

Université de Montréal

**Optimisation de l'administration des médicaments chez
les enfants transplantés grâce à la pharmacocinétique de
population**

par

Nastya Kassir

Sciences Pharmaceutiques, Université de Montréal

Faculté de pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en Sciences Pharmaceutiques
option Pharmacologie

Mars, 2012

© Nastya Kassir, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Optimisation de l'administration des médicaments chez les enfants transplantés grâce à la
pharmacocinétique de population

Présentée par :

Nastya Kassir

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jacques Turgeon, président-rapporteur

Line Labbé, directeur de recherche

Murray Ducharme, membre du jury

Chantale Simard, examinateur externe

Daniel Lamontagne, représentant du doyen de la FES

Résumé

Ce travail de thèse porte sur l'application de la pharmacocinétique de population dans le but d'optimiser l'utilisation de certains médicaments chez les enfants immunosupprimés et subissant une greffe. Parmi les différents médicaments utilisés chez les enfants immunosupprimés, l'utilisation du busulfan, du tacrolimus et du voriconazole reste problématique, notamment à cause d'une très grande variabilité interindividuelle de leur pharmacocinétique rendant nécessaire l'individualisation des doses par le suivi thérapeutique pharmacologique. De plus, ces médicaments n'ont pas fait l'objet d'études chez les enfants et les doses sont adaptées à partir des adultes. Cette dernière pratique ne prend pas en compte les particularités pharmacologiques qui caractérisent l'enfant tout au long de son développement et rend illusoire l'extrapolation aux enfants des données acquises chez les adultes.

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse ont étudié successivement la pharmacocinétique du busulfan, du voriconazole et du tacrolimus par une approche de population en une étape (modèles non-linéaires à effets mixtes). Ces modèles ont permis d'identifier les principales sources de variabilités interindividuelles sur les paramètres pharmacocinétiques. Les covariables identifiées sont la surface corporelle et le poids. Ces résultats confirment l'importance de tenir en compte l'effet de la croissance en pédiatrie. Ces paramètres ont été inclus de façon allométrique dans les modèles. Cette approche permet de séparer l'effet de la mesure anthropométrique d'autres covariables et permet la comparaison des paramètres pharmacocinétiques en pédiatrie avec ceux des adultes. La prise en compte de ces covariables explicatives devrait permettre d'améliorer la prise en charge *a priori* des patients.

Ces modèles développés ont été évalués pour confirmer leur stabilité, leur performance de simulation et leur capacité à répondre aux objectifs initiaux de la modélisation.

Dans le cas du busulfan, le modèle validé a été utilisé pour proposer par simulation une posologie qui améliorerait l'atteinte de l'exposition cible, diminuerait l'échec thérapeutique et les risques de toxicité.

Le modèle développé pour le voriconazole, a permis de confirmer la grande variabilité interindividuelle dans sa pharmacocinétique chez les enfants immunosupprimés. Le nombre limité de patients n'a pas permis d'identifier des covariables expliquant cette variabilité.

Sur la base du modèle de pharmacocinétique de population du tacrolimus, un estimateur Bayésien a été mis au point, qui est le premier dans cette population de transplantés hépatiques pédiatriques. Cet estimateur permet de prédire les paramètres pharmacocinétiques et l'exposition individuelle au tacrolimus sur la base d'un nombre limité de prélèvements.

En conclusion, les travaux de cette thèse ont permis d'appliquer la pharmacocinétique de population en pédiatrie pour explorer les caractéristiques propres à cette population, de décrire la variabilité pharmacocinétique des médicaments utilisés chez les enfants immunosupprimés, en vue de l'individualisation du traitement. Les outils pharmacocinétiques développés s'inscrivent dans une démarche visant à diminuer le taux d'échec thérapeutique et l'incidence des effets indésirables ou toxiques chez les enfants immunosupprimés suite à une transplantation.

Mots-clés : Pharmacocinétique de population, NONMEM, pédiatrie, transplantation, busulfan, tacrolimus, voriconazole, estimateur Bayésien.

Abstract

This thesis deals with the application of population pharmacokinetics in order to optimize the use of certain medications in immunocompromised children undergoing transplantation. Among the various drugs used in immunocompromised children, the use of busulfan, tacrolimus and voriconazole remains problematic, particularly because of high interindividual variability in their pharmacokinetics necessitating individualized doses based on therapeutic drug monitoring. In addition, these drugs have not been studied in children and the doses are adapted from adults. This practice does not take into account the pharmacological characteristics of pediatrics throughout their development and makes illusory the extrapolation of data acquired in adults to children.

The work done in this thesis studied sequentially the pharmacokinetics of busulfan, voriconazole and tacrolimus by a population approach (non-linear mixed effects models). The developed models have identified the main sources of interindividual variability in the pharmacokinetic parameters of these drugs. The identified covariates are body surface area and weight. These results confirm the importance of taking into account the effect of growth in children. These parameters were allometrically included in the models. This approach allows separating the effect of size from other covariates and enables the comparison of pediatric pharmacokinetic parameters with those of adults. The inclusion of these explanatory covariates should improve the management *a priori* of patients.

The developed models were evaluated to confirm their stability, performance, and their ability to answer the original objectives of modeling.

In the case of busulfan, the validated model was used to simulate dosing regimens that improve reaching the target exposure, reduce treatment failure and toxicity episodes.

The developed population pharmacokinetic model for voriconazole confirmed the large variability in its pharmacokinetics in immunocompromised children. The limited data did not allow identification of covariates explaining this variability.

Based on the population pharmacokinetic model of tacrolimus, a Bayesian estimator was developed, which is the first in this population of pediatric liver transplant recipients. This estimator can predict pharmacokinetic parameters and individual exposure to tacrolimus based on a limited number of samples.

In conclusion, this thesis allowed applying the population pharmacokinetics approach in pediatrics to explore the characteristics of this population and describe the pharmacokinetic variability of drugs used in immunocompromised children, for the individualization of treatment. Pharmacokinetic tools developed are part of efforts to decrease the rate of treatment failure and the incidence of adverse and toxic events in immunocompromised and transplanted pediatrics.

Keywords : Population pharmacokinetics, NONMEM, pediatric, transplantation, busulfan, tacrolimus, voriconazole, Bayesian estimator.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Liste des abréviations	xiii
Dédicace	xv
Remerciements	xvi
CHAPITRE I	1
ÉTAT DE L'ART	2
1 Généralités sur la pharmacocinétique en pédiatrie	4
1.1 Généralités	4
1.2 Pharmacocinétique en pédiatrie	9
1.2.1 Absorption	9
1.2.2 Distribution	13
1.2.3 Élimination	18
2 Généralités sur la modélisation pharmacocinétique	27
2.1 Méthode d'analyse classique en pharmacocinétique	30
2.2 La pharmacocinétique de population	31
2.2.1 Approche de regroupement des données "Naïve pooled data"	32
2.2.2 Approche en deux étapes "Iterative two-stage"	33
2.2.3 Modèles non-linéaires à effets mixtes "Non-linear mixed-effect models"	34
2.3 Estimateur Bayésien	41
2.4 La pharmacocinétique de population chez les enfants	41
3 Généralités sur la pharmacogénétique	43
3.1 Pharmacogénétique du CYP3A	44
3.2 Pharmacogénétique du CYP2C	45

3.3	Pharmacogénétique des glutathion-S-transférases	46
4	Généralités sur le busulfan.....	47
4.1	Pharmacocinétique du busulfan.....	47
4.1.1	Absorption	47
4.1.2	Distribution	48
4.1.3	Élimination.....	48
4.2	Interactions médicamenteuses	49
4.3	Pharmacocinétique de population du busulfan	51
5	Généralités sur le voriconazole	53
5.1	Pharmacocinétique du voriconazole	53
5.1.1	Absorption	54
5.1.2	Distribution	54
5.1.3	Élimination.....	54
5.2	Interactions médicamenteuses	55
5.3	Pharmacocinétique de population du voriconazole	57
6	Généralités sur le tacrolimus.....	59
6.1	Pharmacocinétique du tacrolimus	59
6.1.1	Absorption	60
6.1.2	Distribution	60
6.1.3	Élimination.....	61
6.2	Interactions médicamenteuses	62
6.3	Pharmacocinétique de population du tacrolimus	63
7	Objectifs de la thèse	65
	CHAPITRE II	67
	Population pharmacokinetic of intravenous busulfan in children before hematopoietic stem cell transplantation	68
	Abstract	69
1	Introduction	70
2	Methods	71

3	Results	75
4	Discussion	77
5	Acknowledgements	80
6	Conflict of Interest/Disclosure	81
7	References.....	82
8	Figure Legends	87
9	Tables.....	88
10	Figures	92
	CHAPITRE III.....	96
	Population pharmacokinetic of intravenous and oral voriconazole in children	97
	Abstract	98
1	Introduction	99
2	Methods	101
3	Results.....	103
4	Discussion	105
5	References.....	108
6	Figure Legends	110
7	Tables.....	111
8	Figures	114
	CHAPITRE IV.....	116
	Population pharmacokinetics and bayesian estimation of tacrolimus exposure in pediatric liver transplant recipients	117
	Abstract	118
1	Introduction	119
2	Methods	121
3	Results.....	125
4	Discussion	128
5	Acknowledgements	133
6	References.....	134

7	Figure Captions	138
8	Tables	139
9	Figures	145
	CHAPITRE V	148
	DISCUSSION ET CONCLUSION	149
	Bibliographie	159
	Annexe I	176
1	Tables de discrimination du modèle de pharmacocinétique de population de base du tacrolimus – 1 compartiment	177
2	Tables de discrimination du modèle de pharmacocinétique de population de base du tacrolimus – 2 compartiments	178
3	Relation entre les <i>Posthoc</i> du tacrolimus et les covariables continues	180
4	Relation entre les <i>Posthoc</i> du tacrolimus et les covariables catégoriques	183
	Annexe II	196
	Limited sampling strategies for monitoring tacrolimus in paediatric liver transplant recipients	197
	Abstract	199
1	Introduction	200
2	Methods	202
3	Results	206
4	Discussion	208
5	Conclusion	211
6	Acknowledgements	212
7	Conflict of Interest/Disclosure	213
8	References	214
9	Figure Legends	219
10	Tables	220
11	Figures	226
	Annexe III	231

Permission du journal NEJM	231
Annexe IV	233
Accord des coauteurs	233

Liste des tableaux

Tableau 1-1 Différences physiologiques entre les enfants et les adultes influençant la pharmacocinétique	6
Tableau 1-2 Ontogenèse des principaux facteurs impliqués dans l'absorption gastro-intestinale des médicaments	10
Tableau 1-3 Activité enzymatique <i>in vitro</i> des cytochromes P450 au niveau de microsomes hépatiques chez le fœtus et l'enfant de différents âges, exprimés sous forme de fraction de l'activité adulte (nmol/min/mg microsomal protein)	21
Tableau 1-4 Profil de maturation des enzymes de phase II	23
Tableau 4-1 Résumé des paramètres PK du busulfan chez les enfants greffés du foie	51
Tableau 5-1 Résumé des paramètres PK du voriconazole chez les enfants	57
Tableau 6-1 Résumé des paramètres PK du tacrolimus chez les enfants greffés du foie	63

Liste des figures

Figure 1-1 Changements physiologiques influençant le devenir des médicaments chez les enfants.....	15
Figure 2-1 Profil moyen des concentrations en fonction du temps.....	33
Figure 2-2 Profils individuels et moyen des concentrations en fonction du temps	34

Liste des abréviations

ASC	Aire sous la courbe des concentrations en fonction du temps
ASC_{0-t}	Aire sous la courbe calculée entre $t=0$ et le dernier temps de prélèvement
$ASC_{0-\infty}$	Aire sous la courbe calculée entre $t=0$ et l'infini
$ASC_{t-\infty}$	Aire sous la courbe entre le dernier temps de prélèvement et l'infini
BSA	Surface corporelle
CL	Clairance systémique
CL_{biliaire}	Clairance biliaire
$CL_{\text{hépatique}}$	Clairance hépatique
$CL_{\text{int, libre}}$	Clairance intrinsèque de la fraction libre
C_{max}	Concentration maximale
$CL_{\text{rénale}}$	Clairance rénale
C_{ss}	Concentration moyenne à l'état d'équilibre
CYP450	Cytochrome P450
D	Dose
E_H	Coefficient d'extraction hépatique
E_{max}	Effet maximum
F	Biodisponibilité
FDA	Food and Drug Administration
f_{libre}	Fraction libre du principe actif
GST	Glutathion-S-transférases

ICH	Conférence internationale sur l'harmonisation
k_e	Constante de vitesse d'élimination
OFV	Valeur de la fonction objective
P-gp	P-glycoprotéine
pH	Potentiel hydrogène
PK	Pharmacocinétique
PKPOP	Pharmacocinétique de population
Q_H	Débit hépatique
R_0	Vitesse de perfusion
STP	Suivi thérapeutique pharmacologique
τ	Intervalle d'administration
t_{max}	Temps pour atteindre la concentration maximale
V	Volume de distribution
WT	Poids corporel

Dédicace

*À mes parents, pour leur amour
inconditionnel, confiance et sacrifices.*

Remerciements

Je tiens à remercier les personnes, qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail de thèse durant les années qui viennent de s'écouler.

Tout d'abord, mes remerciements s'adressent à ma directrice de recherche : Line Labbé. Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et merci pour votre soutien dans l'accomplissement de cette thèse. Merci pour vos conseils et votre soutien moral constants.

Ma gratitude s'adresse aussi à Dr. Catherine Litalien et Dr. Yves Théorêt pour leur confiance et leur soutien. Merci pour votre passion communicative, vos talents de pédagogues, vos encouragements et le temps consacré à l'accomplissement de ce travail.

Merci au Dr. Philippe Ovetchkine pour m'avoir donné la chance de collaborer à ses projets. Merci d'avoir partagé votre expertise et pour nos échanges intéressants.

Je remercie les membres du jury de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail et tout particulièrement au Dr Jacques Turgeon pour tout le temps que vous avez consacré à cette thèse.

À Samer Mouksassi, mon collègue et mon ami, qui m'a supportée au quotidien et m'a transmis sa passion scientifique. Merci pour tous les moments et souvenirs que nous partageons.

À Yana Kanaan, 19 ans d'amitié ça ne s'invente pas! Un peu comme une sœur; tu as toujours été là dans les bons comme dans les mauvais moments.

À tous mes autres amis, c'est grâce à vous que j'arrive à garder mon équilibre au quotidien. Vous comptez énormément pour moi.

À mes parents et mes frères, c'est grâce à chacun de vous si aujourd'hui j'en suis arrivée là. Merci!

Enfin, je tiens à remercier Walid. Merci de m'avoir épaulée tout le long de cette épreuve. Merci d'être toujours là pour moi.

CHAPITRE I

ÉTAT DE L'ART

Ce travail de thèse porte sur l'application de la pharmacocinétique de population dans le but d'optimiser l'utilisation de certains médicaments chez les enfants immunosupprimés et subissant une greffe.

La greffe d'organe est une pratique largement utilisée depuis plus d'un demi-siècle. La transplantation de parties du corps d'un individu à un autre fascine l'être humain depuis des siècles comme le prouve les traces laissées par ce sujet dans les récits mythologiques. L'avènement de la médecine moderne a été accompagné de nombreuses tentatives dans ce domaine et des progrès impressionnants ont été réalisés. Tous ces essais ont contribué à mettre en lumière les barrières techniques et les limites biologiques fondamentales des transplantations. L'histoire de la transplantation peut être comprise comme la découverte et le dépassement de ces obstacles. En résultat, la transplantation est de mieux en mieux maîtrisée.

Malgré les succès chirurgicaux que la transplantation a connus avant les années 70, le rejet des greffons restait l'obstacle majeur et la principale complication des transplantations. La découverte d'un principe actif, la ciclosporine, en 1970, a constitué une nouvelle étape. Le développement des médicaments immunosuppresseurs a toutefois amélioré le pronostic des greffes durant ces dernières années et a été une des conditions essentielles pour que les transplantations d'organes, de tissus et de cellules deviennent le traitement standard pour de nombreuses maladies graves. Ces médicaments préviennent le rejet de greffe. L'objectif principal de l'immunosuppression est de maintenir le greffon fonctionnel en ciblant l'activation des cellules T, la production de cytokines et l'expansion clonale (prolifération), tout en limitant les risques de toxicité. Cependant pour des doses excessives, l'utilisation de ces médicaments est associée à la survenue d'effets indésirables, parfois toxiques; et à faible exposition systémique, elle est associée à un risque élevé de rejet de greffe. En pratique clinique, le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) est utilisé pour optimiser les effets thérapeutiques de médicaments tout en diminuant les effets indésirables.[1] Cette méthode d'optimisation et d'individualisation de la dose consiste à

surveiller les concentrations sanguines ou plasmatiques du médicament et à adapter les posologies de façon à maintenir les concentrations dans une zone thérapeutique optimale. Les deux sources majeures de variabilité dans la réponse au médicament sont d'une part au niveau de la relation entre dose et concentration (variabilité pharmacocinétique); et d'autre part entre concentration du médicament au niveau du récepteur et la réponse (variabilité pharmacodynamique). En ajustant les doses pour maintenir les concentrations dans une zone thérapeutique optimale, la variabilité pharmacocinétique du médicament est largement réduite. Le STP est considéré aujourd'hui comme indispensable à la bonne utilisation de certains médicaments (par exemple, tacrolimus, busulfan et voriconazole) caractérisés par 1) une grande variabilité pharmacocinétique ; 2) une relation entre concentrations et effets thérapeutiques et indésirables; 3) une marge thérapeutique étroite; 4) une marge des concentrations cibles bien définie; et 5) un effet thérapeutique difficile à suivre.[1, 2]

Le STP requiert la connaissance de la pharmacocinétique (PK) du médicament. Les études de pharmacocinétique de population (PKPOP) de ces médicaments sont peu nombreuses. Ces études ont mis en évidence la complexité des profils PK observés et la grande variabilité interindividuelle sur les paramètres PK. En conséquence, il semble nécessaire d'avoir recours à des outils statistiques plus puissants comme les modèles non linéaires à effets mixtes, et de disposer de modèles PK pertinents afin de développer des stratégies pour l'estimation des paramètres PK individuels, le calcul de l'exposition systémique et l'ajustement des doses à partir d'un nombre limité de prélèvements sanguins.

Dans le chapitre I de cette thèse, nous décrivons brièvement les notions de pharmacocinétique en pédiatrie, modélisation pharmacocinétique, pharmacogénétique et pharmacocinétique des médicaments étudiés. Nous terminons le premier chapitre en présentant les objectifs de la thèse dans ce contexte. La seconde partie de la thèse présente les trois publications issues de ces travaux de doctorat. Enfin, la dernière partie consiste en une discussion générale des résultats et des perspectives de recherche.

1 Généralités sur la pharmacocinétique en pédiatrie

1.1 Généralités

La pharmacologie est la "science des médicaments". Elle s'intéresse à l'interaction qui a lieu entre du matériel vivant (cellules isolées, animal, et ultimement homme) et du matériel chimique ou biochimique (principe actif). Il s'agit en effet d'une interaction puisque le principe actif agit sur le vivant, définissant ainsi la pharmacodynamie et puisque le vivant agit sur le principe actif, définissant ainsi la pharmacocinétique.[3]

Les vertus thérapeutiques de nombreuses plantes sont connues depuis la nuit des temps, mais l'identification des principes actifs responsables de leurs effets pharmacologiques date des XIX^e et XX^e siècles. Rudolf Buchheim est considéré comme le fondateur de la pharmacologie en tant que discipline indépendante pour son entreprise en 1847 de l'étude expérimentale et systématique du mode d'action des médicaments.[3] Dans les années 1930, le professeur Harry Gold, est parmi les premiers à utiliser le terme pharmacologie clinique dans ses études sur la pharmacologie humaine du glycoside digitalis.

Historiquement, la pharmacologie pédiatrique a commencé au milieu du XIX^e siècle, avec les débuts de la pharmacologie.[4] Le père de la pédiatrie américaine, Dr. Abraham Jacobi (1830–1919), a écrit par le passé "*Pediatrics does not deal with miniature men and women, with reduced doses and the same class of disease in smaller bodies, but has its own independent range and horizon*".[5] Plus tard, Harry Shirkey (1916–1995), le pharmacien et pédiatre américain, a écrit "*The long list of dosage rules based on age, body weight or surface and their respective authors is testimony that no rule is entirely satisfactory in producing an exact fraction of the known adult dose that is applicable to a particular child*".[4] Déterminer les doses en pédiatrie, 100 ans plus tard, est encore souvent inconnu. La première étape pour la réussite dans la thérapie pédiatrique serait de reconnaître les différences entre les différents groupes d'âge en pédiatrie.[4]

Les enfants sont très différents des adultes en termes de perspectives sociales, psychosociales, comportementales, et médicales. Contrairement à l'adulte, l'enfant est un être en croissance et cette croissance n'est pas un processus linéaire. Son développement débute dès la conception et se poursuit jusqu'à la fin de la puberté. Il s'agit d'un processus dynamique qui s'accompagne de modifications importantes de la composition corporelle, de la maturation fonctionnelle des organes impliqués notamment dans le devenir des médicaments ainsi que de la maturation des récepteurs impliqués dans leurs effets (Tableau 1-1). Ces changements continus du corps et des organes influencent les effets des médicaments et leur disposition et doivent être pris en compte dans la détermination de schémas posologiques pédiatriques afin d'éviter les accidents toxiques et/ou l'inefficacité thérapeutique.[5-7]

La population pédiatrique regroupe des enfants âgés entre 0 et 18 ans et elle est généralement divisée en groupes d'âge. Une classification, internationalement acceptée, comportant 5 groupes d'âge a été proposée lors de la Conférence internationale sur l'harmonisation (ICH) tenue en 2000 [8]:

- les prématurés (<37 semaines de gestation)
- les nouveau-nés à terme (0 – 28 jours)
- les nourrissons (>28 jours – 23 mois)
- les enfants (2 – 11 ans)
- les adolescents (12 à 16 ou 18 ans, selon les pays)

Tableau 1-1 Différences physiologiques entre les enfants et les adultes influençant la pharmacocinétique

Absorption	Plupart des médicaments administrés par voie orale pH gastrique élevé Vidange gastrique ralentie et irrégulière Motilité intestinale ralentie Fonctions biliaire et pancréatique immatures Profil adulte atteint presque à 2 ans	Conséquences pharmacocinétiques possibles au niveau de la biodisponibilité, de la vitesse d'absorption et de l'exposition
Distribution	Eau totale et eau extracellulaire augmentées Protéines plasmatiques, albumine et compartiment lipidique diminués Perméabilité membranaire vers le système nerveux central augmentée Profil adulte atteint presque à 2 ans	Affecte le volume de distribution: augmenté pour les médicaments hydrosolubles et diminué pour les médicaments liposolubles
Métabolisme	CYP3A7 : présent à l'âge fœtal CYP2E1 : apparaît après la naissance CYP2D6, CYP3A4 : se développent durant les 3 premiers mois CYP1A2 : dernier à apparaître	La clairance hépatique des médicaments éliminés par la famille CYP450 est le plus faible jusqu'à l'âge de 2 mois et la maturation continue tout au long de la première année de vie et se traduit par une demi-vie d'élimination plus longue. Par contre, la clairance est augmentée chez les nourrissons et enfants.
Élimination	Filtration glomérulaire est faible à la naissance Tubules rénaux anatomiquement et fonctionnellement immatures Valeurs adultes atteintes vers 8-12 mois	La clairance des médicaments principalement éliminés par filtration glomérulaire et/ou sécrétion tubulaire est affectée

Modifié d'après Kearns et al.[5]

Des changements importants dans la composition corporelle accompagnent la croissance et le développement en pédiatrie. Ces changements développementaux dans la physiologie et, par conséquent, dans la pharmacologie influencent l'efficacité, la toxicité, et le schéma posologique des médicaments utilisés chez les enfants. Il est donc important de prendre en considération les caractéristiques des périodes pertinentes du développement de la naissance, à l'adolescence, et à l'âge adulte.[9] Par exemple, la ICH E11[10] insiste sur la croissance rapide et la maturation du système nerveux central et du système immunitaire chez les nourrissons. La croissance sexuelle et les conséquences hormonales sur le développement neurocognitif sont des points importants à considérer chez les adolescents.

Les pédiatres essayent d'adopter des approches pour déterminer la première dose pédiatrique basées sur les doses chez l'adulte. Les différentes approches comportent [11]:

- les catégories d'âge
- la normalisation de la dose par le poids (WT)
- la normalisation de la dose par la surface corporelle (BSA)
- les principes d'allométrie

La détermination des doses basée sur les catégories d'âge peut paraître raisonnable vu qu'elle prend en considération les différences physiologiques entre les nouveau-nés, nourrissons, enfants et adolescents. Cette méthode est facile à appliquer, par contre elle ne prend pas en considération l'effet de la maturation sur la PK des médicaments au sein d'un même groupe. De plus, cette méthode considère un enfant n'ayant pas de pathologies.[11]

L'âge et le poids sont deux paramètres très corrélés, mais les paramètres PK normalisés par le poids, peuvent varier en fonction de l'âge. La clairance normalisée par le poids de certains médicaments peut être plus élevée chez les enfants que chez les adultes suggérant une augmentation de la dose chez les enfants. Des limites de poids (minimum – maximum) doivent être définies pour l'application de cette méthode.[11]

La surface corporelle est un paramètre calculé à partir du poids et de la taille de l'enfant. Le dosage basé sur la surface corporelle est préféré chez les enfants dans certaines situations. Parmi ces situations : 1) un faible volume de distribution du médicament chez

l'adulte (<0.4 L/kg), donc distribution dans les fluides extracellulaires qui sont corrélés avec la surface corporelle chez l'enfant; 2) médicament métabolisé par les enzymes matures du foie chez les enfants à partir de 6 mois car la clairance est corrélée au BSA. Cependant, des études de pharmacocinétique de certains médicaments métabolisés par l'enzyme uridine diphosphate glucuronosyltransférase et le CYP2D6 montrent que leurs clairances semblent être plutôt corrélées au poids.[12-14] Les désavantages de cette approche sont la difficulté de calculer la BSA, la disponibilité de plusieurs formules et la possibilité de surdoser les nouveau-nés (par exemple, surdosage de valganciclovir [15]).[11]

L'allométrie relie la fonction physiologique et la morphologie au poids et à la taille. Il est reconnu que l'allométrie par le poids est basée sur un exposant fixe de 0.75 et repose sur des principes biologiques. Ces relations allométriques dérivées de taux de métabolisme basal ont été proposées pour l'extrapolation entre espèces, mais ont également été appliquées dans les études pharmacocinétiques pédiatriques.[16, 17] L'approche d'allométrie avec exposant fixe suggère que la clairance est liée au poids par un exposant de 0.75 ($CL \sim WT^{0.75}$) et que le volume de distribution varie de façon linéaire avec le poids ($V \sim WT^1$).[16] Par contre, plusieurs travaux ont signalé que le concept d'un exposant fixe de 0.75 est inexact pour la prédiction de la clairance dans différents groupes d'âge, en particulier chez les nourrissons et les nouveau-nés.[18-20] Pour tenir compte de la maturation du processus de métabolisme pendant la petite enfance, certains auteurs suggèrent de considérer l'âge post-conception, en plus des modifications de clairance liées au poids.[17, 21, 22] D'autres auteurs recommandent de ne pas fixer l'exposant allométrique à sa valeur théorique, mais de l'estimer à partir des données.

En conclusion, la plupart des approches de dosage selon l'âge sont fondées sur l'influence connue de l'ontogenèse sur l'élimination des médicaments. Les lacunes actuelles dans les connaissances (par exemple, profils incomplets de maturation des enzymes hépatiques et extra-hépatiques, le manque de connaissances en ce qui concerne l'expression des transporteurs de médicaments) empêchent l'utilisation de formules simples pour la prédiction de la dose efficace pédiatrique, surtout chez les nouveau-nés, où la relation entre

les mesures anthropométriques et la maturation des voies métaboliques n'est pas linéaire.[23] De telles approches (par exemple, allométrie) sont surtout utiles chez les enfants plus âgés qu'un an et les adolescents dont la fonction des organes et la composition corporelle se rapprochent de celles des jeunes adultes.

1.2 Pharmacocinétique en pédiatrie

Le développement et la croissance ne sont pas un processus linéaire chez les enfants. La croissance est rapide durant les premières années de la vie de l'enfant. Bien que de nombreux changements physiologiques pouvant affecter le devenir des médicaments aient lieu tout au long de l'enfance, ceux qui affectent le plus la PK se produisent durant la première année de vie.[24]

1.2.1 Absorption

Différentes voies sont utilisées pour administrer les médicaments aux enfants, la plus utilisée étant la voie extravasculaire. L'absorption d'un médicament administré par cette voie est influencée par des facteurs chimiques, physiques, mécaniques et biologiques (Tableau 1-2).[9]

Tableau 1-2 Ontogenèse des principaux facteurs impliqués dans l'absorption gastro-intestinale des médicaments

	Nouveau-né (à la naissance)	Nouveau-né (1 – 27 jours)	Nourrisson (28 jours – 23 mois)	Enfant (2 – 11 ans)
<i>Facteurs Physiologiques</i>				
pH gastrique	1 – 3	> 5	4 → 2	Profil adulte
Vidange gastrique	↓ et irrégulière	↓ et irrégulière	↑	Légèrement ↑
Motilité intestinale	↓	↓	↑	Profil adulte
Surface intestinale	↓	↓	Presque adulte	Profil adulte
Fonction biliaire	Très immature	Immature	Presque adulte	Profil adulte
Fonction pancréatique	Très immature	Immature	Presque adulte	Profil adulte
Flore intestinale	Très immature	Immature	Immature	Presque adulte
Biotransformation intestinale : CYP3A4	Très immature	↓	Profil semblable aux enfants plus âgés	Profil semblable aux enfants plus âgés
Transport intestinal : P-gp	Inconnu	Inconnu	Inconnu	Inconnu
<i>Résultats Pharmacocinétiques</i>				
Taux d'absorption	Variable	Variable	≥ Adulte	Profil adulte
Effet de premier passage digestif	Très ↓	↓	Presque adulte	Profil adulte

Modifié d'après Kearns et al.[5]

La plupart des médicaments sont administrés par voie orale chez l'enfant. En général, la bouche est un site peu important pour l'absorption des médicaments car ces derniers ont besoin d'être dissous en premier dans la salive et à cause du court séjour dans la bouche. L'anatomie du pharynx et de l'œsophage est similaire aux adultes avec la seule différence de taille. Les mouvements coordonnés oraux et pharyngaux nécessaires pour avaler des matières solides se développent durant les 2 premiers mois d'un enfant né à terme.[9] Les facteurs les plus importants qui influencent l'absorption des médicaments sont liés à la physiologie de l'estomac, de l'intestin, et du conduit biliaire.

Dans les premières heures et jours qui suivent la naissance, le poids intestinal et la masse muqueuse doublent presque pour tenir en compte le passage du cordon ombilical à une alimentation orale, ce qui est similaire au passage de l'alimentation parentérale à l'alimentation orale.[25] Cette croissance intestinale rapide et ce développement fonctionnel sont stimulés par l'alimentation par le colostrum, qui est riche en facteurs de croissance peptidiques tels que EGF, TGF alpha et l'IGF-1. La grande quantité d'IgA sécrétées dans le colostrum, qui a une haute biodisponibilité systémique, peut également jouer un rôle dans le développement intestinal en plus de fournir une protection immunitaire.[25]

Les changements dans le pH gastrique affectent la stabilité et le degré d'ionisation de certains médicaments et donc influencent la quantité relative de médicament disponible pour absorption. Même si les cellules pariétales sont bien développées, le pH gastrique est presque neutre à la naissance. Il diminue à 1 – 3 durant les 24 heures suivant la naissance, puis retourne graduellement à la neutralité au jour 8. Ensuite, il diminue de nouveau pour atteindre les valeurs adultes à partir de l'âge de 2 à 3 ans.[9, 11] La diminution de la capacité de sécrétion d'ions hydrogène persiste tout au long de l'enfance, et est en particulier représentée par une diminution de production d'acide suite à la stimulation de pentagastrine.[9, 26] De plus, le contenu gastrique est tamponné par l'alimentation fréquente et la vidange gastrique retardée. Le pH gastrique élevé chez les jeunes enfants, augmente la biodisponibilité des médicaments instables en milieu acide et des bases faibles, et diminue la biodisponibilité des acides faibles. L'absorption des macromolécules comme la lactalbumine contenue dans le lait maternel ou des aminoglycosides est facilitée chez les jeunes enfants en conséquence à l'immaturation de la barrière muqueuse intestinale et l'augmentation de sa perméabilité.[27]

La vidange gastrique est plus lente et irrégulière chez le nouveau-né et le jeune nourrisson ce qui diminue la vitesse d'absorption, diminue la concentration maximale et prolonge le temps pour atteindre cette concentration. Cependant, dans la majorité des cas, l'aire sous la courbe reste inchangée. La valeur adulte est atteinte vers l'âge de 6 à 8 mois.[9, 28]

Le temps de transit intestinal est prolongé chez le nouveau-né en raison d'une diminution du péristaltisme (augmentation de la biodisponibilité des médicaments peu hydrosolubles) et raccourcit chez le nourrisson plus âgé lorsque la motilité gastrique augmente.[9, 28, 29]

Les fonctions biliaires et pancréatiques sont immatures chez le nouveau-né, et se développent rapidement après la naissance, ainsi qu'une relative immaturité de la muqueuse intestinale, ce qui entraîne une augmentation de sa perméabilité. L'immaturité de la sécrétion et de l'activité de la bile et des fluides pancréatiques entraîne une digestion altérée des lipides. L'absorption des vitamines D et E est diminuée chez les nouveau-nés probablement à cause des niveaux inadéquats de bile dans l'iléum.[9]

L'intestin proximal est le site principal d'absorption des médicaments et joue un rôle important dans l'effet de premier passage de certains médicaments administrés par voie orale. Le CYP3A4 est l'enzyme majoritairement exprimée dans la muqueuse intestinale. Une faible expression de cette enzyme entraîne une augmentation de la biodisponibilité des substrats CYP3A4 chez les nouveau-nés.[5, 24] La P-glycoprotéine (P-gp) est un élément important qui limite la biodisponibilité des médicaments. La P-gp est une protéine de la membrane cellulaire exprimée chez l'homme par le gène MDR1. Elle est présente au niveau de l'intestin au pôle apical des entérocytes, où elle expulse les médicaments vers la lumière intestinale, ce qui diminue leur biodisponibilité. Au niveau de la barrière hématoencéphalique, elle diminue le passage des xénobiotiques dans le cerveau. Aux niveaux hépatiques et rénaux, elle contribue à l'excrétion des substances xénobiotiques dans la bile et l'urine, respectivement.[9] Cependant, les données sur l'ontogenèse de la P-gp intestinale sont très limitées et son rôle chez les enfants n'a pas encore été décrit.[30] D'autres transporteurs exprimés au niveau intestinal, comme le BCRP (ABCG2), limitent la biodisponibilité des médicaments. Des biopsies duodénales des enfants montrent l'expression très variable de l'ARN messager du gène MDR1. L'expression des transporteurs P-gp et BCRP a été détectée dans les membranes de l'épithélium intestinal à partir de 12 semaines de gestation.[31] Cependant, l'effet réduit de premier passage

hépatique et intestinal sur la biodisponibilité peut compenser la réduction de biodisponibilité due à plusieurs autres facteurs tels que l'immaturation intestinale, le pH gastrique, la réduction de la vidange gastrique ou le temps de transit intestinal.

Ainsi, le processus de maturation du tractus gastro-intestinal a des conséquences sur la biodisponibilité des médicaments administrés par voie orale.

1.2.2 Distribution

Une fois le médicament dans le sang "compartiment central", il peut se distribuer dans différents autres compartiments du corps selon un processus indépendant de la voie d'administration.[31] Les changements âge-dépendant dans la composition corporelle altèrent la distribution des médicaments (Figure 1-1). Ces changements sont en partie dus à des modifications physiologiques de la composition corporelle, à la liaison aux protéines plasmatiques et tissulaires, au rôle des transporteurs ainsi qu'à la perméabilité membranaire. D'autres facteurs qui varient au cours du développement tels que l'augmentation du débit cardiaque et de la perfusion des organes peuvent également avoir une influence sur la distribution. Le volume de distribution est un marqueur des changements âge-dépendant dans la distribution des médicaments.[5, 9, 11, 24, 31]

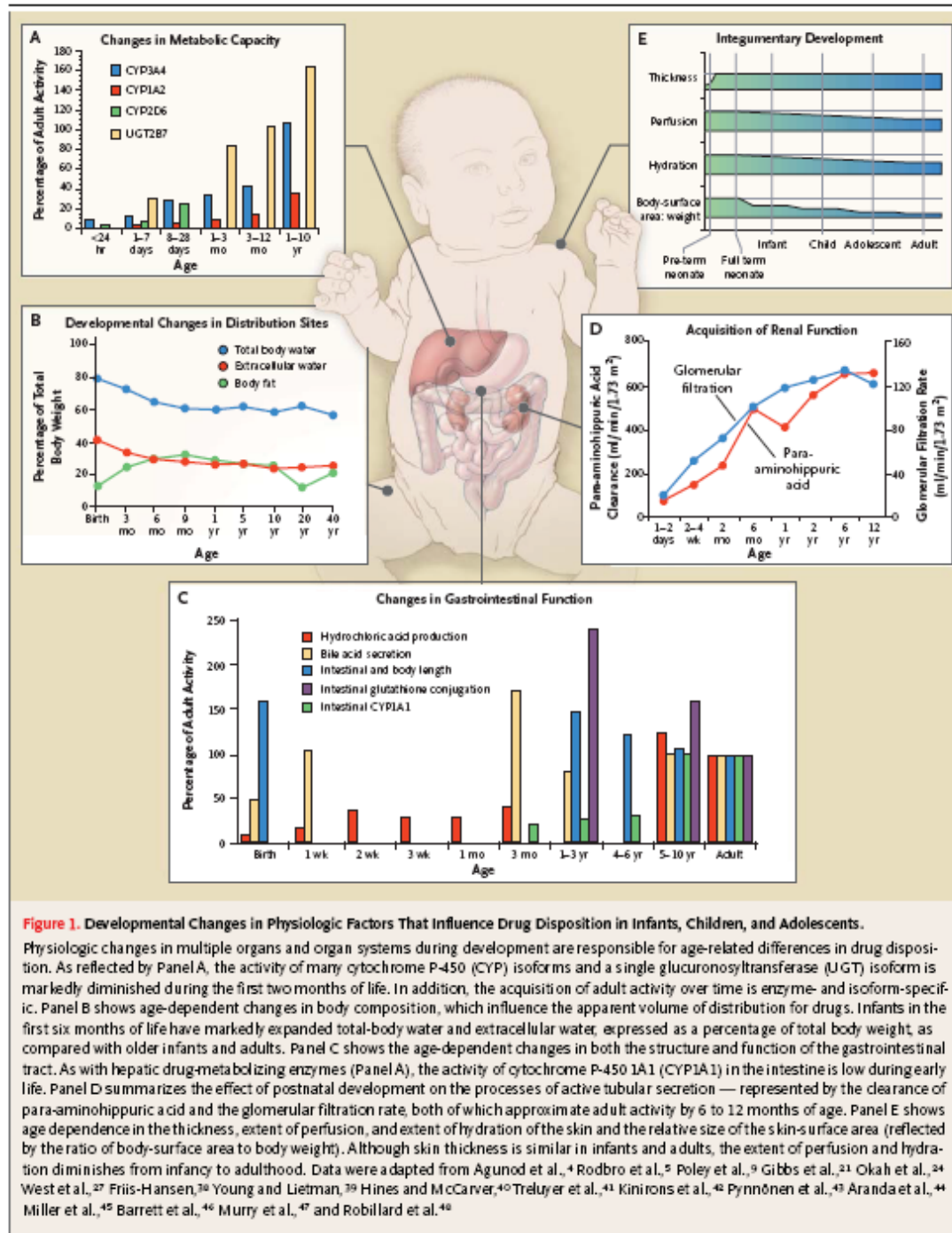
Taille des compartiments hydriques et lipidiques

La taille des compartiments hydriques et lipidiques où se distribuent les médicaments varie selon l'âge. Chez le nouveau-né et les jeunes nourrissons, l'eau totale représente une importante proportion du poids corporel (80 – 90%) comparés aux enfants plus âgés et aux adultes (55 – 60%).[9] L'eau extracellulaire diminue de 40% du poids corporel chez le nouveau-né pour atteindre 20% chez les adultes.[32] Ces changements résultent en un volume de distribution relativement plus grand des médicaments hydrosolubles chez les enfants comparé aux adultes. De plus, la teneur en lipides est faible

à la naissance (10 – 15%), augmente chez le nourrisson et le petit enfant pour atteindre des valeurs proches de celles des adultes à l'âge d'un an. La teneur en lipide diminue de nouveau jusqu'à l'âge de préadolescence (11 ans) pour recommencer à augmenter. En effet, les proportions plus grandes d'eau totale et d'eau extracellulaire chez le nouveau-né et les jeunes enfants, avec le ratio eau/lipide plus important chez le nouveau-né que chez l'adulte (57% vs. 25%) résulte en des concentrations plasmatiques plus faibles quand les doses sont normalisées par le poids.[5, 24]

L'hydrosolubilité et la liposolubilité des médicaments sont les paramètres majeurs qui déterminent les conséquences de ces variations sur la distribution des médicaments. Chez le nouveau-né et le jeune nourrisson, le volume de distribution des médicaments hydrosolubles est plus grand que celui de l'enfant plus âgé; à l'inverse, le volume de distribution des médicaments liposolubles est plus faible.[9]

Figure 1-1 Changements physiologiques influençant le devenir des médicaments chez les enfants



Adapté d'après Kearns et al.[5] (Annexe II)

Liaison aux protéines plasmatiques et tissulaires

La liaison des médicaments aux protéines dépend de la quantité de protéines disponibles, de l'affinité pour la protéine, du nombre de sites de liaisons disponibles, et de la présence de conditions pathophysiologiques ou produits endogènes affectant l'interaction entre le médicament et la protéine.[9] En général, les molécules acides se lient à l'albumine, alors que les molécules basiques se lient aux globulines, α_1 -glycoprotéine et lipoprotéines. Les faibles concentrations sanguines en albumine et en α_1 -glycoprotéine chez les nouveau-nés impliquent une augmentation de la fraction libre comparée aux enfants durant la première année de vie.[33, 34] La présence de l'albumine fœtale (affinité réduite aux acides faibles), et l'augmentation des substances endogènes (bilirubine et acides gras) capables de compétitionner avec les médicaments pour les sites de liaison, peuvent aussi contribuer à l'augmentation de la fraction libre chez les nouveau-nés.[33, 34] En résumé, cette diminution de liaison aux protéines, peut entraîner une augmentation de la fraction libre des médicaments et induire une majoration des effets pharmacodynamiques et toxiques, et donc un ajustement de la dose (diminution) pourrait être nécessaire. D'autre part, les maladies rénales et hépatiques, l'hypoprotéïnémie due à la malnutrition, la fibrose kystique, les brûlures, la chirurgie, les traumatismes et les acidoses peuvent aussi diminuer les liaisons aux protéines plasmatiques à cause d'une diminution de la synthèse des protéines ou de la compétition aux sites de liaison.[24]

Perméabilité membranaire

La perméabilité membranaire est particulièrement élevée chez les nouveau-nés prématurés. La myélinisation, qui contre le passage des médicaments, continue après la naissance.[9] La barrière hémato-encéphalique du prématuré, du nouveau-né à terme et du nourrisson est immature, ce qui permet à certains médicaments et substances endogènes (par exemple, bilirubine) de pénétrer plus facilement dans le système nerveux central et de causer des toxicités. De plus, le cerveau est disproportionnellement large chez les jeunes

enfants ce qui, combiné à l'immaturation de la barrière hémato-encéphalique, résulte en un plus grand volume de distribution.[9]

Une partie de la distribution des médicaments est le résultat de la diffusion passive des médicaments selon le gradient de concentration; une autre partie est due à la présence de transporteurs dans les tissus. La littérature manque d'information sur l'ontogenèse des transporteurs chez l'enfant. Quelques études rapportent l'ontogenèse de transporteurs dans des modèles animaux. La famille des transporteurs MDR est codée par deux gènes, MDR1 et MDR3. La P-gp, codée par le gène MDR1, est un exemple de protéines d'efflux limitant le transport de médicaments qu'elle transporte.[35] Elle a donc pour rôle de protéger le système nerveux central tandis qu'au niveau intestinal, elle limite la biodisponibilité orale des médicaments.[36, 37] La famille des transporteurs OAT (organic anion transporter) est impliquée dans le transport de plusieurs médicaments comme les antibiotiques, anti-inflammatoires et les toxines. Ce système joue un rôle important dans la protection contre les effets toxiques des substances anioniques, d'origines environnementales ou endogènes, en enlevant ces substances du sang par un mécanisme de transport présent dans la membrane basolatérale des cellules épithéliales rénales. L'ontogénie du transport rénal a été étudiée indirectement à travers la physiologie. Il a été démontré que la sécrétion des anions organiques est faible à la naissance, augmente durant les premières semaines de la vie néonatale puis décline vers les niveaux adultes. Cette augmentation dans la sécrétion des anions organiques est disproportionnelle à l'augmentation de la masse rénale, et il a donc été pensé que ceci reflète la maturation du système OAT.[9]

1.2.3 Élimination

La clairance systémique est le paramètre pharmacocinétique le plus important qui décrit l'efficacité avec laquelle les médicaments sont éliminés de l'organisme. La vitesse d'administration et la clairance systémique déterminent la concentration moyenne à l'état d'équilibre qui ensuite est liée à la réponse pharmacologique et/ou toxicologique.[2]

$$C_{ss} = \frac{R_0}{CL} \text{ ou } \frac{FD/\tau}{CL}$$

Où C_{ss} est la concentration à l'équilibre, F est la biodisponibilité, τ est l'intervalle d'administration, CL est la clairance systémique, et R_0 est la vitesse de perfusion.

La clairance systémique est la somme de toutes les voies d'élimination, mais chez les enfants, les médicaments sont principalement éliminés par le foie et/ou par les reins.[35]

$$CL = CL_{\text{hépatique}} + CL_{\text{rénale}} + CL_{\text{biliaire}} + CL_{\text{autre}}$$

1.2.3.1 Clairance hépatique

Selon le modèle « well-stirred », la clairance hépatique est fonction des déterminants suivants: le débit sanguin hépatique, la clairance intrinsèque (les systèmes de transport hépatique et la biotransformation hépatique) et la liaison aux protéines plasmatiques.[38-40] Parmi ces paramètres, la biotransformation hépatique est le facteur sur lequel l'âge et le développement ont des effets importants.

$$CL_H = Q_H * E_H = Q_H * \frac{f_{\text{libre}} * CL_{\text{int,libre}}}{Q_H + (f_{\text{libre}} * CL_{\text{int,libre}})}$$

où Q_H est le débit sanguin hépatique, E_H est le coefficient d'extraction hépatique qui dépend de la fraction libre (f_{libre}), de la clairance intrinsèque de la fraction libre ($CL_{\text{int,libre}}$) et du débit hépatique.

Pour les médicament avec un coefficient d'extraction hépatique faible ($E_H \leq 0.3$), le facteur $f_{\text{libre}} * CL_{\text{int,libre}}$ est négligeable devant Q_H et l'équation peut être simplifiée à:

$$CL_H = Q_H * E_H = Q_H * \frac{f_{\text{libre}} * CL_{\text{int,libre}}}{Q_H \gg f_{\text{libre}} * CL_{\text{int,libre}}} \cong f_{\text{libre}} * CL_{\text{int,libre}}$$

Pour les médicament avec un coefficient d'extraction hépatique élevé ($E_H \geq 0.7$), la clairance intrinsèque est plus importante que le débit sanguin, Q_H est négligeable devant $f_{\text{libre}} * CL_{\text{int,libre}}$ et l'équation peut être simplifiée à:

$$CL_H = Q_H * E_H = Q_H * \frac{f_{\text{libre}} * CL_{\text{int,libre}}}{Q_H \ll f_{\text{libre}} * CL_{\text{int,libre}}} \cong Q_H$$

Débit sanguin hépatique

Le débit sanguin gouverne la clairance hépatique des médicaments à ratio d'extraction élevé. Très peu d'études ont évalué le débit sanguin hépatique chez l'enfant et il n'existe aucune donnée qui suggère que ce dernier a un impact différent dans la population pédiatrique de celui décrit chez l'adulte.[35]

Systèmes de transport hépatique

L'ontogenèse du système de transport hépatocellulaire et de l'excrétion biliaire chez l'humain a reçu peu d'attention. Le développement des processus de transport peut influencer la clairance hépatique en limitant l'excrétion biliaire et/ou le taux de présentation des médicaments aux enzymes hépatiques. L'excrétion biliaire est importante dans l'élimination de certains médicaments (par exemple, anti-cancéreux) et des médicaments conjugués (glucuronide, conjugués de la glutathion), et dans l'excrétion des acides biliaires endogènes et d'autres anions organiques.[35] Les données proviennent essentiellement d'études animales et elles suggèrent que ces systèmes sont immatures chez l'enfant.[41] Toutefois, il faut demeurer prudent avec de telles extrapolations, puisqu'il existe peu de modèles expérimentaux qui permettent d'étudier adéquatement le développement postnatal humain.

Biotransformation hépatique

La biotransformation hépatique est une importante voie d'élimination pour plusieurs médicaments. En général, la biotransformation hépatique augmente l'hydrophilie des médicaments et favorise leur élimination rénale.

La biotransformation hépatique est généralement associée à des réactions de phase I et de phase II. Souvent, l'élimination des médicaments nécessite ces deux types de réactions de manière séquentielle.[35]

Le profil de maturation est spécifique à chaque enzyme, ce qui signifie que la maturation des voies de biotransformation en fonction de l'âge se fait à des vitesses différentes.

Le profil de maturation de chacune des enzymes est spécifique à chaque individu, ce qui se traduit par une grande variabilité interindividuelle.

Enzymes de phase I

Parmi les enzymes de phase I, celles appartenant à la famille des CYP450 sont les plus importantes dans l'élimination de nombreux médicaments.

Chez le fœtus, le contenu total en enzymes CYP450 représente environ le tiers de celui de l'adulte.[42] Le niveau protéique et l'activité enzymatique de la plupart des enzymes sont extrêmement faibles, voire absents, et leur développement est déclenché par la naissance. La maturation des enzymes CYP450 chez l'humain peut être catégorisée en trois groupes selon le développement de leur activité enzymatique.[43]

- Les enzymes CYP450 fœtales (CYP3A7 et CYP4A1), qui sont fortement exprimées au niveau du foie fœtal et qui sont impliquées principalement dans la biotransformation des substances endogènes.
- Les enzymes CYP450 néonatales précoces (CYP2D6 et CYP2E1), dont l'activité est essentiellement absente au cours de la période fœtale et apparaît rapidement dans les heures suivant la naissance.

- Les enzymes CYP450 néonatales (CYP3A4, CYP2C, CYP2B et CYP1A2) dont l'activité apparaît au cours de la première semaine de vie.

Le Tableau 1-3 décrit l'ontogenèse de l'activité enzymatique *in vitro* des enzymes de la famille CYP450 les plus importantes pour la biotransformation des médicaments.

Tableau 1-3 Activité enzymatique *in vitro* des cytochromes P450 au niveau de microsomes hépatiques chez le fœtus et l'enfant de différents âges, exprimés sous forme de fraction de l'activité adulte (nmol/min/mg microsomal protein)

Enzyme CYP450	Fraction de l'activité adulte					
	<24h	1-7 jours	8-28 jours	1-3 mois	3-12 mois	1-15 ans
1A2	0.12	0.10	0.20	0.39	0.46	1.10
2C2	0.02	0.03	0.42	0.31	0.29	--
2D6	0.04	0.09	0.24	--	--	--
2E1	0.21	0.31	0.36	0.46	0.39	0.80
3A4	0.08	0.13	0.29	0.34	0.43	1.08
3A7	9.5	13	6	3	2	--

Modifié d'après Alcorn et al.[24]

CYP1A2: L'activité du CYP1A2 est celle qui se développe en dernier, avec une activité significative qui apparaît à partir de 1-3 mois [44, 45] et qui atteint 50% de celle de l'adulte à l'âge d'un an.[46]

CYP2C: L'activité du CYP2C est absente chez le fœtus. Elle est limitée chez le nouveau-né de moins de huit jours de vie et augmente considérablement à l'âge d'un mois pour atteindre 50% de l'activité adulte.[47, 48] Par la suite, cette activité demeure globalement stable au cours de la première année de vie.

