



UNIVERSITÉ
FRANÇOIS RABELAIS DE
TOURS



École Doctorale SST

CNRS UMR 6239

THÈSE présentée par :

Nicolas AZZOPARDI

soutenue le : 7 décembre 2011

pour obtenir le grade de : Docteur de l'Université François Rabelais

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé / Pharmacologie

**Apport de la modélisation
pharmacocinétique à l'étude de la
variabilité de réponse aux anticorps
monoclonaux antitumoraux :
Application au cetuximab**

THÈSE DIRIGÉE PAR :

M. PAINAUD Gilles

Professeur, Université François Rabelais,
TOURS

JURY :

M. BÉLISSANT Éric

MME. BOISDRON-CELLE Michèle

M. CALAIS Gilles

M. COUET William

M. LECOMTE Thierry

M. PAINAUD Gilles

M. TOD Michel

Professeur, Université de RENNES 1

HDR, Chef de département, Centre Paul Papin, ANGERS

Professeur, Université François Rabelais, TOURS

Professeur, Université de POITIERS

Professeur, Université François Rabelais, TOURS

Professeur, Université François Rabelais, TOURS

Professeur, Université Claude Bernard, LYON 1 Président
du jury

Remerciements

ici votre texte de remerciement...

Abréviations

5-FU	5-fluorouracile
α	Pente de décroissance de la phase de distribution d'un modèle bi-compartmental
ADCC	Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AUC	Aire sous la courbe des concentrations en fonction du temps (<i>Area under the concentration-time versus curve</i>)
AUMC	Moment d'ordre 1 de la courbe des concentrations en fonction du temps (<i>Area under the first moment of the concentration versus time curve</i>)
AUC_n	AUC normalisée à la dose
ATI	Anticorps anti-infliximab (<i>Antibodies toward infliximab</i>)
β	Pente de décroissance de la phase d'élimination d'un modèle bi-compartmental
C	Concentration de médicament
C_{max}	Concentration maximale du médicament observée après une dose unique
CL	Clairance systémique
C_n	Dernière concentration mesurée
CRP	Protéine C-réactive (<i>C-reactive protein</i>)
D	Dose
Da	Dalton : Unité de masse atomique $\approx 1,66054 \times 10^{-27} kg$
DPD	Dihydropyrimidine déshydrogénase
EGF	Facteur de croissance épidermique (<i>Epidermal growth factor</i>)
EGFR	Récepteur au facteur de crois-

Publications et manuscrit

- Thariat J, **Azzopardi N**, Peyrade F, Launay-Vacher V, Santini J, Lecomte T, Etienne-Grimaldi M-C, Paintaud G, Milano G.
Cetuximab pharmacokinetics in end-stage kidney disease under hemodialysis.
Journal of Clinical Oncology. 2008 ; 26(25) : 4223-5.
- Cézé N, Ternant D, Piller F, Degenne D, **Azzopardi N**, Dorval E, Watier H, Lecomte T, Paintaud G.
An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of cetuximab.
Therapeutic Drug Monitoring. 2009 ; 31(5) : 597-601.
- **Azzopardi N**, Lecomte T, Ternant D, Boisdron-Celle M, Piller F, Morel A, Gouilleux-Gruart V, Vignault-Desvignes C, Watier H, Gamelin E, Paintaud G.
Cetuximab pharmacokinetics influences progression-free survival of metastatic colorectal cancer patients.
Clinical Cancer Research. 2011 ; 17(19) : 1-9.
- **Azzopardi N**, Pointreau Y, Ternant D, Paintaud G, Lecomte T.
Influence of infusion intervals on cetuximab concentrations : a simulation study.
Manuscrit.
- Maillet A, Guilleminault L, Lemarié E, Lerondel S, **Azzopardi N**, Montharu J, Congy-Jolivet N, Reverdiau P, Legrain B, Parent C, Douvin D-H, Hureaux J, Courty Y, de Monte M, Diot P, Paintaud G, Le Pape A, Watier H, Heuzé-Vourc'h N.
The airways, a novel route for delivering monoclonal antibodies to treat lung tumors.
Pharmaceutical Research. 2011 ; 28(9) : 2147-56.

Résumé

Les anticorps monoclonaux ont révolutionné le traitement de nombreuses pathologies. Cependant, leur pharmacocinétique (PK) et l'influence de leur concentration sur la réponse clinique restent mal connues. Nous avons étudié les sources de variabilité interindividuelle de la PK du cetuximab, un anticorps anti-EGFR, ainsi que l'influence de l'exposition à cet anticorps sur la réponse. Nous avons validé une méthode ELISA de dosage du cetuximab. Dans un modèle murin, nous avons étudié l'absorption pulmonaire du cetuximab. Nous avons étudié la PK du cetuximab chez un patient hémodialysé. Nous avons décrit la PK du cetuximab chez des patients traités pour cancer colorectal métastatique, à l'aide d'un modèle combinant des éliminations d'ordre 0 et 1. Enfin, nous avons identifié la clairance globale du cetuximab, paramètre pouvant être estimé précocement par la concentration résiduelle à J14, comme un facteur influençant la survie sans progression des patients. Nos travaux montrent qu'une description de la PK d'un anticorps par approche compartimentale permet d'identifier les sources de variabilité et d'étudier l'impact de la PK sur la réponse clinique.

Mots clés : anticorps monoclonaux, cetuximab, ELISA, pharmacocinétique, relation dose-réponse, survie sans progression, polymorphisme génétique, récepteurs Fc

Abstract

Monoclonal antibodies have profoundly modified the treatment of many diseases. However, their pharmacokinetics (PK) and the influence of their concentrations on the clinical response are poorly known. We studied the sources of the interindividual variability of PK of cetuximab, an anti-EGFR, and the influence of the exposure to this antibody on the response. We validated an ELISA technique to measure cetuximab concentrations. We studied the pulmonary absorption of cetuximab in a murine model. We studied cetuximab PK in a hemodialysed patient. In metastatic colorectal cancer patients, we described cetuximab PK with the help of a model combining zero- and first-order eliminations. Finally, we identified the global clearance of cetuximab, a parameter which can be estimated by residual concentration on day 14, as a factor influencing progression-free survival of the patients. Our work shows that the description of the PK of an antibody by compartmental approach allows to identify sources of variability and to study the impact of PK on the clinical response.

Keywords: monoclonal antibodies, cetuximab, ELISA, pharmacokinetics, dose-response relationship, genetic polymorphism, Fc receptors

1 Introduction

1.1 Principes de la modélisation pharmacocinétique

1.1.1 Généralités

L'effet d'un médicament dépend de la dose administrée et plus généralement de sa posologie. La posologie englobe la quantité de médicament administrée, la fréquence d'administration et la voie d'administration. Si la dose est trop faible, aucun effet ne sera observé. Si la dose est trop élevée, le patient présentera des effets indésirables dose-dépendants. Entre les deux se situe un intervalle de doses permettant d'obtenir l'effet thérapeutique souhaité tout en minimisant le risque de survenue d'effets indésirables.

Les différents mécanismes intervenant *in vivo* entre l'administration d'un médicament et son effet sur l'organisme peuvent être décrits de façon quantitative. Pour cela, la relation entre la dose et l'effet est généralement décrite en deux étapes, qui sont respectivement (Figure ??) :

- La relation entre la dose et la concentration, ou pharmacocinétique (PK).
- La relation entre la concentration et l'effet du médicament *in vivo*, ou relation pharmacocinétique-pharmacodynamique (PK-PD)

Chacune de ces deux étapes a des sources spécifiques de variabilité, inter- et intra-individuelles. La connaissance et la description de ces facteurs de variabilité permet de comprendre les mécanismes impliqués dans l'effet des médicaments et d'envisager une adaptation individuelle de la posologie afin d'optimiser la réponse thérapeutique.

L'évolution des concentrations d'un médicament dans l'organisme au cours du temps dépend des modalités d'administration (forme galénique, posologie) et du devenir du médicament dans l'organisme, qui peut être décrit schématiquement par les étapes sui-

1.1. PRINCIPES DE LA MODÉLISATION PHARMACOCINÉTIQUE

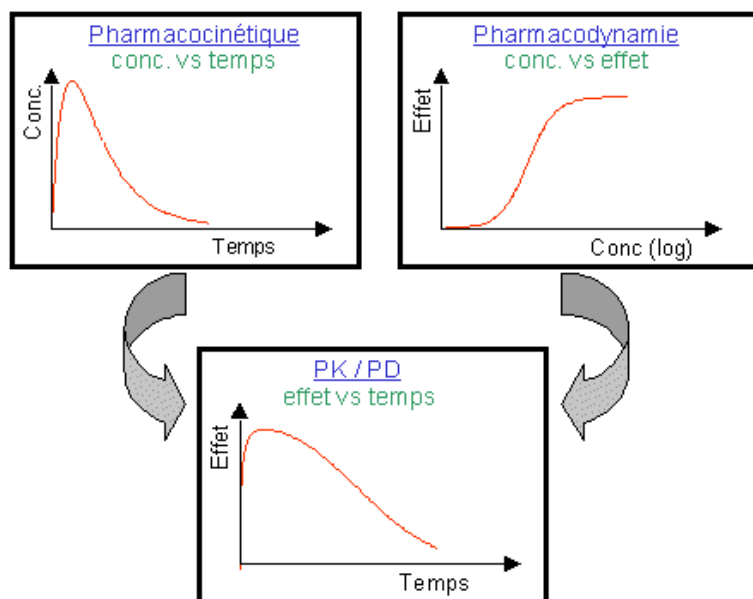


FIGURE 1.1 – Relation dose-concentration-effet d'un médicament.

vantes :

Absorption - Une phase d'absorption existe lorsqu'un médicament est d'administré par voie extravasculaire (EV). Seule une fraction de la dose (D) de médicament atteint alors la circulation générale. La biodisponibilité est définie à la fois par cette fraction de la dose de médicament et par la vitesse d'absorption. La fraction biodisponible est calculée par rapport à celle de la voie intraveineuse (IV), qui est par définition de 1.

Distribution - La distribution correspond au passage du médicament dans les différents tissus et liquides biologiques de l'organisme.

Élimination - Les mécanismes d'élimination du médicament dépendent de sa nature. Dans le cas des médicaments "classiques" (petites molécules, souvent obtenues par synthèse chimique), l'élimination est due à leur métabolisme (biotransformation) ou à leur excrétion, c'est-à-dire leur élimination sous forme inchangée, par voie rénale ou biliaire notamment. Les mécanismes d'élimination des biomédicaments sont ceux des molécules endogènes dont ils sont proches. Le cas des anticorps thérapeutiques sera décrit plus loin.

Les études pharmacocinétiques nécessitent à la fois la mesure des concentrations de médicaments dans les milieux biologiques, notamment le sang, par une technique analy-

tique validée, et la quantification du devenir des médicaments dans l'organisme par des méthodes mathématiques (modélisation pharmacocinétique). Nous présenterons donc dans un premier temps les différentes approches de modélisation pharmacocinétique. Nous décrirons ensuite, dans la partie 1.1.10, les différentes méthodes de mesure des concentrations sanguines des biomédicaments que sont les anticorps thérapeutiques.

1.1.2 Modélisation pharmacocinétique par approche non-compartimentale

L'objectif de l'analyse pharmacocinétique non-compartimentale est de décrire et de quantifier le devenir du médicament dans l'organisme en faisant le moins d'hypothèses possible. C'est l'approche pharmacocinétique qui est privilégiée par les agences du médicament car elle est robuste, peut être facilement vérifiée et est la plus objective. De plus, les paramètres décrits ci-après sont mesurables quel que soit l'allure des concentrations au cours du temps, pourvu qu'un nombre suffisant de prises de sang ait été réalisé.

