tratados con diazepam¹⁰⁹. Ello podría ser compatible con la explicación que la fenitoina actúa a través de la vía de GST. En cambio Carreras et al¹¹⁰ compararon el perfil farmacocinético de busulfán IV administrado conjuntamente con clonazepam (n=24) vs los datos de una cohorte histórica a los que se administró fenitoina (n=127) y observó un aclaramiento 10% superior en la cohorte con clonazepam que en la cohorte con fenitoina, considerándose una diferencia no clínicamente relevante. La explicación de dichas diferencias podría basarse en que el efecto de fenitoina es mayor en el intestino que en el hígado, observándose diferencias en la interacción dependiendo de la vía de administración de busulfán.

* *Ketobemidona*

Ketobemidona es un analgésico opiáceo presente comercialmente en algunos países nórdicos, del cual se han descrito interacción con busulfán a dosis alta. En la publicación se describe el caso clínico de un paciente al que se administraba este medicamento por una fisura rectal y que recibió busulfán a dosis de 1mg/kg por 16 dosis como acondicionamiento a trasplante. Tras la primera dosis de busulfán, se observó una elevación de las concentraciones de busulfán que requirieron ajuste de la dosis a 0,7mg/kg¹¹¹.

* *Tioguanina*

En un artículo publicado¹¹² se describió la aparición de varices esofágicas asociadas a la administración concomitante de busulfán y tioguanina durante

largo periodo de tiempo. La biopsia hepática realizada a 4 de los 5 pacientes descritos evidenció hiperplasia nodular que fue la causa de la hipertensión portal.

1.5. Efectos adversos

En la descripción de los efectos adversos de busulfán se debe tener en cuenta tanto la dosis como la indicación en el que está siendo utilizado, ya que la incidencia de las diferentes toxicidades varía según estos factores. En el presente apartado, se incidirá especialmente en la definición de los efectos adversos relacionados con la administración de **busulfán en dosis altas**.

1.5.1.Toxicidad hematológica

La toxicidad más importante de busulfán es la toxicidad hematológica, que está habitualmente relacionada con la dosis y es, hasta cierto umbral, reversible tras la suspensión del fármaco. Esta toxicidad hematológica se presenta con leucopenia, anemia y trombocitopenia. En dosis bajas, presenta actividad selectiva sobre la línea blanca granulocítica, en cambio en dosis altas claramente se pueden ver afectadas todas las líneas celulares. Comparado con otros agentes alquilantes, el nadir de mielosupresión debido a busulfán puede ser largo, por ejemplo el nadir neutropénico puede encontrarse entre 11 a 30 días.

Algunos pacientes han desarrollado, de manera probablemente relacionada con la administración de busulfán, fibrosis de la médula ósea o aplasia crónica.

1.5.2.Toxicidad gastrointestinal

La administración de busulfán a dosis bajas y de manera crónica se relaciona con baja toxicidad gastrointestinal. En cambio la administración a dosis altas se relaciona con náuseas y vómitos, estomatitis, alteraciones en la función hepática y enfermedad veno-oclusiva hepática, que se describe en el siguiente apartado.

1.5.3. Enfermedad veno-oclusiva hepática (EVOH)

La supervivencia tras un trasplante de progenitores hematopoyéticos depende de la recuperación de la terapia citoreductiva, de un implante exitoso, de la prevención de infecciones y de la enfermedad del injerto contra el huésped y de la erradicación de la enfermedad de base. Pero el daño hepático también ha de ser tenido en cuenta al ser una complicación frecuente de la terapia citoreductiva ya que se desarrolla en pacientes tras TPH entre un 20 y un 40%. La más importante localización de la lesión hepática es la vénula terminal hepática. Adicionalmente a causar cambios vasculares, se puede producir necrosis de los hepatocitos y fibrosis que conduce a obstrucción post-sinusoidal con hipertensión intrahepática, dando lugar al síndrome denominado enfermedad veno-oclusiva hepática (EVOH) ^{113, 114}.

Los criterios de definición de EVOH fueron descritos por McDonald y cols¹¹³ como la presencia de los siguientes eventos en los 20 días del trasplante:

1. Hiperbilirrubinemia (bilirrubina total sérica >34,2 micromol/L)
2. Hepatomegalia o dolor en el cuadrante superior derecho de origen hepático
3. Ganancia de peso (>2% del peso basal) debido a acumulación de líquidos

Factores de riesgo para el desarrollo de EVOH

También el grupo de McDonald estudió los factores relacionados con la incidencia de EVOH¹¹⁵. En la tabla mostrada a continuación se describen los resultados de este estudio (Tabla 7). De entre ellos cabe destacar los aspectos relacionados con el tipo de tratamiento de acondicionamiento, dentro de los cuales se encuentra la asociación ciclofosfamida+busulfán. Del resto de factores, sólo citar a los propios autores que indican que el factor de administración de vancomicina como marcador de fiebre persistente, e incluso en el análisis más detallado de este aspecto, encuentran una relación estadísticamente significativa entre los días de fiebre y el desarrollo de EVOH.

Tabla 7. Análisis de los factores de riesgo de desarrollo de EVOH en el estudio de McDonald y cols (análisis de regresión logístico)¹¹⁵.

Factor de riesgo	Riesgo relativo (IC95%)
Elevación de AST pre-trasplante	4,6 (2,2-9,8)
Terapia con aciclovir pre-trasplante	4,8 (1,2-20,1)
Vancomicina durante la terapia de acondicionamiento	2,9 (1,4-6,0)
Terapia de acondicionamiento con: Ciclofosfamida+ICT (>12 Gy) Busulfán+ciclofosfamida Carmustina+ciclofosfamida+etopósido	2,8 (1,2-6,5)
Donante no emparentado	2,4 (1,1-4,9)
Radioterapia abdominal previa	2,2 (1,0-4,9)

AST: aspartato aminotransferasa; ICT: irradiación corporal total

En el estudio publicado por Horn y cols en 2002 (n=83 niños)¹¹⁶, se definieron como factores de riesgo para el desarrollo de EVOH los siguientes: diagnóstico de neuroblastoma, radiación abdominal, cirugía abdominal, edad ≥ 7 años. En cambio no se encontraron como factores relacionados ni la elevación de transaminasas pre-trasplante ni el tipo de quimioterapia. Hay que indicar que en ninguno de los esquemas estudiados estaba incluido el busulfán y que todos los pacientes recibieron autotrasplante, que a diferencia del alo-trasplante, tiene un menor riesgo de EVOH.

En el estudio de Lee y cols¹¹⁷ se analizó el riesgo de desarrollar EVOH en pacientes que exclusivamente recibían un tipo de acondicionamiento: tiotepa+melfalán+busulfán previo auto-trasplante de progenitores hematopoyéticos (n=253). Los factores de riesgo de desarrollo de EVOH moderada o grave indicados por los autores fueron: diagnóstico de linfoma o

mieloma, afectación tumoral del hígado, fiebre en el mes post-trasplante y radioterapia en el hígado.

Busulfán y riesgo de EVOH

La EVOH está relacionada con una serie de factores, entre ellos los agentes alquilantes a dosis altas, y en concreto el busulfán. La incidencia descrita es variable, dependiendo de los estudios. Esta variabilidad se puede relacionar con factores interindividuales como edad, régimen de acondicionamiento, tipo de trasplante, concomitancia de otros factores ya indicados previamente etc. En la tabla a continuación (Tabla 8) se describen los datos de incidencia de EVOH en pacientes que reciben regímenes que incluyen busulfán.

Tabla 8. Incidencia de EVOH descrita en diferentes estudios que incluían busulfán en el régimen de acondicionamiento.

Autores	N	Adultos/ niños	Acondicionamiento	Diagnóstico	Incidencia EVOH	Mortalidad
Shaw y cols ¹¹⁸	50	Niños	Bu 13mg/kg CY 300mg/kg	Enf. genética	0%	-
Ozkaynak y cols ¹¹⁹	50	Niños	Bu 16mg/kg CY 200mg/kg	Enf. genética Leucemia	0% 36%	0%
Jones y cols ¹¹⁴	82	Adultos	Bu 16mg/kg CY 200mg/kg	Leucemia	24%	46%
Atkinson y cols ¹²⁰	15	Adultos	Bu 16mg/kg CY 120mg/kg	Leucemia	20%	67% (2/3)
Santos y cols ³	51	Adultos	Bu 16mg/kg CY 120mg/kg	Leucemia	6%	100% (3/3)
Tutschka y cols ¹	50	Adultos	Bu 16mg/kg CY 120mg/kg	Leucemia	2%	0%
Brodsky y cols ¹²¹	55	Adultos	Bu 16mg/kg CY 120mg/kg	Cáncer	9,1%	-

Cacchione y cols ¹²²	116	Niños	Busulfán+tiotepa	Tumores sólidos	31%	-
Meresse y cols ¹²³	136	Niños	Varios protocolos con diferentes dosis de busulfán	Tumores sólidos	22%	13%

Bu:busulfán; CY: ciclofosfamida

Es a partir del estudio de Meresse y cols, publicado en 1992, cuando se empezó a establecer las bases de la relación entre exposición a busulfán y riesgo de EVOH¹²³, bases que posteriormente llevarían a la realización de estudios farmacocinéticos y a la metodología de individualización posológica en base a concentraciones plasmáticas de fármaco. Este estudio analiza el riesgo de EVOH en una población infantil (n=136) que reciben diferentes regímenes de acondicionamiento que incluyen busulfán para realizar un posterior auto-trasplante. De los 136 niños incluidos en el estudio, 30 desarrollaron EVOH según los criterios de McDonalds. La incidencia global fue de 22% (IC95% 15-29%). En la tabla a continuación (Tabla 9) se describen los factores de riesgo definidos en el estudio tras un análisis multivariante.

Tabla 9. Análisis de los factores de riesgo de desarrollo de EVOH en el estudio de Meresse y cols (análisis de regresión logístico)¹²³.

Variable	Riesgo relativo	IC95%	p
Nº de fármacos y orden de administración de busulfán			
2 fármacos	1,00	-	-
3 fármacos, busulfán en 1ª posición	3,59	1,03-12,50	0,05
3 fármacos, busulfán 2n 2ª posición	1,27	0,40-4,03	0,069
Dosis de busulfán			
16mg/kg	1,00	-	-
600mg/m2	3,20	0,96-10,60	0,060
Tratamiento con ketoconazol			
No	1,00	-	-
Si	2,37	0,91-6,18	0,080

Comparativa de la incidencia de EVOH entre busulfán oral y IV

Ante la comercialización de la presentación para administración IV de busulfán, las agencias evaluadoras solicitaron al laboratorio promotor, conjuntamente con datos farmacocinéticos comparativos (ver apartado 1.3.4. Aspectos farmacocinéticos), datos de ensayos clínicos fase II que aportaran evidencia de la seguridad y eficacia comparable a la forma oral en el contexto de acondicionamiento asociado a ciclofosfamida. Ante ello se realizaron ensayos en el contexto de trasplante autólogo (OMC-BUS-3) (n=42) y alogénico (OMC-BUS-4, Andersson y cols) (n=62).

A continuación se describen los resultados de estos ensayos relativos a toxicidad, y en concreto a EVOH.

- OMC-BUS-3 A phase 2 study of high-dose iv busulfán and cyclophosphamide with autologous marrow or peripheral blood progenitor cell transplantation for hematologic malignancies y OMC-BUS-4 (n=62)¹²⁴.

En la siguiente tabla (Tabla 10 y 11) se incluye la comparativa de los efectos adversos observados en los dos estudios pivotaes comparados con la bibliografía de busulfán oral (fuente FDA. Medical Review. NDA Reviews⁶⁸)

Se debe indicar que en la mayoría de los estudios de busulfán oral no se realizó ajuste de dosis según concentraciones plasmáticas de busulfán.

Tabla 10. Comparativa de incidencia de efectos adversos observados en ensayo clínico OMC-BUS-3 y bibliografía de busulfán oral (fuente FDA. Medical Review. NDA Reviews).⁶⁸

Efecto adverso (%)	BU IV OMC-BUS-3	BU Oral Bibliografía
EVOH	2% (n=1)	3,2-6,1%
Mortalidad		
< día +28	0	-
< día +100	0	6,5-15%
>día +100	19% (n=8)	-
Pulmonar	2% (n=1)	-

Tabla 11. Comparativa de incidencia de efectos adversos observados en ensayo clínico OMC-BUS-4 y bibliografía de busulfán oral (fuente FDA. Medical Review. NDA Reviews).⁶⁸

Efecto adverso (%)	BU IV OMC-BUS-4	BU Oral Bibliografía
EVOH	8,2% (n=5)	5,9-12%
Mortalidad		
< día +28	3,3% (n=2)	-
< día +100	13,1% (n=8)	4,1-21%
>día +100	16,4% (n=10)	-
Pulmonar	8,2% (n=5)	3,9-16,9%
EICH	18% (n=11)	Aguda 26-41% Crónica 45%

También se dispone de los datos de los estudios publicados de Kashyap y cols¹²⁵, Thall y cols¹²⁶, Lee y cols¹²⁷ y Aggarwal C y cols¹²⁸ que a continuación se describen

- Kashyap y cols 2002¹²⁵

Estudio de análisis retrospectivo para evaluar la incidencia de EVOH y la mortalidad a los 100 días en dos cohortes de pacientes que han recibido el protocolo BuCy (busulfán-ciclofosfamida) para acondicionamiento para un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos: pacientes que habían recibido oral (n=30) (1mg/kg x 16 dosis) vs pacientes que lo han recibido IV (n=61) (0,8mg/kg x 16 dosis). En ninguna de las dos cohortes se informa si se realizó monitorización de concentraciones plasmáticas de busulfán. La evaluación de la EVOH se realizó según los criterios de McDonald modificados¹¹⁴.

La incidencia de EVOH fue 20% en el grupo oral y 5% en el grupo IV. La mortalidad a los 100 días fue 33% en el grupo oral y 13% en el grupo IV. En la realización de un análisis de regresión logística multivariante ajustado al nº de tratamientos previos, mostró que el uso de Bu oral vs IV es un predictor del desarrollo de EVOH (OR 7,5, p=0,002).

En la discusión los autores del estudio destacan la menor toxicidad del protocolo que incluye busulfán IV en base a la menor variabilidad de la cinética de esta presentación. Pero esta hipótesis no está contrastada ya que no disponemos de los datos de los perfiles cinéticos de los pacientes.

- Thall y cols 2004¹²⁶.

Estudio de cohortes retrospectivo en pacientes con LMC que reciben un trasplante alogénico y comparan la incidencia de EVOH y la mortalidad a los 100 días en pacientes que han recibido BuCy con busulfán IV (n=47) y una serie histórica de pacientes que han recibido BuCy con BU oral (n=618) (sin ajuste de dosis según concentraciones) o BU-TBI (n=882).

Aplicando un análisis bayesiano para evaluar la influencia del tratamiento en la probabilidad de morir a los 100 días, BuCy IV se mostró estadísticamente superior (0,54-0,99).

- Lee y cols 2005¹²⁷.

Estudio de cohortes retrospectivo en pacientes que reciben un trasplante alogénico y también compara la incidencia de EVOH en pacientes que han recibido BuCy con busulfán IV (n=55) y una serie histórica de pacientes que han recibido BuCy con BU oral (n=186) una serie histórica de pacientes que han recibido BuCy con BU oral. La incidencia de EVOH el grupo de busulfán IV es 41,7% y en el grupo BU IV es 18,5% y un análisis multivariante muestra que el grupo IV presenta un riesgo estadísticamente significativo menor de EVOH comparado con el grupo oral (p=0,006, OR=0.345)

- Aggarwal y cols. 2006¹²⁸

Análisis retrospectivo de una cohorte de pacientes con linfoma tratados con la combinación de busulfán, ciclofosfamida y etopósido, de los cuales reciben 18 busulfán oral y 31 busulfán IV. En el caso de los pacientes que recibieron busulfán IV se realizó individualización posológica de busulfán, con una AUC por dosis diana de 6.150ng.ml/h. Se observó una mortalidad no relacionada con recaída de 28% en la cohorte oral y 3% en la de IV, y la supervivencia a los 5 años fue 28% en la cohorte oral y 58% en la cohorte IV. Pero se debe considerar el sesgo de que sólo se individualizaba la dosis en la cohorte de busulfán IV.

Como ya se ha indicado, a partir de los estudios descritos, diferentes grupos de investigación desarrollaron y analizaron la hipótesis de la relación entre la exposición a busulfán y el riesgo de desarrollo de EVOH, llegándose finalmente a asociar un incremento de riesgo de desarrollo de EVOH en pacientes que reciben acondicionamiento con busulfán cuando la exposición al fármaco, expresada en área bajo la curva (AUC) es superior a 1500micromol x min.

El desarrollo y análisis de los estudios publicados en que se describe la relación entre la exposición a busulfán y la incidencia de EVOH se analiza en el apartado 1.6. Relación entre la farmacocinética y la farmacodinamia de busulfán, ya que es parte intrínseca de los objetivos del estudio de investigación desarrollado.

1.5.4.Toxicidad neurológica

La administración de dosis altas de busulfán se asocia con la presencia de convulsiones, tanto en su utilización por vía oral ^{129, 130} como por vía intravenosa⁵⁶ . El mecanismo de esta toxicidad continúa sin estar del todo definido, aunque podría estar relacionado con la cinética del busulfán en el líquido cefalorraquídeo (LCR). El busulfán penetra rápidamente en el sistema nervioso central, con una relación LCR: plasma de 0,99 y alcanzándose similares concentraciones, e incluso Hassan describe concentraciones mayores en LCR a las 20 horas post-última dosis⁵⁵ . En las series de casos descritos en la literatura, las convulsiones frecuentemente se observan tras la última dosis o en las 48 horas de finalizado el tratamiento de acondicionamiento^{129, 130} .

Debido a este riesgo de convulsiones por la administración de dosis altas de busulfán, se administran de manera profiláctica fármacos anticonvulsivantes. El fármaco con mayor descripción de utilización en la bibliografía es la fenitoina, aunque en algunas referencias se describe la utilización de benzodiazepinas. Por ejemplo Murphy describe una serie de pacientes (n=106) a los que tras la administración profiláctica de fenitona y su monitorización en el rango terapéutico de 10 a 20 mg/L, no se observó ningún caso de convulsiones¹³⁰ . La dosis habitualmente recomendada de fenitoina es una dosis de ataque de 15 mg/kg 24 horas antes del inicio de busulfán seguido de dosis de mantenimiento de 4 a 8 mg/kg/día hasta 24 horas de finalizado el tratamiento.

Otras toxicidades neurológicas relacionadas con la administración de busulfán son cefaleas (64%, graves 5%), insomnio (84%), ansiedad (75%), depresión (23%), incidencias descritas para la forma endovenosa⁵⁶ .

1.5.5.Toxicidad pulmonar

Está descrito tras la utilización de manera prolongada o dosis altas de busulfán el síndrome descrito como ~~pu~~ pulmón de busulfán+. Este síndrome se inicia con una displasia broncopulmonar con fibrosis intersticial y se caracteriza por tos, fiebre y disnea. En esta situación los estudios de función pulmonar muestran una capacidad de difusión disminuida. En muchos pacientes este síndrome ha progresado a insuficiencia respiratoria, a pesar de la suspensión del busulfán.

En la utilización conjunta de busulfán en dosis altas y ciclofosfamida, se han descrito muertes debido a neumonitis, de manera similar a las descritas asociadas al tratamiento conjunto de ciclofosfamida asociada a irradiación corporal total (TBI). En un estudio retrospectivo que comparaba la toxicidad de 2 regímenes de acondicionamiento para trasplante alogénico, se diagnosticó neumonía intersticial en el 21% de los pacientes que recibieron busulfán+ciclofosfamida versus 28% en los pacientes que recibieron ciclofosfamida combinada con TBI. Sin embargo esta toxicidad fue fatal en el 75% de los pacientes con busulfán comparado con el 54% de los pacientes con TBI. También hubo una mayor incidencia de neumonitis en los pacientes diagnosticados de leucemia mieloide crónica que en aquellos tratados por leucemia aguda (36% vs 7%, $p=0,003$)¹³¹.

Bilgrami y cols¹³² realizaron una evaluación retrospectiva de pacientes que habían recibido busulfán en dosis altas como régimen de acondicionamiento previo a trasplante de progenitores hematopoyéticos para analizar el riesgo de toxicidad pulmonar. De los resultados de este análisis se puede deducir que la toxicidad relacionada con altas dosis difiere del daño pulmonar producido por la utilización crónica de dosis bajas de busulfán. De un total de 271 pacientes, 3,7% (n=10) desarrollaron síndrome pulmonar intersticial idiopático, con una media de aparición de 102 días respecto la infusión de progenitores. Todos los pacientes habían recibido dosis altas y en periodos cortos de busulfán (16mg/kg en 4 días). La primera observación incluyó disnea, tos, hipoxemia y infiltrados, con o sin derrame pleural.

1.5.6.Toxicidad genitourinaria

Está descrita la relación entre la asociación de busulfán y ciclofosfamida previo a trasplante y cistitis hemorrágica, de igual manera que se produce cuando se utiliza como terapia de acondicionamiento ciclofosfamida asociada a TBI. En una serie de 256 niños que recibieron trasplante de progenitores hematopoyéticos con busulfán oral como tratamiento de acondicionamiento, la incidencia de cistitis hemorrágica fue 10,2%, observándose adicionalmente que los niños mayores de 7 años tenían mayores probabilidades de presentarla

($p=0,04$)¹³³. Los datos que el laboratorio que comercializa el busulfán endovenoso indica es una incidencia de cistitis hemorrágica grado 3/4 de 7%⁵⁶.

Se puede desarrollar en los pacientes tratados con busulfán hiperuricemia debida a un catabolismo de las purinas que acompaña a la destrucción celular, especialmente en aquellos con una alta carga tumoral. En estos casos se puede presentar nefropatía y fallo renal agudo.

1.5.7.Toxicidad endocrina

Un tema crucial en la decisión del acondicionamiento para trasplante de progenitores en niños es la afectación endocrina a largo plazo, y principalmente el retraso en el crecimiento. Urban y cols¹³⁴ analizaron este aspecto y observaron que busulfán presenta la ventaja versus TBI de no producir estos efectos, de igual manera que los estudios de Shankar y cols¹³⁵ y Giorgiani y cols¹³⁶. En cambio Wingard si observó este efecto, aunque se presentó en pacientes con enfermedad del injerto contra el huésped crónica y con irradiación craneal previa¹³⁷.

La utilización crónica de busulfán se ha relacionado con un síndrome clínico Addison-like en el que los pacientes presentan pérdida de peso, náuseas y vómitos, hiperpigmentación, anorexia y fatiga. Pesar de este cuadro clínico, no presentan el correspondiente déficit de función adrenocortical. Se puede producir reversibilidad tras la suspensión del busulfán.

La afectación de la función gonadal es comparable a la que se produce con la utilización de TBI, aunque no están disponibles los datos comparativos concluyentes. En hombres se puede producir azoospermia y atrofia testicular y en mujeres premenopáusicas supresión ovárica y amenorrea¹³⁸. Este fallo ovárico se describió en una serie de 10 niñas (de 2 a 17 años, media 9 años), asociado a dosis altas de busulfán (600 mg/m²) combinado con melfalán en acondicionamiento para trasplante autólogo¹³⁹. El fallo ovárico se evidenció por la ausencia de desarrollo puberal.

1.5.8.Otras toxicidades

La administración de busulfán se ha relacionado con el desarrollo de hiperpigmentación (incidencia 5-10%). También se puede relacionar este cuadro al síndrome Addison-like asociado a busulfán.

Otra toxicidad descrita al tratamiento con busulfán es el desarrollo de cataratas. En un análisis de seguimiento de 4 ensayos clínicos que comparaban busulfán-ciclofosfamida vs ciclofosfamida-TBI, la incidencia de cataratas evaluado a los 7 años asociadas al tratamiento de acondicionamiento de busulfán-ciclofosfamida fue 12,3% en pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) y 16% en pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC). En cambio en el grupo de pacientes que habían recibido ciclofosfamida-TBI estas incidencias fueron 12,4% en pacientes con LMA y 47% en pacientes con LMC¹⁴⁰.

También en este estudio de Socie en que se evalúan los efectos a largo plazo de la terapia de acondicionamiento en leucemia mieloide, se describe una incidencia de osteonecrosis del 6 y 7% en pacientes con LMA y 3 y 10% en pacientes con LMC con busulfán-ciclofosfamida y ciclofosfamida-TBI, respectivamente¹⁴⁰.

A nivel cardíaco se han descrito casos de fibrosis pericárdica asociada a tratamiento a largo plazo con busulfán en dosis convencionales para el tratamiento de la LMC^{141, 142}. También se describen en la ficha técnica de busulfán endovenoso incidencias de edemas de grado medio a moderado del 79% y ganancia de peso en el 8% de pacientes que reciben busulfán como acondicionamiento para un trasplante alogénico.

Un aspecto a considerar respecto a diferencias entre la forma oral y la endovenosa (IV) de busulfán es la seguridad de los excipientes. Debido a la pobre solubilidad de busulfán, los excipientes presentes en la presentación IV son polietilenglicol (PEG400) (67% V/V) y dimetilacetamida (DMA) (33% V/V), los dos relativamente tóxicos. La dosis de DMA que se administra a un paciente de 70 kg ue recibe la dosis habitual de 0,8mg/kg/6h al final de las 16 dosis es de 46g. Se debe considerar que el DMA puede saturar el aclaramiento hepático y que tiene toxicidades aditivas a busulfán.

1.5.9. Teratogenicidad y efectos en el embarazo y la lactancia

La clasificación de la capacidad teratogénica que la FDA asigna a busulfán es Categoría D, es decir que hay evidencia positiva del riesgo fetal humano, pero los beneficios en mujeres embarazadas puede ser aceptable. La razón de esta clasificación es que al ser busulfán un agente alquilante, al producir disminución en la proliferación celular y actuar primariamente en el ADN, teóricamente puede tener capacidad de actuar en las células de división del embrión. La capacidad teratogénica real basada en publicaciones es difícil de evaluar por el limitado número de publicaciones al respecto. También dependiendo del factores como estado de gestación, tipo de quimioterapia utilizada y naturaleza de la enfermedad hematológica, se describen diferentes efectos^{143, 144}. Bishop y cols¹⁴⁴ recogen una serie de 40 casos de utilización de busulfán durante el embarazo, de los cuales se realizaron 4 abortos. De los 36 embarazos restantes, nacieron 37 niños de los cuales 4 tuvieron anomalías al nacer.

Respecto a la administración en la lactancia, se desconoce el paso a leche materna. Pero la clasificación Thomson indica que debido a que los datos y las opiniones de expertos no son concluyentes, se debe sopesar el potencial beneficio versus los riesgos de la prescripción de este fármaco en mujeres en periodo de lactancia.

1.6. Relación entre la farmacocinética y la farmacodinamia de busulfán

1.6.1. Relación entre la exposición a busulfán y la toxicidad

a) *Relación entre exposición a busulfán y EVOH*

La asociación entre altas dosis de busulfán y EVOH es bien conocida (ver apartado 1.5. Efectos adversos). Como ya se ha indicado, a partir de los estudios descritos, diferentes grupos de investigación desarrollaron y analizaron la hipótesis de la relación entre la exposición a busulfán y el riesgo de desarrollo de EVOH, llegándose finalmente a asociar un incremento de riesgo de desarrollo de EVOH en pacientes que reciben acondicionamiento con busulfán cuando la exposición al fármaco, expresada en AUC es superior a 1500 micromol x min. A continuación se describen dichos estudios que a su vez se resumen en las tablas 12, 13 y 14:

a.1. Estudios con busulfán administrado oralmente

- ❖ Grochow LB, Jones RJ, Brundrett RB, Braine HG, Chen TL, Saral R, Santos GW, Colvin OM. Pharmacokinetics of busulfán: correlation with veno-occlusive disease in patients undergoing bone marrow transplantation. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 1989; 25: 55-61²⁸.

Estudio realizado por el equipo de Johns Hopkins Oncology Center de Baltimore, EEUU, y es el primer estudio que se analiza la relación entre incidencia de EVOH y exposición a busulfán.

En él se incluyeron 30 pacientes adultos y niños con varios diagnósticos (LMA n=18, sarcomas pediátricos n=4, linfoma Hodkin n=3 y otros n=5). La mayoría recibieron trasplante alogénico (n=16) (autotrasplante n=13 y singénico n=1). El régimen utilizado fue busulfán (1mg/kg x16 dosis) con ciclofosfamida (200mg/kg).

La incidencia de EVOH fue de 20% (6/30). La media de AUC 2012 micromol.min/l (± 1226) y rango 606-5144 micromol.min/l. Si adaptamos estas unidades a las utilizadas en los estudios posteriores, sería una media de AUC 8249 ng.h/ml (± 5027) y rango 2484-21090 ng.h/ml. Se encontró una relación estadísticamente significativa entre la incidencia de EVOH y AUC ($p > 0,0001$) y

mediante regresión logística multivariante, AUC fue el único factor predictor de EVOH encontrado.

A partir de estos datos, el equipo de investigación de este estudio analizaron la aportación de la individualización posológica de busulfán en base a concentraciones plasmáticas⁶¹.

- ❖ Vassal G, Deroussent A, Challine D, Hartmann O, Koscielny S, Valteau-Couanet D, Lemerle J, Gouyette A. Is 600mg/m² the appropriate dosage of busulfan in children undergoing bone marrow transplantation?. Blood 1992; 79: 2475-2479⁶⁰.

El objetivo del estudio de Vassal y cols es analizar si el cambio de dosificación de busulfán de mg/kg a mg/m² se adecua más a las necesidades de la población pediátrica, a través del estudio farmacocinético de busulfán. Los autores postulan que esta adecuación sería deseable para obtener mayor éxito en el implante del injerto.

Se incluyeron 27 niños que recibieron como acondicionamiento a autotrasplante, busulfán a la dosis de 600mg/m² (37,5mg/m²/6h x 16 dosis) asociado a diferentes fármacos (ciclofosfamida, cilcofosfamida y melfalán, ciclofosfamida y tiotepa, o a tiotepa). Los diagnósticos basales eran tanto tumores sólidos (tumor cerebral, neuroblastoma, sarcoma Swing), como leucemia.

Con la nueva dosis en mg/m² se observó una gran variabilidad interindividual con AUC media de 6404±2378 ng. h/ml (rango 3566 a 13129 ng. h/ml) y t_{1/2} entre un rango de 1,3 a 8,5 horas. Comparando con datos publicados y propios, los autores indican que la exposición sistémica a busulfán se incrementa con la dosificación en mg/m², asimilándose a la exposición observada en adultos y refleja las consecuencias de la farmacocinética edad-dependiente de busulfán.

Pero los datos de toxicidades extra-hematológicas indican una mayor incidencia que en otros estudios previos en que la dosificación era fija según mg/kg. La incidencia de EVOH es de 22%, superior a la que los propios autores habían descrito en la dosis de mg/kg 7%¹⁴⁵. También la incidencia de neurotoxicidad se incrementa de 1,7% a 15,4%¹²⁹.

La conclusión de los autores es que la optimización de la dosis de busulfán requiere una mayor individualización basada en monitorización de las concentraciones plasmáticas del fármaco.

- ❖ Schuler U, Schroer S, Kühnle A, Blanz J, Mewes K, Kumbier I, Proksch B, Zeller KP, Ehninger G. Busulfan pharmacokinetics in bone marrow transplant patients: is drug monitoring warranted?. Bone Marrow Transplant. 1994 Nov;14(5):759-65³³.

Estudio realizado en una muestra de 20 pacientes (19 adultos y 1 niño), en que el protocolo incluye busulfán a dosis de 16mg/kg. Se determinan las concentraciones de busulfán tras la primera administración. Los autores indican que el modelo farmacocinética les resulta inestable.