CYP2D6: L'enzyme CYP2D6 constitue 2% du total des enzymes CYP450 dans le foie adulte, mais est responsable du métabolisme de beaucoup de médicaments. L'activité CYP2D6 démontre un grand polymorphisme génétique (5 à 10% des caucasiens sont des métaboliseurs lents).[49] L'activité du CYP2D6 est détectable à deux semaines de vie et

atteint ~ 30% de l'activité adulte à l'âge d'un mois. Sa maturation se complète vers l'âge d'un an.[46]

CYP2E1: L'expression fœtale du CYP2E1 est incertaine mais, si elle existe, c'est en très faible quantité. Son activité augmente immédiatement après la naissance pour atteindre la valeur adulte vers l'âge d'un an.[47]

CYP3A: Les CYP3A4, CYP3A5 et CYP3A7 sont les principales isoformes de la famille CYP3A. Chez le fœtus, le CYP3A7 est l'isoforme qui prédomine, avec une expression négligeable de CYP3A4 et de CYP3A5. Après la naissance, il se produit une inversion CYP3A7-CYP3A4, d'où une augmentation de l'activité de CYP3A4 et une diminution de l'activité du CYP3A7 au cours de la première année de vie.[50] Contrairement à ces observations initiales, certains auteurs suggèrent que le CYP3A7 est produit dans le foie et l'intestin grêle de ~ 15% des adultes de race blanche.[2, 51, 52] Quant au CYP3A5, très peu de données sont disponibles concernant son expression chez le fœtus et l'enfant.[53, 54]

Bien que la vitesse de maturation de ces enzymes soit différente, il est connu qu'elles sont toutes, à l'exception du CYP3A7, immatures à la naissance et qu'elles arrivent à maturité durant la première année de vie. Par conséquent, la clairance hépatique des médicaments éliminés par les enzymes CYP450 est faible chez le prématuré, le nouveau-né et le jeune nourrisson, se traduisant par une demi-vie d'élimination plus longue et une nécessité de réduire la posologie.

La clairance exprimée en fonction du poids corporel pour les médicaments principalement éliminés par le foie, est en général plus rapide chez les enfants âgés entre 1 et 10 ans que chez les adultes. Cliniquement, cela se traduit par la nécessité d'administrer à ce groupe d'âge pédiatrique des doses en mg/kg relativement plus élevées que chez l'adulte afin d'obtenir la même exposition systémique en supposant que la pharmacodynamie est pareille.[5] Les mécanismes sous-jacents expliquant cette augmentation de la clairance sont inconnus. Les deux hypothèses principales possibles sont:

- Une activité CYP450 hépatique plus grande et une masse hépatique plus importante chez l'enfant s'accompagnant d'une capacité de biotransformation absolue plus élevée
- Le pourcentage de la masse hépatique par rapport au poids corporel est maximal entre l'âge d'un an et trois ans et il diminue par la suite jusqu'à l'âge adulte

Enzymes de phase II

L'ontogenèse des réactions impliquant des enzymes de la phase II est moins bien définie que celles des réactions impliquant les enzymes de phase I. Les voies de glucuroconjugaison et d'acétylation sont inefficaces et immatures chez le nouveau-né et le jeune enfant comparativement à l'adulte, alors que les sulfotransférases et les glutathion-transférases sont bien développées et qu'elles fonctionnent efficacement dès la naissance.[35]

Tableau 1-4 Profil de maturation des enzymes de phase II

Enzyme de Phase II	Activité postnatale
Sulfotransférase	Significative, presque adulte
Glutathion-S-transférase	Significative, presque adulte
Uridine 5'-diphosphate glucuronyltransférase	25% de l'activité adulte à 3 mois Activité adulte atteinte entre 6 et 30 mois
N-acétyltransférase	Faible pendant les premiers mois de vie Activité adulte atteinte après l'âge de 1 an

Modifié d'après Alcorn et al.[24]

Glutathion-S-transférase (GST) : Le GST forme une famille d'enzymes de 16 gènes et 6 sous-familles. Au moins 3 loci génétiques (GST1, GST2, GST3) donnent lieu aux classes mu, alpha, thêta et pi de cette famille d'enzymes. Le foie fœtal a une expression plus limitée des enzymes GST comparé aux adultes. Une augmentation graduelle dans l'activité GST1 associée d'une diminution de l'activité GST3 est observée au stade fœtal. Les classes alpha et pi des enzymes GST montrent une expression intense dans les

hépatocytes entre les semaines 16 et 24 de la gestation, alors que la classe alpha prédomine dans le foie des enfants et adultes. Les données sur le développement de l'expression des enzymes GST demeurent confuses, mais suggèrent que le développement est substrat-dépendant et relativement bien développé chez le nourrisson.[35, 55]

Sulfotransférase (SULT) : Les SULT peuvent être décrits dans 4 catégories. Les données sur les différents sous-types sont limitées. Les SULT1A1 sont présents au même niveau à l'âge fœtal, néonatal et adulte. Les SULT1A3 diminuent après la naissance. Les SULT1A2 sont faibles à l'âge fœtal et augmentent de façon stable jusqu'à atteindre le niveau adulte. Une nouvelle famille avec expression prédominante dans le cerveau, SULT4A, a été récemment décrite mais ses fonctions sont encore inconnues.[35, 55]

Uridine 5'-diphosphate glucuronyltransférase (UGT) : Plus que 18 enzymes, divisées en 2 familles, UGT1A et UGT2B, selon les homologies des séquences, ont été identifiées. UGT1A1, responsable de la glucuronidation de la bilirubine, est presque indétectable dans le foie fœtal. L'expression enzymatique augmente indépendamment de l'âge gestationnel directement après la naissance, et atteint le niveau adulte vers l'âge de 3 - 6 mois. L'expression d'UGT1A3 à la naissance est à 30% de la valeur adulte. L'UGT1A6 est à 1-10% du niveau adulte dans le foie fœtal, elle augmente après la naissance et atteint 50% du niveau adulte à 6 mois et son activité est complète après la puberté. Pour UGT2B7, l'expression augmente de 10 à 20% du niveau adulte après la naissance. L'expression d'UGT1A9 et d'UGT2B4 se régularise vers l'âge de 2 ans.[35, 55]

N-acétyltransférase (NAT) : Les données sur l'ontogenèse des NAT sont limitées. Deux gènes ont été identifiés, NAT1 et NAT2. NAT1 est plus faible dans les échantillons fœtaux que chez les adultes.[3, 55]

1.2.3.2 Clairance rénale

La fonction rénale est fonction de trois paramètres: la filtration glomérulaire, la sécrétion tubulaire et la réabsorption tubulaire.

$$CL_{\text{rénale}} = CL_{\text{filtration glomérulaire}} + CL_{\text{sécrétion tubulaire}} + CL_{\text{réabsorption tubulaire}}$$

La maturation de chacun de ces paramètres est indépendante et influence l'élimination des médicaments.[5] La néphrogenèse commence à 8 semaines de gestation et se termine à 36 semaines de gestation. Par contre, la croissance des tubules rénaux se poursuit bien au-delà de la vie fœtale et elle est responsable à elle seule de l'augmentation de la masse rénale qui se produit entre 36 semaines de gestation et l'âge adulte. Ainsi, à la naissance, la fonction glomérulaire est plus développée que la fonction tubulaire.

En période postnatale immédiate, une augmentation rapide du taux de filtration glomérulaire est observée, principalement liée à une augmentation du débit sanguin rénal secondaire à l'augmentation du débit cardiaque et à la diminution de la résistance vasculaire rénale.[6] La filtration glomérulaire est réduite chez le nouveau-né. Elle est de 15 et 40 ml/min/1.73 m² à l'âge d'une semaine chez les nouveau-nés prématurés et à terme, respectivement. Elle atteint les valeurs adultes (~ 100 ml/min/1.73 m²) à ~ 3 mois. Après l'âge de 3 mois, la filtration glomérulaire peut dépasser les valeurs adultes quand exprimée en kg. Les implications cliniques de la maturation de la fonction glomérulaire deviennent apparentes quand on considère les médicaments principalement éliminés par filtration glomérulaire (par exemple, les aminoglycosides). La demi-vie des aminoglycosides est prolongée chez les nouveau-nés avec moins que 34 semaines d'âge post-conception, et leur dose devrait être diminuée ou l'intervalle thérapeutique augmenté comparé aux nouveau-nés à terme.[9, 55]

À la naissance, les tubules rénaux sont anatomiquement et fonctionnellement immatures, ce qui compromet les capacités tubulaires rénales de sécrétion active et de réabsorption. Les facteurs affectant le développement de ces fonctions comprennent la croissance et l'augmentation de la masse tubulaire rénale, la maturation des systèmes de

transport rénaux et la redistribution du débit sanguin vers des zones sécrétoires. Un déséquilibre glomérulo-tubulaire fonctionnel en résulte et persiste jusqu'à ce que la maturation rénale soit complétée, autour de l'âge d'un an.[6] Chez les enfants et les adolescents, la capacité de sécrétion tubulaire peut dépasser celle des adultes. Ceci a été observé pour l'imipenem et la digoxine.[9, 56]

La réabsorption tubulaire est un phénomène généralement passif. Plus le médicament est liposoluble et non métabolisé, plus la réabsorption tubulaire devient importante. Le développement de la capacité de réabsorption tubulaire demeure inconnu.[9]

Pour les médicaments principalement éliminés inchangés dans l'urine par le rein, leur clairance chez les nouveau-nés et nourrissons est limitée par l'immaturation de la filtration glomérulaire et la sécrétion tubulaire. Cependant, pour les nourrissons plus âgés et les enfants, une clairance rénale plus rapide est observée comparativement aux adultes. Ceci a été observé surtout pour la digoxine, phénytoïne, carbamazépine, clindamycine, cimétidine, morphine, chlorpheniramine, cetirizine, etc.[9] En conséquence, des doses en mg/kg relativement plus élevées sont nécessaires pour atteindre les mêmes niveaux plasmatiques que les adultes. Ce ratio concentration-dose plus faible chez les enfants peut être dû à plusieurs phénomènes liés à la fonction rénale (augmentation de la capacité de sécrétion tubulaire) ou indépendant de la fonction rénale (liaison aux protéines plus faible, liaison tissulaire plus forte, augmentation du métabolisme hépatique). L'explication est parfois plus difficile à cause de la maladie sous-jacente chez les enfants.[9]

2 Généralités sur la modélisation pharmacocinétique

La pharmacocinétique est l'étude qualitative et quantitative du devenir du médicament dans l'organisme auquel il est administré. Elle permet de décrire les différentes étapes que subit le médicament depuis la libération de son principe actif jusqu'à sa disposition au site d'action ainsi qu'à son élimination sous forme inchangée ou de métabolites. La pharmacodynamie est l'étude de l'action exercée par les médicaments sur l'organisme, et en particulier leur mode d'action. La modélisation pharmacocinétique repose sur la description mathématique de l'évolution des concentrations plasmatiques et/ou tissulaires et de la relation pharmacocinétique-pharmacodynamie d'un médicament dans une population de patients.[57] Une définition encore plus large de ce domaine a été récemment suggérée et qui définit la pharmacométrie en tant que «branche de la science qui lie les modèles mathématiques de la biologie, la pharmacologie, la maladie et la physiologie pour décrire et mesurer les interactions entre le médicament et les patients, y compris les effets bénéfiques et les effets secondaires résultants de telles interfaces».[58] Cette dernière définition vise à accentuer le rapport avec d'autres disciplines telles que la pharmacologie clinique, les statistiques, l'informatique, et la pharmacologie pure, entre autres. En effet, la pharmacométrie est une discipline qui intègre plusieurs principes de différentes disciplines de la science quantitative avec un foyer important sur le développement de modèles prédictifs du médicament et de la maladie. Ces modèles ont plusieurs utilisations, mais la plus importante est probablement pour déterminer la dose optimale, la durée et le schéma thérapeutique, pour supporter le développement du médicament.

En pharmacométrie, les modèles sont des représentations simplifiées des différents systèmes de l'organisme. C'est cette simplification qui les rend utiles. Donc les modèles sont jugés par leur capacité à répondre à une question et non par le fait qu'ils soient vrais ou faux. Différents types de modèles existent :

- Les modèles pharmacocinétiques : ils décrivent la relation entre les concentrations des médicaments et le temps. Les modèles PK sont représentés

par des compartiments considérés homogènes dans leurs caractéristiques pharmacocinétiques. Les modèles mamillaires sont souvent représentés par un compartiment central (plasma) avec un ou plusieurs compartiments périphériques. En contraste, les modèles physiologiques utilisent un ou plusieurs compartiments pour représenter un organe. Les modèles PK sont basés sur les concentrations dans le sang ou le plasma. Les modèles physiologiques ont en plus besoin des concentrations dans les tissus, ou de paramètres déjà identifiés dans la littérature.

- Les modèles pharmacocinétiques/pharmacodynamiques : Ces modèles incluent une mesure de l'effet du médicament. Ces modèles sont importants pour faire le lien entre la PK et la réponse pharmacologique. Les paramètres pharmacodynamiques continus peuvent être représentés par des fonctions E_{max} . Les paramètres pharmacodynamiques catégoriques peuvent être représentés par des équations logistiques qui transforment la réponse en une probabilité. Les modèles exposition-réponse sont une autre classe des modèles pharmacocinétiques/pharmacodynamiques où la variable indépendante n'est pas le temps mais une variable qui décrit l'exposition du médicament à l'état d'équilibre (dose, aire sous la courbe, concentration maximale).
- Les modèles d'évolution des maladies (Disease progression models) : Ces modèles décrivent la progression d'une maladie, par le biais d'une mesure de marqueur, en fonction du temps. Ces modèles décrivent la variabilité interindividuelle dans la progression de la maladie et comment cette dernière est influencée par le traitement ou des covariables. Ces modèles peuvent être liés aux modèles PK pour déterminer si un médicament exerce un effet symptomatique ou affecte la progression de la maladie.
- La « Méta-analyse » : La méta-analyse est « l'analyse des analyses ». C'est donc l'analyse prospective de plusieurs données et résultats à partir de différentes études pour générer des sommaires des estimés. Elle est utilisée pour comparer l'efficacité ou la sécurité de nouveaux traitements par rapport à

d'autres, telle la comparaison aux produits concurrents. La méta-analyse peut aussi être utilisée dans des situations incluant des résultats mixtes (par exemple, quelques études montrent un effet alors que d'autres ne le montrent pas). Ces analyses peuvent décrire la pharmacodynamie ou l'évolution des maladies, et sont souvent utilisées durant le développement des médicaments pour prendre les décisions "go/no go". Enfin, la méta-analyse permet une meilleure précision en augmentant le nombre de cas étudiés et de tirer une conclusion globale.[59]

La pharmacométrie a le potentiel d'avoir un impact sur de multiples aspects de la santé par la prise de décisions basées sur l'analyse et la synthèse de données disponibles. L'importance de la pharmacométrie a été reconnue par les agences régulatrices, l'industrie pharmaceutique et le milieu académique. En conséquence, (i) l'industrie pharmaceutique incorpore la modélisation en tant qu'étape essentielle dans le processus de développement du médicament,[10, 60-63] (ii) les agences régulatrices acceptent, demandent et exécutent eux-mêmes leurs propres analyses pharmacométriques durant le processus d'évaluation de médicaments,[64-66] et (iii) plusieurs programmes gradués ont été ou sont en cours d'être établis dans différentes universités.[58, 67, 68]

Dans les essais de phase I réalisés habituellement chez le volontaire sain, les études de pharmacométrie permettent de décrire la relation concentration-réponse, de simuler pour déterminer le design de l'étude et choisir les doses pour évaluation ultérieure. Dans les essais de phase II réalisés chez le patient avec un nombre plus important de sujets, les études de pharmacométrie permettent d'identifier et de confirmer les covariables prédictives et de simuler pour déterminer le design de l'étude. Dans les essais de phase III, les études de pharmacométrie permettent de confirmer les covariables prédictives, les ajustements de dose et d'extrapoler à d'autres populations ou indications.

Ainsi, la pharmacométrie est concentrée sur le développement de modèles appropriés basés sur toute la connaissance disponible. Le but de la modélisation est d'estimer les paramètres PK et leur précision, et d'identifier les sources de variabilité au sein d'une

population de patients à partir de données riches ou éparses tout en considérant globalement les concentrations de tous les patients. Cependant, avant de modéliser, il faut répondre à la question si le besoin y existe. Dans certains cas, une simple analyse de PK non-compartimentale est suffisante.[57]

2.1 Méthode d'analyse classique en pharmacocinétique

Cette approche requiert moins d'hypothèses sur le modèle que celles pour l'analyse compartimentale mais nécessite de réaliser un nombre important de prélèvements. L'exposition d'un médicament dans l'organisme est représentée par l'aire sous la courbe ($ASC_{0-\infty}$) des concentrations plasmatiques. L' $ASC_{0-\infty}$ est la somme de l' ASC_{0-t} et de l'ASC extrapolée ($ASC_{t-\infty}$). L' ASC_{0-t} est calculée comme la somme des aires de chacun des trapèzes formés par deux concentrations à des temps consécutifs, entre les temps 0 et t.[57] L' $ASC_{t-\infty}$ extrapolée correspond à la dernière concentration plasmatique mesurée divisée par la constante de vitesse d'élimination terminale (k_e). Si la dernière observation dévie de la ligne de régression, l' $ASC_{t-\infty}$ extrapolée basée sur les concentrations observées serait erronée. Dans ce cas, il est conseillé de se baser sur les concentrations prédites. L' $ASC_{t-\infty}$ extrapolée par rapport à l' $ASC_{0-\infty}$ devrait idéalement être le plus petit possible. L' $ASC_{t-\infty}$ extrapolée ne devrait pas dépasser 20-25% de l' $ASC_{0-\infty}$. [57] La constante d'élimination terminale est estimée par régression sur les dernières log-concentrations observées (3 à 4 points). Le volume de distribution à l'équilibre et durant la phase terminale, la clairance, le temps de résidence moyen, et la demi-vie sont obtenus à partir de l'ASC, de la dose et de la constante d'élimination terminale. La concentration maximale (C_{max}) et le temps correspondant à C_{max} (t_{max}) sont visuellement déduits à partir des profils de concentrations plasmatiques observées. Des comparaisons statistiques des paramètres pharmacocinétiques peuvent être effectuées pour déterminer la différence entre différents groupes de patients. L'analyse se fait sur les paramètres log-transformés et des intervalles de confiance sont dérivées. Le même principe s'applique dans les études de bioéquivalence.[69]

Cette analyse est effectuée chez chaque sujet de l'étude séparément pour estimer les paramètres PK individuels. Cette méthode permet une estimation rapide et simple des paramètres PK pour une dose donnée. Cependant, la fiabilité repose sur la qualité, la quantité des données pour une bonne estimation de l'ASC et de k_e . Idéalement, un minimum de 3-4 demi-vies devrait être écoulées pour obtenir une estimation fiable de k_e . Il est aussi suggéré d'avoir 3-4 observations pour estimer k_e même si deux points sont suffisants pour faire passer une ligne. De plus, avec cette méthode il n'est pas possible de prédire les concentrations en fonction du temps, de caractériser la PK des principes actifs ayant une élimination non-linéaire ou de faire des corrélations PK/PD directes.

2.2 La pharmacocinétique de population

Ce concept a été introduit en 1972 par Sheiner et al.[70] Cette méthode permet d'analyser globalement un ensemble d'individus et peut être réalisée à partir de données riches et/ou éparses par individu. Cet aspect de la pharmacocinétique de population permet d'étudier la PK d'un médicament dans des populations spéciales comme les nouveau-nés, population gériatrique, cancer, où le nombre de prélèvements est limité pour des raisons éthiques et médicales.[71-76] Durant le développement des médicaments, les prélèvements sanguins sont riches et/ou épars pour les patients de la phase II alors qu'ils sont épars pour les patients de la phase III. La PKPOP permet d'utiliser ces données pour l'étude de la PK dans la population cible et pour la détermination de la relation entre la dose, l'exposition (concentration), et la réponse/effets indésirables.

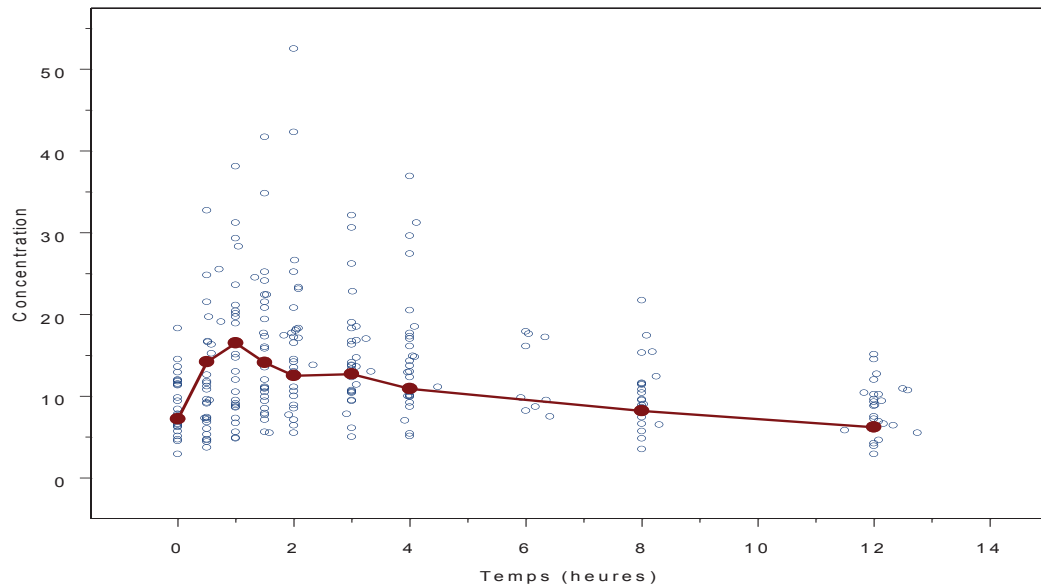
La principale particularité de l'approche de population réside dans le fait qu'elle permet d'analyser simultanément les données de l'ensemble des sujets d'une étude, en tenant compte de facteurs confondants, ou covariables, qui permettent d'expliquer une partie des différences entre sujets. Ce modèle statistique modélise simultanément les profils moyens dans la population et les variabilités interindividuelles, inter-occasion, intraindividuelles et résiduelles.

L'analyse de population requiert une excellente compréhension des modèles individuels et de population pour choisir l'analyse appropriée aux données collectées. Ainsi, le choix de la meilleure méthode d'analyse de population dépend à la fois de l'objectif de l'étude PK et du type de données collectées. Bien que plusieurs méthodes puissent être utilisées pour traiter ces modèles (l'approche de regroupement des données "Naïve pooled data", l'approche en deux étapes "Iterative two-stage"), l'approche optimale à une étape ou modèle non-linéaire à effets mixtes (Non-linear mixed-effect model) est la plus utilisée.

2.2.1 Approche de regroupement des données "Naïve pooled data"

Cette approche consiste à calculer la concentration moyenne à chaque temps d'observation et créer un profil moyen des concentrations au cours du temps afin d'obtenir un "individu moyen" (Figure 2-1). Toutes les doses et les observations sont mises ensemble comme si elles provenaient d'un seul individu. Ce profil moyen est utilisé pour estimer les paramètres PK. Aucune information n'est disponible sur les profils ou paramètres individuels. Cette approche est satisfaisante si les données sont riches et si peu de variabilité interindividuelle existe. Ceci est le cas des études animales mais est rarement vrai chez les humains. Elle devient problématique si des données sont manquantes pour certains individus, surtout dans les études observationnelles. Cette approche ne permet pas l'évaluation de la variabilité interindividuelle.[77] Le regroupement de données de différents patients peut produire une image modifiée de la réponse réelle.

Figure 2-1 Profil moyen des concentrations en fonction du temps

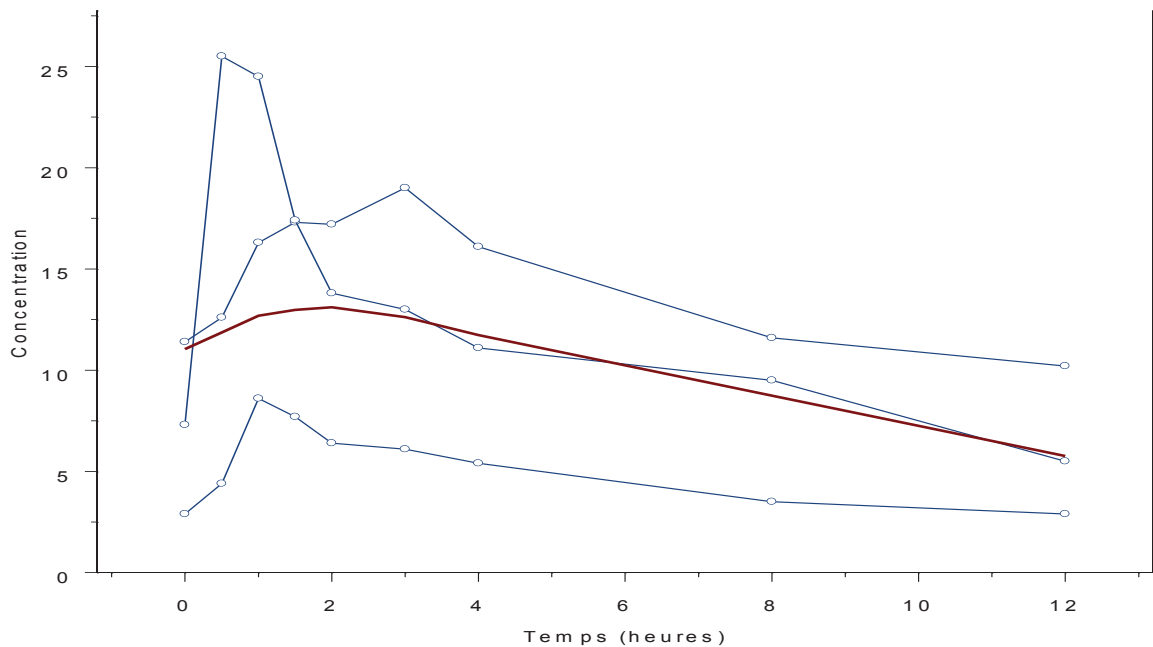


Les cercles vides représentent les concentrations observées, les cercles pleins représentent la concentration moyenne à chaque temps d'observation, et la ligne représente le profil moyen.

2.2.2 Approche en deux étapes “Iterative two-stage”

Les profils individuels des patients sont évalués séparément et les paramètres PK estimés. Ces paramètres individuels sont ensuite combinés pour estimer les paramètres PK de population (Figure 2-2). La variabilité interindividuelle des paramètres PK peut être calculée mais elle est souvent surestimée comme l'erreur sur l'estimation des paramètres individuels n'est pas quantifiée. Cette méthode peut être performée sur des données riches, limitées ou une combinaison des deux.[77]

Figure 2-2 Profils individuels et moyen des concentrations en fonction du temps



Les lignes bleues représentent les profils individuels et la ligne rouge représente le profil moyen.

2.2.3 Modèles non-linéaires à effets mixtes “Non-linear mixed-effect models”

Cette méthode consiste à analyser toutes les données (riches ou éparées) collectées chez tous les individus de l'étude en une seule étape. Quand les données sont riches, l'estimation des paramètres PK est semblable aux deux méthodes précédentes.

Les modèles mathématiques représentent un ensemble de relations mathématiques (équations) décrivant le système d'intérêt. Ces modèles peuvent être utilisés pour explorer la structure et le comportement du système sous différentes conditions. Ces relations sont le plus souvent décrites par des fonctions non-linéaires, d'où découle le nom de ces modèles “non-linéaires”.

Les études de pharmacocinétique regroupent d'habitude des volontaires sains sous des conditions strictes pour minimiser la variabilité interindividuelle et avoir une

population le plus homogène. Cependant, ces conditions strictes ne correspondent pas à l'utilisation réelle du médicament. Contrairement aux méthodes traditionnelles, la pharmacocinétique de population cherche à obtenir l'information PK pertinente pour la population visée par le médicament et reconnaître l'importance des sources de variabilité.[78]

La principale particularité de cette approche réside dans le fait qu'elle quantifie différents niveaux de variabilité pharmacocinétique tout en cherchant à expliquer ces sources de variabilités. Les sources de variabilité qui contribuent aux différences entre les prédictions et les résultats sont classées en variabilité interindividuelle et variabilité résiduelle. Donc, les paramètres du modèle sont traités comme des distributions et non pas comme des valeurs individuelles. La moyenne de cette distribution est la valeur typique du paramètre alors que la distribution est dérivée à partir des données et elle décrit la distribution des paramètres PK dans cette population.[79]

Une partie de la variabilité observée, variabilité interindividuelle, peut être expliquée par des facteurs ou covariables, tels que les données démographiques (WT, sexe, âge, race,...), environnementales (diète, cigarette,...), polymorphisme génétique (CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9,...), physiologiques ou pathophysiologiques (insuffisance hépatique, insuffisance rénale, grossesse,...), entre autres. Cependant, une partie de la variabilité interindividuelle ne peut être expliquée par aucune covariable. L'évaluation simultanée du profil moyen (paramètre typique) ainsi que de la variabilité aléatoire est nommée "effets mixtes". La magnitude de la variabilité aléatoire est importante car l'efficacité et la sécurité d'un médicament peuvent diminuer avec l'augmentation de cette variabilité inexpliquée. En plus de la variabilité interindividuelle, la variabilité des concentrations à l'état d'équilibre pour un même sujet est aussi importante. Les concentrations d'un sujet peuvent varier pour des raisons inexplicables d'un jour à l'autre ou d'une semaine à l'autre (variabilité inter-occasion), ou à cause des erreurs de mesure ou mis-spécification du modèle (variabilité résiduelle). L'estimation de ces types de variabilité est importante pour la surveillance des médicaments lors de l'utilisation de l'approche bayésienne empirique.[78]

De nombreux logiciels d'analyse et de simulation de pharmacocinétique de population ont été développés. NONMEM[®][79] est l'outil de modélisation le plus utilisé actuellement. Il existe aussi d'autres logiciels, tels que MONOLIX[®] (Lavielle et Mesa)[80], et NLME (Pinheiro).[81]

De manière générale, le modèle PK permettant d'estimer les paramètres PK d'un individu 'i' peut être écrit tel que:

$$C_{p_{ij}} = C(D_i, t_j, \theta_i) + \varepsilon_{ij}$$

$$\theta_i = (\theta_{i1}, \dots, \theta_{im})$$

où $C_{p_{ij}}$ est la concentration prédite au temps j (t_j) pour le patient i , D_i représente la dose du patient i , θ_i est le vecteur de m paramètres du patient i , et ε_{ij} est l'erreur résiduelle associée à la concentration j du patient i .

La variabilité interindividuelle (η_i) suit une loi gaussienne ayant une moyenne nulle et une variance Ω (ω^2) qui est une matrice définie positive:

$$\theta_{in} = \theta_{TVn} * \exp(\eta_{in})$$

$$(\eta_1, \dots, \eta_m) \sim N(0, \omega^2)$$

où θ_{TVn} est la valeur typique du paramètre PK n (par exemple, clairance), et η_{in} l'effet aléatoire sur le $n^{\text{ième}}$ paramètre PK du patient i .

La variance des erreurs résiduelles peut être constante et assume donc que la précision est égale pour toutes les mesures. Ceci est souvent le cas pour les modèles concentrations-effet. Dans certaines circonstances, l'erreur peut changer avec les différentes mesures et la variance est alors proportionnelle. L'erreur proportionnelle est utilisée si les mesures sont toujours positives et si leur précision diminue avec l'augmentation de la valeur de la mesure. Une combinaison des deux modèles d'erreur peut être utilisée pour améliorer la prédiction aux limites inférieures des essais où l'erreur est considérée constante, et une erreur proportionnelle.

Le but de l'étude PKPOP est d'estimer les valeurs des paramètres PK typiques, des effets aléatoires et des erreurs résiduelles afin que les concentrations prédites aient le maximum de vraisemblance avec les concentrations observées.

Dans les modèles non-linéaires à effets mixtes, la vraisemblance n'a pas de solution analytique. Plusieurs algorithmes d'estimation par maximum de vraisemblance spécifique ont donc été développés. Les premiers algorithmes étaient basés sur une linéarisation du modèle au premier ordre autour des effets fixes comme dans l'algorithme First-Order (FO)[70] ou autour des effets aléatoires comme dans l'algorithme First-Order Conditional Estimation (FOCE)[82] ce qui permet de se ramener à un modèle linéaire mixte dont la fonction de vraisemblance a une forme explicite. Par la suite, une méthode d'estimation où la vraisemblance est calculée par une approximation de Laplace a été proposée. Récemment, l'algorithme Maximum Likelihood Expectation Maximization (EM) a été développé.[83] Contrairement aux algorithmes FO et FOCE, cette méthode d'estimation exacte ne requiert pas la linéarisation des équations non-linéaires. L'étape d'estimation se décompose en une estimation de paramètres individuels suivie de la maximisation qui permet d'obtenir de nouvelles valeurs des paramètres, réutilisés à la première étape de l'itération suivante jusqu'à convergence de l'algorithme.

Les différentes étapes de l'analyse de population consistent en l'identification du modèle de base, du modèle stochastique pour quantifier les variabilités, et enfin du modèle avec les covariables pour décrire les relations entre les paramètres PK et les covariables mesurées.

- **Modèle de base:** il décrit la tendance centrale des données. Un certain nombre de modèles peuvent être essayés selon le cas étudié. Par exemple, un-, deux-, trois-compartiments avec absorption d'ordre zéro et/ou premier, et une élimination linéaire ou non linéaire. Des modèles plus complexes d'absorption ou d'élimination existent. Le choix des uns ou des autres découle des données disponibles et de l'objectif de l'étude. Avant de choisir le modèle de base, une étude exploratoire des données s'avère importante. Elle permet d'examiner les

données et d'avoir une idée de leur structure. Cette analyse permet d'identifier les valeurs aberrantes, la corrélation entre les variables et leur distribution. Ceci est important car la plupart des modèles sont basés sur des hypothèses sur les distributions sous-jacentes. Les représentations graphiques des données permettent d'accomplir l'étape de l'exploration des données.

- **Modèle stochastique:** les variabilités sur les paramètres PK peuvent être de nature interindividuelle, résiduelle, et parfois inter-occasionnelle.[79]

La variabilité interindividuelle: Elle quantifie l'écart entre un paramètre typique d'une population et celui d'un individu. Cette variabilité peut être liée à des facteurs démographiques (âge, sexe, race, etc.), environnementaux (diète, etc.), génétiques (phénotype d'une voie métabolique), facteurs fonctionnels (maladie concomitante, insuffisance rénale ou hépatique...), facteurs biologiques ou chronobiologiques. Ces différents facteurs sont appelés covariables et sont à l'origine d'une variation des paramètres pharmacocinétiques entre individus ou, parfois même, chez un même individu au cours du traitement.

La variabilité résiduelle: Elle fait référence à la variabilité non expliquée d'un paramètre associée par exemple aux erreurs de mesure (variabilité due aux méthodes analytiques, à l'imprécision des temps de prélèvements...), erreurs du modèle, entre autres. Elle quantifie l'écart entre la valeur prédite par le modèle et la valeur observée pour un individu.

Il est aussi possible de considérer une variabilité intraindividuelle (ou variabilité inter-occasionnelle) qui quantifie l'écart des valeurs des paramètres PK d'un même individu au cours du temps.

- **Analyse de covariable:** L'identification des covariables qui peuvent expliquer les variabilités interindividuelles des paramètres PK, permet d'individualiser les posologies.

Lors de l'analyse compartimentale, le choix du meilleur modèle repose sur des considérations visuelles et statistiques. La qualité de l'ajustement entre les concentrations

prédites et les concentrations observées est estimée par la valeur de la fonction objective (OFV) qui est égale à $-2 \cdot \log(\text{vraisemblance})$. En utilisant la même méthode d'estimation avec la distribution χ^2 et pour un degré de liberté (modèles hiérarchiques), une diminution de OFV de 3.84 et 10.8 témoigne d'une différence significative avec $p=0.05$ et 0.01 , respectivement. Dans certaines situations spéciales comme un petit nombre d'individus, les conditions asymptotiques ne sont pas réalisées et le test de rapport de vraisemblance n'est plus valide. On pourrait alors utiliser des tests de permutations ou autres distributions de la différence de $-2 \log\text{-likelihood}$ ($-2LL$). [84] La qualité de l'ajustement du modèle est déterminée aussi par une distribution homogène des résidus en fonction du temps et des prédictions, une faible erreur résiduelle du modèle et une bonne précision de l'estimation des paramètres PK.

La dernière étape de la modélisation PK est l'évaluation qui permet de juger la stabilité du modèle choisi, ses performances de simulation et sa capacité à répondre aux buts initiaux de la modélisation. Cependant, les modèles qui échouent la validation sont considérés descriptifs et servent à décrire les données utilisées pour les développer. Utiliser le modèle pour simuler des données permet d'évaluer le modèle et de faire des inférences. Pour faire des inférences, le modèle est utilisé pour simuler des données autres que celles utilisées pour développer le modèle. L'interpolation implique la simulation des données dans les limites des données initiales alors que l'extrapolation implique la simulation des données à l'extérieur de ces limites. Une application importante des simulations est la simulation des études cliniques. La simulation permet de déterminer la dose appropriée pour les études «First-in-Humans», de choisir les doses pour les étapes ultérieures, de déterminer le nombre de sujets, le nombre d'échantillons et les temps de prélèvements. La gamme des outils de validation est large. Le «non-parametric bootstrap» et le «predictive check» sont parmi les outils d'évaluation les plus fréquemment utilisés.

Le «non-parametric bootstrap» est une technique statistique qui permet d'évaluer la stabilité du modèle [85] ainsi que de déterminer la précision et les erreurs standards des paramètres. [86] Elle consiste à re-échantillonner un grand nombre de fois l'échantillon

initial qui a été réellement prélevé dans la population, l'inférence statistique étant basée sur les résultats des échantillons ainsi obtenus. La technique de bootstrap est itérative. La première étape consiste à tirer aléatoirement avec remise $n-1$ individus parmi les n formant l'échantillon initial. A chaque tirage, chaque individu possède une même probabilité de figurer dans l'échantillon de bootstrap égale à $1/n$. La seconde étape consiste à calculer la moyenne empirique sur l'échantillon de bootstrap. Ces deux étapes sont ensuite répétées un grand nombre de fois, typiquement 1000 et plus (N). Les N moyennes empiriques fournissent alors une approximation de la distribution de la vraie moyenne, dont la valeur estimée correspond à la moyenne empirique des N moyennes issues des échantillons de bootstrap. L'estimateur ainsi obtenu est alors plus robuste que la moyenne empirique sur l'échantillon initial. Les distributions statistiques des paramètres estimés dans le modèle initial et dans les échantillons bootstrapés (donc N jeux de valeurs) sont comparées. Le biais sur chaque paramètre est calculé en faisant la différence entre la valeur obtenue par le modèle final et celle obtenue par le bootstrap. Si le biais est faible le modèle est dit robuste aux variations aléatoires des données.

La technique qui permet d'évaluer la capacité du modèle à simuler est la méthode appelée « predictive check ».[87] Cette méthode consiste à simuler un grand nombre de données aléatoirement à partir du modèle établi et à comparer les simulations aux données observées. Ceci peut se faire sur les concentrations plasmatiques ou sur un paramètre pharmacocinétique particulier. On trace un intervalle de prédiction d'une taille donnée (souvent 90%) dans lequel on s'attend à trouver 90% des observations; on compare ensuite avec les observations réalisées.[88] Ces graphiques permettent de détecter des zones où le modèle ne reproduit pas correctement les données et de suggérer des améliorations possibles.

D'autres méthodes qui normalisent et standardisent les concentrations observées sont aussi possibles comme le «normalised prediction distribution errors» et le «standardized visual predictive check».[89, 90]

2.3 Estimateur Bayésien

La méthode d'estimation Bayésienne permet d'utiliser un modèle pharmacocinétique de population (information *a priori*) et quelques valeurs de concentrations obtenues chez le patient ainsi que, parfois, des informations relatives à l'individu (covariables significatives dans le modèle de population). Elle a pour objectif de déterminer les valeurs de paramètres PK et ensuite prédire les concentrations plasmatiques. Ce modèle sert de base pour développer un estimateur Bayésien, capable d'évaluer les paramètres pharmacocinétiques individuels du médicament et l'exposition à ce médicament (ASC) avec stratégie de prélèvements limités. Le but des stratégies de prélèvements limités est de déterminer le design qui permet de collecter les données les plus informatives pour un modèle et pour l'estimation de ses paramètres à partir de nouvelles études. L'approche générale implique le calcul de la «Fisher information matrix». Pour les modèles non-linéaires, cette matrice peut être calculée analytiquement en fournissant un modèle, un ensemble de paramètres et un design candidat. L'inverse de la matrice est un estimé de la matrice de covariance. Les racines carrées des éléments diagonaux de la matrice de covariance sont les erreurs standards des estimés des paramètres. Le design optimal est celui qui maximise le déterminant de la matrice Fisher et donc donne les plus faibles erreurs standards (<20%). Le design optimal n'est pas nécessairement le design le plus désiré pour l'application clinique. Parfois, il faut ajuster les designs pour qu'ils soient utiles en clinique.

2.4 La pharmacocinétique de population chez les enfants

Les soucis éthiques concernant les enfants ont limité la collection de données chez cette population. L'utilisation des données de STP chez les enfants a permis la réalisation des premières études de population.[91]

La flexibilité des temps de prélèvement pour les méthodes de population a facilité les études chez les enfants. Des intervalles de prélèvements peuvent être définis à la place de temps de prélèvements fixes par l'utilisation de l'information *a priori* et «Fisher

information Matrix». [92] Malheureusement, les enfants ou leurs parents peuvent refuser les prélèvements répétitifs. Cependant, les données manquantes peuvent toujours être utilisées dans une étude de population pédiatrique.

Les simulations basées sur les paramètres PK et les variabilités estimées permettent d'améliorer les études en pédiatrie. Le choix des doses pour les études cliniques peut être fait par les simulations (clinical trial simulations).

Les enfants sont différents des adultes par deux aspects principalement: la croissance et le développement. Ces aspects propres aux enfants sont à prendre en considération lors de la modélisation.

- Ajustement de mesure anthropométrique: l'étendue de poids chez les enfants est très large par rapport aux adultes. L'utilisation du poids plutôt que la surface corporelle demeure un sujet controversé. Mais ce qui est sûr c'est que la relation de la mesure anthropométrique avec les paramètres PK n'est pas linéaire mais allométrique. [21, 93]
- Effet de l'âge: la maturation des fonctions rénales et hépatiques dépend de l'âge. Elles commencent à l'âge foetal et continuent après la naissance. Ceci a un effet sur la clairance chez les enfants. [9, 94] La fraction d'eau corporelle et les concentrations des protéines (albumine, globuline, lipoprotéine, glycoprotéine) changent durant les premières années de vie de l'enfant et affectent le volume de distribution des médicaments. [95]

Le respect des aspects particuliers en pédiatrie améliore la compréhension du développement des médicaments et permet une utilisation plus efficace des médicaments.

3 Généralités sur la pharmacogénétique

La pharmacogénétique s'intéresse à la relation entre les variations des gènes codants pour des protéines impliquées dans l'absorption, la distribution, le métabolisme, l'élimination (single nucleotide polymorphisms) et les effets associés sur la pharmacocinétique ou la pharmacodynamie de médicaments.[96] La présence de différentes formes alléliques aboutit à l'existence de génotypes homozygotes (deux copies du même allèle) et hétérozygotes (deux allèles différents). Le phénotype résulte de l'interaction des 2 allèles, d'une manière additive (les hétérozygotes ayant un phénotype à mi-chemin des homozygotes) ou multiplicative. Dans le cas le plus simple, un allèle, dit allèle dominant, peut complètement masquer l'effet des autres, dits allèles récessifs.

Dans les essais de phase I réalisés habituellement chez le volontaire sain, les études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques permettent de déterminer la dose maximale tolérée. Dans les essais de phase II réalisées chez le patient avec un nombre plus important de sujets, les études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques permettent d'évaluer l'efficacité et l'influence de covariables sur la relation dose-réponse. Les études pharmacogénétiques dans ces premières phases du développement permettent d'évaluer, pour des protéines clés, l'impact de polymorphismes génétiques sur la réponse au médicament et le cas échéant d'influer sur la sélection des patients dans les essais de phase III. Ces dernières sont des étapes clés du développement du médicament qui impliquent de très larges effectifs. A ce stade, les études pharmacogénétiques permettent de considérer un plus grand nombre de polymorphismes et de quantifier la part de la variabilité interindividuelle associée à ces polymorphismes. Après la mise sur le marché, les études pharmacogénétiques permettent d'améliorer la compréhension de la relation entre l'efficacité et/ou la toxicité du médicament et les polymorphismes.

La pharmacogénétique apporte au clinicien un nouvel outil potentiel permettant la prise de décisions thérapeutiques rationnelles se basant sur des spécificités individuelles. Dans le domaine de la transplantation, les principales études réalisées ces dernières années se sont

intéressées aux inhibiteurs de la calcineurine, en raison de la découverte de polymorphismes au niveau des gènes codant pour les CYP3A4/5 et la P-gp. Ces études se justifient d'autant plus que ces agents présentent une grande variabilité pharmacocinétique ainsi que des marges thérapeutiques étroites, rendant leur utilisation clinique délicate, malgré un suivi régulier des concentrations sanguines. Toutes les enzymes intervenant dans le métabolisme des médicaments sont génétiquement régulées. On cite les CYP450 (enzymes de métabolisme de phase 1), les glutathion-S-transférases, les uridine diphosphate-glucuronosyltransférases (enzymes de métabolisme de phase 2) et enfin les transporteurs avec la P-gp (transporteur d'efflux), la protéine MRP2 (transporteur d'efflux), les OATPs (transporteurs d'influx). Aucun polymorphisme de la P-gp ne résulte en une perte totale d'expression ou de fonction de la P-gp mais certains polymorphismes sont susceptibles d'expliquer une partie de la variabilité interindividuelle de sa capacité de transport. Dans cette section, nous aborderons surtout le polymorphisme des enzymes impliquées dans le métabolisme du busulfan, du voriconazole et du tacrolimus.

3.1 Pharmacogénétique du CYP3A

Le CYP3A4 est l'isoenzyme la plus abondante dans le foie et les intestins. Elle est responsable du métabolisme de 50-60% des médicaments couramment prescrits, incluant dans le domaine de la transplantation le voriconazole et le tacrolimus.[97] Le CYP3A5, qui partage un profil de substrats assez semblable au CYP3A4, n'est exprimé que dans une minorité de la population.[98]

Il existe une grande variabilité interindividuelle au niveau de l'expression et de l'activité catalytique du CYP3A4. Cette variabilité est caractérisée par une distribution de type unimodale, suggérant la contribution de multiples facteurs génétiques, physiologiques et environnementaux.[99] L'allèle sauvage est dénommé CYP3A4*1. La fréquence de la plupart des variantes alléliques est faible et la majorité d'entre eux ne semblent pas être associés à des modifications de l'expression de ce cytochrome. L'allèle muté le plus connu

est appelé CYP3A4*1B. La fréquence de cette allèle varie selon les ethnies, elle est de 0% chez les Asiatiques, 2-10% chez les Caucasiens et 35-67% chez les Africains-américains.[100] L'allèle CYP3A4*1B a été associé à une augmentation de la transcription du gène *in vitro*,[101] mais ces observations n'ont pas été confirmées par d'autres investigateurs.[102, 103]

L'expression du CYP3A5 suit une distribution de type bimodale, indiquant la présence d'un polymorphisme génétique classique. L'allèle sauvage est appelé CYP3A5*1. L'allèle muté, le plus fréquent, dénommé CYP3A5*3, conduit à la formation d'un ARNm aberrant. Au moins un allèle sauvage CYP3A5*1 est requis pour exprimer ce cytochrome, tandis que le génotype homozygote muté CYP3A5*3/*3 conduit à une absence de son expression.[2, 104] L'allèle muté est nettement plus fréquent que l'allèle sauvage, soit 85-95% chez les Caucasiens, 65-85% chez les Asiatiques et 27-55% chez les Africains-américains, indiquant qu'une majorité d'individus n'expriment pas de CYP3A5 parmi ces populations. Un autre polymorphisme plus rare a également été identifié au niveau du gène CYP3A5 (allèle CYP3A5*6) mais qui n'est pratiquement pas observé chez les Caucasiens et Asiatiques, mais est plus fréquemment rencontré chez les Africains-américains (13%).[2]

3.2 Pharmacogénétique du CYP2C

Le CYP2C19 est en termes d'abondance, une isoenzyme relativement mineure où elle contribue pour moins de 5% des CYP450s hépatiques totaux. La réaction classiquement associée à l'activité du CYP2C19 est l'hydroxylation de la S-méphénytoïne. Le CYP2C19 est une enzyme hépatique impliquée dans le métabolisme de quelques médicaments, incluant dans le domaine de la transplantation le voriconazole. Il existe 3 principaux polymorphismes génétiques, le variant CYP2C19*2, le variant CYP2C19*3 et le variant CYP2C19*17. Les individus définis comme déficients en CYP2C19 sont porteurs de deux variantes alléliques. La diminution d'activité du CYP2C19 apparaît plus commune auprès des orientaux que des européens. La fréquence des métaboliseurs lents chez les Caucasiens

est de 2.2% avec absence de l'enzyme.[105] Les allèles CYP2C19*2 et CYP2C19*3 sont responsables de la majorité des allèles retrouvés chez les métaboliseurs lents; chez les asiatiques, le CYP2C19*3 est particulièrement présent.[106]

Parmi les membres de la sous-famille CYP2C, le CYP2C9 est le plus hautement exprimé dans le tissu hépatique. Cette isoenzyme est probablement la seconde en importance en termes d'expression protéique hépatique après le CYP3A4. Le CYP2C9 est une enzyme hépatique impliquée dans le métabolisme de plusieurs médicaments, incluant dans le domaine de la transplantation le voriconazole. Il existe deux principaux polymorphismes génétiques à l'origine d'une diminution de l'activité enzymatique définissant l'existence de métaboliseurs lents (2 allèles mutés) ou rapides (1 ou 2 allèles fonctionnels). Les métaboliseurs lents (CYP2C9*2 et CYP2C9*3) sont très rares (< 1% des Caucasiens).[107]

3.3 Pharmacogénétique des glutathion-S-transférases

Le glutathion-S-transférase (GST) comprend plusieurs isoenzymes dont principalement : mu (GSTM), theta (GSTT), pi (GSTP), et alpha (GSTA). Les GSTM1, GSTT1, GSTP1 et GSTA1 présentent des polymorphismes qui résultent en une réduction ou absence de l'activité ou de l'expression de l'enzyme.[108] Les polymorphismes du GSTM1 et GSTT1 (null genotype), GSTP1, et GSTA1 existent chez 23 – 62%, 10 – 64%, 4 - 12%, et 2 - 14% de la population, respectivement.[109-111]

4 Généralités sur le busulfan

Le busulfan (diméthyl-sulfonyl-1,4-diméthane) est un agent alkylant généralement utilisé en combinaison avec d'autres agents de chimiothérapie (cyclophosphamide) dans le cadre du conditionnement pré-greffe des cellules souches hématopoïétiques. Le busulfan est utilisé comme substitut à l'irradiation corporelle car cette dernière provoque de sérieux effets indésirables chez l'enfant parmi lesquels: retard de croissance, hypothyroïdie, et cataracte.[112-114]

Le busulfan, à forte dose, induit la mort cellulaire en alkylant les acides nucléiques pour inhiber la transcription et la réplication des régions d'ADN concernées.[115] Le caractère lipophile du busulfan lui confère sa forte myélotoxicité.

Le busulfan était initialement disponible juste sous forme orale. En 1999, la FDA a approuvé la formulation intraveineuse.

4.1 Pharmacocinétique du busulfan

La PK du busulfan présente une grande variabilité interindividuelle surtout chez les enfants. Plusieurs études ont décrit les paramètres PK de cette molécule.

4.1.1 Absorption

Le busulfan est rapidement absorbé après administration orale. La concentration maximale est atteinte entre 1.5 et 2.5 heures.

La biodisponibilité du busulfan est très variable, surtout chez les enfants.[116] Elle est estimée entre 22% et 120%, chez les enfants de 1.5 à 6 ans. Chez les patients de 13 à 60 ans, la biodisponibilité varie de 47% à 103%.[117] Cette grande variabilité est liée en partie à la forme d'administration (comprimés, comprimés écrasés et mis en solution ou

administrés avec de la compote ou du jus de fruits) ainsi qu'à l'administration concomitante avec les aliments.