1.1.2.1 Aire sous la courbe

L'aire sous la courbe ou *AUC* (pour *Area under the concentration versus time curve*) reflète l'exposition du sujet au médicament administré. Sa dimension est la suivante :

$$\text{Unité de concentration} \times \text{Unité de temps}$$

L'*AUC* est l'intégration des concentrations en fonction du temps :

$$AUC(t_{\infty}) = \int_0^{t_{\infty}} C(t) dt \quad (1.1)$$

où C est la concentration et t le temps. Lors d'une administration unique, l'exposition totale du sujet est estimée par l'*AUC* extrapolée à l'infini, notée AUC_{∞} . Dans un premier temps, l'*AUC* entre les temps t_0 et t_n est estimée par la méthode des trapèzes :

$$AUC_{0 \rightarrow t_n} = \sum_{i=0}^{n-1} \left(\frac{C_i + C_{i+1}}{2} \cdot (t_{i+1} - t_i) \right) \quad (1.2)$$

où C_i est la concentration mesurée au temps t_i et t_n est le temps correspondant à la dernière concentration mesurée. L'*AUC* entre la dernière concentration mesurée et l'infini

1.1. PRINCIPES DE LA MODÉLISATION PHARMACOCINÉTIQUE

$AUC_{t_n \rightarrow \infty}$ est estimée par extrapolation de la pente de décroissance, si elle est log-linéaire.

On peut démontrer que :

$$AUC_{t_n \rightarrow \infty} = \frac{C_n}{\lambda_z} \quad (1.3)$$

où C_n est la dernière concentration mesurée et λ_z est la constante d'élimination d'ordre 1 correspondant à la pente de décroissance terminale (également appelée k_e lorsqu'une seule phase de décroissance est visible). L' AUC extrapolée à l'infini est donc calculée par :

$$AUC_{0 \rightarrow \infty} = AUC_{0 \rightarrow t_n} + AUC_{t_n \rightarrow \infty} \quad (1.4)$$

La fraction extrapolée ne doit pas être trop importante, si possible inférieure à 10% de l' AUC totale. Lors d'administrations répétées, la mesure de l'exposition repose sur le calcul de l' AUC à l'état d'équilibre, entre deux administrations (séparées par l'intervalle de temps τ), par la méthode des trapèzes.

L' AUC est souvent le meilleur critère pour l'étude des relations entre l'exposition et l'effet du médicament mais elle ne permet généralement pas d'étudier la relation concentration-effet individuelle et ses sources de variabilité. L' AUC est un indice pharmacocinétique dose-dépendant et la cinétique est dite linéaire lorsque l' AUC augmente proportionnellement à la dose.

1.1.2.2 Fraction biodisponible

Si un médicament est administré par voie IV et par voie EV, à deux moments différents suffisamment espacés pour que la première dose soit complètement éliminée, on peut calculer la fraction biodisponible F :

$$F = \frac{AUC_{EV}}{AUC_{IV}} \cdot \frac{D_{IV}}{D_{EV}} \quad (1.5)$$

où AUC_{EV} et AUC_{IV} sont respectivement les AUC après administration EV et après administration IV, et D_{IV} et D_{EV} sont les doses respectives de la voie IV et de la voie EV. La condition nécessaire est que la clairance ne se soit pas modifiée entre les deux études pharmacocinétiques. S'il n'y a pas de phénomènes saturables intervenant dans l'absorption, F est indépendant de la dose.

1.1.2.3 Temps de résidence moyen

La demi-vie $t_{1/2}$ est le paramètre le plus souvent utilisé pour quantifier l'élimination des médicaments. C'est le temps nécessaire pour que la concentration du médicament diminue de moitié. Lors de l'administration répétée d'un médicament, la $t_{1/2}$ permet de déterminer le temps nécessaire à l'obtention de l'état d'équilibre. Cependant, la $t_{1/2}$ ne peut être estimée s'il n'y a pas de phase log-linéaire de décroissance terminale des concentrations.

Le calcul du "temps de résidence moyen" (*MRT* pour *Mean Residence Time*) est un autre moyen de mesurer le temps passé par un médicament dans l'organisme. Il peut être calculé quelle que soit l'allure de la cinétique des concentrations. Ce paramètre est particulièrement utile lorsqu'il s'agit de médicaments administrés par voie EV et ayant une absorption lente (médicament à libération prolongée ou biomédicaments administrés par voie sous-cutanée) ou irrégulière. En pratique, le *MRT*, qui a la dimension d'un temps, est calculé après administration IV rapide (bolus) par :

$$MRT_{IV} = \frac{AUMC}{AUC} \quad (1.6)$$

où *AUMC* (*Area Under the first Moment of the concentration versus time Curve*) est le moment d'ordre 1 de la courbe des concentrations en fonction du temps. Comme l'*AUC*, l'*AUMC* entre les temps t_0 et t_n peut être estimée par la méthode des trapèzes :

$$AUMC_{0 \rightarrow t_n} = \sum_{i=0}^{n-1} \left(\frac{t_i C_i + t_{i+1} C_{i+1}}{2} \cdot (t_{i+1} - t_i) \right) \quad (1.7)$$

La fraction extrapolée à l'infini est obtenue par :

$$AUMC_{t_n \rightarrow \infty} = \frac{C_n \cdot t_n}{\lambda_z} + \frac{C_n}{\lambda_z^2} \quad (1.8)$$

Le *MRT* et les paramètres qui en sont dérivés ont l'avantage de pouvoir être additionnés. Par exemple, après administration extra vasculaire :

$$MRT_{EV} = MAT + MRT_{IV} \quad (1.9)$$

où MAT (*Mean Absorption Time*) est le temps d'absorption moyen qui reflète la vitesse d'absorption globale quelles que soient ses caractéristiques cinétiques. De plus, si $MAT > MRT_{IV}$, il s'agit d'une cinétique absorption-dépendante, comme dans le cas des médicaments à libération prolongée : la vitesse d'absorption va limiter la vitesse d'élimination.

Si la décroissance terminale des concentrations est log-linéaire, la $t_{1/2}$ peut être estimée et sa relation avec le MRT est la suivante :

$$t_{1/2} = \ln(2) \cdot MRT_{IV} \quad (1.10)$$

1.1.2.4 Clairance

La clairance (CL) quantifie la capacité d'élimination du médicament par l'organisme. Elle correspond au volume de liquide biologique épuré par unité de temps. Elle a donc la dimension d'un débit volume $[L]^3 \cdot [T]^{-1}$. La clairance permet de relier à chaque instant la vitesse d'élimination à la concentration :

$$\text{Vitesse d'élimination} = CL \times \text{concentration}$$

La CL peut être calculée, après administration IV, par :

$$CL = \frac{D}{AUC} \quad (1.11)$$

La capacité d'élimination du médicament par le patient peut donc être quantifiée quelle que soit l'allure de la courbe des concentrations en fonction du temps. S'il n'y a pas de phénomènes saturables intervenant dans l'élimination, la clairance CL ne change pas avec la dose D .

1.1.2.5 Volume de distribution

Après une injection IV, le volume de distribution à l'état d'équilibre (V_{SS}) peut être estimé grâce à la clairance CL et au temps de résidence moyen MRT par la formule suivante :

$$V_{SS} = CL \cdot MRT \quad (1.12)$$

1.1.3 Modélisation pharmacocinétique par approche compartimentale

Contrairement à l'approche non-compartimentale, l'approche compartimentale impose des hypothèses fortes. L'organisme est assimilé à un réseau de compartiments. Ce sont des volumes fictifs, sans réalité physiologique, dans lesquels la concentration de médicament est instantanément homogène. L'entrée et la sortie de ces compartiments étant le plus souvent liées à des phénomènes passifs, leurs vitesses peuvent être décrites par des constantes d'ordre 1, c'est-à-dire que ces vitesses sont, à chaque instant, proportionnelles à la concentration. Bien que l'approche compartimentale ne soit pas toujours applicable, elle présente les avantages suivants :

- elle vise une description plus mécanistique de la pharmacocinétique que l'analyse non-compartimentale.
- elle permet, grâce à l'approche de population, d'estimer des paramètres individuels en utilisant des données "pauvres" (faible nombre de prises de sang par sujet) si le nombre de sujet est suffisamment grand.
- Le modèle paramétrique qui en découle peut être utilisé pour prédire par simulation les concentrations attendues au cours du temps avec d'autres posologies.

1.1.3.1 Modèle mono-compartimental avec élimination d'ordre 1

Ce type de modèle pharmacocinétique est paramétré par un volume de distribution unique et par une constante d'élimination d'ordre 1 (Figure ??).

Après administration en bolus IV, la variation des concentrations du médicament au cours du temps est décrite par l'équation différentielle suivante :

$$\frac{dC}{dt} = -k_{10} \cdot C(t) \quad (1.13)$$

où dC/dt est la variation instantanée de la concentration en fonction du temps, k_{10} la constante d'élimination d'ordre 1 de dimension $[T]^{-1}$ et $C(t)$ la concentration au temps t . La condition initiale de l'équation ?? étant $C(0) = C_0$, c'est-à-dire la concentration sanguine extrapolée à $t = 0$, son intégration conduit à la relation :

$$C(t) = C_0 \cdot e^{-k_{10} \cdot t} \quad (1.14)$$

1.1. PRINCIPES DE LA MODÉLISATION PHARMACOCINÉTIQUE

Dans le cas d'un modèle mono-compartmental, la demi-vie d'élimination ($t_{1/2}$) peut être estimée grâce à k_{10} :

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{10}} \quad (1.15)$$

Le modèle mono-compartmental peut également être exprimé en termes de "paramètres physiologiques" (Figure ??), c'est-à-dire du volume de distribution (V) et de la clairance systémique (CL). Le volume de distribution est estimé par la relation suivante :

$$V = \frac{D}{C(0)} \quad (1.16)$$

CL est relié à k_{10} et à V par l'équation suivante :

$$CL = k_{10} \cdot V \quad (1.17)$$

L'équation ?? s'écrit alors :

$$C(t) = \frac{D}{V} \cdot e^{-\frac{CL}{V} \cdot t} \quad (1.18)$$

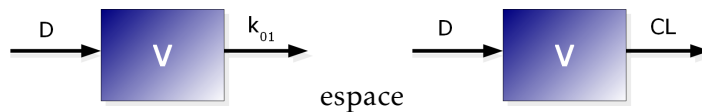


FIGURE 1.2 – Modèle à un compartiment où D est la dose de médicament administrée, V le volume de distribution. L'élimination peut être codée par k_{10} , une constante d'élimination d'ordre 1 ou par CL , une clairance d'élimination.

1.1.3.2 Modèle mono-compartmental avec administration EV

Lorsque le médicament est administré par voie EV, l'absorption peut le plus souvent être prise en compte en ajoutant un compartiment d'absorption A, sans volume, et en estimant une constante d'absorption k_a d'ordre 1 (Figure ??). Dans le cas d'une distribution mono-compartmentale, la pharmacocinétique du médicament administré par voie EV peut être décrite par le système d'équations différentielles suivant :

x

(1.19)

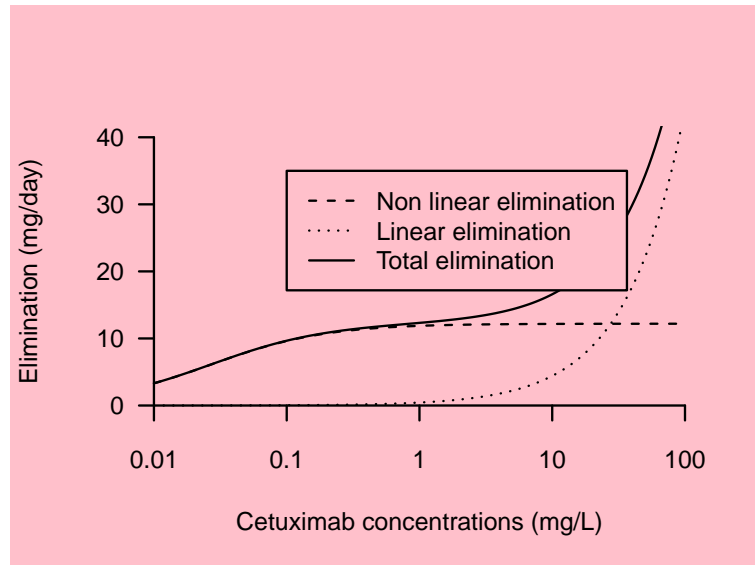


FIGURE 1.3 – Modèle à un compartiment avec compartiment d'absorption (grisé); k_a et k_{10} sont les constantes d'ordre 1 d'absorption et d'élimination.