La incidencia de EVOH es 15% (3/20) y no se observa relación con la exposición a busulfán. Los autores indican que el papel de la individualización posológica de busulfán en base a concentraciones plasmáticas debe ser clarificado.

- ❖ Slattery J.T., Sanders J.E., Buckner C.D., Schafer R.L., Lambert K.W., Langer F.P., Anasetti C., Bensinger W.I., Fisher L.D., Appelbaum F.R., Hansen J.A.. Graft-rejection and toxicity following bone marrow transplantation in relation to busulfan pharmacokinetics. Bone Marrow Transplantation 1995; 16: 31-42¹⁴⁶.

Este estudio desarrollado en el centro Fred Hutchinson Cancer Research Center de Seattle sería el que establecería las bases más importantes de la relación entre la exposición a busulfán y éxito del trasplante. Pero también contiene análisis de la relación con toxicidad, y por ello se incluye en este apartado.

Se incluyeron 42 pacientes (adultos y niños) con una gran variedad de diagnósticos, aunque el 67% eran oncológicos, y la mayoría recibían acondicionamiento para trasplante alogénico (sólo se incluyeron 7% trasplantes

antólogos). El protocolo utilizado era la asociación de busulfán (dosis 16-30mg/kg) con ciclofosfamida (120-200mg/kg).

La incidencia de EVOH observada fue de 53% en los adultos y 26% en los niños según criterios de McDonalds y cols¹¹³.

Se observó una correlación estadísticamente significativa entre la gravedad de la toxicidad relacionada con el procedimiento según los criterios de Bearman y cols¹⁴⁷ y la exposición a busulfán según el parámetro de concentración en el estado de equilibrio estacionario (C_{ss}) ($r=0,717$, $p>0,0001$). A su vez se observó que la incidencia de toxicidades graves (grado 3 o 4) era menor (1/31) en los pacientes con $C_{ss}<900\text{ng/ml}$ y mayor cuando $C_{ss}>900\text{ng/ml}$ (4/11). Las toxicidades graves mayoritariamente observadas fueron EVOH y síndrome de distrés respiratorio.

- ❖ Dix SP, Wingard JR, Mullins RE, Jerkunica I, Davidson TG, Gilmore CE, York RC, Lin LS, Devine SM, Geller RB, Heffner LT, Hillyer CD, Holland HK, Winton EF, Saral R. Association of busulfan area under the curve with veno-occlusive disease following BMT. *Bone Marrow Transplantation* 1996; 17: 225-30¹⁴⁸.

Estudio en el que se analiza la relación entre exposición a busulfán y EVOH, pero a diferencia de los anteriores ya se realiza individualización posológica de busulfán en base a concentraciones plasmáticas.

Se incluyeron 68 pacientes adultos y adolescentes con una variedad de patologías oncológicas. Los regimenes utilizados fueron busulfán asociado a ciclofosfamida, a ciclofosfamida y citarabina y ciclofosfamida y etopósido. La individualización posológica se realizó tras la evaluación de la AUC en la primera administración según los criterios del estudio de Grochow y cols⁶¹ (si $AUC>1500\text{ micromol}\cdot\text{min/l}$ o $6150\text{ ng}\cdot\text{h/ml}$ se ajustó la dosis).

Los resultados muestran una media de AUC $1304\pm 380\text{ micromol}\cdot\text{min/l}$ ($5346\pm 1558\text{ ng}\cdot\text{h/ml}$). En el 35,3% de los pacientes en que se pudo evaluar AUC estaba por encima de $6150\text{ ng}\cdot\text{h/ml}$ (18/51), pero en sólo 10 se redujo la dosis.

La incidencia de EVOH observada fue 18,2% (12/66). De los pacientes en que se pudo evaluar AUC ($n=51$), el 33% de los que $AUC>6150\text{ ng}\cdot\text{h/ml}$ desarrollaron EVOH frente a 3% de los que $AUC<6150\text{ ng}\cdot\text{h/ml}$ (riesgo relativo 11,1, $p=0,0056$).

- ❖ Ljungman P, Hassan M, Békássy AN, Ringdén O, Öberg G. High busulfan concentrations are associated with increased transplant-related mortality in allogenic bone marrow transplant patients. *Bone Marrow Transplantation* 1997; 20: 909-13¹⁴⁹.

Este estudio se desarrolló por el equipo investigador de Karolinska Institute de Suecia y el objetivo fue el análisis de la importancia de las concentraciones de busulfán en la mortalidad relacionada con el trasplante. Se incluyeron 172 pacientes adultos y niños, 87 recibieron autotrasplante y 85 alotrasplante para patologías oncológicas, siendo la leucemia mieloide aguda la patología mayoritaria (60%). En todos ellos el protocolo utilizado fue busulfán 16mg/kg y ciclofosfamida 120mg/kg.

La C_{ss} media fue 593 ng/ml (rango 111-1512ng/ml). Se observó una tendencia de correlación entre la C_{ss} y la mortalidad relacionada con el trasplante (TRM), aunque no estadísticamente significativa ($r^2=0,12$, $p=0,07$). A través de modelo de cuarteles, se observó que los pacientes con C_{ss} ≤ 721 ng/ml tenían una mayor TRM vs los pacientes con C_{ss} >721 ng/ml (29% vs 14%, $p=0,01$). La toxicidad mayoritaria era la EVOH (5% en el grupo C_{ss} ≤ 721 ng/ml vs 2% en el grupo C_{ss} >721 ng/ml).

- ❖ Chan MY, Pinell W, Lanza C, Gerritsen B, Webbs D, Veys P. Correlation of busulphan levels and clinical outcome in bone marrow transplant in children. *Bone Marrow Transplantation* 1997; 20: S4: O15¹⁵⁰.

En este estudio se estudió la correlación entre las concentraciones de busulfán y la toxicidad en una población pediátrica (n=47). Los regímenes en los que se combinó busulfán fueron: con ciclofosfamida (n=39), etoposido y ciclofosfamida (n=7) y melfalán (n=2). El tipo de trasplante realizado incluyó tanto auto-trasplante como alogénico, tanto de donante emparentado como no emparentado.

La media de AUC fue 1744 micromol/l/min (rango 426-3505 micromol/l/min) (según unidades previamente descritas media 7150 ng.h/ml y rango 1747-14370 ng.h/ml). Desarrollaron EVOH 9 pacientes (19%). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la AUC media entre los pacientes

con y sin EVOH (1933 micromol/l/min vs 1700 micromol/l/min o 7925 vs 6970 ng.h/ml, $p=0,27$). Sin embargo el 45% de los pacientes con EVOH tenían una $AUC>2000$ micromol/l/min (8200 ng.h/ml) comparado con los pacientes sin EVOH, que tan sólo el 25% tenían $AUC>2000$ micromol/l/min.

- ❖ Copelan EA, Bechtel TP, Avalos BR, Elder PJ, Ezzone SA, Scholl MD, Penza SL. Busulfan levels are influenced by prior treatment and are associated with hepatic veno-occlusive disease and early mortality but not with delayed complications following marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2001; 27: 1121-24⁶³.

Estudio desarrollado en una muestra de 28 pacientes (tanto adultos como niños) con diagnósticos oncológicos (75% leucemia o síndrome mieslodisplásico) que recibieron trasplante de progenitores hematopoyéticos (78% alogénico). En todos los pacientes el protocolo de acondicionamiento fue busulfán 16mg/kg y ciclofosfamida 120mg/kg. La evaluación de EVOH se realizó según criterios McDonald (McDonalds, 1984) y la toxicidad relacionada con el procedimiento según criterios Bearman¹⁴⁷.

Los resultados muestran una media de AUC 4780ng.h/ml (± 2160 ng.h/ml). No se encontró correlación entre exposición a busulfán y el diagnóstico, aunque si se observó que los pacientes que no habían recibido quimioterapia o una quimioterapia de baja intensidad presentaron una AUC y C_{max} menor que los que habían recibido quimioterapias de intensidad ($p=0,02$ y $p=0,03$ respectivamente).

La incidencia de EVOH fue de 36% (10/28), encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre esta incidencia de EVOH y AUC ($p=0,03$), no encontrándose con C_{max} . También se encontró relación entre la mortalidad temprana (<6 meses del procedimiento) y AUC ($p=0,006$), pero no con recaída, supervivencia libre de eventos, bronquiolitis y enfermedad de injerto contra huésped (GVHD).

- ❖ Bouligand J, Boland I, Valteau-Couanet D, Deroussent A, Kalifa C, Hartmann O, Vassal G. In children and adolescents, the

pharmacodynamics of high-dose busulfan is dependent on the second alkylating agent used in the combined regimen (melphalan or thiotepa).

Bone Marrow Transplant. 2003;32(10):979-86¹⁵¹.

Estudio prospectivo que explora la farmacodinamia de busulfán combinado con melfalán (n=25) o con tiotepa (n=20) seguido de trasplante autólogo en niños y adolescentes con tumores sólidos. La dosis de busulfán administrada es 600mg/m² y no se indica que se realice ajuste posológico según concentraciones plasmáticas. No se observa diferencias en la exposición a Bu y incidencia de EVOH en el grupo BuMel y si se observa en el grupo BuTTP, ya que los pacientes que desarrollan presentan una AUC tras la 13 dosis mayor (6.201±607 ng.h/ml) que los que no presentan (5.024±978 ng.h/ml) (p<0,05).

Tabla 12. Estudios que analizan la relación entre exposición a busulfán oral y incidencia de EVOH

Autores	N	Adultos/ niños	Acondicionamiento	Diagnóstico	Parámetros farmacocinéticos	Incidencia EVOH	Relación EVOH vs Bu exposición
Grochow 1989 ²⁸	30	Si/Si	Bu16mg/kg CY 200mg/kg	LMA, sarcomas pediátricos, E. Hodgkin, otros	AUC Media 8249 ng.h/ml (±5027), rango 2484-21090 ng.h/ml.	20% (6/30)	Correlación AUC vs EVOH (p<0,0001) AUC único predictor de EVOH
Vassal 1992 ⁶⁰	27	No/Si	Bu 600mg/m ² + CY ±melfalán y tiotepa +tiotepa	T. cerebral, neuroblastoma LMA, sarcoma Ewing	AUC Media 6404 ng.h/ml (±2378), rango 3566-13129 ng.h/ml.	22%	Incidencia superior a población con dosis Bu mg/kg (7%)
Schuler 1994 ³³	20	Si/Si (n=1)	Bu 16mg/kg +?			15% (3/20)	No correlación EVOH vs exposición Bu
Slattery 1995 ¹⁴⁶	42	Si/Si	Bu 16-30mg/kg CY 120-200mg/kg	67% cáncer (LMA, LMC, SMD)		53% adultos 26% niños	Correlación entre TRP y (Css) (r=0,717, p>0,0001). Incidencia de toxicidades graves (grado 3 o 4) era menor (1/31) en los pacientes con C _{ss} <900ng/ml y mayor cuando C _{ss} >900ng/ml (4/11). Las toxicidades graves mayoritariamente observadas fueron EVOH y síndrome de distrés respiratorio.
Dix 1996 ¹⁴⁸	68	Si/No	Bu con TDM +CY ±citarabina		AUC Media 5346±1558 ng.h/ml En el 35,3% de los pacientes en que se puedo evaluar AUC estaba por encima de 6150 ng.h/ml (18/51), pero en sólo 10 se redujo la dosis.	18,2% (12/66).	33% de los que AUC>6150ng.h/ml desarrollaron EVOH frente a 3% de los que AUC<6150ng.h/ml (riesgo relativo 11,1, p=0,0056).

Ljungman 1997 ¹⁴⁹	172	Si/Si	Bu16mg/kg CY 200mg/kg		Css Media 593 ng/ml Rango 111-1512ng/ml		Se observó una tendencia de correlación entre la Css TRM, aunque no estadísticamente significativa ($r^2=0,12$, $p=0,07$). Css ⁻ 721ng/ml tenían una mayor TRM vs Css \bar{m} 721ng/ml (29% vs 14%, $p=0,01$). La toxicidad mayoritaria era la EVOH (5% en el grupo Css ⁻ 721ng/ml vs 2% en el grupo Css \bar{m} 721ng/ml).
Chan 1997 ¹⁵⁰	47	No/Si	Bu 8-24mg/kg +CY 120-200mg/kg (n=39) +CY+etoposido (n=7) +Melfalán (n=2)	Immunodeficiencias Leucemia Otros	AUC Media 7150 ng.h/ml Rango 1747-14370 ng.h/ml	19% (9/47)	No se encontró diferencias estadísticamente significativas en la AUC EVOH. Sin embargo 45% de los pacientes con EVOH tenían una AUC>8200 ng.h/ml) comparado con los pacientes sin EVOH, que tan sólo el 25% tenían AUC>8200ng.h/ml
Copelan 2001 ⁶³	28	Si/Si	Bu16mg/kg CY 120mg/kg	Oncológicos (75% leucemias y SMD)	AUC Media 4780 ng.h/ml ± 2160	36% (10/28)	Entre esta incidencia de EVOH y AUC ($p=0,03$), no con Cmax. Relación entre la mortalidad temprana (<6 meses del procedimiento) y AUC ($p=0,006$), pero no con recaída, supervivencia libre de eventos, bronquiolitis y enfermedad de injerto contra huésped (GVHD).
Bouligand 2003 ¹⁵¹	45	No/Si	Bu 600mg/m2 + Melfalán (BuMel) O Tiotepa (BuTTP)	Oncológicos	AUC	44% BuMel (IC95% 23- 65%) 25% BuTTP (IC95%9- 49%)	No se observa diferencias en la exposición a Bu y incidencia de EVOH en el grupo BuMel y si se observa en el grupo BuTTP, ya que los pacientes que desarrollan presentan una AUC tras la 13 dosis mayor (6.201±607 ng.h/ml) que los que no presentan (5.024±978 ng.h/ml) ($p<0,05$).

Bu:busulfán; CY: ciclofosfamida ; TDM: individualización posológica según concentraciones plasmáticas; LMA: leucemia mieloide aguda; LMC: leucemia mieloide crónica; SMD: síndrome mielodisplásico; AUC: área bajo la curva (se expresa en ng.h/ml a partir de los datos de los estudios); Css: concentración en equilibrio estacionario; TRP: toxicidad relacionad con el procedimiento; TRM: mortalidad relacionada con el trasplante

a.2. Estudios con busulfán administrado parenteralmente

Los estudios pivotaes de busulfán IV incluyen el análisis de la farmacocinética y de la toxicidad, incluida la EVOH. Estos datos se puede comparar con los datos disponibles de la forma oral de manera indirecta y también se dispone de algún estudio que compara ambas administraciones, aspecto que es analizado en el apartado c) (ver apartados correspondientes, Farmacocinética y Efectos adversos y a) y b)).

En resumen podemos decir que estos estudios mayoritariamente son retrospectivos (3 de 5), con un tamaño pequeño (rango 21-72) y su no analizan directamente la correlación entre la exposición y la EVOH.

En la gran mayoría de ellos se realiza individualización de la dosis en base a concentraciones plasmáticas del fármaco (4 de 5).

A continuación se describen los 5 estudios que analizan la relación entre la farmacocinética de busulfán administrado por vía IV y la toxicidad en términos de EVOH:

- ❖ Andersson BS, Thall PF, Madden T, Couriel D, Wang X, Tran H, Anderlini P, de Lima M, Gajewski J, Champlin R. Busulfan systemic exposure relative to regimen-related toxicity and acute graft-versus-host disease: defining a therapeutic window for IV BuCy2 in chronic myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8:477-85⁵.

Bajo la hipótesis que la exposición a busulfán se correlaciona con la toxicidad, los autores de este estudio analizan la mortalidad y la incidencia de toxicidad, incluida la hepática, en una cohorte de pacientes con leucemia mieloide crónica que reciben el protocolo BuCy con busulfán IV (0,8mg/kg x 16 dosis) como acondicionamiento para trasplante (n=36). Se realizó análisis farmacocinética en la dosis 1 con posterior ajuste de dosis a partir de la dosis 3 según el perfil cinético (AUC diana 1250µMol-min).

Ningún paciente desarrollo EVOH, y por ello se utilizó la elevación de bilirrubina en la evaluación de la toxicidad hepática. Se observó una diferencia estadísticamente significativa en la probabilidad de desarrollar hepatotoxicidad

en los pacientes con un AUC mayor ($p>0,01$). El riesgo de morir fue significativamente menor en los pacientes con AUC entre 950 y 1520 $\mu\text{Mol}\cdot\text{min}$, mientras que el riesgo fue mayor en pacientes con AUC menores o mayores a este intervalo.

- ❖ Williams CB, Day SD, Reed MD, Copelan EA, Bechtel T, Leather HL, Wingard JR, Abbott BL, Abhyankar S, McGuirk JP. Dose modification protocol using intravenous busulfan (Busulfex) and cyclophosphamide followed by autologous or allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in patients with hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2004;10(9):614-23¹⁵².

Los autores de este estudio evalúan la seguridad de la administración de busulfán IV asociado a ciclofosfamida a través de un modelo de modificación de dosis en 5 cohortes de pacientes y se realiza determinación de concentraciones plasmáticas en la primera y última dosis de busulfán. En la cohorte 5, en que la administración de busulfán era a dosis 3,2mg/kg cada 24 horas por 4 dosis, 2 de 3 pacientes con el $\text{AUC}>6.000\mu\text{M}\cdot\text{min}$ (equivalente a 24.100 ng*h/ml) desarrollaron EVOH confirmada por autopsia. Los autores concluyen no recomendando esta dosis por excesiva toxicidad.

- ❖ Zwaveling J, Bredius RG, Cremers SC, Ball LM, Lankester AC, Teepe-Twiss IM, Egeler RM, den Hartigh J, Vossen JM. Intravenous busulfan in children prior to stem cell transplantation: study of pharmacokinetics in association with early clinical outcome and toxicity. *Bone Marrow Transplant.* 2005;35(1):17-23¹⁵³.

Estudio retrospectivo que analiza la farmacocinética de busulfán IV en la primera dosis y tras ella realizan individualización posológica del fármaco. La población es pediátrica ($n=31$) con diversas patologías (leucemias y otras patologías oncológicas, inmunodeficiencias y otras). En el 35% de los pacientes consiguieron una AUC global en el AUC diana, mientras que el resto estuvieron por debajo. No observan relación del AUC ni con toxicidad ni con eficacia (recaída e implante).

- ❖ Schechter T, Finkelstein Y, Doyle J, Verjee Z, Moretti M, Koren G, Dupuis LL. Pharmacokinetic disposition and clinical outcomes in infants and children receiving intravenous busulfan for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007 ;13(3):307-14¹⁵⁴

Los autores realizan un análisis retrospectivo de la relación de la farmacocinética de busulfán IV con los resultados del trasplante en una población pediátrica (n=45). La dosis inicial se calculó en base al peso actual y se realizó individualización posológica con los datos de AUC. Los datos mostraron una relación inversa ya que el desarrollo de EVOH tuvo relación con una menor C max y ninguna relación con el resto de parámetros (AUC individual o total o CI). Esta relación es definida como estadísticamente significativa por los autores, pero con valor clínico marginal.

- ❖ Perkins JB, Kim J, Anasetti C, Fernandez HF, Perez LE, Ayala E, Kharfan-Dabaja MA, Tomblyn MR, Sullivan DM, Pidala JA, Field TL. Maximally tolerated busulfan systemic exposure in combination with fludarabine as conditioning before allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(7):1099-107¹⁵⁵.

Perkins y cols realizan un estudio prospectivo en que el protocolo utilizado en es busulfán administrado IV y en dosis única diaria a tres niveles planificados de exposición (AUC diario de 6.000, 7.500 y 9.000 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$), asociado a fludarabina (40mg/m²) por 4 días. La incidencia de EVOH fue 0% en los 40 pacientes del nivel de exposición de 6.000 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$, 7% en los 29 pacientes del nivel 7.500 y 100% en los 3 pacientes del nivel 9.000. También se observó un incremento de incidencia de dermatitis (p<0,01) y toxicidad pulmonar (p<0,01) relacionada con AUC mayores.

Tabla 13. Estudios que analizan la relación entre exposición a busulfán IV y incidencia de EVOH

Autores	N	Adultos/niños	Acondicionamiento	Diagnóstico	Parámetros farmacocinéticos	Relación EVOH vs Bu exposición
Andersson 2002 ⁵	36	Adultos	Bu-CY	LMC	AUC	Ningún paciente desarrollo EVOH, y por ello se utilizó la elevación de bilirrubina en la evaluación de la toxicidad hepática. Se observó una diferencia estadísticamente significativa en la probabilidad de desarrollar hepatotoxicidad en los pacientes con un AUC mayor ($p>0,01$)
Williams 2004 ¹⁵²	21	Adultos	5 cohortes cons dosis variables de Bu, cada 6h y dosis única al día	Oncológicos	AUC	En cohorte 5, 2 de 3 pacientes con AUC alta desarrollaron EVOH
Zwaveling 2005 ¹⁵³	31	Niños	Diversos (con individualización posológica Bu)	Oncológicos y diversos	AUC	No relación, considerar que se individualiza la dosis de Bu
Schechter 2007 ¹⁵⁴	45	Niños	Diversos (con individualización posológica Bu)	Oncológicos y diversos	C _{max}	Desarrollo de EVOH en niños con C _{max} menor ($4,2\pm 0,68$ vs $4,8\pm 0,73$ μM $p=0,035$) (relación inversa).
Perkins 2012 ¹⁵⁵	72	Adultos	Bu-Flu (40mg/m ² x 4 días) (con individualización posológica Bu y 3 niveles de exposición)	Oncológicos	AUC	Relación entre el nivel de exposición e incidencia de EVOH.

Bu: busulfán; CY: ciclofosfamida ; TDM: individualización posológica según concentraciones plasmáticas; LMA: leucemia mieloide aguda; LMC: leucemia mieloide crónica; SMD: síndrome mielodisplásico; AUC: área bajo la curva (se expresa en ng.h/ml a partir de los datos de los estudios); C_{ss}: concentración en equilibrio estacionario; TRP: toxicidad relacionad con el procedimiento; TRM: mortalidad relacionada con el trasplante

a.3. Estudios con comparación entre busulfán oral y parenteral

El análisis comparado de la farmacocinética y consecuentemente la exposición a busulfán oral vs IV y la toxicidad en términos de EVOH se analiza en 2 estudios, aunque en ninguno de ellos es el objetivo principal.

Como se ha indicado en el apartado de efectos adversos, en estudios como los de Kashyap y cols¹²⁵, la incidencia de EVOH es menor en las cohortes de pacientes que reciben busulfán IV que en las cohortes que reciben oral. Pero a partir de aquí establecer la hipótesis de que esta menor incidencia es debido a una correlación entre exposición y toxicidad no se puede realizar de manera directa ya que en los estudios diseñados con este fin^{156, 157} (Mamlouk 2005, Zhang 2012), no se observa esta relación y es importante tener en consideración que en ellos se realiza individualización de la dosis en base a concentraciones plasmáticas del fármaco.

A continuación se describen dichos estudios:

- ❖ Mamlouk K, Saracino G, Berryman RB, Fay JW, Pineiro LA, Vance EA, White M, Sandler I, Agura ED. Modification of the Bu/Cy myeloablative regimen using daily parenteral busulfan: reduced toxicity without the need for pharmacokinetic monitoring. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35(8):747-54¹⁵⁶.

Estudio prospectivo de 3 cohortes de pacientes que reciben régimen mieloalbativo de Bu/Cy previo al trasplante (2 que reciben busulfán IV en dosis una vez al día o cada 6 horas y otra que reciben la dosis oral). Se realizó análisis farmacocinético e individualización posológica. No se observó diferencias entre los grupos en la incidencia de toxicidad hepática ni neurológica, ni en implante o recaída. Sólo se observó diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de enfermedad del implante contra el huésped aguda, siendo menor en la cohorte de busulfán IV administrado una vez al día que en los otros dos grupos.

- ❖ Zhang H, Graiser M, Hutcherson DA, Dada MO, McMillan S, Ali Z, Flowers CR, Waller EK. Pharmacokinetic-directed high-dose busulfan combined with

cyclophosphamide and etoposide results in predictable drug levels and durable long-term survival in lymphoma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(8):1287-94¹⁵⁷.

Análisis retrospectivo de una cohorte de pacientes con linfoma tratados con la combinación de busulfán, ciclofosfamida y etopósido, de los cuales reciben 95 busulfán oral, 113 busulfán IV cada 6 horas (IV16) y 86 IV en administración única diaria (IV4). En todos los casos se realiza individualización posológica de busulfán, con una AUC global predefinida de $20.000\mu\text{M}\cdot\text{min}$ (equivalente a $82.000\text{ng}\cdot\text{h}/\text{ml}$). La mortalidad a 100 días fue del 2,1%, 3,6% y 3,5% para las cohortes de oral, IV16 y IV4 y la supervivencia global fue 57% (IC95% 45-66%) en la cohorte oral y 64% (IC95% 53-73%) en la cohorte de IV. A nivel de toxicidad hepática, no se observó ningún paciente con EVOH.

Tabla 14. Estudios que comparan la relación entre exposición a busulfán oral y IV y incidencia de EVOH

Autores	N Oral/IV	Adultos/ niños	Acondicionamiento	Individualización posológica Bu	Parámetros farmacocinéticos	Relación EVOH vs Bu oral o IV y exposición
Mamlouk 2005 ¹⁵⁶	25/31	Adultos	Bu-CY en 3 cohortes de dosis, una de ellas oral (con individualización posológica Bu)	Si	AUC	No relación, considerar que se individualiza la dosis de Bu
Zhang 2012 ¹⁵⁷	95/199	Adultos	Bu-CY-etoposido	Si	AUC	Ningún paciente desarrolla EVOH. No relación, considerar que se individualiza la dosis de Bu

Bu:busulfán; CY: ciclofosfamida ; TDM: individualización posológica según concentraciones plasmáticas; LMA: leucemia mieloide aguda; LMC: leucemia mieloide crónica; SMD: síndrome mielodisplásico; AUC: área bajo la curva (se expresa en ng.h/ml a partir de los datos de los estudios); Css: concentración en equilibrio estacionario; TRP: toxicidad relacionad con el procedimiento; TRM: mortalidad relacionada con el trasplante

b) Relación entre otras toxicidades y exposición a busulfán

Aunque la EVOH es la toxicidad de mayor importancia y limitante a nivel clínico de la administración de busulfán en dosis altas y a la vez la más analizada en diferentes estudios, también es de interés referenciar que se ha estudiado la relación entre exposición y la mortalidad en los 100 días post trasplante. Ljungman y cols¹⁴⁹ analizaron la importancia de las concentraciones de busulfán en la mortalidad relacionada con el trasplante. Se incluyeron 172 pacientes adultos y niños, 87 recibieron autotrasplante y 85 alotrasplante para patologías oncológicas, siendo la leucemia mieloide aguda la patología mayoritaria (60%). En todos ellos el protocolo utilizado fue busulfán 16mg/kg y ciclofosfamida 120mg/kg. Se observó una tendencia de correlación entre la C_{ss} y la mortalidad relacionada con el trasplante (TRM), aunque no estadísticamente significativa ($r^2=0,12$, $p=0,07$). También se observó que los pacientes con C_{ss} ≤ 721 ng/ml tenían una mayor TRM vs los pacientes con C_{ss} >721 ng/ml (29% vs 14%, $p=0,01$). En el estudio de Zhang y cols¹⁵⁷, artículo referenciado en el apartado anterior, la mortalidad a 100 días fue 2,1%, 3,6% y 3,5% para las cohortes de oral, IV16 y IV4, no observando diferencias significativas, pero se debe considerar que se realizaba individualización posológica.

Otro efecto adverso relacionado con la exposición a busulfán estudiado en diferentes trabajos es la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH). Una mayor exposición a busulfán podría producir una mayor incidencia de EICH, pero los datos no han sido concluyentes y también se puede indicar que los estudios eran con n pequeñas.

En los ensayos de desarrollo de busulfán IV, Andersson y cols⁵ en una cohorte de pacientes con LMC (n=36) que recibieron un AloTPH y un régimen de BuCy encontraron que había relación entre AUC de busulfán y GVHD aguda ($p<0,01$).

En cambio dos estudios no han encontrado relación^{156, 158}. El estudio de Baker y cols¹⁵⁸ se realizó en una cohorte de 52 pacientes pediátricos con LMA y no se observó ninguna influencia de la exposición de busulfán sobre la incidencia de

GVHD. Mamlouk y cols¹⁵⁶ realizaron un estudio prospectivo de 3 cohortes de pacientes que reciben régimen mieloalbativo de By/Cy previo trasplante, siendo la dosis de busulfán individualizada según AUC, y no se observó diferencias entre las cohortes en toxicidad, excepto en la incidencia de enfermedad del implante contra el huésped aguda, siendo menor en la cohorte de busulfán IV administrado una vez al día que en los otros dos grupos (oral y IV cada 6 horas).

Vassal y cols¹²⁹ observaron que la neurotoxicidad aguda por busulfán era dosis dependiente en niños cuando ajustaron la dosis de busulfán por superficie corporal en vez de por peso (15,4% vs 1,7%). Se debe indicar que la dosis por superficie corporal genera una mayor exposición que la dosis por kg de peso.

La alopecia es una complicación del TPH desde el punto de vista del paciente. En un estudio publicado en 1995¹⁵⁹ se analizó la influencia de las concentraciones de busulfán en el desarrollo de alopecia a largo plazo, observando tras un análisis multivariante una relación (OR 3,43; IC95% 3,04-3,88).

1.6.2. Relación entre la exposición a busulfán y eficacia

El mayor objetivo de los agentes utilizados en los regímenes de acondicionamiento para TPH es generar un efecto antitumoral y, en el caso de alotrasplantes, inmunodeprimir suficientemente al paciente para facilitar el implante. Ante ello, se han realizado diferentes estudios analizando la relación entre la exposición de busulfán y el objetivo terapéutico, tanto en éxito del implante como en no recaída.

Se puede resumir que hay menor número de estudios y que además en dichos estudios las evidencias son menos robustas que los que relacionan la exposición del fármaco con la toxicidad, aunque se marca una tendencia. La hipótesis que generan la visión global de los estudios es que el equilibrio entre recaída y éxito del implante tendría que ver con establecer un margen en la exposición de busulfán que permitiese este correcto efecto antitumoral a la vez que permitir el implante, pero por ahora este margen no está claramente definido.

a) Fallo del implante

Diversos estudios han analizado la asociación entre exposiciones bajas a busulfán y fallo del implante, siendo contradictorios en los resultados y todos ellos son con busulfán administrados por vía oral y todos excepto uno de ellos en población pediátrica (Tabla 15).

El estudio exploratorio de Hobbs y cols¹⁶⁰ pone las bases de la relación entre dosis de busulfán, y consecuentemente exposición, e implante del injerto. Sobre todo el análisis es en niños, donde se observa menor % de implante que en el adulto, también por menores exposiciones, como estudios posteriores demuestran. Y este estudio llevó a diferentes autores proponer utilizar dosis más altas en niños^{42, 60}.

En 1995 se publicó el estudio de Slaterry y cols¹⁴⁶ en que en una cohorte de pacientes adultos y pediátricos (n= 42) que recibieron BuCy (busulfán oral) encontraron que las concentraciones en el estado de equilibrio estacionario de busulfán (Css) eran determinantes en el rechazo del implante (p=0,0154).

Posteriormente, se publican dos estudios con una población exclusivamente pediátrica que recibieron BuCy con datos contradictorios entre sí. En 1997, los datos de Pawlowska¹⁶¹ no encuentran relación entre ningún parámetro farmacocinético e implante del injerto. En cambio el grupo de Bolinger y cols¹⁶² observa que la concentración de busulfán en el estado de equilibrio estacionario (Css) <600ng/ml se correlacionan con recuperación autóloga y a través de modelo logístico predicen que hay un 90% de probabilidad de implante si $C_{ss} > 639 \text{ ng/ml}$ y 95% si $> 762 \text{ ng/ml}$.