L'absorption du busulfan a été décrite par un modèle d'ordre zéro[118] ainsi que par un modèle de premier ordre.[119, 120] Certains patients expérimentent une absorption retardée ou une élimination prolongée.[118]

4.1.2 Distribution

Le busulfan est faiblement lié aux protéines plasmatiques. Moins que 5% du busulfan est réversiblement lié aux protéines plasmatiques alors que 30% sont irréversiblement liés.[121]

La pharmacocinétique du busulfan suit un modèle mono-compartimental. Après injection intraveineuse, le volume de distribution correspond au compartiment aqueux de l'organisme, et la différence entre les adultes et les enfants correspond exactement à celle rapportée pour le volume d'eau totale. Ceci peut indiquer que malgré le caractère très lipophile du busulfan, il se distribue dans l'eau totale.[117, 118] Le volume de distribution du busulfan oral est plus élevé chez les enfants que chez les adultes.[122]

Le busulfan, à fortes doses, se distribue dans le liquide céphalo-rachidien ce qui explique sa toxicité au niveau du système nerveux central.[116, 118]

4.1.3 Élimination

Le busulfan est métabolisé principalement par conjugaison au glutathion. Cette réaction est catalysée par les glutathion-S-transférases hépatiques. Aucun des métabolites ne semble contribuer significativement à l'efficacité et à la toxicité. Les métabolites sont éliminés par voie rénale alors que la molécule mère est éliminée par voie biliaire.

GSTA1-1 est l'isoforme prédominante qui catalyse la conjugaison du busulfan avec le glutathion.[123] Ainsi, l'extraction pré-systémique du busulfan résulte en une biodisponibilité diminuée et variable en fonction de la capacité métabolique du foie. Plusieurs polymorphismes ont été identifiés au niveau de la GSTA1. Cependant, les résultats sont contradictoires sur la relation entre ces polymorphismes génétiques et la clairance du busulfan.[124-128]

La clairance moyenne du busulfan (normalisée au poids corporel total) chez les enfants a été estimée à 3.62 ml/min/kg. Cette valeur est plus élevée que celle observée chez les adultes de la même population. La différence n'est pas significative quand la clairance est normalisée à la surface corporelle.[116]

La variabilité interindividuelle au niveau de la clairance affecte l'exposition systémique du busulfan et impacte les résultats cliniques. Cette variabilité peut être expliquée par plusieurs facteurs: âge, pathologie, biodisponibilité, fonction hépatique et rythme circadien.[116, 117, 129, 130]

4.2 Interactions médicamenteuses

L'association du busulfan avec la phénytoïne doit être utilisée avec précaution: La phénytoïne induit le métabolisme du busulfan et diminue son exposition systémique.[116, 131] Une majoration de la neurotoxicité a été décrite pour le busulfan en association avec la phénytoïne. Le mécanisme semble être une augmentation du métabolisme hépatique, avec formation de métabolites toxiques. De l'autre côté, des concentrations sous-thérapeutiques de la phénytoïne ont été observées lorsqu'elle est administrée avec le busulfan. [116, 131] Par contre, dans la pratique clinique, la phénytoïne est parfois administrée pour prévenir les épilepsies causées par le busulfan. Cette combinaison est accompagnée de STP des 2 molécules.

L'association du busulfan avec le vaccin contre la fièvre jaune est contre-indiquée: risque de maladie vaccinale généralisée mortelle.

Certaines associations sont déconseillées comme avec l'itraconazole : réduction de la clairance du busulfan de 20 %.

L'acétaminophène peut diminuer les taux de glutathion dans le sang et les tissus, et par conséquent diminuer la clairance du busulfan.

D'autres associations sont à prendre en compte comme avec la cyclosporine ou le tacrolimus: Immunodépression excessive avec risque de lymphoprolifération.

4.3 Pharmacocinétique de population du busulfan

Plusieurs études de pharmacocinétique de population du busulfan ont été publiées. Ces études permettent l'identification de variables influençant la PK du busulfan et permettent en conséquence l'individualisation des posologies. Un résumé des études et des paramètres PK du busulfan en greffe hématopoïétiques est présenté dans le Tableau 4-1.

Tableau 4-1 Résumé des paramètres PK du busulfan chez les enfants greffés du foie

Référence	n	Âge (années)	Paramètres Pharmacocinétiques	BSV CL (%)	BSV V (%)
Tram et al.[132]	94	0.4-18.8	Modèle avec BSA: CL = 4.2 (l/h/m ²) Modèle avec WT allométrique: CL = 4.1 (l/h/kg ^{0.75}) V = 18.4 (l/kg) F = 93 – 99 (%)		
Nguyen et al.[133]	24	0.45-16.7	CL = 4.57 + 2.97*(LOG(WT) - 3) (l/h) V ~ WT	19	12
Zwaveling et al.[125]	77	0.2-23	CL = 4.8*(WT/19) ^{0.84} V = 15*(WT/19) ^{0.98}	24	28
Johnson et al.[126]	29	0.08-18.3	Age ≤ 4 ans : CL = 0.288* WT (l/h) Age > 4 ans : CL = 0.173* WT (l/h) GSTA1*B: CL *0.704 (l/h) V = 0.682* WT (l)	24.7	11.1
Booth et al.[134]	24	--	CL = 4.04 *(WT/20) ^{0.742} (l/h) V = 12.8*(WT/20) ^{0.843} (l)	23	10.9
Nakamura et al.[135]	103	0.2-11	CL/F = 3.25*(AGE/18) ^{0.376} *(AST/29) ^{-0.161} *0.787 ^{DIS} (l/h) V/F = 9.07*(1+0.0736*(WT-10)) (l)	31.2	13.6
Schiltmeyer et al.[136]	48	0.4-18.1	CL/F = 4.13*BSA (l/h/m ²) V/F = 21.3*BSA (l/m ²)	26	31

AST = alanine aminotransférase; BSA = surface corporelle; BSV = variabilité interindividuelle; CL = clairance systémique; CL/F = clairance orale apparente; DIS = maladie maligne (oui=1, non=0); F = biodisponibilité; GSTA1*B = génotype de la glutathion-S-transférase; n = nombre de patients; V = volume de distribution; WT = poids corporel.

L'Agence européenne des médicaments (EMA) recommande pour le busulfan intraveineux un dosage en fonction du poids, avec 5 groupes définis selon Nguyen, et comprend: (i) 1 mg/kg pour les patients <9 kg; (ii) 1.2 mg/kg pour les patients 9 à <16 kg, (iii) 1.1 mg/kg pour les patients 16 à <23 kg; (iv) 0.95 mg/kg pour les patients 23 à <34 kg, et (v) 0.8 mg/kg pour les patients > 34 kg.[137, 138] Ces recommandations basées sur le poids sont appuyées par plusieurs études de POPPK.[125, 126, 133, 134] En revanche, des études chez l'enfant ont montré que les valeurs de l'ASC similaires à ceux observés chez les adultes peuvent être réalisées lorsque le busulfan est dosé selon la surface corporelle.[132, 136] De plus, l'effet du polymorphisme de la GST demeure controversé comme le montrent plusieurs études.[125, 126, 132, 139] Tous ces résultats montrent que plus d'études sont nécessaires pour confirmer les paramètres impliqués dans la cinétique du busulfan.

5 Généralités sur le voriconazole

Le voriconazole est un nouvel antifongique triazole à large spectre. Il est utilisé comme traitement de première ligne pour l'aspergillose invasive et d'autres infections fongiques graves.

Le voriconazole produit une inhibition sélective du 14 α -stérol déméthylase (enzyme dépendante du CYP450 fongique, CYP450 14DM) duquel dépend la synthèse de l'ergostérol. L'ergostérol est un élément essentiel de la membrane cellulaire fongique, qui régule sa fluidité, sa perméabilité, ainsi que l'activité des enzymes s'y attachant.[140] L'inhibition de la 14 α -stérol déméthylase produit une déplétion de l'ergostérol puis l'interruption de l'intégrité et de la fonction de la membrane cellulaire fongique et une accumulation de précurseurs stérols toxiques.[141]

Des études *in vitro* ont démontré une activité du voriconazole contre les *Candida* spp, incluant *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida neoformans*, *Candida parapsilosis*, et *Candida tropicalis*. [142]

Le voriconazole a montré une activité fongicide contre les espèces suivantes : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium prolificans*. [142]

Le voriconazole est disponible en fiole pour administration intraveineuse (fiole de 200 mg) et en comprimés pour administration orale (50 et 200 mg).

5.1 Pharmacocinétique du voriconazole

La pharmacocinétique du voriconazole a été étudiée après administrations IV, orale et IV-à-orale chez des sujets en bonne santé [143-145] ainsi que chez des patients à risque d'infections fongiques. [146] Une grande variabilité inter- et intraindividuelle dans les

concentrations plasmatiques du voriconazole existe quelle que soit la forme d'administration et la population.[143, 147, 148]

Une exposition faible au voriconazole est associée à un échec thérapeutique chez les patients atteints d'une aspergillose, alors qu'une exposition élevée est associée à une augmentation du risque de toxicités oculaires et des encéphalopathies.[147, 149, 150] Le suivi thérapeutique pharmacologique est actuellement pratiqué pour optimiser les thérapies avec voriconazole. L'ASC est le paramètre PK le plus utilisé pour caractériser l'exposition totale au médicament.

5.1.1 Absorption

Le voriconazole est rapidement absorbé après administration orale et la concentration maximale est atteinte en 2 heures.[143] La biodisponibilité du voriconazole est estimée à plus que 90% et n'est pas affectée par le pH gastrique. Cette biodisponibilité élevée permet le passage de la forme IV à la forme orale chez les patients.

5.1.2 Distribution

Le voriconazole se lie à 58% aux protéines plasmatiques.[151] Il a un grand volume de distribution ce qui suggère une distribution dans les compartiments intra- et extracellulaires. Le volume de distribution du voriconazole à l'état d'équilibre est de 4.6 L/kg.[144]

5.1.3 Élimination

Le voriconazole est éliminé par métabolisme : moins que 2% d'une dose intraveineuse sont éliminés sous forme inchangée dans les urines. Il est métabolisé par N-oxydation dans le foie par le CYP2C19, majoritairement, et à moindre taux par les

CYP3A4 et CYP2C9. Le voriconazole est transformé en 8 métabolites avec le N-oxide qui y compte pour 72%, formé par les cytochromes hépatiques.[7, 71, 152]

Le polymorphisme génétique du CYP2C19 peut être lié à une partie de la variabilité interindividuelle du voriconazole. Des métaboliseurs lents et rapides du voriconazole peuvent être identifiés.[71] Les mutations du CYP3A4 ont été rapportées. L'allèle CYP3A4*1B a été associé à une augmentation de la transcription du gène *in vitro*.[101] mais ces observations n'ont pas été confirmées par d'autres investigateurs qui n'ont pas observé de modifications au niveau de l'expression de la protéine ou de son activité enzymatique.[102, 103] Ces polymorphismes sont donc rares et considérés avoir peu d'impact sur la clairance des substrats du CYP3A4.[100] Comme le voriconazole est peu métabolisé par le CYP2C9, il est peu affecté par son polymorphisme. De plus, les métaboliseurs lents (CYP2C9*2 et CYP2C9*3) sont très rares (< 1% des Caucasiens).[107]

La clairance moyenne a été estimée entre 13 et 36 L/h après administration intraveineuse d'une dose de maintien de 3mg/kg.[153]

Comme le voriconazole est éliminé principalement par métabolisme, il est possible qu'une saturation de la clairance métabolique soit la cause de non-linéarité dans sa cinétique.[154]

5.2 Interactions médicamenteuses

Le voriconazole est principalement métabolisé par les CYP2C19 et CYP3A4. Les inhibiteurs ou inducteurs de ces 2 derniers enzymes sont supposés affecter la cinétique du voriconazole. D'un autre côté, en considérant ses congénères (miconazole, fluconazole, ketoconazole et itraconazole), le voriconazole a le potentiel de modifier la cinétique des médicaments coadministrés.

- i) Médicaments qui affectent le métabolisme du voriconazole et diminuent sa concentration:

Les inducteurs des enzymes CYP2C19 et CYP3A4 causent une diminution de la concentration de voriconazole. Parmi ces médicaments on cite : rifampicine, rifabutine, phénytoïne, carbamazépine.[142]

- ii) Médicaments dont le métabolisme est affecté par le voriconazole

Le potentiel du voriconazole à inhiber ou induire l'activité des enzymes CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 et du P-gp n'a pas été élucidée. Cependant le voriconazole augmente la concentration de plusieurs médicaments même si le mécanisme d'interaction n'est pas rapporté. Il est contre indiqué d'administrer le voriconazole avec le sirolimus et les alcaloïdes d'ergot à cause d'une possibilité d'ergotisme. Des torsades de pointe et prolongation de l'intervalle QT peuvent être provoqués lors de l'administration avec la quinidine et pimozide.[142] D'autres interactions sont possibles avec les médicaments pour HIV, cyclosporine, oméprazole, entre autres. De plus, le voriconazole augmente les concentrations de la rifabutine et phénytoïne ce qui nécessite un suivi thérapeutique de ces médicaments.[142]

5.3 Pharmacocinétique de population du voriconazole

Peu d'études de pharmacocinétique de population du voriconazole ont été publiées. Un résumé des études et des paramètres PK du voriconazole chez les enfants est présenté dans le Tableau 5-1.

Tableau 5-1 Résumé des paramètres PK du voriconazole chez les enfants

Référence	n	Paramètres Pharmacocinétiques	BSV CL (%)	BSV V (%)
Karlsson et al.[155]	82	CL = 0.582 l/h/kg ~WT (chez les patients EMs) Diminution de la CL pour HEMs/PMs (%) = 35.5 Log(ALT) sur CL = -0.0931 Vc = 0.807 l/kg ~WT Q = 0.609 l/h/kg ~ WT Vp = 2.17 l/kg ~ WT K _m = 3.030 (ng/ml) Ka = 0.849 (1/h) F = 44.6 (%)	52.8	--
Walsh et al.[156]	35	CL = 0.4 l/h/kg ~WT, log(ALT), log(ALKP), polymorphisme CYP2C19 Vc = 0.8 l/kg ~WT Q = 0.64 l/h/kg ~ WT Vp = 1.7 l/kg ~ WT	66.5	--

ALT = alanine aminotransférase; ALKP = alcaline phosphatase; BSV = variabilité interindividuelle; CL = clairance; EMs = métaboliseurs extensifs homozygotes, F = biodisponibilité; HEMs = métaboliseurs extensifs hétérozygotes, Ka = taux d'absorption; n = nombre de patients; PMs = métaboliseurs lents homozygotes, Q = clairance intercompartimentale; Vc = volume de distribution; Vp = volume de distribution périphérique; WT = poids corporel.

Les résultats des études de pharmacocinétique de population du voriconazole montrent que les paramètres PK varient en fonction du poids. La cinétique du voriconazole est non-linéaire selon Karlsson et al.[155]; alors que les résultats de l'étude de Walsh et al.[156] montrent une cinétique linéaire. Les variabilités interindividuelles sur la clairance

restent élevées (>50%) ce qui implique le besoin de plus d'études pour mieux l'expliquer. Cependant, selon les études publiées, le polymorphisme du CYP2C19 affecte la clairance du voriconazole.

6 Généralités sur le tacrolimus

Le tacrolimus a été découvert en 1987 par des chercheurs japonais. Comme la cyclosporine, il a été identifié dans le sol où il est synthétisé par une bactérie "*Streptomyces tsukubaensis*".[157, 158]

Le tacrolimus est un immunosuppresseur puissant qui agit en inhibant l'activité phosphatase de la calcineurine. Cette inhibition conduit au blocage de la prolifération des cellules T et de la transcription du gène de l'interleukine-2, conduisant à une réduction marquée de l'activité des lymphocytes T effecteurs.[159] Bien que ce mode d'action soit similaire à celui de la cyclosporine, plusieurs études ont prouvé une efficacité supérieure du tacrolimus dans la prévention du rejet de greffe et la réduction de l'usage des corticostéroïdes. Ce dernier aspect est particulièrement important dans la transplantation chez les enfants.[160-162]

Le tacrolimus est utilisé dans la grande majorité des transplantations: cœur,[163] intestin grêle,[164] pancréas,[165] poumon,[166] foie,[161, 167-169] rein,[170] et dans la greffe de la moelle osseuse.[171]

Le tacrolimus est disponible sous forme intraveineuse (5 mg/ml), capsules (0.5, 1 et 5 mg), et capsules à effet prolongé (0.5, 1, 3 et 5 mg).

6.1 Pharmacocinétique du tacrolimus

La pharmacocinétique du tacrolimus présente une grande variabilité inter- et intraindividuelle, d'où la nécessité d'ajuster les doses par un suivi thérapeutique.[7] Récemment, la PK du tacrolimus a été revue par plusieurs études en utilisant des méthodes analytiques différentes.[7, 152, 172-175] Pour interpréter les résultats, il faut prendre en compte la méthode analytique et la matrice biologique utilisées. Une différence existe entre les concentrations du tacrolimus dans le sang et les concentrations plasmatiques à cause de sa distribution dans les érythrocytes. De plus, la population pédiatrique se distingue par des

différences physiologiques par rapport aux adultes comme la composition corporelle (eau/graisse), perméabilité membranaire, protéines plasmatiques et activité métabolique.[176] Ces particularités pourraient expliquer certaines variations dans la PK du tacrolimus.

6.1.1 Absorption

Le tacrolimus est rapidement absorbé après administration orale. La concentration maximale est atteinte en 2 heures chez les enfants. La biodisponibilité du tacrolimus est généralement faible. Chez les enfants ayant subi une transplantation hépatique, elle a été estimée en moyenne à 25% et varie de 3 à 77%.[175]

Le tacrolimus est un substrat de l'isoforme CYP3A4 et sa faible biodisponibilité peut être liée au métabolisme pré-systémique dans la membrane intestinale et dans le foie.[174]

6.1.2 Distribution

Le tacrolimus se lie fortement aux érythrocytes et la fraction sang/plasma varie de 4 à 114[7, 152] et aux protéines, surtout l'albumine et l' α_1 -glycoprotéine. La distribution entre le plasma et les érythrocytes dépend de la concentration du tacrolimus et est affectée par plusieurs paramètres: l'hématocrite et la concentration des protéines plasmatiques.[177, 178] La concentration des protéines et le nombre des érythrocytes augmentent durant les premiers mois après la transplantation ce qui pourrait affecter la distribution et l'élimination du tacrolimus.[179] En transplantation hépatique, le volume de distribution du tacrolimus chez les enfants peut atteindre 1.8 fois celui des adultes.[180]

6.1.3 Élimination

Le tacrolimus est éliminé de façon linéaire par métabolisme: moins que 1% d'une dose intraveineuse est éliminé sous forme inchangée dans les urines.[7, 152] Il est métabolisé par le CYP3A4 et CYP3A5 dans le foie et dans la paroi intestinale pour former au moins 10 métabolites inactifs.[32, 181-183] Les voies métaboliques sont la O-déméthylation principalement, puis l'hydroxylation et la glucuronidation. La faible affinité et la capacité du CYP3A7 pour le tacrolimus suggèrent que cette enzyme ne jouerait aucun rôle dans le métabolisme du tacrolimus *in vivo*. [52]

La voie oxydative catalysée par les enzymes CYP450 est immature durant les premiers mois après la naissance et atteint une activité importante entre 6 et 12 mois, qui peut être plus élevée que l'activité moyenne chez l'adulte. Cette maturation graduelle de l'activité enzymatique durant les premiers mois après la naissance contribue significativement à la variabilité interindividuelle du taux d'élimination du tacrolimus chez les enfants.

La clairance moyenne du tacrolimus (normalisée au poids corporel total) chez les enfants ayant subi une transplantation hépatique a été estimée à 0.14 l/h/kg après administration intraveineuse.[175] Cette valeur est deux fois plus élevée que celle observée chez les adultes de la même population. Ce qui suggère que les enfants ont besoin au moins du double de la dose des adultes pour atteindre la même exposition systémique.

La clairance du tacrolimus augmente avec le temps chez les enfants ayant subi une transplantation hépatique[7] et diminue en cas d'infection par le virus de l'hépatite C.[178] Des ajustements de la dose en découlent.

6.2 Interactions médicamenteuses

L'interaction médicamenteuse entre le tacrolimus et les autres médicaments se fait surtout à 2 niveaux :

i) Médicaments qui affectent l'absorption et le métabolisme du tacrolimus:

Le tacrolimus est métabolisé par les CYP3As. Les inducteurs ou les inhibiteurs de ces enzymes causent une diminution ou une augmentation de la concentration de tacrolimus. Les conséquences sont un rejet de greffe dans le premier cas (phénytoïne, phénobarbital, carbamazépine, et primidone)[184] et une augmentation du risque de toxicité dans le deuxième cas (érythromycine,[185] clarithromycine,[186] clotrimazole,[187] fluconazole,[188, 189] kétoconazole,[173] itraconazole,[190] nifédipine,[191] diltiazem,[192] chloramphénicol,[193] et corticostéroïdes[184]). L'association de la rifampine avec le tacrolimus provoque une diminution des concentrations du dernier.[56]

ii) Médicaments qui diminuent la fonction rénale

L'administration concomitante du tacrolimus et des anti-inflammatoires non stéroïdiens peut causer une augmentation de la néphrotoxicité du tacrolimus due à la diminution de la synthèse de la prostaglandine.[184] De plus, l'administration simultanée du tacrolimus et des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine peut causer une insuffisance rénale à cause de leur effet additif sur l'augmentation du taux de potassium.[184]

6.3 Pharmacocinétique de population du tacrolimus

Plusieurs études de pharmacocinétique de population du tacrolimus ont été publiées. Ces études permettent l'identification de variables influençant la PK du tacrolimus et permettent en conséquence l'individualisation des posologies. Un résumé des études et des paramètres PK du tacrolimus chez les enfants greffés est présenté dans le Tableau 6-1.

Tableau 6-1 Résumé des paramètres PK du tacrolimus chez les enfants greffés du foie

Référence	n	Paramètres Pharmacocinétiques	BSV CL (%)	BSV V (%)
Yasuhara et al.[7]	33	CL= (0.0749+0.000457*POD)*(15*(WT/15) ^{0.290}) (l/h) V= 2.76*(15*(WT/15) ^{0.290}) (l) F= 19% (fixed)	52.1	27.4
Sam et al.[173]	20	CL= 1.46*(1+0.339*(AGE-2.25)) (l/h) V= 39.1*[1+4.57*(BSA-0.49)] (l) BILI <200 µmol/l: F= 0.197*(1+0.0887*WT-11.4) (%) BILI ≥200 µmol/l: F= 0.197*(1+0.0887*WT-11.4)*1.61 (%)	33.5	33.0
Staatz et al.[194]	35	CL/F _{whole liver} = 44 (l/h) CL/F _{cut-down liver} = 5.75 (l/h) V/F= 617 (l)	110	297
Garcia Sanchez et al.[193]	18	CL/F= 10.4*(WT/70) ^{0.75} *e ^(-0.00032 T) *e ^(-0.057 BILI) *(1-0.079*ALT) (l/h)	24.3	--
Wallin et al.[195]	73	CL/F= 0.148 + (1.37*POD ^{3.78})/(5.38 ^{3.78} +POD ^{3.78}) (l/h/kg ^{0.75}) V/F= 27.2 (l/kg)	NR	90
Fukudo et al.[196]	130	CL/F= (0.134*1.8 ^{iFLAG} +0.0181*2 ^{hFLAG*} XPOD)*8.6*(WT/8.6) ^{0.341} *e ^(-0.0358*AST/53) (l/h/kg) ^a V/F= 17.1*8.6*(WT/8.6) ^{0.341} (l)	48.7	82.6

ALT = alanine aminotransférase; AST = aspartate aminotransférase; BILI = bilirubine; BSA = surface corporelle; BSV = variabilité interindividuelle; CL = clairance systémique; CL/F = clairance orale apparente; F = biodisponibilité; HF = fonction hépatique; n = nombre de patients; POD = temps après transplantation; T = temps après initiation du traitement; V = volume de distribution; WT = poids corporel.

^a Si POD <21, XPOD = POD; sinon, XPOD = 21; si le donneur est porteur du gène *CYP3A5*^{*}1, donc hFLAG = 1; sinon, 0; si le niveau de MDR1 mRNA intestinal est >0.22 amol/µg, donc iFLAG = 1; sinon, 0.

La majorité des études de pharmacocinétique de population du tacrolimus ont décrit la cinétique avec des modèles à un compartiment. Il est à signaler que ces modèles ont été

développés à partir de creux. Le poids corporel a été inclus dans la plupart des équations pour décrire la cinétique du tacrolimus. L'inclusion de paramètres décrivant la fonction hépatique dans le calcul de la clairance semble raisonnable vu que le tacrolimus est métabolisé par les enzymes CYP3A. Enfin, plusieurs études ont confirmé l'effet du polymorphisme du CYP3A5 sur l'absorption et le métabolisme du tacrolimus. Certaines études ont rapporté un changement de la cinétique du tacrolimus avec le temps post-transplantation alors que d'autres n'ont pas trouvé d'effet. Enfin, l'étude par Staatz et al.[194], décrit une cinétique différente selon le type de foie transplanté. Basé sur ces résultats très divers et sur la variabilité interindividuelle, large dans certaines études, plus d'études pourraient améliorer la compréhension de variables affectant la cinétique du tacrolimus.

7 Objectifs de la thèse

L'utilisation de médicaments chez les enfants subissant des greffes et immunosupprimés n'est pas toujours optimale. Pour certains de ces médicaments, caractérisés par une fenêtre thérapeutique étroite et une grande variabilité pharmacocinétique inter- et intraindividuelle au cours du temps, le suivi thérapeutique pharmacologique est utilisé pour optimiser les effets thérapeutiques tout en diminuant les effets indésirables. Cette méthode d'optimisation consiste à surveiller les concentrations sanguines du médicament et à adapter les posologies de façon à maintenir les concentrations dans une zone thérapeutique optimale. Le suivi thérapeutique pharmacologique est aujourd'hui considéré comme indispensable à la bonne utilisation de certains médicaments comme le tacrolimus, le busulfan et le voriconazole. Cette méthode n'est pas convenable chez les enfants, n'est pas pratique pour les patients externes et coûte cher à l'hôpital.

Dans le but d'améliorer l'utilisation des médicaments en pédiatrie, les données de suivi thérapeutiques à l'hôpital Ste-Justine, ont été utilisées pour développer des modèles de pharmacocinétique de population, identifier les facteurs responsables des variabilités interindividuelles et proposer un ajustement de doses à partir d'un nombre limité de prélèvements sanguins.

Plus spécifiquement, le premier article de cette thèse consiste à décrire la pharmacocinétique de population du busulfan chez les enfants subissant une greffe de moelle osseuse, identifier les covariables associées à la variabilité interindividuelle et proposer une meilleure dose qui permet de garder les concentrations dans la fenêtre thérapeutique.

Le deuxième article consiste à décrire la pharmacocinétique de population du voriconazole chez les enfants immunosupprimés à risque d'infections fongiques.

Le troisième article de cette thèse a pour but de développer, à l'aide d'une analyse de population, un estimateur Bayésien permettant d'estimer l'exposition individuelle au

tacrolimus (AUC_{0-12}) sur la base d'un nombre limité de prélèvements. Cet estimateur est caractérisé par la facilité d'usage en routine hospitalière et devrait améliorer le suivi thérapeutique pharmacologique et l'adaptation individuelle des doses de tacrolimus chez les enfants greffés de foie.

CHAPITRE II

Population pharmacokinetic of intravenous busulfan in children before hematopoietic stem cell transplantation

Nastya Kassir¹, Yves Théorêt^{2,3}, Martin A. Champagne^{4,5}, Mohamad-Samer Mouksassi¹,
Michel Duval⁶, Diane Larocque⁷, Line Labbé¹

1. Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal, Canada.
2. Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Canada.
3. Department of Biochemistry, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine
Montréal, Canada
4. Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Canada.
5. Service d'hématologie-oncologie, Hôpital de Verdun, Montréal, Canada
6. Service d'hématologie-oncologie, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine
Montréal, Canada
7. Department of pharmacy, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine Montréal,
Canada

Correspondence to:

Line Labbé, PhD

Faculty of Pharmacy, Université de Montréal

C.P.6128, Succursale Centre-ville

Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7

Telephone number: 514-343-6111 ext. 2781

Fax number: 514-343-2102

Article à resoumettre

Abstract

A retrospective population pharmacokinetic analysis was performed on 41 children receiving intravenous busulfan as part of their conditioning regimen for hematopoietic stem cell transplantation. Initial dose of busulfan was 0.8 or 1 mg/kg, in a 2 hour infusion, and then every 6 hours, for a total of 16 doses. Pharmacokinetics was determined on the first dose, and subsequent doses were adjusted, if needed. Data analysis was carried out by NONMEM. Clearance (CL) and volume of distribution (V) were found to be function of body surface area (BSA) and BSA + SEX, respectively. The interindividual variability was decreased from 77.5% to 18.5% in CL and from 76.4% to 7.9% in V by including BSA and SEX in the model. The final population estimates were: CL = 101 ml/min/m² (92.6 – 109.4 ml/min/m²) and V = 21.2 l/m² (19.4 – 22.4 l/m²). Different simulated dose regimens were tested. The percentage of patients reaching target AUC after optimization of the first dose was 71% versus 42% with the original administered dose. Based on this, the suggested dosing regimen would be 25 mg/m² if BSA ≤ 1 m² and 32 mg/m² if BSA > 1 m². Individualization of busulfan dosage is required and until our results are confirmed therapeutic drug monitoring is mandatory to target 900 to 1500 µM.min.

Keywords: busulfan, hematopoietic stem cell transplantation, population pharmacokinetic, children, modeling

1 Introduction

Busulfan is an alkylating agent used in combination with other chemotherapy agents as a substitute to radiotherapy in preparative regimens needed for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), both in adults and children (1, 2).

The most common busulfan dosing regimen in children is 0.8 or 1 mg/kg/dose for the i.v. formulation (3, 4); and 1 mg/kg/dose for the oral formulation, every 6 hours for 16 consecutive doses (1). Busulfan has a narrow therapeutic window that ranges from 900 to 1500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ (3.7 – 6.2 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$) (5, 6). At a dosage exceeding the therapeutic levels, veno-occlusive disease and seizures are seen (7-9). A low systemic exposure is associated with increased risk of engraftment failure and, in certain patients, leukemia relapse.

Systemic exposure to busulfan, typically expressed as area under the plasma concentration-time curve (AUC) or average concentration at steady state, has shown to be highly variable between and even within individuals. The development of various intravenous busulfan formulations has reduced the variability associated with delayed absorption or prolonged elimination of its oral form (10-12). However, intravenous busulfan still shows important pharmacokinetic variability especially in young patients, which may be attributed to factors such as drug-drug interaction, circadian variation, diseases, ability to metabolize busulfan and age, including changes in the ratio of body surface area to body mass from infancy to young adulthood.

The objectives of this study were to determine the population pharmacokinetics of intravenous busulfan in children undergoing HSCT, to identify the covariates responsible for the interindividual variability (IIV) in busulfan pharmacokinetic parameters and to quantify the interoccasion variability (IOV).

2 Methods

Patients and dosing schedule

Forty-one consecutive patients (24 girls and 17 boys), under the age of 21 years, undergoing HSCT at our tertiary care center, and who received i.v. busulfan (Busulfex, PDL pharma) as part of their preparative regimen, were included in this retrospective study. Initial dose of i.v. busulfan was usually prescribed based on actual weight, as per the following: 0.8 mg/kg/dose for 33 patients and 1 mg/kg/dose for 8 patients. Sixteen doses were given in a 2 hour infusion every 6 hours for all patients. Pharmacokinetics was determined on the first dose, and subsequent doses were adjusted, if needed, based on target busulfan concentration at steady state for each patient. Therefore, 5 patients had their subsequent doses decreased (0.3 – 0.7 mg/kg), while 20 patients needed an increase of their doses (0.9 – 1.5 mg/kg).

Seizure prophylaxis consisted of midazolam (16 patients), lorazepam (15 patients) or phenytoin (10 patients) and was initiated 12 hours prior to the initial infusion of busulfan and continued 24 hours following the last dose. During this period, no fluconazole or voriconazole was given. After busulfan therapy, all children received cyclophosphamide at 60 mg/kg/day as a 1 h infusion for 2 days or 50 mg/kg/day as a 2 h infusion for 4 days and/or other agents such as VP16 as a conditioning regimen.

Pharmacokinetic sampling, busulfan determination and dose adjustment

Blood samples for drug monitoring were collected in heparinised tubes from the central venous catheter using a different line from the one used for busulfan administration. One to 3 ml were withdrawn immediately before the administration of busulfan, 5 minutes before the end of infusion, at the end of infusion and 15, 30, 60, 120, 180, and 240 minutes after the end of infusion. Whether dose adjustment was made or not, confirmatory steady state level was determined from blood sampling done in each patient immediately before

and at the end of 6, 7, 8, and/or 9th infusions. Plasma samples obtained by centrifugation were stored frozen until analysis the same day or day after.

Busulfan was assayed by a validated reversed-phase liquid chromatography method with ultraviolet detection at 280 nm using 1,6-bis(methanesulfonyloxy)hexane (synthesized with a method already published) (13) as an internal standard (14). In brief, plasma samples were extracted with ethyl acetate and derivatized with diethyldithiocarbamate. Chromatography was accomplished using Nova-Pak (Waters) C18 (4 μ m, 3 x 150 mm) analytical and C18 (Guard-Pak) guard columns and a mobile phase composed of acetonitrile-water-tetrahydrofuran (65:32.6:2.4) running at a flow rate of 1.8 ml/min. The calibration curves were linear over concentrations ranging from 61.25 to 4000 ng/ml. Quality control samples (0.25, 0.5 and 1 μ g/ml) were incorporated into each run. The intra- and inter-assay variability was below 12% for calibration standards and quality controls and a difference of less than 12% from the nominal value was observed for all busulfan plasma concentrations tested (range: 150-2000 ng/ml) within an internationally (13 institutions) coordinated cross verification scheme. A non-compartmental analysis model for constant infusion was used (WinNonlin Professional version 5.2, Pharsight Corporation) and the clearance and terminal elimination rate constant (λ_z) were calculated automatically. Using these parameters, plasma concentration at steady state was determined and busulfan dose adjusted according to target value for each patient.

Population pharmacokinetic analysis

Data analysis and pharmacokinetic parameters estimation were carried out by a population approach using the nonlinear mixed effect modeling program NONMEM, version V (15). Throughout the model building the first order conditional estimation method FOCE with interaction was used. Empirical individual Bayes parameter estimates were obtained using the final model with the POSTHOC option of NONMEM.

Several steps were included to determine and to evaluate the pharmacokinetic model. First, we developed the basic pharmacokinetic model without covariates that describes the best the concentration-time profile of i.v. busulfan. One and two compartment models with zero order infusion and first order elimination were tested. Interindividual and interoccasion variabilities were introduced as an exponential error model on pharmacokinetic parameters: clearance (CL) and volume of distribution (V) (16):

$$CL_{ij} = CL \times \text{EXP}(\eta_{iCL} + \kappa_{ij})$$

where CL_{ij} is the hypothetical clearance value of the i^{th} individual on the j^{th} occasion, CL is the typical value of population clearance, η_{iCL} and κ_{ij} consist of independent normally distributed random variables with mean zero and variance ω^2 and π^2 , respectively. The same modeling was used for the V.

To describe the residual unexplained variability, the additive, the proportional and the combined (proportional and additive) error models were tested.

Once the basic pharmacokinetic model was defined, the influence of the covariates age, sex, actual body weight (ABW) and body surface area (BSA) was studied. The BSA was calculated using the Dubois formula (17). The generalized additive modeling (GAM) approach in the Xpose 3.104 program (18) was used as an exploratory tool for covariate selection. Covariates were sequentially tested into the population PK model to assess the effect on between-subject variability of PK parameters of interest. A decrease in the minimum objective function value of 3.84 ($p \leq 0.05$) was considered significant to include the covariate in the final model. The objective function value (OFV) is proportional to $-2 \log$ -likelihood and the difference of OFV between two models is approximately Chi Square distributed with n degrees of freedom; n denoting the difference in the number of parameters between the two models.

Sex and age were introduced in term of linear relationship; ABW and BSA were introduced on the basis of allometric scaling (19, 20). Continuous covariates were centered on the mean.

The process of model discrimination was guided by examination of model diagnostic plots (plots of predicted vs. observed; weighted residuals vs. time; weighted residuals vs. predicted), the value of the minimum objective function, the precision of parameter estimates, and the symmetry of the distributions of individual parameter estimates compared to the estimated median parameter. The program S-Plus 7.06 was used for interfacing NONMEM graphics (21).

To assess the stability of the final model, a non-parametric bootstrap ($n = 2000$ samples) was performed in PsN 2.2.1 (22). The 95% confidence intervals of the parameters were calculated from the bootstrap percentiles (23). A predictive check was performed to evaluate the ability of the model to reproduce similar results as those from the original dataset. The parameter estimates obtained from the final model were used to conduct 1000 simulations (24).

The area under the plasma concentration-time curve in each patient was calculated according to the linear trapezoidal rule using S-plus (25). Using the final population pharmacokinetic model, different dose regimens were studied to optimize the number of patients achieving the target AUC after the first dose using the approach of Karlsson et al. (26) and to estimate the BSA cutoffs. The target AUC range chosen was from 900 to 1500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ (3.7 – 6.2 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$) (5, 6). The different tested dose regimens were: a) 30 mg/m^2 ; b) 25 mg/m^2 if $\text{BSA} \leq 1 \text{ m}^2$ or 32 mg/m^2 if $\text{BSA} > 1 \text{ m}^2$ c) 22 mg/m^2 if $\text{BSA} \leq 0.65 \text{ m}^2$ or 28 mg/m^2 if $0.65 < \text{BSA} \leq 1.3 \text{ m}^2$ or 35 mg/m^2 if $\text{BSA} > 1.3 \text{ m}^2$. BSA cutoffs were the mean (1 m^2) and the tertiles (0.65 and 1.3 m^2) of BSA. The dose regimens were chosen empirically by ranging doses from 5 to 60 mg/m^2 . Then we tested the best regimen with simulation (Subproblems = 1000) incorporating parameter uncertainty in NONMEM by sampling from the posterior parameter distributions. Including uncertainty allows for a quantitative evaluation of the state of knowledge.

3 Results

Plasma concentration data of busulfan from a total of 41 children, median age 7.92 years (range 0.21-20 years), were used in this analysis. Demographics of these patients are summarized in Table 1. Thirty three children received an initial busulfan dose of 0.8 mg/kg, while eight patients received 1 mg/kg. The analyzed dataset consisted of 648 plasma concentrations. Observed concentrations versus sampling time after the first dose of busulfan are represented in Figure 1.

A one compartment model was found to be more suitable than a two compartment model to describe our data. IIV and IOV were modeled on both CL and V, their inclusion was very significant and led to a large drop of the OFV and markedly improved the quality of fit of busulfan ($p < 0.001$). The combined (proportional and additive) error model was used to describe the residual unexplained variability. Therefore, the combined error model with IIV and IOV on CL and V was selected as the optimum base model and was used to test the different covariates.

The most important pharmacokinetic models with their corresponding OFV and IIV on CL and V are shown in Table 2. While building the model of covariates in NONMEM, we found that CL and V were functions of BSA. As a consequence of this, CL and V increase with BSA (9.9% and 10.7% per 0.1 m^2 , respectively; $p < 0.05$). V was also found a function of sex. The drop in the OFV, when introducing the covariate sex on the parameter V, was significant but borderline ($\Delta\text{OFV} = 9.29$). We used a statistical test, the permutation test, with 1000 replicates to confirm this effect. This test was realized using the program Wings for NONMEM 409 (27). Since P value was 0.005, the covariate sex was kept in the model, indicating that boys had a volume of distribution 12% higher as compared to girls.

Parameters obtained from the final model are listed in the Table 3. The final population estimates were: CL = 101 ml/min/m² (92.6 – 109.4 ml/min/m²) and V = 21.2 l/m² (19.4 – 22.4 l/m²). The performance of the final population PK model including

covariates to fit plasma concentrations of busulfan is presented in Figure 2. The maximum *a posteriori* Bayes individual CL and V estimates versus BSA are shown in Figure 3.

A summary of the average parameter values from the 2000 bootstrap replicates are listed in the Table 3. The bootstrap results indicated a relatively low bias in the mean population parameters and they were within 7% of those obtained from the final model. Confidence intervals were also calculated from the bootstrap replicates with the percentile method.

For the qualification of our model, we tested it to produce reliable results by using the method of predictive check. The result was obtained by comparing the calculated AUC, after the first dose was administered to all patients from the original data and the calculated AUC from the simulated data. The simulated AUC's density was centered on the median of the original data and this proves that this model can generate data similar to the original ones. Figure 4 shows the result of the predictive check.

Based on our final model, we tested different dose regimens. The dose regimens were a) 30 mg/m²; b) 25 mg/m² if BSA ≤ 1 m² or 32 mg/m² if BSA > 1 m² c) 22 mg/m² if BSA ≤ 0.65 m² or 28 mg/m² if 0.65 < BSA ≤ 1.3 m² or 35 mg/m² if BSA > 1.3 m² (data not shown). Among these regimens, the 25 mg/m² if BSA ≤ 1 m² or 32 mg/m² if BSA > 1 m² was the best one to obtain the target AUC. The percentage of our patients within the target AUC after the first dose was 42%, but it would have been 71% if busulfan would have been administered at a dose of 25 mg/m² if BSA ≤ 1 m² or 32 mg/m² if BSA > 1 m². The percentage of patients having their AUC in the toxic range after the first dose was 4.9% in the former and would have been 2.4% in the latter.

4 Discussion

A population pharmacokinetic analysis was carried out using retrospective data from 41 consecutive children who were given i.v. busulfan as part of their preparative regimen for hematopoietic stem cell transplantation. The objectives of this analysis were to characterize the relationship between pharmacokinetic parameters of i.v. busulfan and covariates, and to explain interindividual and interoccasion variabilities. In this study, we have evaluated a novel dosing to optimize safety and efficacy for HSCT.

The PK of busulfan was evaluated using a population PK approach and a thorough covariate analysis was performed to assess the potential impact of demographic covariates. A one-compartment model with zero-order infusion and first-order elimination fitted plasma concentrations of busulfan adequately.

Covariate analysis was performed using a stepwise approach. Available covariates in this study were ABW, BSA, age, and sex. During the first step of covariate analysis, BSA was found to be the significant covariate on CL and V using an allometric scaling model; in contrast to other pediatric studies where this covariate was ABW (28-30). Although ABW was a significant covariate in our study, IIV on CL and V were better explained and well correlated with BSA. In addition to BSA, sex was found to be a significant covariate on V. Age did not improve our model and this could be explained by the fact that BSA takes in account the effect of age in children. After the inclusion of covariates, BSA explained 76% and 85% of the variability on CL and V, respectively; sex explained 4% of the variability on V. Despite this reduction in variability, individualization of doses is still necessary.

Overall, individual concentrations of busulfan were well fitted with the final population PK model with allometric scaling on CL and V as well as sex effect on V. This was demonstrated by the LOESS curve fitted between the observed concentrations and the predicted concentrations values, which was very close to the identity line (Figure 2) and the results of the bootstrap (Table 3).

The predicted CL derived with the final population PK model was 0.1 l/min (0.09 - 0.11 l/min). This CL's range corresponds to 2.91 – 3.56 ml/min/kg. This value was very consistent to CL values previously reported by pediatric and adult studies (1.80 to 5.58 ml/min/kg) (29, 31-37). Likewise, the total volume of distribution of busulfan in the current study 21.2 l (19.4 - 22.4 l) was consistent with values found in the literature for children (12.5 – 21.3 l) (28, 30, 32, 33, 35, 37).

In the final model, IIV on CL and V were found to be 18.5% and 7.9%, respectively. In a study conducted by Nath et al. (37), the IIV on CL (35%) and IIV on V (22%) were higher than in our study. Moreover, in Booth's study (28), IIV on both CL and V were higher (23% and 11%, respectively). Therefore, our developed pharmacokinetic model with the covariates BSA and sex reduces more efficiently IIV in pharmacokinetic parameters.

The interoccasion variability was found to have a large impact on CL and V (13.3% and 9.4%, respectively). Comparing our findings with those reported by Takama et al. (29) and Nguyen et al. (30), they had just modeled IOV on clearance and it was found to be equivalent to 6.6% and 9%, respectively. In Booth's study (28), IOV on CL and V were 9.5% and 6.1%, respectively. Overall, results derived with the current population PK model were very consistent with those reported by other groups including studies in adult and pediatric patients, oral and intravenous busulfan.

The relation between systemic exposure of busulfan and toxicities or engraftment failure is well known (7-9). Therefore, after the development of the pharmacokinetic model, we tried to optimize the percentage of patients reaching the target AUC (900 – 1500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) following the first dose.

First, we proved that our model is able to produce reliable results by conducting a visual predictive check and then we studied different dose regimens. From these regimens, we suggest an administration based on BSA that would have resulted in 71% of patients reaching the therapeutic range after the first dose and a very low percentage of AUCs in the

toxic range (2.4%). This dosing regimen is 25 mg/m² if BSA ≤ 1 m² or 32 mg/m² if BSA > 1 m².

Our study had some limitations. There are some functional polymorphisms of genes, which control important enzymes in busulfan metabolism that contribute to the observed IIV in the pharmacokinetic of this drug. Busulfan is metabolized principally by the GSTA1, as well as by other GST enzymes like the GSTM1 and GSTP1 (38). These enzymes are present in the liver as well as in the intestinal cells and are up regulated in the digestive system of young children. In our retrospective study, information about GSTA1, GSTM1 and GSTP1 genes' polymorphism was not available. However, it is unknown if including it would have added more information to the model since recent studies had reported contradictory results about the impact of polymorphisms. Johnson et al. (39) and Gaziev et al. (36) demonstrated that carriers of GSTA1*B had reduced busulfan clearance by 30% and 10 %, respectively. Moreover, Ansari et al. (40) found that GSTA1 and GSTM1 polymorphisms seemed to modify busulfan pharmacokinetics. On the other hand, Zwaveling et al. (41) observed that variability in the pharmacokinetics of busulfan was not related to polymorphism in GST. Underlying disease has also an influence on busulfan disposition and affects its CL and AUC (35), but it was not taken in consideration in our model. Another limitation of the study is the limited number of patients (n= 41) and the fact that it is a retrospective study.

To conclude, the pharmacokinetics of busulfan varies with BSA and sex. Moreover, our model suggests that a dosing of 25 mg/m² in children with BSA ≤ 1 m² and 32 mg/m² if BSA > 1 m² would result more often in first dosing busulfan within therapeutic range than our current per recipient body weight (71% versus 42%, respectively). However, the individualization of busulfan doses remains required to control risks of toxicities or treatment failure pending prospective documentation of our findings.

5 Acknowledgements

We thank the staff of the HSCT, and Ms MF Vachon, nurse specialist, for their support in the pharmacokinetic studies. N.K. received a studentship from the Faculty of graduate studies of Université de Montréal. L.L. was the recipient of scholarship from Health Research Foundation of Rx&D.

6 Conflict of Interest/Disclosure

The authors declare no conflict of interest.

7 References

1. Santos GW. The development of busulfan/cyclophosphamide preparative regimens. *Semin Oncol* 1993; **20**(4 Suppl 4): 12-6; quiz 17.
2. Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, Saral R, Beschorner WE, Bias WB *et al.* Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N Engl J Med* 1983; **309**(22): 1347-53.
3. Dalle JH, Wall D, Theoret Y, Duval M, Shaw L, Larocque D *et al.* Intravenous busulfan for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in infants: clinical and pharmacokinetic results. *Bone Marrow Transplant* 2003; **32**(7): 647-51.
4. Wall DA, Chan KW, Nieder ML, Hayashi RJ, Yeager AM, Kadota R *et al.* Safety, efficacy, and pharmacokinetics of intravenous busulfan in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer*; **54**(2): 291-8.
5. Bolinger AM, Zangwill AB, Slattery JT, Glidden D, DeSantes K, Heyn L *et al.* An evaluation of engraftment, toxicity and busulfan concentration in children receiving bone marrow transplantation for leukemia or genetic disease. *Bone Marrow Transplant* 2000; **25**(9): 925-30.
6. McCune JS, Gooley T, Gibbs JP, Sanders JE, Petersdorf EW, Appelbaum FR *et al.* Busulfan concentration and graft rejection in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; **30**(3): 167-73.
7. 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 Transplant* 2000; **26**(5): 463-70.

8. Grochow LB, Jones RJ, Brundrett RB, Braine HG, Chen TL, Saral R *et al.* Pharmacokinetics of busulfan: correlation with veno-occlusive disease in patients undergoing bone marrow transplantation. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; **25**(1): 55-61.
9. Dix SP, Wingard JR, Mullins RE, Jerkunica I, Davidson TG, Gilmore CE *et al.* Association of busulfan area under the curve with veno-occlusive disease following BMT. *Bone Marrow Transplant* 1996; **17**(2): 225-30.
10. Hassan M, Oberg G, Bekassy AN, Aschan J, Ehrsson H, Ljungman P *et al.* Pharmacokinetics of high-dose busulphan in relation to age and chronopharmacology. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991; **28**(2): 130-4.
11. Hassan M, Ljungman P, Bolme P, Ringden O, Syruckova Z, Bekassy A *et al.* Busulfan bioavailability. *Blood* 1994; **84**(7): 2144-50.
12. Andersson BS, Kashyap A, Gian V, Wingard JR, Fernandez H, Cagnoni PJ *et al.* Conditioning therapy with intravenous busulfan and cyclophosphamide (IV BuCy2) for hematologic malignancies prior to allogeneic stem cell transplantation: a phase II study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; **8**(3): 145-54.
13. Bleyzac N, Barou P, Aulagner G. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for busulfan assay in plasma. *Journal of chromatography* 2000; **742**(2): 427-32.
14. Rifai N, Sakamoto M, Lafi M, Guinan E. Measurement of plasma busulfan concentration by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Therapeutic drug monitoring* 1997; **19**(2): 169-74.
15. Boeckman A, Beal S, Sheiner L. NONMEM user's guide San Francisco: Globomax. In, 1998.
16. Karlsson MO, Sheiner LB. The importance of modeling interoccasion variability in population pharmacokinetic analyses. *J Pharmacokinetic Biopharm* 1993; **21**(6): 735-50.

17. Du Bois D, Du Bois E. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Archives of Internal Medicine* 1916; **17**: 863-871.
18. Jonsson EN, Karlsson MO. Xpose--an S-PLUS based population pharmacokinetic/pharmacodynamic model building aid for NONMEM. *Comput Methods Programs Biomed* 1999; **58**(1): 51-64.
19. Holford NH. A size standard for pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 1996; **30**(5): 329-32.
20. Meibohm B, Laer S, Panetta JC, Barrett JS. Population pharmacokinetic studies in pediatrics: issues in design and analysis. *Aaps J* 2005; **7**(2): E475-87.
21. Mathsoft. S-PLUS 7 User's Guide Seattle: Data Analysis Products Division Mathsoft. In, 2005.
22. Lindbom L, Pihlgren P, Jonsson EN. PsN-Toolkit--a collection of computer intensive statistical methods for non-linear mixed effect modeling using NONMEM. *Comput Methods Programs Biomed* 2005; **79**(3): 241-57.
23. Henderson AR. The bootstrap: a technique for data-driven statistics. Using computer-intensive analyses to explore experimental data. *Clin Chim Acta* 2005; **359**(1-2): 1-26.
24. Yano Y, Beal SL, Sheiner LB. Evaluating pharmacokinetic/pharmacodynamic models using the posterior predictive check. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2001; **28**(2): 171-92.
25. Proost JH. Wagner's exact Loo-Riegelman equation: the need for a criterion to choose between the linear and logarithmic trapezoidal rule. *J Pharm Sci* 1985; **74**(7): 793-4.
26. Jonsson S, Karlsson MO. A rational approach for selection of optimal covariate-based dosing strategies. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2003; **73**(1): 7-19.
27. Holford PN. Wings for NONMEM program version 409. In.