Si le début de l'absorption est décalé par rapport au temps d'administration EV, comme cela est fréquemment le cas après administration orale, un temps de retard appelé *lag-time* (noté t_{lag}) peut être pris en compte et estimé. Ce décalage de l'absorption peut également être décrit à l'aide de compartiments de transit. Ce type de modèle décrit le retard de l'absorption par le passage du médicament par une série de compartiments de transit an sans volume, avec une constante de transfert unique k_t .

Dans le cas d'un modèle à un compartiment, la pharmacocinétique du médicament administré par voie EV avec retard d'absorption peut être décrite par le système de $n + 2$ équations différentielles suivant :

x

(1.20)

L'absorption est dans ce cas définie à la fois par la fraction biodisponible F et par une constante d'absorption k_a mais également par une constante de transfert k_t et le nombre de compartiments de transit n . En pratique, le nombre d'équations dans le système ?? est fixé par n . Pour trouver le nombre n de compartiments de transit qui permet au mieux de

décrire l'absorption, il est donc nécessaire de faire plusieurs essais. Cette limitation peut être contournée[?], en simplifiant le système d'équation ?? par le système suivant si $n > 2$:

$$x \quad (1.21)$$

Cette simplification permet d'estimer le nombre de compartiments n comme un paramètre du modèle. Cependant, cette simplification ne peut être utilisée que pour les administrations uniques de médicament.

1.1.3.3 Correspondance avec l'analyse non-compartimentale

Il existe une correspondance entre les paramètres de l'analyse mono-compartimentale et les paramètres de l'analyse non-compartimentale :

$$MRT_{IV} = \frac{1}{k_{10}} \quad (1.22)$$

$$MAT = \frac{1}{k_a} \quad (1.23)$$

En pratique, k_a est souvent difficile à estimer, surtout si l'absorption est lente, alors que le MAT peut toujours être calculé si l'on dispose de données après voie IV et voie EV.

1.1.3.4 Modèle bicompartimental avec constantes de transfert d'ordre 1

Dans la plupart des cas, les médicaments ne sont pas instantanément distribués de façon homogène dans tout l'organisme. Le modèle bi-compartimental permet de décrire le fait que les concentrations dans deux groupes de tissus ou de fluides biologiques ne s'équilibrent pas immédiatement. Les échanges entre ces compartiments sont le plus souvent décrits par des constantes de transfert d'ordre 1. Le compartiment "central" correspond au sang et aux tissus dans lesquels les concentrations s'équilibrent rapidement avec celles du sang. Le compartiment périphérique correspond aux tissus et organes dans lesquels la concentration du médicament s'équilibre plus lentement avec celle du compartiment central. Pour des raisons d'identifiabilité, l'élimination du médicament de l'organisme est le plus souvent décrite comme se faisant à partir du compartiment central.

1.1. PRINCIPES DE LA MODÉLISATION PHARMACOCINÉTIQUE

Comme le modèle mono-compartmental, le modèle bi-compartmental peut être paramétré de plusieurs façons :

Paramétrisation à l'aide de "micro-constantes" : Après administration par voie IV bolus, le modèle est décrit à l'aide du volume du compartiment central (V_1), des constantes de distribution k_{12} et k_{21} (d'ordre 1) et de la constante d'élimination k_{10} (Figure ??) :

$$x \quad (1.24)$$

où C_1 et C_2 sont les concentrations du médicament, respectivement dans le compartiment central et le compartiment périphérique.

Paramétrisation "physiologique" : Le modèle est décrit à l'aide des volumes de distribution du compartiment central et périphérique, respectivement V_1 et V_2 , et des clairances systémique CL et de distribution Q (??).

Les relations entre les micro-constantes et les constantes physiologiques sont les suivantes :

$$x \quad (1.25)$$

$$x \quad (1.26)$$

$$x \quad (1.27)$$

Paramétrisation à l'aide de "macro-constantes" : Celle-ci permet de faire une description graphique de l'évolution des concentrations et d'estimer les demi-vies de distribution et d'élimination. Ainsi la cinétique de décroissance des concentrations de médicament s'écrit :

$$x \quad (1.28)$$

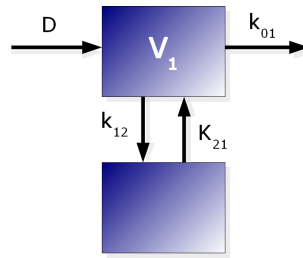


FIGURE 1.4 – Modèle à deux compartiments où D est la dose de médicament administrée, V_1 et V_2 les volumes de distribution, k_{10} la constante d'élimination d'ordre 1, k_{12} et k_{21} les constantes de distribution.

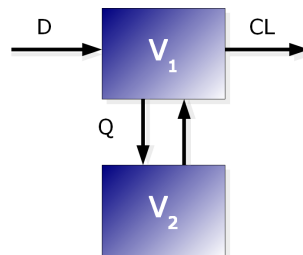


FIGURE 1.5 – Modèle à deux compartiments où D est la dose de médicament administrée, V_1 et V_2 les volumes de distribution, CL et Q les clairances d'élimination et de distribution.

où A et B sont respectivement les concentrations de distribution et d'élimination, extrapolées au temps 0 ("à l'origine") par approche "graphique", analogues au C_0 du modèle mono-compartmental, et α et β sont respectivement les macro-constantes de distribution et d'élimination définies par :

$$\alpha = \frac{1}{2} \cdot [k_{12} + k_{21} + k_{10} + \sqrt{(k_{12} + k_{21} + k_{10})^2 - 4 \cdot k_{21} \cdot k_{10}}] \quad (1.29)$$

$$\beta = \frac{1}{2} \cdot [k_{12} + k_{21} + k_{10} - \sqrt{(k_{12} + k_{21} + k_{10})^2 - 4 \cdot k_{21} \cdot k_{10}}] \quad (1.30)$$

On note que l'équation ?? de calcul de la demi-vie pour le modèle mono-compartmental ne s'applique pas au modèle bi-compartmental. En revanche à l'aide des paramètres α et β , il est possible de calculer :

$$x \quad (1.31)$$

et

$$x \quad (1.32)$$

qui sont respectivement les demi-vies de distribution et d'élimination[?].

1.1.3.5 Modèles avec élimination saturable

Lorsque l'élimination du médicament est liée à des phénomènes actifs et que la capacité d'élimination est limitée, on parle d'élimination saturable. Les vitesses de transfert du médicament ne sont alors plus proportionnelles à la concentration et à forte concentration, la vitesse d'élimination est à sa valeur maximale. Ce phénomène peut être décrit par différents modèles mécanistiques : modèle d'élimination liée à la cible (TMDD pour *Target Mediated Drug Disposition*), modèle avec élimination de type Michaelis-Menten ou encore modèle avec constante d'élimination d'ordre 0.

L'élimination saturable des médicaments "classiques", généralement liée à une saturation du métabolisme hépatique, peut être décrite par une équation de type Michaelis-Menten, le métabolisme étant limité par la quantité d'enzyme présente dans l'organisme. Si la vitesse d'élimination est la plupart du temps à sa valeur maximale, la description mathématique de celle-ci peut être simplifiée en utilisant une constante d'élimination d'ordre 0.

1.1.3.5.1 Modèle mécanistique TMDD Le modèle mécanistique TMDD a été développé pour décrire les pharmacocinétiques de médicaments dont la distribution et/ou l'élimination sont influencées par la fixation sur leur cible[?]. Ce modèle est fréquemment utilisé pour les anticorps monoclonaux[?]. La fixation peu réversible des anticorps sur leur cible est en effet souvent suivie de leur élimination. S'il s'agit d'un antigène membranaire, une internalisation du complexe antigène-anticorps ou une cytolysse peuvent être observées. S'il s'agit d'un antigène circulant, un complexe immun est formé puis dégradé par les macrophages. Lorsque la cible est en quantité limitée par rapport à la concentration d'anticorps, la fraction de l'élimination de l'anticorps due à l'interaction avec la cible est saturable.

Un modèle pharmacocinétique de type TMDD est une interprétation mécanistique précise de l'interaction entre le médicament et sa cible au cours du temps (Figure ??).

1.1. PRINCIPES DE LA MODÉLISATION PHARMACOCINÉTIQUE

Les variations de concentration de médicament, de quantité de cible et de complexe médicament-cible sont décrites par le système d'équations différentielles suivant :

$$x \quad (1.33)$$

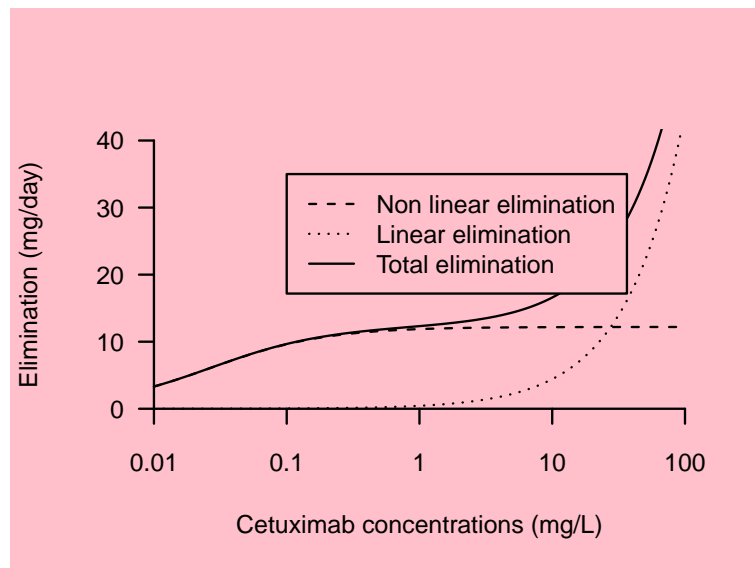


FIGURE 1.6 – Représentation d'un modèle TMDD où C est la concentration du médicament libre, R est la cible libre et RC est le complexe cible-médicament.

Le médicament sous forme libre, de concentration C , se lie à une quantité de cible libre R avec une constante d'association k_{on} . Cette constante est d'ordre 2 car l'association dépend à la fois de la concentration C et de la quantité de récepteur R . Cette association forme un complexe médicament-cible RC . Le complexe RC peut soit se dissocier avec une constante de dissociation d'ordre 1 k_{off} (qui est très faible pour les anticorps) soit être internalisé ou dégradé avec une constante d'ordre 1 k_{int} . Comme indiqué dans le système d'équations ??, le modèle peut également prendre en compte le fait que les cibles libres sont synthétisées avec une constante d'ordre 0 k_{syn} et dégradées indépendamment de l'effet du médicament, avec une constante de dégradation d'ordre 1 k_{deg} ?.

Un tel modèle doit être couplé à un modèle compartimental classique qui décrit les phénomènes d'absorption, de distribution et d'élimination du médicament qui ne sont pas liés à la cible. Dans ce cas, C représente la concentration dans le compartiment central.

1.1.3.5.2 Élimination de type Michaelis-Menten L'équation de Michaelis-Menten a été initialement proposée pour décrire la saturation de la cinétique enzymatique[?]. Elle est maintenant couramment utilisée pour décrire, entre autres, la cinétique d'élimination saturable de certains médicaments. D'après le modèle de Michaelis-Menten, ce type d'élimination est décrit par l'équation différentielle suivante :

$$\dot{x} = -\frac{V_{max}x}{k_M + x} \quad (1.34)$$

où V_{max} est la vitesse maximale d'élimination du médicament et k_M est la constante dite de Michaelis, qui correspond à la concentration de médicament pour laquelle la vitesse d'élimination est égale à la moitié de V_{max} (Figure ??).