A su vez Jacobson y cols¹⁶³ diferenciaron que la exposición a busulfán tenía relación con el implante temprano (<6 meses) ($p=0,063$) pero no en cambio con el implante tardío.

En el 2002 el grupo de McCune¹⁶⁴ publican un estudio con población pediátrica y observan que Css fue el único predictor estadísticamente significativo estadísticamente del rechazo ($p=0,0024$) en un análisis de regresión logística, con un riesgo de rechazo que disminuye con el incremento de Css. Y por último Chandy y cols¹⁶⁵ analizan la relación entre la concentración valle en la primera dosis y rechazo del implante en una población pediátrica ($n=94$) y se observa una relación entre la concentración valle tras primera dosis <150ng/ml y mayor probabilidad de implante.

Tabla 15. Estudios que analizan la relación entre exposición a busulfán y fallo de implante.

Autores	N	Adultos/niños	Acondicionamiento	Parámetros farmacocinéticos	Relación vs Bu exposición
Slattery 1995 ¹⁴⁶	42	Si/Si	Bu oral-CY	C _{ss}	Si, las concentraciones en el estado de equilibrio estacionario de busulfán (C _{ss}) eran determinantes en el rechazo del implante (p=0,0154).
Pawlowska 1997 ¹⁶¹	64	No/Si	Bu oral-CY	AUC	No encuentran relación entre ningún parámetro farmacocinético e implante del injerto
Bolinger 2000 ¹⁶²	35	No/Si	Bu oral (14-20mg/kg) -CY	C _{ss}	Si se observa relación a) través del test Wilcoxon rank sum, se observe que C _{ss} <600ng/ml se correlaciona con recuperación autóloga b) modelo logístico predice que hay 90% probabilidad de implante si C _{ss} >639ng/ml y 95% si >762ng/ml
Jacobson 2001 ¹⁶³	39	No/si	Bu oral-CY-ICT	C _{ss}	Si observan relación entre implante temprano (<6 meses) (p=0,0063) y no observan con implante tardío (≥ 6 meses)
McCune 2002 ¹⁶⁴	53	No/Si	Bu oral-CY	C _{ss}	Si, C _{ss} fue el único predictor significativo estadísticamente (p=0,0024) en rechazo en un análisis de regresión logística,

					con un riesgo de rechazo que disminuye con el incremento de css
Chandy 2005 ¹⁶⁵	94	No/Si	Bu oral (600mg/m2 y 16mg/kg)-CY	Concentración valle en primera dosis	Si se observa relación entre concentración valle tras primera dosis <150ng/ml y mayor probabilidad de implante

Bu :busulfán; CY: ciclofosfamida ; ICT: irradiación corporal total; Css: concentración en equilibrio estacionario; AUC área bajo la curva

b) Recaída

Como ya se ha indicado, el mayor objetivo de busulfán junto con el resto de los agentes utilizados en los regímenes de acondicionamiento para TPH es generar un efecto antitumoral. Ante ello se podría plantear la hipótesis que a menores niveles de exposición a busulfán, mayor posibilidad de recaída, aunque considerando también que si estas exposiciones favorecen la presencia de EICH, ello facilitase un efecto anti-leucemia.

En los primeros estudios realizados estudiando la variabilidad de exposición entre población pediátrica y adulta, ya se observó que los niños toleraban aparentemente mejor el fármaco y a la vez experimentaban más frecuentemente recaída, especialmente si no se individualizaba la dosis, y se lanzó la hipótesis de que era debido a una menor exposición^{161, 162}.

Slattery y cols¹⁶⁶ estudiaron la relación entre exposición a busulfán y riesgo de recaída en una población (n=45) de pacientes con LMC que recibieron el régimen BuCy (busulfán oral) y observaron que aquellos pacientes con concentraciones plasmáticas en el estado de equilibrio (Css) inferiores a 917ng/ml presentaron una mayor incidencia de recaída que en aquellos que superaron esta cifra, y también una menor supervivencia, aunque las diferencias en esta última variable no fueron estadísticamente significativas.

Con resultados en el sentido contrario, en el año 2000 se publicaron los datos de un estudio realizado con el objetivo de evaluar la influencia de la exposición a busulfán en recaída, mortalidad no relacionada con recaída y supervivencia¹⁵⁸. Los resultados mostraron que no había correlación de Css con recaída ($p=0,31$) y también se analizó entre subgrupos de edad y tipo de trasplante (allogénico y autólogo) sin observarse asociación tampoco ni tampoco asociación entre Css e incidencia de EICH en el subgrupo de pacientes que recibieron un alotrasplante.

Más recientemente en un estudio realizado administrando busulfán IV dentro del esquema BuCy en pacientes con LMC (n=36), se describió la relación entre peores resultados en términos de menor supervivencia en aquellos pacientes con menores exposiciones ($AUC < 950\mu M \cdot min$)⁵.

1.7. Justificación de la investigación

La indicación de optimización de la posología de fármacos utilizados en acondicionamiento para TPH mieloablativos a través de la monitorización de concentraciones plasmáticas es generar dicho efecto con exposiciones cercanas al límite de tolerabilidad¹⁶⁷. En el caso de TPH autólogos será la única vía en el que estos esquemas sean efectivos. En el caso de enfermedades no malignas, la exposición debe ir orientada a asegurar el implante. Cuando el TPH es de intensidad reducida, se minimiza el objetivo de la monitorización de fármacos orientada a disminuir toxicidades y se plantea la hipótesis del equilibrio del efecto del injerto contra la enfermedad y la inmunosupresión.

Es de interés destacar que en este contexto de regímenes de quimioterapia a dosis altas seguido de TPH, la eficacia y toxicidad de los fármacos utilizados sólo pueden ser comprobadas tras terminar la terapia, a diferencia de las quimioterapias convencionales, donde de ciclo a ciclo se puede evaluar la respuesta¹⁶⁷.

El busulfán es un agente alquilante frecuentemente utilizado en regímenes de quimioterapia en dosis alta con soporte de células hematopoyéticas pluripotenciales. La dosis de busulfán utilizada en estos regímenes es de 1mg/kg/6h por vía oral hasta completar 10 ó 16 dosis. Por ello, en el caso que sea necesaria una individualización de dosis, se podría hacer el estudio cinético orientado a la individualización posológica tras la primera dosis e inmediatamente modificar las siguientes hasta completar el tratamiento.

A continuación se va a desarrollar la justificación del desarrollo de la presente investigación **Í Optimización mediante análisis farmacocinético del tratamiento de busulfán en dos poblaciones específicas de pacientes onco-hematológicosÍ** , en base a tres ejes:

- 1. Relación entre exposición a busulfán y toxicidad**
- 2. Relación entre exposición a busulfán y efectividad**
- 3. Análisis de los datos farmacocinéticos de busulfán utilizando una aproximación poblacional, con el fin de identificar y cuantificar la variabilidad inter e intra-individual de busulfán en la población de estudio y posterior potencialidad para la individualización de la dosis**

y en concreto en las poblaciones analizadas en el trabajo de investigación:

- a) Pacientes con mieloma múltiple (MM) que recibe busulfán asociado a melfalán en regímenes de intensificación y posterior trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (Población MM)**
- b) Pacientes que reciben busulfán asociado a fludarabina en un contexto de régimen de acondicionamiento para un trasplante de intensidad reducida (Población AloTIR).**

1. Relación entre exposición a busulfán y toxicidad

La toxicidad más limitante en el uso de busulfán es la EVOH. Como ya se ha indicado, a partir de los estudios descritos, diferentes grupos de investigación desarrollaron y analizaron la hipótesis de la relación entre la exposición a busulfán y el riesgo de desarrollo de EVOH, llegándose finalmente a asociar un incremento de riesgo de desarrollo de EVOH en pacientes que reciben acondicionamiento con busulfán cuando la exposición al fármaco, expresada en área bajo la curva (AUC) es superior a 6.150 ng.h/ml.

Posiblemente relacionado con la toxicidad EVOH, también es de interés indicar que se ha estudiado y asociado la mortalidad en los 100 días post trasplante y las concentraciones de busulfán.

Esta relación entre exposición a busulfán y toxicidad es más robusta en población adulta que en población pediátrica, posiblemente debido a que los niños presentan una menor exposición al fármaco. Y también es más robusta en la asociación de busulfán con ciclofosfamida que en la utilización de busulfán con otras combinaciones de fármacos.

Se debe considerar que un problema asociado del análisis de los estudios es que en algunos se utiliza busulfán oral y otros IV y que también en algunos se individualiza la dosis según concentraciones plasmáticas y en otros no, hecho que dificulta el análisis combinado de los estudios. Pero que indica que a lo largo del tiempo la asociación de administrar busulfán IV junto con la individualización posológica disminuye la incidencia de EVOH, aunque no se puede conocer el efecto por separado de ambos factores.

- *Consecuentemente se puede indicar que se requieren nuevos estudios de la toxicidad de busulfán administrado por vía oral y en que se realiza individualización posológica tras determinación de concentraciones plasmáticas, y en poblaciones diferentes de las estudiadas, incluyendo regímenes diferentes como son la asociación de busulfán con melfalán y la asociación de busulfán con fludarabina en regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida.*

2. Relación entre exposición a busulfán y efectividad

El mayor objetivo de los agentes utilizados en los regímenes de acondicionamiento para TPH es generar un efecto antitumoral y, en el caso de alotrasplantes, inmunodeprimir suficientemente al paciente para facilitar el implante. Ante ello, se han realizado diferentes estudios analizando la relación entre la exposición de busulfán y el objetivo terapéutico, tanto en éxito del implante como en ausencia de recaída.

Se puede resumir que hay menor número de estudios y que además en dichos estudios las evidencias son menos robustas que los que relacionan la exposición del fármaco con la toxicidad, aunque se marca una tendencia.

En concreto respecto a fallo de implante, diversos estudios han analizado la asociación entre exposiciones bajas a busulfán y fallo del implante, siendo contradictorios los resultados y todos ellos con busulfán administrados por vía oral y todos excepto uno de ellos en población pediátrica.

Respecto a riesgo de recaída también los datos son contradictorios, habiéndose publicado tres estudios, de los cuales uno de ellos no relaciona exposición con riesgo de recaída, y dos sí, siendo ambos en población con diagnóstico de LMC y administrándose busulfán en uno oralmente y en el otro IV y con individualización posológica.

- *Consecuentemente se puede indicar que se requieren nuevos estudios de la efectividad de busulfán administrado por vía oral y en que se realiza individualización posológica tras determinación de concentraciones plasmáticas, y en poblaciones diferentes de las estudiadas, ya que hay pocos estudios y no concluyentes.*

3. Análisis de los datos farmacocinéticos de busulfán utilizando una aproximación poblacional, con el fin de identificar y cuantificar la variabilidad inter e intra-individual de busulfán en la población de estudio y posterior potencialidad para la individualización de la dosis

Como se ha descrito ampliamente en el apartado de Aspectos farmacocinéticos (ver apartado 1.3.4 Aspectos farmacocinéticos), la farmacocinética de busulfán presenta una gran variabilidad, tanto en la absorción si se administra por vía oral, como la eliminación. Esto hace concluir que es imposible predecir la exposición sistémica al busulfán sin disponer de las concentraciones plasmáticas.

Este comportamiento farmacocinético de busulfán utilizado en dosis altas como acondicionamiento para trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) ha sido extensamente estudiado y descrito en numerosos artículos científicos, tanto del comportamiento del fármaco administrado oralmente, como IV, y tanto en adultos como en niños. Pero en la mayoría de los estudios realizados, el régimen en el que se administraba busulfán era asociado con ciclofosfamida.

Ante los datos indicados anteriormente que orientan a una variabilidad en el comportamiento farmacocinético de busulfán, junto a los datos que indican una relación entre exposición y toxicidad y probablemente a una relación entre exposición y efectividad, se consideraría un fármaco de margen terapéutico estrecho que requiere individualización posológica.

Así pues diferentes grupos de investigación han iniciado la realización de programas de individualización posológica de busulfán, tanto en pacientes adultos como en pacientes pediátricos^{168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175}. Uno de los más destacados, el grupo de Slattery y cols del Fred Hutchinson Research Center, Seattle, USA, que ya en el año 1998 realizaron 446 individualizaciones posológicas y también en este centro calcularon que esta individualización supone menos del 1% de todo el coste del trasplante^{176, 177}.

Ante esta realidad, y para optimizar esta aproximación, se requieren análisis farmacocinéticos poblacionales que permitan estudiar las fuentes de variabilidad y correlaciones de las concentraciones plasmáticas de busulfán

entre los distintos individuos que representan la población diana a la cual va destinada el fármaco. De esta manera los resultados de los estudios poblacionales de busulfán se podrían emplear como fuente del conocimiento empírico previo en los análisis Bayesianos de muestras obtenidas posteriormente en un nuevo individuo perteneciente a una población igual o similar a la estudiada. Esta estrategia permitiría obtener los parámetros farmacocinéticos individuales necesarios para el consejo individualizado de dosis en la práctica clínica^{178, 179}.

De los estudios publicados de farmacocinética poblacional de busulfán en adultos, se puede indicar que hay 8 estudios publicados, de los cuales sólo 5 son exclusivamente en población adulta. Respecto a la vía de administración de busulfán, en 3 artículos se administra vía oral y en 5 vía IV. Los protocolos de administración son diversos, incluyendo By-Cy, Bu-ICT, Bu-Flu-Tim y otros en muy menor proporción. En 6 estudios se describe el efecto de varios factores (covariables) sobre los parámetros farmacocinéticos, siendo el peso la co-variable más relevante afectando al aclaramiento plasmático del fármaco en 4 estudios y al volumen central de distribución en 5 estudios. Otras co-variables incluidas en los modelos farmacocinéticos poblacionales son ALT, administración de fenitoina, la superficie corporal, la patología, influyendo principalmente en el aclaramiento, y el sexo en el volumen central de distribución. Se realiza validación externa en sólo 2 de los 8 estudios publicados.

- *Consecuentemente se puede indicar que se requieren nuevos estudios de farmacocinética poblacional de busulfán administrado por vía oral y en poblaciones no estudiadas a día de hoy y en regímenes de acondicionamiento utilizados en nuestro entorno para que permitan estudiar las fuentes de variabilidad y correlaciones entre los distintos individuos que representan la población diana a la cual va destinada el fármaco y para su potencialidad en la individualización posológica*

Análisis de las poblaciones estudiadas en el trabajo de investigación:

a) Pacientes con mieloma múltiple que recibe busulfán asociado a melfalán en regímenes de intensificación y posterior trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

Como se ha indicado anteriormente, la mayoría de estudios de variabilidad en el comportamiento farmacocinético de busulfán, de análisis de la relación entre exposición y toxicidad y/o efectividad se han realizado en poblaciones que recibían la asociación de busulfán con ciclofosfamida y con una alta presencia de población pediátrica.

El único estudio publicado que analiza la farmacocinética de busulfán en asociación con melfalán es el estudio de Bouligand¹⁵¹. Se trata de un estudio prospectivo que explora la farmacodinamia de busulfán combinado con melfalán (n=25) o con tiotepa (n=20) seguido de trasplante autólogo en niños y adolescentes con tumores sólidos. La dosis de busulfán administrada es 600mg/m² y no se indica que se realice ajuste posológico según concentraciones plasmáticas del fármaco. No se observa diferencias en la exposición a Bu e incidencia de EVOH en el grupo BuMel y si se observa en el grupo BuTTP, ya que los pacientes que desarrollan EVOH presentan una AUC tras la 13 dosis mayor (6.201±607 ng.h/ml) que los que no presentan EVOH (5.024±978 ng.h/ml) (p<0,05).

Pero se debe destacar que en este estudio la población es pediátrica o de adolescentes con tumores sólidos, y consecuentemente es una población muy diferente de la de mieloma múltiple. El mieloma múltiple afecta fundamentalmente a la población de edad avanzada, con un pico de incidencia entre los 70 y 75 años de edad (Kyle 2003). La mediana de edad al diagnóstico es de 68 años, de manera que el 75% de los hombres y el 79% de las mujeres diagnosticadas de MM son mayores de 60 años. Como se ha indicado anteriormente en el apartado 1.3.4 Aspectos Farmacocinéticos, la edad es uno de los factores más importantes relacionados con la variabilidad en la metabolización de busulfán. Aunque este hecho se ha estudiado comparando población pediátrica y adulta joven.

También es de interés considerar que la asociación de busulfán y melfalán pueden producir una mayor incidencia de EVOH que melfalán en monoterapia, sobre todo si no se individualiza la dosis^{151, 180}).

- *Consecuentemente es de gran interés el estudio de la efectividad y toxicidad, así como el desarrollo de un modelo farmacocinético poblacional en población adulta de edad avanzada que recibe busulfán asociado a melfalán.*

b) Pacientes que reciben busulfán asociado a fludarabina en un contexto de régimen de acondicionamiento para un trasplante de intensidad reducida (AloTIR).

Los datos de la farmacocinética y resultados de la individualización posológica de busulfán en este tipo de acondicionamiento son mucho menores que en el acondicionamiento convencional en trasplante alogénico basado en busulfán y ciclofosfamida. Los estudios de farmacocinética de busulfán en protocolos combinados con fludarabina son dos: Bornhäuser et al de grupo de Seattle¹⁸¹ y de Lima et al del grupo de Hudson⁵⁰, pero ambos con diferencias importantes en el protocolo de acondicionamiento respecto al utilizado en nuestro entorno. Los datos publicados por el grupo de Seattle en 2003¹⁸¹, aunque el acondicionamiento es combinación de busulfán y fludarabina, pero son dosis mayores (fludarabina dosis total 120 mg/m² y busulfán oral dosis total 16 mg/kg) y por lo tanto se pueden considerar intensidad convencional. En este estudio realizan individualización posológica de busulfán en base a las concentraciones plasmáticas.

En el estudio de de Lima⁵⁰ (de Lima, 2004) las diferencias respecto al protocolo AloTIR español son tanto en la dosis de busulfán, que es en dosis única diaria por vía endovenosa (130 mg/m² del día . 6 a . 3, es decir dosis total 520 mg/m²) como de fludarabina (160 mg/m² dosis total). En este estudio realizan determinaciones de concentraciones plasmáticas, pero no individualizan la dosis de busulfán.

La relación del régimen y de la farmacocinética de busulfán con la efectividad podría tener connotaciones muy diferentes en AtoTIR que en intensidad convencional ya que en el objetivo de un AtoTIR es de especial importancia la búsqueda del efecto del injerto contra la enfermedad. Ante ello se podría plantear la hipótesis que a menor exposición a busulfán, mayor posibilidad de recaída, pero en este caso el equilibrio debe considerar también que si esta exposición favorece la presencia de EICH y/o el efecto anti-leucemia. También en este caso la población es adulta y de edad avanzada, y como se ha indicado anteriormente en el trabajo, la edad es uno de los factores más importantes relacionados con la variabilidad en la metabolización de busulfán.

- *Consecuentemente es de gran interés el estudio de la efectividad y toxicidad, así como el desarrollo de un modelo farmacocinético poblacional en población adulta que recibe busulfán asociado a fludarabina como régimen de acondicionamiento para un trasplante de intensidad reducida.*

2.HIPÓTESIS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

2. HIPÓTESIS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación desarrolla las siguientes hipótesis en dos poblaciones de pacientes específicas hasta ahora no estudiadas en la literatura, población adulta con mieloma múltiple que recibe busulfán asociado a melfalán en regímenes de intensificación y posterior trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos y población adulta que recibe busulfán asociado a fludarabina en un contexto de régimen de acondicionamiento para un trasplante de intensidad reducida.

1. La alta variabilidad en el comportamiento farmacocinético del busulfán en su utilización en la práctica clínica asistencial junto con su relación con la efectividad y toxicidad, hace necesaria la monitorización farmacocinética para la individualización de la dosis
2. El estudio del comportamiento farmacocinético poblacional de busulfán, identificando y cuantificando la variabilidad observada, nos ha de permitir optimizar la dosis mediante algoritmos bayesianos y que ello sea aplicado en el futuro en la práctica asistencial de nuestro entorno.

3.OBJETIVOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

3.OBJETIVOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

En el presente trabajo de investigación se plantea:

estudiar la efectividad, toxicidad y el comportamiento farmacocinético de busulfán en población adulta con mieloma múltiple que recibe busulfán asociado a melfalán en regímenes de intensificación y posterior trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos.

y

estudiar la efectividad, toxicidad y el comportamiento farmacocinético de busulfán en población adulta que recibe busulfán asociado a fludarabina en un contexto de régimen de acondicionamiento para un trasplante de intensidad reducida.

Consecuentemente en estas poblaciones de pacientes específicas se definen los siguientes objetivos:

1. Estudiar la caracterización farmacocinética individual de cada paciente, a través de un método de regresión no lineal.
2. Analizar la toxicidad y la efectividad del tratamiento y su relación con la exposición a busulfán
3. Caracterizar el comportamiento farmacocinético poblacional de busulfán, identificando y cuantificando la variabilidad observada, y validar el modelo farmacocinético poblacional desarrollado en un nuevo grupo de pacientes

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Pacientes

4.1.1. Población adulta con mieloma múltiple (MM) que recibe busulfán asociado a melfalán en regímenes de intensificación y posterior trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

- **Criterios inclusión y exclusión**

Se incluyeron de manera prospectiva desde febrero de 2000 a abril 2003 44 pacientes (21 hombres y 23 mujeres). La edad media en el momento del trasplante fue 55 años (rango 41-68), 13 de los 44 pacientes (30%) tenían más de 60 años. Los pacientes estaban diagnosticados de mieloma múltiple (MM) en estadio avanzado y se incluyeron en el protocolo cooperativos español activo en aquel momento (GEM-2000) y recibieron un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos en primera respuesta tras quimioterapia. Dicho protocolo fue aprobado por el comité de ética correspondiente y los pacientes habían firmado el consentimiento informado. Se excluyeron los pacientes con alteración de la función hepática, renal, cardíaca o pulmonar.

- **Terapia de intensificación**

La terapia de intensificación consistió en la asociación de busulfán oral a una dosis inicial de 0,75mg/kg cada 6h hasta un total de 16 dosis (dosis total teórica 12mg/kg en 4 días) seguido de melfalán 140mg/m² endovenoso. La dosis inicial de busulfán estaba basada en el peso actual real en pacientes con índice de masa corporal (IMC)<27kg/m² y en los pacientes con IMC>27kg/m² la dosis se basaba en el peso corporal ajustado. El cálculo de peso corporal ajustado se basa en el descrito por Gibbs y cols³⁴ y definido como el peso ideal más el 25% de la diferencia entre el peso real y en ideal. Esta dosis inicial era ajustada posteriormente en función de las concentraciones plasmáticas (ver apartado 4.4.).

- **Medicación concomitante**

A todos los pacientes se administró:

- Fenitoina como profilaxis de la toxicidad neurológica de busulfán, iniciándose el tratamiento 24 horas antes de la primera dosis de busulfán y continuando hasta 24 horas tras la última dosis de busulfán.
- Ondansetron como tratamiento antiemético, a dosis de 8 mg IV cada 8 horas, iniciándose el tratamiento al inicio de la terapia de acondicionamiento hasta el día del trasplante.
- Factores estimulante de colonias de granulocitos a dosis de 5mcg/kg/día SC desde el día +7 hasta la recuperación de neutrófilos.

El resto de medicación habitual del paciente se recogió de manera prospectiva y se incluyó en la base de datos por su interés como posible factor de variabilidad en la farmacocinética de busulfán.

4.1.2. Población adulta que recibe busulfán asociado a fludarabina en un contexto de régimen de acondicionamiento para un trasplante de intensidad reducida (AloTiR)

- **Criterios de inclusión y exclusión**

Se incluyeron de manera prospectiva desde mayo del 2000 hasta diciembre de 2003 32 pacientes (20 hombres y 12 mujeres). La edad media fue 56 años (rango 35-66 años) y 10 de los 32 pacientes (31%) tenían más de 60 años. Estos 32 pacientes se incluyeron en el protocolo multicéntrico LAM-AIR03 y CETLAM-2003¹⁹ para recibir un trasplante de donante emparentado. Este protocolo estaba diseñado sólo para pacientes que está contraindicado un trasplante mieloablativo convencional con enfermedades malignas mieloides definidas como: leucemia mieloide aguda (LMA) de alto riesgo o síndrome mielodisplásico (SMD) (International Pronostic Score (IPSS)) alto o intermedio-2) o leucemia mieloide crónica (LMC), según recomendaciones estándar (Urbano-Ispizua , 2002). Dicho protocolo fue aprobado por el comité de ética correspondiente y los pacientes habían firmado el consentimiento informado. Se excluyeron los pacientes con alteración de la función hepática, renal, cardíaca o pulmonar.

- **Terapia de acondicionamiento**

La terapia de acondicionamiento consistió en la asociación de fludarabina (Flu 30mg/m² IV de los días . 9 a . 5) y Bu oral a una dosis inicial de 1mg/kg cada 6 horas hasta un total de 10 dosis (días -4 a -2). La dosis inicial de busulfan estaba basada en el peso actual real en pacientes con índice de masa corporal (IMC)<27kg/m² y en los pacientes con IMC>27kg/m² la dosis se basaba en el peso corporal ajustado. El cálculo de peso corporal ajustado se basa en el descrito por Gibbs y cols³⁴ y definido como el peso ideal más el 25% de la diferencia entre el peso real y en ideal. Esta dosis inicial era ajustada posteriormente en función de las concentraciones plasmáticas (ver apartado 4.4.).

- **Medicación concomitante**

A todos los pacientes se administró:

- Fenitoina como profilaxis de la toxicidad neurológica de busulfán, iniciándose el tratamiento 24 horas antes de la primera dosis de busulfán y continuando hasta 24 horas tras la última dosis de busulfán.

- Ondansetron como tratamiento antiemético, a dosis de 8 mg IV cada 8 horas, iniciándose el tratamiento al inicio de la terapia de acondicionamiento hasta el día del trasplante.

- La profilaxis de enfermedad del injerto contra el huésped aguda (aEICH) consistió en ciclosporina desde el día . 7 y metotrexate (10mg/m² IV en los días +1, +3 y +6), seguido de ácido folínico. El descenso de la dosis de ciclosporina se inició en día +90 si el paciente no desarrollaba EICH o recurrencia de la enfermedad temprana. El diagnóstico de EICH agudo o crónico se realizó utilizando los criterios establecidos^{182, 183}. El tratamiento de aEICH como del crónico (cEICH) se realizó con prednisona, ciclosporina y/o micofenolato de mofetilo.

El resto de medicación habitual del paciente se recogió de manera prospectiva y se incluyó en la base de datos por su interés como posible factor de variabilidad en la cinética de busulfán por posible interacción.

4.2. Determinación de concentraciones plasmáticas de busulfán

Las muestras de sangre total se recogieron justo antes de la administración y a los 90, 180, 240 y 360 minutos de la primera dosis de busulfán. Las muestras fueron centrifugadas, se separó el plasma y se realizó por duplicado la determinación cuantitativa de concentraciones plasmáticas de busulfán por cromatografía líquida de alta resolución (ver apartado 4.3.).

4.3. Metodología analítica de busulfán

La determinación de busulfán se realizó a través de una adaptación y posterior validación del método¹⁸⁴ descrito por Henner¹⁸⁵. Está basada en la derivación del busulfán con dietilditiocarbamato y del estándar interno (metilsufanildioxihexano) antes de una extracción líquido /líquido seguida de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en columna de fase reversa y detección ultravioleta. El intervalo analítico está entre 250 y 4000ng/ml, la imprecisión interserial (CV) es 11,4 % y el grado de recuperación es de 96,5%.

4.4. Estudio farmacocinético (FC) individual y diseño posológico

- **Modelo FC aplicado**

La caracterización farmacocinética individual de cada paciente se realizó mediante un modelo monocompartimental. El método farmacocinético de estimación de parámetros individuales fue regresión no lineal.

- **Parámetros FC estimados**

Se estimaron el aclaramiento plasmático aparente (Cl/F) y el volumen de distribución aparente (Vd/F) de busulfán. A partir de ellos se calcularon la constante de eliminación (Ke/F), el área bajo la curva de concentraciones plasmáticas en el estado de equilibrio estacionario frente al tiempo (AUC_{ss}/F) y la concentración plasmática promedio en el estado de equilibrio estacionario (C_{ss}). Esta estimación se realizó utilizando el paquete ADAPT-PC (University of Southern California).

- **Exposición diana de busulfán**

- a) **Población adulta con MM que recibe busulfán asociado a melfalán en regímenes de intensificación y posterior trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos**

La exposición diana se definió como área bajo la curva de concentraciones plasmáticas en el estado de equilibrio estacionario AUC_{0-6h} entre 4200 y 5100 ng.h/ml o la concentración promedio en el estado de equilibrio estacionario (C_{ss}) entre 700 y 850 ng/ml, en base a los criterios definidos por Slattery y cols¹⁷⁶ según los artículos publicados que relacionan exposición con toxicidad y eficacia con el objetivo de disminuir el riesgo de toxicidad sin incrementar el riesgo de recaída. Como se ha indicado en la Introducción no hay ningún artículo que defina la exposición diana en este grupo de población ni en la asociación de busulfán con melfalán, pero ante la evidencia del riesgo reconocido de toxicidad, principalmente EVOH, y recaída, se adapta el indicado por Slattery y cols¹⁷⁶.

- b) **Población adulta que recibe busulfán asociado a fludarabina en un contexto de régimen de acondicionamiento para un trasplante de intensidad reducida (AloTiR)**

La exposición diana se definió en AUC_{0-6h} = 4500-6000 ng.h/ml o C_{ss} = 750-1000 ng/ml en base a los criterios definidos por Bornhäuser et al¹⁸¹. Se debe considerar que los márgenes definidos se basan en conseguir la menor toxicidad (<750ng/mml) pero manteniendo la capacidad de implante y no recaída. Como ya se ha indicado anteriormente, en el artículo de Bornhäuser et al¹⁸¹ el acondicionamiento se puede considerar mieloablativo, mientras que en el actual no. Pero al no haber ningún estudio en este escenario se adaptaron los márgenes.

- **Diseño posológico**

A partir de los parámetros FC individuales, se ajustó la dosis de busulfán tras la tercera dosis según exposición diana (AUC 0-6h). Se tuvo en cuenta al realizar este ajuste, la inducción del metabolismo de busulfán debida a la fenitoina (ver apartado 1.4. Interacciones medicamentosas).

- **Concentraciones plasmáticas individuales predichas vs observadas**

Con el objetivo de analizar la predicción de las concentraciones plasmáticas individuales versus las observadas y la adecuación de la dosis ajustada tras la tercera dosis, en los primeros pacientes se repitió el estudio farmacocinético de manera simplificada (determinaciones a los 240 y 360 minutos de la dosis) en la dosis 5, 9 y/o 15. En la población de MM en 7 pacientes se repitió el estudio farmacocinético simplificado tras 5ª dosis y a 17 en la 15ª dosis y en la población de AloTiR se repitió el estudio tras 5ª dosis en 7 y en 16 pacientes tras la 9ª dosis.

4.5. Factores de variabilidad

Se analizó la relación entre diferentes parámetros farmacocinéticos individuales de busulfán y la edad, el sexo, el peso y la obesidad (definido como índice de masa corporal (IMC) $>30\text{kg/m}^2$) de los pacientes.

4.6. Evaluación de toxicidad

- Toxicidad relacionada con el trasplante
 - a) **Población adulta con MM que recibe busulfán asociado a melfalán en regímenes de intensificación y posterior trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos**

Se analizó utilizando los criterios definidos por Bearman y cols¹⁸⁶ que gradúa las complicaciones pulmonares, cardíacas, hepáticas, renales, de las mucosas, de la vejiga y neurológicas tras el trasplante.