28. Booth BP, Rahman A, Dagher R, Griebel D, Lennon S, Fuller D *et al.* Population pharmacokinetic-based dosing of intravenous busulfan in pediatric patients. *J Clin Pharmacol* 2007; **47**(1): 101-11.
29. 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.
30. 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.
31. Sandstrom M, Karlsson MO, Ljungman P, Hassan Z, Jonsson EN, Nilsson C *et al.* Population pharmacokinetic analysis resulting in a tool for dose individualization of busulphan in bone marrow transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant* 2001; **28**(7): 657-64.
32. Schiltmeyer B, Klingebiel T, Schwab M, Murdter TE, Ritter CA, Jenke A *et al.* Population pharmacokinetics of oral busulfan in children. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003; **52**(3): 209-16.
33. Cremers S, Schoemaker R, Bredius R, den Hartigh J, Ball L, Twiss I *et al.* Pharmacokinetics of intravenous busulfan in children prior to stem cell transplantation. *Br J Clin Pharmacol* 2002; **53**(4): 386-9.
34. Oechtering D, Schiltmeyer B, Hempel G, Schwab M, Wurthwein G, Murdter T *et al.* Toxicity and pharmacokinetics of i.v. busulfan in children before stem cell transplantation. *Anticancer Drugs* 2005; **16**(3): 337-44.
35. Bertholle-Bonnet V, Bleyzac N, Galambrun C, Mialou V, Bertrand Y, Souillet G *et al.* Influence of underlying disease on busulfan disposition in pediatric bone marrow transplant recipients: a nonparametric population pharmacokinetic study. *Ther Drug Monit* 2007; **29**(2): 177-84.

36. Gaziev J, Nguyen L, Puozzo C, Mozzi AF, Casella M, Perrone Donnorso M *et al.* Novel pharmacokinetic behavior of intravenous busulfan in children with thalassemia undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a prospective evaluation of pharmacokinetic and pharmacodynamic profile with therapeutic drug monitoring. *Blood*; **115**(22): 4597-604.
37. 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.
38. Srivastava A, Poonkuzhali B, Shaji RV, George B, Mathews V, Chandy M *et al.* Glutathione S-transferase M1 polymorphism: a risk factor for hepatic venoocclusive disease in bone marrow transplantation. *Blood* 2004; **104**(5): 1574-7.
39. Johnson L, Orchard PJ, Baker KS, Brundage R, Cao Q, Wang X *et al.* Glutathione S-transferase A1 genetic variants reduce busulfan clearance in children undergoing hematopoietic cell transplantation. *J Clin Pharmacol* 2008; **48**(9): 1052-62.
40. Ansari M, Lauzon-Joset JF, Vachon MF, Duval M, Theoret Y, Champagne MA *et al.* Influence of GST gene polymorphisms on busulfan pharmacokinetics in children. *Bone Marrow Transplant* 2009.
41. Zwaveling J, Press RR, Bredius RG, van Derstraaten TR, den Hartigh J, Bartelink IH *et al.* Glutathione S-transferase polymorphisms are not associated with population pharmacokinetic parameters of busulfan in pediatric patients. *Ther Drug Monit* 2008; **30**(4): 504-10.

8 Figure Legends

Figure 1 Plasma concentrations (observed individual concentrations) of busulfan versus time with loess of predicted concentrations versus time after the first dose.

Figure 2 Observed individual concentrations of busulfan versus population predicted concentrations in the final model with loess of observed individual concentrations versus population predicted concentrations. The dotted line is the identity line.

Figure 3 Maximum *a posteriori* Bayes individual CL (left panel) and V (right panel) estimates versus BSA before inclusion in the model. A smooth line “LOESS” is drawn to show the trend in the data.

Figure 4 Predictive check results. The bold black and gray lines represent the original simulated area under the plasma concentration time curve ($AUC_{0-\infty}$) from the final model, respectively. The median of the observed $AUC_{0-\infty}$ and the individual predicted $AUC_{0-\infty}$ are shown as a black dashed line and a gray dashed line, respectively.

9 Tables

Table 1 Population characteristics

Characteristic	Mean \pm SD	Median	Range
Age (years)	8.0 \pm 6.3	7.9	0.2 – 20
ABW (kg)	30.9 \pm 22.9	24	3.8 – 95.6
BSA (m ²)	1 \pm 0.5	0.9	0.2 – 2.0

ABW: actual body weight, BSA: body surface area, SD: standard deviation

Table 2 Summary of OFV and IIV in selected models

Pharmacokinetic model	OFV	IIV~CL	IIV~V
Basic + IOV ~ CL, V	-2407.175	77.52%	76.35%
Basic + IOV + BSA ~ CL, V	-2548.516	18.3%	11.05%
Basic + IOV + BSA ~ CL, V + SEX ~ V	-2557.804	18.49%	7.94%

BSA: body surface area, CL: total clearance, IIV: interindividual variability, IIV~CL: interindividual variability on clearance, IIV~V: interindividual variability on volume of distribution, IOV: interoccasion variability, OFV: objective function value produced by NONMEM, V: volume of distribution.

Table 3 Parameter estimates from the final model and the bootstrap, confidence interval and stability of the model

Parameters	Typical population parameter estimate (precision CV %) ¹	Mean population parameter estimate ²	Difference (%) ³	95% confidence interval ²
θ_{CL} (l/min)	0.1 (4.1)	0.1	0	0.09 – 0.11
θ_V (l)	21.2 (3.3)	21.18	- 0.09	19.4 – 22.4
$\theta_{CL,BSA}$	1.2 (4)	1.2	0	1.1 – 1.3
$\theta_{V,BSA}$	1.2 (3.4)	1.2	0	1.1 – 1.3
$\theta_{V,SEX}$	-0.12 (28.4)	-0.12	0	(-0.18) – (-0.04)
IIV_{CL} (%)	18.5 (21.6)	17.9	- 3.4	7.1 – 26.1
IIV_V (%)	7.9 (19.8)	7.9	0	1 – 14.8
IOV_{CL} (%)	13.3 (11.2)	13.4	0.7	11.1 – 15.8
IOV_V (%)	9.4 (16.2)	9.4	0	3.8 – 13.9
ERR PROP (%)	7.8 (9.3)	7.3	- 6.8	5.4 – 9.1
ERR ADD (mg/l)	0.05 (22.6)	0.05	0	0.02 – 0.07

¹ Obtained from the original data; ² Mean and confidence interval calculated from the bootstrap; ³ (Bootstrap mean value – typical value from original data)/bootstrap mean value x 100

$$CL = \theta_{CL} \times (BSA/Mean)^{\theta_{CL, BSA}}$$

$$V = \theta_V \times (\text{BSA}/\text{Mean})^{\theta_{V, \text{BSA}}} \times (1 - \theta_{V, \text{SEX}} \times \text{SEX})$$

θ_{CL} and θ_V are the typical values of population clearance and volume of distribution, respectively; $\theta_{\text{CL,BSA}}$ and $\theta_{V,BSA}$ are the BSA effect on CL and V, respectively; $\theta_{V,SEX}$ is the difference in V between boys and girls. Dichotomous variable sex was coded as 1 if girls and 0 otherwise.

BSA: body surface area, CL: clearance, CV: coefficient of variation, ERR ADD: additive component of the residual error, ERR PROP: proportional residual error, IIV: interindividual variability, IOV: interoccasion variability, Mean: BSA was centered on the mean (1 m²), V: volume of distribution.

CV was calculated as the ratio of the asymptotic standard error given by NONMEM on the parameter estimate.

10 Figures

Figure 1

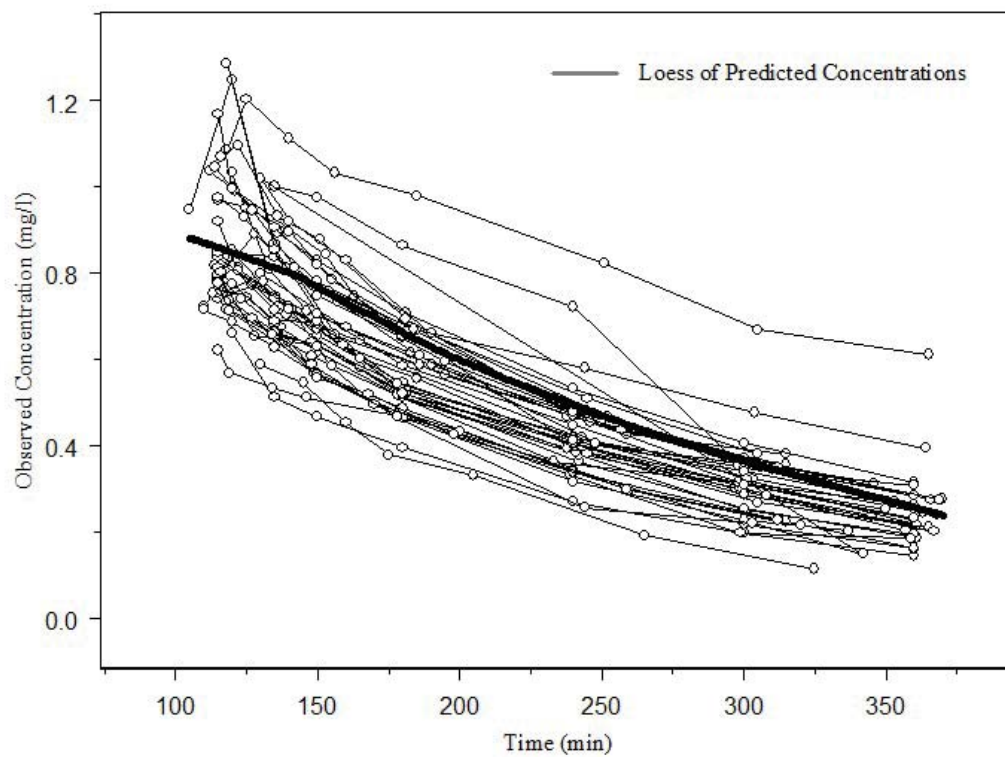


Figure 2

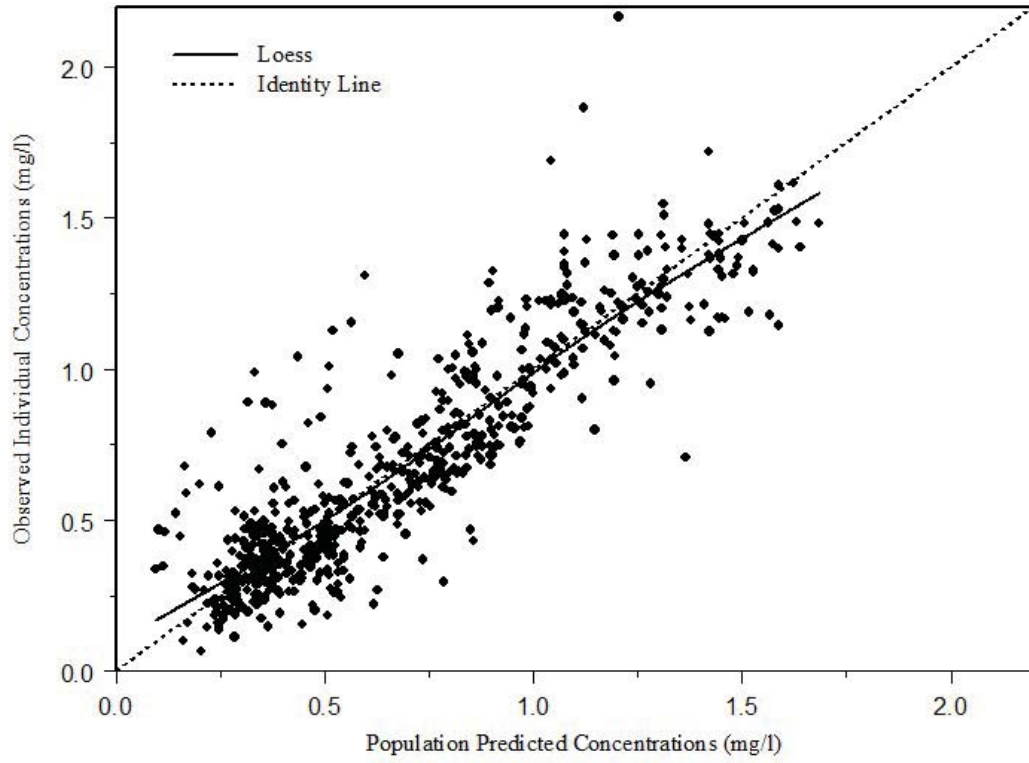


Figure 3

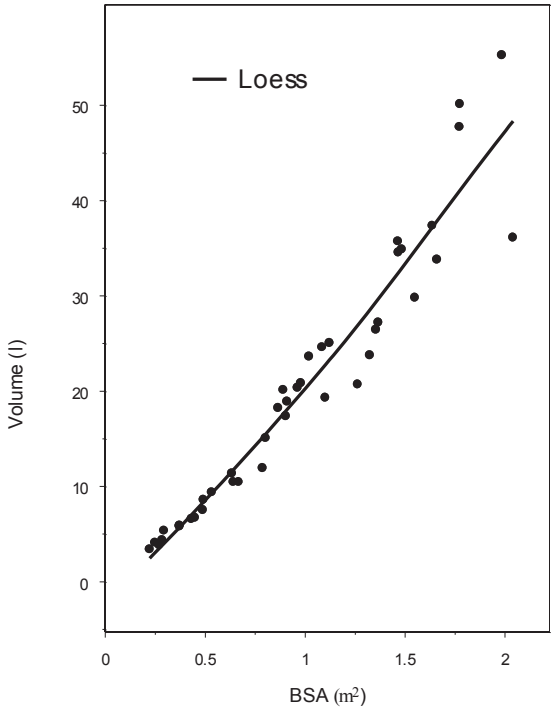
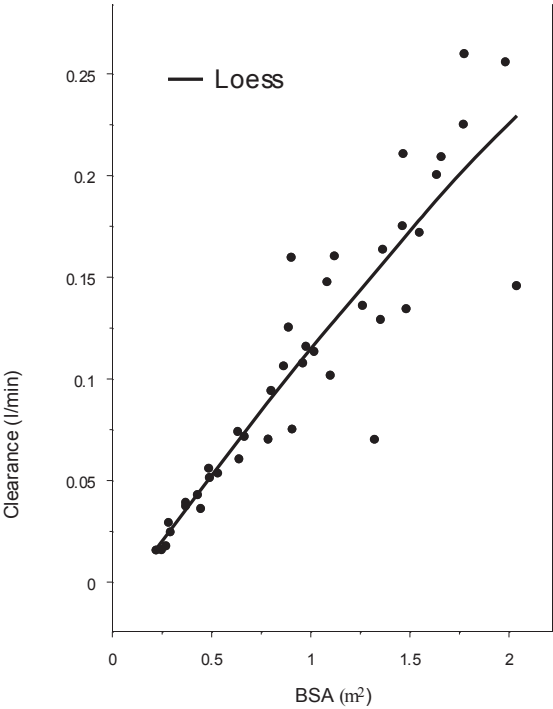
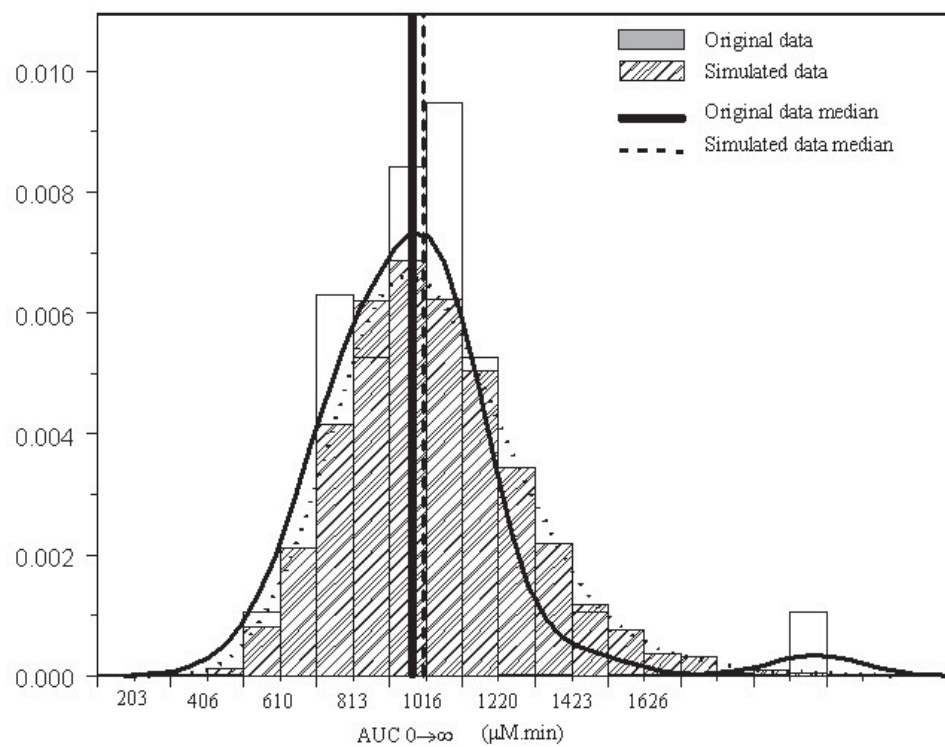


Figure 4



CHAPITRE III

Population pharmacokinetic of intravenous and oral voriconazole in children

Nastya Kassir^{1,2,3}, Philippe Ovetchkine^{1,4}, Yves Théorêt^{1,5,6}, Catherine Litalien^{1,4,6}, Bruce Tapiero⁴, Michel Duval⁴, Line Labbé²

(1) Clinical Pharmacology Unit, CHU Ste-Justine, Montreal, Quebec, Canada; (2) Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada; (3) Pharsight - A Certara Company, Montreal, Quebec, Canada; Departments of (4) Pediatrics, (5), and Biochemistry, CHU Ste-Justine, Montreal, Quebec, Canada; (6) Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence to:

Line Labbé, PhD

Faculty of Pharmacy, Université de Montréal

C.P.6128, Succursale Centre-ville

Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7

Telephone number: 514-343-6111 ext. 2781

Fax number: 514-343-2102

Article (short communication) en préparation

Abstract

Background. Voriconazole pharmacokinetics (PK) is known to have highly interindividual variability in adults. Limited pediatric PK data are available. The aim of this study was to characterise the PK of voriconazole in children.

Methods. At our institution, children receiving voriconazole underwent therapeutic drug monitoring as part of patient management. PK data was collected from children treated with intravenous and/or oral voriconazole for invasive fungal infections. Plasma voriconazole concentrations were measured using HPLC. Data analysis was carried out by a population approach using NONMEM. One and two-compartment models with linear or non-linear elimination were studied. The influence of patient characteristics including body weight (WT), age, gender, and underlying disease on PK parameters was tested. The underlying diseases were as follows: febrile neutropenia, invasive aspergillosis and invasive candidiasis in immunocompromised patients. Model performance was evaluated with the bootstrap technique.

Results. A total of 135 voriconazole concentrations from 14 patients (aged 2-18 years) were analyzed. A one-compartment model with linear elimination best described the data. Population estimates of clearance and volume of distribution after intravenous and/or oral voriconazole administration were 7.9 l/h and 84.3 l, respectively. Oral bioavailability was estimated to be 67%. Interindividual variability on clearance, volume of distribution and bioavailability were 84.5%, 56.5% and 78.5%, respectively. None of the tested covariates explained the variability in PK parameters of voriconazole. Bootstrap results showed that bias in the model was less than 17%.

Conclusion. The developed population PK model suggests that individualization of voriconazole dosage in children is required and therapeutic drug monitoring is mandatory to reduce toxicity and prevent treatment failure pending prospective analyses.

1 Introduction

Invasive fungal infections have been an increasing and severe problem in immunocompromised patients and especially in bone marrow transplant recipients.^{1 2} Voriconazole is a second generation antifungal triazole with potent activity against a broad spectrum of clinically significant fungal pathogens such as *Aspergillus*, *Candida* and emerging and less common pathogens including *Scedosporium* and *Fusarium*.³ Clinical efficacy of voriconazole has been well documented in immunocompromised adults with severe invasive fungal infections.^{3, 4} The drug is approved for primary treatment of invasive aspergillosis and for salvage therapy in cases of severe infections caused by unusual moulds. Both intravenous (IV) and oral formulations of voriconazole are available. In adults, oral voriconazole is absorbed within two hours of intake and oral bioavailability is excellent (>90%) allowing switching between IV and oral formulations without major dose modifications.⁵ Voriconazole is extensively metabolized, primarily by hepatic CYP2C19, CYP2C9 and CYP3A4 isoenzymes, to inactive metabolites.^{3, 6} In adults and children, contradictory results are reported about the linearity of voriconazole pharmacokinetics.⁷⁻¹³ Interindividual variability in plasma concentrations of voriconazole is high regardless of the route of administration.^{5, 14, 15}

Voriconazole use has increased in pediatrics; however optimum dosing regimen is still under discussion. Several studies have suggested a correlation between voriconazole trough concentrations and efficacy, poor outcome being observed in patients with voriconazole trough concentrations <0.5-1 mg/l.⁹ Moreover, recent data even suggested the need for voriconazole trough concentrations ≥ 2 mg/l and <6 mg/l.¹⁴

Maintenance of adequate voriconazole plasma concentrations is crucial in treating invasive fungal infections in immunocompromised children. Since the pharmacokinetic of voriconazole has been poorly assessed in this population, therapeutic drug monitoring was performed in all immunocompromised children treated with voriconazole in our institution.

Available voriconazole drug concentrations were used in order to develop a population pharmacokinetics model of voriconazole in pediatrics and identify sources of variability.

2 Methods

Study data

Voriconazole concentrations in immunocompromised children treated with oral and/or intravenous voriconazole between 2005 and 2009 at CHU Ste-Justine were retrospectively reviewed. Concentrations were obtained as part of patient clinical management. When necessary, doses were adjusted in order to achieve voriconazole trough concentrations above 1 mg/L exceeding the minimum inhibitory concentration of most pathogens.⁵ Medical charts were reviewed and the following data were collected: age, sex, body weight, underlying disease, and liver function tests (AST and ALT).

Voriconazole was provided in 50 and 200 mg tablets or in 200 mg vials for injection. Voriconazole was generally administered in combination with food or enteral feeding. Oral voriconazole doses were extrapolated from recommended IV doses, 4 mg/kg/dose every 12 hours (q12h).¹³

One hundred thirty five (135) blood samples (0.5 ml) for determination of voriconazole levels from complete pharmacokinetic profiles (following dosing modification) were available for the analysis. Plasma concentrations were measured using high performance liquid chromatography.

Pharmacokinetic analysis

The population PK analysis was performed using NONMEM Version 7, level 1.2 (ICON Development Solutions, Ellicott City, Maryland, USA) with the first-order conditional estimation (FOCE) and the INTERACTION option. Nonlinear mixed-effects models were fitted to the concentration-time data of voriconazole following multiple IV and/or oral administrations described by typical pharmacokinetic compartmental models (e.g. 1- or 2-compartmental models with linear or non-linear elimination). Interindividual variability on PK parameters and the form of the residual error model were evaluated.

Model evaluation and selection were based on pertinent graphical representations of goodness-of-fit and based on the minimization of $-2 \times \text{Log}(\text{Likelihood})$, which was presented as the objective function value (OFV). The interindividual variability (IIV) was modeled as an exponential random-effect model in order to positively constrain the individual parameter values, which were thus assumed to follow a log-normal distribution.

Covariate analysis was carried out using visual inspection followed by a formal evaluation in NONMEM. The latter consisted of a stepwise forward additive approach ($P \leq 0.05$) followed by a backward elimination ($P \leq 0.01$). Potential covariates were: body weight, age, sex, underlying disease, and liver function tests (AST and ALT).

The performance of the final population PK model was evaluated with diagnostic plots and shrinkage of population PK parameters.

In order to assess whether the final model could be used to estimate individual PK parameters based on population means and sparse PK data, changes in the estimates of IIV, residual variability, and shrinkage in interindividual random effects were evaluated.¹⁶ Shrinkage values of ≤ 0.2 indicate good individual estimates of a parameter of interest, while larger shrinkage values indicate that the individual Bayesian estimates “shrunk” towards the population mean values.

In addition, the stability and precision of the model were evaluated using a nonparametric bootstrap within Perl-Speaks-NONMEM (PsN V3.4.2).¹⁷ The bootstrap technique involves resampling from the original data with each individual subject considered as a sampling unit. One thousand replicates of the data were generated by bootstrap to obtain the median and 95% percentile of PK parameters and the fixed- and random-effect parameters. The bias of each parameter was calculated by computing the difference between the median value derived from the bootstrap and the final parameter estimate.

3 Results

A total of 14 patients were included in this study. Table 1 summarizes the characteristics of the patients, including body weight, age, sex, and liver function tests (ALT and AST). Patients had a wide variety of diagnoses including invasive aspergillosis (n = 8), invasive candidiasis (n = 2), febrile neutropenia (n = 2), and other (n = 2).

There was a large variability in voriconazole plasma concentrations (Figure 1). A total of 135 plasma samples were available for the population PK analysis. Even with therapeutic drug monitoring, only 53% of voriconazole concentrations were maintained within 1 to 6 mg/l. A large percentage of concentrations (38%) were below 1 mg/l and 9% were above 6 mg/l.

Population Pharmacokinetics

A 1-compartment model with first-order absorption and elimination with lag time adequately fit the concentration data of voriconazole. More complex elimination models were not supported by the data. The population estimates of IIV on clearance (CL), volume of distribution (V_c) and bioavailability (F) were 84.5%, 56.5%, and 78.5%, respectively. A proportional error model was used for residual unexplained variability (51%).

Covariates Analysis and Sources of Variability

Visual inspection of the relationships between individual random effects of PK parameters and covariates did not show any trend. Nonetheless, a thorough covariate analysis was performed within NONMEM. None of the covariates tested reached statistical significance.

Population parameter estimates are reported in Table 2. For the final model, typical population CL and V_c were 7.93 l/h and 84.3 l, respectively. The absorption rate constant was estimated to be 1.94 h⁻¹ and the extent of oral bioavailability was 66.9%.

Model Evaluation

The performance of the final population PK model was evaluated with diagnostic plots and shrinkage of population PK parameters. The overall fit of observed and predicted voriconazole concentrations based on individual parameter estimates is presented in Figures 2A and 2B. Shrinkages to the mean of the individual random effects of CL and Vc were acceptable (less than 28%). Conditional weighted residuals were homogeneously distributed around 0 (Figures 2C and 2D), suggesting no bias in the prediction of voriconazole concentrations. Bootstrap resampling strategies were used to validate the population PK model. A total of 912 runs were successfully minimized with covariance step. Medians of PK parameters derived with the bootstrap resampling analysis were consistent with those derived from the original analysis with bias <17% (Table 2), demonstrating accuracy of predictions as well as model stability.

4 Discussion

The present study used a population pharmacokinetic approach to describe the PK of intravenous and oral voriconazole and to identify potential sources of variability in immunocompromised pediatric patients (2 to 18 years of age).

A one-compartment model with first-order absorption and elimination best described the concentration-time profiles of voriconazole in the study population. Nonlinear pharmacokinetics were not observed in this pediatric study (Michaelis-Menten elimination process did not improve the fitting). This result is in concordance with other studies where voriconazole elimination was linear in children¹³ and in adults.^{10, 11} In contrast, Karlsson et al.¹² reported that the elimination of voriconazole in children follows a Michaelis-Menten process.

Oral pharmacokinetic profiles of voriconazole show a quick absorption, with the peak concentration being reached around 2 hours after dose administration. These results are in agreement with those previously reported by Han et al.¹¹

Voriconazole pharmacokinetic is characterized by large interindividual variability.^{5, 7, 14, 15} A major objective of this study was to identify potential sources of variability using the population approach. Among all covariates tested in this study, none was able to explain the interindividual variability on pharmacokinetic parameters. The number of patients was very limited and heterogeneous to observe significant difference. However, results reported in the literature identified several covariates such as weight, ALT and CYP2C19 polymorphism,^{12, 13} the latest was in common between the two pediatric studies. Voriconazole is mainly metabolized through hepatic CYP2C19 isoenzyme, therefore, polymorphism of CYP2C19 plays an important role in its clearance. This polymorphism results in two phenotypes: poor and extensive metabolizers. Caucasian and African populations account for approximately 3 to 5% of poor metabolizers; Asian population comprises 15 to 20%.^{18, 19} Unfortunately, the impact of this genetic variation could not be tested as CYP2C19 genotypes were not available. Results reported in the literature show

that clearance of voriconazole correlated with CYP2C19.^{12, 13} Nevertheless, dose adjustments based solely on CYP2C19 genotype are not recommended.²⁰

The estimated PK parameter values using the final model are slightly different than those reported in literature for children. A typical pediatric patient would have clearance and volume of distribution of 7.9 l/h and 84.3 l, respectively. While Karlsson et al.¹² reported that clearance and total volume of distribution were 13.3 l/h and 67.9 l, respectively, Walsh et al.¹³ estimated them to 9.3 l/h and 58.5 l, respectively.

Voriconazole in adults is well absorbed, with bioavailability over 90%.⁵ In this study, the bioavailability was estimated to be 67%. Similar results were observed in Walsh et al. where oral bioavailability was 66%.² Karlsson et al. estimated a lower bioavailability (44.6%).¹² A potential explanation for the lower bioavailability in children compared to adults could be the developmental differences in the absorption and metabolism of drugs (i.e., absorption rate, activity of intestinal enzymes, efflux transporters, first-pass metabolism...). Children exhibit greater systemic metabolism and also greater first-pass metabolism than that of adults. Moreover, children on average have higher hepatic blood flow than that of adults per kilogram of body weight, leading to a higher dilution of voriconazole during absorption.

The stability and precision of the population PK model were evaluated using a nonparametric bootstrap. The results of this analysis demonstrated the model stability (91.2% successful convergence) as well as the accuracy of the estimated parameters (bias <17%).

The current study has some limitations. The major ones were the limited number of patients (n= 14) and the fact that it is a retrospective study. Moreover, the group of patients had a wide variety of diagnoses adding another level of variability to the study.

In conclusion, a population pharmacokinetic model was developed for voriconazole in immunocompromised children. Large interindividual variability in voriconazole pharmacokinetics was demonstrated. Therefore, the individualization of voriconazole doses

remains required to control risks of toxicities or treatment failure pending prospective analyses.

5 References

1. Hovi, L., et al., Invasive fungal infections in pediatric bone marrow transplant recipients: single center experience of 10 years. *Bone Marrow Transplant*, 2000. 26(9): p. 999-1004.
2. Walsh, T.J., et al., Pharmacokinetics, safety, and tolerability of voriconazole in immunocompromised children. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010. 54(10): p. 4116-23.
3. Pearson, M.M., et al., Voriconazole: a new triazole antifungal agent. *Ann Pharmacother*, 2003. 37(3): p. 420-32.
4. Herbrecht, R., et al., Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med*, 2002. 347(6): p. 408-15.
5. Theuretzbacher, U., F. Ihle, and H. Derendorf, Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole. *Clin Pharmacokinet*, 2006. 45(7): p. 649-63.
6. Johnson, L.B. and C.A. Kauffman, Voriconazole: a new triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis*, 2003. 36(5): p. 630-7.
7. Purkins, L., et al., The pharmacokinetics and safety of intravenous voriconazole - a novel wide-spectrum antifungal agent. *Br J Clin Pharmacol*, 2003. 56 Suppl 1: p. 2-9.
8. Purkins, L., et al., Pharmacokinetics and safety of voriconazole following intravenous- to oral-dose escalation regimens. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. 46(8): p. 2546-53.
9. Lutsar, I., et al., Safety of voriconazole and dose individualization. *Clin Infect Dis*, 2003. 36(8): p. 1087-8.
10. Han, K., et al., Population pharmacokinetic evaluation with external validation and Bayesian estimator of voriconazole in liver transplant recipients. *Clin Pharmacokinet*, 2011. 50(3): p. 201-14.

11. Han, K., et al., Bioavailability and population pharmacokinetics of voriconazole in lung transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010. 54(10): p. 4424-31.
12. Karlsson, M.O., I. Lutsar, and P.A. Milligan, Population pharmacokinetic analysis of voriconazole plasma concentration data from pediatric studies. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. 53(3): p. 935-44.
13. Walsh, T.J., et al., Pharmacokinetics and safety of intravenous voriconazole in children after single- or multiple-dose administration. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. 48(6): p. 2166-72.
14. Smith, J., et al., Voriconazole therapeutic drug monitoring. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006. 50(4): p. 1570-2.
15. Pascual, A., et al., Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin Infect Dis*, 2008. 46(2): p. 201-11.
16. Karlsson, M.O. and R.M. Savic, Diagnosing model diagnostics. *Clin Pharmacol Ther*, 2007. 82(1): p. 17-20.
17. Henderson, A.R., The bootstrap: a technique for data-driven statistics. Using computer-intensive analyses to explore experimental data. *Clin Chim Acta*, 2005. 359(1-2): p. 1-26.
18. Desta, Z., et al., Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet*, 2002. 41(12): p. 913-58.
19. Bertilsson, L., Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. *Clin Pharmacokinet*, 1995. 29(3): p. 192-209.
20. Hyland, R., B.C. Jones, and D.A. Smith, Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-oxidation of voriconazole. *Drug Metab Dispos*, 2003. 31(5): p. 540-7.

6 Figure Legends

Figure 1 Plasma concentrations (observed individual concentrations) of intravenous and oral voriconazole versus time after the last dose with LOESS. LOESS is a locally weighted scatterplot smoothing line.

Figure 2 Observed individual concentrations (Cobs) of voriconazole versus population predicted concentrations (PRED) (2A) and versus individual predicted concentrations (IPRED) (2B); Conditional weighted residuals versus time after last dose (2C) and versus population predicted concentrations (2D). LOESS is a locally weighted scatterplot smoothing line.

7 Tables

Table 1: Patient Characteristics at Baseline

Continuous Variable	Median (Range)
Age (year)	13.0 (2.0 – 17.8)
Weight(kg)	42.6 (13.0 – 80.0)
AST (U/l)	31.0 (14.0 – 62.0)
ALT (U/l)	45.5 (11.0 – 93.0)
Intravenous dose (mg/kg/dose)	3.9 (3.5 – 6.9)
Oral dose (mg/dose)	200 (100 - 300)
Categorical Variable	n (%)
Sex	
Female	3 (21.4)
Male	11 (78.6)
Underlying Disease	
Invasive aspergillosis	8 (57.1)
Febrile neutropenia	2 (14.3)
Invasive candidiasis	2 (14.3)

Other	2 (14.3)
Drug Formulation	
Intravenous	7 (50.0)
Oral	7 (50.0)

ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase; n = number of patients

Table 2. Parameter Estimates for the Final Model with Bootstrap Validation

Parameter	Parameter Estimates (RSE%) ^a	Bootstrap ^b		
		Median	95% CI	Bias (%)
Pharmacokinetic Parameter				
CL (l/h)	7.9 (32.4)	8.0	4.3, 17.4	1.1
Vc (l)	84.3 (36.7)	78.1	44.1, 198	-7.4
Ka (1/h)	1.9 (28.9)	2.2	1.1, 6.6	11.2
Tlag (h)	0.243 (4.6)	0.248	0.221, 0.499	2.2
F	0.669 (45.1)	0.664	0.289, 1.9	-0.75
Between-Subject Variability (BSV)				
BSV CL (%)	84.5 (19.2)	80.2	46.9, 126.5	-9.9
BSV Vc (%)	56.5 (25.9)	41.1	14.1, 87.1	2.4
BSV F (%)	78.5 (14.7)	73.0	32.5, 99.3	16.2
Residual Variability				
Residual Proportional Error (%)	51.0 (10)	48.1	23.0, 79.4	-5.9

CL= systemic clearance; F= bioavailability; Ka= absorption rate; Tlag= lag time; Vc= apparent central volume of distribution.

^a Relative standard error calculated as the standard error of parameter estimate/parameter estimate x 100%.

^b Median of 912 successful bootstrap samples from the 1000 runs with prediction intervals (CI) calculated as the 2.5th and 97.5th percentiles.

8 Figures

Figure 1

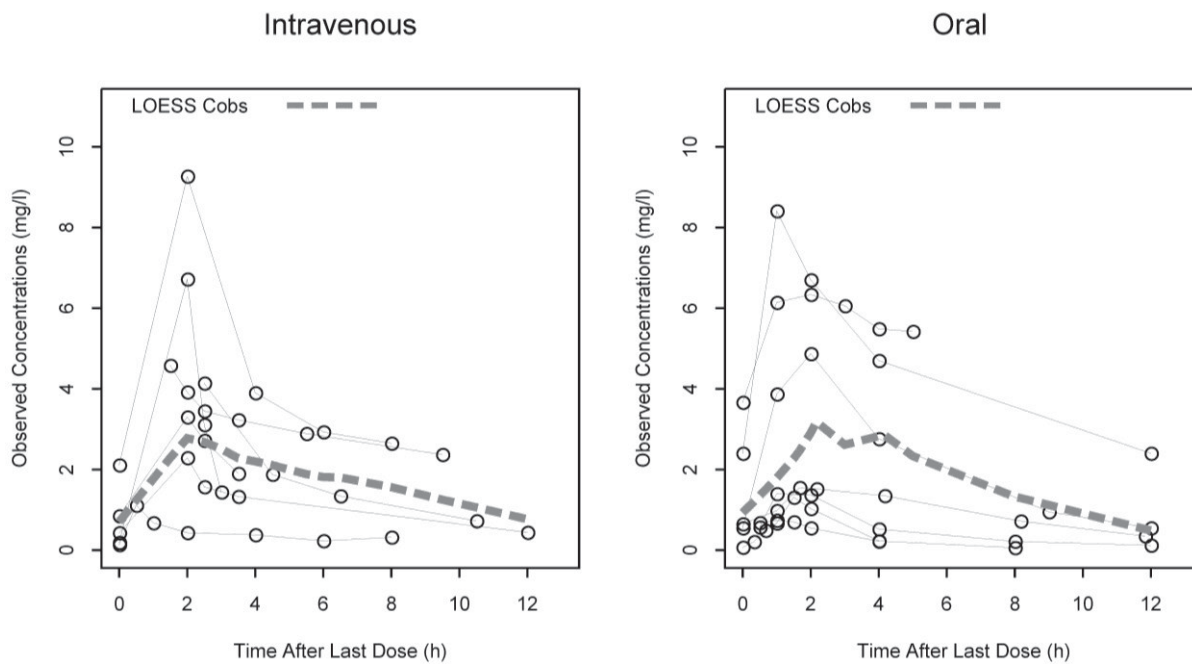
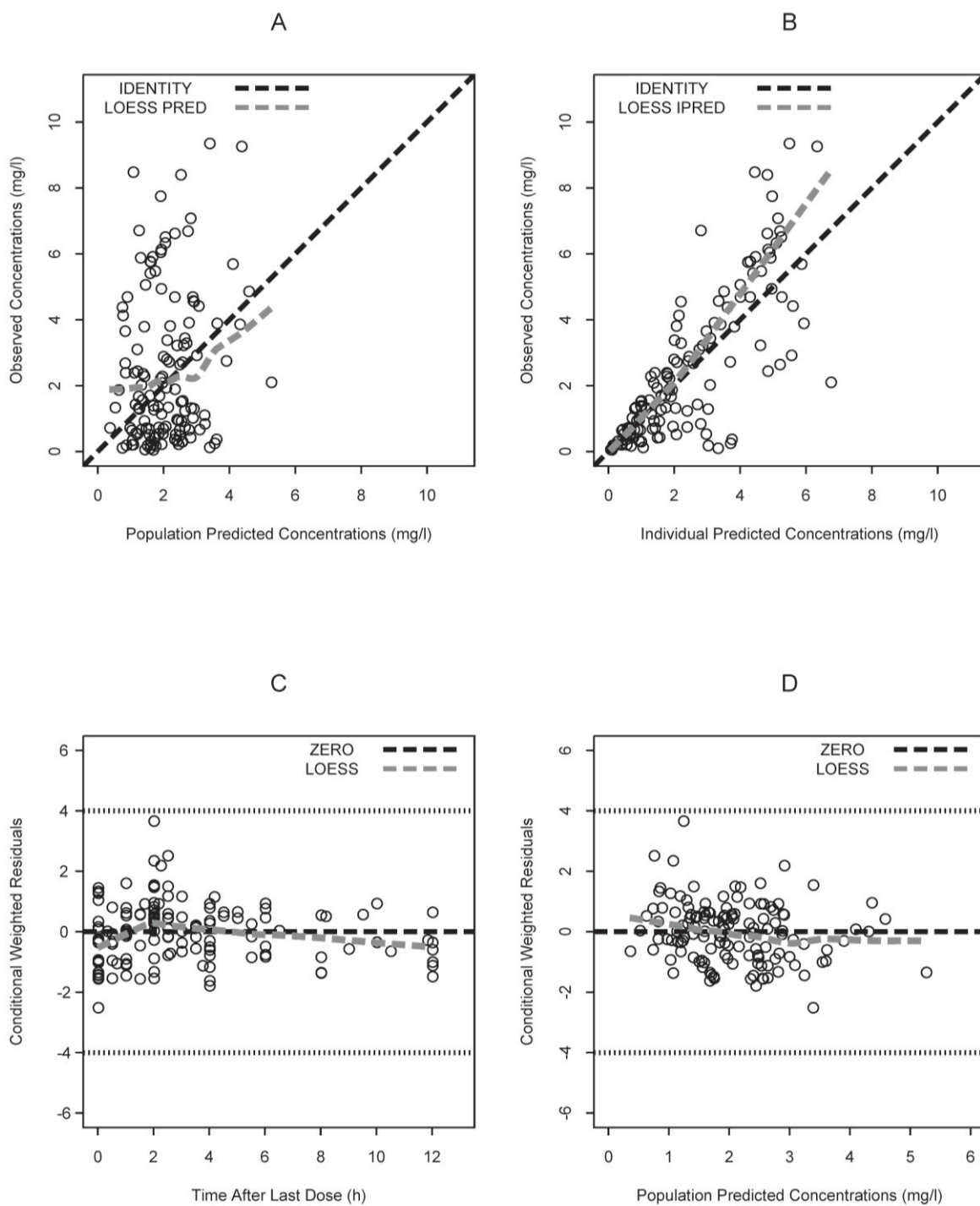


Figure 2



CHAPITRE IV

Population pharmacokinetics and bayesian estimation of tacrolimus exposure in pediatric liver transplant recipients

Nastya Kassir^{1,2,3}, Line Labbé², Jean-Romain Delaloye^{1,4}, Mohamad-Samer Mouksassi^{2,3},
Anne-Laure Lapeyraque^{1,5}, Fernando Alvarez⁵, Michel Lallier⁴, Mona Beaunoyer⁴, Yves
Théorêt^{1,6,7}, Catherine Litalien^{1,5,7}

(1) Clinical Pharmacology Unit, CHU Ste-Justine, Montreal, Quebec, Canada; (2) Faculty
of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada; (3) Pharsight - A Certara
Company, Montreal, Quebec, Canada; Departments of (4) Surgery, (5) Pediatrics, and (6)
Biochemistry, CHU Ste-Justine, Montreal, Quebec, Canada; (7) Department of
Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

Corresponding author:

Dr. Catherine Litalien

Division of Pediatric Critical Care, Department of Pediatrics

Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine

3175 chemin de la Côte Sainte-Catherine

Montréal (Québec), Canada H3T 1C5

Tel: (514) 345-4931 extension 2571

FAX: (514) 345-7731

Article soumis pour publication dans
« Clinical Pharmacology and Therapeutics »

Abstract

Aims: Objectives of this study were to develop a population pharmacokinetic (PopPK) model for tacrolimus in pediatric liver transplant patients and determine optimal sampling strategies (OSS).

Methods: Twelve-hour intensive pharmacokinetic profiles from 30 patients (age 0.4 – 18.4 years) receiving tacrolimus orally were analyzed. The PopPK model explored the following covariates: weight, age, sex, type of transplant, liver function tests, albumin, hematocrit, drug interactions, and time post-transplantation. OSS were developed, and validated with jackknife.

Results: A 2-compartment model with first-order absorption and elimination and lag time described the data. Weight was included on all pharmacokinetic (PK) parameters. Typical apparent clearance and central volume of distribution were 12.1 l/h and 31.3 l, respectively. The PopPK approach led to the development of an OSS, which allowed estimation of tacrolimus PK and area under the concentration-time curve (AUC) on the basis of a C_0 – $C_{0.5h}$ – C_{2h} sampling schedule with $\pm 20\%$ prediction error limit. The mean bias and precision of the Bayesian versus reference (trapezoidal) AUCs were -2.6% and 12.5%, respectively.

Conclusions: PopPK of tacrolimus and empirical Bayesian estimates represent an accurate and convenient method to predict tacrolimus $AUC_{(0-12)}$ in pediatric liver transplant recipients, despite high between subject variability in PK and patient demographics. The developed OSS will allow the undertaking of prospective trials to define tacrolimus target AUCs and dosing guidelines in this population.

1 Introduction

Tacrolimus (Prograf[®], Fujisawa Healthcare Inc.) is a first-line immunosuppressive agent widely used in pediatric and adult solid organ transplant recipients. Since it has a narrow therapeutic index and significant inter- and intraindividual pharmacokinetic (PK) variability, dosing individualization is essential to ensure graft survival and limit associated toxicities including life-threatening complications.[1]

Tacrolimus PK properties have been mainly studied in adults. Generally, oral bioavailability is poor and extremely variable, partly due to presystemic metabolism of tacrolimus by gastrointestinal cytochrome (CYP) P450 3A isoenzymes and removal by P-glycoprotein transport. In pediatric liver transplant patients, oral bioavailability was found to range from 5% to 77%.[2] Tacrolimus binds extensively to erythrocytes in blood while in plasma it is principally associated with α_1 -acid glycoprotein and albumin. In the liver, tacrolimus is extensively metabolized by CYP3A4 and the polymorphically expressed CYP3A5, with more than 95% of metabolites eliminated through biliary excretion.[3]

In this context, therapeutic drug monitoring has become a standard of care for tacrolimus dosing optimization. Trough concentration (C_{trough}) is commonly used to guide tacrolimus dose individualization despite its inadequacy in reflecting total drug exposure as was demonstrated by numerous studies involving solid organ transplant recipients.[4-6] Although the relationship between tacrolimus exposure and patient outcome has not been precisely defined, the last consensus report on twice-daily tacrolimus concluded that there was an urgent need to evaluate alternative strategies to C_{trough} such as area under the concentration-time curve ($AUC_{(0-12)}$), which is widely considered as the best marker for drug exposure.[1] However AUC-based monitoring implies the measurement of multiple concentration-time points over the entire dosing interval and is time-consuming, expensive, and often impractical for routine clinical practice, especially in the pediatric population.[7] Alternatively, AUC can be predicted using optimal sampling strategy (OSS).

The OSS using maximum *a posteriori* Bayesian estimators (MAP-BE) can predict individual PK parameters using a limited number of concentration-time points with flexibility in sampling time and consideration of patient characteristics. In addition, the MAP-BE approach can be made simple to use by clinicians with appropriate computer technology.[8] At present, OSS using MAP-BE has been developed for tacrolimus in adult liver and kidney transplant recipients but not in pediatrics.

To establish an OSS using MAP-BE, a population PK (PopPK) model is required. Few PopPK studies have been performed in pediatric liver transplant recipients (Table 1).[9-14] In these studies, factors that may alter tacrolimus PK have been investigated but not always simultaneously. Although numerous covariates were identified, between subject variability remained important, implicating yet unidentified factors. Furthermore, these models were derived using sparse data, mostly C_{trough} .

Therefore, the aims of this study were to develop: 1) a PopPK model for tacrolimus in pediatric liver transplant patients using rich sampling; and 2) an OSS using MAP-BE that accurately predicts tacrolimus PK parameters and $AUC_{(0-12)}$.

2 Methods

Patients and Study Design

This is a retrospective study analyzing 12-hour PK profiles performed in the pediatric liver transplant population of the Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine (Montreal, Canada) between July 2006 and May 2011. The study was approved by the Institutional Research Ethics Committee of Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine (Identification code: 3162). The need for subject consent was waived. Thirty-eight (38) intensive PK profiles obtained from 30 patients receiving tacrolimus orally twice daily as a capsule or suspension (5 mg/ml) were analyzed. All PK profiles were obtained at least three days after receiving the same dose of tacrolimus. Concentrations were obtained as part of patient clinical management. Dosage was adjusted by the liver transplant team to keep tacrolimus C_{trough} within the suggested target range of 5-15 ng/ml according to time post-transplantation and concomitant immunosuppression. However, measurement of $AUC_{(0-12)}$ was requested in some specific situations including: 1) at or around patient discharge; 2) when nephrotoxicity occurred despite C_{trough} levels within the target range; 3) when important intra-individual C_{trough} variability occurred in the absence of dose modification; and 4) at mycophenolate mofetil initiation.

Medical charts were reviewed and the following data collected: body weight, height, age, sex, type of transplant (full or cut-down liver), age of liver donor, underlying diagnosis, liver function tests (ALT, AST, GGT, albumin, and total bilirubin), serum creatinine, hematocrit, time post-transplantation, drug formulation, use of steroids, and presence of clinically relevant CYP3A4 inhibitors.

Sample Collection and Analytical Methods

Serial blood samples were collected in EDTA-containing vacutainers immediately before tacrolimus administration (C_{trough}), and after 0.5 ($C_{0.5}$), 1 (C_1), 1.5 ($C_{1.5}$), 2 (C_2), 3 (C_3), 4 (C_4), 8 (C_8), and 12 (C_{12}) hours. Tacrolimus whole blood concentrations were

determined using the microparticle enzyme immunoassay (MEIA) IMx (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). The lower and upper limits of detection were 1.5 ng/ml and 30 ng/ml, respectively. The between-run coefficients of variation were 14.10% at 5 ng/ml, 11.15% at 11 ng/ml, and 10.21% at 22 ng/ml. Three hundred forty-one (341) blood samples for determination of tacrolimus levels were obtained at steady state.

Population Pharmacokinetic Analysis

The PopPK analysis was performed using NONMEM Version 7, level 1.2 (ICON Development Solutions, Ellicott City, Maryland, USA) with the first-order conditional estimation (FOCE) and the INTERACTION option. Nonlinear mixed-effects models were used to fit the concentration-time data of tacrolimus described by typical PK compartmental models (e.g. 1- or 2-compartmental models, first-order absorption, with linear or non-linear elimination). For a 2-compartment model, PK parameters were apparent oral clearance (CL/F), apparent volume of distribution (V_1/F), Intercompartmental clearance (Q_2/F), apparent peripheral volume (V_2/F), and first-order absorption rate constant (k_a). Between subject variability (BSV) and between occasion variability (BOV) in PK parameters were modeled as exponential random effect models in order to positively constrain the individual parameter values, which were thus assumed to follow a log-normal distribution. Covariance between parameters was also examined. Additive, proportional and combined error structures were tested during modeling of residual random error. Model evaluation and selection were based on pertinent graphical representations of goodness of fit and on the minimization of $-2 \times \text{Log (Likelihood)}$, which was presented as the objective function value (OFV). A decrease in the OFV of 3.84 ($P=0.05$) was considered significant to include a parameter in the model. Allometric scaling was applied to the base model [15, 16] that is:

$$\begin{aligned} \text{CL/F} &= \theta_1 * (\text{WT}/\text{WT}_{\text{median}})^{0.75}, \quad \text{Q}_2/\text{F} = \theta_3 * (\text{WT}/\text{WT}_{\text{median}})^{0.75}, \\ \text{V}_1/\text{F} &= \theta_2 * (\text{WT}/\text{WT}_{\text{median}})^1, \quad \text{V}_2/\text{F} = \theta_4 * (\text{WT}/\text{WT}_{\text{median}})^1 \\ k_a &= \theta_5 * (\text{WT}/\text{WT}_{\text{median}})^{-0.25} \end{aligned}$$

where θ is the typical value of the parameter in a child with median weight (WT) of the study population.

Covariate Analysis and Sources of Variability

Covariate analysis was carried out using visual inspection followed by a formal evaluation in NONMEM. The latter consisted of a stepwise forward additive approach ($P=0.05$) followed by backward elimination ($P=0.01$). Potential covariates that were evaluated were: age, sex, type of transplant (full or cut-down liver), age of liver donor, time post-transplantation, liver function tests (ALT, AST, GGT, and total bilirubin), albumin, renal function (serum creatinine and creatinine clearance), hematocrit, use of steroids, presence of clinically relevant CYP3A4 inhibitors, and drug formulation. Some of the continuous covariates were also tested as categorical variables (Table 2).

Model Evaluation

The performance of the final PopPK model was evaluated with diagnostic plots and shrinkage of PopPK parameters. In order to assess whether the final model could be used to estimate individual PK parameters based on population means and sparse PK data, changes in the estimates of BSV, residual variability, and shrinkage in individual random effects were evaluated.[17] Shrinkage values of $\leq 20\%$ indicate good individual estimates of a parameter of interest, while larger shrinkage values show that individual Bayesian estimates “shrunk” towards the population mean values.