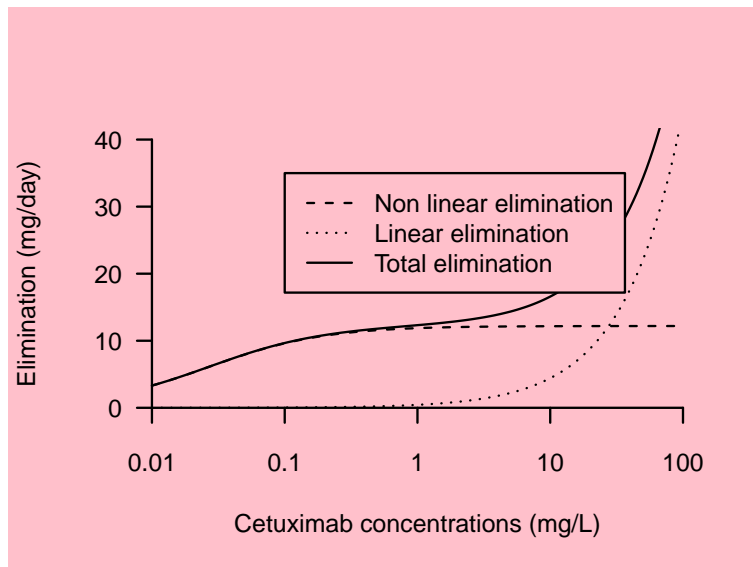


FIGURE 1.7 – Modèle à un compartiment avec élimination de type Michaelis-Menten.

Un tel type d'élimination peut être considéré comme une simplification d'un modèle TMDD sous deux conditions :

- L'affinité du médicament pour sa cible est très forte (c'est-à-dire : $k_{on} \gg k_{off}$).
- La quantité totale de cible $R_{tot} = R + RC$ reste constante au cours du temps.

Dans ces conditions, les paramètres de Michaelis-Menten sont définis par : $V_{max} = k_{int} \cdot R_{tot} \cdot V$ où V est le volume de distribution du médicament et par $k_M = k_{off}/k_{on}$ ^{??}.

1.1.3.5.3 Élimination d'ordre 0 Ce modèle est le plus simple pour décrire une élimination saturable. L'élimination n'est pas dépendante de la concentration et la vitesse d'élimination (quantité de médicament éliminée par unité de temps) est constante (Figure ??). Ce type d'élimination est décrit par l'équation différentielle suivante :

$$\dot{x} = -k_0 \quad (1.35)$$

où k_0 est une constante d'ordre 0, la vitesse d'élimination étant indépendante de la concentration.

L'élimination d'ordre 0 est un cas particulier de l'élimination de type Michaelis-Menten, correspondant à des concentrations de médicaments $\gg k_M$. Dans ce cas, k_M n'est pas identifiable et $k_0 \approx V_{max}$.

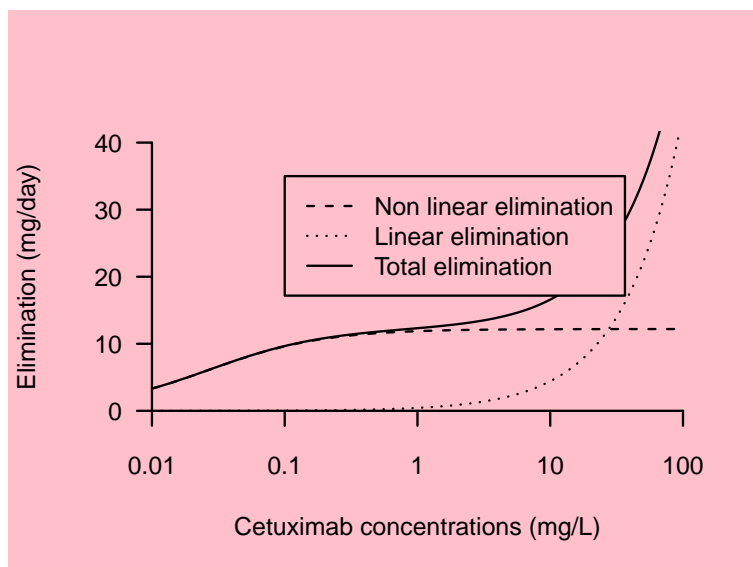


FIGURE 1.8 – Clairance du médicament en fonction de sa concentration. En trait plein, élimination de type Michaelis-Menten ; en trait discontinus, élimination d'ordre 0 (indépendante de la concentration) ; en pointillés, élimination d'ordre 1 (proportionnelle à la concentration).

1.1.4 Relation dose-concentration-effet d'un médicament

La relation dose-effet ou dose-réponse décrit l'augmentation de l'effet en fonction de la dose. La variabilité interindividuelle de cette relation est due à la fois à la variabilité de

1.1. PRINCIPES DE LA MODÉLISATION PHARMACOCINÉTIQUE

la relation dose-concentration (pharmacocinétique, traitée plus haut) et à la variabilité de la relation concentration-effet. La relation concentration-effet observée dans un modèle *in vitro* peut être décrite par des équations sigmoïdes E_{max} ou sigmoïdes I_{max} (inhibition de l'effet). Cependant, ces équations simples sont souvent insuffisantes pour décrire la relation concentration-effet *in vivo*. Notamment, lorsque l'effet est retardé par rapport à la concentration, la représentation de la courbe de l'effet en fonction de la concentration fait apparaître une hystérèse antihoraire (si l'effet augmente avec la concentration). Ce phénomène peut être décrit grâce à l'utilisation d'un compartiment d'effet ou d'un modèle indirect.

Les sources de variabilité de la relation concentration-effet sont multiples. Elles incluent notamment les facteurs génétiques, le stade de la maladie et les traitements associés[?].

L'étude des sources de variabilité interindividuelle de la relation concentration-effet des médicaments nécessite une mesure quantitative de l'effet, ce qui repose habituellement sur l'utilisation de biomarqueurs. Un biomarqueur est une caractéristique qui est mesurée et évaluée en tant qu'indicateur de processus biologiques normaux, de processus pathogéniques, ou de réponses pharmacologiques. Dans le cas des anticorps utilisés dans les maladies inflammatoires, tels que les anti-TNF α , les biomarqueurs utilisés sont par exemple la vitesse de sédimentation, la protéine C-réactive (CRP) et les scores d'activité de la maladie (DAS28, BASDAI, etc.).

En cancérologie, il existe de nombreux marqueurs biochimiques, tels que le CA19.9 ou l'ACE, mais leur relation avec la réponse thérapeutique est complexe. La variation de la taille des tumeurs, exprimée par le critère RECIST, qui est devenu le principal critère de réponse, reste la plus pertinente. Cependant, il existe une forte variabilité interindividuelle de l'évolution de ce critère, ce qui rend sa modélisation difficile en pratique. Pour cela, la réponse, qui est une catégorisation des variations du critère RECIST, est souvent utilisée (Tableau ?? ci-après).

Le but d'un traitement anticancéreux est de maximiser le temps pendant lequel la maladie ne progresse pas. Ce temps est appelé le temps de survie sans progression (PFS pour *progression-free survival*).

1.1. PRINCIPES DE LA MODÉLISATION PHARMACOCINÉTIQUE

TABLE 1.1 – Correspondance entre la réponse objective et le critère RECIST : (A) : Entre les réponses objectives sur les lésions cibles et les variations du critère RECIST mesuré sur ces lésions. (B) : Entre les réponses objectives sur les lésions non cibles et la variation du nombre et/ou de la taille de ces lésions.

A		
Réponse objective sur les lésions cibles	abréviation	Critère
Réponse complète	CR	disparition de toutes les lésions cibles
Réponse partielle	PR	diminution d'au moins 30 % du RECIST
Stabilité tumorale	SD	diminution de moins de 30 % ou augmentation de moins de 20 % du RECIST
Progression tumorale	PD	augmentation d'au moins 20 % du RECIST
B		
Réponse objective sur les lésions non cibles	abréviation	Critère
Réponse complète	CR	disparition de toutes les lésions
Stabilité tumorale	SD	persistance de une ou de plusieurs lésions
Progression tumorale	PD	apparition de une ou de plusieurs nouvelles lésions

1.1.5 Principes de l'estimation des paramètres d'un modèle pharmacocinétique

Avant d'estimer les paramètres d'un système d'équations différentielles, il est important de s'assurer de leur identifiabilité ; c'est-à-dire qu'à partir des données expérimentales, le système d'équations admet une solution unique pour chaque paramètre. Par exemple, la pharmacocinétique d'un médicament administré de façon régulière en bolus IV avec un intervalle de temps τ ne peut être décrite par un modèle à deux compartiments (équation ??) si les concentrations disponibles ne sont que des concentrations résiduelles (avant réinjection). En effet, dans ce cas, les paramètres correspondant au compartiment périphérique Q et V_2 ne sont généralement pas identifiables.

La modélisation pharmacocinétique s'inscrit dans le cadre de la régression non-linéaire

1.1. PRINCIPES DE LA MODÉLISATION PHARMACOCINÉTIQUE

sur mesures répétées. Comme pour de nombreux types de modélisation, la qualité d'un modèle pharmacocinétique est quantifiée par la "-2ln-vraisemblance" ($-2LL$) ou par le critère d'information d'Akaike (AIC). La $-2LL$ est couramment appelée fonction objective (FO). Les paramètres sont estimés en minimisant la FO.

L'équilibre entre complexité du modèle et ajustement des données prédites et observées doit être recherché. Un modèle complexe peut fournir un ajustement très précis entre les données, mais ses paramètres risquent de ne pas être identifiables. Ainsi, pour des valeurs de fonction objective non significativement différentes, le modèle le plus simple doit être privilégié. Par exemple, un modèle à deux compartiments n'est justifié que s'il permet d'obtenir une valeur de fonction objective significativement inférieure à celle d'un modèle à un compartiment.

La modélisation pharmacocinétique peut être réalisée par approche individuelle ou par approche de population.

1.1.5.1 Approche individuelle

L'approche individuelle consiste à étudier le profil des concentrations sanguines du médicament chez chaque sujet, indépendamment des autres sujets. Elle permet une description précise pour chaque sujet, même si la variabilité interindividuelle des paramètres estimés est grande. Cette approche nécessite cependant un grand nombre de données pour chaque sujet.

1.1.5.2 Approche de population

A l'origine, l'approche de population a été proposée pour analyser des données "pauvres" (faible nombre de données par patient) et "hétérogènes" (posologies et temps d'observation différents d'un patient à l'autre) car provenant de larges cohortes de patients[?]. Elle est maintenant de plus en plus utilisée pour l'analyse de données "riches" recueillies dans le cadre d'études pharmacocinétiques cliniques. Cette approche est recommandée par la Food and Drug Administration (FDA) pour l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché (AMM)[?].

L'analyse pharmacocinétique de population prend en compte l'ensemble des individus inclus dans l'étude et permet donc d'utiliser l'information de chaque sujet pour

estimer des paramètres moyens dans la population considérée.

La modélisation de population s'inscrit dans le cadre des modèles non-linéaires à effets mixtes sur mesures répétées⁷. Les modèles de population sont également appelés "hiérarchiques" car ils incluent plusieurs niveaux de variabilité. A chacun de ces niveaux correspond un modèle descriptif, comme décrit ci-dessous.

Modèle structural : Pour la pharmacocinétique, il s'agit du modèle qui relie la concentration au temps. La fonction qui relie les deux variables comporte les paramètres pharmacocinétiques : volume de distribution, clairance, constantes de transfert, etc. Le modèle structural s'écrit :

$$x \quad (1.36)$$

où Y est la variable étudiée, $Y_{ij,pred}$ est la valeur prédite par le modèle pour le sujet i et la répétition j et φ_i sont les paramètres du sujet i .

Exemple : Après une dose unique et d'après l'équation ??, pour un modèle pharmacocinétique mono-compartmental avec élimination d'ordre 1, l'équation ?? peut s'écrire :

$$x \quad (1.37)$$

où $C_{ij,pred}$ est la concentration prédite par le modèle pour le sujet i au temps de prélèvement j , D_i , V_i et CL_i sont respectivement la dose administrée au sujet i , le volume de distribution et la clairance du sujet i .