- b) **Población adulta que recibe busulfán asociado a fludarabina en un contexto de régimen de acondicionamiento para un trasplante de intensidad reducida (AloTiR)**

Se analizó utilizando los criterios definidos en Common Toxicity Criteria versión 3 (CTCAE 3.0) del National Cancer Institute (http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/adverse_effects.htm).

- Enfermedad veno-oclusiva hepática (EVOH)

El diagnóstico de EVOH se realizó clínicamente, basado en el criterio estándar de bilirrubina $\geq 2,0$ mg/dL antes del día 21 tras el trasplante y al menos dos de los siguientes criterios: hepatomegalia con dolor en el cuadrante superior derecho, ascitis o ganancia de peso mayor del 5% respecto al basal¹¹⁵.

Se analizó también la denominada EVOH tardía, en la cual el inicio de la ictericia se produce de manera retardada, es decir 1 o 2 semanas respecto al criterio anterior¹¹⁷.

- Mucositis

Se analizó la gravedad de la mucositis utilizando la graduación de toxicidad de la Organización Mundial de la Salud, que utiliza una escala que va de 0 a IV.

- Recuperación hematológica

La recuperación hematológica posterior al trasplante se evaluó mediante el número de días necesarios para conseguir un recuento de neutrófilos $\geq 0,5 \times 10^9/L$ y $\geq 1,0 \times 10^9/L$ y un recuento de plaquetas $\geq 20 \times 10^9/L$ y $\geq 50 \times 10^9/L$. También se analizó los días de hospitalización, considerándose desde el día de la infusión del trasplante hasta el día del alta.

- Mortalidad relacionada con el procedimiento

Se consideró mortalidad relacionada con el procedimiento aquella muerte que se produjese dentro de los 100 días posteriores al trasplante.

- Enfermedad del injerto contra el huésped

En la Población adulta que recibe busulfán asociado a fludarabina en un contexto de régimen de acondicionamiento para un trasplante de intensidad reducida se evaluó la incidencia de enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), tanto aguda (EICHa) como crónica (EICHc).

4.7. Evaluación de efectividad

- a) **Población adulta con MM que recibe busulfán asociado a melfalán en regímenes de intensificación y posterior trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos**

La respuesta al procedimiento del trasplante se evaluó a los 3 meses del procedimiento mediante el método propuesto por Gore y cols¹⁸⁷ con modificaciones¹⁸⁸.

- a) **Población adulta que recibe busulfán asociado a fludarabina en un contexto de régimen de acondicionamiento para un trasplante de intensidad reducida (AloTiR)**

Se analizó la supervivencia global y la tasa de recaída de la enfermedad de base. También se recogió el quimerismo hematopoyético y el fallo del implante. La evaluación del implante se realizó por PCR en células periféricas de manera repetida tras el trasplante¹⁸⁹. El quimerismo completo del donante se definió como 100% células del donante y quimerismo mixto como la presencia de >1% de células del receptor en muestra analizada.

4.8. Estrategia estadística para estudiar la caracterización farmacocinética individual y el análisis de la toxicidad y la efectividad del tratamiento y su relación con la exposición a busulfán

El análisis estadístico se realizó siguiendo los métodos clásicos del análisis de datos. En una primera etapa se resumieron los datos mediante técnicas de análisis descriptivo calculando las frecuencias absolutas en variables cualitativas y, en el caso de las variables cuantitativas, se calculó la media aritmética y/o mediana como medidas de tendencia central y la desviación estándar (SD) como medida de dispersión.

Para analizar la relación entre la exposición a busulfán (AUC₀₋₂₄ y C₂₄), CI/F y edad y peso corporal se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Para

analizar la relación entre las concentraciones de busulfán y toxicidad se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS para Windows 10.0. El nivel de significación aplicado a las distintas pruebas de hipótesis fue de $p \leq 0,05$.

4.9. Modelo FC poblacional

- **Desarrollo de los modelos FC poblacionales**

Para el desarrollo del modelo se procedió al análisis simultáneo de las concentraciones de busulfán frente al tiempo, mediante el modelo de efectos mixtos no lineales implementado en el programa NONMEM v.7.3. (Icon Development Solutions⁸⁵ y aplicando la estrategia de tres etapas:

1. Selección modelo poblacional básico
2. Exploración de la relación de los parámetros FC vs las co-variables
3. Selección de co-variables y modelo final

Respecto al modelo farmacocinético poblacional estructural se probaron dos opciones: modelo farmacocinético monocompartimental y bi-compartimental con administración extravascular y eliminación y absorción de primer orden. Fueron caracterizados los parámetros farmacocinéticos poblacionales del modelo seleccionado y fue modelizada la variabilidad inter-individual en estos parámetros. Se exploró la correlación entre los efectos aleatorios. La variabilidad residual fue estudiada mediante modelos aditivos, proporcionales y mixtos.

En todos los casos los métodos de estimación ensayados durante el ajustado de los distintos modelos a los datos experimentales fueron el método de estimación condicional de primer orden con interacción (first-order conditional estimation, FOCE interaction).

Las mejoras en el modelo FC fueron evaluadas a través de: 1) gráficas basadas en el acuerdo entre las concentraciones plasmáticas observadas y predichas; 2) gráfico de predicciones vs residuales y residuales condicionales; 3) uniformidad de distribución de los residuales; y 4) descenso significativo en el valor de la función objetiva de cada modelo (análisis de cociente de máxima verosimilitud, OFV). La diferencia en al menos dos veces el log de la función

objetiva entre dos modelos anidados se asume que sigue una distribución chi cuadrado (χ^2) asintótica con igual grados de libertad que la diferencia en el número de parámetros entre los modelos comparados. Un nivel de significación de 0,05 y 0,01 demuestra una mejor significativa (disminución de OFV en más de 3,841 y 6,63 respectivamente). Se utilizaron para guiar el proceso de mejoras del modelo FC los paquetes R v3.1.1 (the R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) y Xpose v4.5.0¹⁹⁰. A su vez se utilizó Perl-speaks-NONMEM (PsN) v 3.7.3¹⁹¹ para la automatización durante todo el proceso de modelización.

Además los factores demográficos y biológicos clínicamente razonables fueron ensayados para su inclusión como co-variables en el modelo FC básico poblacional con el objetivo de explicar la variabilidad inter-individual.

Las variables continuas fueron incluidas como:

$$P_j = P_{POP} * (COV_j / COV_{MEAN})^{COV} \quad \text{o} \quad P_j = P_{POP} * COV [1 + (COV_j - COV_{MEAN})]$$

donde P_j es el parámetro FC para el paciente j y con un valor de la co-variable, P_{POP} es el valor típico del parámetro FC correspondiente al valor medio de la co-variable en la población, COV_j es el valor de la co-variable para el paciente j , COV_{MEAN} es la media de la co-variable en la población y COV representa la escala del valor de la influencia de la co-variable.

Las variables categóricas fueron incluidas en el modelo según se expresa a continuación:

$$P_j = P_{POP} + COV (1 - COV_i)$$

donde P_j es el parámetro FC para el paciente j , COV_i es el valor numérico (in este caso: 1 para la categoría referencia o 0 para la categoría comparativa), P_{POP} es el valor típico del parámetro FC correspondiente al valor de co-variable de referencia y COV es el factor multiplicativo para la influencia de esta co-variable en el parámetro FC.

La inclusión de covariables en el modelo FC básico se realizó con la inclusión secuencial y posterior exclusión de covariables (*forward-backward deletion strategy*) utilizando los métodos: (i) modelo aditivo generalizado (*GAM Generalised Additive Modelling*), y (ii) análisis automatizado con la aproximación *Stepwise Covariate Modelling* (scm) %.

Cada co-variable se retuvo si conduce a una mejora del modelo. Se mantuvieron las co-variables en el modelo si se consigue una $p < 0,05$ de acuerdo con el análisis. Se incluyeron en el modelo todas las co-variables encontradas significativas. En el último paso, el modelo final fue evaluado con la estrategia *backward-deletion strategy* y se eliminaron, una a una, cada variable y se calculó la pérdida de ajuste al eliminar. Se consideró una reducción significativa en el valor de OFV superior a 6,81 para considerar la covariable como significativa ($p < 0.01$).

Las mejoras en el modelo FC fueron evaluadas a través de: 1) plausibilidad biológica y clínica de la co-variable; 2) gráficas basadas en el acuerdo entre las concentraciones plasmáticas observadas y predichas; 3) uniformidad de distribución de los residuales; y 4) diferencia del log de la función objetiva entre los dos modelos anidados. Se consideró clínicamente relevante para la inclusión de una co-variable la disminución de al menos el 10% en IIV asociada a un parámetro FC.

Se evaluó para cada parámetro en el modelo final la extensión del *shrinkage*¹⁹². Se evaluó la medida del *-shrinkage* y *-shrinkage* sobre las concentraciones individuales y los parámetros individuales, respectivamente. Se utilizó *-shrinkage* para cuantificar la información que proporciona un gráfico las concentraciones plasmáticas predichas (IPRED) vs los valores observados (OBS). Su valor se incrementa desde 0 a 1 a medida que los datos son menos informativos. Valores de *shrinkage* superiores al 30% suponen una pérdida del poder de predicción de los gráficos de IPRED vs OBS. Los parámetros individuales se basan en valores individuales de , obtenidos a partir de los elementos estimados de la matriz omega. Los valores individuales de se emplean frecuentemente en la selección de covariables. El concepto de

shrinkage también se puede aplicar a , de forma que un valor de -shrinkage elevado (>30%) se asocia a parámetros individuales menos fiables.

- **Validación del modelo**

Se realizó una validación interna del modelo farmacocinético poblacional en NONMEM v.7.3.⁸⁵ mediante: *%predicted corrected - visual predictive check (pc-vpc)*¹⁹³. A través de la simulación de 1000 concentraciones plasmáticas de busulfán a partir del modelo farmacocinético poblacional final, considerando las distintas covariables incluidas en el modelo,, se calcula la media y el intervalo de confianza del 95% de concentraciones y se compara con las concentraciones observadas en el estudio. Dicho análisis se realizó utilizando Perl-speaks-NONMEM (PsN) v 3.7.3.¹⁹¹.

Para la validación interna se utilizó asimismo un análisis de Bootstrapping. Es un análisis estadístico que emplea la replicación y la generación repetitiva de pseudomuestras distribuidas de la muestra de origen. En el bootstrapping, se aplica el modelo a cada una de las pseudomuestras y se obtiene un resumen de los resultados obtenidos. Permite calcular la precisión de las estimaciones de los parámetros mediante el cálculo de los intervalos de confianza del 95% asociados y el error estándar de los estimados.

Se realizó una validación externas tanto en el modelo desarrollado para la población de MM como de AloTIR. De los 44 pacientes incluidos en el subestudio de MM, , 23 fueron incluidos prospectivamente en el estudio de modelización de farmacocinética poblacional y se realizó una validación del modelo con los nuevos 21 pacientes restantes. En la población de AloTIR 31 pacientes fueron incluidos en el desarrollo del modelo, y con los datos de 16 nuevos pacientes se realizó la validación del modelo. Se obtuvieron las concentraciones de busulfán predichas a través de estimación Bayesiana para cada una de las concentraciones observadas en los pacientes del grupo validación, tras incluir los valores de los parámetros farmacocinéticos poblacionales previamente obtenidos con la población del grupo de referencia. La capacidad del análisis Bayesiano se evaluó por la comparación de las concentraciones observadas (OBS) vs las concentraciones predichas

poblacionales (PRED) e individuales (IPRED). Se calcularon sesgo y precisión en términos de porcentaje de error de predicción (PE%) y error absoluto medio de predicción (APE%) respectivamente, según las siguientes fórmulas¹⁹⁴:

$$\text{PE-ipred\%} = [(\text{OBS-IPRED})/\text{IPRED}] * 100$$

$$\text{PE-pred\%} = [(\text{OBS-PRED})/\text{PRED}] * 100$$

$$\text{APE-ipred\%} = [|\text{OBS-IPRED}|/\text{IPRED}] * 100$$

$$\text{APE-pred\%} = [|\text{OBS-PRED}|/\text{PRED}] * 100$$

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Sub-estudio Población adulta con mieloma múltiple (MM) que recibe busulfán asociado a melfalán en regímenes de intensificación y posterior trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

5.1.1. Caracterización farmacocinética individual de cada paciente, a través de un método de regresión no lineal.

- **Pacientes**

Se incluyeron de manera prospectiva desde febrero de 2000 a abril 2003 44 pacientes (21 hombres y 23 mujeres). La edad media en el momento del trasplante fue 55 años (rango 41-68), 13 de los 44 pacientes (30%) tenían más de 60 años. Las características clínicas de los pacientes al diagnóstico y al trasplante se muestran en la siguiente tabla 16.

Tabla 16. Características al diagnóstico y al trasplante de los pacientes con mieloma múltiple (n=44).

<i>n</i>	44
Edad (media, rango) en años al diagnóstico	55 (40-68)
Edad (media, rango) en años al trasplante	55 (41-68)
Sexo (hombres / mujeres)	21 / 23
<i>Isotipo [n (%)]</i>	22 (50%)
Ig G κ/λ	12 (27%)
Ig A κ/λ	10 (23%)
Bence-Jones κ/λ	7 (16%)
Quimioterapia en primera línea [n (%)]	36 (82%)
VCMP/VBAP	1 (2%)
VBCMP/VBAD	
VAD	
N. de líneas de quimioterapia previas [n (%)]	41 (93%)
1 línea	3 (7 %)
2 líneas	5 (11%)
Estadio al trasplante [n (%)]	38 (87%)
CR	1 (2 %)
PR	
EPR	35 (79%)
ECOG al trasplante [n (%)]	7 (16%)
0	2 (5%)
1	
2	
Celularidad infundida [media (rango)]	2,9 (2.1 . 5.9)
CD34 ⁺ células (x 10 ⁶ /kg)	7,2 (1,96 . 19,3)
MNCs (x 10 ⁸ /kg)	2,8 (0,76 . 19,0)
CFU-GM (x 10 ⁴ /kg)	

VCMP/VBAP. Vincristina, ciclofosfamida, melfalan, prednisona / vincristina, carmustina, adriamicina, prednisona; VBCMP/VBAD. Vincristina, carmustina, cyclophosphamida, melfalan, prednisona / vincristina, carmustina, adriamicina, dexametasona; VAD. Vincristina, adriamicina, dexametasona; CR. Remisión completa; PR. Remisión parcial; EPR: enfermedad primariamente refractaria; MNCs. Células mononucleares; CFU-GM. Unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos.

- **Parámetros farmacocinéticos**

Los parámetros farmacocinéticos individuales de busulfán tras la administración de la primera dosis se resumen en la tabla 17.

Tabla 17. Parámetros farmacocinéticos individuales de busulfán estimados tras la primera dosis de 0.75mg/kg (n= 44).

	<i>Media</i>	<i>SD</i>	<i>Rango</i>
Ke (h ⁻¹)	0,2734	0,0954	0,0755-0,5077
Cl/F (ml/min/kg)	2,298	0,7404	1,059-3,900
AUC _{0-∞} (ng.h/ml)	6052	2139	3192-12180
C _{ss} (ng/ml)	989	340	544-2030

Ke. Constante de eliminación; Cl/F aclaramiento oral aparente ; AUC_{0-∞} el área bajo la curva de concentraciones plasmáticas en el estado de equilibrio estacionario; C_{ss} concentración promedio en el estado de equilibrio estacionario.

- **Optimización posológicas de busulfán**

De los 44 pacientes, 24 (55%) tuvieron una AUC_{0-∞} > 5100 ng h/mL y por lo tanto requirieron reducción de la dosis, siendo la media de reducción de 23%±8%.

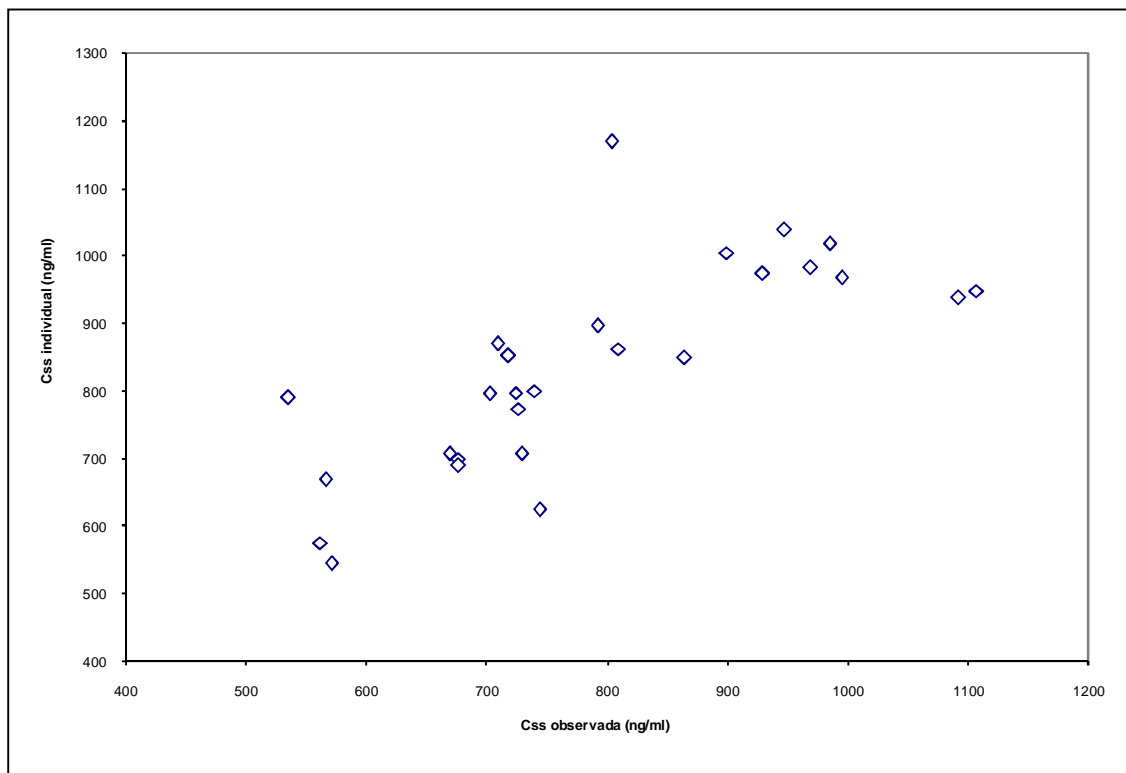
Sólo 2 (5%) pacientes tuvieron AUC_{0-∞} <4200 ng h/mL y requirieron subida de dosis, que fue de un 12,5% en ambos casos.

- **Concentraciones plasmáticas individuales versus observadas**

En los 27 primeros pacientes incluidos en el estudio en los que se realizó un estudio farmacocinético individual tras la administración de la dosis 15, se demostró que el 59% de ellos consiguieron presentar una exposición al final del tratamiento con busulfán tras el ajuste posológico dentro del rango definida

como exposición diana (área bajo la curva de concentraciones plasmáticas en el estado de equilibrio estacionario AUC_{Css} entre 4200 y 5100 ng.h/ml o la concentración promedio en el estado de equilibrio estacionario (C_{ss}) entre 700 y 850 ng/ml) (ver apartado 4.4.). La figura 1 muestra la comparación entre la C_{ss} individual y la observada tras la dosis 15.

Figura 1 . Comparación entre la concentración plasmática observada tras la dosis 15 y la C_{ss} individual para cada paciente (n= 27) (r²= 0.753; p<0.01).

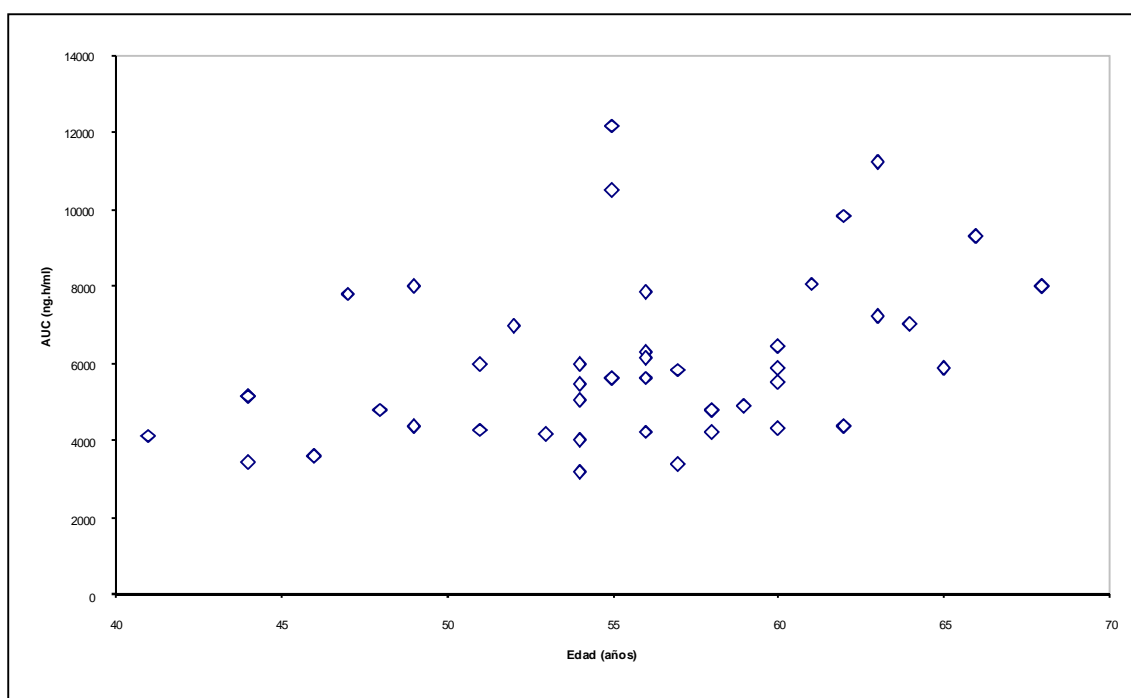


▪ **Factores de variabilidad**

Se analizó la relación entre diferentes parámetros farmacocinéticos individuales y la edad, sexo y peso de los pacientes, encontrándose que el AUC_{Css} presentaba una correlación estadísticamente significativa con la edad (coeficiente de correlación de Pearson = 0,351, p<0,05, Figura 2), mientras que

no se encontró correlación entre AUCss y sexo o peso corporal de los pacientes.

Figura 2. Relación entre la edad y exposición expresada como el área bajo la curva de concentraciones plasmáticas en el estado de equilibrio estacionario (AUCss) estimada tras la primera dosis de 0.75mg/kg (n=44) ($r^2= 0.3510$; $p<0.05$).



5.1.2. Análisis de la toxicidad y la efectividad del tratamiento y su relación con la exposición a busulfán

▪ Evaluación de toxicidad

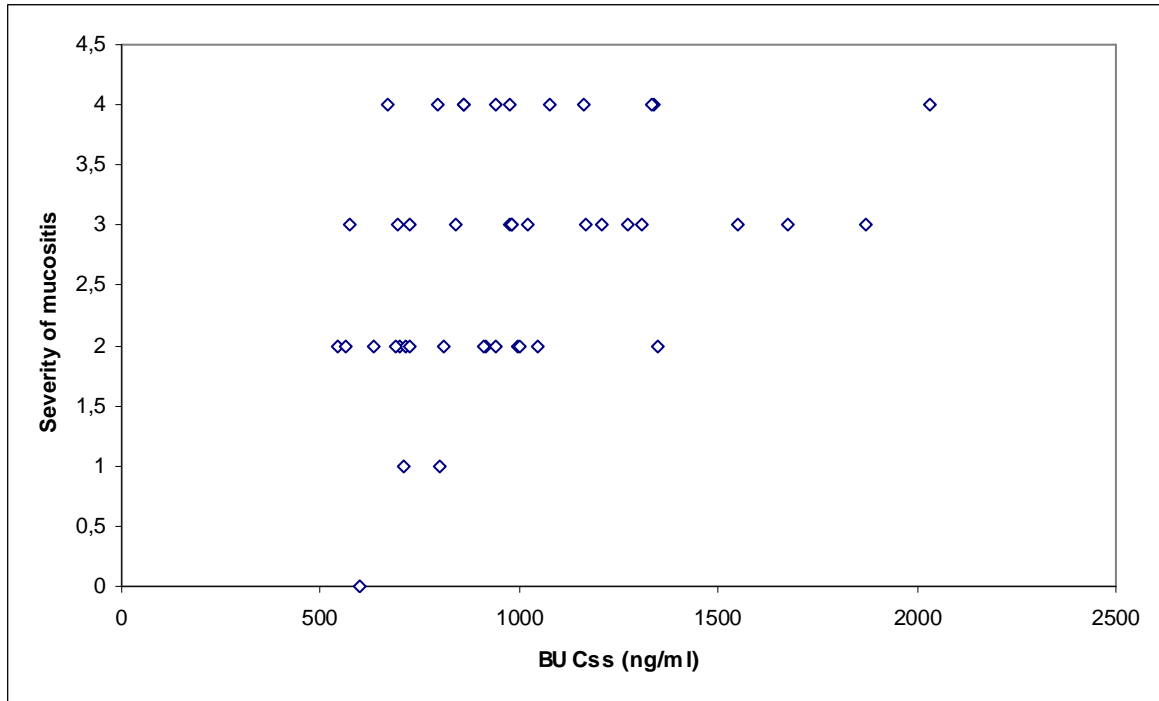
No se observó ningún caso de EVOH en la población estudiada (n=44). Las toxicidades extrahematológicas según criterios de Bearman y cols¹⁸⁶ se muestran en la siguiente tabla 18.

Tabla 18. Toxicidades extrahematológicas grado \geq II tras el trasplante (n=44).

Toxicidades grado \geq II	Número de pacientes (%)
Mucositis orofaríngea	42 (95)
Gastrointestinal	11 (25)
Cardíaca	3 (7)
Pulmonar	0
Vejiga	0
Renal	1 (2)
Neurológica	1 (2)
Hepática	5 (11)
Enfermedad veno-oclusiva hepática	0

En la mayoría de pacientes (95%) presentaron mucositis grado ≥ 2 , y se observó una relación entre la gravedad de esta mucositis y la exposición a busulfán estimada tras la primera dosis (ver figura 3).

Figura 3. Relación entre gravedad de la mucositis y concentraciones en equilibrio estacionario (C_{ss}) de busulfán (n=44) (r_s=0.387; p<0.01).



La reconstitución hematológica y el tiempo de hospitalización tras trasplante se muestran en la tabla 19. La reconstitución de neutrófilos se completó en el 100% de los pacientes.

Tabla 19. Reconstitución hematológica y el tiempo de hospitalización tras trasplante.

	N. de pacientes evaluables	Media (rango) (días)
Neutrófilos $\geq 0.5 \times 10^9/l$	40	13 (10 . 20)
Plaquetas $\geq 20 \times 10^9/l$	36	13 (8 . 30)
Tiempo de hospitalización (días)	44	21 (13 . 46)

- **Evaluación de efectividad**

De los 44 pacientes incluidos, 4 murieron por causas relacionadas con el procedimiento y previos a la evaluación: 2 por fallo multiorgánico y 2 por infección pulmonar. De los restantes 40 pacientes evaluables para respuesta a los 3 meses 15 (37,5%) estaban en respuesta completa con inmunofijación negativa, 21 (52,5%) estaban en remisión parcial y 4 (10%) en enfermedad estable.

5.1.3. Caracterización del comportamiento farmacocinético poblacional de busulfán, identificando y cuantificando la variabilidad observada, y validación del modelo farmacocinético poblacional desarrollado en un nuevo grupo de pacientes

- **Pacientes y concentraciones**

De los 44 pacientes incluidos en el estudio de la Caracterización farmacocinética individual, 23 fueron incluidos prospectivamente en el estudio de modelización de farmacocinética poblacional y se realizó una validación del modelo con los nuevos 21 pacientes restantes.

Los criterios de inclusión y exclusión, la descripción de la terapia de acondicionamiento, la medicación concomitante, el control de concentraciones plasmáticas y método analítica son las descritas previamente (ver apartado 4.1.2.).

Se utilizaron para el análisis los datos de 137 concentraciones plasmáticas de del grupo referencia (n=23) y 105 concentraciones plasmáticas del grupo validación (n=21).

- **Modelo FC poblacional de busulfán**

El modelo FC poblacional básico propuesto corresponde a un modelo farmacocinético monocompartimental con absorción y eliminación de primer orden y extravascular administración y descrito con aclaramiento plasmático poblacional (Cl/F), volumen aparente de distribución (Cl/F) y constante de absorción (Ka/F). Sin embargo, los datos disponibles no soportaron la estimación de Ka/F ni la variabilidad interindividual de Ka/F. Consecuentemente este parámetro fue obtenido de la bibliografía⁹⁹. Un modelo bi-compartimental no mejoraba el resultado vs el modelo monocompartimental y no se observó una disminución estadísticamente significativa en OFV.

La variabilidad interindividual fue descrita con un modelo exponencial y resultando en unos valores de 26,9% para Cl/F y de 14,4% para V/F.

La distribución de la variabilidad del error residual se asumió mixta, describiéndose a través de los valores de θ_4 como escala de valor aditiva y θ_5 como escala de valor proporcional.

Del análisis de co-variables se observó que edad influye significativamente en Cl/F (reducción en el valor de la función objetivo en NONMEM significativamente ($p < 0,05$)). Además el peso y el sexo influyen significativamente en V/F. Como se ha indicado en Material y Métodos, las variables continuas, es decir peso en el parámetro volumen de distribución y edad en el parámetro aclaramiento plasmático, fueron incluidas como:

$$P_j = P_{POP} * (Cov_j / Cov_{MEAN})^{COV} \text{ o } P_j = P_{POP} * COV [1 + (Cov_j - Cov_{MEAN})]$$

donde P_j es el parámetro FC para el paciente j y con un valor de la co-variable, P_{POP} es el valor típico del parámetro FC correspondiente al valor medio de la co-variable en la población (60 años para edad y 72,9 kg para peso), Cov_j es el valor de la co-variable para el paciente j , Cov_{MEAN} es la media de la co-variable en la población y COV representa la escala del valor de la influencia de la co-variable.

Las variables categóricas, es decir el sexo en el parámetro FC volumen de distribución, fueron incluidas en el modelo según se expresa a continuación:

$$P_j = P_{POP} + COV (1 \cdot Cov_i)$$

donde P_j es el parámetro FC para el paciente j , Cov_i es el valor numérico, en este caso: 1 para la hombre o 0 para mujer, P_{POP} es el valor típico del parámetro FC correspondiente al valor de co-variable de referencia y COV es el factor multiplicativo para la influencia de esta co-variable en el parámetro FC.