In addition, the stability and precision of the model were evaluated using a nonparametric bootstrap within Perl-Speaks-NONMEM (PsN V3.4.2).[18] The bootstrap technique involves resampling from the original data with each individual subject considered as a sampling unit. One thousand replicates of the data were generated by bootstrap to obtain the median and 95% percentile of PK parameters and the fixed- and random-effect parameters. The bias of each parameter was calculated by computing the

difference between median value derived from the bootstrap and the final parameter estimate.

Building and Validation of Optimal Sampling Strategy Using Bayesian Estimator

Using the final model, the initial time points for the OSS were obtained with the WinPOPT[®] (Version 1.2) software. Limited sampling strategies among combinations of a maximum of four sampling time points, including C_{trough} , and up to 4 hours post-drug administration were tested. The selection of the best strategy used the determinant of the Fisher information matrix as a measure of the informativeness of the design. In addition, the best 3 combinations of sampling time points previously identified ($C_{\text{trough}}-C_1-C_4$, $C_{\text{trough}}-C_{0.5}-C_2-C_4$, $C_{\text{trough}}-C_1-C_2-C_4$) using MRA in a subset of the actual data were also selected for further evaluation.[19]

Evaluation and validation of the OSS identified by WINPOPT as well as the 3 MRA-derived combinations of sampling times were performed using a jackknife technique in NONMEM. This approach consists of building n reference populations of $n-1$ patients by sequentially excluding one patient at a time, from the analysis. For each reference population, the four different MAP-BE sampling time points were used to predict the CL/F and the resulting $AUC_{(0-12)}$ of the excluded patient. The predictive performance was evaluated by calculating bias (relative mean prediction error, ME(%)) and precision (relative root mean squared prediction error, RMSE(%)) using the following equations [20]:

$$ME(\%) = 100 * \frac{1}{n} \left(\sum \frac{\text{Pred} - \text{Obs}}{\text{Obs}} \right)$$

$$RMSE(\%) = 100 * \left(\sqrt{\frac{1}{n} \sum \left(\frac{\text{Pred} - \text{Obs}}{\text{Obs}} \right)^2} \right)$$

where Pred is the Bayesian $AUC_{(0-12)}$ estimate, Obs is the reference $AUC_{(0-12)}$ value obtained using the linear trapezoidal method applied to the 12-hour intensive PK profiles, and n is the number of patients.

3 Results

Thirty-eight 12-hour intensive PK profiles obtained from 30 liver transplant recipients were available for this study. Patients' characteristics are summarized in Tables 2 and 3. Patients had a wide variety of diagnoses leading to whole or cut-down liver transplantation, including biliary atresia (n = 12), tyrosinemia (n = 8), North American Indian childhood cirrhosis (n = 3), fulminant hepatitis (n = 2), Alagille syndrome (n = 2), histiocytosis X (n = 1), sclerosing cholangitis (n = 1), and auto-immune hepatitis (n = 1).

A total of 341 plasma samples were available for the population PK analysis. A median of nine concentration-time points were obtained for each patient (range: 8 - 10). Observed concentration-time profiles of tacrolimus are plotted in Figure 1.

Population Pharmacokinetics

Among the structural models tested, a 2-compartment model with first-order absorption and first-order elimination and lag time adequately fit the concentration data of oral tacrolimus. More complex absorption models were not supported by the data (transit absorption models). BSV was included on CL/F, V_1/F , Q_2/F . A proportional error model was used for residual unexplained variability. BOV was not included in the model.

Covariates Analysis and Sources of Variability

Visual inspection of the relationships between individual random effects of CL/F and V_1/F and covariates showed trends for liver function test (ALT), and concomitant administration of CYP3A4 inhibitors. A thorough covariate analysis was performed within NONMEM and none of the tested covariates explained the variability of PK parameters of tacrolimus in pediatric liver transplant recipients.

The final POPPK model was described by the following equations:

$$CL/F \text{ (l/h)} = 12.1 \times (WT/20)^{0.75}$$

$$V_{1/F} \text{ (l)} = 31.3 \times (\text{WT}/20)^1$$

$$Q_{2/F} \text{ (l/h)} = 30.7 \times (\text{WT}/20)^{0.75}$$

$$V_{2/F} \text{ (l)} = 290 \times (\text{WT}/20)^1$$

$$K_a \text{ (1/h)} = 0.342 \times (\text{WT}/20)^{-0.25}$$

$$t_{\text{lag}} \text{ (h)} = 0.433$$

where CL/F is apparent oral clearance, $V_{1/F}$ is apparent volume of distribution, $Q_{2/F}$ is intercompartmental clearance, $V_{2/F}$ is apparent peripheral volume of distribution, k_a is first-order absorption rate constant, t_{lag} is lag time, and WT is body weight.

Population parameter estimates along with between subject and residual variabilities are reported in Table 4. Typical population CL/F and $V_{1/F}$ for a child weighing 20 kg were 12.1 l/h and 31.3 l, respectively.

Model Evaluation

The performance of the final population PK model was evaluated with diagnostic plots and shrinkage of population PK parameters. The overall fit of observed and predicted tacrolimus concentrations based on population and individual parameter estimates are presented in Figures 2A and 2B, respectively. Shrinkages to the mean of the individual random effects of CL/F and $V_{1/F}$ were low (less than 12%). Conditional weighted residuals were homogeneously distributed around 0 (Figures 2C and 2D), suggesting no bias in the prediction of tacrolimus concentrations. Bootstrap resampling strategies were used to validate the PopPK model. A total of 939 runs were successfully minimized with covariance step. Medians of PK parameters derived with the bootstrap resampling analysis were consistent with those derived from the original analysis with bias <9% (Table 4), demonstrating accuracy of predictions as well as model stability.

Building and Validation of a Bayesian Estimator

The PopPK parameters obtained from the final model were used as priors for the development of the MAP-BE. The OSS schedule, selected using the Fisher information matrix, was 0, 0.5, and 2h post-dose with relative standard errors of 5.8% and 22.6% on CL/F and V_1/F , respectively. $AUC_{(0-12)}$ bias and precision obtained during the validation procedure were -2.57% and 12.49%, respectively (Table 5). Typical fits for the estimation of reference parameters (considering all concentrations) and Bayesian estimation (with sampling times at 0, 0.5, and 2h post-dose) are illustrated in Figure 3. Moreover, the predictive performance of the MAP-BEs using multiple regression analysis (MRA) derived combinations of sampling times are reported in Table 5. Their relative bias and precision were below $\pm 10\%$. AUC estimation with these sampling times seemed to be more accurate than the schedule identified with WINPOPT, however the MRA-derived sampling times only targeted CL/F prediction while those identified by WINPOPT optimized for all PK parameters.

For comparison purposes, predictive performance of limited sampling strategies developed with MRA by Delaloye et al.[19] are also presented in Table 5. The precision of both MAP-BE and MRA for the same sampling times ($C_{\text{trough}}-C_1-C_4$, $C_{\text{trough}}-C_{0.5}-C_2-C_4$, $C_{\text{trough}}-C_1-C_2-C_4$) appeared to be similar. Although bias with both approaches was low, MRA had the tendency to underestimate $AUC_{(0-12)}$.

4 Discussion

To the best of our knowledge, this study is the first maximum *a posteriori* Bayesian estimator for the prediction of tacrolimus exposure in pediatric liver transplant recipients.

A 2-compartment model with first-order absorption and elimination best fitted the concentration-time profiles of tacrolimus at steady state in the study population. This is in contrast with other PopPK studies in pediatric liver transplant recipients where tacrolimus PK followed a 1-compartment model. The use of trough concentrations in these studies precluded the development of multi-compartment models whereas in the current analysis, intensive PK profiles were available.[9-13] After inclusion of weight in the base model, none of the tested covariates significantly described the variability in PK parameters. This model allowed a precise estimation of tacrolimus clearance with a relative standard error of 10%.

Growth and development usually described by demographic factors such as size and age, respectively, contribute most of the variance to drug PK through the pediatric age span. In the present study, body weight was included on all PK parameters as an allometric fixed term to account for the effect of growth.[16, 21] The impact of development on tacrolimus PK in pediatric liver transplant recipients is complex to evaluate as its total clearance is influenced by both recipient's and donor's characteristics. These include among others: 1) recipient's (i.e., patient's) intestinal metabolism and transporter activity maturation and CYP3A5 genotype; 2) donor's hepatic metabolism which depends at least on the donor's age and CYP3A5 genotype; and 3) the ratio of liver transplant size to recipient's liver volume or recipient's body weight. Also, the influence of recipient's age on the metabolic function of the transplant liver is currently unknown. In addition, the maturation of intestinal and hepatic CYP3A is expected to be essentially completed by the end of the first year of life and considering that only 4 patients less than 1 year were included, it was not possible to study the developmental effects using the sigmoid E_{\max} model (e.g., Hill equation) with postmenstrual age (PMA) which allows a description of the gradual maturation of clearance during the first year of life. As such, the impact of hepatic

and intestinal enzyme maturation on tacrolimus PK in this population could not be appropriately evaluated.

Since tacrolimus is mainly metabolized by CYP3A isoenzymes, hepatic dysfunction can significantly decrease its elimination; indeed some authors have reported that liver function tests influence tacrolimus clearance.[9, 11, 12] However, the current final model does not include these covariates, which may be due to the relatively small incidence of hepatic impairment (17%) as well as the absence of severe hepatic dysfunction among the study population.

Time post-transplantation has been shown to affect tacrolimus clearance. Some authors found that clearance increased within the immediate postoperative period possibly due to recovery from surgery [9, 13]; others have reported decreased clearance with time post-transplantation [12] potentially associated with steroids weaning. In the current study, time post-transplantation had no effect; it is of interest to note that no included patients were studied during the first two weeks after transplantation.

Donor's age and transplant type were also evaluated, as they may influence tacrolimus PK in pediatric liver transplant recipients. In the present study, both covariates were not found to be significant. In the contrary, Staatz et al. [10] found that children who received cut-down liver from an adult exhibited an average 7-fold lower tacrolimus clearance compared to those who received a whole liver from a child donor. The authors postulated that the transplant organ retains the metabolic characteristics of the donor and that an adult donor liver has lower drug clearance than a child donor liver. If age of the donor had been included in the model by Staatz et al., type of transplant may have not been identified as a significant covariate.

The concomitant use of steroids has the potential to increase tacrolimus elimination by inducing CYP3A4.[22] In this sense, the results reported in the literature are contradictory. While some authors found that steroids may induce CYP3A4, other studies have suggested decreased tacrolimus metabolism. The effect of concomitant steroids administration could not be demonstrated in this study which is in agreement with the

findings from other pediatric studies.[12, 23] Hematocrit and albumin concentrations were also tested as potential covariates as tacrolimus accumulates in erythrocytes and is highly bound to plasma proteins. As such, low hematocrit and albumin concentrations are expected to result in a reduction in total drug concentration in whole blood and an increase in total clearance. Similar to Garcia Sanchez et al., hematocrit and albumin were not found to be significant covariates. This is in opposition to results found by Zhao et al. where clearance of tacrolimus was significantly higher in patients with low levels of hematocrit (< 33%). Albumin was not tested in the latter study.

The estimated PK parameter values using the final model are close to those previously reported in pediatric liver transplant recipients.[9, 10, 12, 13] A typical pediatric patient (WT = 20 kg) would have CL/F and total volume of distribution (V_d/F), which is the sum of V_1/F and V_2/F , of 12.1 l/h and 321.3 l, respectively. These values are similar to those previously reported for CL/F (4.6 – 13.1 l/h) [9, 12] and V_d/F (196.1 – 617 l).[9, 10, 13].

Between subject variabilities were 55.6% and 126.1% for CL/F and V_1/F , respectively, and were in the range of previously reported variabilities for CL (24.3 – 110 %) and V_1/F (27.4 – 297 %).[9-14] Several reasons could potentially explain the remaining BSV. It is now well recognized that CYP3A5 polymorphism plays an important role in the absorption and metabolism of tacrolimus.[9, 24] Unfortunately, the impact of this genetic variation could not be tested as CYP3A5 genotypes of neither donors nor recipients were available. Moreover, BSV on CL/F could be attributed to the extremely variable tacrolimus bioavailability (3 to 77%).[2] Furthermore, half of the patients received the drug as an extemporaneously compounded oral suspension prepared by CHU Ste-Justine hospital [25] or community drugstores (possibly using a different reconditioning method), for which bioavailability is unknown.

As recommended by the U.S. Food and Drug Administration [26], the stability and precision of the PopPK model were evaluated using a nonparametric bootstrap. The results

of this analysis demonstrated the model stability (93.9% successful convergence) as well as the accuracy of the estimated parameters (bias <9%).

In a final step, a maximum *a posteriori* Bayesian estimator was developed and validated using the jackknife technique for the prediction of tacrolimus exposure in pediatric liver transplant recipients. Optimal sampling strategies involved a limited number of blood samples within a short period of time after drug administration (4h) allowing for transferability to routine patient care. Because C_{trough} checks for compliance, helps identify patients with high tacrolimus clearance, and is a commonly used marker by clinicians, it was included in all tested schedules.[27, 28] Using the design with 3 sampling times (0, 0.5, and 2h) proposed by WINPOPT, $AUC_{(0-12)}$ bias and precision obtained during the validation procedure were below 15% with respect to the reference $AUC_{(0-12)}$ values. However, the 95% confidence intervals for bias and precision exceeded the acceptable 20% limit and this is not surprising given that the D-optimal design minimizes total variance for all parameter estimates.

Since the best marker for drug exposure is AUC, which is related to clearance, different OSS were evaluated to optimize the Bayesian estimation of individual CL/F. In this context, the sampling combinations previously reported based on MRA ($C_{\text{trough}}-C_1-C_4$, $C_{\text{trough}}-C_{0.5}-C_2-C_4$, $C_{\text{trough}}-C_1-C_2-C_4$) for the estimation of tacrolimus AUC in pediatric liver transplant recipients were tested with MAP-BE.[19] The limited sampling strategy using MAP-BE based on predose, 1h and 4h post-dose estimated tacrolimus AUC with $\pm 20\%$ prediction error limit. The mean bias and precision (95% confidence interval) of this design were -1.93% (-14.90 to 15.34 %) and 8.44% (0.60 to 17.59 %), respectively, which is clinically acceptable predictive performance. Inclusion of a fourth sample resulted in further improvement of both bias and precision but impairs practical application.

The comparison of the predictive performance of both MAP-BE and MRA for the same sampling times shows that both approaches can accurately estimate tacrolimus exposure in pediatric liver transplant recipients. However, even though precision was

similar, MRA had the tendency to underestimate $AUC_{(0-12)}$ with a 95% confidence interval for bias excluding zero.

Although MRA results in a simple equation, it can only be used for the estimation of a single PK parameter with a near exactly similar dosing schedule and requires precise sampling times. In contrast, MAP-BE allows the description of the PK profile and the estimation of PK parameters, considering patients characteristics, with flexibility of blood sampling times and number making this method compatible with real-life situations.[29] Moreover, Bayesian predictions can improve as more patient-specific data is added to the population model.

The optimal sampling strategies developed in this study were based on data from pediatric liver transplant recipients and as such can only be applied to the same population. Transferability of these models to other transplant types (kidney, heart...) could be envisioned following proper validation in these groups. Furthermore, these models should not be applied for the estimation of tacrolimus exposure in young infants (< 1 year), as there were only 4 patients in this age group among the study population, and in early post-transplantation, as no included patients were studied during the first two weeks after transplantation. In conclusion, PopPK of tacrolimus and empirical Bayesian estimates represent an accurate and convenient method to predict tacrolimus $AUC_{(0-12)}$ in pediatric liver transplant recipients, despite high between subject variability in PK and patient demographics. The developed OSS will allow the undertaking of prospective trials to define tacrolimus target AUCs and dosing guidelines in this population and to evaluate the efficacy of alternative strategies to C_{trough} -based monitoring in order to prevent graft rejection while minimizing toxicity events.

5 Acknowledgements

Financial support came from the Research Centre of Centre Hospitalier Universitaire Ste-Justine. L. Labbé was the recipient of an Rx&D/CIHR Health Research Foundation Career Award in health sciences. We thank Carole Viau for her technical assistance. We also thank the nursing staff of the Multispeciality Clinic and medical technologists at CHU Ste-Justine for their help with sample collection and analysis, respectively.

6 References

1. Wallemacq P, Armstrong VW, Brunet M, Haufroid V, Holt DW, Johnston A, Kuypers D, Le Meur Y, Marquet P, Oellerich M, Thervet E, Toenshoff B, Undre N, Weber LT, Westley IS, Mourad M. Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference. *Ther Drug Monit.* 2009;31:139-52.
2. Wallemacq PE, Furlan V, Moller A, Schafer A, Stadler P, Firdaus I, Taburet AM, Reding R, Clement De Clety S, De Ville De Goyet J, Sokal E, Lykavieris L, Van Leeuw V, Bernard O, Otte JB, Undre NA. Pharmacokinetics of tacrolimus (FK506) in paediatric liver transplant recipients. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1998;23:367-70.
3. Wallemacq PE, Verbeeck RK. Comparative clinical pharmacokinetics of tacrolimus in paediatric and adult patients. *Clin Pharmacokinet.* 2001;40:283-95.
4. Claeys T, Van Dyck M, Van Damme-Lombaerts R. Pharmacokinetics of tacrolimus in stable paediatric renal transplant recipients. *Pediatr Nephrol.* 25:335-42.
5. Filler G, Feber J, Lepage N, Weiler G, Mai I. Universal approach to pharmacokinetic monitoring of immunosuppressive agents in children. *Pediatr Transplant.* 2002;6:411-8.
6. Montini G, Ujka F, Varagnolo C, Ghio L, Ginevri F, Murer L, Thafam BS, Carasi C, Zacchello G, Plebani M. The pharmacokinetics and immunosuppressive response of tacrolimus in paediatric renal transplant recipients. *Pediatr Nephrol.* 2006;21:719-24.
7. Ting LS, Villeneuve E, Ensom MH. Beyond cyclosporine: a systematic review of limited sampling strategies for other immunosuppressants. *Ther Drug Monit.* 2006;28:419-30.
8. Barrett JS, Mondick JT, Narayan M, Vijayakumar K, Vijayakumar S. Integration of modeling and simulation into hospital-based decision support systems guiding pediatric pharmacotherapy. *BMC medical informatics and decision making.* 2008;8:6.

9. Fukudo M, Yano I, Masuda S, Goto M, Uesugi M, Katsura T, Ogura Y, Oike F, Takada Y, Egawa H, Uemoto S, Inui K. Population pharmacokinetic and pharmacogenomic analysis of tacrolimus in pediatric living-donor liver transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;80:331-45.
10. Staatz CE, Taylor PJ, Lynch SV, Willis C, Charles BG, Tett SE. Population pharmacokinetics of tacrolimus in children who receive cut-down or full liver transplants. *Transplantation.* 2001;72:1056-61.
11. Sam WJ, Aw M, Quak SH, Lim SM, Charles BG, Chan SY, Ho PC. Population pharmacokinetics of tacrolimus in Asian paediatric liver transplant patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2000;50:531-41.
12. Garcia Sanchez MJ, Manzanares C, Santos-Buelga D, Blazquez A, Manzanares J, Urruzuno P, Medina E. Covariate effects on the apparent clearance of tacrolimus in paediatric liver transplant patients undergoing conversion therapy. *Clin Pharmacokinet.* 2001;40:63-71.
13. Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, McMichael J, Lever J, Burckart G, Starzl T. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet.* 1995;29:404-30.
14. Wallin JE, Bergstrand M, Wilczek HE, Nydert PS, Karlsson MO, Staatz CE. Population pharmacokinetics of tacrolimus in pediatric liver transplantation: early posttransplantation clearance. *Ther Drug Monit.* 2011;33:663-72.
15. Anderson BJ, Allegaert K, Holford NH. Population clinical pharmacology of children: general principles. *Eur J Pediatr.* 2006;165:741-6.
16. Anderson BJ, Allegaert K, Holford NH. Population clinical pharmacology of children: modelling covariate effects. *Eur J Pediatr.* 2006;165:819-29.
17. Karlsson MO, Savic RM. Diagnosing model diagnostics. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;82:17-20.

18. Henderson AR. The bootstrap: a technique for data-driven statistics. Using computer-intensive analyses to explore experimental data. *Clin Chim Acta*. 2005;359:1-26.
19. Delaloye JR, Kassir N, Lapeyraque AL, Alvarez F, Lallier M, Beaunoyer M, Labbe L, Theoret Y, Litalien C. Limited sampling strategies for monitoring tacrolimus in pediatric liver transplant recipients. *Ther Drug Monit*. 2011;33:380-6.
20. Sheiner LB, Beal SL. Some suggestions for measuring predictive performance. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1981;9:503-12.
21. Holford NH. A size standard for pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*. 1996;30:329-32.
22. Kim JS, Aviles DH, Silverstein DM, Leblanc PL, Matti Vehaskari V. Effect of age, ethnicity, and glucocorticoid use on tacrolimus pharmacokinetics in pediatric renal transplant patients. *Pediatr Transplant*. 2005;9:162-9.
23. Zhao W, Elie V, Roussey G, Brochard K, Niaudet P, Leroy V, Loirat C, Cochat P, Cloarec S, Andre JL, Garaix F, Bensman A, Fakhoury M, Jacqz-Aigrain E. Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of tacrolimus in de novo pediatric kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther*. 2009;86:609-18.
24. Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clin Pharmacokinet*. 2010;49:141-75.
25. Jacobson PA, Johnson CE, West NJ, Foster JA. Stability of tacrolimus in an extemporaneously compounded oral liquid. *Am J Health Syst Pharm*. 1997;54:178-80.
26. U.S. Department of Health Services, Food and drug Administration. Guidance for Industry Population Pharmacokinetics. February 1999 [updated 31 January 2012]; Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM072137.pdf>.

27. David OJ, Johnston A. Limited sampling strategies for estimating cyclosporin area under the concentration-time curve: review of current algorithms. *Ther Drug Monit.* 2001;23:100-14.
28. Hoyer PF. Therapeutic drug monitoring of cyclosporin A: should we use the area under the concentration-time curve and forget trough levels? *Pediatr Transplant.* 2000;4:2-5.
29. van der Meer AF, Marcus MA, Touw DJ, Proost JH, Neef C. Optimal sampling strategy development methodology using maximum a posteriori Bayesian estimation. *Ther Drug Monit.* 2011;33:133-46.

7 Figure Captions

Figure 1. Whole blood tacrolimus concentrations versus time after last dose in pediatric liver transplant recipients. LOESS is a locally weighted scatterplot smoothing line.

Figure 2. Observed individual concentrations of tacrolimus versus population predicted concentrations in the final model (2A); Observed individual concentrations of tacrolimus versus individual predicted concentrations in the final model (2B); Conditional weighted residuals versus time after last dose (2C), and versus population predicted concentrations (2D). LOESS is a locally weighted scatterplot smoothing line.

Figure 3. Simulation of tacrolimus concentrations for typical subjects with low bias (3A, 3B) or high bias (3C, 3D). Full circles represent observed concentrations, full lines represent prediction using all available concentrations, and dashed lines represent prediction with 3 sampling times ($C_{\text{trough}}-C_{0.5}-C_2$) and MAP-BE.

8 Tables

Table 1. Mean Population Pharmacokinetic Parameters for Tacrolimus in Pediatric Liver Transplant Recipients

Ref	n	Pharmacokinetic parameters	BSV CL (%)	BSV V (%)
(12) ^a	18	$CL/F = 10.4 * (WT/70)^{0.75} * e^{(-0.00032 * T)} * e^{(-0.05 / BILI)} * (1 - 0.079 * ALT)$ (l/h)	24.3	NR
(11) ^a	20	$CL = 1.46 * (1 + 0.339 * (AGE - 2.25))$ (l/h) $V = 39.1 * [1 + 4.57 * (BSA - 0.49)]$ (l) BILI < 200 µmol/l: $F = 0.197 * (1 + 0.0887 * WT - 11.4)$ (%) BILI ≥ 200 µmol/l: $F = 0.197 * (1 + 0.0887 * WT - 11.4) * 1.61$ (%)	33.5	33.0
(13) ^a	33	$CL = (0.0749 + 0.000457 * POD) * (15 * (WT/15)^{0.290})$ (l/h) $V = 2.76 * (15 * (WT/15)^{0.290})$ (l) F = 19% (fixed)	52.1	27.4
(10) ^b	35	$CL/F_{\text{whole liver}} = 44$ (l/h) $CL/F_{\text{cut-down liver}} = 5.75$ (l/h) $V/F = 617$ (l)	110	297
(14) ^c	73	$CL/F = 0.148 + (1.37 * POD^{3.78}) / (5.38^{3.78} + POD^{3.78})$ (l/h/kg ^{0.75}) $V/F = 27.2$ (l/kg)	NR	90
(9) ^{a,d}	130	$CL/F = (0.134 * 1.8^{0.1 * FLAG} + 0.0181 * 2^{0.1 * FLAG} * XPOD) * 8.6 * (WT/8.6)^{0.341} * e^{(-0.0358 * AST/55)}$ (l/h/kg) ^c $V/F = 17.1 * 8.6 * (WT/8.6)^{0.341}$ (l)	48.7	82.6

ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase; BILI = bilirubin concentration; BSA = body surface area; BSV = between-subject variability; CL = clearance; CL/F = apparent oral clearance; F = bioavailability; HF = hepatic function; n = number of patients; NR = not reported; POD = postoperative day; T = time after initiation of treatment; V = volume of distribution; WT = body weight.

^a Tacrolimus whole blood concentrations were determined using the microparticle enzyme immunoassay (MEIA) by use of an IMx analyzer

^b Tacrolimus blood concentrations were measured using a validated high-performance liquid chromatography tandem mass–spectrometry assay specific for the parent drug

^c Tacrolimus blood concentrations were measured using the EMIT 2000 assay (Siemens Healthcare) and a validated high-performance liquid chromatography tandem mass–spectrometry assay specific for the parent drug

^a if POD was <21 , then XPOD = POD; otherwise, XPOD = 21; if the donor was a *CYP3A5*^{*}1 allele carrier, then hFLAG= 1; otherwise, 0; and if the intestinal MDR1 mRNA level was >0.22 amol/ μ g total RNA, then iFLAG = 1; otherwise, 0.

Table 2. Patient Characteristics at Baseline: Categorical Covariates

Categorical Variables	n (%)
Sex	
Female	13 (43.3)
Male	17 (56.7)
Type of Transplant	
Cut-down liver	20 (66.7)
Full liver	10 (33.3)
CYP3A4 Inhibitors ^a	
Yes	8 (26.7)
No	22 (73.3)
Steroids ^b	
Yes	20 (66.7)
No	10 (33.3)
Hepatic Impairment ^c	
Yes	5 (16.7)
No	25 (83.3)
Drug Formulation	
Capsule	15 (50)
Solution	15 (50)
Transformation of Continuous into Discrete Covariates (n at Baseline)	
Time Post-Transplantation	
≤ 28 days	8
> 28 days	22
ALB (U/l) ^d	
> 32	23
≤ 32	7
ALT (U/l) ^d	
< 45	15
≥ 45	15
Hematocrit (%) ^d	
< 33	7
≥ 33	23
ALB= albumin; ALT= alanine aminotransferase, n= number of patients	
^a CYP3A4 inhibitors included amlodipine, lansoprazole, and diltiazem	
^b Prednisone was the steroid used in this study	
^c Hepatic impairment was defined as total bilirubin >68.4 mmol/l and/or ALT >2 times the upper limit for the age group (2*45= 90 U/l)	
^d The cut-off ranges for these transformations were those previously published (12)	

Table 3. Patient Characteristics at Baseline: Continuous Covariates

Continuous Variable	Median (Range)
Age (year) ^a	7.3 (0.4 – 18.4)
Weight (kg)	20.4 (4.5 – 57.8)
BSA (m ²)	0.8 (0.2 – 1.6)
ALB (g/l)	36.0 (26.0 – 43.0)
AST (U/l)	33.0 (16.0 – 68.0)
ALT (U/l)	44.5 (14.0 – 140.0)
GGT (U/l)	54.5 (8 - 432)
Total Bilirubin (μmol/l)	11.0 (4.0 – 25.0)
Hematocrit (%)	34.5 (25.0 – 44.1)
Serum Creatinine (mg/dl)	0.4 (0.1 – 0.9)
Creatinine Clearance (ml/min) ^b	155.6 (58.4 – 360.3)
Time Post-Transplantation (months)	2.5 (0.5 – 188.2)

ALB = albumin; ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase; BSA = body surface area; GGT = γ -glutamyl transferase

^a 8 patients were less than 2 years old among which 4 were less than 1 year old

^b Creatinine clearance was calculated based on the Schwartz equation for patients 18 years and under, and Cockcroft-Gault for patients over 18 years old

Table 4. Parameter Estimates for the Final Model with Bootstrap Validation

Parameter	Parameter Estimates (RSE%) ^a	Bootstrap ^b		
		Median	95% CI	Bias (%)
Pharmacokinetic Parameter^c				
CL/F (l/h)	12.1 (10.1)	12.08	10.1, 14.9	-0.17
V ₁ /F (l)	31.3 (42.8)	30.87	12.3, 70.3	-1.37
Q ₂ /F (l/h)	30.7 (29.3)	28.9	13.1, 53.1	-5.86
V ₂ /F (l)	290 Fix			
Ka (1/h)	0.342 (33.3)	0.342	0.142, 0.656	0.00
Tlag (h)	0.433 (4.2)	0.4325	0.383, 0.456	-0.12
Between-Subject Variability (BSV)				
BSV CL/F (%)	55.6 (9.6)	54.39	43.82, 65.12	-4.27
BSV V ₁ /F (%)	126.1 (18)	120.50	69.50, 165.23	-8.68
BSV Q ₂ /F (%)	84.0 (21.3)	81.0	44.61, 141.77	-7.07
Residual Variability				
Residual Proportional Error (%)	20.3 (12.1)	20.21	15.3, 24.9	-0.44
CL/F= apparent oral clearance; F= bioavailability; Ka= absorption rate; Q ₂ /F= apparent distribution clearance; Tlag= lag time; V ₁ /F= apparent central volume of distribution; V ₂ /F= apparent peripheral volume of distribution.				
^a Relative standard error calculated as the standard error of parameter estimate/parameter estimate x 100%.				
^b Median of 939 successful bootstrap samples from the 1000 runs with prediction intervals (CI) calculated as the 2.5 th and 97.5 th percentiles.				
^c Body weight was included in all pharmacokinetic parameters as an allometric fixed term				
^d V ₂ /F was fixed to a value estimated from a previous run in order to stabilize the model				

Table 5. Comparison of the Predictive Performance Between MAP-BE and MRA

Optimal Sampling Times (h)	MAP-BE ^a		MRA ^b	
	ME% (95% CI)	RMSE% (95% CI)	ME% (95% CI)	RMSE% (95% CI)
C ₀ -C _{0.5} -C ₂	-2.57 (-30.94 , 17.43)	12.49 (0.71 , 31.16)	--	--
C ₀ -C ₁ -C ₄	-1.93 (-14.90 , 15.34)	8.44 (0.60 , 17.59)	-4.98 (-8.37 , -1.59)	8.29 (3.29 , 11.28)
C ₀ -C _{0.5} -C ₂ -C ₄	-1.93 (-14.66 , 10.94)	7.37 (1.02 , 15.85)	-6.15 (-9.14 , -3.16)	8.48 (4.25 , 11.22)
C ₀ -C ₁ -C ₂ -C ₄	-2.78 (-14.38 , 10.91)	7.42 (0.14 , 15.04)	-5.07 (-8.34 , -1.81)	8.15 (3.22 , 11.07)

CI= 95% confidence interval; MAP-BE= maximum *a posteriori* Bayesian estimators; ME%= relative mean prediction error; MRA= multiple regression analysis; RMSE%= relative root mean squared prediction error.

^a Validation in the present study was carried out by the jackknife technique

^b Validation in the Delaloye et al. study was carried out with an independent set of patients (validation group) (14)

9 Figures

Figure 1

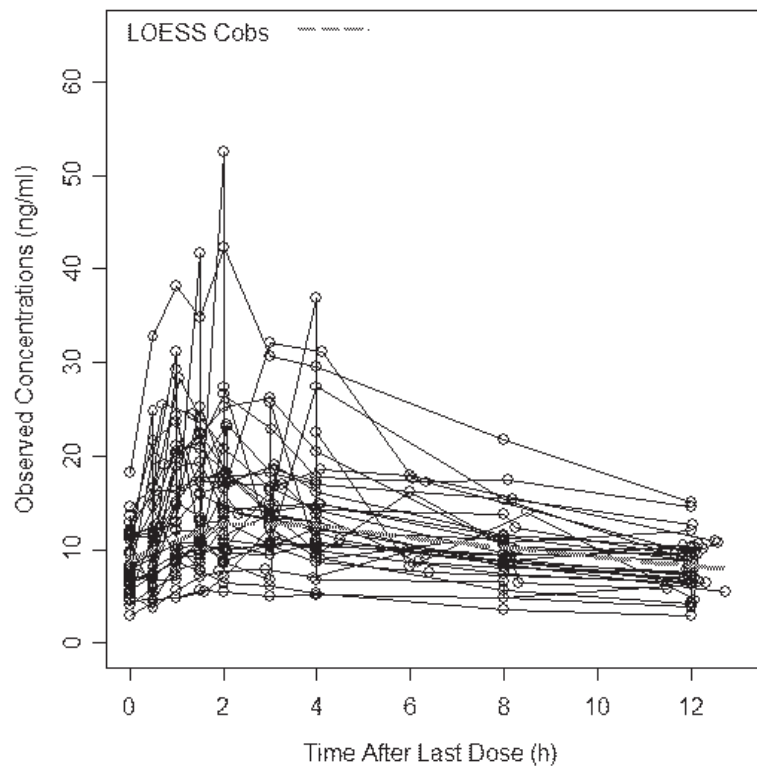


Figure 2

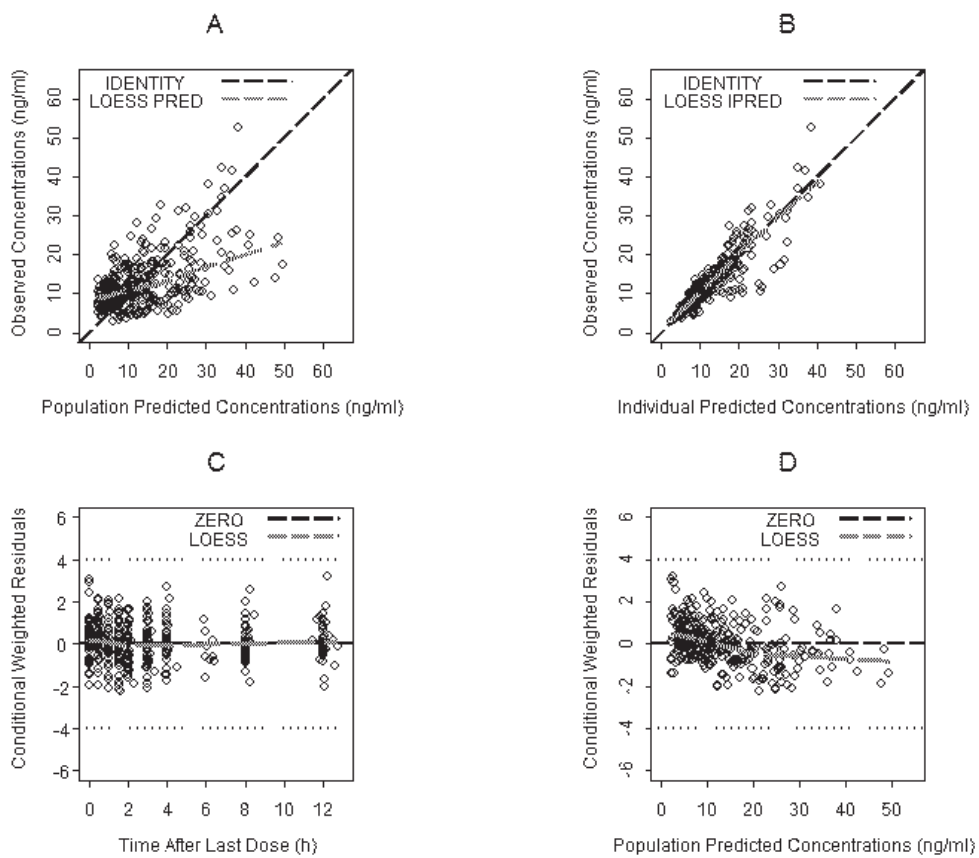
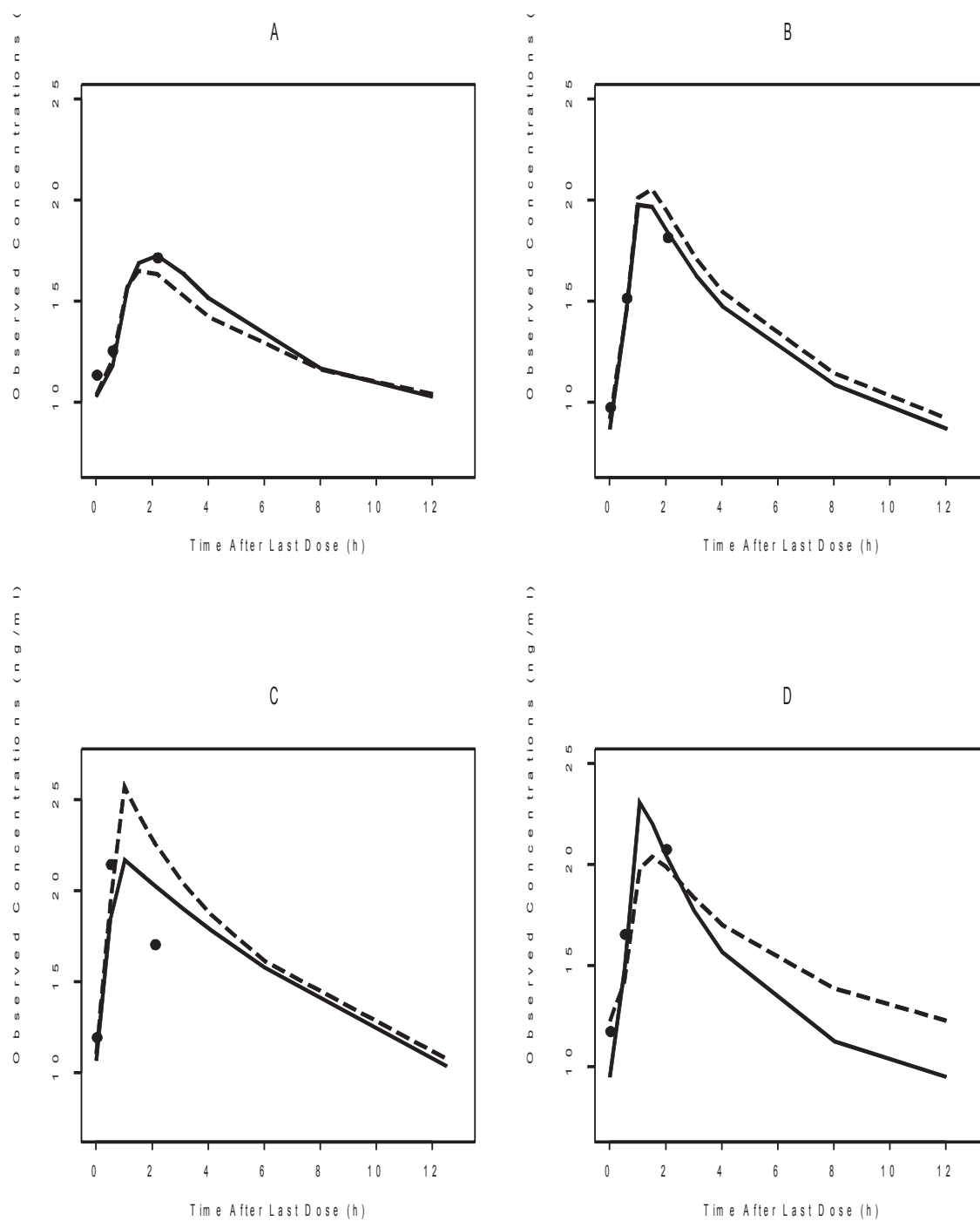


Figure 3



CHAPITRE V

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les enfants ont toujours été des « orphelins thérapeutiques ». De nombreux médicaments n'ont pas fait l'objet d'étude chez les enfants, leur utilisation n'est pas officiellement autorisée, ce qui crée un déficit lorsque le besoin s'y présente chez cette population. Plusieurs catastrophes au sein du groupe d'âge pédiatrique en témoignent.[71-73, 197] Les recommandations posologiques pour la plupart des médicaments utilisés en pédiatrie sont généralement établies en milligramme/kilogramme de poids corporel jusqu'à une dose adulte maximale. Bien que la posologie établie en milligramme/mètre carré de surface corporelle puisse être préférable, l'expérience clinique indique que les erreurs de mesure de la taille (notamment chez les petits enfants et les nourrissons) et les erreurs de calcul de la surface corporelle à partir du poids et de la taille sont courantes. L'adaptation de posologie en pédiatrie à partir des adultes ne prend pas en compte les particularités pharmacologiques qui caractérisent l'enfant tout au long de son développement. L'extrapolation de l'utilisation des médicaments à partir des données chez l'adulte a provoqué des morbidités significatives qui auraient pu être minimisées en effectuant la recherche chez les enfants.[71, 198, 199] Cependant, l'évolution considérable de la science et de la réglementation sur la recherche des médicaments en pédiatrie[200] et dans la modélisation pharmacocinétique[201] ont permis d'améliorer la pharmacothérapie chez les enfants.

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse avaient pour objectif général d'appliquer la pharmacocinétique de population en pédiatrie pour explorer les caractéristiques propres à cette population, de décrire la variabilité pharmacocinétique des médicaments utilisés chez les enfants immunosupprimés, en vue de l'individualisation du traitement en termes de choix de régime posologique. Conjointement à ces études, des outils permettant d'estimer l'exposition individuelle en limitant le nombre de prélèvements et optimiser les temps de ces derniers ont été développés.

Le premier volet de cette thèse consistait à décrire et tenter d'expliquer la variabilité interindividuelle dans les concentrations des médicaments par des covariables, quantifier cette variabilité et développer des modèles PKPOP capables de prédire les profils

plasmatiques, permettant ainsi de déterminer des doses associées à une fenêtre thérapeutique optimale.

En premier lieu, la croissance et le développement qui sont des caractéristiques propres aux enfants ont été étudiés dans les différents articles de cette thèse. Ces 2 aspects peuvent être évalués en considérant les mesures anthropométriques et l'âge comme covariables décrivant la variabilité interindividuelle sur les paramètres PK. Ces covariables sont souvent très corrélées, chacune pouvant ou pas prédire l'effet de l'autre. L'évaluation de cet aspect commence par l'inclusion de l'effet des mesures anthropométriques en premier suivi de l'âge. Ces mesures font référence au poids corporel, à la taille et à la surface corporelle. Les résultats des travaux de cette thèse confirment l'importance de l'inclusion des mesures anthropométriques pour décrire la variabilité interindividuelle sur les paramètres PK en pédiatrie.

Dans notre premier article, la surface corporelle et le poids décrivaient significativement la variabilité interindividuelle des paramètres PK. Cependant, la surface corporelle était meilleur indicateur de cette variabilité que le poids corporel. Ce résultat a été retrouvé récemment dans une étude de PKPOP du busulfan en pédiatrie.[132] Ce résultat est conforme avec le fait que le taux de métabolisme des médicaments est proportionnel à la surface corporelle. De plus, plusieurs mesures de dimension d'organes et de volumes de fluides corrélaient bien avec la surface corporelle chez les enfants. Considérant l'âge de la population dans cette étude, soit une majorité des patients plus âgés que 1 an, l'application du dosage par surface corporelle est tout à fait raisonnable. Toutefois, l'utilisation de la surface corporelle comme indicateur de mesure anthropométrique en pédiatrie a ses limites en clinique et selon les groupes d'âge. De plus, bien que la posologie établie en mg/mètre carré de surface corporelle puisse être préférable, l'expérience clinique indique que les erreurs de mesure de la taille (notamment chez les petits enfants et les nourrissons) et les erreurs de calcul de la surface corporelle à partir du poids et de la taille sont courantes. Donc, il faut prendre un soin particulier pour s'assurer que le calcul de la dose est exact. Enfin, d'un point de vue d'application clinique,

l'utilisation de formules incluant la surface corporelle peut être considérée difficile pour les professionnels de la santé malgré la signification physiologique de ce paramètre et son importance à expliquer la variabilité dans la pharmacocinétique du busulfan. Un point à souligner dans les résultats de cet article est l'utilisation de doses plus élevées par BSA chez les enfants que chez les adultes. Ces résultats confirment que l'extrapolation par kilogramme ou par mètre carré à partir des doses adultes ne fonctionne pas et qu'il faut déterminer des doses spécifiques pour les enfants.

Dans notre deuxième article, les résultats finaux n'incluaient aucune covariable de mesure anthropométrique sur les paramètres PK. Durant le processus du développement du modèle, le poids corporel était la covariable la plus significative sur les paramètres PK comme attendu en pédiatrie. Cependant, le nombre de patients était limité dans cette étude ($n = 14$) et les valeurs extrêmes de poids influençaient énormément les résultats et masquaient l'effet réel. Alors que l'inclusion du poids améliorait la description des profils cinétiques de certains patients, il détériorait celles d'autres profils. Le nombre restreint de patients représente la limitation principale de cette étude surtout pour l'étude de la pharmacocinétique d'un médicament administré par plusieurs voies et connu pour avoir une grande variabilité interindividuelle. Les autres limitations de cette étude étaient le manque de collecte de covariables comme le niveau d'inflammation, la dysfonction hépatique et le génotypage qui auraient pu aider à mieux expliquer la variabilité.

L'utilisation du poids corporel a été choisie dans notre troisième article pour prendre en compte l'effet de la croissance en pédiatrie. Le poids corporel a été inclus de façon allométrique sur tous les paramètres pharmacocinétiques, de même que dans les autres articles. Certains auteurs proposent d'estimer les exposants allométriques [202, 203] et ceci a été appliqué dans notre premier article. Cependant, l'estimation de l'exposant allométrique à partir de données humaines se heurte à des problèmes en raison de la fourchette de poids relativement étroite et l'erreur d'estimation impliquée dans un tel paramètre non linéaire. En conséquence, cet exposant a été fixé dans notre troisième article comme proposé par plusieurs auteurs.[93, 94, 204] En effet, il est plus sûr d'utiliser les

paramètres fixes développés à partir de données plus larges dans les modèles allométriques. L'ajustement allométrique représente une approche mécanistique qui repose sur des bases théoriques et empiriques solides.[21, 93, 205, 206] L'utilisation de l'exposant fixé permet de séparer les effets d'autres covariables de l'effet de la mesure anthropométrique. L'ajustement allométrique permet également la comparaison des estimés en pédiatrie avec ceux des adultes.

Le choix du meilleur paramètre pour prendre en compte l'effet de la mesure anthropométrique sur les paramètres pharmacocinétiques dépend des caractéristiques du médicament, de la population étudiée, des groupes d'âge et de leur poids. La question est plus simple quand la majorité des patients sont plus âgés que 1 an. Cependant pour les nouveau-nés et à part des polymorphismes génétiques, il y a des considérations à prendre en compte lors du développement des modèles pharmacocinétiques comme la maturation des enzymes, la clairance rénale réduite par rapport à l'adulte, demi-vie de certains médicaments prolongée, et volume de distribution plus large pour les médicaments hydrosolubles et plus petit pour les médicaments liposolubles.

Une fois l'effet de la mesure anthropométrique pris en compte dans le modèle, l'évaluation de l'effet de l'âge et d'autres covariables peut être effectuée. L'âge post-conception est utilisé pour décrire la maturation de la fonction rénale. Ce paramètre n'a pas été évalué au cours des travaux de cette thèse car le nombre de patients plus jeune que 1 an était limité ne permettant pas la description du processus de maturation. L'inclusion de l'âge dans les modèles pharmacocinétiques paraît raisonnable vu qu'il prend en considération les différences physiologiques entre les nouveau-nés, nourrissons, enfants et adolescents.

Ensuite, d'autres covariables liées à la fonction hépatique, la fonction rénale, la co-médication et le sexe ont été évaluées. L'absence d'effet de sexe en études pédiatriques n'est pas surprenant comme la majorité des enfants sont en dessous de l'âge pubertaire. La croissance sexuelle et les conséquences hormonales sont des paramètres importants à considérer dans les études pharmacocinétiques chez les adolescents.

Les modèles de population développés ont permis d'expliquer une part de la variabilité pharmacocinétique des médicaments étudiés mais de nombreuses covariables restent à explorer, notamment sur le côté pharmacogénétique qui présente un intérêt certain pour la description du métabolisme du busulfan, du voriconazole, et du tacrolimus. Le GST responsable du métabolisme du busulfan comprend plusieurs isoenzymes. Les GSTM1, GSTT1, GSTP1 et GSTA1 présentent des polymorphismes qui résultent en une réduction ou absence de l'activité ou de l'expression de l'enzyme.[108] Le CYP2C19 est l'enzyme hépatique responsable de l'élimination du voriconazole. Il existe 3 principaux polymorphismes génétiques, le CYP2C19*2, le CYP2C19*3 et CYP2C19*17. Les patients ayant l'allèle CYP2C19*17 sont des métaboliseurs ultrarapides des médicaments métabolisés par cette voie, alors que les porteurs de l'allèle CYP2C19*2 sont des métaboliseurs lents. Le CYP2C19*2 existe uniquement chez les sujets d'origine asiatique. L'allèle *17 a une fréquence allélique de 23% chez les occidentaux, 15% chez les afro-américains et d'environ 4% chez les sujets d'origine asiatique. Le génotypage du CYP3A5 responsable du métabolisme du tacrolimus montre que l'allèle muté CYP3A5*3, associé à une absence d'expression de la protéine CYP3A5 (le patient doit être homozygote pour l'allèle muté). L'allèle muté est nettement plus fréquent que l'allèle sauvage ce qui fait que la majorité des caucasiens n'expriment pas cette enzyme. Jusqu'à récemment, le CYP3A7 a été le gène le plus négligé des CYP3A, en raison de l'absence d'un anticorps spécifique et sa classification erronée de gène exclusivement fœtal.[15] Le progrès le plus important a été le développement d'un véritable anticorps spécifique pour le CYP3A7, qui a finalement démontré l'expression de CYP3A7 *in vivo* de manière sans équivoque.[207] Pareil que le CYP3A5, le CYP3A7 présente une expression polymorphique au niveau du foie et de l'intestin. Chez les Caucasiens, les deux tiers des cas d'augmentation de l'expression du CYP3A7 hépatique peuvent être expliqués par la présence de l'allèle CYP3A7*1C ou moins fréquemment par CYP3A7*1B.[2, 51, 207] Les deux allèles affectent la transcription du gène, mais le mécanisme a été élucidé seulement pour le CYP3A7*1C. Contrairement au CYP3A7*1C, le CYP3A7*1B affecte l'expression du CYP3A7 au niveau du foie mais pas de l'intestin.[51] Cependant, la faible affinité et la capacité du CYP3A7 pour le

tacrolimus suggèrent que cette enzyme ne jouerait aucun rôle dans le métabolisme du tacrolimus *in vivo*. [52] La pharmacogénétique permet d'étudier la variabilité interindividuelle de la séquence de l'ADN génomique responsable d'une variabilité de la réponse à certains médicaments. L'intérêt du génotypage dans la modélisation et pour le suivi thérapeutique n'est pas démontré. Des études sur le polymorphisme du GST ont montré une corrélation avec la variabilité dans la pharmacocinétique du busulfan. [139, 208] L'effet du polymorphisme génétique sur la pharmacocinétique du tacrolimus a été rapporté dans plusieurs études. Cependant, les cibles thérapeutiques du tacrolimus sont atteintes en utilisant le suivi thérapeutique chez tous les patients quel que soit leur génotype. Il existe un chevauchement important des valeurs des concentrations du tacrolimus pour les patients des différents génotypes, et la connaissance de ce génotype ne suffit pas à déterminer la dose optimale pour chaque patient. En transplantation rénale, malgré l'inclusion du génotypage du CYP3A5 dans le modèle PK du tacrolimus, la variabilité interindividuelle reste élevée. [209] Dans la transplantation hépatique, il faut considérer l'influence du génotype du donneur en plus de celui du receveur. D'un point de vue clinique, le polymorphisme génétique n'est pas nécessairement associé à une différence de phénotype. Des exemples de cas cliniques observés au CHU Ste-Justine incluent le cas d'un nouveau-né qui était métaboliseur lent du voriconazole avec des signes de toxicité et est devenu métaboliseur ultra rapide après deux jours avec des concentrations indétectables. D'autres exemples sont les nouveau-nés métaboliseurs ultra rapides mais qui à cause de leur âge se présentent avec un phénotype de métaboliseurs lents. Les études pharmacogénétiques constitueront sans doute dans un avenir proche un préalable à la commercialisation d'un grand nombre de médicaments, au même titre que les études de toxicité ou de pharmacocinétique. Ceci sera à l'origine de l'émergence d'une thérapeutique sur mesure pour chaque patient, lui assurant un traitement efficace, moins toxique et à moindre coût.