Modèle d'erreur interindividuelle : Il décrit la variabilité interindividuelle des sujets, c'est-à-dire l'écart entre les paramètres de population et les paramètres individuels estimés. Ce modèle s'écrit :

$$x \quad (1.38)$$

où φ_k est le modèle d'erreur interindividuelle utilisé pour décrire la variabilité des valeurs individuelles θ_{ki} du paramètre de population θ_k et η_{ki} quantifie la différence individuelle du sujet i par rapport à θ_k . On suppose la distribution des η_{ki} normale et centrée, telle que :

$$x \quad (1.39)$$

où ω_k^2 est la variance interindividuelle du paramètre.

Pour décrire la variabilité interindividuelle des paramètres, plusieurs modèles peuvent être utilisés :

— Modèle additif :

$$x \quad (1.40)$$

— Modèle proportionnel :

$$x \quad (1.41)$$

— Modèle exponentiel :

$$x \quad (1.42)$$

En pratique, le modèle exponentiel est le plus utilisé car c'est le seul qui ne peut pas donner de valeurs d' θ_{ki} nulles ou négatives. Surtout, le rapport de deux lois log-normales (issue d'un modèle exponentiel) suit également une loi log-normale tandis que le rapport de deux lois normales suit une loi de Cauchy (aussi appelée loi de Lorentz) qui n'admet ni espérance, ni écart-type. Ceci serait par exemple problématique pour établir des relations entre micro constantes et constantes physiologiques (équations ??-??).

Si aucune variabilité interindividuelle n'est estimée,

$$\theta_{ki} = \theta_k \quad (1.43)$$

Pour chaque individu i , la valeur θ_{ki} du même paramètre est donc égale à θ_k .

Modèle de covariables : une covariable est une caractéristique individuelle qualitative ou quantitative avec laquelle la valeur d'un paramètre est significativement reliée. Les covariables sont souvent des facteurs démographiques (âge, taille, poids, sexe, surface corporelle, etc.) ou biologiques (clairance de la créatinine, numération sanguine, etc.). L'intérêt d'inclure une covariable dans l'analyse pharmacocinétique est d'expliquer une partie de la variabilité interindividuelle d'un paramètre. Si cette inclusion a une influence significative sur la fonction objective (cf. partie 3.2.4 page 63), elle peut réduire la variabi-

1.1. PRINCIPES DE LA MODÉLISATION PHARMACOCINÉTIQUE

lité interindividuelle d'un paramètre et, dans une moindre mesure, l'erreur résiduelle du modèle (*cf. infra*). Dans le modèle final, la covariable devient ainsi un facteur explicatif et prédictif de la variabilité de la pharmacocinétique du médicament. Par exemple, si le volume de distribution d'un médicament augmente avec le poids, le poids est un facteur prédictif d'exposition à ce médicament, car on peut s'attendre à trouver, pour une même dose injectée, des concentrations de médicament d'autant plus faibles que le poids des patients augmente.

Si aucune covariable n'est ajoutée au modèle interindividuel, θ_k s'écrit :

$$x \quad (1.44)$$

où $\theta_{k,TV}$ est la valeur "typique" (*typical value*) du paramètre k , dans la population. Si une covariable m est ajoutée au modèle interindividuel, $\theta_{k,TV}$ s'écrit :

$$x \quad (1.45)$$

où g est le modèle de covariables et z_{kmi} est la valeur de la covariable m propre au sujet i et au paramètre k .

Exemple : Pour un modèle interindividuel exponentiel, la clairance du sujet i s'écrit :

$$x \quad (1.46)$$

Si CL_{TV} est influencée par la surface corporelle (BSA pour *body surface area*) du patient (Figure ??), la valeur typique de CL peut s'écrire :

$$x \quad (1.47)$$

où CL est la valeur de population de la clairance, $\beta_{BSA,CL}$ est une constante, BSA_i la surface corporelle du patient i et BSA_{med} la surface corporelle médiane de la population. Pour un modèle interindividuel exponentiel, la clairance CL_i du sujet i s'écrit donc :

$$x \quad (1.48)$$

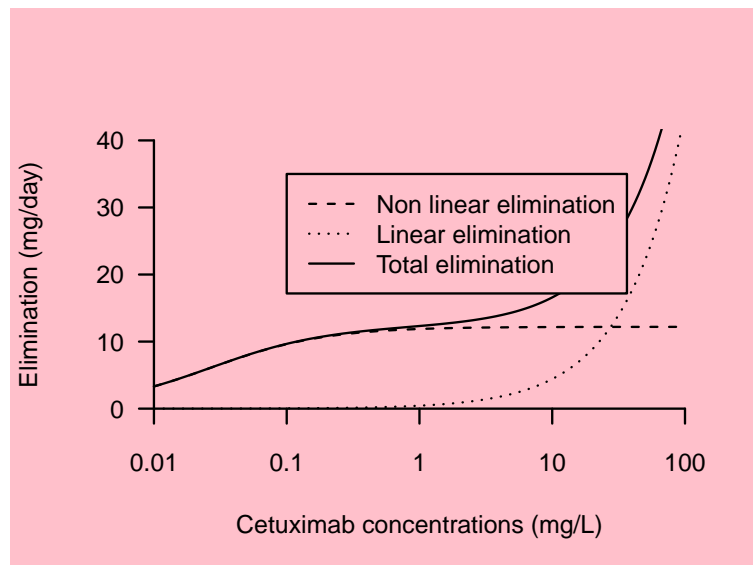


FIGURE 1.9 – Modèle de covariable. Exemple d’une relation linéaire entre la clairance systémique d’un médicament et la surface corporelle (BSA). Les points bleus représentent les valeurs individuelles. *TV* : *Typical Value* ; *med* : Valeur médiane.

Une covariable est retenue pour être testée sur un paramètre du modèle structural si des arguments biologiques ou bibliographiques le justifient (ex. : influence du poids sur le volume de distribution V_1) et si elle n’est pas trop fortement corrélée ($|\text{coefficient de corrélation}| > 0,3$) avec une autre covariable d’intérêt (ex. : la surface corporelle avec le poids)[?]. Si ces conditions sont respectées, la covariable est appelée covariable d’intérêt. La significativité de l’influence des covariables d’intérêt sur les paramètres est classiquement testée par une procédure pas à pas ascendante puis pas à pas descendante (*cf. méthode*). Une autre procédure de test de la significativité des covariables d’intérêt consiste à tester toutes les covariables d’intérêt en même temps (*Full covariate model*). La significativité est contrôlée par un test de Wald[?]. Cette procédure, qui nécessite cependant une plus grande puissance de calcul, est encore peu utilisée.

A la fin de ces procédures, le modèle obtenu comporte uniquement les covariables qui influencent significativement les paramètres.

Modèle d’erreur résiduelle : Malgré l’utilisation d’un modèle de variabilité inter-individuel et d’un modèle de covariables, il reste toujours un écart "résiduel", appelé résidu, entre la valeur d’une concentration observée et celle de la concentration prédite

(Figure ??). Le modèle d'erreur résiduelle permet de décrire la distribution des résidus. L'équation générale du modèle d'erreur résiduelle s'écrit :

$$x \quad (1.49)$$

où $Y_{ij,obs}$ est la j ème valeur observée (ici, une concentration) pour le sujet i , ζ est le modèle d'erreur résiduelle et ε_{ij} est une variable aléatoire. On suppose que $\varepsilon_{ij} \sim \mathcal{N}(0; \sigma^2)$ où σ^2 est la variance résiduelle. Comme pour la variabilité interindividuelle, plusieurs modèles d'erreur résiduelle peuvent être utilisés (Figure ??) :

— Modèle additif :

$$x \quad (1.50)$$

— Modèle proportionnel :

$$x \quad (1.51)$$

— Modèle mixte :

$$x \quad (1.52)$$

— Modèle exponentiel :

$$x \quad (1.53)$$

1.2 Les anticorps monoclonaux thérapeutiques

1.2.1 Généralités

Les anticorps sont des glycoprotéines également appelées immunoglobulines (Ig) qui sont produits exclusivement par les lymphocytes B.

Les anticorps thérapeutiques peuvent être classés en trois grands groupes : les Ig polyvalentes, les Ig polyclonales et les anticorps monoclonaux. Les anticorps monoclonaux recombinants, utilisés en thérapeutique depuis les années 1980, ont révolutionné la prise en charge de nombreuses pathologies telles que le cancer, les maladies inflammatoires et certaines maladies immunologiques. En 1975, Kohler et Milstein ont réussi à fusionner une cellule lymphoïde normale et une cellule myélomateuse pour créer un hybridome, lignée cellulaire immortelle capable de produire un anticorps monoclonal de manière

1.2. LES ANTICORPS MONOCLONAUX THÉRAPEUTIQUES

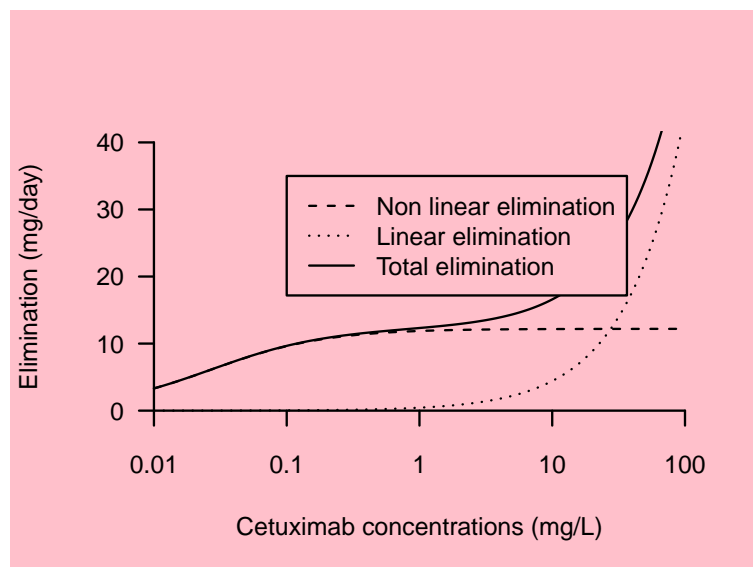


FIGURE 1.10 – Visualisation de l'erreur résiduelle. En haut, concentrations prédites vs. observées. En bas, concentrations observées au cours du temps avec la concentration prédite par les paramètres de population (ligne). De gauche à droite, modèle d'erreur additif, proportionnel, mixte, exponentiel.

durable[?]. Ces anticorps monoclonaux sont tous identiques et reconnaissent le même épitope sur un antigène. Aujourd'hui, la production industrielle d'anticorps monoclonaux utilise des techniques d'expression d'ADN recombinant, le plus souvent dans des cellules de mammifères^{??}. Les anticorps monoclonaux thérapeutiques commercialisés sont principalement des IgG1 κ . Ils sont constitués de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes d'isotype γ ("H", de 50 kDa) et deux chaînes légères d'isotype κ ("L", de 25 kDa), soit une masse moléculaire totale d'environ 150 kDa. Chacune de ces chaînes possède des domaines variables ("V", correspondant à l'extrémité N terminale et se fixant sur l'antigène) et des domaines constants ("C "). Les IgG sont constituées de deux portions Fab, contenant les parties variables, et d'une portion Fc (Figure ??a). La portion Fc a la capacité de fixer le complément (fraction C1q) et de recruter des cellules effectrices porteuses de récepteurs Fc γ R (Figure ??b)[?].

Les premiers anticorps monoclonaux produits étaient intégralement murins. Trois inconvénients ont limité leur utilisation en thérapeutique[?] :

- Une élimination trop rapide de l'organisme entraînant une faible efficacité.
- Une faible capacité de la portion Fc murine de recruter les cellules effectrices humaines ou d'activer la voie classique du complément.