La estimación final de los parámetros farmacocinéticas poblacionales se indican en la tabla 20. En la figura 4 se puede observar la buena concordancia entre los valores observados y predichos. Los valores de los residuales

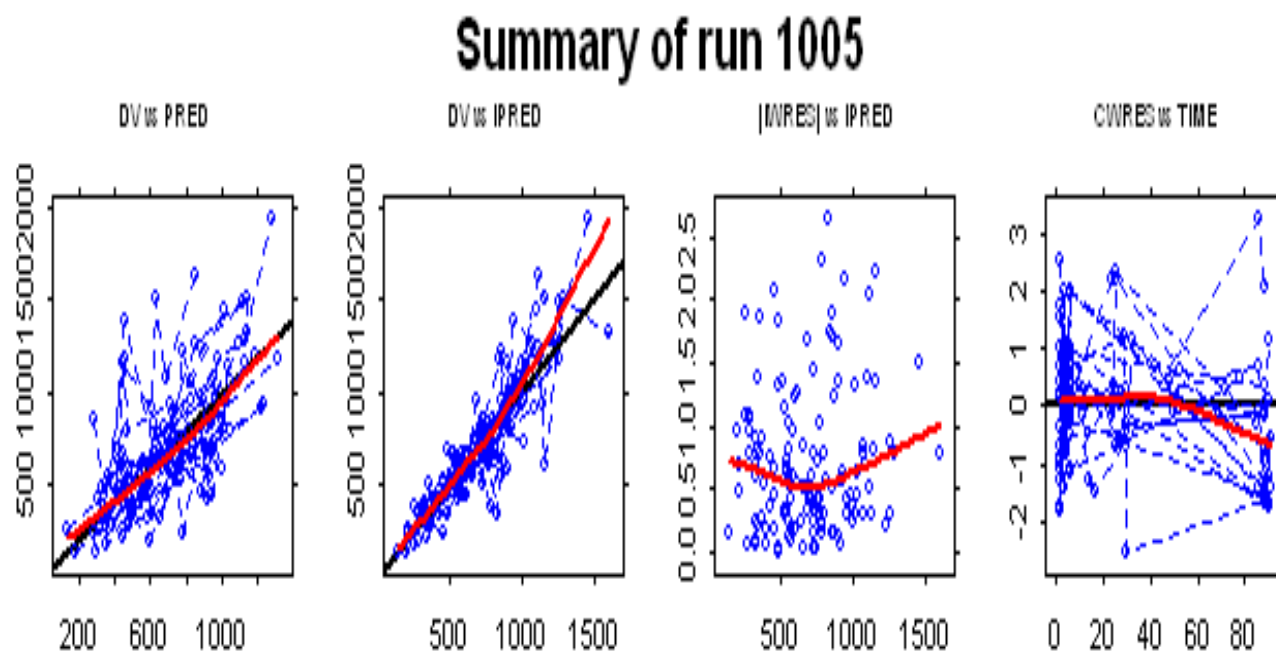
ponderados están uniformemente distribuidos y en un rango aceptable. La estimación de $\omega_{1-shrinkage}$ y $\omega_{2-shrinkage}$ mostró valores inferiores al 30% ($\omega_{1-shrinkage}$: 4.78%; $\omega_{2-shrinkage}$: 28.7% y $\omega_{3-shrinkage}$: 25.1%)

Tabla 20. Estimación de los parámetros farmacocinéticos poblacionales del modelo final

Parámetro	Estimación	Precisión (SE en %)
$\theta_{CL/F}$ (L/h)	8,45	5,8
$\theta_{V/F}$ (L)	35,9	6,2
$\theta_{Ka/F}$ (h ⁻¹)	1,68 FIX	
θ_{V2} (Theta 6)	0,285	65,3
θ_{CL2} (Theta 7)	-0,282	4,5
θ_{V3} (Theta 8)	0,434	90,3
θ_4	-0,363	85,7
θ_5	-0,215	14,7
$\omega_{2CL/F}$ (%)	26,9	27,2
$\omega_{2V/F}$ (%)	14,4	63,3

SE: error estándar; $\theta_{CL/F}$ = BU aclaramiento de BU de un paciente con una edad media (60 años); $\theta_{V/F}$ = volumen de distribución de BU en un paciente varón con un peso medio (72,0 kg); $\theta_{Ka/F}$ = constante de absorción; θ_{CL2} = escala del valor de la influencia de la co-variable edad en el aclaramiento de BU; θ_{V2} = escala del valor de la influencia de la co-variable peso en el volumen de distribución de BU; θ_{V3} = factor multiplicativo para la influencia de esta co-variable sexo en el volumen de distribución de BU; θ_4 corresponde a escala de valor aditivo en el error residual; θ_5 corresponde al factor multiplicativo en el error residual; ω_{2p} = variancia inter-individual (P = CL/F, V/F).

Figura 4. Gráfica de bondad de ajuste para el modelo poblacional final. Se incluye gráfica de acuerdo entre concentraciones plasmáticas observadas vs predichas y gráfico de predicciones vs residuales y residuales condicionales.

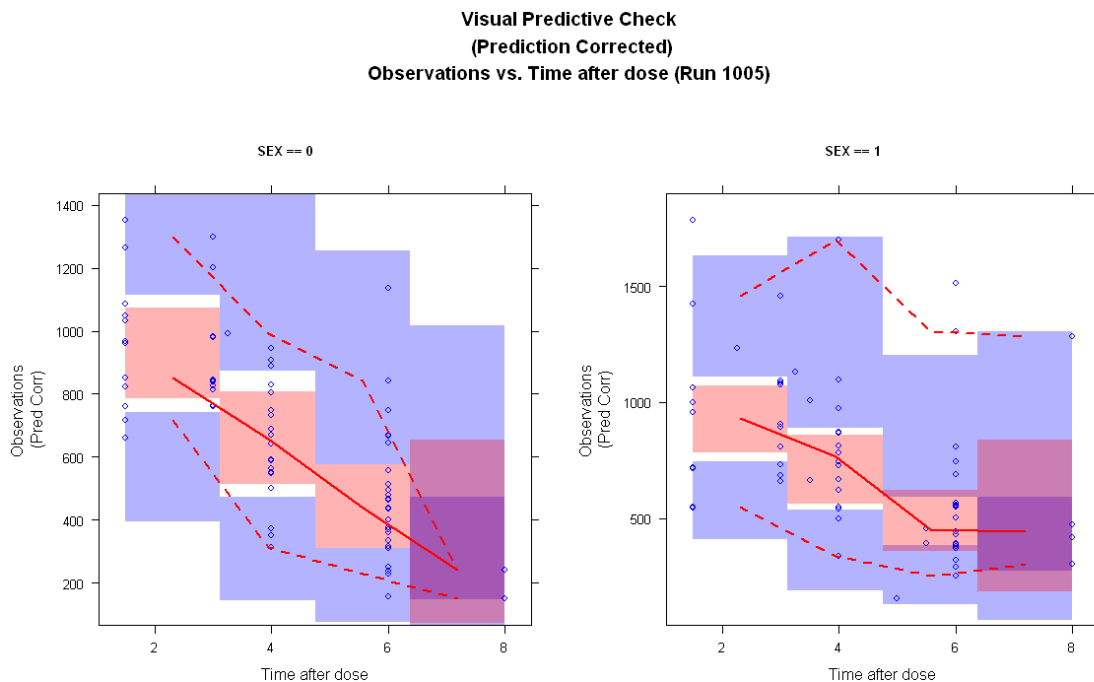


DV: concentraciones observadas; PRED: predicciones poblacionales; IPRE: predicciones individuales; IWRES: residuales ; CWRES: residuales condicionales . Línea roja: línea de identidad; Línea negra gruesa: indica la tendencia general de los datos. Concentraciones de BU (DV, PRED y IPRE) en ng/mL, tiempo en horas.

- **Validación del modelo FC poblacional final**

Los resultados de la validación interna mediante un test de *visual predictive check* (*vpc*) mostraron que prácticamente todas las observaciones se encuentran en el intervalo de confianza (IC) del 95% para cada paciente representativo: 1) hombre edad media 57 años y peso medio 81 kg y primera dosis (OCC=1) y 2) mujer edad media 58 años y peso medio 65 kg y primera dosis (OCC=1). La figura 5 muestra los resultados correspondientes a las concentraciones plasmáticas para estos dos pacientes representativos. En ambos casos el IC90% incluyeron todas las concentraciones de busulfán.

Figura 5. Evaluación del modelo final: comparación entre los percentiles 5^o, 50^o (línea marcada) y 95 de las simulaciones para paciente representativo, en la izquierda varón, con 81 kg de peso y 57 años, y a la derecha mujer con 65 kg de peso y 58 años. Concentraciones expresadas en ng/mL y tiempo en horas. Puntos: concentraciones de busulfán observadas.



Los datos de la validación interna por Bootstrapping se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Datos de la validación interna por bootstrapping

	Estimación	IC 95%
θ_{CL}/F (L/h)	8,45	7,39-9,51
θ_{V}/F (L)	35,9	30,74-41,05
θ_{Ka}/F (h ⁻¹)	1,68	Fix
θ_4	-0,363	-0,21- (-0,94)
θ_5	-0,215	-0,28-(-0,15)
θ_{V2}	0,285	0,07-0,64
θ_{CL2}	-0,0282	-0,05-(-0,003)
θ_{V3}	0,434	0,28-1,24
ω_{2CL}/F	0,0723	0,038-0,111
ω_{2V}/F (%)	0,0207	0,01-0,042

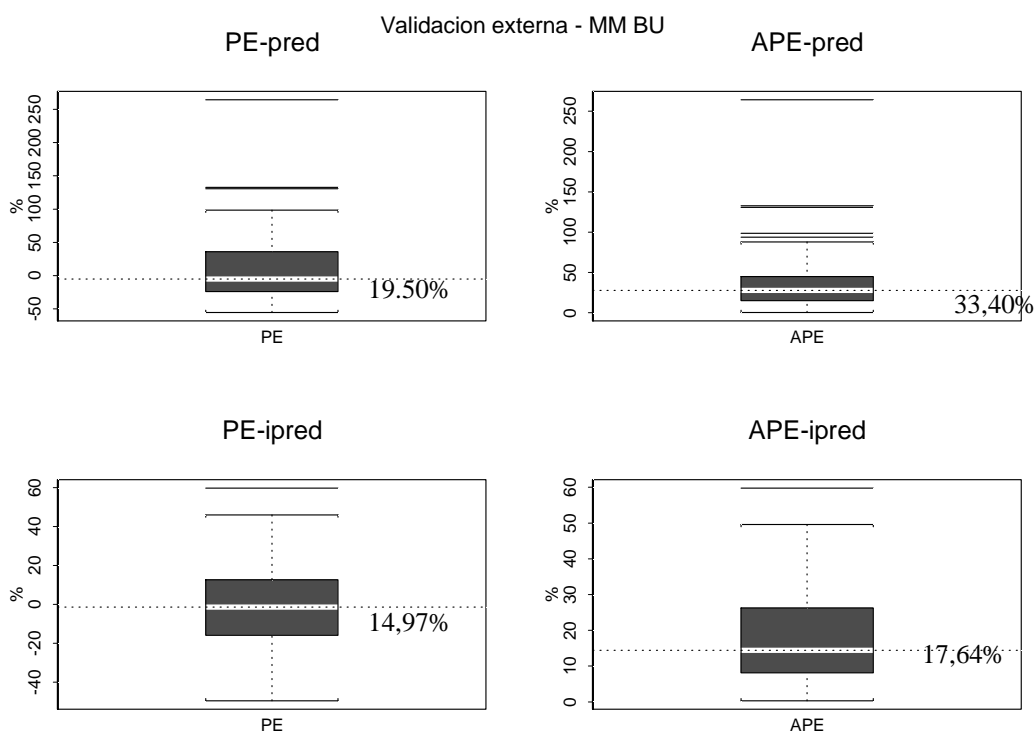
Para la validación externa del modelo farmacocinético, se analizó la capacidad predictiva analizando los datos de nuevos individuos (grupo validación, n=21, 8 varones y 13 mujeres) tratados con busulfán oral en similares condiciones que la población de estudio (grupo de referencia, n=23) (ver Tabla 22).

Tabla 22. Características de los pacientes y de las concentraciones plasmáticas de busulfán de las poblaciones del grupo referencia (n=23) y del grupo validación (n=21).

Parámetro	Grupo de referencia (n=23)	Grupo validación (n=21)
Concentraciones de busulfán totales	137	105
Rango concentraciones plasmáticas (mg/L)	0,20-1,90	0,20-1,28
Edad (media±DE) (años al diagnostico)	57,4±6,3	53,4±5,9
Peso (media±DE) (Kg)	72,6±12,4	69,9±12,9
Sexo: (hombres / mujeres)	11/12	8/13
Obesos (%)	17,4%	14,3%

El sesgo medio y la precisión para los estimados bayesianos MAP (IPRED) resultaron en 14,97% y 17,64% respectivamente, ambos cercanos al valor esperado de 0, y mejores que los valores obtenidos para el sesgo y precisión del modelo farmacocinético poblacional basal (PRED), que fueron 19,50% y 33,40% respectivamente (ver figura 6).

Figura 6. Box-plots del porcentaje de error (PE-pred: para concentraciones estimadas poblacionales; PE-ipred: para concentraciones estimadas individuales (*MAP Bayesian*)) y error absoluto de predicción (APE-pred: para concentraciones estimadas poblacionales; APE-ipred: para concentraciones estimadas individuales (*MAP Bayesian*)) de los datos del grupo validación.



La línea blanca punteada en cada gráfico indica el percentil 50, la amplitud de la caja indica los percentiles 25 y 75 y los paréntesis indican los percentiles 10 y 90. El resto de líneas horizontales identifican a los %outliers+ (es decir valores fuera del rango del percentil 10-90).

5.2. Sub-estudio Población adulta que recibe busulfán asociado a fludarabina en un contexto de régimen de acondicionamiento para un trasplante de intensidad reducida (AloTiR)

5.2.1. Caracterización farmacocinética individual de cada paciente, a través de un método de regresión no lineal.

▪ Pacientes

Se incluyeron de manera prospectiva desde mayo del 2000 hasta diciembre de 2003 32 pacientes (20 hombres y 12 mujeres). La edad media fue 56 años (rango 35-66 años) y 10 de los 32 pacientes (31%) tenían más de 60 años. Las características clínicas de los pacientes al diagnóstico y al trasplante se muestran en la siguiente tabla 23.

Tabla 23 . Características de los pacientes (n=32).

N. pacientes	32
Edad (media, rango) al trasplante	56 años [35-66]
Pacientes con edad > 60 años	10 (31%)
Sexo [hombres/mujeres]	20/12
Paciente hombre-donante mujer	9 (28%)
Enfermedad de base	
Leucemia mieloide crónica	5 (16%)
Otros síndromes mieloproliferativos crónicos	1 (3%)
Leucemia mieloide aguda (LMA)	16 (50%)
Síndrome mielodisplásico (MDS)	10 (31%)
Meses desde el diagnóstico [media, rango]	8 [2-84]
Trasplante autólogo previo	5 (16%)
Quimioterapia tipo-LMA antes del trasplante(2)	18 (56%)
Anormalidades citogenéticas al trasplante	18 (56%)
PS ECOG PS (2-3)(3)	6 (19%)
Comorbidity score(4)	
0	12 (38)
1-2	17 (53)
≥ 3	3 (9)
Celularidad infundida	
CD34+ células (x 10 ⁶ /kg)[media, rango]	7,9 [2,6-15,6]

(1) IPSS, international prognostic scoring system; (2) Quimioterapia tipo-LMA antes del trasplante se refiere a tratamiento de inducción o remisión que incluya antraciclinas y citarabina, con o sin otros fármacos; (3) ECOG PS, escala performance estatus Eastern Cooperative Oncology Group; (4) Comorbidity score calculado según Diaconescu et al (Diaconescu, 2004)

▪ **Parámetros farmacocinéticos**

Los parámetros farmacocinéticos de busulfán tras la administración de la primera dosis se resumen en la tabla 24.

Tabla 24. Parámetros farmacocinéticos de busulfán estimados tras la primera dosis de 1mg/kg (n= 32).

	<i>Media</i>	<i>SD</i>	<i>Rango</i>
Ke (h ⁻¹)	0,3268	0,1097	0,1617-0,5986
Cl/F (ml/min/kg)	2,6526	0,8387	1,4184-5,8332
AUCss(ng.h/ml)	6653	1834	2782-11750
Css (ng/ml)	1058	305	463-1958

Ke. Constante de eliminación; Cl/F aclaramiento oral aparente ; AUCss el área bajo la curva de concentraciones plasmáticas en el estado de equilibrio estacionario; Css concentración promedio en el estado de equilibrio estacionario.

▪ **Diseño posológico**

De los 32 pacientes tras la primera dosis, 16 (50%) tuvieron una AUCss > 6000 ng h/mL y por lo tanto requirieron reducción de la dosis y sólo 3 (9%) pacientes tuvieron AUCss <4500 ng h/mL y requirieron subida de dosis (Tabla 25), siendo la dosis media recibida en la 3^o dosis de 0,83 mg/kg (rango 0,66 a 1,17 mg/kg). La dosis total media recibida tras las 10 administraciones fue 8,98 mg/kg (rango 6,3-13,34 mg/kg) (Tabla 26).

Tabla 25. Distribución de pacientes según margen terapéutico tras la primera dosis

	<i>n (%)</i>
Total pacientes	32
En el margen terapéutico (Css 800-1000 ng/ml)	13 (41%)
Por debajo del margen (Css<800ng/ml)	3 (9%)
Por encima margen (Css>800ng/ml)	16 (50%)

Tabla 26. Dosis total media recibida tras las 10 administraciones.

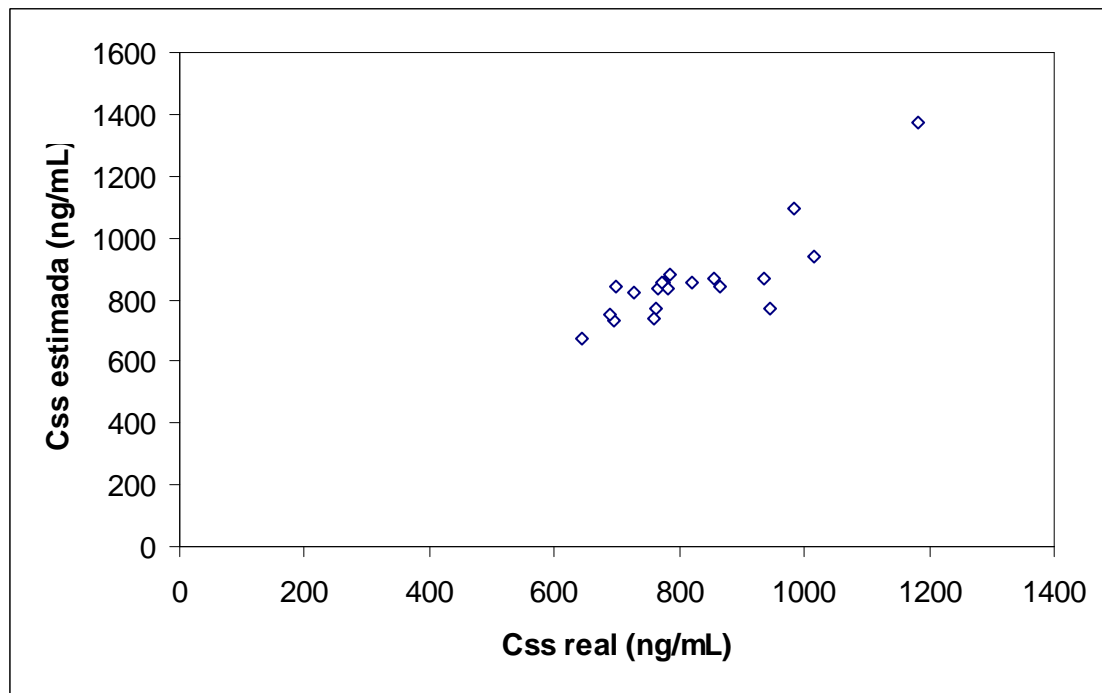
	<i>Media (rango)</i>
Dosis total media (mg/kg) (n=32)	8,98 (6,3-13,34)
<8 mg/kg (n=10, 31%)	7,49 (6,98-7,92)
8-10 mg/kg (n=19, 60%)	9,14 (8-10)
>10mg/kg (n=3, 9%)	11,54 (10,15-13,34)

▪ **Concentraciones plasmáticas individuales versus observadas**

En los 20 pacientes incluidos en el estudio en los que se realizó un estudio farmacocinético tras la administración de la dosis 9 (0 horas día -2), se demostró que el 65% de ellos consiguieron presentar una exposición al final del tratamiento con busulfán tras el ajuste posológico dentro del rango definida como exposición diana (área bajo la curva de concentraciones plasmáticas en el estado de equilibrio estacionario AUC_{ss} entre 4500 y 6000 ng.h/ml o la concentración promedio en el estado de equilibrio estacionario (C_{ss}) entre 750

y 1000 ng/ml) (ver apartado 4.4). La figura 7 muestra la comparación entre la C_{ss} individual y la observada tras la dosis 9.

Figura 7. Comparación entre la concentración plasmática observada tras la dosis 9 y la C_{ss} individual para cada paciente (n= 20) ($r^2= 0,7013$; $p<0,01$).



▪ **Factores de variabilidad**

Se analizó la relación entre diferentes parámetros farmacocinéticos (AUC_{ss}, C_{ss} y Cl/F) y la edad, sexo y peso de los pacientes, no encontrándose ninguna correlación estadísticamente significativa .

5.2.2. Análisis de la toxicidad y la efectividad del tratamiento y su relación con la exposición a busulfán

▪ Evaluación de toxicidad

No se observó ningún caso de EVOH en la población estudiada (n=32). Las toxicidades extrahematológicas según criterios de Common Toxicity Criteria versión 3 (CTCAE 3.0) se muestran en la siguiente tabla 27.

Tabla 27. Toxicidades extrahematológicas grado \geq II tras el trasplante (n=32).

Toxicidades	Número de pacientes (%)
Mucositis grado 3/4	4 (13%)
Diarrea	<5%
Enfermedad veno-oclusiva hepática	0 (0%)

Toxicidades	Media (rango)
Bilirrubina total sérica máxima (micromol/L)	23 (16-43)
AST sérica máxima (IU/L)	48 (30-78)
ALT sérica máxima (UI/L)	82 (42-180)

La reconstitución hematológica y el tiempo de hospitalización tras trasplante se muestran en la tabla 28. La reconstitución de neutrófilos se completó en el 100% de los pacientes.

Tabla 28. Reconstitución hematológica y el tiempo de hospitalización tras trasplante (en días) (n=32)

	Media (rango) (días)
Neutrófilos $\geq 0.5 \times 10^9/l$	14 (7-21)
Plaquetas $\geq 20 \times 10^9/l$	12(0-28)
Tiempo de hospitalización (días)	17 (10-26)

La mortalidad relacionada con el trasplante se produjo en 5 pacientes de los 32 analizados. Trasladando este análisis en el tiempo, la incidencia a los 100 días y a los 2 años fue 5% y 12% respectivamente, con un seguimiento medio de 42 meses.

La evaluación de la incidencia de enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), tanto aguda (EICHa) como crónica (EICHc), se muestra en la siguiente tabla (Tabla 29).

Tabla 29. incidencia de enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), tanto aguda (EICHa) como crónica (EICHc) (n=32).

	%
EICHa grado II-IV (a los 100 días)	20%
EICHc (a los 2 años)	65%
EICH (a los 2 años) ¹	45%

¹EICH tanto agudo grado II-IV, como crónico extenso o ambos

No se observó ninguna relación estadísticamente significativa entre exposición a busulfán y toxicidad al procedimiento.

▪ **Evaluación de efectividad**

La supervivencia global y la tasa de recaída de la enfermedad de base se muestra en la siguiente tabla (Tabla 30).

Tabla 30. Supervivencia global y la tasa de recaída de la enfermedad de base

	n (%)
Supervivencia global a 2 años (%, IC95%)	21 (65%; 47-81)
Recaída de la enfermedad (%, IC95%)	7 (21%; 8,2-39,4)

Todos los pacientes (n=32) consiguieron un correcto implante (ver tabla 28 reconstitución hematológica), indicando el test del quimerismo, un rápido reemplazo por la hematopoyesis del donante en todos los pacientes.

5.2.3. Caracterización del comportamiento farmacocinético poblacional de busulfán, identificando y cuantificando la variabilidad observada, y validación del modelo farmacocinético poblacional desarrollado en un nuevo grupo de pacientes

▪ Pacientes y concentraciones

De los 32 pacientes incluidos en el estudio de la Caracterización farmacocinética individual, 31 fueron incluidos prospectivamente en el estudio de modelización de farmacocinética poblacional y se realizó una validación del modelo con los datos de 16 nuevos pacientes.

Los criterios de inclusión y exclusión, la descripción de la terapia de acondicionamiento, la medicación concomitante, el control de concentraciones plasmáticas y método analítica son las descritas previamente (ver apartado 4.1.2.).

Se utilizaron para el análisis los datos de 167 concentraciones plasmáticas de del grupo referencia (n=31) y 85 concentraciones plasmáticas del grupo validación (n=16).

▪ Modelo FC poblacional de busulfán

El modelo FC poblacional básico propuesto corresponde a un modelo farmacocinético monocompartimental con absorción y eliminación de primer orden y extravascular administración y descrito con aclaramiento plasmático poblacional (Cl/F), volumen aparente de distribución (Cl/F) y constante de absorción (Ka/F). Sin embargo, los datos disponibles no soportaron la estimación de Ka/F ni la variabilidad interindividual de Ka/F. Consecuentemente este parámetro fue obtenido de la bibliografía⁹⁹ . Un modelo bi-compartimental no mejoraba el resultado vs el modelo monocompartimental y no se observó una disminución estadísticamente significativa en OFV.

La variabilidad interindividual fue descrita con un modelo exponencial y resultando en unos valores de 22,9% para Cl/F y de 17,6% para V/F.

La distribución de la variabilidad del error residual se asumió mixta, describiéndose a través de los valores de θ_4 como escala de valor aditiva y θ_5 como escala de valor proporcional.

Del análisis de co-variables se observó que el peso influye significativamente tanto en CI/F como en V/F (reducción en el valor de la función objetivo en NONMEM significativamente ($p < 0,05$), mientras que la edad y el sexo no.

Como se ha indicado en Material y Métodos, las variables continuas, es decir peso en el parámetro volumen de distribución y en el parámetro aclaramiento plasmático, fue incluido como:

$$P_j = P_{POP} * COV [1 + (COV_j - COV_{MEAN})]$$

donde P_j es el parámetro FC para el paciente j y con un valor de la co-variable, P_{POP} es el valor típico del parámetro FC correspondiente al valor medio de la co-variable en la población (69 kg para peso), COV_j es el valor de la co-variable para el paciente j , COV_{MEAN} es la media de la co-variable en la población y COV representa la escala del valor de la influencia de la co-variable.

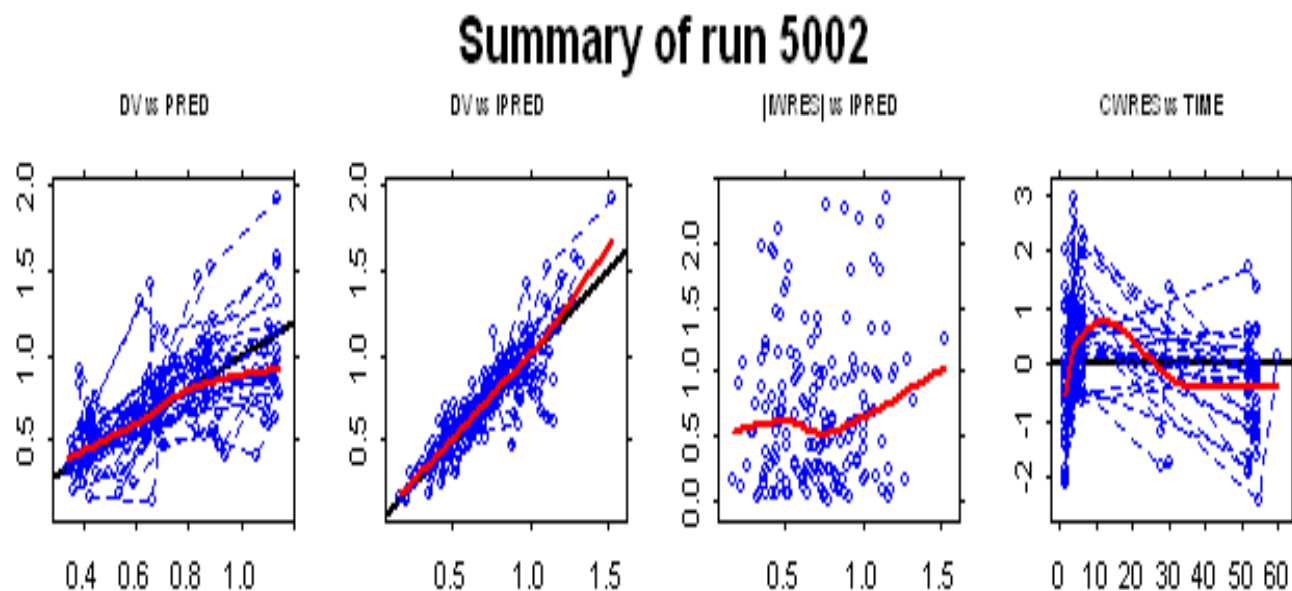
La estimación final de los parámetros farmacocinéticas poblacionales se indican según la Tabla 31. En la figura 8 se puede observar la buena concordancia entre los valores observados y predichos. Los valores de los residuales ponderados están uniformemente distribuidos y en un rango aceptable. La estimación de $-shrinkage$ y $-shrinkage$ mostró valores inferiores al 30% ($1-shrinkage$: 5,44%; $2-shrinkage$: 20,32% y $-shrinkage$: 13,96%).

Tabla 31. Estimación de los parámetros farmacocinéticos poblacionales del modelo final

Parámetro	Estimación	Precisión
		(SE en %)
$\theta_{CL/F}$ (L/h)	10,8	4,7%
$\theta_{V/F}$ (L)	43,9	4,8%
$\theta_{Ka/F}$ (h-1)	1,68 FIX	
θ_{CL2}	0,0097	29,7%
θ_{V2}	0,0143	22,7%
θ_4	0,0474	61,0%
θ_5	-0,200	16,7%
$\omega^2_{CL/F}$ (%)	22,98	35,8%
$\omega^2_{V/F}$ (%)	17,55	75,6%

SE: error estándar; $\theta_{CL/F}$ = BU aclaramiento de BU de un paciente con un peso medio (69 kg); $\theta_{V/F}$ = BU volumen de distribución de un paciente con un peso medio (69 kg); $\theta_{Ka/F}$ = constante de absorción; θ_{CL2} = escala del valor de la influencia de la co-variable peso en el aclaramiento de BU; θ_{V2} = escala del valor de la influencia de la co-variable peso en el volumen de distribución de BU; θ_4 corresponde a escala de valor aditivo en el error residual; θ_5 corresponde al factor multiplicativo en el error residual; ω^2_p = variancia inter-individual (P = CL/F, V/F).

Figura 8. Gráfica de bondad de ajuste para el modelo poblacional final. Se incluye gráfica de acuerdo entre concentraciones plasmáticas observadas vs predichas y gráfico de predicciones vs residuales y residuales condicionales.

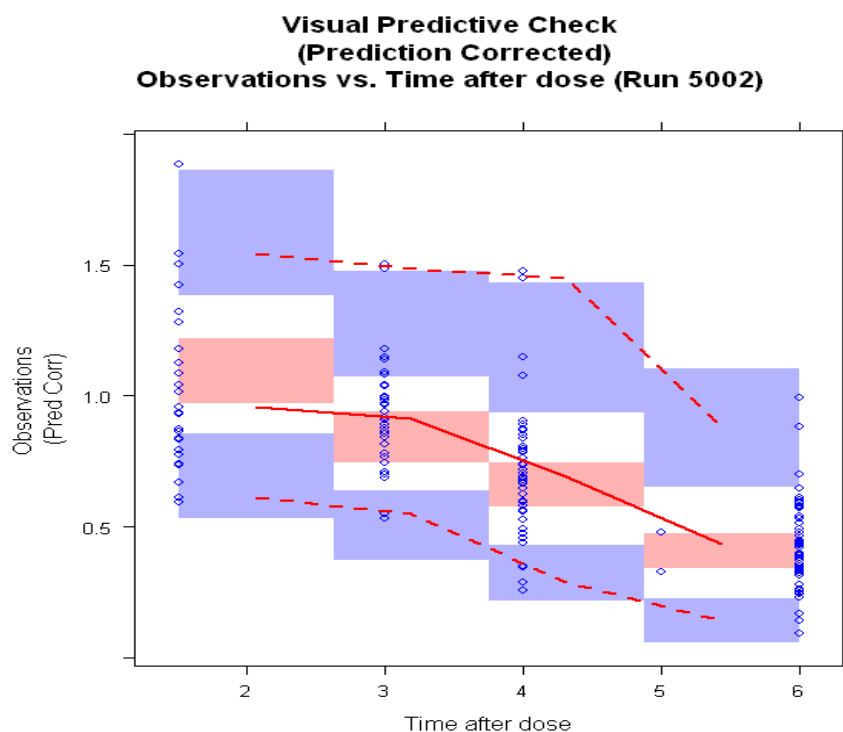


DV: concentraciones observadas; PRED: predicciones poblacionales; IPRE: predicciones individuales; IWRES: residuales ; CWRES: residuales condicionales . Línea roja: línea de identidad; Línea negra gruesa: indica la tendencia general de los datos. Concentraciones de BU (DV, PRED y IPRE) en ng/mL, tiempo en horas.