L'étude de ces covariables discutées chez les enfants permet l'amélioration de la compréhension des effets des médicaments dans la population pédiatrique, et donc une utilisation plus efficace.

Le développement de ces modèles de population capables d'expliquer une part de la variabilité pharmacocinétique, permet d'optimiser les traitements en pédiatrie et un meilleur choix de doses. Dans le cas du busulfan, qui est un médicament avec une fenêtre thérapeutique très étroite, les posologies reposent sur le suivi thérapeutique. Dans notre étude, les doses de départ ont résulté en 42% des cas dans la fenêtre thérapeutique. Considérant les conséquences, une posologie qui permettrait d'augmenter ce pourcentage est fortement recommandée. Les simulations basées sur le modèle PKPOP développé et prenant en compte la surface corporelle, permettent de déterminer une posologie qui résulterait en 71% de patients atteignant l'exposition optimale à partir de la première dose. Encore une fois, l'utilisation des modèles PKPOP en pédiatrie pourrait améliorer les conditions de cette population.

L'évaluation est une partie importante de la construction de modèles, faisant l'objet de recommandations de la part des autorités régulant la mise sur le marché de nouveaux médicaments. Dans le champ de la pharmacocinétique et de la pharmacodynamie, où ces modèles peuvent être utilisés pour le suivi thérapeutique et l'ajustement posologique, cette facette de l'analyse revêt une importance particulière. Alors ces modèles doivent être évalués pour confirmer leur stabilité, leur performance de simulation et leur capacité à répondre aux objectifs initiaux de la modélisation. Certaines de ces méthodes ont été appliquées dans cette thèse pour confirmer que les modèles peuvent être utilisés pour effectuer des simulations et des prédictions futures.

Les résultats du « bootstrap » confirment si le modèle est robuste aux variations aléatoires des données alors que le « predictive check » permet d'évaluer la capacité du modèle à simuler. Cependant, une étude descriptive des données ne requiert pas une validation vue qu'elle ne sera pas utilisée pour des simulations ou des prédictions ultérieures.

Les modèles physiologiques représentent un autre type de modèles pour analyser les données présentées dans cette thèse. Ces modèles physiologiques auraient pu inclure une composante physiologique pour expliquer la maturation de la fonction rénale, l'ontogénie

des organes et des systèmes enzymatiques. Cependant, les données sur l'ontogénie des transporteurs et des tubules rénaux ne sont pas disponibles, et beaucoup d'incertitude existe dans ces modèles qui introduiraient plus de variabilité.

Le deuxième volet de cette thèse consistait à développer un estimateur Bayésien pour limiter le nombre et optimiser les temps de prélèvements en se basant sur un modèle PKPOP. Cet objectif s'avère très important en pédiatrie considérant les limitations pratiques d'analyses pharmacocinétiques en pédiatrie.

L'exposition systémique est un paramètre important pour définir la disposition d'un médicament et sa relation avec les effets cliniques recherchés. La quantité de sang pour chaque échantillon et le nombre d'échantillons nécessaires sont deux variables extrêmement importantes pour décrire de manière adéquate le profil des concentrations en fonction du temps.[210] La quantité de sang est limitée par l'âge du patient, sa taille, et la maladie sous-jacente. Ce problème est surmonté en utilisant des méthodes analytiques précises qui tiennent compte des petits volumes d'échantillon chez les enfants.

L'autre problème de la mesure de l'exposition systémique est le grand nombre de prélèvements qui est souvent peu commode pour la pratique clinique de routine, en particulier dans la population pédiatrique. Le nombre d'échantillons implique une consommation plus élevée des ressources cliniques (équipement, temps du personnel, etc) et du coût global de l'étude. En pratique clinique, le suivi thérapeutique pharmacologique est la méthode la plus utilisée pour calculer l'exposition systémique, optimiser les effets thérapeutiques tout en diminuant les effets indésirables. Cette méthode, qui permet une estimation rapide et simple des paramètres PK pour une dose donnée, se heurte en pédiatrie à la nécessité de collecter un nombre élevé d'échantillons. De plus, avec cette méthode il n'est pas possible de prédire les concentrations en fonction du temps, de caractériser la PK des principes actifs ayant une élimination non-linéaire, ou de faire des corrélations PK/PD directes. Alternativement, l'exposition systémique peut être prédite avec une approche d'échantillons limités.

L'estimateur Bayésien développé pour le tacrolimus est le premier dans cette population de transplantés hépatiques pédiatriques. Cet estimateur a pour principal avantage de pouvoir prédire, chez chaque individu, les paramètres pharmacocinétiques et l'exposition au médicament à l'aide de 3-4 prélèvements effectués au cours des 4 premières heures de l'interdose. D'autres stratégies de prélèvements par régression linéaire multiple pour le tacrolimus, basées sur la même population, ont été développées.[211] La comparaison entre les 2 méthodes montre des performances similaires. Toutefois, la méthode par régression linéaire multiple a tendance à sous-estimer l'ASC. La méthode par régression linéaire multiple permet de calculer l'exposition avec une équation simple, mais cette approche est limitée par la nécessité de respecter les horaires de prélèvements définis ce qui peut parfois être incompatible avec la pratique clinique en routine. Cependant, la méthode d'estimation Bayésienne présente l'avantage d'une plus grande souplesse dans le respect des horaires et du nombre de prélèvements que les stratégies de prélèvements limités utilisant la régression linéaire multiple, ce qui est plus compatible avec la pratique clinique. De plus, la méthode d'estimation Bayésienne permet d'estimer les paramètres pharmacocinétiques du patient et de reconstituer la totalité de la courbe de la concentration en fonction du temps ce qui fournit un précieux indice de l'adéquation entre l'AUC estimée et les valeurs de concentrations mesurées. Cet outil est caractérisé par sa facilité d'usage en routine hospitalière, il peut être d'un grand intérêt sur le plan clinique et doit contribuer à améliorer la prise en charge individuelle des patients.

Le défi majeur des études en pédiatrie est la grande variabilité dans les profils pharmacocinétiques due à la maturation, la croissance mais aussi à la forme galénique des médicaments administrés. Les suspensions n'existant pas pour certains médicaments, sont préparées par l'hôpital ou la pharmacie locale. Les biodisponibilités de ces suspensions ne sont jamais évaluées et ceci introduit une variabilité énorme dans les études. Une solution pourrait être le contrôle de la biodisponibilité et son introduction dans les études pharmacocinétiques. Un autre défi qui découle des variabilités élevées est le nombre de patients à inclure dans les études. Malgré que la POPPK soit une méthode robuste capable de déterminer les paramètres PK à partir d'un nombre limité de patients, une certaine

homogénéité est nécessaire. Plus la variabilité dans la cinétique du médicament augmente, plus le nombre de patients pour bien estimer les paramètres est élevé. Une fois les problèmes pour construire un modèle utile sont surmontés, apparaissent les défis pour rendre ces modèles accessibles aux cliniciens. Le développement d'une plate-forme informatique est l'étape ultime pour que les cliniciens puissent profiter des résultats des modèles développés pour individualiser les traitements au chevet du patient selon ses caractéristiques.

Des nouvelles études sont à entreprendre afin d'élargir le domaine d'application de ces outils à d'autres types de patients (greffés cardiaques, rénaux) et à d'autres traitements (busulfan, voriconazole,...). De plus, d'autres études visant à étudier l'effet du génotypage des enzymes responsables du métabolisme du busulfan (GST), du voriconazole (CYP2C19) et du tacrolimus (CYP3A5) sont actuellement effectuées au CHU Ste-Justine et devrait nous permettre d'évaluer ultérieurement l'impact des facteurs génétiques sur le métabolisme de ces médicaments et la variabilité des rapports métaboliques.

Enfin, les travaux de cette thèse peuvent être vus comme un pas vers le développement d'approches prédictives de la thérapie individualisée. Les outils pharmacocinétiques développés s'inscriraient à part entière dans une démarche visant à diminuer le taux d'échec thérapeutique et l'incidence des effets indésirables ou toxiques chez les enfants immunosupprimés et ayant bénéficié d'une transplantation.

Bibliographie

1. Kang JS, Lee MH. Overview of therapeutic drug monitoring. *The Korean journal of internal medicine*. 2009;24:1-10.
2. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet*. 2001;27:383-91.
3. Beaulieu P, Lambert C. *Précis de pharmacologie: Du fondamental à la clinique*. Montréal LpdlUd, editor2010.
4. Rane A, Schwab M, Seyberth H. *Pediatric clinical pharmacology*: Springer; 2011.
5. Kearns GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Blowey DL, Leeder JS, Kauffman RE. Developmental pharmacology--drug disposition, action, and therapy in infants and children. *N Engl J Med*. 2003;349:1157-67.
6. Novak E, Allen PJ. Prescribing medications in pediatrics: concerns regarding FDA approval and pharmacokinetics. *Pediatr Nurs*. 2007;33:64-70.
7. Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, McMichael J, Lever J, Burckart G, Starzl T. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet*. 1995;29:404-30.
8. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Clinical investigation of medicinal products in the pediatric population E11. 2000; Available from: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Efficacy/E11/Step4/E11_Guideline.pdf.
9. Strolin Benedetti M, Whomsley R, Baltes EL. Differences in absorption, distribution, metabolism and excretion of xenobiotics between the paediatric and adult populations. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2005;1:447-71.
10. European Medicines Agency. Clinical Investigation of Medicinal Products in the Paediatric Population. 2001; Available from: http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002926.pdf.
11. Bartelink IH, Rademaker CM, Schobben AF, van den Anker JN. Guidelines on paediatric dosing on the basis of developmental physiology and pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet*. 2006;45:1077-97.
12. Hunt A, Joel S, Dick G, Goldman A. Population pharmacokinetics of oral morphine and its glucuronides in children receiving morphine as immediate-release liquid or sustained-release tablets for cancer pain. *J Pediatr*. 1999;135:47-55.

13. Bakshi SS, Britto P, Capparelli E, Mofenson L, Fowler MG, Rasheed S, Schoenfeld D, Zimmer B, Frank Y, Yogeve R, Jimenez E, Salgo M, Boone G, Pahwa SG. Evaluation of pharmacokinetics, safety, tolerance, and activity of combination of zalcitabine and zidovudine in stable, zidovudine-treated pediatric patients with human immunodeficiency virus infection. AIDS Clinical Trials Group Protocol 190 Team. *The Journal of infectious diseases*. 1997;175:1039-50.
14. Murthy BV, Pandya KS, Booker PD, Murray A, Lintz W, Terlinden R. Pharmacokinetics of tramadol in children after i.v. or caudal epidural administration. *Br J Anaesth*. 2000;84:346-9.
15. Komori M, Nishio K, Kitada M, Shiramatsu K, Muroya K, Soma M, Nagashima K, Kamataki T. Fetus-specific expression of a form of cytochrome P-450 in human livers. *Biochemistry*. 1990;29:4430-3.
16. Holford NH. A size standard for pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*. 1996;30:329-32.
17. Anderson BJ, Holford NH. Mechanism-based concepts of size and maturity in pharmacokinetics. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2008;48:303-32.
18. Mahmood I. Prediction of drug clearance in children from adults: a comparison of several allometric methods. *Br J Clin Pharmacol*. 2006;61:545-57.
19. Knibbe CA, Krekels EH, van den Anker JN, DeJongh J, Santen GW, van Dijk M, Simons SH, van Lingen RA, Jacqz-Aigrain EM, Danhof M, Tibboel D. Morphine glucuronidation in preterm neonates, infants and children younger than 3 years. *Clin Pharmacokinet*. 2009;48:371-85.
20. Peeters MY, Allegaert K, Blusse van Oud-Alblas HJ, Cella M, Tibboel D, Danhof M, Knibbe CA. Prediction of propofol clearance in children from an allometric model developed in rats, children and adults versus a 0.75 fixed-exponent allometric model. *Clin Pharmacokinet*. 2010;49:269-75.
21. Anderson BJ, Meakin GH. Scaling for size: some implications for paediatric anaesthesia dosing. *Paediatr Anaesth*. 2002;12:205-19.
22. Tod M, Jullien V, Pons G. Facilitation of drug evaluation in children by population methods and modelling. *Clin Pharmacokinet*. 2008;47:231-43.
23. Holford N. Dosing in children. *Clin Pharmacol Ther*. 2010;87:367-70.
24. Alcorn J, McNamara PJ. Pharmacokinetics in the newborn. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55:667-86.
25. Commare CE, Tappenden KA. Development of the infant intestine: implications for nutrition support. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*. 2007;22:159-73.

26. Anderson GD, Lynn AM. Optimizing pediatric dosing: a developmental pharmacologic approach. *Pharmacotherapy*. 2009;29:680-90.
27. Axelsson I, Jakobsson I, Lindberg T, Polberger S, Benediktsson B, Raiha N. Macromolecular absorption in preterm and term infants. *Acta paediatrica Scandinavica*. 1989;78:532-7.
28. Strolin Benedetti M, Baltes EL. Drug metabolism and disposition in children. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003;17:281-99.
29. Kearns GL. Impact of developmental pharmacology on pediatric study design: overcoming the challenges. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000;106:S128-38.
30. Fakhoury M, Litalien C, Medard Y, Cave H, Ezzahir N, Peuchmaur M, Jacqz-Aigrain E. Localization and mRNA expression of CYP3A and P-glycoprotein in human duodenum as a function of age. *Drug Metab Dispos*. 2005;33:1603-7.
31. Hutson JR, Weitzman S, Schechter T, Arceci RJ, Kim RB, Finkelstein Y. Pharmacokinetic and pharmacogenetic determinants and considerations in chemotherapy selection and dosing in infants. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2012;8:709-22.
32. Christians U, Braun F, Schmidt M, Kosian N, Schiebel HM, Ernst L, Winkler M, Kruse C, Linck A, Sewing KF. Specific and sensitive measurement of FK506 and its metabolites in blood and urine of liver-graft recipients. *Clin Chem*. 1992;38:2025-32.
33. Windorfer A, Kuenzer W, Urbanek R. The influence of age on the activity of acetylsalicylic acid-esterase and protein-salicylate binding. *Eur J Clin Pharmacol*. 1974;7:227-31.
34. Ehrnebo M, Agurell S, Jalling B, Boreus LO. Age differences in drug binding by plasma proteins: studies on human fetuses, neonates and adults. *Eur J Clin Pharmacol*. 1971;3:189-93.
35. Alcorn J, McNamara PJ. Ontogeny of hepatic and renal systemic clearance pathways in infants: part I. *Clin Pharmacokinet*. 2002;41:959-98.
36. Lin JH, Yamazaki M. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42:59-98.
37. Anderson BJ. Pharmacology in the very young: anaesthetic implications. *European journal of anaesthesiology*. 2012;29:261-70.
38. Rowland M, Benet LZ, Graham GG. Clearance concepts in pharmacokinetics. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics*. 1973;1:123-36.
39. Pang KS, Rowland M. Hepatic clearance of drugs. I. Theoretical considerations of a "well-stirred" model and a "parallel tube" model. Influence of hepatic blood flow, plasma

and blood cell binding, and the hepatocellular enzymatic activity on hepatic drug clearance. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics*. 1977;5:625-53.

40. Yamazaki M, Suzuki H, Sugiyama Y. Recent advances in carrier-mediated hepatic uptake and biliary excretion of xenobiotics. *Pharm Res*. 1996;13:497-513.

41. Balistreri WF. Immaturity of hepatic excretory function and the ontogeny of bile acid metabolism. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1983;2 Suppl 1:S207-14.

42. Cresteil T, Beaune P, Kremers P, Celier C, Guengerich FP, Leroux JP. Immunoquantification of epoxide hydrolase and cytochrome P-450 isozymes in fetal and adult human liver microsomes. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1985;151:345-50.

43. Cresteil T. Onset of xenobiotic metabolism in children: toxicological implications. *Food additives and contaminants*. 1998;15 Suppl:45-51.

44. Sonnier M, Cresteil T. Delayed ontogenesis of CYP1A2 in the human liver. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1998;251:893-8.

45. Ratanasavanh D, Beaune P, Morel F, Flinois JP, Guengerich FP, Guillouzo A. Intralobular distribution and quantitation of cytochrome P-450 enzymes in human liver as a function of age. *Hepatology*. 1991;13:1142-51.

46. Tateishi T, Nakura H, Asoh M, Watanabe M, Tanaka M, Kumai T, Takashima S, Imaoka S, Funae Y, Yabusaki Y, Kamataki T, Kobayashi S. A comparison of hepatic cytochrome P450 protein expression between infancy and postinfancy. *Life Sci*. 1997;61:2567-74.

47. Treluyer JM, Cheron G, Sonnier M, Cresteil T. Cytochrome P-450 expression in sudden infant death syndrome. *Biochem Pharmacol*. 1996;52:497-504.

48. Treluyer JM, Gueret G, Cheron G, Sonnier M, Cresteil T. Developmental expression of CYP2C and CYP2C-dependent activities in the human liver: in-vivo/in-vitro correlation and inducibility. *Pharmacogenetics*. 1997;7:441-52.

49. Daly AK, Brockmoller J, Broly F, Eichelbaum M, Evans WE, Gonzalez FJ, Huang JD, Idle JR, Ingelman-Sundberg M, Ishizaki T, Jacqz-Aigrain E, Meyer UA, Nebert DW, Steen VM, Wolf CR, Zanger UM. Nomenclature for human CYP2D6 alleles. *Pharmacogenetics*. 1996;6:193-201.

50. Lacroix D, Sonnier M, Moncion A, Cheron G, Cresteil T. Expression of CYP3A in the human liver--evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1997;247:625-34.

51. Yang M, Zhu XR, Park PC, Titt U, Mohan R, Virshup G, Clayton JE, Dong L. Comprehensive analysis of proton range uncertainties related to patient stopping-power-ratio estimation using the stoichiometric calibration. *Physics in medicine and biology*. 2012;57:4095-115.

52. Kamdem LK, Streit F, Zanger UM, Brockmoller J, Oellerich M, Armstrong VW, Wojnowski L. Contribution of CYP3A5 to the in vitro hepatic clearance of tacrolimus. *Clin Chem.* 2005;51:1374-81.
53. Wrighton SA, Brian WR, Sari MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Raucy JL, Molowa DT, Vandenbranden M. Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III A5 (HLp3). *Mol Pharmacol.* 1990;38:207-13.
54. Schuetz JD, Beach DL, Guzelian PS. Selective expression of cytochrome P450 CYP3A mRNAs in embryonic and adult human liver. *Pharmacogenetics.* 1994;4:11-20.
55. van den Berg H, van den Anker JN, Beijnen JH. Cytostatic drugs in infants: a review on pharmacokinetic data in infants. *Cancer treatment reviews.* 2012;38:3-26.
56. Furlan V, Perello L, Jacquemin E, Debray D, Taburet AM. Interactions between FK506 and rifampicin or erythromycin in pediatric liver recipients. *Transplantation.* 1995;59:1217-8.
57. Gabrielsson J, Weiner D. *Pharmacokinetic and pharmacodynamic data Analysis: Concepts and Applications* 2000.
58. Barrett JS, Fossler MJ, Cadieu KD, Gastonguay MR. Pharmacometrics: a multidisciplinary field to facilitate critical thinking in drug development and translational research settings. *J Clin Pharmacol.* 2008;48:632-49.
59. Mould DR, Upton RN. *Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development. CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology* 2012;1.
60. Gieschke R, Steimer JL. Pharmacometrics: modelling and simulation tools to improve decision making in clinical drug development. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2000;25:49-58.
61. Grasela TH, Dement CW, Kolterman OG, Fineman MS, Grasela DM, Honig P, Antal EJ, Bjornsson TD, Loh E. Pharmacometrics and the transition to model-based development. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;82:137-42.
62. Sheiner LB. Learning versus confirming in clinical drug development. *Clin Pharmacol Ther.* 1997;61:275-91.
63. Sheiner LB, Steimer JL. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in drug development. *Annual review of pharmacology and toxicology.* 2000;40:67-95.
64. Lee JY, Garnett CE, Gobburu JV, Bhattaram VA, Brar S, Earp JC, Jadhav PR, Krudys K, Lesko LJ, Li F, Liu J, Madabushi R, Marathe A, Mehrotra N, Tornoe C, Wang Y, Zhu H. Impact of pharmacometric analyses on new drug approval and labelling decisions: a review of 198 submissions between 2000 and 2008. *Clin Pharmacokinet.* 2011;50:627-35.

65. Bhattaram VA, Bonapace C, Chilukuri DM, Duan JZ, Garnett C, Gobburu JV, Jang SH, Kenna L, Lesko LJ, Madabushi R, Men Y, Powell JR, Qiu W, Ramchandani RP, Tornoe CW, Wang Y, Zheng JJ. Impact of pharmacometric reviews on new drug approval and labeling decisions--a survey of 31 new drug applications submitted between 2005 and 2006. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;81:213-21.
66. Powell JR, Gobburu JV. Pharmacometrics at FDA: evolution and impact on decisions. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;82:97-102.
67. Barrett JS. The role of quantitative pharmacology in an academic translational research environment. *The AAPS journal.* 2008;10:9-14.
68. Holford N, Karlsson MO. Time for quantitative clinical pharmacology: a proposal for a pharmacometrics curriculum. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;82:103-5.
69. Gabrielsson J, Weiner D. *Pharmacokinetic & Pharmacodynamic Data Analysis: Concepts and Applications.* 4 ed 2006.
70. Sheiner LB, Rosenberg B, Melmon KL. Modelling of individual pharmacokinetics for computer-aided drug dosage. *Computers and biomedical research, an international journal.* 1972;5:411-59.
71. Berde CB. Convulsions associated with pediatric regional anesthesia. *Anesthesia and analgesia.* 1992;75:164-6.
72. Burns LE, Hodgman JE, Cass AB. Fatal circulatory collapse in premature infants receiving chloramphenicol. *N Engl J Med.* 1959;261:1318-21.
73. Kauffman RE. Fentanyl, fads, and folly: who will adopt the therapeutic orphans? *J Pediatr.* 1991;119:588-9.
74. Chatelut E, Boddy AV, Peng B, Rubie H, Lavit M, Dezeuze A, Pearson AD, Roche H, Robert A, Newell DR, Canal P. Population pharmacokinetics of carboplatin in children. *Clin Pharmacol Ther.* 1996;59:436-43.
75. Collart L, Blaschke TF, Boucher F, Prober CG. Potential of population pharmacokinetics to reduce the frequency of blood sampling required for estimating kinetic parameters in neonates. *Developmental pharmacology and therapeutics.* 1992;18:71-80.
76. Crome P, Flanagan RJ. Pharmacokinetic studies in elderly people. Are they necessary? *Clin Pharmacokinet.* 1994;26:243-7.
77. Anderson BJ, Allegaert K, Holford NH. Population clinical pharmacology of children: general principles. *Eur J Pediatr.* 2006;165:741-6.
78. Ette EI, Williams PJ. Population pharmacokinetics I: background, concepts, and models. *Ann Pharmacother.* 2004;38:1702-6.
79. Beal SL, Sheiner LB. *NONMEM user's guides.* NONMEM Project Group. San Francisco: University of California - 1992. 1992.

80. Kuhn E, Lavielle M. Maximum likelihood estimation in nonlinear mixed effects models. *Computational Statistics and Data Analysis*. 2005;49:1020-38.
81. Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-103. 2012.
82. Lindstrom ML, Bates DM. Nonlinear mixed effects models for repeated measures data. *Biometrics*. 1990;46:673-87.
83. Wang X, Schumitzky A, D'Argenio DZ. Nonlinear Random Effects Mixture Models: Maximum Likelihood Estimation via the EM Algorithm. *Computational statistics & data analysis*. 2007;51:6614-23.
84. Bertrand J, Comets E, Chenel M, Mentre F. Some Alternatives to Asymptotic Tests for the Analysis of Pharmacogenetic Data Using Nonlinear Mixed Effects Models. *Biometrics*. 2011.
85. Ette EI. Stability and performance of a population pharmacokinetic model. *J Clin Pharmacol*. 1997;37:486-95.
86. Ette EI, Onyiah LC. Estimating inestimable standard errors in population pharmacokinetic studies: the bootstrap with Winsorization. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2002;27:213-24.
87. Yano Y, Beal SL, Sheiner LB. Evaluating pharmacokinetic/pharmacodynamic models using the posterior predictive check. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2001;28:171-92.
88. Post TM, Frejjer JI, Ploeger BA, Danhof M. Extensions to the visual predictive check to facilitate model performance evaluation. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2008;35:185-202.
89. Comets E, Brendel K, Mentre F. Why Should Prediction Discrepancies Be Renamed Standardized Visual Predictive Check? *J Clin Pharmacol*. 2011.
90. Wang DD, Zhang S. Standardized visual predictive check versus visual predictive check for model evaluation. *J Clin Pharmacol*. 2012;52:39-54.
91. Grasela TH, Sheiner LB, Rambeck B, Boenigk HE, Dunlop A, Mullen PW, Wadsworth J, Richens A, Ishizaki T, Chiba K, et al. Steady-state pharmacokinetics of phenytoin from routinely collected patient data. *Clin Pharmacokinet*. 1983;8:355-64.
92. Retout S, Mentre F. Optimization of individual and population designs using Splus. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2003;30:417-43.
93. Rajagopalan P, Gastonguay MR. Population pharmacokinetics of ciprofloxacin in pediatric patients. *J Clin Pharmacol*. 2003;43:698-710.
94. Anderson BJ, Woollard GA, Holford NH. A model for size and age changes in the pharmacokinetics of paracetamol in neonates, infants and children. *Br J Clin Pharmacol*. 2000;50:125-34.

95. Anderson BJ, Allegaert K, Holford NH. Population clinical pharmacology of children: modelling covariate effects. *Eur J Pediatr*. 2006;165:819-29.
96. Kalow W. Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and pharmacobiology. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;70:1-4.
97. Thummel KE, Wilkinson GR. In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1998;38:389-430.
98. Westlind-Johnsson A, Malmebo S, Johansson A, Otter C, Andersson TB, Johansson I, Edwards RJ, Boobis AR, Ingelman-Sundberg M. Comparative analysis of CYP3A expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism. *Drug Metab Dispos*. 2003;31:755-61.
99. Koch I, Weil R, Wolbold R, Brockmoller J, Hustert E, Burk O, Nuessler A, Neuhaus P, Eichelbaum M, Zanger U, Wojnowski L. Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos*. 2002;30:1108-14.
100. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54:1271-94.
101. Amirimani B, Walker AH, Weber BL, Rebbeck TR. RESPONSE: re: modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91:1588-90.
102. Westlind A, Lofberg L, Tindberg N, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M. Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;259:201-5.
103. Spurdle AB, Goodwin B, Hodgson E, Hopper JL, Chen X, Purdie DM, McCredie MR, Giles GG, Chenevix-Trench G, Liddle C. The CYP3A4*1B polymorphism has no functional significance and is not associated with risk of breast or ovarian cancer. *Pharmacogenetics*. 2002;12:355-66.
104. Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, Nuessler AC, Neuhaus P, Klattig J, Eiselt R, Koch I, Zibat A, Brockmoller J, Halpert JR, Zanger UM, Wojnowski L. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics*. 2001;11:773-9.
105. Shimizu T, Ochiai H, Asell F, Shimizu H, Saitoh R, Hama Y, Katada J, Hashimoto M, Matsui H, Taki K, Kaminuma T, Yamamoto M, Aida Y, Ohashi A, Ozawa N. Bioinformatics research on inter-racial difference in drug metabolism I. Analysis on frequencies of mutant alleles and poor metabolizers on CYP2D6 and CYP2C19. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2003;18:48-70.

106. Xie HG, Kim RB, Wood AJ, Stein CM. Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2001;41:815-50.
107. Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med*. 2005;352:2211-21.
108. Hengstler JG, Arand M, Herrero ME, Oesch F. Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. Recent results in cancer research *Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer*. 1998;154:47-85.
109. Cotton SC, Sharp L, Little J, Brockton N. Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2000;151:7-32.
110. Coles BF, Chen G, Kadlubar FF, Radomska-Pandya A. Interindividual variation and organ-specific patterns of glutathione S-transferase alpha, mu, and pi expression in gastrointestinal tract mucosa of normal individuals. *Arch Biochem Biophys*. 2002;403:270-6.
111. Komiya Y, Tsukino H, Nakao H, Kuroda Y, Imai H, Katoh T. Human glutathione S-transferase A1, T1, M1, and P1 polymorphisms and susceptibility to prostate cancer in the Japanese population. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2005;131:238-42.
112. Holmstrom G, Borgstrom B, Calissendorff B. Cataract in children after bone marrow transplantation: relation to conditioning regimen. *Acta ophthalmologica Scandinavica*. 2002;80:211-5.
113. Santos GW. The development of busulfan/cyclophosphamide preparative regimens. *Semin Oncol*. 1993;20:12-6; quiz 7.
114. Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, Saral R, Beschorner WE, Bias WB, Braine HG, Burns WH, Elfenbein GJ, Kaizer H, et al. Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N Engl J Med*. 1983;309:1347-53.
115. DeLeve LD, Wang X. Role of oxidative stress and glutathione in busulfan toxicity in cultured murine hepatocytes. *Pharmacology*. 2000;60:143-54.
116. Hassan M, Ehrsson H, Ljungman P. Aspects concerning busulfan pharmacokinetics and bioavailability. *Leuk Lymphoma*. 1996;22:395-407.
117. Hassan M, Ljungman P, Bolme P, Ringden O, Syruckova Z, Bekassy A, Stary J, Wallin I, Kallberg N. Busulfan bioavailability. *Blood*. 1994;84:2144-50.
118. Vassal G, Gouyette A, Hartmann O, Pico JL, Lemerle J. Pharmacokinetics of high-dose busulfan in children. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989;24:386-90.

119. Tran HT, Madden T, Petropoulos D, Worth LL, Felix EA, Sprigg-Saenz HA, Choroszy M, Danielson M, Przepiorka D, Chan KW. Individualizing high-dose oral busulfan: prospective dose adjustment in a pediatric population undergoing allogeneic stem cell transplantation for advanced hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplant.* 2000;26:463-70.
120. Buggia I, Locatelli F, Regazzi MB, Zecca M. Busulfan. *Ann Pharmacother.* 1994;28:1055-62.
121. Hassan M, Ehrsson H, Smedmyr B, Totterman T, Wallin I, Oberg G, Simonsson B. Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of busulfan during high-dose therapy. *Bone Marrow Transplant.* 1989;4:113-4.
122. McCune JS, Gibbs JP, Slattery JT. Plasma concentration monitoring of busulfan: does it improve clinical outcome? *Clin Pharmacokinet.* 2000;39:155-65.
123. Czerwinski M, Gibbs JP, Slattery JT. Busulfan conjugation by glutathione S-transferases alpha, mu, and pi. *Drug Metab Dispos.* 1996;24:1015-9.
124. Bredschneider M, Klein K, Murdter TE, Marx C, Eichelbaum M, Nussler 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;71:479-87.
125. 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;30:504-10.
126. Johnson L, Orchard PJ, Baker KS, Brundage R, Cao Q, Wang X, Langer E, Farag-El Maasah S, Ross JA, Remmel R, Jacobson PA. Glutathione S-transferase A1 genetic variants reduce busulfan clearance in children undergoing hematopoietic cell transplantation. *J Clin Pharmacol.* 2008;48:1052-62.
127. 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. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* 2006;368:93-8.
128. 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;104:1574-7.
129. Vassal G, Challine D, Koscielny S, Hartmann O, Deroussent A, Boland I, Valteau-Couanet D, Lemerle J, Levi F, Gouyette A. Chronopharmacology of high-dose busulfan in children. *Cancer Res.* 1993;53:1534-7.
130. Poonkuzhali B, Chandy M, Srivastava A, Dennison D, Krishnamoorthy R. Glutathione S-transferase activity influences busulfan pharmacokinetics in patients with

beta thalassemia major undergoing bone marrow transplantation. *Drug Metab Dispos.* 2001;29:264-7.

131. Fitzsimmons WE, Ghalie R, Kaizer H. Anticonvulsants and busulfan. *Annals of internal medicine.* 1990;112:552-3.

132. 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;17:6867-77.

133. Nguyen L. Integration of modelling and simulation into the development of intravenous busulfan in paediatrics: an industrial experience. *Fundam Clin Pharmacol.* 2008;22:599-604.

134. 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;47:101-11.

135. 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;30:75-83.

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

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

138. Vassal G, Michel G, Esperou H, Gentet JC, Valteau-Couanet D, Doz F, Mechinaud F, Galambrun C, Neven B, Zouabi H, Nguyen L, Puozzo C. Prospective validation of a novel IV busulfan fixed dosing for paediatric patients to improve therapeutic AUC targeting without drug monitoring. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008;61:113-23.

139. Ansari M, Lauzon-Joset JF, Vachon MF, Duval M, Theoret Y, Champagne MA, Krajcinovic M. Influence of GST gene polymorphisms on busulfan pharmacokinetics in children. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45:261-7.

140. Sanati H, Belanger P, Fratti R, Ghannoum M. A new triazole, voriconazole (UK-109,496), blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:2492-6.

141. Ghannoum MA, Kuhn DM. Voriconazole -- better chances for patients with invasive mycoses. *European journal of medical research.* 2002;7:242-56.

142. Jeu L, Piacenti FJ, Lyakhovetskiy AG, Fung HB. Voriconazole. *Clin Ther.* 2003;25:1321-81.

143. Purkins L, Wood N, Greenhalgh K, Allen MJ, Oliver SD. Voriconazole, a novel wide-spectrum triazole: oral pharmacokinetics and safety. *Br J Clin Pharmacol.* 2003;56 Suppl 1:10-6.
144. Purkins L, Wood N, Greenhalgh K, Eve MD, Oliver SD, Nichols D. The pharmacokinetics and safety of intravenous voriconazole - a novel wide-spectrum antifungal agent. *Br J Clin Pharmacol.* 2003;56 Suppl 1:2-9.
145. Purkins L, Wood N, Ghahramani P, Greenhalgh K, Allen MJ, Kleinermans D. Pharmacokinetics and safety of voriconazole following intravenous- to oral-dose escalation regimens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:2546-53.
146. Lazarus HM, Blumer JL, Yanovich S, Schlamm H, Romero A. Safety and pharmacokinetics of oral voriconazole in patients at risk of fungal infection: a dose escalation study. *J Clin Pharmacol.* 2002;42:395-402.
147. Pascual A, Calandra T, Bolay S, Buclin T, Bille J, Marchetti O. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin Infect Dis.* 2008;46:201-11.
148. Pascual A, Nieth V, Calandra T, Bille J, Bolay S, Decosterd LA, Buclin T, Majcherczyk PA, Sanglard D, Marchetti O. Variability of voriconazole plasma levels measured by new high-performance liquid chromatography and bioassay methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:137-43.
149. Scott LJ, Simpson D. Voriconazole : a review of its use in the management of invasive fungal infections. *Drugs.* 2007;67:269-98.
150. Denning DW, Ribaud P, Milpied N, Caillot D, Herbrecht R, Thiel E, Haas A, Ruhnke M, Lode H. Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of acute invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 2002;34:563-71.
151. Theuretzbacher U, Ihle F, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole. *Clin Pharmacokinet.* 2006;45:649-63.
152. Spencer CM, Goa KL, Gillis JC. Tacrolimus. An update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation. *Drugs.* 1997;54:925-75.
153. Robatel C, Rusca M, Padoin C, Marchetti O, Liaudet L, Buclin T. Disposition of voriconazole during continuous veno-venous haemodiafiltration (CVVHDF) in a single patient. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54:269-70.
154. Roffey SJ, Cole S, Comby P, Gibson D, Jezequel SG, Nedderman AN, Smith DA, Walker DK, Wood N. The disposition of voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog, and human. *Drug Metab Dispos.* 2003;31:731-41.
155. Karlsson MO, Lutsar I, Milligan PA. Population pharmacokinetic analysis of voriconazole plasma concentration data from pediatric studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:935-44.

156. Walsh TJ, Karlsson MO, Driscoll T, Arguedas AG, Adamson P, Saez-Llorens X, Vora AJ, Arrieta AC, Blumer J, Lutsar I, Milligan P, Wood N. Pharmacokinetics and safety of intravenous voriconazole in children after single- or multiple-dose administration. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:2166-72.
157. Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot (Tokyo).* 1987;40:1249-55.
158. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo).* 1987;40:1256-65.
159. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell.* 1991;66:807-15.
160. Ellis D. Clinical use of tacrolimus (FK-506) in infants and children with renal transplants. *Pediatr Nephrol.* 1995;9:487-94.
161. McDiarmid SV. The use of tacrolimus in pediatric liver transplantation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1998;26:90-102.
162. Reding R, Wallemacq PE, Lamy ME, Rahier J, Sempoux C, Debande B, Jamart J, Barker A, Sokal E, De Ville de Goyet J, et al. Conversion from cyclosporine to FK506 for salvage of immunocompromised pediatric liver allografts. Efficacy, toxicity, and dose regimen in 23 children. *Transplantation.* 1994;57:93-100.
163. Swenson JM, Fricker FJ, Armitage JM. Immunosuppression switch in pediatric heart transplant recipients: cyclosporine to FK 506. *J Am Coll Cardiol.* 1995;25:1183-8.
164. Reyes J, Mazariegos GV, Bond GM, Green M, Dvorchik I, Kosmach-Park B, Abu-Elmagd K. Pediatric intestinal transplantation: historical notes, principles and controversies. *Pediatr Transplant.* 2002;6:193-207.
165. Jindal RM, Dubernard JM. Towards a specific immunosuppression for pancreas and islet grafts. *Clin Transplant.* 2000;14:242-5.
166. Treede H, Klepetko W, Reichenspurner H, Zuckermann A, Meiser B, Birsan T, Wisser W, Reichert B. Tacrolimus versus cyclosporine after lung transplantation: a prospective, open, randomized two-center trial comparing two different immunosuppressive protocols. *J Heart Lung Transplant.* 2001;20:511-7.
167. Reyes J, Jain A, Mazariegos G, Kashyap R, Green M, Iurlano K, Fung J. Long-term results after conversion from cyclosporine to tacrolimus in pediatric liver transplantation for acute and chronic rejection. *Transplantation.* 2000;69:2573-80.

168. Cao S, Cox KL, Berquist W, Hayashi M, Concepcion W, Hammes GB, Ojogho OK, So SK, Frerker M, Castillo RO, Monge H, Esquivel CO. Long-term outcomes in pediatric liver recipients: comparison between cyclosporin A and tacrolimus. *Pediatr Transplant.* 1999;3:22-6.
169. Busuttil RW, Holt CD. Tacrolimus is superior to cyclosporine in liver transplantation. *Transplant Proc.* 1998;30:2174-8.
170. Shapiro R. Tacrolimus in pediatric renal transplantation: a review. *Pediatr Transplant.* 1998;2:270-6.
171. Yanik G, Levine JE, Ratanatharathorn V, Dunn R, Ferrara J, Hutchinson RJ. Tacrolimus (FK506) and methotrexate as prophylaxis for acute graft-versus-host disease in pediatric allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000;26:161-7.
172. Filler G, Grygas R, Mai I, Stolpe HJ, Greiner C, Bauer S, Ehrich JH. Pharmacokinetics of tacrolimus (FK 506) in children and adolescents with renal transplants. *Nephrol Dial Transplant.* 1997;12:1668-71.
173. Floren LC, Bekersky I, Benet LZ, Mekki Q, Dressler D, Lee JW, Roberts JP, Hebert MF. Tacrolimus oral bioavailability doubles with coadministration of ketoconazole. *Clin Pharmacol Ther.* 1997;62:41-9.
174. Lo A, Burckart GJ. P-glycoprotein and drug therapy in organ transplantation. *J Clin Pharmacol.* 1999;39:995-1005.
175. Wallemacq PE, Furlan V, Moller A, Schafer A, Stadler P, Firdaous I, Taburet AM, Reding R, Clement De Clety S, De Ville De Goyet J, Sokal E, Lykavieris L, Van Leeuw V, Bernard O, Otte JB, Undre NA. Pharmacokinetics of tacrolimus (FK506) in paediatric liver transplant recipients. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1998;23:367-70.
176. Wallemacq PE, Verbeeck RK. Comparative clinical pharmacokinetics of tacrolimus in paediatric and adult patients. *Clin Pharmacokinet.* 2001;40:283-95.
177. Beysens AJ, Wijnen RM, Beuman GH, van der Heyden J, Kootstra G, van As H. FK 506: monitoring in plasma or in whole blood? *Transplant Proc.* 1991;23:2745-7.
178. Moreno M, Manzanares C, Castellano F, Medina E, Urruzuno P, Camarena C, Manzanares J, Jara P. Monitoring of tacrolimus as rescue therapy in pediatric liver transplantation. *Ther Drug Monit.* 1998;20:376-9.
179. Undre NA, van Hooff J, Christiaans M, Vanrenterghem Y, Donck J, Heeman U, Kohnle M, Zanker B, Land W, Morales JM, Andres A, Schafer A, Stevenson P. Low systemic exposure to tacrolimus correlates with acute rejection. *Transplant Proc.* 1999;31:296-8.
180. Jain AB, Fung JJ, Tzakis AG, Venkataramanan R, Abu-Elmagd K, Alessiani M, Reyes J, Irish W, Warty V, Mehta S, et al. Comparative study of cyclosporine and FK 506 dosage requirements in adult and pediatric orthotopic liver transplant patients. *Transplant Proc.* 1991;23:2763-6.

181. Christians U, Braun F, Kosian N, Schmidt M, Schiebel HM, Ernst L, Kruse C, Winkler M, Holze I, Linck A, et al. High performance liquid chromatography/mass spectrometry of FK 506 and its metabolites in blood, bile, and urine of liver grafted patients. *Transplant Proc.* 1991;23:2741-4.
182. Gonschior AK, Christians U, Braun F, Winkler M, Linck A, Baumann J, Sewing KF. Measurement of blood concentrations of FK506 (tacrolimus) and its metabolites in seven liver graft patients after the first dose by h.p.l.c.-MS and microparticle enzyme immunoassay (MEIA). *Br J Clin Pharmacol.* 1994;38:567-71.
183. Sattler M, Guengerich FP, Yun CH, Christians U, Sewing KF. Cytochrome P-450 3A enzymes are responsible for biotransformation of FK506 and rapamycin in man and rat. *Drug Metab Dispos.* 1992;20:753-61.
184. Mignat C. Clinically significant drug interactions with new immunosuppressive agents. *Drug Saf.* 1997;16:267-78.
185. Padhi ID, Long P, Basha M, Anandan JV. Interaction between tacrolimus and erythromycin. *Ther Drug Monit.* 1997;19:120-2.
186. Wolter K, Wagner K, Philipp T, Fritschka E. Interaction between FK 506 and clarithromycin in a renal transplant patient. *Eur J Clin Pharmacol.* 1994;47:207-8.
187. Miele L, Venkataramanan R, Yokoyama I, Warty VJ, Starzl TE. Interaction between FK506 and clotrimazole in a liver transplant recipient. *Transplantation.* 1991;52:1086-7.
188. Assan R, Fredj G, Larger E, Feutren G, Bismuth H. FK 506/fluconazole interaction enhances FK 506 nephrotoxicity. *Diabete Metab.* 1994;20:49-52.
189. Manez R, Martin M, Raman D, Silverman D, Jain A, Warty V, Gonzalez-Pinto I, Kusne S, Starzl TE. Fluconazole therapy in transplant recipients receiving FK506. *Transplantation.* 1994;57:1521-3.
190. Billaud EM, Guillemain R, Fortineau N, Kitzis MD, Dreyfus G, Amrein C, Kreft-Jais C, Husson JM, Chretien P. Interaction between roxithromycin and cyclosporin in heart transplant patients. *Clin Pharmacokinet.* 1990;19:499-502.
191. Seifeldin RA, Marcos-Alvarez A, Gordon FD, Lewis WD, Jenkins RL. Nifedipine interaction with tacrolimus in liver transplant recipients. *Ann Pharmacother.* 1997;31:571-5.
192. Hebert MF, Lam AY. Diltiazem increases tacrolimus concentrations. *Ann Pharmacother.* 1999;33:680-2.
193. Schulman SL, Shaw LM, Jabs K, Leonard MB, Brayman KL. Interaction between tacrolimus and chloramphenicol in a renal transplant recipient. *Transplantation.* 1998;65:1397-8.

194. Staatz CE, Taylor PJ, Lynch SV, Willis C, Charles BG, Tett SE. Population pharmacokinetics of tacrolimus in children who receive cut-down or full liver transplants. *Transplantation*. 2001;72:1056-61.
195. Wallin JE, Bergstrand M, Wilczek HE, Nydert PS, Karlsson MO, Staatz CE. Population pharmacokinetics of tacrolimus in pediatric liver transplantation: early posttransplantation clearance. *Ther Drug Monit*. 2011;33:663-72.
196. Fukudo M, Yano I, Masuda S, Goto M, Uesugi M, Katsura T, Ogura Y, Oike F, Takada Y, Egawa H, Uemoto S, Inui K. Population pharmacokinetic and pharmacogenomic analysis of tacrolimus in pediatric living-donor liver transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;80:331-45.
197. Taussig HB. A study of the German outbreak of phocomelia. The thalidomide syndrome. *JAMA*. 1962;180:1106-14.
198. Borowitz DS, Grand RJ, Durie PR. Use of pancreatic enzyme supplements for patients with cystic fibrosis in the context of fibrosing colonopathy. Consensus Committee. *J Pediatr*. 1995;127:681-4.
199. Olkkola KT, Aranko K, Luurila H, Hiller A, Saarnivaara L, Himberg JJ, Neuvonen PJ. A potentially hazardous interaction between erythromycin and midazolam. *Clin Pharmacol Ther*. 1993;53:298-305.
200. Saint Raymond A, Bresseur D. Development of medicines for children in Europe: ethical implications. *Paediatric respiratory reviews*. 2005;6:45-51.
201. Pillai GC, Mentre F, Steimer JL. Non-linear mixed effects modeling - from methodology and software development to driving implementation in drug development science. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2005;32:161-83.
202. Schuttler J, Ihmsen H. Population pharmacokinetics of propofol: a multicenter study. *Anesthesiology*. 2000;92:727-38.
203. Yukawa E, Satou M, Nonaka T, Yukawa M, Ohdo S, Higuchi S, Kuroda T, Goto Y. Pharmacoepidemiologic investigation of clonazepam relative clearance by mixed-effect modeling using routine clinical pharmacokinetic data in Japanese patients. *J Clin Pharmacol*. 2002;42:81-8.
204. Capparelli EV, Englund JA, Connor JD, Spector SA, McKinney RE, Palumbo P, Baker CJ. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of zidovudine in HIV-infected infants and children. *J Clin Pharmacol*. 2003;43:133-40.
205. West GB, Brown JH, Enquist BJ. A general model for the origin of allometric scaling laws in biology. *Science*. 1997;276:122-6.
206. West GB, Brown JH, Enquist BJ. The fourth dimension of life: fractal geometry and allometric scaling of organisms. *Science*. 1999;284:1677-9.

207. Sim SC, Edwards RJ, Boobis AR, Ingelman-Sundberg M. CYP3A7 protein expression is high in a fraction of adult human livers and partially associated with the CYP3A7*1C allele. *Pharmacogenet Genomics*. 2005;15:625-31.
208. Ansari M, Krajinovic M. Can the pharmacogenetics of GST gene polymorphisms predict the dose of busulfan in pediatric hematopoietic stem cell transplantation? *Pharmacogenomics*. 2009;10:1729-32.
209. Zhao W, Fakhoury M, Baudouin V, Storme T, Maisin A, Deschenes G, Jacqz-Aigrain E. Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of once daily prolonged-release formulation of tacrolimus in pediatric and adolescent kidney transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2012.
210. Reed MD. Optimal sampling theory: An overview of its application to pharmacokinetic studies in infants and children. *Pediatrics*. 1999;104:627-32.
211. Delaloye JR, Kassir N, Lapeyraque AL, Alvarez F, Lallier M, Beaunoyer M, Labbe L, Theoret Y, Litalien C. Limited sampling strategies for monitoring tacrolimus in pediatric liver transplant recipients. *Ther Drug Monit*. 2011;33:380-6.

Annexe I

1 Tables de discrimination du modèle de pharmacocinétique de population de base du tacrolimus – 1 compartiment

Nom	Paramètres PK	BSV	MOF	Δ MOF	Ka (h ⁻¹)	CL/F (L/h)	Vc/F (L)	BSV CL/F (%)	Erreur Additive (ng/mL)	Erreur Prop (%)
run1cptadddiag	CL, Vc, Ka	CL et Vc non-corrélés	1330.337	128.684	1.10	12.8	187	67.6	3.39	--
run1cptproptdiag	CL, Vc, Ka	CL et Vc non-corrélés	1201.653	--	1.07	12.7	217	65.6	--	0.236
run1cptmixdiag	CL, Vc, Ka	CL et Vc non-corrélés	1201.653	0.000	1.07	12.7	217	65.6	--	0.236
run1cptaddcor	CL, Vc, Ka	CL et Vc corrélés	1308.577	106.924	1.10	12.9	164	66.6	3.38	--
run1cptpropcor	CL, Vc, Ka	CL et Vc corrélés	1180.803	-20.850	1.05	12.7	193	65.7	--	0.236
run1cptmixcor	CL, Vc, Ka	CL et Vc corrélés	1180.803	-20.850	1.05	12.6	193	65.7	--	-0.236
run1cptproptdiagka	CL, Vc, Ka	CL, Vc et Ka non-corrélés	1273.403 ^a	71.750	0.589	16.7	90.9	66.0	--	0.328
run1cptpropcorCLVka	CL, Vc, Ka	CL, Vc corrélés, et Ka non-corrélés	1151.610	-50.043	0.790	12.6	158	65.5	--	0.219
run1cptpropcorCLVlag	CL, Vc, Ka, LAG	CL et Vc corrélés	1180.803 ^b	-20.850	1.05	12.7	193	65.7	--	0.236
run1cptpropcorCLVkalag	CL, Vc, Ka, LAG	CL et Vc corrélés; et Ka non-corrélés	1151.610 ^b	-50.043	0.790	12.6	158	65.5	--	0.219
run1cptpropcorCLVdiagkalag	CL, Vc, Ka, LAG	CL et Vc corrélés; et Ka, lag non-corrélés	1151.610 ^b	-50.043	0.790	12.6	158	65.5	--	0.219

BSV= Variabilité interindividuelle; MOF= Fonction objective minimale; PK= Pharmacocinétique; Prop=Proportionnelle.