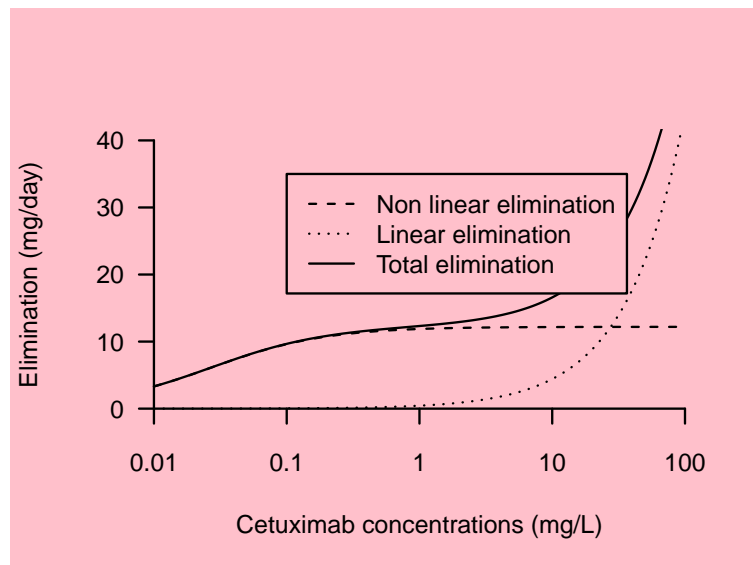


FIGURE 1.11 – Structure d'une IgG et rôle de la portion Fc dans le mode d'action des anticorps se fixant sur un antigène membranaire. Grâce à leur portion Fc, les IgG1 peuvent recruter des cellules porteuses de récepteurs $Fc\gamma R$ ou la fraction C1q du complément.

- Une forte immunogénicité avec la production rapide d'anticorps anti-anticorps thérapeutique chez tous les patients traités.

Les progrès en biotechnologie ont permis de développer des anticorps chimériques, puis humanisés et enfin totalement humains, pour tenter de pallier ces inconvénients. Les anticorps chimériques comme le rituximab ou le cetuximab possèdent des régions variables murines et des régions constantes humaines. Pour les anticorps humanisés comme le bevacizumab ou le trastuzumab, seules les régions hypervariables sont d'origine animale. Enfin, les anticorps monoclonaux humains ne possèdent aucune région animale (Figure ??).

1.2.2 Mécanismes impliqués dans la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

Ne serait-ce que parce que ce sont des protéines de haute masse moléculaire (environ 150 kDa), les anticorps monoclonaux ont des sources de variabilité pharmacocinétique différentes de celles des médicaments "classiques", molécules généralement issues d'une synthèse chimique et d'une masse moléculaire faible. Cependant, on peut décrire des phases d'absorption (pour les administrations par voie EV), de distribution et d'élimina-

1.2. LES ANTICORPS MONOCLONAUX THÉRAPEUTIQUES

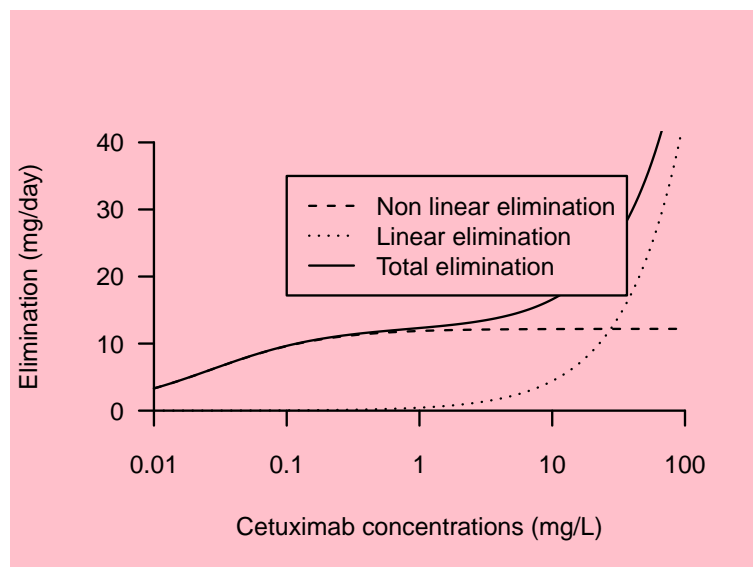


FIGURE 1.12 – Différents degrés d'humanisation des anticorps thérapeutiques IgG. En rouge, les portions animales, en bleu, les portions humaines. –o– : murin ; –xi– : chimérique ; –zu– : humanisé et –u– : humain.

tion.

1.2.2.1 Absorption des anticorps monoclonaux

La majorité des anticorps monoclonaux est administrée par voie IV, ce qui permet une exposition rapide et complète. Cependant, certains d'entre eux, comme l'adalimumab, un anti-TNF α , sont administrés par voie sous cutanée (SC). L'administration EV représente un confort pour le patient puisque qu'elle est moins invasive et peut se faire à domicile. Cependant, l'absorption des anticorps monoclonaux est lente et donc difficile à quantifier précisément. Elle est par ailleurs incomplète. Nous verrons dans la discussion que ces voies d'administration sont une source de variabilité pharmacocinétique supplémentaire qu'il faut prendre en compte. Les mécanismes d'absorption des IgG après administration SC et EV en général n'ont jamais été directement étudiés⁷.

1.2.2.2 Élimination des anticorps monoclonaux

Les anticorps sont principalement éliminés par deux mécanismes associés : un catabolisme non spécifique suivant leur endocytose passive et une élimination faisant suite à leur fixation sur l'antigène cible. Lorsqu'une immunisation survient les anticorps peuvent

1.2. LES ANTICORPS MONOCLONAUX THÉRAPEUTIQUES

également être éliminés par la formation de complexes immuns.

1.2.2.3 Captation par endocytose

Comme l'ensemble des protéines circulantes, les anticorps pénètrent dans les cellules endothéliales vasculaires par endocytose passive^{??}. Ce phénomène pourrait également se produire dans certains tissus (peau, muscles, foie et intestin)[?]. Mais un phénomène de protection contre la dégradation des IgG existe, dans lequel le FcRn joue un rôle clé.

1.2.2.4 Rôle du FcRn dans l'élimination et de la distribution des anticorps monoclonaux

La demi-vie ($t_{1/2}$) d'élimination de l'albumine et des IgG endogènes (à l'exception de celle des IgG3) est d'environ 21 jours chez l'homme, ce qui est plus long que celle des autres protéines et notamment des autres immunoglobulines (entre 2,5 et 6 jours)^{??}. Par ailleurs, la demi-vie d'élimination du fragment Fc est du même ordre de grandeur que celle de l'IgG totale, alors que celle des fragments Fab est plus courte[?]. La portion Fc joue donc un rôle majeur dans la vitesse d'élimination des IgG.

A concentrations thérapeutiques, l'élimination des immunoglobulines polyvalentes administrées par voie intraveineuse est concentration-dépendante[?] mais à l'inverse des médicaments « classiques », leur $t_{1/2}$ d'élimination diminue lorsque leur concentration augmente[?] (Figure ??).

A partir de cette observation, Brambell, dans les années 1960, a émis l'hypothèse d'un récepteur spécifique et saturable protégeant les IgG du catabolisme endogène[?]. Ce récepteur est maintenant appelé FcRn (pour *neonatal Fc receptor*) car il a été identifié pour la première fois dans l'épithélium intestinal de Rat nouveau-né[?]. Depuis, du FcRn a été trouvé chez d'autres rongeurs, chez le Singe, chez l'Homme[?] et il est maintenant admis qu'il est présent chez tous les mammifères. Chez l'Homme, FcRn a été identifié dans le poumon[?], la barrière hémato-encéphalique, le foie[?], les reins et d'autres organes[?]. C'est un homologue du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I qui est constitué de trois sous-unités : $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$, et est associé de façon non covalente à la $\beta 2$ -microglobuline. Chez la Souris^{??} comme chez l'Homme^{??}, le FcRn est responsable du transport materno-foetal des IgG à travers la barrière placentaire en fin de gestation.

1.2. LES ANTICORPS MONOCLONAUX THÉRAPEUTIQUES

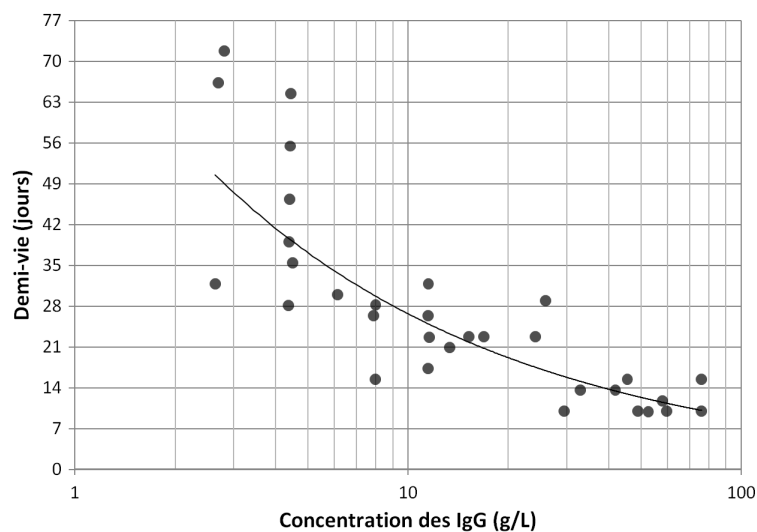


FIGURE 1.13 – Relation entre la demi-vie des IgG et leurs concentrations sériques. Adapté d'après Kuester K, Kloft C. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies. In : Meibohm B, ed. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of biotech drugs. Weinheim : Wiley-VCH Verlag, 2006.

L'interaction FcRn-IgG est pH dépendante : après leur endocytose passive (pinocytose) par les cellules endothéliales, les IgG se fixent à pH acide (6,0) au FcRn, à l'intérieur des vésicules d'endocytose. Cette dépendance au pH est en partie expliquée par la présence d'histidines dans les domaines CH₂ et CH₃ de la portion Fc^{??}. Les protéines endocytées mais non fixées au FcRn sont dégradées dans les lysosomes^{??}. La fixation au FcRn permet de détourner les IgG de la dégradation en permettant leur exocytose à pH neutre. On parle de recyclage ou de transcytose suivant si la vésicule est exocytée vers le pôle apical ou le pôle baso-latéral. (Figure ??). Plusieurs études ont confirmé le rôle décisif du FcRn dans l'homéostasie des IgG.

L'albumine sérique est également recyclée par le FcRn mais sans phénomène de compétition avec le recyclage des IgG[?].

Le FcRn d'une espèce animale donnée peut avoir une affinité pour les IgG d'une autre espèce. Ainsi, le FcRn de Souris est peu spécifique et fixe les IgG de plusieurs espèces (Lapin, Rat, Cochon d'Inde, Boeuf, Mouton et Homme), alors que le FcRn humain est plus sélectif et ne fixe que les IgG de Lapin et de Cochon d'Inde[?]. La courte $t_{1/2}$ d'élimination des IgG3 humaines par rapport aux IgG1, 2 et 4 peut être expliquée par leur faible affinité pour le FcRn[?]. Parmi les anticorps monoclonaux commercialisés, aucun n'est de type

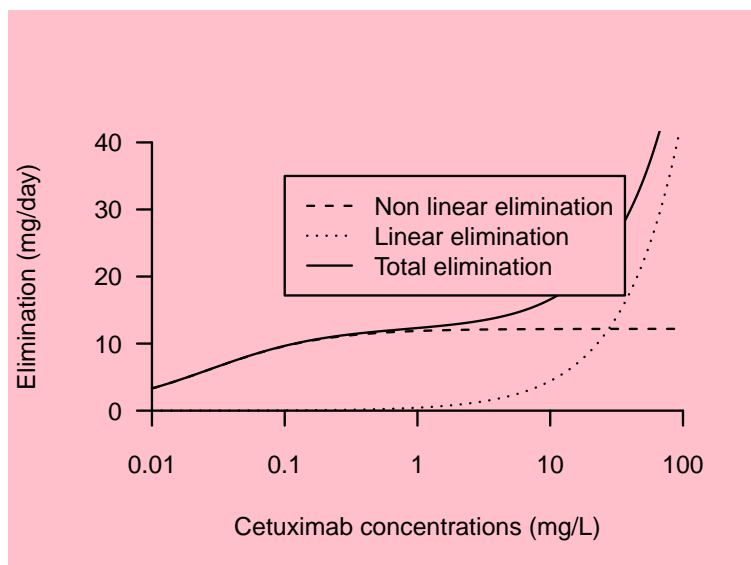


FIGURE 1.14 – Rôle du FcRn dans la protection des IgG de la dégradation et dans leur transport bidirectionnel à travers la cellule endothéliale. D'après Ghetie & Ward, 1997.