- **Validación del modelo FC poblacional final**

Los resultados de la validación interna mediante un test de *visual predictive check (vpc)* mostraron que prácticamente todas las observaciones se encuentran en el intervalo de confianza (IC) del 95% para cada paciente representativo. La figura 9 muestra los resultados correspondientes a las concentraciones plasmáticas para este paciente representativos, estando prácticamente todas las concentraciones de busulfán dentro del IC95%.

Figura 9. Evaluación del modelo final: comparación entre los percentiles 5º, 50 º (línea marcada) y 95 de las simulaciones para el paciente representativo, Concentraciones expresadas en ng/mL y tiempo en horas. Puntos: concentraciones de busulfán observadas.



Los datos de la validación interna por Bootstrapping se muestran en la Tabla 32.

Tabla 32. Datos de la validación interna por bootstrapping

	Estimación	IC 95%
θ_{CL}/F (L/h)	10,8	9,84-11,75
θ_{V}/F (L)	43,9	36,69-48,10
θ_{Ka}/F (h ⁻¹)	1,68	Fix
θ_4	0,0472	0,013-0,110
θ_5	-0,20	0,291-(-0,103)
θ_{Cl2}	0,00971	0,004 . 0,021
θ_{V2}	0,0143	0,0083-0,086
ω_{2CL}/F	0,0531	0,019-0,067
ω_{2V}/F (%)	0,0308	0,005-0,041

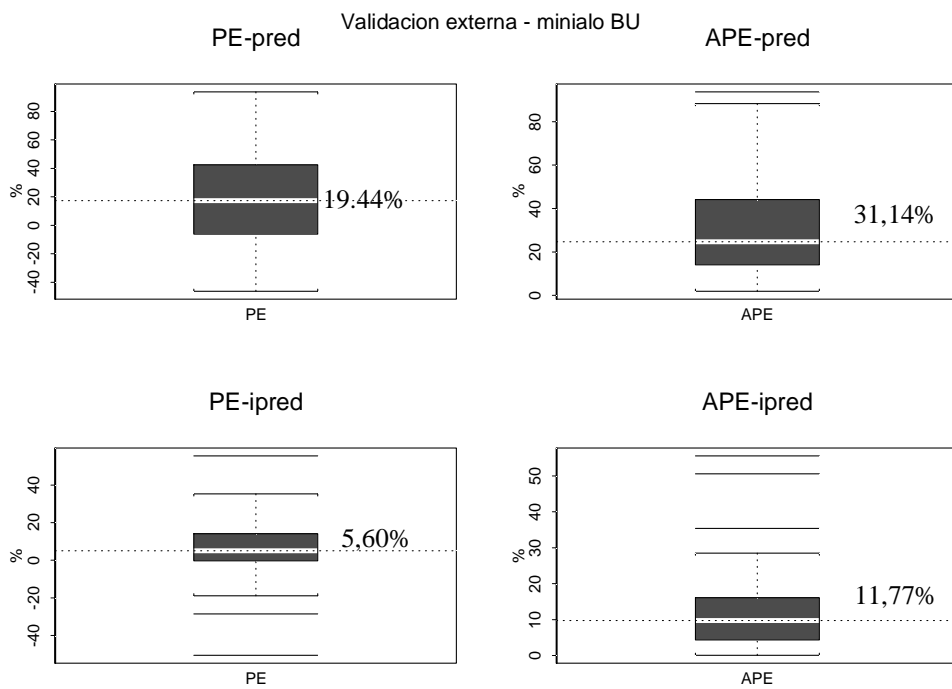
Las características clínicas y demográficas de estos 16 pacientes son similares al grupo de pacientes de referencia para el desarrollo del modelo (Tabla 33).

Tabla 33. Características clínicas y demográficas de los pacientes incluidos en la construcción del modelo (grupo referencia, n=31) y en la validación del mismo (grupo validación, n=16).

Parámetro	Grupo de referencia (n=31)	Grupo validación (n=16)
Edad media±DE (años)	52,0±12,1	56,6±17,4
Peso (Kg)	70,7±15,3	74,8±0,5
Sexo: (hombres / mujeres)	23/8	7/9
Obeso (%)	22,5	25,0
Nº concentraciones busulfan	167	85
Intervalo concentraciones (mg/l)	0,15-1,92	0,25-1,89

El sesgo medio y la precisión para los estimados bayesianos MAP (IPRED) resultaron en 5,60% y 11,7% respectivamente, ambos cercanos al valor esperado de 0, y mejores que los valores obtenidos para el sesgo y precisión del modelo farmacocinético poblacional basal (PRED), que fueron 19,4% y 31,1% respectivamente (ver figura 10).

Figura 10. Box-plots del porcentaje de error (PE-pred: para concentraciones estimadas poblacionales; PE-ipred: para concentraciones estimadas individuales (*MAP Bayesian*)) y error absoluto de predicción (APE-pred: para concentraciones estimadas poblacionales; APE-ipred: para concentraciones estimadas individuales (*MAP Bayesian*)) de los datos del grupo validación.



La línea blanca punteada en cada gráfico indica el percentil 50, la amplitud de la caja indica los percentiles 25 y 75 y los paréntesis indican los percentiles 10 y 90. El resto de líneas horizontales identifican a los %outliers+ (es decir valores fuera del rango del percentil 10-90).

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación se desarrolla a partir de la hipótesis que la alta variabilidad en el comportamiento farmacocinético de busulfán en su utilización en la práctica clínica asistencial junto con la relación entre exposición y la efectividad y toxicidad, hace necesario la monitorización farmacocinética para la individualización de la dosis. Por ello se plantea que los resultados del mismo, a través del estudio del comportamiento farmacocinético de busulfán, identificando y cuantificando la variabilidad observada, nos ha de permitir optimizar la dosis mediante algoritmos bayesianos y que ello sea aplicado en el futuro en la práctica asistencial de nuestro entorno. Se puede considerar que hay abundantes datos en la literatura sobre la caracterización farmacocinética de busulfán, como más adelante se desarrollará en esta discusión, pero no en dos poblaciones dónde es habitual en nuestro entorno la utilización del fármaco y hasta ahora no estudiadas en la literatura, población adulta con mieloma múltiple que recibe busulfán asociado a melfalán en regímenes de intensificación y posterior trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos y población adulta que recibe busulfán asociado a fludarabina en un contexto de régimen de acondicionamiento para un trasplante de intensidad reducida. A continuación se desarrolla la discusión de los resultados del trabajo de investigación a través de; 1) análisis de la validez interna y limitaciones del diseño; 2) la comparación de los resultados con otros estudios publicados; 3) identificación necesidades futuras de investigación; y 4) análisis de la utilidad práctica de los resultados y propuesta de actuación.

6.1. Análisis de la validez interna y limitaciones del diseño

El presente trabajo de investigación se desarrolla de manera prospectiva en la recogida de datos sobre la base del desarrollo a su vez de dos protocolos cooperativos de grupos españoles de investigación (GEM-2000 y CETLAM-2003). Consecuentemente los datos analizados presentan la ventaja de ser propios de la práctica asistencial pero adolecen de una sistemática propia de los estudios observacionales a diferencia del ensayo clínico. Por otro lado, el propio objetivo del trabajo de investigación describe que se desea analizar dos poblaciones muy concretas no estudiadas previamente, población adulta con mieloma múltiple que recibe busulfán asociado a melfalán en regímenes de intensificación y posterior trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (Población MM) y población adulta que recibe busulfán asociado a fludarabina en un contexto de régimen de acondicionamiento para un trasplante de intensidad reducida (población AloTIR). Este hecho, de poblaciones específicas, junto con que el estudio es uni-céntrico, la n de pacientes y el nº de datos de concentraciones plasmáticas son relativamente limitados. Ciertamente es que, por otro lado al ser poblaciones específicas, en teoría se eliminan factores de variabilidad descritos en la literatura, como la propia patología o el efectos de las medicaciones concomitantes propias de los diferentes protocolos de acondicionamiento. Se puede decir que las dos poblaciones son homogéneas y sus características similares a la población general de dichas patologías, tanto en tratamientos previos recibidos como en medicación concomitante (ver Tabla 16 y 23). La proporción de población de edad avanzada (definido como >60 años) en ambos grupo de población se considera adecuado (30% en MM 31% y en población AloTIR) de igual manera que la distribución por sexos en la población de MM(52% mujeres) pero posiblemente con una presencia reducida de mujeres en la población AloTIR (37%). Es importante considerar estos aspectos por ser factores de variabilidad descritos en la literatura que pueden ser incorporados en los modelos farmacocinéticos poblacionales.

En referencia a la medicación concomitante que puede afectar a la farmacocinética de busulfán, es de especial interés la administración de fenitoina. En ambas poblaciones el 100% de pacientes reciben este fármaco como profilaxis de la toxicidad neurológica de busulfán, iniciándose el tratamiento 24 horas antes de la primera dosis de busulfán y continuando hasta 24 horas tras la última dosis de busulfán. Este hecho impide que se pueda realizar la comparación entre poblaciones que reciben el fármaco y que no, y al no disponer de concentraciones plasmáticas de fenitoina también dificulta su incorporación en el modelo farmacocinético poblacional como co-variable. Pero desde el punto de vista de validez externa, ciertamente esta administración profiláctica de fenitoina es la habitual en la práctica clínica asistencial en nuestro entorno.

El número de concentraciones plasmáticas, como ya se ha indicado, al ser un estudio basado en la práctica asistencial y a su vez uni-céntrico, es limitado aunque se considera suficiente. Respecto la monitorización de las concentraciones plasmáticas de busulfán más allá de la dosis 1, el número de muestras sanguíneas disponibles es limitado, pero debe tenerse en cuenta la dificultad específica de la determinación de concentraciones plasmáticas en la administración de un fármaco como busulfán en el contexto de trasplante, ya que se administra cada 6 horas en 16 dosis en MM y 10 dosis en AloTIR. Y es precisamente en esta dificultad que, en el caso que sea necesaria una individualización de dosis, se debe hacer el estudio farmacocinético orientado a la individualización posológica tras la primera dosis e inmediatamente modificar las siguientes hasta completar el tratamiento.

Respecto a la vía de administración de busulfán, en el 100% de los casos la administración ha sido oral, por ello no se puede realizar comparación del comportamiento farmacocinético en estas poblaciones entre vía oral e intravenosa. La causa de ello es por un lado que la comercialización de busulfán se produjo posterior a la inclusión de pacientes y recogida de los datos y en segundo lugar, porque al ya realizarse monitorización cinética para individualización de dosis en estos pacientes, se eliminaban los riesgos toxicidad y no efectividad ligados a la variabilidad no sólo de la absorción, sino también de la eliminación del fármaco.

El hecho de que únicamente se incluyan pacientes que reciben el fármaco por vía oral constituye una limitación en la caracterización de la absorción y la biodisponibilidad oral del fármaco en las poblaciones de estudio. Y a su vez tiene como consecuencia la limitación también de la estimación del resto de parámetros farmacocinéticos, tales como aclaramiento plasmático y volumen de distribución aparente.

Relacionado con este aspecto de la monitorización farmacocinética para individualizar la dosis, se considera que la mayor limitación del trabajo de investigación en referencia al estudio de la relación entre exposición a busulfán y toxicidad y/o efectividad del fármaco es el hecho de no disponer de grupo control. Cuando se diseñó el trabajo de investigación, ya había suficiente evidencia en la literatura de la necesidad de realizar programas de individualización posológica de busulfán^{168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176}. Uno de los más destacados, el grupo de Slattery y cols¹⁷⁶ del Fred Hutchinson Research Center, Seattle, USA, ya en el año 1998 se realizaron 446 individualizaciones posológicas y también se tuvo el contacto personal en el año 1997 del grupo de Pavía que a nivel europeo estaban liderando este programa. Ante ello se decidió que era necesario iniciar el programa de individualización posológica de busulfán en el Hospital de Sant Pau en todas las poblaciones para disminuir riesgos de toxicidad y optimizar la efectividad de la terapia, a la vez que se iniciaba la línea de investigación en poblaciones específicas no descritas en la literatura, hecho que llevó al trabajo de investigación presentado en esta memoria. Aún con esta limitación propia de la intervención, se investiga la relación de exposición a busulfán y las diferentes incidencias de toxicidad y a la efectividad, habiéndose encontrado relación en la población de MM entre exposición y incidencia de mucositis. Se analizó la gravedad de la mucositis utilizando la graduación de toxicidad de la Organización Mundial de la Salud, que utiliza una escala que va de 0 a IV y la mayoría de pacientes (95%) presentaron mucositis grado ≥ 2 , y se observó una relación entre la gravedad de esta mucositis y la exposición a busulfán estimada tras la primera dosis (ver figura 3). No se encuentra relación entre exposición y EVOH en ninguna de las poblaciones y el dato de incidencia de EVOH es 0%, hecho positivo clínicamente y que podría deberse a la intervención realizada (individualización

posológica) pero que hace que la posible relación entre exposición y EVOH deba quedar como hipótesis al no disponer de grupo control.

Consecuentemente al hecho de la individualización posológica a través de la monitorización farmacocinética, se debe indicar otra limitación del estudio, descrito en el material y métodos. Es la dificultad de tener definido una exposición diana de busulfán para estas poblaciones al no haber en la literatura evidencia independiente. La exposición diana en la población de MM se definió como área bajo la curva de concentraciones plasmáticas en el estado de equilibrio estacionario AUC₀₋₆ entre 4200 y 5100 ng.h/ml, adaptando los criterios definidos por Slattery y cols¹⁷⁶ según los artículos publicados que relacionan exposición con toxicidad y eficacia con el objetivo de disminuir el riesgo de toxicidad sin incrementar el riesgo de recaída, ante la evidencia del riesgo reconocido de toxicidad, principalmente EVOH, y recaída. En la población AloTIR, la exposición diana se definió en AUC₀₋₆ entre 4500 y 6000 ng.h/ml adaptando los criterios definidos por Bornhäuser et al¹⁸¹. Se debe considerar en este caso que los márgenes definidos se basan también en conseguir la menor toxicidad pero manteniendo la capacidad de implante y no recaída. Es importante tener en cuenta que en el artículo de Bornhäuser et al el acondicionamiento se puede considerar mieloablativo, mientras que en la población de AloTIR no, pero al no haber ningún estudio en este escenario se adaptaron los márgenes.

En el diseño se describe que se analizó la relación entre diferentes parámetros farmacocinéticos estimados a través de farmacocinética individual y la edad, sexo, peso y obesidad (definido como IMC > 30 kg/m²) de los pacientes en la primera fase del presente trabajo de investigación y en la segunda fase, dichos factores de variabilidad son analizados en el modelo farmacocinético poblacional como co-variables. Se considera adecuado su inclusión por su plausibilidad científica como por ser factores de variabilidad descritos en la literatura (ver siguiente apartado). Ya se ha descrito anteriormente el factor de medicación concomitante. Pero si que se debe indicar como limitación en el trabajo de investigación que no se ha estudiado la función hepática ni la presencia de polimorfismos genéticos. La metabolización de busulfán tiene lugar a nivel hepático por conjugación con glutatión a través del sistema enzimático glutatión-S-transferasa (GST)^{58, 59}. Esta vía de metabolización

podría estar influida por factores genéticos (ver apartado correspondiente, 1.3.5 Aspectos farmacogenéticos). Respecto a la función hepática la dificultad de su inclusión como factor de variabilidad es la selección del parámetro que refleja mejor su funcionalidad y su relación con la eliminación de fármacos. Respecto a los aspectos farmacogenéticos, estudios realizados in vitro e in vivo muestran controversia y discordancia en la asociación de la exposición de busulfán y la presencia de diversos polimorfismos de los diferentes isoenzimas de GST, que son GSTA1, GSTM1, GSTP1 y GSTT1^{69, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78}. A parte de la dificultad de la técnica de análisis farmacogenético, estas publicaciones y la propia técnica no estaban disponibles en el momento del diseño del trabajo de investigación, que fue en 2000, pero sí que claramente marcan una línea futura de investigación.

Para el desarrollo del modelo farmacocinético poblacional se procedió al análisis simultáneo de las concentraciones de busulfán frente al tiempo, mediante el modelo de efectos mixtos no lineales implementado en el programa NONMEM v 7.3.⁸⁵ y aplicando la estrategia de tres etapas. Como ya se ha descrito anteriormente, el número de concentraciones plasmáticas, es limitado aunque se considera suficiente y se dispone de determinaciones más allá de la dosis 1. Pero los tiempos de muestreo no son aleatorios, hecho que en si es una limitación para la representación adecuada de la evolución de las concentraciones del fármaco a lo largo del intervalo de dosificación y consecuentemente para el desarrollo del modelo, sin embargo estos datos observacionales de tiempos de muestreo de pacientes tratados en práctica asistencial presentan la ventaja de tener la correspondientes utilidad clínica. El número de concentraciones por individuo se considera también adecuado. Debido a que se utilizó busulfán administrado oralmente, una limitación del trabajo es que los datos disponibles no soportaron la estimación de los parámetros farmacocinéticos que caracterizan la absorción (K_a/F) ni la variabilidad interindividual en ellos. Consecuentemente K_a/F fue obtenido de la literatura científica previa⁹⁹.

Finalmente destacar que se realizó una validación tanto interna como externa del modelo farmacocinético poblacional, siendo en la validación externa las características de la población de validación similares a la población de estudio (ver Tabla 22 y 33).

6.2. Comparación de los resultados con otros estudios publicados

Según se puede ver en los apartados 1.3.4. Aspectos farmacocinéticos y 1.3.6. farmacocinética poblacional de busulfán, el comportamiento farmacocinético de busulfán utilizado en dosis altas como acondicionamiento para trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) ha sido extensamente estudiado y descrito en numerosos artículos científicos, tanto del comportamiento del fármaco a través de estudio individual, administrado oralmente (Tabla 1 y 2)^{28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45} y por vía intravenosa (IV) (Tabla 3)^{5, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53}, como farmacocinética poblacional de busulfán (Tabla 6)^{99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106}. En ellos se describe que busulfán presenta una gran variabilidad en sus parámetros farmacocinéticos, tanto en la absorción si se administra por vía oral, como la eliminación. y esto hace concluir que es imposible predecir la exposición sistémica al busulfán sin disponer de sus concentraciones plasmáticas. Pero estos estudios están realizados mayoritariamente en poblaciones que recibían la asociación de busulfán con ciclofosfamida y con una alta presencia de población pediátrica (ver tablas 1, 2 3 y 6).

El único estudio publicado que analiza la farmacocinética de busulfán en la asociación con melfalan es el estudio de Bouligand¹⁵¹. Se trata de un estudio prospectivo que explora la farmacodinamia de busulfán combinado con melfalan (n=25) o con tiotepa (n=20) seguido de trasplante autólogo en niños y adolescentes con tumores sólidos. La dosis de busulfán administrada es 600mg/m² y no se indica que se realice ajuste posológico según concentraciones plasmáticas del fármaco. No se observa diferencias en la exposición a Bu y incidencia de EVOH en el grupo BuMel y si se observa en el grupo BuTTP, ya que los pacientes que desarrollan EVOH presentan una exposición al fármaco (AUC) tras la 13 dosis mayor (6.201±607 ng.h/ml) que los que no presentan EVOH (5.024±978 ng.h/ml) (p<0,05). Pero se debe destacar que en este estudio la población es pediátrica o de adolescentes con tumores sólidos, y consecuentemente es una población muy diferente que la población de mieloma múltiple. El mieloma múltiple afecta fundamentalmente a la población de edad avanzada, con un pico de incidencia entre los 70 y 75

años de edad ¹⁹⁵. La mediana de edad al diagnóstico es de 68 años, de manera que el 75% de los hombres y el 79% de las mujeres diagnosticadas de MM son mayores de 60 años. Como se ha indicado anteriormente en el apartado 1.3.4 Aspectos Farmacocinéticos, la edad es uno de los factores más importantes relacionados con la variabilidad en la metabolización de busulfán. Aunque este hecho se ha estudiado comparando población pediátrica y adulta joven. También es de interés considerar que la asociación de busulfán y melfalán pueden producir una mayor incidencia de EVOH que melfalán en monoterapia, sobre todo si no se individualiza la dosis ^{151, 180}. Consecuentemente es de gran interés el objetivo del presente trabajo de investigación del estudio de la efectividad y toxicidad, así como el desarrollo de un modelo farmacocinético poblacional en población adulta que recibe busulfán asociado a melfalán.

Respecto a la parte del trabajo de investigación presentado en esta memoria referido a la población AloTIR, los datos de la farmacocinética y resultados de la individualización posológica de busulfán en este tipo de acondicionamiento también son mucho menores que en el acondicionamiento convencional en trasplante alogénico basado en busulfán y ciclofosfamida. Los estudios de farmacocinética de busulfán en protocolos combinados con fludarabina son dos: Bornhäuser et al de grupo de Seattle¹⁸¹ y de Lima et al del grupo de Hudson⁵⁰, pero ambos con diferencias importantes en el protocolo de acondicionamiento respecto al utilizado en el trabajo de investigación aquí presentado. Los datos publicados por el grupo de Seattle en 2003¹⁸¹, aunque el acondicionamiento es combinación de busulfán y fludarabina, pero son dosis mayores (fludarabina dosis total 120mg/m² y busulfán oral dosis total 16mg/kg) y por lo tanto se pueden considerar intensidad convencional. En este estudio realizan individualización posológica de busulfán en base a las concentraciones plasmáticas. En el estudio de de Lima⁵⁰ las diferencias respecto al protocolo AloTIR español son tanto en la dosis de busulfán, que es en dosis única diaria por vía endovenosa (130mg/m² del día . 6 a . 3, es decir dosis total 520mg/m²) como de fludarabina (160mg/m² dosis total). En este estudio realizan determinaciones de concentraciones plasmáticas, pero no individualizan la dosis de busulfán. La relación del régimen y de la farmacocinética de busulfán con la efectividad podría tener connotaciones muy diferentes en AloTIR que en intensidad convencional ya que en el objetivo de un AloTIR es de especial

importancia la búsqueda del efecto del injerto contra la enfermedad. Ante ello se podría plantear la hipótesis que a menores niveles de exposición a busulfán, mayor posibilidad de recaída, pero en este caso el equilibrio debe considerar también que si esta exposición favorece la presencia de EICH y/o el un efecto anti-leucemia. También en este caso la población es adulta y de edad avanzada, y como se ha indicado anteriormente en el trabajo, la edad es uno de los factores más importantes relacionados con la variabilidad en la metabolización de busulfán.

Habiendo ya analizado en esta discusión las diferencias en las poblaciones objeto del trabajo respecto a las poblaciones publicadas, si comparamos los datos de aclaramiento plasmático de los análisis farmacocinéticos individuales de nuestras poblaciones y las de los estudios publicados en pacientes adultos (bibliografía Tabla 2 y 3), podemos indicar que el aclaramiento observado en la población de MM tras la primera dosis, $2,298 \pm 0,7404$ m/min/kg, es ligeramente menor que el de los estudios publicados y que el estimado en la población de AloTIR ($2,652 \pm 0,839$ ml/min/kg) y por supuesto mucho menor que el de la población pediátrica. La causa posible de este hallazgo seguramente tiene que ver con el factor edad, ya que como se ha indicado anteriormente el mieloma múltiple afecta fundamentalmente a la población de edad avanzada, y en el caso de nuestra población la edad media era en el momento del trasplante fue 55 años (rango 41-68) y 13 de los 44 pacientes (30%) tenían más de 60 años, a diferencia de los estudios como el de Grochow y cols³⁶ con busulfán oral o el de Shaughnessy y cols⁵¹ con el fármaco IV que la población tenía una menor edad media. Contrariamente las diferencias en la edad entre nuestras propias poblaciones, MM y AloTIR, son menores, la edad media en AloTIR fue 56 años (rango 35-66 años) y 10 de los 32 pacientes (31%) tenían más de 60 años, por lo que se deduce que tienen que haber más factores que expliquen las diferencias en el aclaramiento plasmático del fármaco. Respecto a la variabilidad observada en la eliminación en nuestras poblaciones, es similar a la de los estudios con farmacocinética individual publicados en poblaciones adultas (comparar tabla 1 y 3 vs tablas 22 y 30).

Determinados estudios han analizado las diferencias en el comportamiento farmacocinético de busulfán entre pacientes con diferentes enfermedades. Vassal y cols⁴⁴ observaron que el aclaramiento era mayor en niños con

enfermedades lisosomales que en niños con enfermedades malignas. En otros estudios realizados por Bertholle-Bonnet y cols⁶² y Poonkuzhali y cols³⁸ presentaron datos mostrando que en los niños con talasemia también el aclaramiento era mayor que en el resto de patologías, y incluso relacionándolo con una mayor proporción de fallo del implante en la utilización de dosis estándar y no individualizadas³⁸. También se han observado diferencias entre pacientes con diferentes tumores, y así Gibbs y cols³⁴ mostró que los pacientes con LNH tenían un aclaramiento plasmático menor que los pacientes con LMC. Desconociendo como dicha variabilidad según patología se puede explicar en términos de otros factores, tanto de tratamientos previos recibidos como de aspectos farmacogenéticos, cabría destacar el esfuerzo realizado en el presente trabajo de investigación de estudiar poblaciones específicas con el objetivo de utilizar dicha información en la práctica clínica asistencial y se propone que esta línea de investigación se continúe en el futuro (ver apartado 6.3.)

Respecto a los resultados del trabajo de investigación en el apartado de la caracterización del comportamiento farmacocinético poblacional de busulfán, tras identificar y cuantificar la variabilidad observada y posterior comparación con los estudios publicados, se pueden observar datos interesantes. En resumen de los estudios publicados de farmacocinética poblacional de busulfán (Tabla 6), hay 8 estudios de los cuales 5 son exclusivamente en población adulta. Respecto a la vía de administración de busulfán, 3 artículos la administración es oral y 5 es IV. Los protocolos de administración son diversos, incluyendo By-Cy, Bu-ICT, Bu-Flu-Tim y otros en muy menor proporción.

Los resultados del presente estudio en la población MM muestran la existencia de una influencia significativa de edad en el aclaramiento plasmático de busulfán y de peso y sexo en el volumen aparente de distribución. A su vez, en la población AloTIR se observó que también el peso influía en el aclaramiento plasmático y en el volumen aparente de distribución.

Si analizamos los estudios publicados respecto a las co-variables incluidas en el modelo de farmacocinética poblacional, en 6 estudios se incluyen co-variables, siendo el peso la co-variable más importante ya que influyen en el aclaramiento en 4 estudios y en el volumen aparente de distribución en 5 estudios. Otras co-

variables descritas en los estudios son ALT, administración de fenitoina, superficie corporal, tipo de enfermedad en aclaramiento y sexo en volumen.

La edad es uno de los factores más importantes relacionados con la variabilidad en la metabolización de busulfán, siendo paradigmático el hecho que los niños presentan una mayor metabolización que los adultos y requiriendo mayores dosis para conseguir exposiciones similares^{31, 35, 36, 39}. Estas diferencias en el aclaramiento plasmático según edad podría ser atribuido al mayor tamaño del hígado en los niños cuando se relaciona con la superficie corporal, sin embargo en estudios que han estudiado y/o dosificado el fármaco en base a la superficie corporal, no se ha observado diferencias entre niños y adolescentes, sugiriendo una posible relación con la expresión de GST. En el caso de variabilidad dentro de poblaciones adultas, uno de los factores que puede influir, debido a que el busulfán es metabolizado en el hígado, es la alteración de su funcionalidad tanto, hecho que como se ha indicado anteriormente, incluso se ha relacionado con pacientes que han recibido muchos tratamientos previos al TPH². Es de interés que en el estudio de Sandström⁹⁹, en población mayoritariamente adulta, se incluyó como co-variable el valor de ALT para el aclaramiento plasmático.

Respecto al análisis realizado en la caracterización de la variabilidad inter-ocasión hay dos factores que podrían influir de manera importante en las poblaciones estudiadas. Uno de ellos es el efecto de la fenitoina en el aclaramiento plasmático de busulfán, como se definió en el estudio de Sandström⁹⁹, en que la administración concomitante de fenitoina influía en la eliminación del fármaco. En 7 pacientes tratados con dosis alta de busulfán oral (1 mg/kg en 16 dosis) previo a trasplante de médula ósea, se observó un aumento del aclaramiento plasmático (de 2,8 a 3,32 ml/min/kg), un AUC menor (de 6,475 a 5,412 ng/ml.h) y una semivida de eliminación más corta (de 3,94 a 3,03) entre la primera y la última dosis, cuando se les administró fenitoina. En cambio no se observaron cambios en los parámetros farmacocinéticos en 8 pacientes tratados con diazepam¹⁰⁹. Ello podría ser compatible con la explicación que la fenitoina actúa a través de la vía de GST. En cambio Carreras et al¹¹⁰ compararon el perfil farmacocinético de busulfán IV administrado conjuntamente con clonazepam (n=24) vs los datos de una cohorte histórica a los que se administró fenitoina (n=127) y observó un

aclaramiento plasmático 10% superior en la cohorte con clonazepam que en la cohorte con fenitoina, considerándose dicha diferencia no clínicamente relevante. La explicación de dichas diferencias podría basarse en que el efecto inductor del metabolismo de la fenitoina es mayor en el intestino que en el hígado, observándose diferencias en la interacción dependiendo de la vía de administración de busulfán. Como se ha indicado en las limitaciones, el efecto de la fenitoina no se pudo estudiar al no disponer de población que no reciba el fármaco anticonvulsivante y al no disponer de concentraciones plasmáticas del mismo.

Otro factor importante a tener en cuenta en el análisis de la variabilidad interocasión es el efecto que puede tener la propia intervención realizada en la optimización posológica a través de la monitorización de concentraciones plasmáticas de busulfán. El denominado efecto $\%TDM+$ ($\%Therapeutic\ drug\ monitoring+$) puede generar en si mismo una disminución de dicha variabilidad. Por esta razón no se ha analizado la ocasión como una posible co-variable en el modelo.

Sorprendentemente en los resultados del actual trabajo de investigación no se identificó la obesidad como un factor de variabilidad en el aclaramiento aunque si el peso total en la población AloTIR, lo que concuerda con los estudios en adultos de Sandström⁹⁹, Takama¹⁰⁰, Choe¹⁰⁵ y Takamatsu¹⁰³.

Ya en el 1999, el estudio realizado por Gibbs y cols³⁴, mostró que la obesidad tiene un impacto en el aclaramiento de busulfán. En dicho estudio, analizaron el comportamiento farmacocinético de busulfán en 279 pacientes y observaron que los pacientes muy obesos, es decir con un índice de masa corporal (IMC) superior a 35 kg/m² tenían un menor aclaramiento plasmático, entre un 17 a 32% menor, que aquellos con un IMC normal. El ajuste de la dosis según el peso ideal puede corregir estas diferencias en la eliminación, aunque sigue existiendo variabilidad, y ciertamente la optimización de la dosis en pacientes obesos es un tema de debate²⁹.