2 Tables de discrimination du modèle de pharmacocinétique de population de base du tacrolimus – 2 compartiments

Nom	Paramètres PK	BSV	MOF	Δ MOF	Ka (h ⁻¹)	CL/F (L/h)	Vc/F (L)	BSV CL/F (%)	BSV Vc/F (%)	Erreur Additive (ng/mL)	Erreur Prop (%)
run2cptadddiag	CL, Vc, Ka, VP, Q	CL and Vc uncorrelated	1252.364 ^b	104.939	0.299	13.1	52.7	66.2	99.0	2.92	--
run2cptpropdiag	CL, Vc, Ka, VP, Q	CL and Vc uncorrelated	1147.425	--	0.242	12.8	52.7	64.8	106	--	0.216
run2cptmixdiag	CL, Vc, Ka, VP, Q	CL and Vc uncorrelated	1201.155 ^b	53.730	1.03	9.83	115	80.4	128	--	0.235
run2cptadddiagVPfix	CL, Vc, Ka, VP(290), Q	CL and Vc uncorrelated	1254.783	104.247	0.300	13.0	51.5	66.2	100	2.93	--
run2cptpropdiagVPfix	CL, Vc, Ka, VP(290), Q	CL and Vc uncorrelated	1150.536	--	0.188	12.7	39.5	65.0	109	--	0.217
run2cptmixdiagVPfix	CL, Vc, Ka, VP(290), Q	CL and Vc uncorrelated	1150.536	0.000	0.188	12.7	39.5	65.0	109	--	0.217
run2cptpropcor	CL, Vc, Ka, VP(290), Q	CL and Vc correlated	1142.323	-8.213	0.215	12.8	43.3	64.6	104	--	0.218
run2cptpropdiagka	CL, Vc, Ka, VP(290), Q	CL, Vc and Ka uncorrelated	1156.844 ^b	6.308	0.522	12.9	112	64.9	0.100	--	0.220
run2cptpropcorka	CL, Vc, Ka, VP(290), Q	CL, Vc correlated; and Ka	1137.859 ^b	-12.677	0.491	12.9	102	64.9	60.9	--	0.216
run2cptpropdiagLAG	CL, Vc, Ka, VP(290), Q, LAG	CL and Vc uncorrelated	1115.605	-34.931	0.171	12.6	19.5	65.0	156	--	0.202
run2cptpropcorLAG	CL, Vc, Ka, VP(290), Q, LAG	CL and Vc correlated	1111.198	-39.338	0.177	12.7	20.1	64.7	149	--	0.203
run2cptpropcorLAGdiagKA	CL, Vc, Ka, VP(290), Q, LAG	CL and Vc correlated, KA uncorrelated	1101.870	-48.666	1.33	12.9	147	65.3	56.3	--	0.194
run2cptpropcorLAGdiagQ	CL, Vc, Ka, VP(290), Q, LAG	CL and Vc correlated, Q uncorrelated	1100.268	-50.268	0.316	12.9	32.3	64.9	139	--	0.193

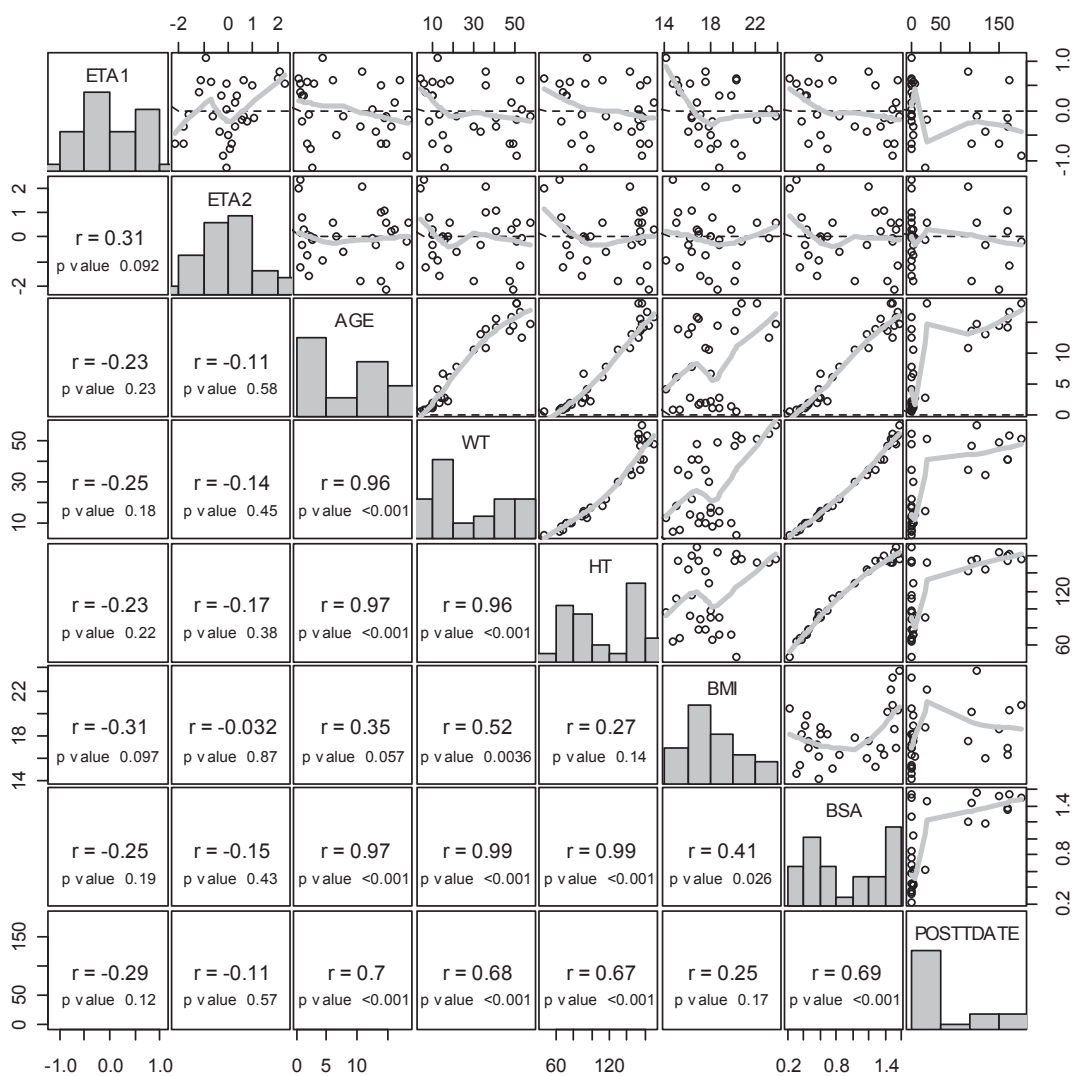
BSV= Variabilité interindividuelle; MOF= Fonction objective minimale; PK= Pharmacocinétique; Prop=Proportionnelle.

2 Tables de discrimination du modèle de pharmacocinétique de population de base du tacrolimus – 2 compartiments (Suite)

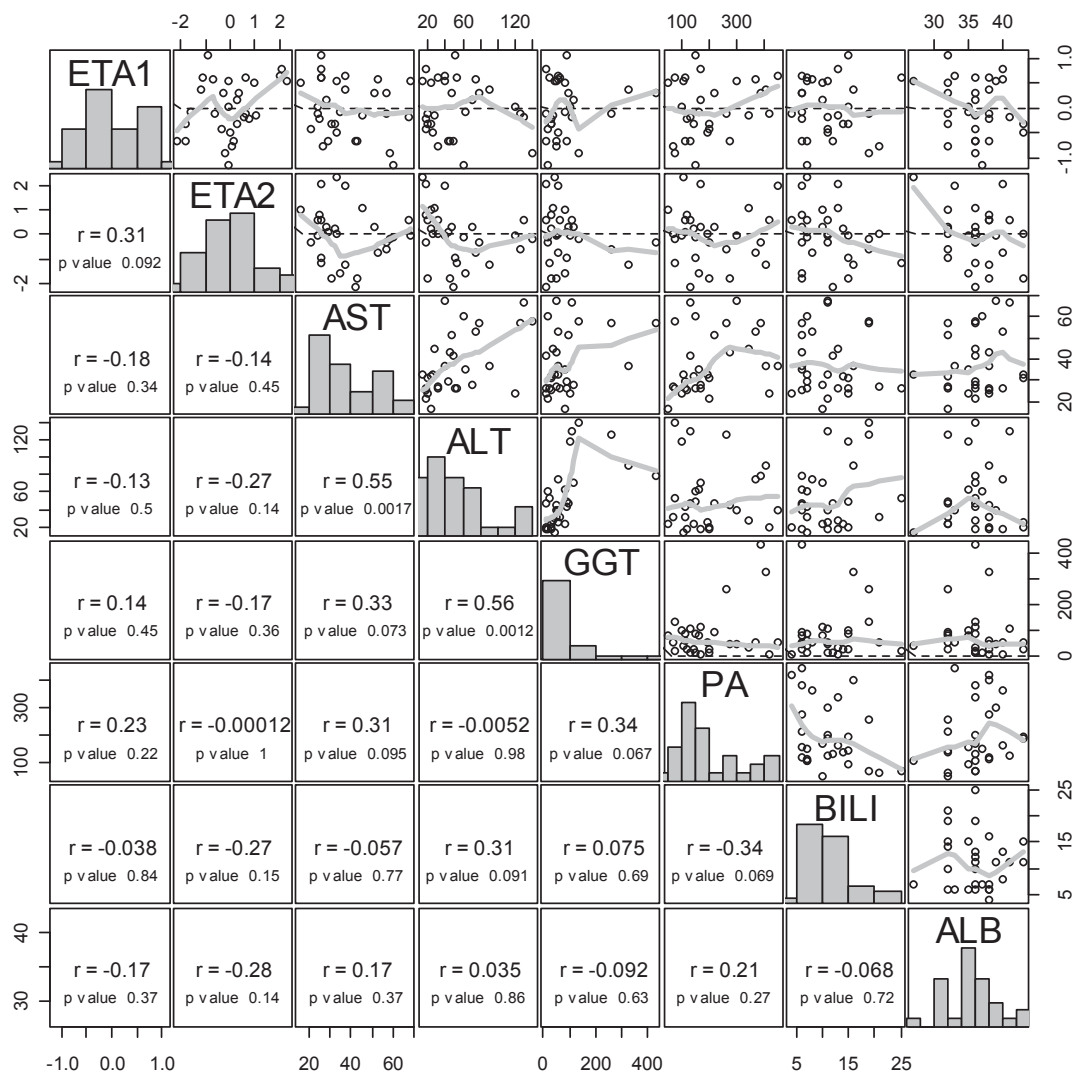
Nom	Paramètres PK	BSV	MOF	Δ MOF	Ka (h ⁻¹)	CL/F (L/h)	Vc/F (L)	BSV CL/F (%)	BSV Vc/F (%)	Erreur Additive (ng/mL)	Erreur Prop (%)
run2cptpropcorL AGQfixdiagQ	CL, Vc, Ka, VP(290), Q(28), LAG	CL and Vc correlated, Q uncorrelated	1100.270	-50.266	0.313	12.9	32.0	64.8	139	--	0.193
run2cptpropcorL AGdiagVP	CL, Vc, Ka, VP(290), Q, LAG	CL and Vc correlated, VP uncorrelated	1111.164	-39.372	0.179	12.7	20.3	64.8	149	--	0.203
run2cptpropcorL AGdiagLAG	CL, Vc, Ka, VP(290), Q, LAG	CL and Vc correlated, LAG uncorrelated	1108.458 ^b	-42.078	0.621	12.0	75.4	80.9	161	--	0.189
run2cptpropcorL AGdiagQVP	CL, Vc, Ka, VP(290), Q, LAG	CL and Vc correlated, Q, VP uncorrelated	1100.017	-50.519	0.316	12.9	32.4	65.1	139	--	0.192
run2cptpropcorL AGdiagQKA	CL, Vc, Ka, VP(290), Q, LAG	CL and Vc correlated, Q, KA uncorrelated	1097.646 ^b	-52.890	0.901	13.0	104	65.5	42.5	--	0.190
run2cptpropcorL AGdiagQLAG	CL, Vc, Ka, VP(290), Q, LAG	CL and Vc correlated, Q, LAG uncorrelated	1099.765 ^b	-50.771	0.678	13.4	92.4	65.7	104	--	0.172
run2cptpropcorL AGdiagQWT	CL, Vc, Ka, VP(290), Q, LAG	CL and Vc correlated, Q uncorrelated	1135.567	-14.969	0.336	12.1	29.8	55.4	122	--	0.204
run2cptpropdiag LAGdiagQWT	CL, Vc, Ka, VP(290), Q, LAG	CL and Vc correlated, Q uncorrelated	1138.443	-12.093	0.342	12.1	31.3	55.6	126	--	0.203
run2cptpropcorl OVCL	CL, Vc, Ka, VP(290), Q, LAG	CL and Vc correlated, Q uncorrelated	1135.567 ^b	-14.969	0.335	12.1	29.8	55.4	122	--	0.204
run2cptpropcorl OVVC	CL, Vc, Ka, VP(290), Q, LAG	CL and Vc correlated, Q uncorrelated	1135.567	-14.969	0.335	12.1	29.8	55.4	122	--	0.204
run2cptpropcorl OVKA	CL, Vc, Ka, VP(290), Q, LAG	CL and Vc correlated, Q uncorrelated	1134.172	-16.364	0.280	12.1	25.5	55.1	113	--	0.203
run2cptpropcorl OVKACL	CL, Vc, Ka, VP(290), Q, LAG	CL and Vc correlated, Q uncorrelated	1134.172 ^b	-16.364	0.280	12.1	25.5	55.2	113	--	0.203
run2cptpropcorl OVKAVC	CL, Vc, Ka, VP(290), Q, LAG	CL and Vc correlated, Q uncorrelated	1134.172	-16.364	0.280	12.1	25.5	55.1	113	--	0.203
runBASEMODE L	CL, Vc, Ka, VP(290), Q, LAG	CL and Vc correlated, Q uncorrelated	1135.567	-14.969	0.336	12.1	29.8	55.4	122	--	0.204

BSV= Variabilité interindividuelle; MOF= Fonction objective minimale; PK= Pharmacocinétique; Prop=Proportionnelle.

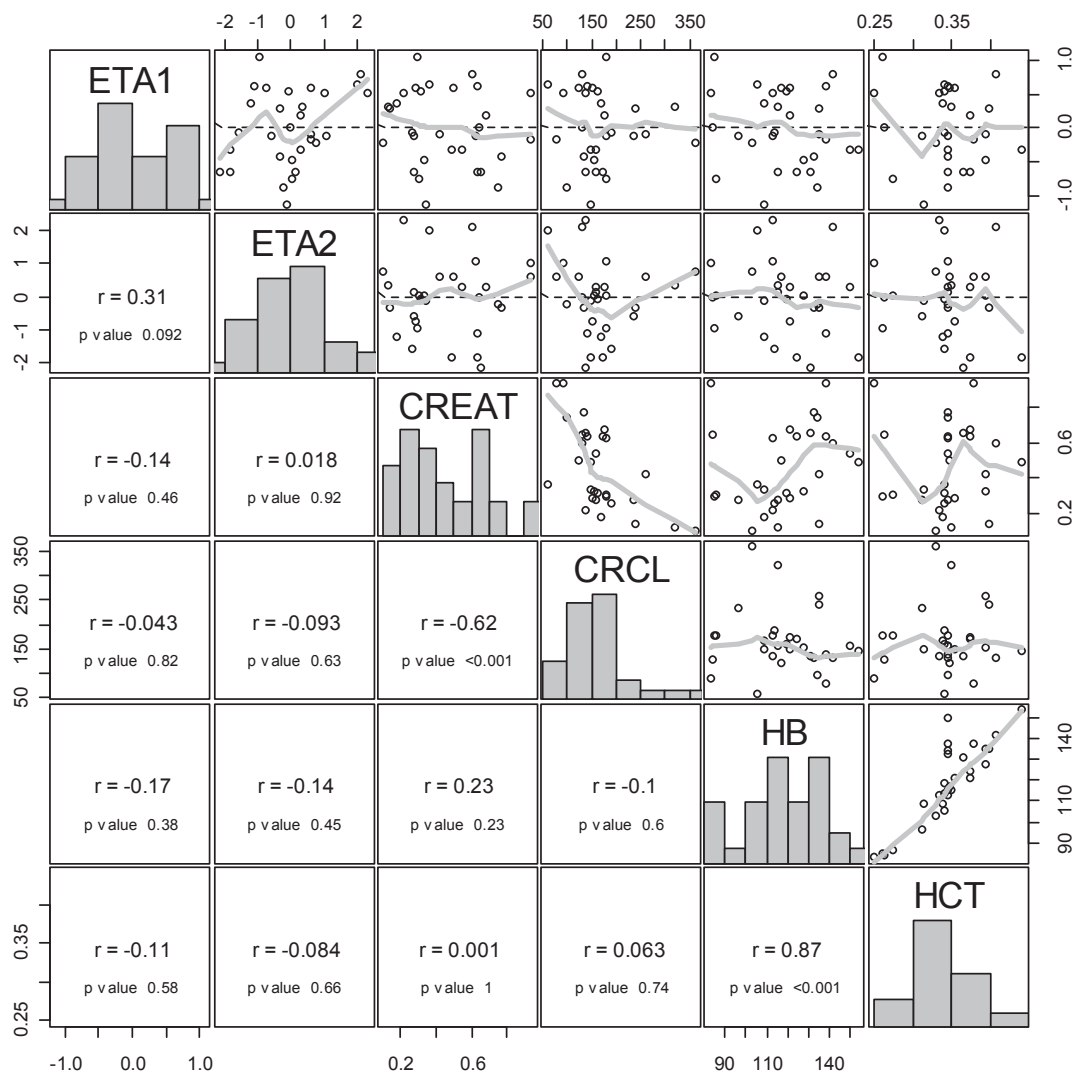
3 Relation entre les *Posthoc* du tacrolimus et les covariables continues



BMI= Indice de masse corporelle; BSA= Surface corporelle; ETA1= Effet aléatoire sur la clairance; ETA2= Effet aléatoire sur le volume de distribution; HT= Taille; WT= Poids.

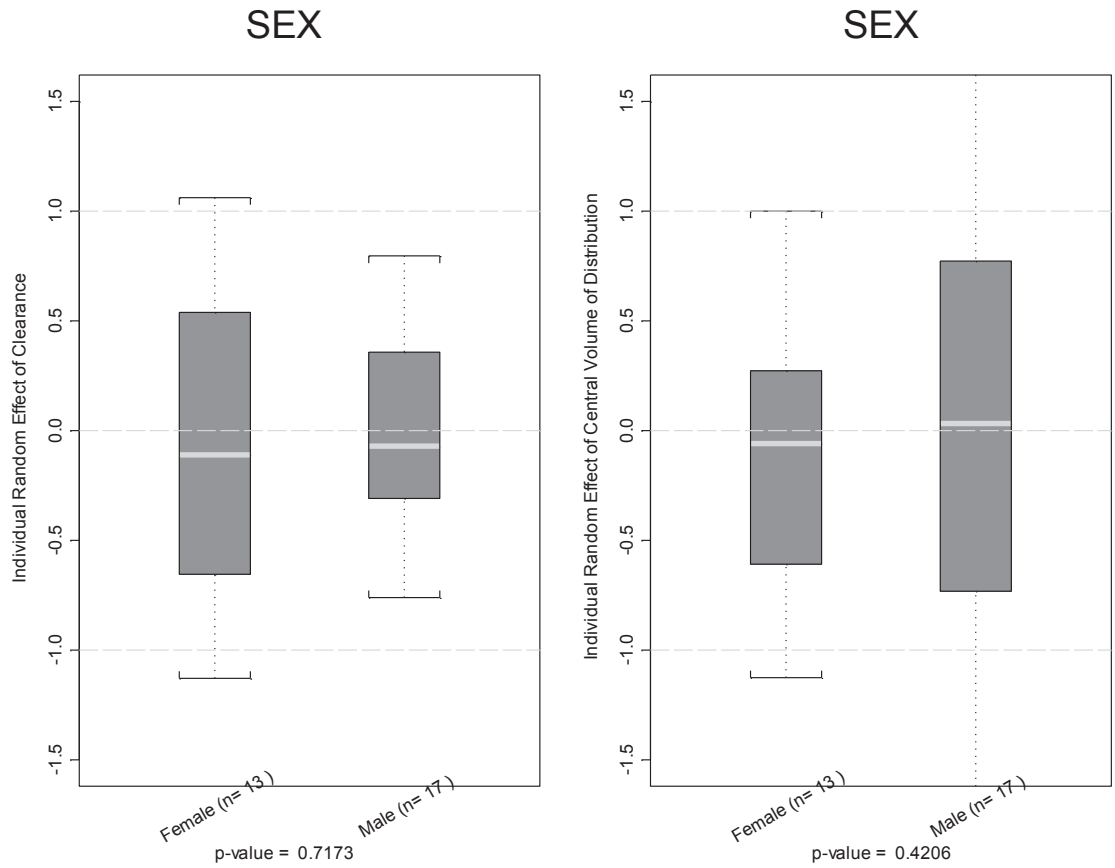


ALB= Albumine; ALT= Alanine aminotransferase, AST= Aspartate aminotransferase; BILI= Bilirubine; ETA1= Effet aléatoire sur la clairance; ETA2= Effet aléatoire sur le volume de distribution; GGT= γ -glutamyl transferase; PA= Phosphatase alcaline.

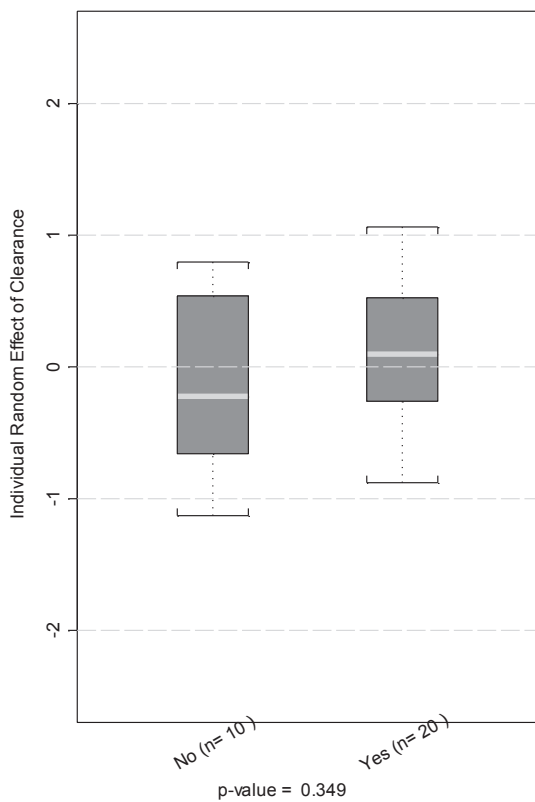


CRCL= Clairance de la creatinine; CREAT= Creatinine; ETA1= Effet aléatoire sur la clairance; ETA2= Effet aléatoire sur le volume de distribution; HB= Hémoglobine; HCT= Hématocrite.

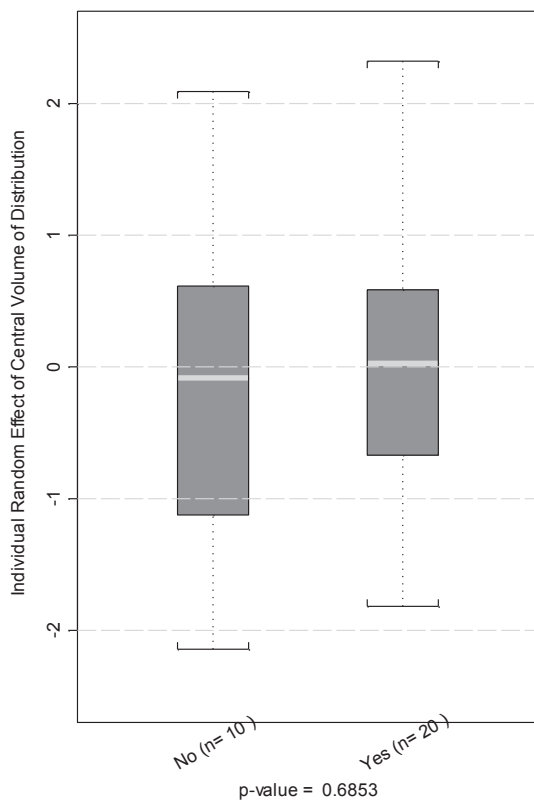
4 Relation entre les *Posthoc* du tacrolimus et les covariables catégoriques



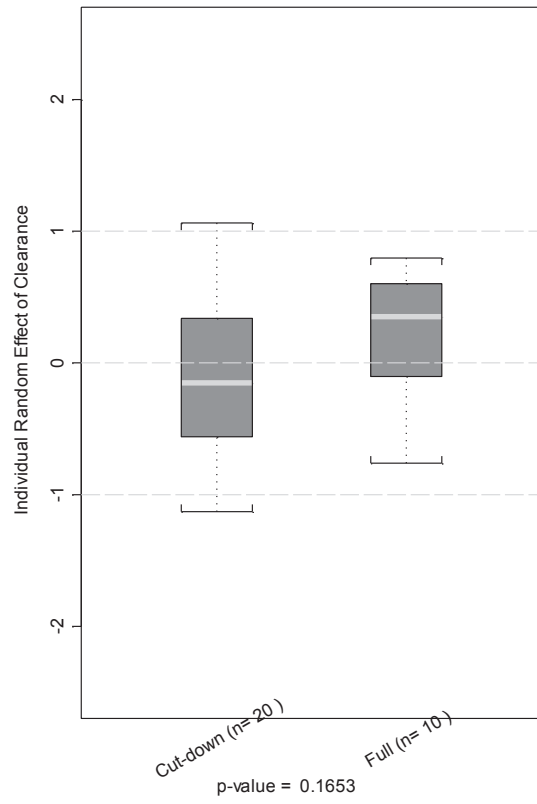
Steroids



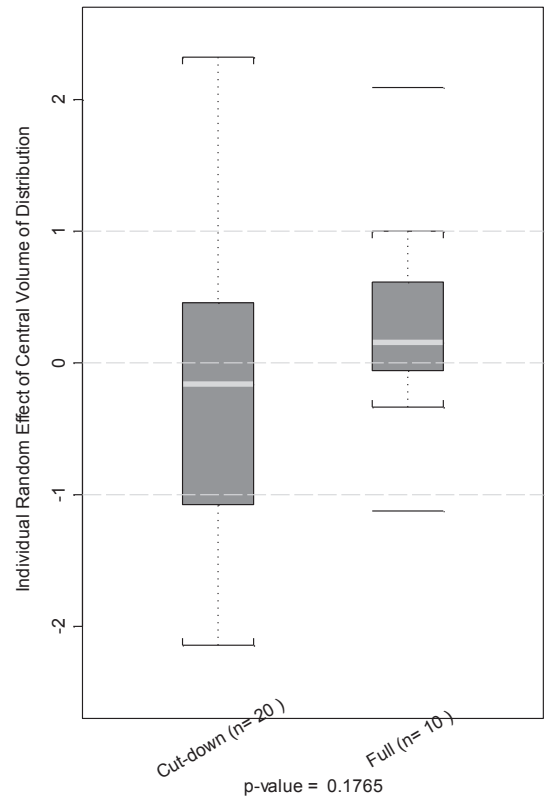
Steroids



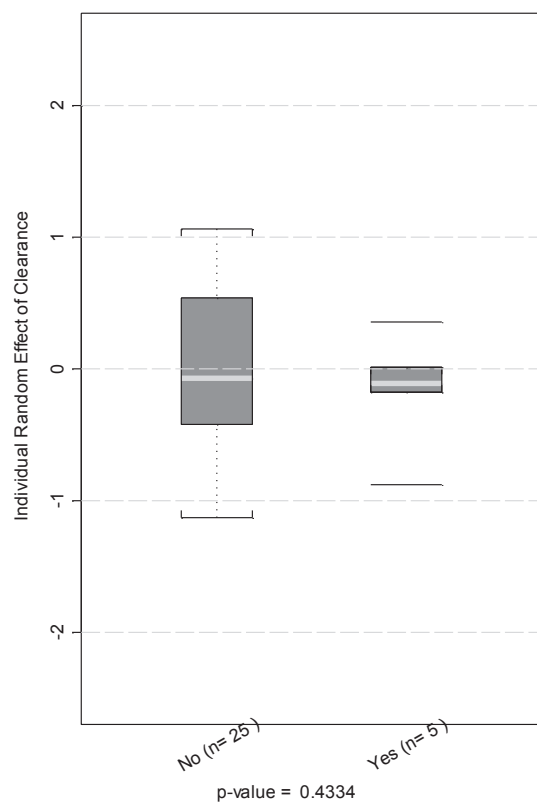
Type of Transplant



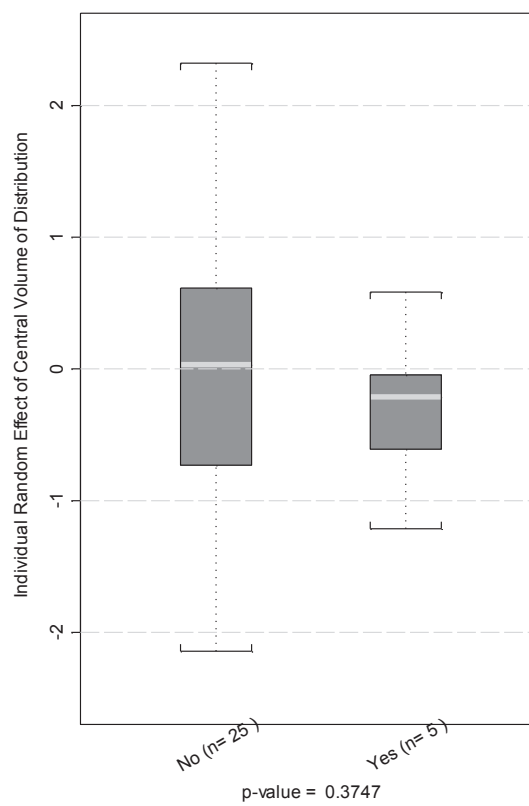
Type of Transplant



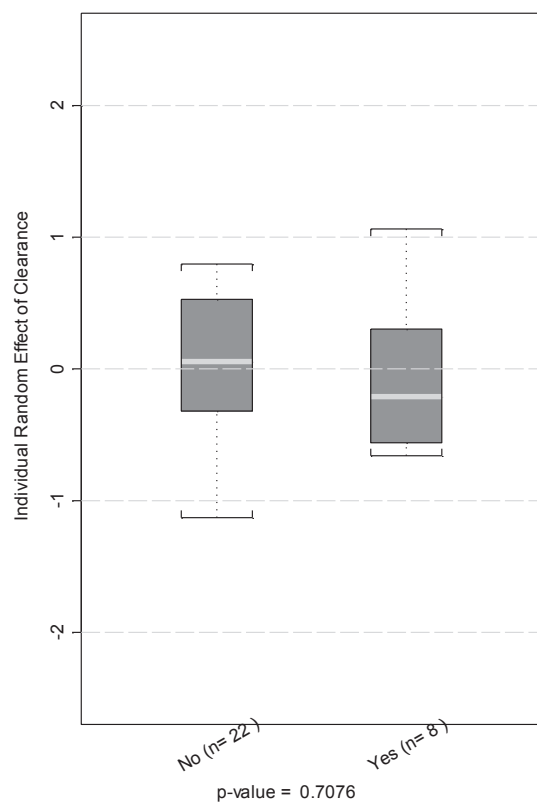
Hepatic Impairment



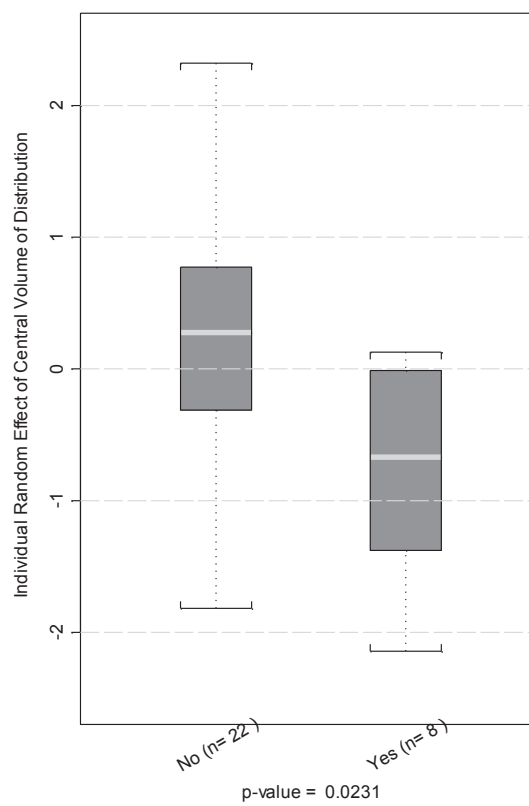
Hepatic Impairment



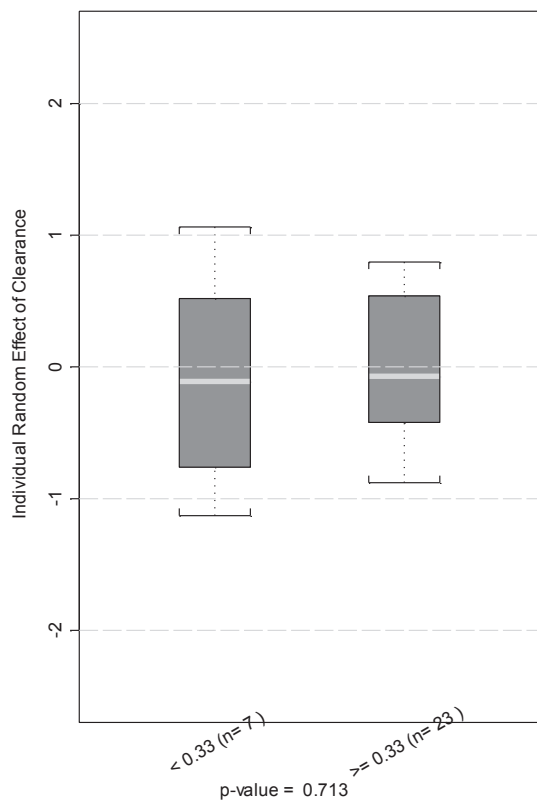
CYP3A4 Inhibitors



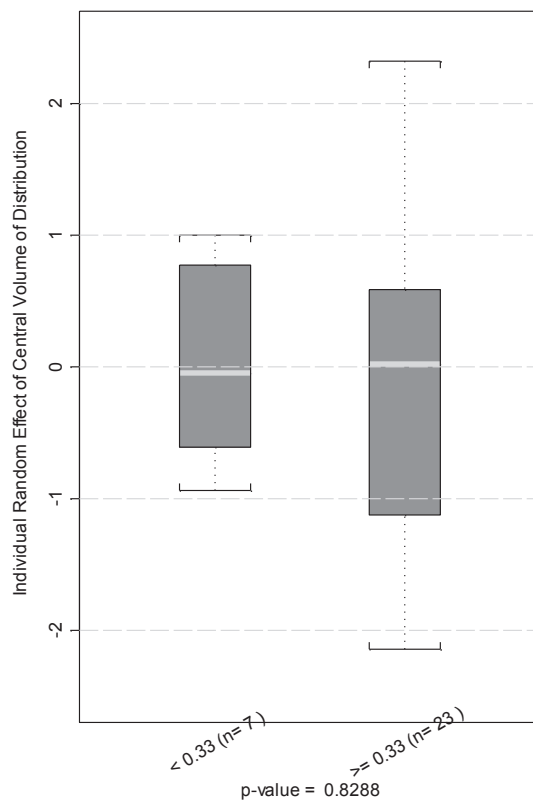
CYP3A4 Inhibitors



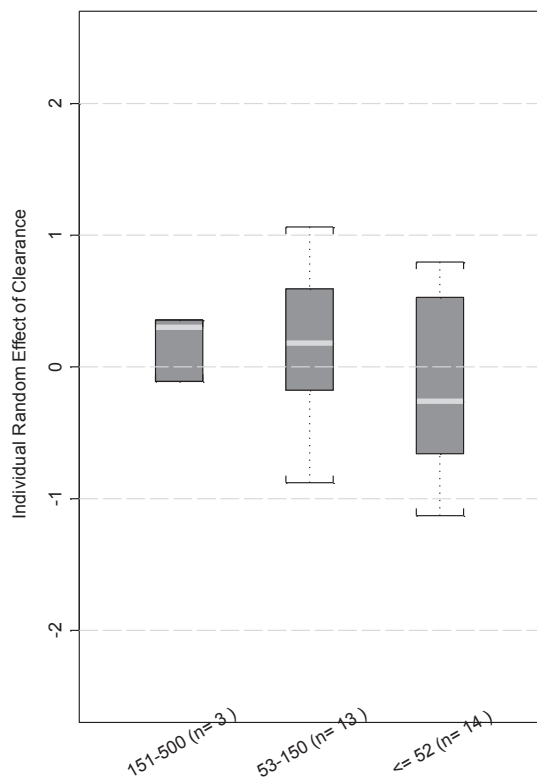
Hematocrit



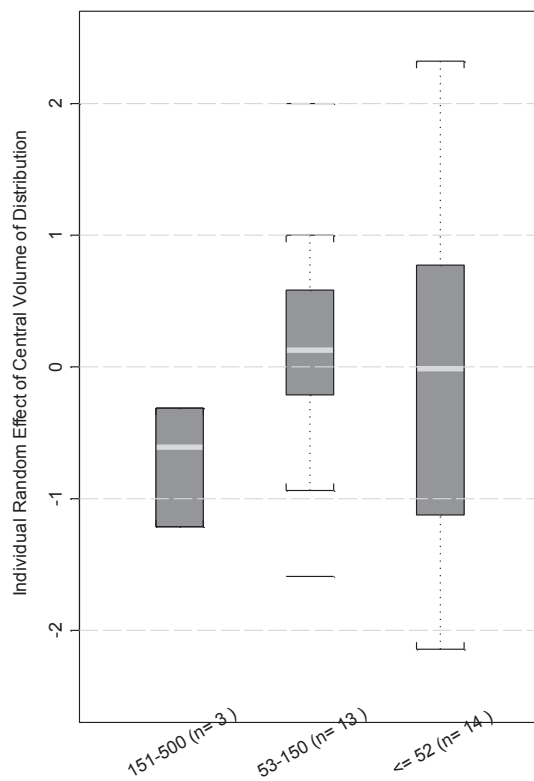
Hematocrit



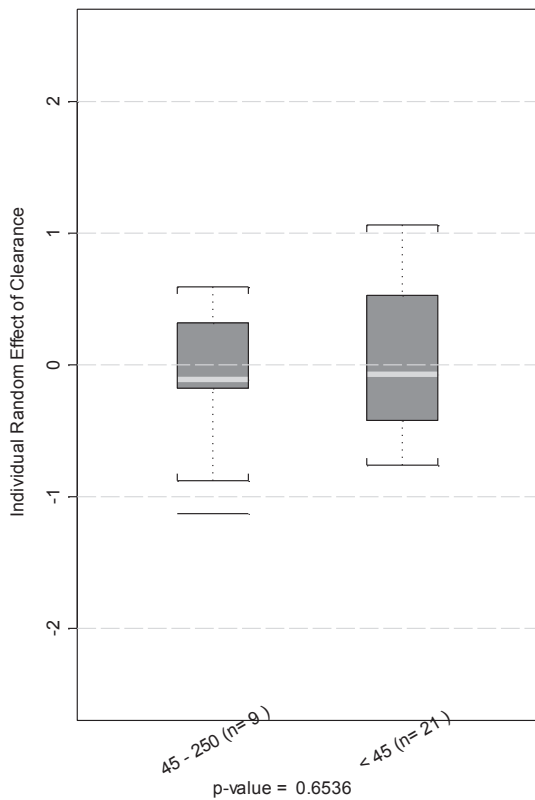
GGT



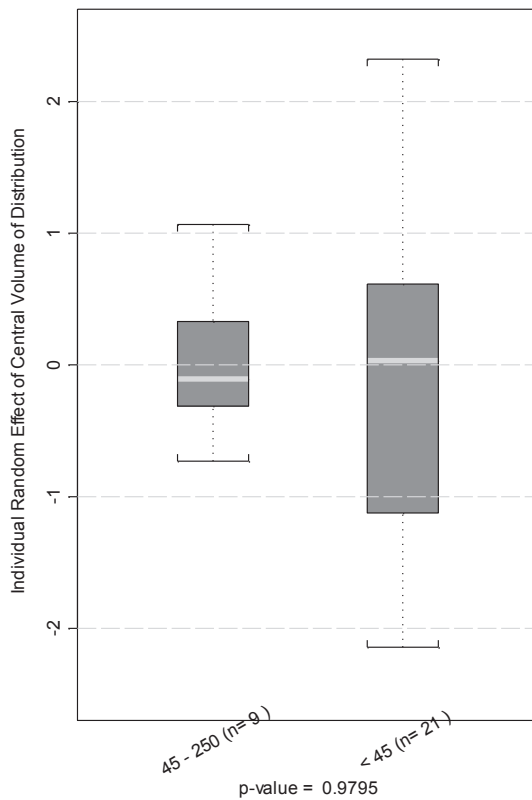
GGT

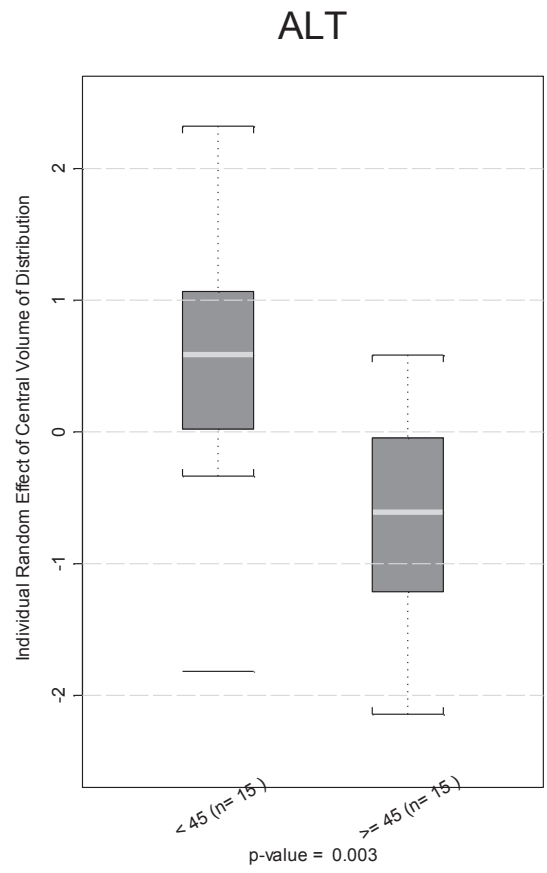
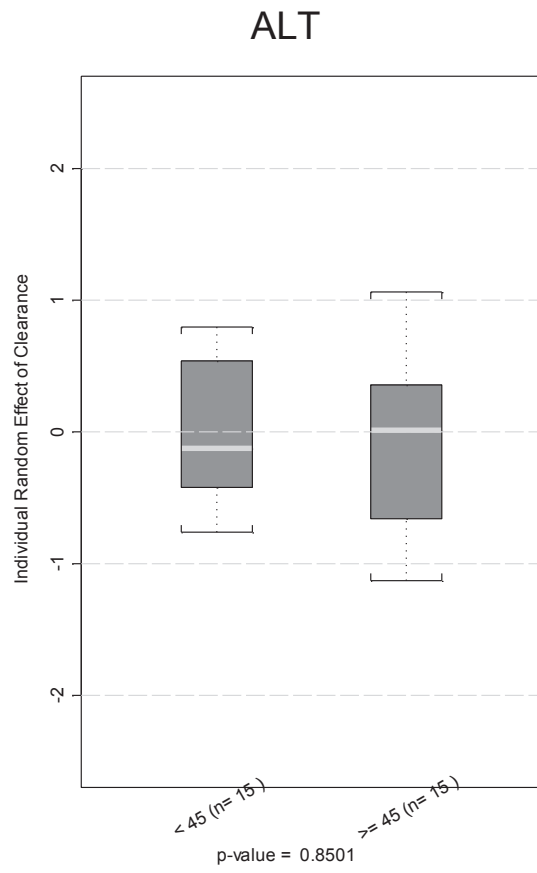


AST

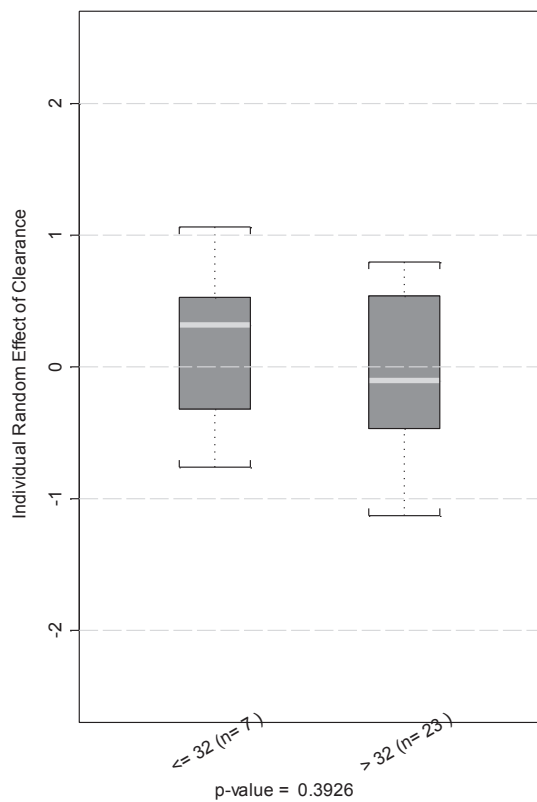


AST

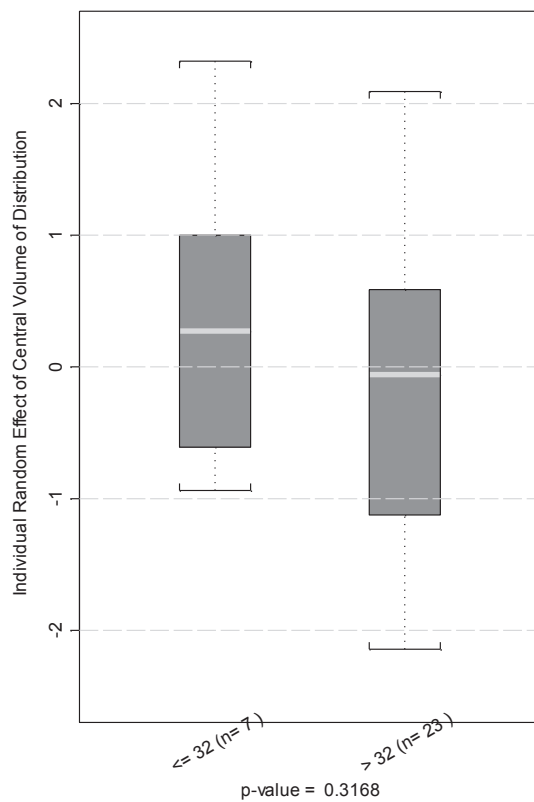




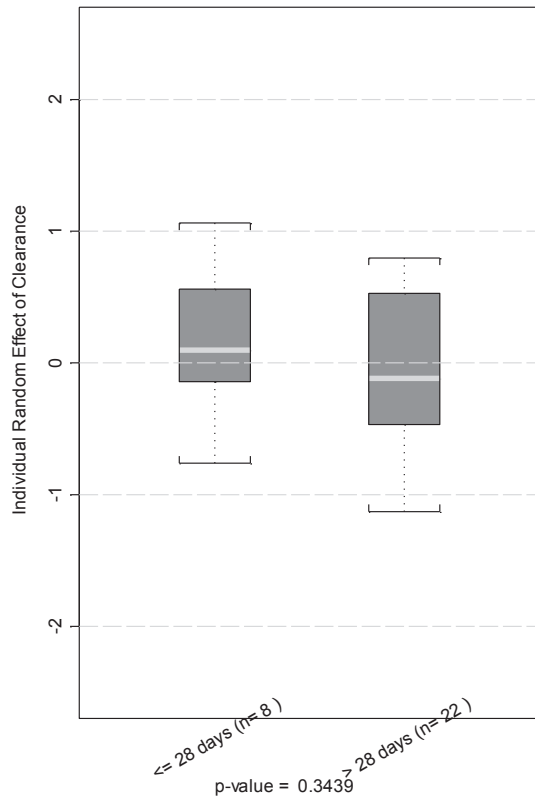
Albumin



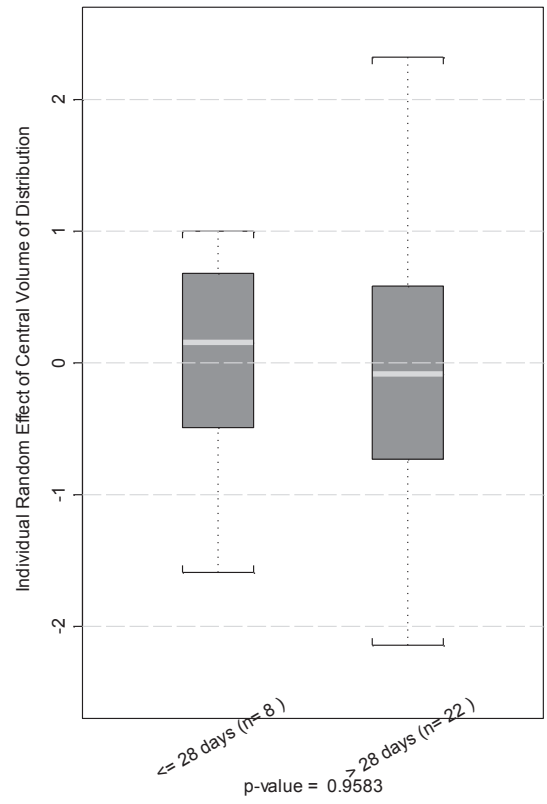
Albumin



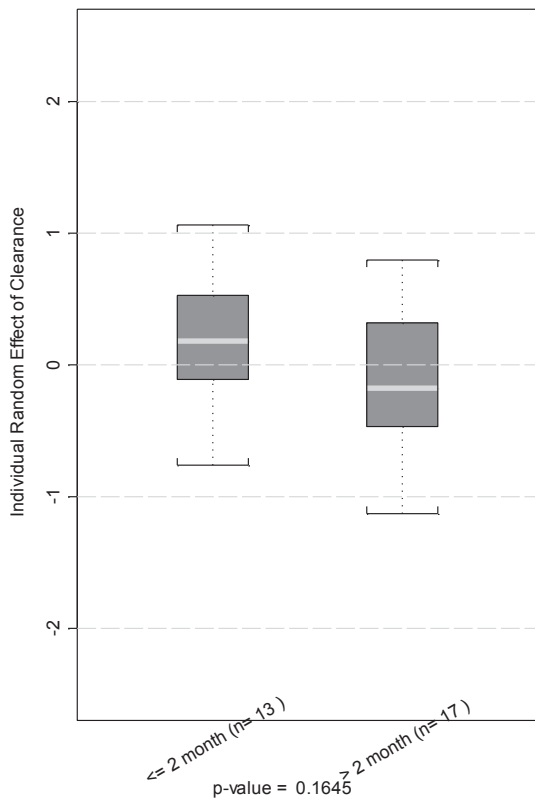
Time Post-transplantation



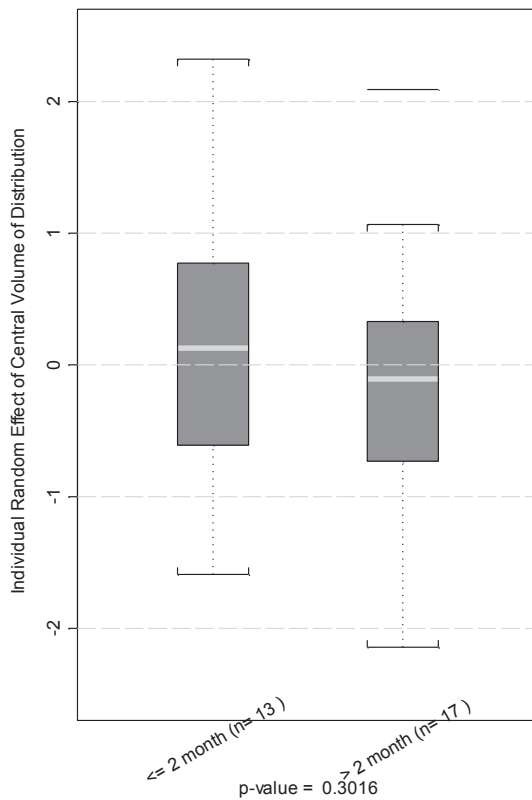
Time Post-transplantation



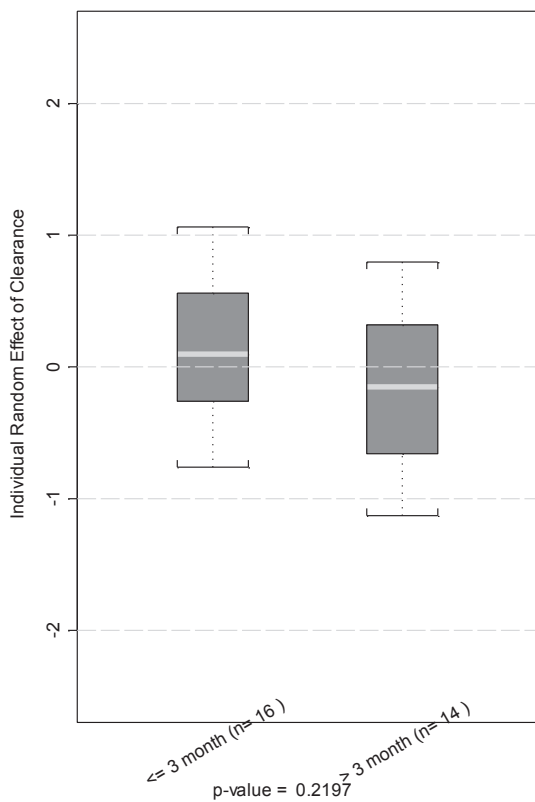
Time Post-transplantation



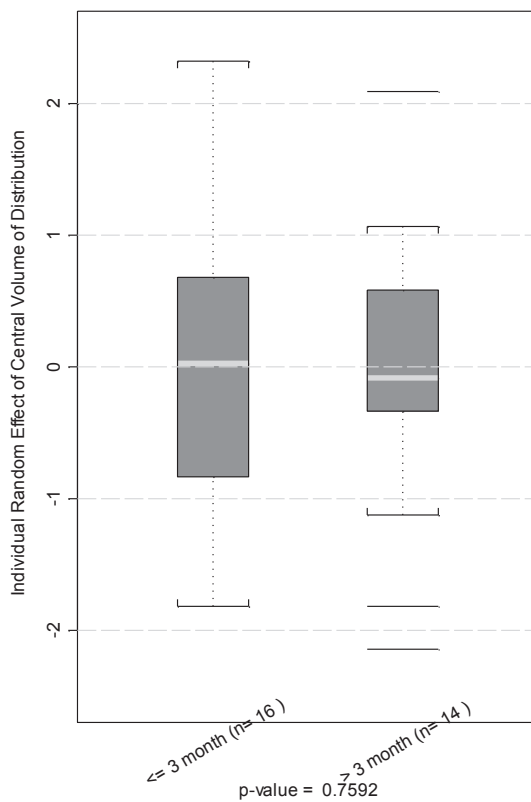
Time Post-transplantation



Time Post-transplantation



Time Post-transplantation



Annexe II

Limited sampling strategies for monitoring tacrolimus in paediatric liver transplant recipients

Jean-Romain Delaloye^{1*}, Nastya Kassir^{2*}, Anne-Laure Lapeyraque³, Fernando Alvarez⁴, Michel Lallier⁵, Mona Beaunoyer⁶, Line Labbé⁷, Yves Théorêt⁸, and Catherine Litalien⁹

¹ Division of General Paediatric Surgery, Department of Surgery, and Clinical Pharmacology Unit, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, MD

² Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Pharm.D

³ Division of Nephrology, Department of Paediatrics, and Clinical Pharmacology Unit, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, MD

⁴ Division of Gastroenterology, Department of Paediatrics, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, MD, PhD

⁵ Division of General Paediatric Surgery, Department of Surgery, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine. MD

⁶ Division of General Paediatric Surgery, Department of Surgery, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine. MD

⁷ Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, PhD

⁸ Department of Biochemistry and Clinical Pharmacology Unit, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, and Department of Pharmacology, Université de Montréal, PhD

⁹ Division of Paediatric Critical Care, Department of Paediatrics, and Clinical Pharmacology Unit, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, and Department of Pharmacology, Université de Montréal, MD

* These authors contributed equally to this work

Corresponding author:

Dr. Catherine Litalien

Division of Pediatric Critical Care, Department of Pediatrics

Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine

3175 chemin de la Côte Sainte-Catherine

Montréal (Québec), Canada H3T 1C5

Tel: (514) 345-4931 extension 2571

FAX: (514) 345-7731

Article publié dans

« Therapeutic Drug Monitoring »

Abstract

Objective: To develop and validate limited sampling strategies (LSSs) for tacrolimus in paediatric liver transplant recipients.