IgG3[?].

Il n'existe pas de polymorphisme génétique rapporté sur les 5 exons de *FCGRT*, le gène codant pour le FcRn. Cependant, les variations du nombre de répétitions en tandem (VNTR pour variable number of tandem repeats) dans l'intron 1 pourraient influencer la transcription[?]. Cette différence pourrait être une source de variabilité dans la vitesse de distribution et d'élimination des IgG.

Les IgG devraient théoriquement avoir une faible pénétration tissulaire en raison de leur masse moléculaire élevée et donc être confinés dans la circulation sanguine et les liquides extracellulaires (**Tang 2001**). Cependant, une phase de distribution est clairement identifiable sur la courbe des concentrations en fonction du temps pour tous les IgG1. Le FcRn, en permettant la transcytose des IgG, joue vraisemblablement un rôle majeur dans leur distribution dans l'organisme^{??}.

1.2.2.5 Élimination après fixation sur la cible

Le mécanisme d'action des anticorps thérapeutiques repose sur leur fixation sur un antigène-cible circulant ou membranaire.

Dans le cas d'un antigène circulant, la formation puis l'élimination par le système

1.2. LES ANTICORPS MONOCLONAUX THÉRAPEUTIQUES

immunitaire du complexe antigène-anticorps entraîne l'élimination de la cible et de l'anticorps.

Dans le cas d'un antigène membranaire, la fixation de l'anticorps peut provoquer l'endocytose du complexe antigène-anticorps formé. Cette internalisation a par exemple été décrite après la fixation de l'efalizumab sur le CD11a (la sous-unité α du récepteur LFA-1). Après son internalisation, le complexe immunitaire est retrouvé dans les lysosomes, puis est dégradé². Une internalisation a également été décrite pour le complexe formé par le cetuximab et sa cible, l'EGFR². La vitesse d'élimination par cette voie est le plus souvent limitée par la quantité de cible.

1.2.2.6 Élimination liée à l'immunisation du sujet traité (immunogénicité)

Théoriquement, le risque d'immunisation contre les anticorps décroît avec leur degré d'humanisation, c'est-à-dire : murins > chimériques > humanisés > totalement humains². Cependant, les anticorps partiellement ou totalement humanisés peuvent également être immunogènes du fait de leur portion animale ou en raison d'une immunisation contre leur idiotype, qui peut toujours être reconnu comme du non-soi. Les anticorps induits sont responsables d'une accélération de l'élimination de l'anticorps thérapeutique et donc d'une diminution de son efficacité clinique et peuvent être à l'origine d'effets indésirables.

La structure des anticorps thérapeutiques n'est cependant pas le seul facteur influençant leur immunogénicité. En effet, le risque d'immunisation contre le rituximab, un anticorps chimérique anti-CD20, existe dans la polyarthrite rhumatoïde, alors qu'il semble inexistant chez les patients traités pour lymphome.

1.2.3 Modélisation pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

Comme pour les médicaments "classiques", la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux est principalement étudiée lors des phases initiales de leur développement clinique (phases I et II) pour déterminer les doses qui seront testées en phase III. Cependant, pour de nombreux anticorps monoclonaux actuellement sur le marché, la relation entre la concentration et l'effet *in vivo* est mal connue et/ou peu décrite dans la littérature et les données pharmacocinétiques sont insuffisamment utilisées lors du choix des

1.2. LES ANTICORPS MONOCLONAUX THÉRAPEUTIQUES

doses à administrer. Une meilleure connaissance de la pharmacocinétique est donc une étape indispensable pour l'optimisation de l'utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux. Ce besoin d'amélioration du schéma posologique est particulièrement net en cancérologie. Il y a au moins deux raisons à cela : d'une part, au moment de la mise sur le marché, la connaissance de l'anticorps monoclonal est souvent incomplète car son développement clinique a été accéléré compte tenu de la gravité de la pathologie. D'autre part, une influence de la masse tumorale sur la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux est suspectée^{???}. Si cette influence est confirmée, ce facteur devrait être pris en compte pour améliorer l'adaptation posologique individuelle. De plus, l'analyse de la pharmacocinétique clinique des anticorps thérapeutiques est une étape nécessaire à l'étude de leur relation concentration-effet, outil indispensable à la fois pour un choix raisonné de la posologie et pour la compréhension de leur mécanisme d'action chez l'Homme.

La pharmacocinétique n'a pas été étudiée avec le même niveau de détail pour tous les anticorps thérapeutiques. La pharmacocinétique de l'efalizumab (anti-CD11a) a été bien décrite^{???}. La pharmacocinétique du rituximab a été assez bien étudiée^{??}, mais la connaissance de la pharmacocinétique d'anticorps comme l'adalimumab et le bevacizumab, utilisés pourtant depuis plusieurs années, reste insuffisante. Les études de la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux chez l'Homme ont utilisé l'approche non-compartimentale^{??????} et l'approche compartimentale. Dans ce cas, les modèles étaient parfois mono-compartimentaux[?] mais le plus souvent, bi-compartimentaux (tableau ??). Après administration IV, les concentrations d'anticorps monoclonaux décroissent en effet généralement de façon bi-exponentielle. Les anticorps se distribuent donc dans deux types de tissus, respectivement modélisés par un volume central de distribution V_1 et un volume périphérique V_2 avec une clairance de distribution Q et une clairance d'élimination CL .

La description compartimentale de la pharmacocinétique des anticorps administrés par voie EV peut être réalisée en intégrant un compartiment d'absorption et une constante d'absorption k_a d'ordre 1. Hayashi *et al.* ont par exemple décrit l'absorption de l'omalizumab (anti IgE) administré par voie sous cutanée (SC) à l'aide de ce modèle[?]. aucune modélisation de l'absorption d'un anticorps monoclonal reposant sur des compartiments de transit n'a pour l'instant été publiée. Compte tenu de la lenteur de l'absorption, la distribution de l'anticorps dans le compartiment périphérique est rarement identifiable ;

1.2. LES ANTICORPS MONOCLONAUX THÉRAPEUTIQUES

pour cette raison, un modèle mono-compartmental est souvent utilisé.

1.2.3.1 Dose-dépendance et élimination non-linéaire

Des phénomènes d'éliminations saturables ont été décrits pour près de la moitié des anticorps monoclonaux commercialisés[?]. Leur clairance étant en partie due à leur fixation sur l'antigène-cible, un modèle mécanistique de type TMDD peut être utilisé si les données sont suffisamment riches. Les données disponibles étant rarement très riches, la description de ces phénomènes d'élimination saturable est souvent réalisée par une équation de type Michaelis-Menten[?]. Mould *et al.* ont par exemple décrit l'élimination de l'alemtuzumab par une équation de type Michaelis-Menten reliée au compartiment central. Kloft *et al.* ont décrit l'élimination du sibrotuzumab par une équation combinant clairance (élimination non saturable) et élimination de type Michaelis-Menten à partir du compartiment central[?]. Sharma *et al.* ont quant à eux décrit la pharmacocinétique du keliximab et du clenoliximab (deux anticorps anti CD4) par un modèle à deux compartiments avec élimination de type Michaelis-Menten appliquée aux deux compartiments[?].

Lorsque l'élimination n'est pas saturée, l'*AUC* – qui est le reflet de l'exposition – est proportionnelle à la dose (équation ??). Dans ce cas, si l'intervalle d'injection τ est doublé, la même *AUC* peut être obtenue en doublant la dose. Lorsque l'élimination fait intervenir des phénomènes saturables, cette relation n'est plus vraie et il est nécessaire de disposer d'un modèle compartimental intégrant ces phénomènes pour adapter la posologie selon l'objectif d'exposition.

Bien que les modèles de type TMDD soient théoriquement les mieux adaptés à la description mécanistique de l'élimination des anticorps monoclonaux, aucune publication n'a encore rapporté leur utilisation. Les caractéristiques non-linéaires de l'élimination sont généralement décrites par équation de Michaelis-Menten.

1.2.3.2 Facteurs de variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux.

Comme nous l'avons évoqué plus haut, la plupart des études initiales^{????}, ont rapporté une grande variabilité interindividuelle des concentrations résiduelles (avant l'injection suivante) pour une même dose. Cette grande variabilité a été confirmée par toutes

1.2. LES ANTICORPS MONOCLONAUX THÉRAPEUTIQUES

les études pharmacocinétiques (Tableau 2), celles-ci ayant rapporté des CV interindividuels des paramètres compris entre 20% et 50%. Avec la généralisation de l'analyse pharmacocinétique de population, quelques facteurs de variabilité ont pu être identifiés, mais la majeure partie de cette variabilité demeure inexpiquée.

1.2.3.2.1 Facteurs démographiques et biochimiques. Les facteurs démographiques (âge, poids, sexe, origine ethnique, surface corporelle, etc.) ainsi que certaines mesures biologiques (albuminémie, numérations sanguines, marqueurs de l'inflammation, etc.) sont montrés une relation avec les paramètres pharmacocinétiques d'un anticorps thérapeutique. Le poids ou la surface corporelle sont souvent les principales covariables explicatives de la variabilité interindividuelle des volumes de distribution, ceux-ci augmentant avec la valeur de ces covariables^{1,2,3,4,5,6}. Le sexe peut également influencer la pharmacocinétique des anticorps. Ternant *et al.* ont montré une influence du sexe sur le volume de distribution de l'infliximab⁷. Comme décrit plus haut, la distribution et l'élimination de l'albumine et des IgG sont liées. Fasanmade *et al.* ont observé une relation entre la concentration sérique d'albumine et la pharmacocinétique de l'infliximab chez les patients traités pour rectocolite hémorragique⁸. La clairance de l'infliximab était d'autant plus faible que les patients avaient une concentration d'albumine élevée. Pour expliquer ces résultats, les auteurs ont fait l'hypothèse que des concentrations faibles d'albumine sont le reflet d'une expression plus faible de FcRn, responsable d'un recyclage plus faible et donc d'une élimination plus importante de l'infliximab et de l'albumine. Ils ont proposé d'utiliser la concentration sérique d'albumine comme indicateur prédictif de l'exposition des patients à l'infliximab.

1.2.3.2.2 Immunisation L'immunisation contre les anticorps thérapeutiques augmente leur clairance. Ternant *et al.* ont montré que la clairance de l'infliximab était 2,7 fois plus élevée chez les patients ayant des anticorps anti-infliximab (ATI pour *antibodies toward infliximab*)⁹ que chez les patients non immunisés.

1.2.4 Facteurs de variabilité de la relation dose-concentration-effet des IgG

Un des premiers facteurs individuels de variabilité de la réponse aux anticorps thérapeutiques identifié est un polymorphisme génétique du récepteur FcγRIIIA (CD16a)

1.2. LES ANTICORPS MONOCLONAUX THÉRAPEUTIQUES

codé par le gène FCGR3A. Ce polymorphisme conduit à la présence d'une phénylalanine ou d'une valine en position[?]. En effet, la survie sans progression de patients traités par rituximab, un anti-CD20, pour lymphome malin non Hodgkinien était significativement plus longue chez les patients homozygotes de génotype FCGR3A-158V/V que chez les patients porteurs de l'allèle FCGR3A-158F[?]. Ce polymorphisme génétique influence l'affinité du récepteur Fc γ RIIIA pour la portion Fc des IgG et donc le recrutement des cellules impliquées dans la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC pour *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*)^{??}. L'influence de ce polymorphisme sur l'efficacité du rituximab a été confirmée par d'autres études^{??} et a également été mis en évidence pour d'autres anticorps thérapeutiques agissant au moins en partie par ADCC, comme un anticorps anti-D[?], l'infliximab[?] et le trastuzumab[?].