Como se ha indicado anteriormente, la metabolización de busulfán se realiza a través del sistema enzimático glutatión-S-transferasa (GST)^{58, 59}, siendo GSTA1 la forma más activa de GST en humanos y la de mayor importancia en el metabolismo de busulfán. Estudios realizados in vitro e in vivo muestran

controversia y discordancia en la asociación de la exposición de busulfán y la presencia de diversos polimorfismos de los diferentes isoenzimas de GST. Tras revisión de la literatura, se encuentran 8 estudios in vivo que estudian la influencia de los polimorfismos de GST y la farmacocinética de busulfán y obtienen resultados positivos, pero el problema es que no hay concordancia entre cual de los polimorfismos y que isoenzima está relacionado a la vez que hay discordancia entre los estudios que analizan población que recibe busulfán oral o IV^{69, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79}. La mayoría de dichos estudios se realizan con poblaciones pequeñas (de 22 a 77 pacientes), excepto el estudio de Abbasi y cols⁶⁹ que es una población de mayor tamaño (n=152). Kusama y cols⁷¹ observaron que los pacientes heterocigotos para GSTA1 (GSTA1*A/*B), tenían una eliminación más lenta de busulfán administrado oral que aquellos que tenían la variante salvaje (%wild-type+, GSTA1*A/*A) homocigota. Un estudio realizado en pacientes con talasemia (n=114)⁷² sugiere que el aclaramiento plasmático de busulfán oral es mayor en pacientes con genotipo GSTM1 nulo comparado con aquellos que tenían un GSTM1 positivo, relacionándolo a su vez con un menor riesgo de enfermedad veno-oclusiva hepática (18,3% vs 46,5%, p=0,01). Tanto el trabajo de Johnson y cols⁷³ como el de ten Brink y cols⁷⁷ también estudiando la farmacocinética de busulfán IV y observaron que el aclaramiento plasmático era menor en los portadores del polimorfismo GSTA1*B y no estaba asociado con polimorfismos GSTM1 o P1. En cambio en el estudio de Zwaveling y cols⁷⁹ en que el busulfán se administraba por vía IV a 77 niños, la farmacocinética no se vio modificada en relación a los polimorfismos de GSTA1, GSTM1, GSTP1 o GSTT1. Se han propuesto diferentes hipótesis sobre los datos contradictorios de los estudios, incluyendo la diferente expresión de GSTA1 a nivel intestinal, que podría afectar a la diferencia de los datos entre busulfán oral y IV. Así en el estudio de Abbasi y cols⁶⁹ observan que el aclaramiento de busulfán administrado oral se asocia con los genotipos de GSTA1 (p=0,008), pero en cambio no hay dicha asociación en la población a los que se administra IV (p=0,21). De esta manera los autores defienden que la personalización de la dosis de busulfán, ya sea oral o IV, no se puede simplificar en base al genotipado. En la revisión de la literatura no encontramos ningún estudio que incluya los polimorfismos con co-variable, ni el presente trabajo de investigación, pero consideramos que debe ser una línea de investigación en el futuro.

En este estudio en ambas poblaciones el peso es una variable que influye de manera importante al volumen aparente de distribución, hecho también observado en todos los estudios de farmacocinética poblacional de busulfán^{99, 101, 100, 105}. La inclusión del sexo como co-variable del volumen en la población de MM podría estar ligado a su relación con el peso o podría ser debido a otras relaciones desconocidas, pero también es un hallazgo único en la literatura.

Previa aplicación de los modelos farmacocinéticos poblacionales en la práctica clínica diaria, es preciso comprobar su robustez interna y su fiabilidad en datos de pacientes nuevos. La validación interna de los dos modelos farmacocinéticos poblacionales presentados en este estudio confirmó su robustez para explicar los datos analizados. Por otra parte, la validación externa realizada en datos procedentes de nuevos pacientes similares a los de las dos poblaciones de estudio, demostró una precisión y exactitud adecuada, corroborando su futura utilidad en la práctica clínica a través de optimizar la dosis mediante algoritmos bayesianos. Aún siendo la validación de los modelos uno de los puntos cruciales en su desarrollo, cabe resaltar que, por desgracia, de los 8 estudios publicados sólo en 2 se realizó la validación externa.

A continuación se va a analizar y discutir los resultados en referencia a la relación entre exposición de busulfán y toxicidad y/o efectividad del tratamiento. La toxicidad más importante de busulfán administrado a dosis altas es la EVOH. Como ya se ha indicado, a partir de los estudios descritos, diferentes grupos de investigación desarrollaron y analizaron la hipótesis de la relación entre la exposición a busulfán y el riesgo de desarrollo de EVOH, llegándose finalmente a asociar un incremento de riesgo de desarrollo de EVOH en pacientes que reciben acondicionamiento con busulfán cuando la exposición al fármaco, expresada en AUC es superior a 1500micromol x min (ver Tabla 12)^{28, 33, 60, 63, 146, 148, 149, 150, 151}. En los resultados del presente trabajo de investigación ningún paciente presentó EVOH en ninguna de las poblaciones analizadas. Este hecho ya de por sí es significativo, considerando que la incidencia de EVOH en los estudios publicados que incluían busulfán como régimen de acondicionamiento en población adulta está entre 2 y el 31% (ver Tabla 8)^{1, 3, 114, 118, 119, 120, 121, 122, 123}. Es de especial interés el estudio realizado en población que recibieron busulfán según el mismo protocolo GEM-2000 del grupo cooperativo español que la

población del grupo MM de este trabajo de investigación, pero sin monitorización farmacocinética y individualización de la dosis, en cuyos resultados se describe que la incidencia de EVOH fue de 7,6%²², hecho que llevó a este grupo cooperativo a cambiar el protocolo de intensificación a melfalán en monoterapia.

Los datos de AUC (0-6) y su variabilidad observada tras la primera dosis (Tabla 17 y tabla 24) en ambas poblaciones son los siguientes: población MM 6.052 rango 3.192 a 12.180 ng.h/ml y población AloTIR 6.653 rango 2.782 a 11.750 ng.h/ml. En la población MM, el 55% de los pacientes tuvieron una AUCss > 5100 ng h/mL y por lo tanto requirieron reducción de la dosis, siendo la media de reducción de 23%±8% y sólo 2 (5%) pacientes tuvieron AUCss (0-6) <4200 ng h/mL y requirieron subida de dosis, que fue de un 12,5% en ambos casos. En la población AloTIR, de los 32 pacientes 16 (50%) tuvieron una AUCss (0-6) > 6000 ng h/mL tras la primera dosis, y por lo tanto requirieron reducción de la dosis y sólo 3 (9%) pacientes tuvieron AUCss (0-6) <4500 ng h/mL y requirieron subida de dosis (Tabla 25), siendo la dosis media recibida en la 3ª dosis de 0,83 mg/kg (rango 0,66 a 1,17 mg/kg). La dosis total media recibida tras las 10 administraciones fue 8,98 mg/kg (rango 6,3-13,34 mg/kg) (Tabla 26). Estos datos permiten deducir que si no se hubiese realizado monitorización farmacocinética con individualización posológica si se hubiese podido observar EVOH. Pero como ya se ha indicado en el apartado 6.6., se considera la mayor limitación del trabajo de investigación el hecho de no disponer de grupo control para poder concluir en la relación entre exposición y toxicidad. Y se desea insistir que en el momento del diseño del trabajo de investigación, ya había suficiente evidencia en la literatura de la necesidad de realizar programas de individualización posológica de busulfán. Este mismo hecho de la posible influencia de la intervención a través de la individualización posológica de busulfán en el análisis de la relación entre exposición y EVOH se puede indicar para el resto de toxicidades y con la efectividad, ya que no se observó tampoco relación ni con la incidencia de EICH, ni agudo ni crónico, ni con fallo de implante ni con recaída. En la tabla 15^{146, 161, 162, 163, 164, 165} se observan el resumen de los estudios que analizan la relación entre exposición a busulfán y fallo del implante, siendo concluyentes en cuanto a la relación 5 de los 6 estudios, pero en todos ellos el régimen de acondicionamiento era Busulfán-ciclofosfamida.

Si que se observó en la población de MM relación entre la gravedad de esta mucositis y la exposición a busulfán estimada (ver figura 3). Esta relación es de interés ya que no se ha observado en ningún otro estudio publicado.

6.3. Identificación de necesidades futuras de investigación

Tras el análisis realizado en los apartados 6.1. y 6.2. de esta discusión y con los resultados del presente trabajo, se considera que aunque se ha publicado abundantemente en referencia al comportamiento farmacocinético de busulfán y a la relación de su exposición con la toxicidad y efectividad del tratamiento, se requiere seguir investigando y se identifican las siguientes necesidades:

- Estudiar en nuevas poblaciones y en nuevos esquemas de tratamiento que incluyan dosis altas de busulfán y que sean diferentes a los estudiados en la literatura y en el presente trabajo de investigación, ya que se pueden observar variabilidades y relaciones entre exposición y toxicidad y/o efectividad diferentes, datos que a su vez permitirían optimizar mejor la terapia en estos pacientes.
- A su vez se considera que los factores de variabilidad no relacionado con factores demográficos (como peso, sexo y edad) están aún poco analizados en la literatura, tanto en poblaciones ya estudiadas como en no. Dentro de estos factores de variabilidad es de especial interés el análisis de la influencia de los polimorfismos genéticos ya que se considera que los estudios hasta ahora publicados no son concluyentes, en parte debido a un tamaño de muestra pequeño (pocos pacientes) y en parte a la dificultad por la variedad de polimorfismos de los diferentes isoenzimas de GST.
- Estudios que de manera prospectiva y comparando con grupo control, permitan definir claramente la relación entre exposición y toxicidad y efectividad de los diferentes regímenes de busulfán y a su vez definan las exposiciones dianas en estas poblaciones. La dificultad para ello en el momento actual es que con la evidencia disponible puede ser éticamente

cuestionable disponer de un grupo control sin monitorización farmacocinética

6.4. Análisis de la utilidad práctica de los resultados y propuesta de actuación

Se considera que el presente trabajo demuestra la alta variabilidad en el comportamiento farmacocinético de busulfán en su utilización en la práctica clínica asistencial en dos poblaciones específicas de pacientes, población MM y población AloTIR, hecho que hace necesario la monitorización farmacocinética para la individualización de la dosis. Debido a que los factores de variabilidad definidos como las co-variables incluidas en el modelo farmacocinético poblacional tienen que ver con la variabilidad en la eliminación del fármaco, se considera que esta monitorización e individualización de dosis debe realizar tanto en tanto en la administración de busulfán oral como IV, ya que la diferente vía de administración sólo elimina la variabilidad en la absorción pero no en la eliminación, y por ello se propone que esta estrategia de optimización terapéutica se expanda a todos los centros que realicen trasplantes en España.

Se considera que con los datos aportados con el presente trabajo de investigación, a través de la caracterización el comportamiento farmacocinético poblacional de busulfán, identificando y cuantificando la variabilidad observada, y habiéndose validado los modelos farmacocinéticos poblacionales, dichos datos pueden ser empleados como información *a priori* para optimizar la dosis de busulfán en pacientes de las dos poblaciones estudiadas, mediante algoritmos bayesianos en la práctica asistencial de nuestro entorno.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Tras el desarrollo del presente trabajo de investigación en las poblaciones de pacientes específicas, en población adulta con mieloma múltiple que recibe busulfán asociado a melfalán en regímenes de intensificación y posterior trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (Población MM) y población adulta que recibe busulfán asociado a fludarabina en un contexto de régimen de acondicionamiento para un trasplante de intensidad reducida (Población AloTIR) , **se concluye:**

4. *Respecto al objetivo: Estudiar la caracterización farmacocinética individual de cada paciente, a través de un método de regresión no lineal.*

- Tras la caracterización farmacocinética individual a través de un método de regresión no lineal se observa una alta variabilidad, tanto en la población MM como AloTIR (rango del CV de los parámetros 31 - 33%). Esta variabilidad fue posteriormente caracterizada, identificada y cuantificada dicha mediante el análisis farmacocinético poblacional.
- A la dosis considerada estándar, el 55% de la población MM y el 50% de la población AloTIR tuvieron una exposición tras la primera dosis por encima de la definida como diana y por lo tanto requirieron reducción de la dosis. Estos datos sugieren que se requieren programas de monitorización terapéutica para la individualización posológica ya que el busulfán es un fármaco de margen terapéutico estrecho que presenta una la alta variabilidad.

❖ *Respecto al objetivo: Analizar la toxicidad y la efectividad del tratamiento y su relación con la exposición a busulfán*

- En las condiciones del estudios en que se realizó monitorización terapéutica para la individualización posológica, no se observa ningún caso de EVOH en la población estudiada, ni población MM ni

AloTIR, y en ambas poblaciones la reconstitución de neutrófilos se completa en el 100% de los pacientes

- Se observa una relación entre la gravedad de la mucositis y la exposición a busulfán estimada en la población MM. No se encuentra ninguna otra relación entre exposición a busulfán y toxicidad ni en la población AloTIR ni MM.
- No se encuentra ninguna relación entre exposición a busulfán y efectividad del tratamiento en el periodo de seguimiento de los parámetros ni en la población AloTIR ni MM.

❖ *Respecto al objetivo: Caracterizar el comportamiento farmacocinético poblacional de busulfán, identificando y cuantificando la variabilidad observada, y validar el modelo farmacocinético poblacional desarrollado en un nuevo grupo de pacientes*

- Los resultados en la población MM muestran la existencia de una influencia significativa de la edad en el aclaramiento plasmático de busulfán y del peso y del sexo en el volumen aparente de distribución.
- Los resultados en la población AloTIR muestran que el peso influía tanto en el aclaramiento plasmático como en el volumen aparente de distribución, mientras que ninguna otra variable analizada en el modelo influía.
- Las diferencias entre las poblaciones en las co-variables que influyen en los parámetros farmacocinéticos de busulfán indican que se requiere caracterizar la variabilidad de manera específica para poblaciones homogéneas, identificando y cuantificando dicha variabilidad de manera diferenciada.
- La validación interna confirma la robustez de los modelos farmacocinéticos poblacionales de ambas poblaciones, población MM y población AloTIR.

- La validación externa realizada con datos procedentes de nuevos pacientes en ambos modelos farmacocinéticos poblacionales demuestra una adecuada precisión y exactitud, lo que y corrobora la utilidad futura en la práctica clínica de la optimización de la dosis mediante algoritmos bayesianos.

8.BIBLIOGRAFÍA

8.BIBLIOGRAFÍA

1. Tutschka JP, Copelan AE, Klein PJ. Bone marrow transplantation for leukaemia following new busulfan and cyclophosphamide regimen. *Blood* 1987; 70: 1382-1388.

2 . Copelan EA, Deeg HJ. Conditioning for allogeneic marrow transplantation in patients with lymphohematopoietic malignancies without the use of total body irradiation. *Blood*. 1992 ;80(7):1648-58.

3 Santos WG, Tutschka PJ, Brookmeyer R et al. Marrow transplantation for acute non lymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *New Engl J Med* 1983; 309: 1347-1353.

4. Andersson BS, Gajewski J, Donato M, Giralt S, Gian V, Wingard J, Tarantolo S, Fernandez H, Hu WW, Blume K, Kashyap A, Forman SJ, Champlin RE. Allogeneic stem cell transplantation (BMT) for AML and MDS following i.v. busulfan and cyclophosphamide (i.v. BuCy). *Bone Marrow Transplant*. 2000 May;25 Suppl 2:S35-8.

5. Andersson BS, Thall PF, Madden T, Couriel D, Wang X, Tran HT, Anderlini P, de Lima M, Gajewski J, Champlin RE. Busulfan systemic exposure relative to regimen-related toxicity and acute graft-versus-host disease: defining a therapeutic window for i.v. BuCy2 in chronic myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(9):477-85.

6 Ringden O, Horowitz M, Gale R et al. Outcome after allogeneic bone marrow transplant for leukemia in older adults. JAMA 1993; 270: 57-60.

7. Ringden O. Allogeneic bone marrow transplantation for hematological malignancies - controversies and recent advances. Acta Oncol. 1997;36(6):549-564.

8 Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozaman C, Speck B, Truitt RL, Zwaan FE, Bortin MM. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. Blood 1990; 75: 555-562.

9. Kolb H, Schattenberg A, Goldman J, Herenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusion in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation working Party Chronic Leukemia. Blood 1995; 86: 2041-2050.

10. Collins Jr RH, Shpilberg O, Drobyski WR, Porter DL, Giralt S, Champlin R, Goodman SA, Wolff SN, Hu W, Verfaillie C, List A, Dalton W, Ognoskie N, Chetrit A, Antin JH, Nemunaitis J. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. Journal Clinical Oncology 1997; 15: 433-444.

11. Giralt S, Thall PF, Khouri I, Wang X, Braunschweig I, Ippolitti C, Claxton D, Donato M, Brutton J, Cohen A, Davis M, Andersson B, Anderlini P, Gajewski J,

Kornblau S, Andreeff M, Przepiorka D, Ueno NT, Molldrem J, Champlin R. Melphalan and purine analog-containing preparative regimens: reduced-intensity conditioning for patients with haematological malignancies undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Blood* 2001; 97: 631-637.

12. Khouri IF, Keating M, Przepiorka D, Anderlini PO, Brien S, Giralt S, Ippoliti C, von Wolff B, Gajewski J, Donato M, Claxton D, Ueno N, Andersson B, Gee A, Champlin R. Transplant lite: induction of graft-versus-malignancy using fludarabine-based non-ablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor cell transplantation as treatment for lymphoid malignancy. *Journal Clinical Oncology* 1998; 8: 2817-2824.

13. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, Varadi G, Kirschbaum M, Ackerstein A, Samuel S, Amar A, Brautbar C, Ben-Tal O, Eldor A, Or R. Non-myeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and non-malignant haematologic disease. *Blood* 1998; 91: 756-763.

14. Childs R, Clave E, Contentin N, Jayasekera D, Hensel N, Leitman S, Read EJ, Carter C, Bahceci E, Young NS, Barrett AJ. Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood* 1999; 94: 3234-3241.

15. McSweeney P, Niederwieser D, Shizuru J, Molina A, Wagner J, Minor S, Radich J, Chauncey T, Hegenbart U, Maloney D, Nash R, Sandmaier B, Blume K, Storb R. Outpatient allografting with minimally myelosuppressive immunosuppressive conditioning of low-dose TBI and postgrafting cyclosporine and mycophenolate mofetil. *Blood* 1999; 94: 393a.
16. Carella AM, Champlin R, Slavin S, McSweeney P, Storb R. Mini-allografts: ongoing trials in humans. *Bone Marrow Transplantation* 2000; 25: 345-350.
17. Bornhäuser M, Thiede C, Schuler U et al. Dose-reduced conditioning for allogeneic blood stem cell transplantation: durable engraftment without antithymocyte globulin. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 119-125.
18. Martino R, Caballero MD, Canals C, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning: results of a prospective multicentre study. *Br J Haematol.* 2001;115:653-659.
19. Martino R, Caballero MD, de la Serna J, et al. Low transplant related mortality after second allogeneic peripheral blood stem cell transplant with reduced-intensity conditioning in adult patients who have failed a prior autologous transplant. *Bone Marrow Transplant.* 2002;30:63-68.
20. San Miguel JF, Bladé Creixentí J. Mieloma múltiple. En: *Hematología*. García-Conde J, San Miguel JF, Sierra J, Urbano-Ispizua A, Vicente V, Vives Corrons JL. Aran Ediciones SL , Madrid 2003: p: 917-932.
21. Lahuerta JJ, Martínez-López J, Grande C, Bladé J, de la Serna J, Alegre A et al for the GETH and PETHEMA Groups. Conditioning regimens in autologous stem cell transplantation for the multiple myeloma: a comparative study of

efficacy and toxicity from the Spanish registry for transplantation in multiple myeloma. *British Journal of Haematology* 2000; 109: 138-47.

22. Lahuerta JJ, Martínez R, Bladé J, de la Riba J, García-Laraña J, Alegre A, Prosper F, Arribas F, Sureda A, Carrera D, Bargay J, Díaz-Mediavilla J, San Miguel J. Prospects of the current protocol of the Spanish Myeloma Group. *The Hematology Journal* 2003; 4 (S1): S218.

23. Wheeler GP. Alkylating agents. In: Holland JF, Frei E eds. *Cancer medicine*. Philadelphia: Lea and Febiger 1982: 824-43.

24. Ijiri K, Potten CS. Response of intestinal cells of differing topographical and hierarchical status to ten cytotoxic drugs and five sources of radiation. *Br J Cancer*. 1983;47(2):175-85.

25. Thiele J, Zirbes TK, Lorenzen J, Kvasnicka HM, Dresbach S, Manich B, Leder LD, Niederle N, Diehl V, Fischer R. Apoptosis and proliferation (PCNA labelling) in CML--a comparative immunohistological study on bone marrow biopsies following interferon and busulfan therapy. *J Pathol*. 1997;181(3):316-22.

26. Hassan Z, Hassan M, Hellström-Lindberg E. The pharmacodynamic effect of busulfan in the P39 myeloid cell line in vitro. *Leukemia* 2001; 15: 1240-47.

27. Galton DAG. Myleran in chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 1953; 1: 208-213.

28. Grochow LB, Jones RJ, Brundrett RB, Braine HG, Chen TL, Saral R, Santos GW et al. Pharmacokinetics of busulfan: correlation with veno-occlusive disease

in patients undergoing bone marrow transplantation. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 1989; 25: 55-61.

29. Grochow LB, Baraldi C, Noe D. Is dose normalization to weight or body surface area useful in adults?. *J Natl Cancer Inst.* 1990 21;82(4):323-5.

30. Hassan M, Öberg G, Ehrsson H, Ehrnebo M, Wallin I, Smedmyr B, Tötterman T, Eksborg S, Simonsson B. Pharmacokinetic and metabolic studies of high-dose busulphan in adults. *Eur J Clin Pharmacol* 1989; 36: 525-30.

31. Hassan M, Öberg G, Bekassy AN, Aschan J, Ehrsson H, Ljungman P. Pharmacokinetics of high-dose busulphan in relation to age and chronopharmacology. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 1991; 28: 130-4.

32. Hassan M, Ljungman P, Bolme P, y cols. Busulfan Bioavailability. *Blood* 1994; 84: 2144-2150 .

33. Schuler U, Schroer S, Kühnle A, Blanz J, Mewes K, Kumbier I, Proksch B, Zeller KP, Ehninger G. Busulfan pharmacokinetics in bone marrow transplant patients: is drug monitoring warranted?. *Bone Marrow Transplant.* 1994;14(5):759-65.

34. Gibbs JP, Gooley T, Corneau B, Murray G, Stewart P, Appelbaum FR, Slattery JT. The impact of obesity and disease on busulfan oral clearance in adults. *Blood* 1999; 93: 4436-40.

35. Bostrom B, Enochson K , Johnson A, Bruns A, Blazar B. Plasma pharmacokinetics of high-dose oral busulfan in children and adults undergoing bone marrow transplantation. *Pediatr Transplant*. 2003;7 Suppl 3:12-8.
36. Grochow LB, Krivit W., Whitley CB, Blazar B. Busulfan Disposition in Children. *Blood* 1990; 75: 1723-1727.
37. Hassan M, Fasth A, Gerritsen B, Haraldsson A, Syručková Z, van den Berg H et al. Busulphan kinetics and limited sampling model in children with leukemia and inherited disorders. *Bone Marrow Transplantation* 1996; 18: 843-50.
38. Poonkuzhali B, Srivastava A, Quernin MH, Dennison D, Aigrain EJ, Kanagasabapathy AS, Krishnamoorthy R, Chandy M. Pharmacokinetics of oral busulphan in children with beta thalassaemia major undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1999 ;24(1):5-11.
39. Regazzi MB, Locatelli F, Buggia I, Bonetti F, Zecca M, Pregnolato M et al. Disposition of high-dose busulfan in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1993; 53: 45-52.
40. Shaw PJ, Scharping CE, Brian RJ, Earl JW. Busulfan pharmacokinetics using a single daily high-dose regimen in children with acute leukemia. *Blood* 1994; 84: 2357-2362.
41. Shaw PJ, Nath C, Berry A, Earl JW. Busulphan given as four single daily doses of 150 mg/m² is safe and effective in children of all ages. *Bone Marrow Transplant*. 2004 Aug;34(3):197-205.

42. Yeager AM, Wagner JE, Graham ML, Jones RJ, Santos GW, Grochow LB. Optimization of busulfan dosage in children undergoing bone marrow transplantation: a pharmacokinetic study of dose escalation. *Blood* 1992; 80: 2425-8.
43. Vassal G, Gouyette A, Hartmann O, Pico JL, Lemerle J. Pharmacokinetics of high-dose busulfan in children. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989;24(6):386-90.
44. Vassal G, Fischer A, Challine D, Boland I, Ledheist F, Lemerle S, Vilmer E, Rahimy C, Souillet G, Gluckman E, et al. Busulfan disposition below the age of three: alteration in children with lysosomal storage disease. *Blood.* 1993 Aug 1;82(3):1030-4.
45. Veal GJ, Nguyen L, Paci A, Riggi M, Amiel M, Valteau-Couanet D, Brock P, Ladenstein R, Vassal G. Busulfan pharmacokinetics following intravenous and oral dosing regimens in children receiving high-dose myeloablative chemotherapy for high-risk neuroblastoma as part of the HR-NBL-1/SIOPEN trial. *Eur J Cancer.* 2012 48(16):3063-72.
46. Schuler US, Renner UD, Kroschinsky F, Johne C, Jenke A, Naumann R, Bornhäuser M, Deeg HJ, Ehninger G. Intravenous busulphan for conditioning before autologous or allogeneic human blood stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2001;114(4):944-50.
47. Russell JA, Tran HT, Quinlan D, Chaudhry A, Duggan P, Brown C, Stewart D, Ruether JD, Morris D, Glick S, Gyonyor E, Andersson BS. Once-daily intravenous busulfan given with fludarabine as conditioning for allogeneic stem

cell transplantation: study of pharmacokinetics and early clinical outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8(9):468-76.

48. Fernandez HF, Tran HT, Albrecht F, Lennon S, Caldera H, Goodman MS. Evaluation of safety and pharmacokinetics of administering intravenous busulfan in a twice-daily or daily schedule to patients with advanced hematologic malignant disease undergoing stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8(9):486-92.

49. Dalle JH, Wall D, Theoret Y, Duval M, Shaw L, Larocque D, Taylor C, Gardiner J, Vachon MF, Champagne MA. Intravenous busulfan for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in infants: clinical and pharmacokinetic results. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32(7):647-51.

50. De Lima M, Couriel D, Thall PF, Wang X, Madden T, Jones R, Shpall EJ, Shahjahan M, Pierre B, Giralt S, Korbling M, Russell JA, Champlin RE, Andersson BS. Once-daily IV busulfan and fludarabine: clinical and pharmacokinetic results of a myeloablative, reduced-toxicity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in AML and MDS. *Blood* 2004; 104: 857-864.

51. Shaughnessy P, Alexander W, Tran H, Ririe D, Splichal J, Pollack M, Bachier C, LeMaistre C. Phase I and pharmacokinetic study of once-daily dosing of intravenously administered busulfan in the setting of a reduced-intensity preparative regimen and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as immunotherapy for renal cell carcinoma. *Mil Med.* 2006 Feb;171(2):161-5.

52. Nath CE, Earl JW, Pati N, Stephen K, Shaw PJ. Variability in the pharmacokinetics of intravenous busulphan given as a single daily dose to

paediatric blood or marrow transplant recipients. Br J Clin Pharmacol. 2008; 66(1):50-9.

53. Kim AH, Tse JC, Ikeda A, Moore TB. Evaluating pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous busulfan in pediatric patients receiving bone marrow transplantation. Pediatr Transplant. 2009 ;13(8):971-6.

54. Hassan M, Ehrsson H, Ljungman P. Aspects concerning busulfan pharmacokinetics and bioavailability. Leuk Lymphoma 1996; 22: 395.

55. Hassan M, Ehrsson H, Smedmyr B, Tötterman T, Wallin I, Oberg G, Simonsson B. Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of busulfan during high-dose therapy. Bone Marrow Transplant 1989; 4: 113-114.

56. Ficha Técnica Busilvex® [Internet]. [citado 22 de noviembre de 2015]. Recuperado a partir de: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000472/WC500052066.pdf.

57. Eberly AL, Anderson GD, Bubalo JS, McCune JS.. Optimal prevention of seizures induced by high-dose busulfan. Pharmacotherapy. 2008 ;28(12):1502-10.

58. Czerwinski M, Gibbs JP, Slattery JT. Busulfan conjugation by glutathione S-transferases alpha, mu, and pi. Drug Metab Dispos. 1996; 24(9):1015-9.

59. Gibbs JP, Czerwinski M, Slattery JT. Busulfan-glutathione conjugation catalyzed by human liver cytosolic glutathione S-transferases. Cancer Res. 1996 15;56(16):3678-81.

60. Vassal G, Deroussent A, Challine D, Hartmann O, Koscielny S, Valteau-Couanet D, Lemerle J, Gouyette A. Is 600mg/m² the appropriate dosage of

busulfan in children undergoing bone marrow transplantation?. *Blood* 1992; 79: 2475-2479.

61. Grochow LB. Busulfan disposition: the role of therapeutic monitoring in bone marrow transplantation induction regimens. *Seminars in Oncology* 1993; 20: S4: 18-25.

62. Bertholle-Bonnet V, Bleyzac N, Galambrun C, Mialou V, Bertrand Y, Souillet G, Aulagner G. Influence of underlying disease on busulfan disposition in pediatric bone marrow transplant recipients: a nonparametric population pharmacokinetic study. *Ther Drug Monit.* 2007;29(2):177-84.

63. Copelan EA, Bechtel TP, Avalos BR, Elder PJ, Ezzone SA, Scholl MD, Penza SL. Busulfan levels are influenced by prior treatment and are associated with hepatic veno-occlusive disease and early mortality but not with delayed complications following marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2001; 27: 1121-24.

64. Slattery JT. Intravenous versus oral busulfan-perhaps not as different as suggested. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9 (4): 282-4.

65. Andersson BS, Kashyap A, Couriel D, Madden T, de Lima M, Thall PF, Fernandez H, Vaughan WP, Jones R, Wingard JR, Blume KG, Champlin RE. Intravenous busulfan in pretransplant chemotherapy: bioavailability and patient benefit. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9 (11): 722-4.

66. Schuler US, Ehram M, Schneider A, Schmidt H, Deeg J, Ehninger G. Pharmacokinetics of intravenous busulfan and evaluation of the bioavailability of the oral formulation in conditioning for haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1998;22(3):241-4.

67. Andersson BS, Madden T, Tran HT, Hu WW, Blume KG, Chow DS, Champlin RE, Vaughan WP. Acute safety and pharmacokinetics of intravenous busulfan when used with oral busulfan and cyclophosphamide as pretransplantation conditioning therapy: a phase I study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2000;6(5A):548-54.
68. FDA. Center for Drug Evaluation and Research. Medical Review. Application Number 20-954. NDA 20-954 Busulfex (busulfan). Clinical pharmacology and biopharmaceutics NDA Reviews.
69. Abbasi N, Vadnais B, Knutson JA, Blough DK, Kelly EJ, O'Donnell PV, Deeg HJ, Pawlikowski MA, Ho RJ, McCune JS. Pharmacogenetics of intravenous and oral busulfan in hematopoietic cell transplant recipients. *J Clin Pharmacol.* 2011; 51(10):1429-38.
70. Bredschneider M, Klein K, Mürdter TE, Marx C, Eichelbaum M, Nüssler AK, Neuhaus P, Zanger UM, Schwab M. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase A1, the major glutathione S-transferase in human liver: consequences for enzyme expression and busulfan conjugation. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;71(6):479-87.
71. Kusama M, Kubota T, Matsukura Y, Matsuno K, Ogawa S, Kanda Y, Iga T. Influence of glutathione S-transferase A1 polymorphism on the pharmacokinetics of busulfan. *Clin Chim Acta.* 2006;368(1-2):93-8.
72. Srivastava A, Poonkuzhali B, Shaji RV, George B, Mathews V, Chandy M, Krishnamoorthy R. Glutathione S-transferase M1 polymorphism: a risk factor for hepatic venoocclusive disease in bone marrow transplantation. *Blood.* 2004 1;104(5):1574-7.