Methods: Thirty six 12-hour pharmacokinetic profiles from 28 paediatric liver transplant recipients (0.4 to 18.5 years) were collected. Tacrolimus concentrations were measured by immunoassay and area under the curve (AUC_{0-12}) by trapezoidal rule. LSSs consisting of 1, 2, 3, or 4 concentration-time points were developed using multiple regression analysis. Eight promising models (2 per category) were selected based on the following criteria: $r^2 \geq 0.90$, inclusion of trough concentration (C_0), and time points within 4 hours post-dose. The predictive performance of these LSSs was evaluated in an independent set of data by measuring the mean prediction error (%ME) and the root mean squared prediction error (%RMSE).

Results: Five models including 2 to 4 time points predicted AUC_{0-12} with a $\pm 15\%$ error limit. Bias (%ME) and precision (%RMSE) of LSS involving C_0 , C_1 , and C_4 ($AUC_{\text{predicted}} = 9.30 + 3.69 \cdot C_0 + 2.19 \cdot C_1 + 4.69 \cdot C_4$) were -4.98% and 8.29% , respectively. Among single time point LSSs, model using C_0 had a poor correlation with AUC_{0-12} ($r^2 = 0.53$) while the one with C_4 had the highest correlation with tacrolimus exposure ($r^2 = 0.84$).

Conclusion: Trough concentration is a poor predictor of tacrolimus AUC_{0-12} in paediatric liver transplant recipients. However, LSSs using 2 to 4 concentration-time points obtained within 4 hours post-dose provide a reliable and convenient method to predict tacrolimus exposure in this population. The proposed LSSs represent an important step that will allow the undertaking of prospective trials aiming to better define tacrolimus target AUC in paediatric liver transplant recipients, and to determine whether AUC-guided monitoring is superior to C_0 -based monitoring in terms of efficacy and safety.

Keywords: tacrolimus, therapeutic drug monitoring, paediatrics, liver transplantation, limited sampling strategies

1 Introduction

Tacrolimus (Prograf[®]; Fujisawa Healthcare Inc.) is the most prescribed immunosuppressive agent in paediatric solid organ transplant recipients; the proportion of paediatric patients receiving tacrolimus increased from 14.5% in 1997 to 63.2% in 2006.¹ As with cyclosporine, tacrolimus inhibits calcineurin and blocks the transcription of cytokines that drive the proliferative T-cell response, particularly interleukin-2.

Therapeutic drug monitoring has become a standard of care for tacrolimus dosing optimization because of its significant inter- and intraindividual pharmacokinetic (PK) variability and its narrow therapeutic index. Although whole blood trough concentration (C_0) is the current method used to guide dose individualisation. However many paediatric studies have shown that the relationship between tacrolimus C_0 and area under the concentration-time curve (AUC) is highly variable, with coefficients of determination (r^2) ranging from 0.30 to 0.88.²⁻¹³ Additionally, controversies remain about the relationship between C_0 and clinical outcomes.^{14, 15} In liver transplantation, while a number of studies have shown a significant correlation between C_0 and tacrolimus nephro- and neurotoxicity, reports failed to demonstrate a linear relationship between tacrolimus C_0 and the development of graft rejection.¹⁶⁻¹⁸

In adult kidney recipients, Undre et al. reported a significant correlation between low systemic exposure of tacrolimus and acute rejection,¹⁹ while Mahalati et al. demonstrated that AUC was a better predictor of clinical outcomes than C_0 for the related calcineurin inhibitor cyclosporine.²⁰ However, AUC-based monitoring which implies the measurement of multiple concentration-time points over the entire dosing interval is time-consuming, expensive, and often impractical for routine clinical practice, especially in the paediatric population.²¹ Alternatively, AUC can be predicted using the limited sampling strategy (LSS) approach, which has been developed so that a restricted number of sampling times can be used. Most LSSs for tacrolimus have been derived from adult transplant recipients,²²⁻²⁶ and their direct application in children may not be feasible because of different tacrolimus PKs.²⁷ In the paediatric population, three studies have proposed LSSs

to estimate tacrolimus exposure;^{2, 3, 28} none of these LSSs have been validated in an independent set of data.^{21, 29, 30} Furthermore, two of these trials^{2, 3} involved stable renal transplant patients and, as such, their use in other types of transplantation is not recommended since LSSs should only be applied to the patient population for which they have been validated.²¹ The third trial dealt with children who underwent liver transplantation but provided only limited information with regard to the population studied and the methodological approach used.

The aim of this study was to develop and validate LSSs for tacrolimus in paediatric liver transplant recipients.

2 Methods

Patients and Study Design

This is a retrospective study analyzing 12-hour PK profiles performed in the paediatric liver transplant population of the Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine (Montreal, Canada) between January 2007 and January 2009. The study was approved by the Institutional Research Ethics Committee. All liver transplant recipients aged ≤ 18 years of age who underwent full tacrolimus PK profile as part of their clinical care were eligible for inclusion. Exclusion criteria included patients not receiving oral tacrolimus twice daily and those for whom full PK profile was not obtained at least three days after receiving the same dose of tacrolimus.

Tacrolimus was administered as a capsule or suspension (5 mg/mL) without any food intake recommendation. Dosage was adjusted by the liver transplant team to keep tacrolimus C_0 within a suggested target range of 5-15 ng/ml according to time post-transplantation and concomitant immunosuppression. However measurement of AUC_{0-12} was requested in some specific situations including: at or around patient discharge; when nephrotoxicity occurred despite C_0 levels within the target range; when important intra-individual C_0 variability occurred in the absence of dose modification; and at mycophenolate mofetil initiation.

Whenever available in the medical chart, the following data were recorded for each patient: demographic parameters, type of liver transplantation, underlying diagnosis, time post-transplantation at which the PK profile was performed, tacrolimus dosing regimen and formulation, concomitant immunosuppression, blood chemistry (liver and renal function tests, haemoglobin, hematocrit, and albumin), and presence of clinically relevant CYP3A4 and/or P-glycoprotein inducer or inhibitor.

Sample Collection and Analytical Methods

Serial blood samples were collected in EDTA-containing vacutainers immediately before tacrolimus administration (C_0), and after 0.5 ($C_{0.5}$), 1 (C_1), 1.5 ($C_{1.5}$), 2 (C_2), 3 (C_3), 4 (C_4), 8 (C_8), and 12 (C_{12}) hours. Tacrolimus whole blood concentrations were determined using the microparticle enzyme immunoassay (MEIA) IMx (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). The lower and upper limits of detection were 1.5 ng/mL and 30 ng/mL, respectively. The between-run coefficients of variation were 14.10% at 5 ng/mL, 11.15% at 11 ng/mL, and 10.21% at 22 ng/mL.

Pharmacokinetic and Statistical Analyses

Pharmacokinetic parameters were estimated using noncompartmental methods. Tacrolimus peak concentration (C_{\max}), time to reach C_{\max} (T_{\max}), and C_0 , were determined for each patient from direct data observation. Observed tacrolimus AUC (AUC_{0-12}) was calculated using the linear trapezoidal rule (S-plus 8.1, Insightful Corporation, Seattle, USA).

Pharmacokinetic data were randomly split into two equal groups: a training group and a validation group. In the training group, a multiple regression analysis was used to determine the relationship between observed tacrolimus AUC_{0-12} (dependent variable) and the concentrations at various time points (independent variable or predictor). This was carried out using the best-subset-regression in conjunction with the stepwise forward selection technique. This method consists of starting with an equation with no predictors, trying them out one by one sequentially, and calculating the coefficient of determination for each equation (r^2). Multiple linear regression models were developed in which 1, 2, 3, or 4 concentration-time points were used as predictors. All possible equations were derived and the 2 best regression models using 1, 2, 3, and 4 predictors were identified based on the following criteria: $r^2 \geq 0.90$, inclusion of C_0 , and time points within 4 hours post tacrolimus administration.

Equations were then validated in an independent set of patients, the validation group. The latter was used to estimate the predictive performance of the regression models developed in the training group. As suggested by Sheiner and Beal,³⁰ two error indices, the mean prediction error (ME) and the root mean squared prediction error (RMSE), were calculated to evaluate bias and precision, respectively. Their relative values, expressed as percentages, were also calculated. The following equations were used:

$$ME = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\text{Pred} - \text{Obs})$$

$$MSE = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\text{Pred} - \text{Obs})^2$$

$$RMSE = \sqrt{MSE}$$

$$ME (\%) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left(\frac{\text{Pred} - \text{Obs}}{\text{Obs}} \right) \times 100$$

$$RMSE (\%) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left(\frac{\text{Pred} - \text{Obs}}{\text{Obs}} \right)^2} \times 100$$

where Pred is the predicted value of AUC_{0-12} , Obs is the AUC_{0-12} observed value of, MSE is the mean squared prediction error, and N is the number of patients. A 95 % confidence interval (CI) was calculated for each parameter. In addition, the predictive performance of the LSSs was tested by the method of Bland and Altman.³¹ Finally, an approach based on CI was used to compare the predictive performance of the different regression models.³⁰ This consisted of computing the difference in MSE's (Δ MSE) and ME's (Δ ME) between the two models compared and calculating their CI. If the CI did not include zero, the model with the smaller MSE or ME was considered significantly more precise or less biased, respectively. On the other hand, when the CI included zero, the MSE or ME difference was considered not significant. Clinical and PK data are presented as mean \pm SD (range). Comparisons between patient characteristics and PK parameters of the training and validation groups were performed using the unpaired t-test for normally distributed data

and the Wilcoxon Rank-Sum test for skewed data. Statistical significance was defined at P value ≤ 0.05 . All statistical analyses were performed using S-plus 8.1, SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), and GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3 Results

A total of 42 full PK profiles obtained from 31 liver transplant recipients were available for this study. Thirty six profiles from 28 patients (15M/13F) aged between 0.4 and 18.5 years were included. Six profiles from 3 patients were excluded because either they were not obtained under steady-state conditions (n=3), or they were obtained while patients were receiving tacrolimus three times a day. The indications for whole liver (10 patients) or cutdown liver (18 patients) transplantation were: biliary atresia (n=11), tyrosinemia (n=7), North American Indian childhood cirrhosis (n=2), fulminant hepatitis (n=2), Alagille syndrome (n=2), histiocytosis (n=2), sclerosing cholangitis (n=1), and autoimmune hepatitis (n=1).

Patient characteristics are summarized in Table 1. As shown, the 36 PK profiles were equally divided in the training and validation groups. One patient with 3 full measurements of AUC_{0-12} was included in both groups with two profiles in the training group and one in the validation group. Patient characteristics were not statistically different between the two groups, except for two liver parameters (ALT and GGT). Concomitant use of corticosteroids, which may induce CYP3A isoenzyme, was present for 22 PK profiles (61.1%). In about half of the profiles (52.8%), patients were receiving one or two drugs known as potential CYP3A4 and/or P-glycoprotein inhibitors (amlodipine and lansoprazole (n=6), amlodipine and enalapril (n=1), amlodipine (n=9), lansoprazole (n=2), and diltiazem (n=1)).

Tacrolimus concentration-time profiles and PK parameters (Figure 1 and Table 2, respectively) exhibited a high degree of between-individual variability. When PK parameters were normalized for a tacrolimus dose of 0.1 mg/kg, no significant difference was observed between the training and validation groups ($P = 0.73, 0.87,$ and 0.44 for $AUC_{0-12}, C_0,$ and C_{max} , respectively).

LSS development

Two hundred fifty five regression equations were developed to predict tacrolimus AUC_{0-12} using a maximum of 4 different concentration-time points. Among these equations, 5 were identified as best regression models based on the predefined selection criteria (models 1 to 5, Table 3). For comparison purposes, 4 equations that did not meet these criteria (models 6 to 9) are also presented. Among the 3 single concentration-time point equations shown, those involving C_0 and C_4 had the poorest ($r^2=0.53$) and the highest ($r^2=0.84$) correlation with AUC_{0-12} , respectively.

LSS validation

The %ME (bias) was also less than 15%, although all models tended to underestimate tacrolimus AUC_{0-12} . The relative performance of the different LSSs is shown in Table 5. For three out of the four regression models using 3 or 4 concentration-time points (models 1 to 3), precision and bias were significantly better than the model using 2 point equation (model 5). The fourth model using 3 time points (model 4) was significantly more precise than model 5, but there was no difference in bias between the two models. Finally, no significant difference was observed between the predictive capacity of LSSs involving 3 and 4 concentration-time points

Figures 2A and 2B depict the linear correlation of observed AUC_{0-12} and AUC_{0-12} predicted by model 3 ($C_0-C_1-C_4$) and model 5 (C_0-C_4), respectively. Figures 2C and 2D show the Bland and Altman analysis of the paired samples for both models, with the average of predicted and observed AUC_{0-12} ranging from 83.6 to 305.0 ng*h/mL. In accordance with %ME, the predicted AUC_{0-12} was lower than the observed AUC_{0-12} , with a bias of -5.4% for model 3 (Figure 2C) and -10.5% for model 5 (Figure 2D).

4 Discussion

This is the first study on the development and validation of LSSs for the prediction of tacrolimus AUC_{0-12} in paediatric liver transplant recipients. Five LSSs using 2 to 4 concentration-time points obtained within 4 hours after tacrolimus dosing and including C_0 have been developed and provide an accurate and convenient method to predict tacrolimus AUC_{0-12} in this population. All 5 models predicted tacrolimus AUC_{0-12} with a $\pm 15\%$ prediction error limit; this is a clinically acceptable range because it represents the deviation from the observed AUC that usually initiates dosage adjustment.^{29, 32, 33}

Among single concentration-time point LSSs, regression model using C_0 had a poor correlation with AUC_{0-12} ($r^2 = 0.53$) while the one with C_4 had the highest correlation with tacrolimus exposure ($r^2 = 0.84$). This is in accordance with other adult and paediatric studies that have shown C_0 to be a poor predictor of tacrolimus exposure in solid organ transplantation.^{2, 3, 6, 8, 14, 34, 35}

LSSs developed in this study involved a limited number of blood samples within a short period of time after drug administration, originally suggested by Ting et al.²¹ This method is convenient both for the patient and the clinician, and is financially acceptable for the institution. The inclusion of predose measurement in the equations was a deliberate choice. Indeed, C_0 allows checking for compliance, helps identifying patients with high tacrolimus clearance, and is a routinely used marker by clinicians.^{29, 36}

In paediatric organ transplantation, data published regarding LSSs are scarce. One report involving 14 liver recipients has suggested a 3 concentration-time points LSS (C_1 - C_4 - C_8), but without evaluation of its predictive performance.²⁸ In renal transplant recipients, two studies^{2, 3} have proposed LSSs, although with inconvenient sampling times for an outpatient setting (C_6) and no validation with an independent set of data.^{21, 29, 30} Both studies showed a weak correlation between observed AUC and C_0 ($r^2 = 0.36$ and $r^2 = 0.56$) and among single concentration-time point, the best correlation was observed with C_4 . These observations are in agreement with our results.

As in children, limited data are available in adult liver transplant recipients. Dansirikul et al.³⁴ developed LSSs based on single time point. In their study, AUC_{0-6} was assumed to be a surrogate of the full tacrolimus AUC (AUC_{0-12}) and was used for LSS analysis. The authors showed that regression equations with sampling time at 2, 4, or 5 hours post-dose rather than C_0 were superior in predicting tacrolimus exposure (AUC_{0-6}). However, only the LSS model involving C_5 was properly validated with a jackknife technique. In renal transplant patients, numerous LSSs have been published over the last decade although proper validation was often lacking.^{23, 33, 37-39} More recently, Miura et al.⁴⁰ developed and validated LSSs for simultaneous estimation of AUC of tacrolimus and mycophenolic acid in this population. Similar to our findings, they reported that combinations of 2 or 3 concentration-time points including C_0 and C_4 (C_0-C_4 and $C_0-C_2-C_4$) provided reliable estimation of tacrolimus AUC_{0-12} ; however, the best LSS for simultaneous prediction of the 2 immunosuppressive agents included C_2 , C_4 , and C_9 . These results are not surprising considering the enterohepatic circulation of mycophenolic acid glucuronides which causes a secondary plasma peak of mycophenolic acid.

The LSSs developed in this study showed good predictive performance in an independent validation group, despite high heterogeneity of the studied population in terms of demographic and clinical characteristics, time post-transplantation, and shape of PK profiles. This increases the likelihood that these LSSs will be used in various clinical settings. Additionally, in an “intention” to be highly representative of clinical reality, outlier PK profiles were not removed even if this was associated with the potential risk of underestimating the predictive performance of the LSSs. Another strength of these LSSs is the ease with which they could be applied by health care professionals; this is in contrast with LSSs derived from Bayesian analysis where users require more extensive training and specialized software programs.

This study has some limitations that deserve further comments. Ting et al.²¹ recently suggested that LSS should only be applied on transplant patient populations that are comparable to the population used to develop the LSS. As such, the predictive power of the

LSSs reported in this study cannot be guaranteed for patient populations other than paediatric liver transplant recipients. By opposition to Bayesian derived LSSs, LSSs developed with a multiple regression approach are less flexible in the sampling time where collection of samples at exact times is necessary.⁴¹ Immunoassays may overestimate tacrolimus concentrations compared to high-performance liquid chromatography methods, due to cross reactivity with tacrolimus metabolites.¹⁵ Thus, caution should be exerted in the application of the proposed LSSs if tacrolimus concentrations are measured with analytic techniques different than the specific immunoassay used in this study.

Even though the evaluation of the relative performance of the 5 LSSs has shown that 3 and 4 concentration-time points LSSs were statistically more precise and less biased than the one using 2 time points, all equations can be used with confidence. Therefore, it is the ultimate clinician's choice to decide which model to use according to the desired level of precision, balanced with the costs and feasibility in clinical practice.

5 Conclusion

Trough concentration is a poor predictor of tacrolimus AUC_{0-12} in paediatric liver transplant recipients. However, LSSs using 2 to 4 concentration-time points obtained within 4 hours after tacrolimus dosing have been developed and provide a reliable and convenient method to predict tacrolimus exposure in this population. By facilitating the accurate measurement of tacrolimus full AUC, the proposed LSSs represent an important step that will allow the undertaking of prospective trials aiming to better define tacrolimus target AUC in paediatric liver transplant recipients, and to determine whether AUC-guided monitoring is superior to C_0 -based monitoring in terms of efficacy and safety.

6 Acknowledgements

We thank Carole Viau and Dr. Oliver Karam for their technical assistance. We also thank the nursing staff of the Multispecialty Clinic at CHU Ste-Justine for their help with sample collection. The time and effort of Professor Manuel Pascual (Chief, Centre de Transplantation d'Organes, CHUV, Lausanne) in accomplishing this project are also gratefully acknowledged.

7 Conflict of Interest/Disclosure

Financial support came from the Research Centre of Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine. N.K. received a studentship from the Faculty of graduate studies of Université de Montréal. L.L. is recipient of a Rx & D/CIHR Health Research Foundation Career Award in Health Sciences.

8 References

1. Smith JM, Stablein DM, Munoz R, et al. Contributions of the Transplant Registry: The 2006 Annual Report of the North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies (NAPRTCS). *Pediatr Transplant.* 2007;11:366-373.
2. Claeys T, Van Dyck M, Van Damme-Lombaerts R. Pharmacokinetics of tacrolimus in stable paediatric renal transplant recipients. *Pediatr Nephrol.* 2010;25:335-342.
3. Filler G, Feber J, Lepage N, et al. Universal approach to pharmacokinetic monitoring of immunosuppressive agents in children. *Pediatr Transplant.* 2002;6:411-418.
4. Filler G, Grygas R, Mai I, et al. Pharmacokinetics of tacrolimus (FK 506) in children and adolescents with renal transplants. *Nephrol Dial Transplant.* 1997;12:1668-1671.
5. Heffron TG, Pescovitz MD, Florman S, et al. Once-daily tacrolimus extended-release formulation: 1-year post-conversion in stable pediatric liver transplant recipients. *Am J Transplant.* 2007;7:1609-1615.
6. Kim JS, Aviles DH, Silverstein DM, et al. Effect of age, ethnicity, and glucocorticoid use on tacrolimus pharmacokinetics in pediatric renal transplant patients. *Pediatr Transplant.* 2005;9:162-169.
7. Lee MN, Butani L. Improved pharmacokinetic monitoring of tacrolimus exposure after pediatric renal transplantation. *Pediatr Transplant.* 2007;11:388-393.
8. Montini G, Ujka F, Varagnolo C, et al. The pharmacokinetics and immunosuppressive response of tacrolimus in paediatric renal transplant recipients. *Pediatr Nephrol.* 2006;21:719-724.
9. Reding R, Sokal E, Paul K, et al. Efficacy and pharmacokinetics of tacrolimus oral suspension in pediatric liver transplant recipients. *Pediatr Transplant.* 2002;6:124-126.
10. Schubert M, Venkataramanan R, Holt DW, et al. Pharmacokinetics of sirolimus and tacrolimus in pediatric transplant patients. *Am J Transplant.* 2004;4:767-773.

11. Shishido S, Asanuma H, Tajima E, et al. Pharmacokinetics of tacrolimus in pediatric renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2001;33:1066-1068.
12. Wallemacq PE, Furlan V, Moller A, et al. Pharmacokinetics of tacrolimus (FK506) in paediatric liver transplant recipients. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1998;23:367-370.
13. Webb NJ, Stevenson PJ, Lewis MA, et al. Pharmacokinetics of tacrolimus in paediatric renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2002;34:1948-1950.
14. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43:623-653.
15. Wallemacq P, Armstrong VW, Brunet M, et al. Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference. *Ther Drug Monit.* 2009;31:139-152.
16. Backman L, Nicar M, Levy M, et al. FK506 trough levels in whole blood and plasma in liver transplant recipients. Correlation with clinical events and side effects. *Transplantation.* 1994;57:519-525.
17. Kershner RP, Fitzsimmons WE. Relationship of FK506 whole blood concentrations and efficacy and toxicity after liver and kidney transplantation. *Transplantation.* 1996;62:920-926.
18. Schwartz M, Holst B, Facklam D, et al. FK 506 in liver transplantation: correlation of whole blood levels with efficacy and toxicity. The US Multicenter FK 506 Dose Optimization. *Transplant Proc.* 1995;27:1107.
19. Undre NA, van Hooff J, Christiaans M, et al. Low systemic exposure to tacrolimus correlates with acute rejection. *Transplant Proc.* 1999;31:296-298.
20. Mahalati K, Belitsky P, Sketris I, et al. Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve: its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation. *Transplantation.* 1999;68:55-62.

21. Ting LS, Villeneuve E, Ensom MH. Beyond cyclosporine: a systematic review of limited sampling strategies for other immunosuppressants. *Ther Drug Monit.* 2006;28:419-430.
22. Armendariz Y, Pou L, Cantarell C, et al. Evaluation of a limited sampling strategy to estimate area under the curve of tacrolimus in adult renal transplant patients. *Ther Drug Monit.* 2005;27:431-434.
23. Pisitkun T, Eiam-Ong S, Chusil S, et al. The roles of C₄ and AUC₀₋₄ in monitoring of tacrolimus in stable kidney transplant patients. *Transplant Proc.* 2002;34:3173-3175.
24. Ragette R, Kamler M, Weinreich G, et al. Tacrolimus pharmacokinetics in lung transplantation: new strategies for monitoring. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24:1315-1319.
25. Scholten EM, Cremers SC, Schoemaker RC, et al. AUC-guided dosing of tacrolimus prevents progressive systemic overexposure in renal transplant recipients. *Kidney Int.* 2005;67:2440-2447. \
26. Ting LS, Partovi N, Levy RD, et al. Limited sampling strategy for predicting area under the concentration-time curve of mycophenolic acid in adult lung transplant recipients. *Pharmacotherapy.* 2006;26:1232-1240.
27. Wallemacq PE, Verbeeck RK. Comparative clinical pharmacokinetics of tacrolimus in paediatric and adult patients. *Clin Pharmacokinet.* 2001;40:283-295.
28. Manzanares C. Therapeutic drug monitoring of tacrolimus: a moving matter. *Therapie.* 2002;57:133-136.
29. David OJ, Johnston A. Limited sampling strategies for estimating cyclosporin area under the concentration-time curve: review of current algorithms. *Ther Drug Monit.* 2001;23:100-114.
30. Sheiner LB, Beal SL. Some suggestions for measuring predictive performance. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1981;9:503-512.

31. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986;1:307-310.
32. Meier-Kriesche HU, Kaplan B, Brannan P, et al. A limited sampling strategy for the estimation of eight-hour neoral areas under the curve in renal transplantation. *Ther Drug Monit*. 1998;20:401-407.
33. Wong KM, Shek CC, Chau KF, et al. Abbreviated tacrolimus area-under-the-curve monitoring for renal transplant recipients. *Am J Kidney Dis*. 2000;35:660-666.
34. Dansirikul C, Staatz CE, Duffull SB, et al. Sampling times for monitoring tacrolimus in stable adult liver transplant recipients. *Ther Drug Monit*. 2004;26:593-599.
35. Langers P, Press RR, den Hartigh J, et al. Flexible limited sampling model for monitoring tacrolimus in stable patients having undergone liver transplantation with samples 4 to 6 hours after dosing is superior to trough concentration. *Ther Drug Monit*. 2008;30:456-461.
36. Hoyer PF. Therapeutic drug monitoring of cyclosporin A: should we use the area under the concentration-time curve and forget trough levels? *Pediatr Transplant*. 2000;4:2-5.
37. Balbontin FG, Kiberd B, Squires J, et al. Tacrolimus monitoring by simplified sparse sampling under the concentration time curve. *Transplant Proc*. 2003;35:2445-2448.
38. Jorgensen K, Povlsen J, Madsen S, et al. C₂ (2-h) levels are not superior to trough levels as estimates of the area under the curve in tacrolimus-treated renal-transplant patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17:1487-1490.
39. Kuypers DR, Claes K, Evenepoel P, et al. Time-related clinical determinants of longterm tacrolimus pharmacokinetics in combination therapy with mycophenolic acid and corticosteroids: a prospective study in one hundred de novo renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43:741-762.

40. Miura M, Satoh S, Nioka T, et al. Limited sampling strategy for simultaneous estimation of the area under the concentration-time curve of tacrolimus and mycophenolic acid in adult renal transplant recipients. *Ther Drug Monit.* 2008;30:52- 59.
41. Rousseau A, Marquet P. Application of pharmacokinetic modelling to the routine therapeutic drug monitoring of anticancer drugs. *Fundam Clin Pharmacol.* 2002;16:253-262.

9 Figure Legends

Figure 1. Tacrolimus concentrations as a function of time plotted for the 38 pharmacokinetic profiles (training group, solid lines; validation group, dashed gray lines).

Figure 2. Correlation between the observed AUC_{0-12} ($ObsAUC_{0-12}$) and the predicted AUC_{0-12} ($PredAUC_{0-12}$) of tacrolimus calculated with the equations of model 3 (A) involving 3 concentration-time points ($C_0-C_1-C_4$) and model 5 (B) involving 2 concentration-time points (C_0-C_4), respectively. Bland and Altman analysis testing agreement between tacrolimus $ObsAUC_{0-12}$ and $PredAUC_{0-12}$ calculated with the equations of model 3 (C) involving 3 concentration-time-points ($C_0-C_1-C_4$) and model 5 (D) involving 2 concentration-time points (C_0-C_4), respectively.

10 Tables

Table 1. Summary of patient characteristics on the day of the pharmacokinetic profile (results expressed as number or mean \pm SD or median (range))

Variable	Training group (18 profiles)	Validation group (18 profiles)	<i>P</i> value
Age (years)	12.0 (0.4–16.9)	2.9 (0.6–18.5)	0.20
Weight (kg)	34.7 (4.5–61.3)	17.3 (6.2–59.1)	0.58
Time after transplantation (months)	24.1 (0.5–166.2)	4.2 (0.5–185.5)	0.46
Tacrolimus dose (mg/kg/d) ¹	0.11 (0.05–0.54)	0.19 (0.05–0.42)	0.44
Tacrolimus formulations ²			
Suspension (5 mg/mL)	7	11	
Capsule	11	6	
Concomitant immunosuppressive agents			
None	1	0	
Corticosteroids	7	9	
Corticosteroids + MMF	0	6	
MMF	10	3	
AST (U/L)	31 (16–304)	47 (24–148)	0.06
ALT (U/L)	45 \pm 27 (17–125)	93 \pm 69 (14–249)	0.01
GGT (U/L)	51 (8–261) ³	98 (13–886)	0.02
AP (U/L)	168 (49–448)	130 (66–567) ³	0.53
Bilirubine (μ mol/L)	10 (4–25) ³	11 (5–110)	0.84
Hb (g/dL)	120 \pm 21 (83–151)	120 \pm 16 (84–143)	0.92
Hct (%)	0.34 \pm 0.054 (0.25– 0.44) ⁴	0.36 \pm 0.04 (0.26–0.43) ³	0.48

Serum albumin (g/L)	35 ± 3 (32–40) ⁴	36 ± 4 (27–43) ³	0.66
Serum creatinine (mg/dL)	0.5 ± 0.2 (0.3–0.9)	0.4 ± 0.3 (0.1–0.9)	0.23

¹Given twice a day

²Data available for 17 profiles in the validation group

³Data available for 17 profiles

⁴Data available for 13 profiles

ALT, alanine aminotransferase; AP, alkaline phosphatase; AST, aspartate aminotransferase; GGT, γ -glutamyltranspeptidase; Hb, hemoglobin; Hct, hematocrit; MMF, mycophenolate mofetil

Table 2. Pharmacokinetic parameters of tacrolimus after oral administration in paediatric liver transplant recipients (results expressed as mean \pm SD or median (range))

Parameter	Training group (n=18)	Validation group (n=18)	P value
C_0 (ng/mL)	7.3 \pm 2.8 (2.9–13.6)	9.7 \pm 3.5 (4.7–18.3)	0.87 ¹
C_{max} (ng/mL)	12.1 (5.6–32.1)	17.9 (9.8–52.5)	0.58 ¹
T_{max} (h)	2.5 (0.7–4.0)	1.5 (1.0–6.0)	0.11
AUC_{0-12} (ng*h/mL)	114.0 (51.4–245.0)	141.2 (94.0–310.7)	0.70 ¹

¹For PK parameter normalized for a tacrolimus dose of 0.1 mg/kg

AUC_{0-12} , area under the concentration-time curve from 0 to 12 hours post-dose;

C_0 , trough concentration; C_{max} , peak blood concentration; n, number of PK profiles; T_{max} , time to reach C_{max}

Table 3. Regression equations for predicting tacrolimus AUC_{0-12} in paediatric liver transplant recipients with the associated coefficient of determination (r^2)

Model	Time-points	Regression equation	r^2
1	C_0, C_1, C_2, C_4	$AUC_p = 9.15 + 3.65*C_0 + 1.81*C_1 + 0.51*C_2 + 4.55*C_4$	0.99
2	$C_0, C_{0.5}, C_2, C_4$	$AUC_p = 9.51 + 3.52*C_0 + 1.27*C_{0.5} + 1.52*C_2 + 4.29*C_4$	0.99
3	C_0, C_1, C_4	$AUC_p = 9.30 + 3.69*C_0 + 2.19*C_1 + 4.69*C_4$	0.99
4	$C_0, C_{1.5}, C_4$	$AUC_p = 9.14 + 4.11*C_0 + 1.69*C_{1.5} + 4.67*C_4$	0.98
5	C_0, C_4	$AUC_p = 17.93 + 5.79*C_0 + 4.71*C_4$	0.94
6	C_0, C_2	$AUC_p = 18.56 + 6.97*C_0 + 4.05*C_2$	0.71
7	C_4	$AUC_p = 45.19 + 5.87*C_4$	0.84
8	C_2	$AUC_p = 44.33 + 6.01*C_2$	0.58
9	C_0	$AUC_p = 36.24 + 11.68*C_0$	0.53

AUC_p , predicted area under the concentration-time curve; r^2 , coefficient of determination

Table 4. Evaluation of the predictive performance of limited sampling strategies to estimate tacrolimus AUC_{0-12} in paediatric liver transplant recipients, mean (95% CI)

Model	Time-points	RMSE (ng/mL)	ME (ng/mL)	RMSE (%)	ME (%)
1	C ₀ , C ₁ , C ₂ , C ₄	11.71 (6.97–15.02)	-7.77 (-12.25– -3.28)	8.15(3.22–11.07)	-5.07 (-8.34– -1.81)
2	C ₀ , C _{0.5} , C ₂ , C ₄	12.58 (8.50–15.63)	-8.74 (-13.37– -4.11)	8.48 (4.25–11.22)	-6.15 (-9.14– -3.16)
3	C ₀ , C ₁ , C ₄	12.03 (6.59–15.68)	-7.91 (-12.55– -3.28)	8.29 (3.29–11.28)	-4.98 (-8.37– -1.59)
4	C ₀ , C _{1.5} , C ₄	15.54 (9.08–20.01)	-10.68 (-16.46– -4.91)	9.35 (5.60–11.98)	-6.75 (-10.06– -3.44)
5	C ₀ , C ₄	23.89 (14.25–30.65)	-18.06 (-26.06– -10.05)	11.77 (8.65–14.22)	-9.80 (-13.14– -6.46)

CI: confidence interval; ME, mean prediction error; RMSE, root mean squared prediction error

Table 5. Relative performance of the 5 different models, mean (95% CI)

Models ¹	Δ MSE (ng ² /mL ²) ²	Δ ME (ng/mL) ³
1 vs 2	-21.17 (-70.02–27.69)	0.97 (-1.90–3.85)
1 vs 3	-7.54 (-27.82–12.74)	0.14 (-1.21–1.49)
1 vs 4	-104.25 (-236.95–28.44)	2.91 (-1.84–7.67)
1 vs 5	-433.76 (-785.75– -81.77)	10.29 (2.54–18.03)
2 vs 3	13.63 (-48.76–76.02)	-0.83 (-4.80–3.14)
2 vs 4	-83.09 (-237.42–71.24)	1.94 (-3.87–7.75)
2 vs 5	-412.60 (-751.08– -74.11)	9.31 (0.82–17.81)
3 vs 4	-96.71 (-233.49–40.07)	2.77 (-2.38–7.92)
3 vs 5	-426.22 (-776.36– -76.09)	10.15 (2.87–17.43)
4 vs 5	-329.51 (-645.32– -13.70)	7.37 (-0.63–15.38)

¹Model 1: C₀, C₁, C₂, C₄; model 2: C₀, C_{0.5}, C₂, C₄; model 3: C₀, C₁, C₄; model 4: C₀, C_{1.5}, C₄; model 5: C₀, C₄.

²MSE for each model was as follows: model 1, 137.13; model 2, 158.29; model 3, 144.66; model 4, 241.38; model 5, 570.89

³ME for each model is reported in Table 3

CI: confidence interval; ME, mean prediction error, MSE, mean squared prediction error

11 Figures

Figure 1

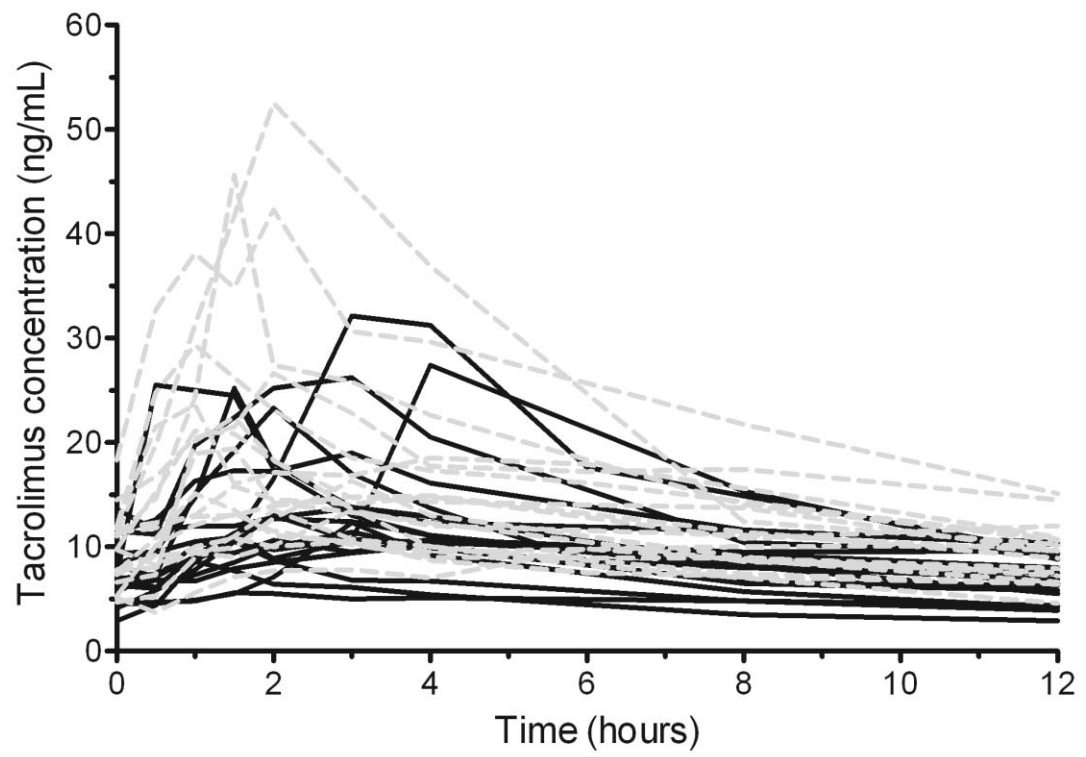


Figure 2A

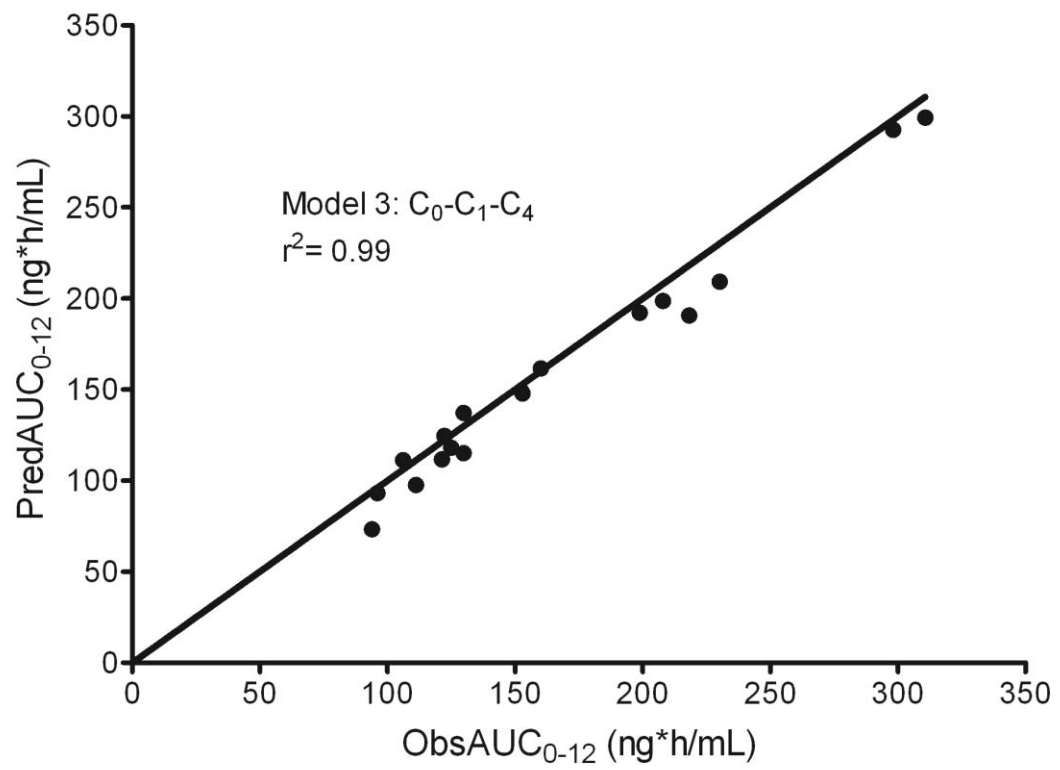


Figure 2B

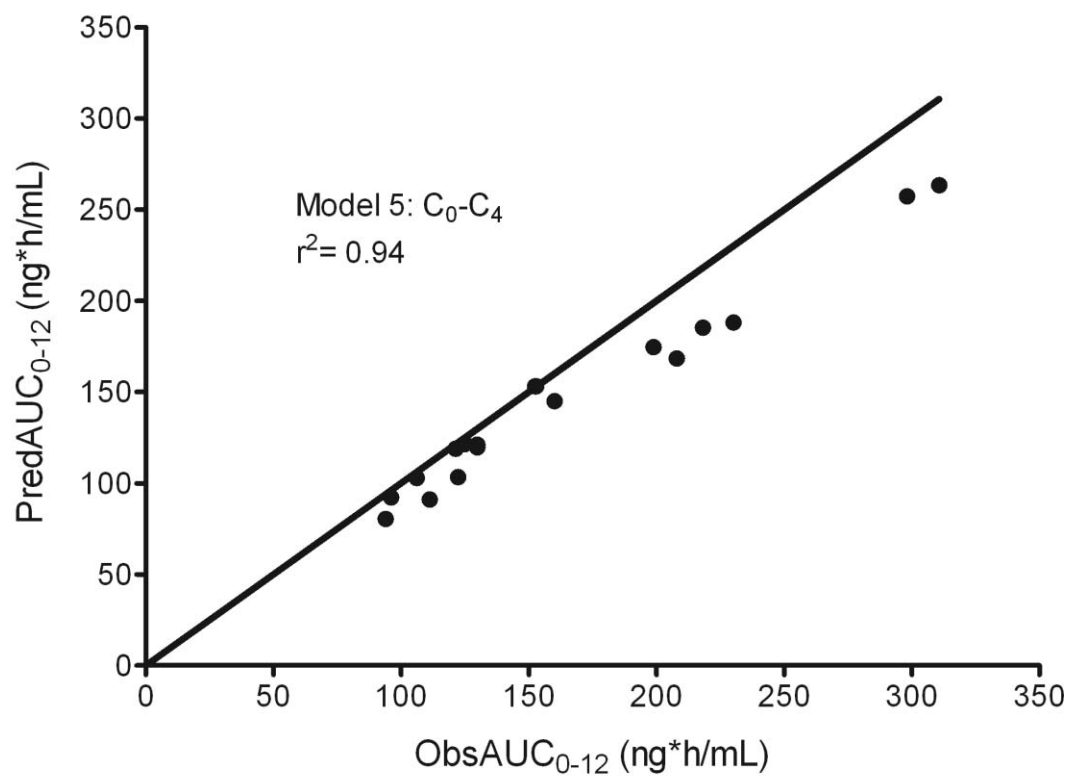


Figure 2C

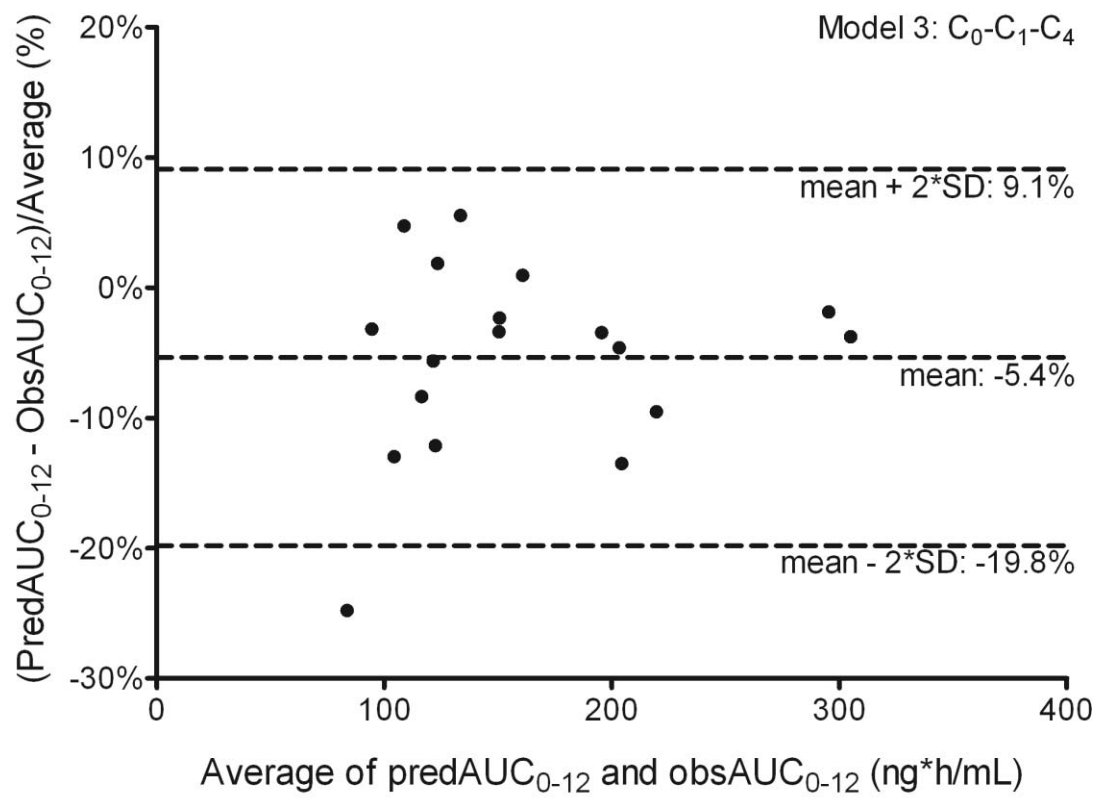
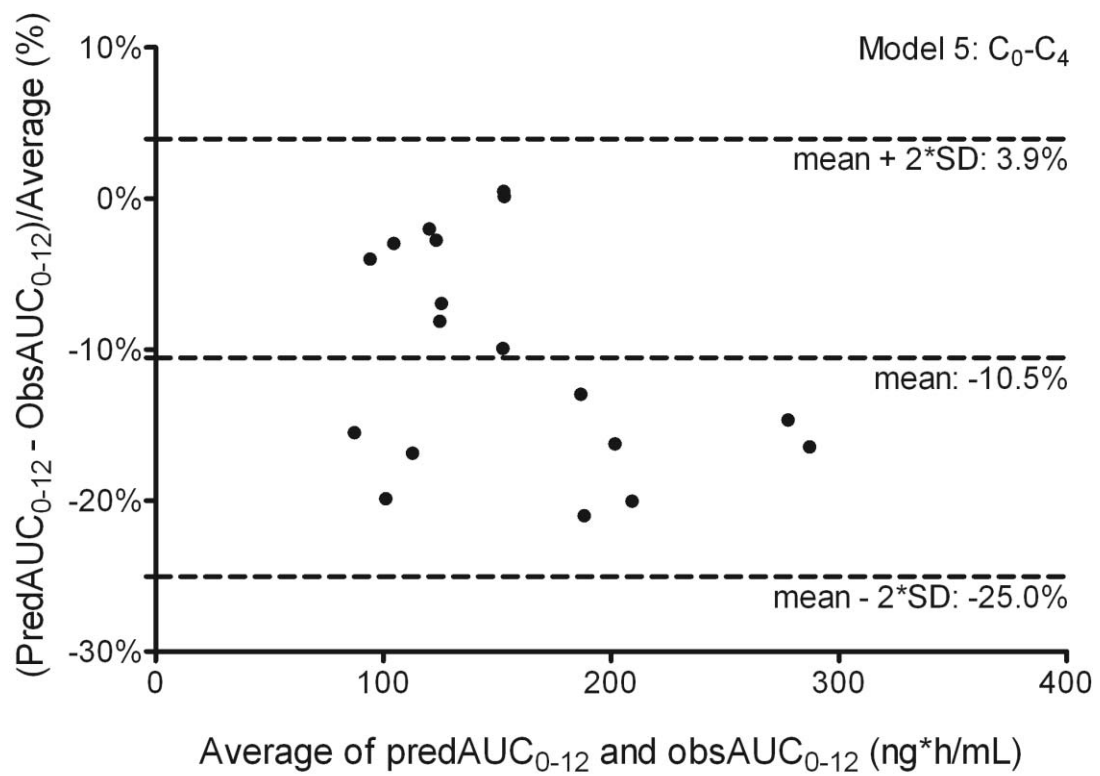


Figure 2D



Annexe III

Permission du journal NEJM



The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

Permission to Use NEJM Material in a Thesis or Dissertation

This permission applies only to copyrighted material that the Massachusetts Medical Society owns, and not to copyrighted text or illustrations from other sources.

All content reproduced from copyrighted material owned by the Massachusetts Medical Society (MMS) remains the full and exclusive copyrighted property of the MMS. The right to grant to a third party is reserved solely by the MMS.

Copyrighted MMS content may not be used in any manner that implies endorsement, sponsorship, or promotion of any entity, product or service by the MMS or its publications. The MMS cannot authorize use of authors' names on promotional materials; such approval must be obtained directly from authors.

The *New England Journal of Medicine* (and its logo design) are registered trademarks of the Massachusetts Medical Society. We do not grant permission for our logo, cover, or brand identity to be used in materials produced by other organizations. NEJM does not issue grants of permission for blanket use of its material. Non-exclusive grants are issued for identified content to be used in a specific manner. We do provide worldwide rights.

MODIFICATIONS/ADAPTATIONS

Grants of permission are issued for the material to be used as originally published by MMS. MMS does not approve adaptations or modifications.

Formatting and stylistic changes and any explanatory material or figure legends used by the requestor must accurately reflect the material as originally published in the *New England Journal of Medicine*.

*This grant covers the right to use the material in print and electronic formats. Figures/Tables that contain text, may be translated.

Annexe IV

Accord des coauteurs