73. Johnson L, Orchard PJ, Baker KS, Brundage R, Cao Q, Wang X, Langer E, Farag-El Maasah S, Ross JA, Rimmel R, Jacobson PA. Glutathione S-transferase A1 genetic variants reduce busulfan clearance in children undergoing hematopoietic cell transplantation. *J Clin Pharmacol.* 2008 ;48(9):1052-62.

74. Elhasid R, Krivoy N, Rowe JM, Sprecher E, Adler L, Elkin H, Efrati E. Influence of glutathione S-transferase A1, P1, M1, T1 polymorphisms on oral busulfan pharmacokinetics in children with congenital hemoglobinopathies undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer.* 2010 1;55(6):1172-9.

75. Ansari M, Krajcinovic M. Can the pharmacogenetics of GST gene polymorphisms predict the dose of busulfan in pediatric hematopoietic stem cell transplantation?. *Pharmacogenomics.* 2009;10(11):1729-32.

76. Kim SD, Lee JH, Hur EH, Lee JH, Kim DY, Lim SN, Choi Y, Lim HS, Bae KS, Noh GJ, Yun SC, Han SB, Lee KH. Influence of GST gene polymorphisms on the clearance of intravenous busulfan in adult patients undergoing hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(8):1222-30.

77. ten Brink MH, Wessels JA, den Hartigh J, van der Straaten T, von dem Borne PA, Guchelaar HJ, Zwaveling J. Effect of genetic polymorphisms in genes encoding GST isoenzymes on BU pharmacokinetics in adult patients undergoing hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2012;47(2):190-5.

78. Krivoy N, Zuckerman T, Elkin H, Froymovich L, Rowe JM, Efrati E. Pharmacokinetic and pharmacogenetic analysis of oral busulfan in stem cell transplantation: prediction of poor drug metabolism to prevent drug toxicity. *Curr Drug Saf.* 2012 ;7(3):211-7.

79. Zwaveling J, Press RR, Bredius RG, van Derstraaten TR, den Hartigh J, Bartelink IH, Boelens JJ, Guchelaar HJ. Glutathione S-transferase

polymorphisms are not associated with population pharmacokinetic parameters of busulfan in pediatric patients. *Ther Drug Monit.* 2008; 30(4):504-10.

80. Aarons L. Population pharmacokinetics: theory and practice. *Br J Clin Pharmacol.* 1991;32(6):669-70.

81. García MJ, Santos MD, Fernández De Gatta MM, Otero MJ, Domínguez-Gil A. Population pharmacokinetics: An approach to the antimicrobial optimization. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2001 May;19(5):219-28.

82. Ette EI, Williams PJ. Population pharmacokinetics I: background, concepts, and models. *Ann Pharmacother.* 2004; 38(10):1702-6.

83. Joerger M. Covariate pharmacokinetic model building in oncology and its potential clinical relevance. *AAPS J.* 2012 Mar;14(1):119-32.

84. Hawwa AF, Collier PS, Millership JS, McCarthy A, Dempsey S, Cairns C, McElnay JC. Population pharmacokinetic and pharmacogenetic analysis of 6-mercaptopurine in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Clin Pharmacol.* 2008;66(6):826-37.

85. Beal S, Sheiner LB, Boeckmann A, Bauer RJ. *NONMEM user's guides* (1989-2009), v.7.3. Icon Development Solutions, Ellicott City MD, 2009.

86. Farré R. Aportación de la farmacocinética clínica al tratamiento del osteosarcoma con dosis altas de metotrexate. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona, 2007.

87. Jelliffe R, Schumitzky A, Van Guilder M. Population pharmacokinetics/pharmacodynamics modeling: parametric and nonparametric methods. *Ther Drug Monit.* 2000 ;22(3):354-65.

88. Tran HT, Madden T, Petropoulos D, Worth LL, Felix EA, Sprigg-Saenz HA et al. Individualizing high-dose oral busulfan: prospective dose adjustment in a pediatric population undergoing allogeneic stem cell transplantation for advanced hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplantation* 2000; 26: 463-70.

89. Schiltmeyer B, Klingebiel T, Schwab M, Mürdter TE, Ritter CA, Jenke A, Ehninger G, Gruhn B, Würthwein G, Boos J, Hempel G. Population pharmacokinetics of oral busulfan in children. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003;52(3):209-16.

90. Nguyen L, Fuller D, Lennon S, Leger F, Puozzo C. I.V. busulfan in pediatrics: a novel dosing to improve safety/efficacy for hematopoietic progenitor cell transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2004;33(10):979-87.

91. Bullock JM, Smith PF, Booker BM, Loughner J, Capozzi D, McCarthy PL Jr, Shaw LM. Development of a pharmacokinetic and Bayesian optimal sampling model for individualization of oral busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Ther Drug Monit.* 2006;28(1):62-6.

92. Booth BP, Rahman A, Dagher R, Griebel D, Lennon S, Fuller D, Sahajwalla C, Mehta M, Gobburu JV. Population pharmacokinetic-based dosing of intravenous busulfan in pediatric patients. *J Clin Pharmacol.* 2007;47(1):101-11.

93. Nakamura H, Sato T, Okada K, Miura G, Ariyoshi N, Nakazawa K, Kitada M. Population pharmacokinetics of oral busulfan in young Japanese children before hematopoietic stem cell transplantation. *Ther Drug Monit.* 2008;30(1):75-83.

94. 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.* 2011;17(21):6867-77.
95. Bartelink IH, van Kesteren C, Boelens JJ, Egberts TC, Bierings MB, Cuvelier GD, Wynn RF, Slatter MA, Chiesa R, Danhof M, Knibbe CA. Predictive performance of a busulfan pharmacokinetic model in children and young adults. *Ther Drug Monit.* 2012 ;34(5):574-83.
96. Paci A, Vassal G, Moshous D, Dalle JH, Bleyzac N, Neven B, Galambrun C, Kemmel V, Abdi ZD, Broutin S, Pétain A, Nguyen L. Pharmacokinetic behavior and appraisal of intravenous busulfan dosing in infants and older children: the results of a population pharmacokinetic study from a large pediatric cohort undergoing hematopoietic stem-cell transplantation. *Ther Drug Monit.* 2012;34(2):198-208.
97. Diestelhorst C, Boos J, McCune JS, Hempel G. Population pharmacokinetics of intravenous busulfan in children: revised body weight-dependent NONMEM® model to optimize dosing. *Eur J Clin Pharmacol.* 2014;70(7):839-47.
98. Long-Boyle JR, Savic R, Yan S, Bartelink I, Musick L, French D, Law J, Horn B, Cowan MJ, Dvorak CC. Population pharmacokinetics of busulfan in pediatric and young adult patients undergoing hematopoietic cell transplant: a model-based dosing algorithm for personalized therapy and implementation into routine clinical use. *Ther Drug Monit.* 2015; 37(2):236-45.
99. Sandström M, Karlsson MO, Ljungman P, Hassan Z, Jonsson EN, Nilsson C, Ringden O, Oberg G, Bekassy A, Hassan M. Population pharmacokinetic analysis resulting in a tool for dose individualization of busulphan in bone marrow transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2001 ;28(7):657-64.

100. Takama H, Tanaka H, Nakashima D, Ueda R, Takaue Y. Population pharmacokinetics of intravenous busulfan in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37(4):345-51.
101. Nguyen L, Leger F, Lennon S, Puozzo C. Intravenous busulfan in adults prior to haematopoietic stem cell transplantation: a population pharmacokinetic study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006 ;57(2):191-8.
102. 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): 1292-30.
103. Takamatsu Y, Sasaki N, Ogata K, Yukawa E, Jimi S, Hara S, Tamura K. Population pharmacokinetic study of a test dose oral busulfan in Japanese adult patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;65(6):1203-7.
104. Hadjibabaie M, Rahimian S, Jahangard-Rafsanjani Z, Amini M, Alimoghaddam K, Iravani M, Ghavamzadeh A, Sadrai S Population pharmacokinetics of oral high-dose busulfan in adult patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Daru.* 2011;19(3):216-23.
105. Choe S, Kim G, Lim HS, Cho SH, Ghim JL, Jung JA, Kim UJ, Noh G, Bae KS, Lee D. A simple dosing scheme for intravenous busulfan based on retrospective population pharmacokinetic analysis in Korean patients. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2012;16(4):273-80.
106. McCune JS, Bemer MJ, Barrett JS, Scott Baker K, Gamis AS, Holford NH.

Busulfan in infant to adult hematopoietic cell transplant recipients: a population pharmacokinetic model for initial and Bayesian dose personalization. Clin Cancer Res. 2014 1;20(3):754-63.

107. Buggia I, Zecca M, Alessandrino EP, Locatelli F, Rosti G, Bosi A, Pession A, Rotoli B, Majolino I, Dallorso A, Regazzi MB.. Itraconazole can increase systemic exposure to busulfan in patients given bone marrow transplantation. GITMO (Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo). Anticancer Res. 1996;16(4A):2083-8.

108. Hassan M, Ljungman P, Ringdén O, Hassan Z, Oberg G, Nilsson C, Békassy A, Bielenstein M, Abdel-Rehim M, Georén S, Astner L. The effect of busulphan on the pharmacokinetics of cyclophosphamide and its 4-hydroxy metabolite: time interval influence on therapeutic efficacy and therapy-related toxicity. Bone Marrow Transplant. 2000;25(9):915-24.

109. Hassan M, Oberg G, Björkholm M, Wallin I, Lindgren M. Influence of prophylactic anticonvulsant therapy on high-dose busulphan kinetics. Cancer Chemother Pharmacol. 1993;33(3):181-6.

110. Carreras E, Cahn JY, Puozzo C, Kröger N, Sanz G, Buzyn A, Bacigalupo A, Vernant JP. Influence on Busilvex pharmacokinetics of clonazepam compared to previous phenytoin historical data. Anticancer Res.2010;30(7):2977-84.

111. Hassan M, Svensson JO, Nilsson C, Hentschke P, Al-Shurbaji A, Aschan J, Ljungman P, Ringdén O. Ketobemidone may alter busulfan pharmacokinetics during high-dose therapy. Ther Drug Monit. 2000 ;22(4):383-5.

112. Key NS, Kelly PM, Emerson PM, Chapman RW, Allan NC, McGee JO.

Oesophageal varices associated with busulphan-thioguanine combination therapy for chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 1987; 2(8567):1050-2.

113. McDonald GB, Sharma P, Matthews DE, Shculman HM, Thomas ED. Venocclusive disease of the liver after bone marrow transplantation: diagnosis, incidence, and predisposing factors. *Hepatology* 1984; 4: 116-22.

114. Jones RJ, Lee KS, Beschorner WE, Vogel VG, Grochow LB, Braine HG, Vogelsang GB, Sensenbrenner LL, Santos GW, Saral R. Venocclusive disease of the liver following bone marrow transplantation. *Transplantation* 1987; 44: 778-83.

115. McDonald GB, Hinds MS, Fisher LB, Schoch HG, Wolford JL, Banaji M et al. Veno-occlusive disease of the liver and multiorgan failure after bone marrow transplantation: a cohort study of 355 patients. *Annals of Internal Medicine* 1993; 118:255-67.

116. Horn B, Reiss U, Matthay K, McMillan A, Cowan M. Veno-occlusive disease of the liver in children with solid tumors undergoing autologous hematopoietic progenitor cell transplantation: a high incidence in patients with neuroblastoma. *Bone Marrow Transplant*. 2002;29(5):409-15.

117. Lee JL, Gooley T, Bensinger W, Schiffman K, McDonald GB. Veno-occlusive disease of the liver after busulfan, melphalan, and thiotepa conditioning therapy: incidence, risk factors, and outcome. *Biol Blood Marrow Transplantation* 1999; 5: 306-15.

118. Shaw PJ, Hugh-Jones K, Hobbs JR, Downie CJC, Barnes R. Busulfan and cyclophosphamide cause little early toxicity during displacement bone marrow transplantation in fifty children. *Bone Marrow Transplant* 1986 1: 193-200.

119. Ozkaynak MF, Weinberg K, Kohn D, Sender L, Parkman R, Lenarsky C. Hepatic veno-occlusive disease post bone marrow transplantation in children conditioned with busulfan and cyclophosphamide: incidence, risk factors and clinical outcome. *Bone Marrow Transplant* 1991; 7: 467-474.

120. Atkinson K, Biggs J, Noble G, ashby M, Concannon A, Dodds A. Preparative regimens for marrow transplantation containing busulfan are associated with hemorrhagic cystitis and hepatic veno-occlusive disease but a short duration of leucopenia and little oro-pharyngeal mucositis. *Bone Marrow Transplant* 1987; 2: 385-394.

121. Brodsky R, Topolsky D, Crilley P, Bulova S, Brodsky I. Frequency of veno-occlusive disease of the liver in bone marrow transplantation with modified busulfan/cyclophosphamide preparative regimen. *Am J Clin Oncol* 1990; 13: 221-225.

122. Cacchione A, LeMaitre A, Couanet DV, Benhamou E, Amoroso L, Simonnard N, Hartmann O.. Risk factors for hepatic veno-occlusive disease: a retrospective unicentric study in 116 children autografted after a high-dose BU-thiotepa regimen. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42(7):449-54.

123. Méresse V, Hartmann O, Vassal G, Benhamou E, Valteau-Couanet D, Brugieres L, Lemerle J. Risk factors for hepatic veno-occlusive disease after high-dose busulfan-containing regimens followed by autologous bone marrow transplantation: a study in 136 children. *Bone Marrow Transplant*. 1992;10(2):135-41.

124. Andersson BS i cols. Conditioning therapy with IV busulfan and cyclophosphamide for hematologic malignancies prior to allogenic stem cell transplantation: a phase II study. *Biol Blood Marrow Transplat* 2002; 8: 145-154.

125. Kashyap A, Wingard J, Cagnoni P, Roy J, Tarantolo S, Hu W, Blume K, Niland J, Palmer JM, Vaughan W, Fernandez H, Champlin R, Forman S, Andersson BS.. Intravenous vs oral busulfan as part of a busulfan/cyclophosphamide preparative regimen for allogenic hematopoietic stem cell transplantation: decreased incidence of hepatic veno-occlusive disease (HVOD), HVOD related mortality and overall 100 day mortality. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8: 493-500.

126. Thall PF i cols. Comparison of 100-day mortality rates associated with iv busulfan and cyclophosphamide vs other preparative regimen in allogenic bone marrow transplantation for CML: Bayesian sensitivity analyses of confounded treatment and center effects. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 1191-9.

127. Lee JH, Choi SJ, Lee JH, Kim SE, Park CJ, Chi HS, Lee MS, Lee JS, Kim WK, Lee KH. Decreased incidence of hepatic veno-occlusive disease and fewer hemostatic derangements associated with intravenous busulfan vs oral busulfan in adults conditioned with busulfa-cyclophosphamide for allogenic bone marrow transplantation. *Ann Hematol* 2005; 84: 321-30.

128. Aggarwal C, Gupta S, Vaughan WP, Saylor GB, Salzman DE, Katz RO, Nance AG, Tilden AB, Carabasi MH. Improved outcomes in intermediate- and high-risk aggressive non-Hodgkin lymphoma after autologous hematopoietic stem cell transplantation substituting intravenous for oral busulfan in a busulfan, cyclophosphamide, and etoposide preparative regimen. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12(7):770-7.

129. Vassal G, Deroussent A, Hartmann O, Challine D, Benhamou E, Valteau-Couanet D, Brugières L, Kalifa C, Gouyette A, Lemerle J. Dose-dependent neurotoxicity of high-dose busulfan in children : a clinical and pharmacological study. *Cancer Res* 1990; 50: 6203-6207.

130. Murphy CP, Harden EA, Thompson JM. Generalized seizures secondary to high-dose busulfan therapy. *Ann Pharmacother* 1992; 26: 30-31.

131. Morgan M, Doods A, Atkinson K, Szer J, Downs K, Biggs J. The toxicity of busulphan and cyclophosphamide as the preparative regimen for bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1991; 77: 529-534.

132. Bilgrami SFA, Metersky ML, McNally D et al. Idiopathic pneumonia syndrome following myeloablative chemotherapy and autologous transplantation. *Ann Pharmacother* 2001; 35: 196-201.

133. Kondo M, Kojima S, Kato K, Matsuyama T.. Late-onset hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation in children. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 995-998.

134. Urban C, Schwingshandl J, Slavc I, Gamillscheg A, Hauer C, Schmid G et al. Endocrine function after bone marrow transplantation without the use of preparative total body irradiation. *Bone Marrow Transplant* 1988; 3: 291-6.

135. Shankar SM, Bunin NJ, & Moshang T. Growth in children undergoing bone marrow transplantation after busulfan and cyclophosphamide conditioning. *J Pediatr Hematol Oncology* 1996; 18:362-366.

136. Giorgiani G, Bozzola M, Locatelli F, et al. Role of busulfan and total body irradiation on growth or prepubertal children receiving bone marrow

transplantation and results of treatment with recombinant human growth hormone. *Blood* 1995; 86:825-831.

137. Wingard JR, Plotnick LP, Freemer CS, Zahurak M, Piantadosi S, Miller DF et al. Growth in children after bone marrow transplantation: busulfan plus cyclophosphamide plus total body irradiation. *Blood* 1992; 79: 1068-73.

138. Afify Z, Shaw PJ, Clavano-Harding A, Cowell CT et al. Growth and endocrine function in children with acute myeloid leukemia after bone marrow transplantation using busulfan/cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 1087-1092.

139. Teinturier C, Hartmann O, Valteau-Couanet D, Benhamou E, Bougneres PF. Ovarian function after autologous bone marrow transplantation in childhood: high-dose busulfan is a major cause of ovarian failure. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 989-994.

140. Socie G, Clift RA, Blaise D, Devergie A, Ringden O, Martin PJ, Remberger M, Deeg HJ, Ruutu T, Michallet M, Sullivan KM, Chevret S.. Busulfan plus cyclophosphamide compared with total-body irradiation plus cyclophosphamide before marrow transplantation for myeloid leukaemia: long-term follow-up of 4 randomized studies. *Blood* 2001; 98: 3569-3574.

141. Terpstra W. Pericardial fibrosis following busulfan treatment. *Netherlands J Med* 1989; 35: 249-252.

142. Weinberger A, Pinkhas J, Sandbank U, Shaklai M, de Vries A. Endocardial fibrosis following busulfan treatment. *JAMA* 1975; 231: 495.

143. Glantz JC. Reproductive toxicology of alkylating agents. *Obstet Gynecol Surv* 1994; 49: 709-715.

144. Bishop JB, Wassom JS. Toxicological review of busulfan. *Mutat Res* 1986; 168: 15-45.
145. Vassal G, Hartmann O, Benhamou E. Busulfan and veno-occlusive disease of the liver in children. *Ann Intern Med* 1990; 12: 881.
146. Slattery J.T., Sanders J.E., Buckner C.D., Schafer R.L., Lambert K.W., Langer F.P., Anasetti C., Bensinger W.I., Fisher L.D., Appelbaum F.R., Hansen J.A.. Graft-rejection and toxicity following bone marrow transplantation in relation to busulfan pharmacokinetics. *Bone Marrow Transplantation* 1995; 16: 31-42.
147. Bearman SI, Appelbaum FR, Buckner CD, Petersen FB, Fischer LD, Clift RA, et al. Regimen-related toxicity in patients undergoing bone marrow transplantation. *Journal of Clinical Oncology* 1988, 6: 1562-68.
148. Dix SP, Wingard JR, Mullins RE, Jerkunica I, Davidson TG, Gilmore CE, York RC, Lin LS, Devine SM, Geller RB, Heffner LT, Hillyer CD, Holland HK, Winton EF, Saral R.. Association of busulfan area under the curve with veno-occlusive disease following BMT. *Bone Marrow Transplantation* 1996; 17: 225-30.
149. Ljungman P, Hassan M, Békássy AN, Ringdén O, Öberg G. High busulfan concentrations are associated with increased transplant-related mortality in allogeneic bone marrow transplant patients. *Bone Marrow Transplantation* 1997; 20: 909-13.
150. Chan MY, Pinell W, Lanza C, Gerritsen B, Webbs D, Veys P. Correlation of busulphan levels and clinical outcome in bone marrow transplant in children. *Bone Marrow Transplantation* 1997; 20: S4: O15.

151. Bouligand J, Boland I, Valteau-Couanet D, Deroussent A, Kalifa C, Hartmann O, Vassal G. In children and adolescents, the pharmacodynamics of high-dose busulfan is dependent on the second alkylating agent used in the combined regimen (melphalan or thiotepa). *Bone Marrow Transplant.* 2003;32(10):979-86.

152. Williams CB, Day SD, Reed MD, Copelan EA, Bechtel T, Leather HL, Wingard JR, Abbott BL, Abhyankar S, McGuirk JP. Dose modification protocol using intravenous busulfan (Busulfex) and cyclophosphamide followed by autologous or allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in patients with hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2004 Sep;10(9):614-23.

153. Zwaveling J, Bredius RG, Cremers SC, Ball LM, Lankester AC, Teepe-Twiss IM, Egeler RM, den Hartigh J, Vossen JM. Intravenous busulfan in children prior to stem cell transplantation: study of pharmacokinetics in association with early clinical outcome and toxicity. *Bone Marrow Transplant.* 2005 Jan;35(1):17-23.

154. Schechter T, Finkelstein Y, Doyle J, Verjee Z, Moretti M, Koren G, Dupuis LL. Pharmacokinetic disposition and clinical outcomes in infants and children receiving intravenous busulfan for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007 ;13(3):307-14

155. Perkins JB, Kim J, Anasetti C, Fernandez HF, Perez LE, Ayala E, Kharfan-Dabaja MA, Tomblyn MR, Sullivan DM, Pidala JA, Field TL. Maximally tolerated busulfan systemic exposure in combination with fludarabine as conditioning before allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(7):1099-107.

156. Mamlouk K, Saracino G, Berryman RB, Fay JW, Pineiro LA, Vance EA, White M, Sandler I, Agura ED. Modification of the Bu/Cy myeloablative regimen

using daily parenteral busulfan: reduced toxicity without the need for pharmacokinetic monitoring. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35(8):747-54.

157. Zhang H, Graiser M, Hutcherson DA, Dada MO, McMillan S, Ali Z, Flowers CR, Waller EK. Pharmacokinetic-directed high-dose busulfan combined with cyclophosphamide and etoposide results in predictable drug levels and durable long-term survival in lymphoma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(8):1287-94.

158. Baker KS, Bostrom B, DeFor T, Ramsay NK, Woods WG, Blazar BR. Busulfan pharmacokinetics do not predict relapse in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2000;26(6):607-14.

159. Ljungman P, Hassan M, Bekassy AN, Ringdén O, Oberg G. Busulfan concentration in relation to permanent alopecia in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 869-871.

160. Hobbs J, Hugo-Jones K, Shaw P, Downie CJ, Williamson S. Engraftment rates related to busulphan and cyclophosphamide dosages for displacement bone marrow transplants in fifty children. *Bone Marrow Transplant* 1986; 1: 201-208.

161. Pawlowska AB, Blazar BR, Angelucci E, Baronciani D, Shu XO, Bostrom B. Relationship of plasma pharmacokinetics of high-dose oral busulfan to the outcome of allogeneic bone marrow transplantation in children with thalassemia. *Bone Marrow Transplantation* 1997; 20: 915-20.

162. Bolinger AM, Zangwill AB, Slattery JT, Glidden D, DeSantes K, Heyn L, Risler LJ, Bostrom B, Cowan MJ. An evaluation of engraftment, toxicity and busulfan concentration in children receiving bone marrow transplantation for leukemia or genetic disease. *Bone Marrow Transplantation* 2000; 25: 925-30.

163. Jacobson P, Park JJ, DeFor TE, Thrall M, Abel S, Krivit W, Peters C. Oral busulfan pharmacokinetics and engraftment in children with Hurler syndrome and other inherited metabolic storage diseases undergoing hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2001; 27(8):855-61.
164. McCune JS, Gooley T, Gibbs JP, Sanders JE, Petersdorf EW, Appelbaum FR, Anasetti C, Rislér L, Sultan D, Slattery JT. Busulfan concentration and graft rejection in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002 ;30(3):167-73.
165. Chandy M, Balasubramanian P, Ramachandran SV, Mathews V, George B, Dennison D, Krishnamoorthy R, Srivastava A. Randomized trial of two different conditioning regimens for bone marrow transplantation in thalassemia--the role of busulfan pharmacokinetics in determining outcome. *Bone Marrow Transplant.* 2005 Nov;36(10):839-45.
166. Slattery J.T., Clift R.A., Buckner C.D. et al. Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: the influence of plasma busulfan levels on the outcome of transplantation. *Blood* 1997; 89: 3055-60.
167. Nieto Y, Vaughan WP. Pharmacokinetics of high-dose chemotherapy. *Bone Marrow Transplant.* 2004 ;33(3):259-69.
168. Tabak A, Hoffer E, Rowe JM, Krivoy N. Monitoring of busulfan area under the curve: estimation by a single measurement. *Ther Drug Monit.* 2001 Oct;23(5):526-8.
169. Bleyzac N, Souillet G, Magron P, Janoly A, Martin P, Bertrand Y, Galambrun C, Dai Q, Maire P, Jelliffe RW, Aulagner G Improved clinical outcome of paediatric bone marrow recipients using a test dose and Bayesian

pharmacokinetic individualization of busulfan dosage regimens. *Bone Marrow Transplant*. 2001 Oct;28(8):743-51.

170. Balasubramanian P, Chandy M, Krishnamoorthy R, Srivastava A. Evaluation of existing limited sampling models for busulfan kinetics in children with beta thalassaemia major undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001 Nov;28(9):821-5.

171. Krivoy N, Hoffer E, Tabak A, Elhasid R, Arush MW, Stein J, Yaniv I, Rowe JM. Therapeutic monitoring of busulfan in pediatric bone marrow transplantation. *Pediatr Hematol Oncol*. 2002;19(1):31-7.

172. Vaughan WP, Carey D, Perry S, Westfall AO, Salzman DE. A limited sampling strategy for pharmacokinetic directed therapy with intravenous busulfan. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(11):619-24.

173. Lindley C, Shea T, McCune J, Shord S, Decker J, Harvey D, Petros WP, Garbriel D, Serody J, Kirby S, Wiley J. Intraindividual variability in busulfan pharmacokinetics in patients undergoing a bone marrow transplant: assessment of a test dose and first dose strategy. *Anticancer Drugs*. 2004;15(5):453-9.

174. Hoffer E, Akria L, Tabak A, Scherb I, Rowe JM, Krivoy N. A simple approximation for busulfan dose adjustment in adult patients undergoing bone marrow transplantation. *Ther Drug Monit*. 2004 Jun;26(3):331-5.

175. Matthews RH, Emami M, Connaghan DG, Holland HK, Morris LE. Home administration of high-dose oral busulfan in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2007 Apr;39(7):397-400
2007.

176. Slattery JT, Risler LJ. Therapeutic Monitoring of busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Therapeutic Drug Monitoring* 1998; 20: 543-549.
177. McCune J, Gibbs JP, Slattery JT. Plasma concentration monitoring of busulfan. Does it improve clinical outcome?. *Clinical Pharmacokinetic* 2000; 39: 155-165.
178. Vozech S, Steiner C. Estimates of the population pharmacokinetic parameters and performance of Bayesian feedback: a sensitivity analysis. *J Pharmacokinetic Biopharm.* 1987 Oct;15(5):511-28.
179. Jelliffe RW, Schumitzky A, Van Guilder M, Liu M, Hu L, Maire P, Gomis P, Barbaut X, Tahani B. Individualizing drug dosage regimens: roles of population pharmacokinetic and dynamic models, Bayesian fitting, and adaptive control. *Ther Drug Monit.* 1993 ;15(5):380-93.
180. Carreras E, Rosiñol L, Terol MJ, Alegre A, de Arriba F, García-Laraña J, Bello JL, García R, León A, Martínez R, Peñarrubia MJ, Poderós C, Ribas P, Ribera JM, San Miguel J, Bladé J, Lahuerta JJ; Veno-occlusive disease of the liver after high-dose cytoreductive therapy with busulfan and melphalan for autologous blood stem cell transplantation in multiple myeloma patients. Spanish Myeloma Group/PETHEMA. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13(12):1448-54.
181. Bornhäuser M, Storer B, Slattery JT et al. Conditioning with fludarabine and targeted busulfan for transplantation of allogenic hematopoietic stem cells. *Blood* 2003; 102: 820-826.
182. Przepiorka D, Weisdorf D, Martín P et al. 1994 Consensus Conference on Acute GCHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 825-828.

183. Sullivan KM, Agura E, Anasetti C, Appelbaum F, Badger C, Bearman S, Erickson K, Flowers M, Hansen J, Loughran T . Chronic graft-versus-host disease and other late complications of bone marrow transplantation. *Semin Hematol* 1991; 28: 250-259.

184. Queraltó JM, Carrascosa C, Turà M, Clopés A, Manges MA. Monitorización del tratamiento con busulfán. *Química Clínica* 2000; 19 (2): 106.

185. Henner DW, Furlong AF, Flaherty MD, Shea TC. Measurement of busulfan in plasma in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. of Chromatography* 1987; 416: 426-32.

186. Bearman SI, Appelbaum FR, Buckner CD, Petersen FB, Fischer LD, Clift RA, et al. Regimen-related toxicity in patients undergoing bone marrow transplantation. *Journal of Clinical Oncology* 1988, 6: 1562-68.

187. Gore ME, Selby PJ, Viner C, Clark PI, Meldrum M, Millar B, Bell J et al. Intensive treatment of multiple myeloma and criteria for complete remission. *Lancet* 1989; 2: 879-81.

188. Blade J, Samson D, Reece D, Apperley J, Björkstrand B, Gahrton G, Gertz M, Giralt S, Jagannath S, Vesole D. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haematopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant. *Br J Haematol* 1998; 102: 1115-1123.

189. Valcarcel D, Martino R, Caballero D, Mateos MV, Pérez-Simón JA, Canals C, Fernández F, Bargay J, Muñoz-Díaz E, Gonzalez M, San Miguel JF, Sierra J. Chimerism análisis following allogenic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 387-392.

190. Jonsson EN, Karlsson MO. Xpose-an S-PLUS based population pharmacokinetic/pharmacodynamic model building aid for NONMEM. *Comput Methods Programs Biomed* 1999; 58: 51-64.

191. Lindbom L, Ribbing J, Jonsson EN. Perl-speaks-NONMEM (PsN)- a Perl module for NONMEM related programming. *Comput Methods Programs Biomed* 2004; 75: 85-94.

192. Savic RM, Karlsson MO. Importance of shrinkage in empirical bayes estimates for diagnostics: problems and solutions. *AAPS J.* 2009; 11:558. 569.

193. Bergstrand M, Hooker AC, Wallin JE, Karlsson MO. Prediction-corrected visual predictive checks for diagnosing nonlinear mixed-effects models. *AAPS J* 2011; 13: 143-151.

194. Sheiner LB, Beal SL. Some suggestions for measuring predictive performance. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1981;9(4):503-12.

195. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 2003;78:21-33.