Comme ce polymorphisme entraîne une différence d'affinité du récepteur Fc γ RIIIA pour la portion Fc des anticorps thérapeutiques, il était logique de penser qu'il n'influence pas la pharmacocinétique des anticorps mais plutôt leur relation concentration-effet. Ceci a été confirmé pour le rituximab par un modèle *in vitro*[?], puis chez l'Homme par la modélisation de la relation concentration-effet de la Lymphoglobuline[?].

Comme pour les médicaments classiques, les autres sources potentielles de variabilité de la relation concentration-effet sont le type de maladie et les traitements associés[?].

1.2.5 Méthodes de mesure des concentrations des anticorps monoclonaux

Afin de pouvoir réaliser des études pharmacocinétiques, il faut disposer d'une technique analytique validée. La première étape de la validation est la sélection d'une méthode de dosage appropriée à l'analyte et à sa matrice. Dans le cadre des études de cette thèse, l'analyte est un anticorps monoclonal. Compte tenu de sa masse moléculaire très élevée, la mesure de sa concentration ne peut pas être réalisée avec les mêmes techniques que celles utilisées pour les médicaments "classiques". Par ailleurs, le sérum, matrice dans laquelle l'analyse est habituellement réalisée, contient de nombreuses protéines et notamment d'autres anticorps. La méthode de mesure doit donc permettre d'estimer des concentrations sériques d'anticorps monoclonaux pouvant être inférieures à 1 mg/L alors qu'ils sont mélangés avec des IgG1 endogènes ayant des concentrations de l'ordre de 9 g/L[?]. Plusieurs méthodes de dosage des anticorps monoclonaux sont décrites dans la littérature[?] :

Résonance plasmonique de surface (BiaCore®) : Cette technique consiste à envoyer un faisceau de lumière monochromatique polarisée sur une puce sur laquelle un antigène-cible a été fixé, puis à mesurer les variations de l'angle de réflexion du faisceau dues à la modification de masse liée à la fixation antigène—anticorps. Cette méthode est très précise, mais trop lourde pour envisager son utilisation en routine[?].

Chromatographie : Ces méthodes sont prometteuses, car elles sont très rapides. Cependant, le développement est encore limité en raison de la matrice (le sérum) qu'il faut préalablement immuno-purifier. Yang *et al.* ont développé une technique de dosage d'un anticorps thérapeutique (non spécifié) par LC-MS/MS[?]. Une autre méthode expérimentale de dosage du cetuximab par LC-MS/MS a également été publiée[?].

Bio-analyses : Ces techniques permettent d'estimer les concentrations d'anticorps monoclonaux en mesurant leur activité biologique *ex vivo*. La variabilité des cellules cibles utilisées peut cependant poser des problèmes de reproductibilité, ce qui rend cette approche inadaptée en recherche clinique ou en suivi thérapeutique.

Immunoanalyses : Cet ensemble de techniques permet de quantifier les concentrations d'anticorps monoclonaux grâce à l'interaction antigène-anticorps. La méthode E.L.I.S.A. (ou ELISA pour *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*)[?], comme les méthodes précédemment citées, peut être utilisée sous plusieurs formes. Parmi les principales méthodes ELISA, on peut citer (??) :

- ELISA directe : La détection directe utilise un anticorps marqué ou couplé à une enzyme qui reconnaît directement l'antigène fixé. Cette technique ne permet pas de quantifier l'anticorps mais est utilisée pour la coloration immunohistochimique de tissus ou de cellules.
- ELISA indirecte : La détection indirecte est la plus utilisée et principalement pour le dosage des anticorps monoclonaux[?]. Dans ce cas, l'antigène fixé est reconnu par l'anticorps primaire que l'on veut doser. Un anticorps secondaire marqué ou couplé à une enzyme va ensuite reconnaître spécifiquement l'anticorps primaire.
- ELISA sandwich : Cette technique permet le dosage d'un antigène. Dans ce cas,

1.3. LE CETUXIMAB

un anticorps de capture, reconnaissant l'antigène à doser est fixé au fond du puits. L'antigène se fixe sur l'anticorps, puis un anticorps secondaire marqué ou couplé à une enzyme, reconnaît un autre épitope de l'antigène.

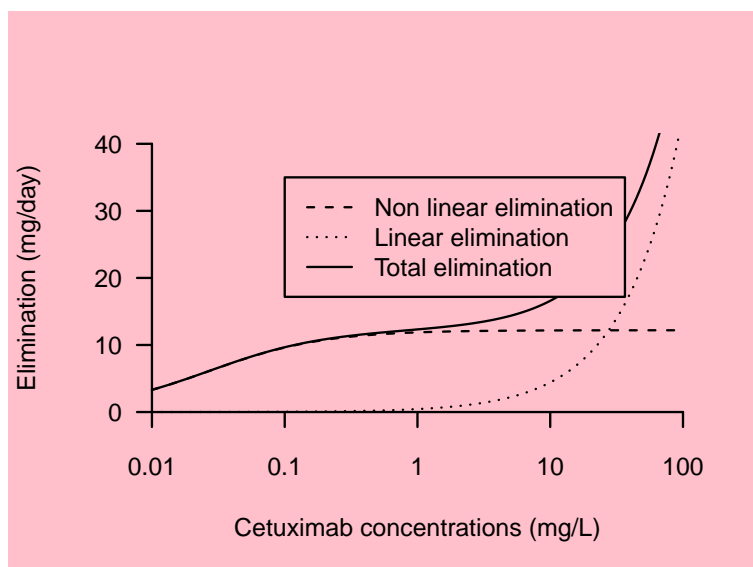


FIGURE 1.15 – Principes des trois formes de technique ELISA.

Si elle n'est pas répétable et reproductible, la méthode de dosage peut également être une source d'imprécision et biaiser de façon importante l'analyse pharmacocinétique.

1.3 Le cetuximab

1.3.1 Modes d'action du cetuximab

Le cetuximab (Erbix[®], Merck-Serono, Darmstadt, Allemagne) est un anticorps monoclonal recombinant de type IgG1 κ . Il reconnaît spécifiquement le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR pour *Epidermal Growth Factor Receptor*), récepteur transmembranaire ayant une activité tyrosine kinase (TK). À l'état physiologique, l'EGFR est présent à la surface des cellules majoritairement dans une conformation compactée. Une petite fraction d'entre eux se trouve sous forme relâchée, permettant la fixation des ligands comme l'EGF ou le TGF α sur les domaines I et III[?]. Cette fixation permet alors de démasquer le domaine II qui interagit avec le domaine II d'un autre récepteur de la superfamille des EGFR (Figure ??).

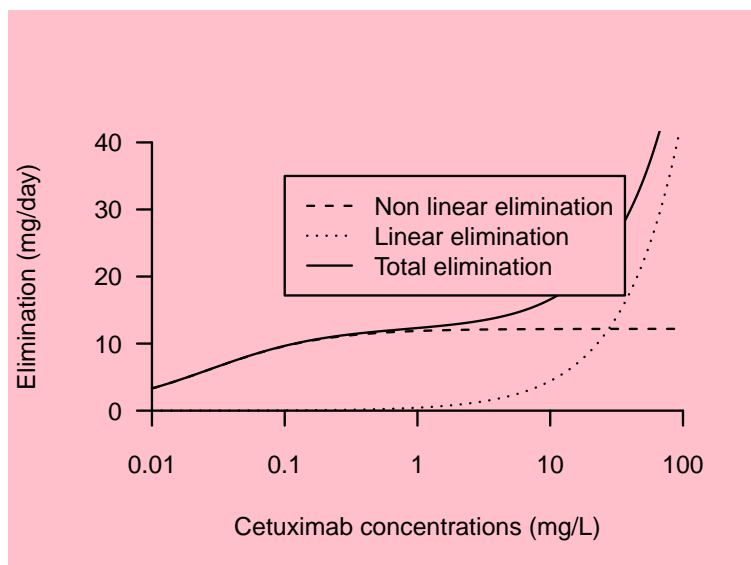


FIGURE 1.16 – L'EGFR est constitué de trois domaines : un domaine intracellulaire qui possède une activité tyrosine kinase, un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire subdivisé en quatre sous-domaines (I, II, III et IV). La fixation du ligand sur les sous-domaines I et III permet de démasquer le domaine II et donc la dimérisation avec un autre récepteur.

La dimérisation des récepteurs entraîne l'activation des domaines tyrosine kinase intracellulaires. Plusieurs voies de transduction du signal sont alors activées[?]. La voie Ras/Raf-MAPK aboutit à l'activation de facteurs de transcription via ERK, à l'origine de la prolifération cellulaire[?]. L'EGFR phosphorylé peut également activer la PI3 kinase (PI3K), qui mène à un signal anti-apoptotique[?]. L'EGFR possède également un rôle dans la prolifération et la survie cellulaire via JAK2/STAT3[?]. D'autres voies de signalisation sont impliquées dans l'adhésion cellulaire et l'angiogenèse. EGFR est exprimé dans de nombreux tissus épidermiques sains, comme la peau ou les follicules pileux, et est surexprimé ou stimulé de manière excessive dans certains cancers[?]. Le cetuximab se fixe sur le domaine III de l'EGFR, empêchant ainsi le démasquage du domaine II et donc la dimérisation des récepteurs. De nombreuses études *in vitro* ont montré que le cetuximab inhibe ainsi des phénomènes d'angiogenèse et de prolifération cellulaire et qu'il entraîne une restauration de l'apoptose[?]. Une internalisation du complexe cetuximab-EGFR a également été décrite[?]. D'autres études *in vitro* sur cellules surexprimant EGFR ont montré que le cetuximab peut également à forte concentration entraîner la phosphorylation de l'EGFR et donc induire une transduction de signal (**Mandic, Rodgarkia-Dara *et al.* 2006** ;

Yoshida, Okamoto *et al.* 2008). Cet effet de type agoniste vis-à-vis de l'EGFR est donc susceptible d'être observé *in vivo* pour des concentrations élevées de cetuximab.

1.3.2 Indications et posologie du cetuximab

Le cetuximab est actuellement indiqué dans le traitement des patients ayant un cancer colorectal métastatique exprimant l'EGFR avec gène KRAS de type sauvage (*wild-type*), en association avec une chimiothérapie, ou en monothérapie après échec d'un traitement à base d'oxaliplatine (FOLFOX) ou d'irinotecan (FOLFIRI) ou en cas d'intolérance à l'irinotecan[?].

Le cetuximab est également indiqué dans le traitement des patients ayant un carcinome épidermoïde de la tête et du cou, en association avec la radiothérapie en cas de maladie localement avancée[?], ou en association avec la chimiothérapie à base de platine en cas de maladie récidivante et/ou métastatique[?].

Dans ces deux indications, le cetuximab est injecté par voie intraveineuse (IV) toutes les semaines. La dose de charge recommandée est de 400 mg/m² pour la première perfusion qui se déroule sur deux heures. La dose de maintenance hebdomadaire est de 250 mg/m².

Les conditions de prescription dans le cancer colorectal ont évolué au cours du temps. En effet, la surexpression d'EGFR n'est plus un critère strict d'inclusion puisque des études ont montré que le nombre de copies d'EGFR n'influence pas significativement le bénéfice clinique 107-109. De plus, la mutation tumorale de KRAS n'était pas un critère d'exclusion au moment de l'autorisation de mise sur le marché (AMM) du cetuximab en juin 2004. Depuis, plusieurs études ont montré que la réponse au cetuximab est restreinte aux patients porteurs de tumeurs avec KRAS non muté^{???}.

Une méta-analyse a récemment montré que la survie sans progression des patients dont la tumeur avait la mutation KRAS G13D était meilleure que celle des patients ayant une tumeur avec une autre mutation[?]. Une autre étude a montré que le statut KRAS peut varier entre la tumeur primaire et les métastases chez un même patient[?]. D'autres polymorphismes génétiques tels que PTEN ou BRAF pourraient également avoir une influence sur l'efficacité du cetuximab^{??}.

Dans le cancer colorectal métastatique, la chimiothérapie associée est administrée

toutes les deux semaines alors que la posologie de l'AMM du cetuximab est d'une injection hebdomadaire. Pour éviter au patient d'être hospitalisé toutes les semaines, l'injection d'une double dose (500 mg/m^2) de cetuximab toutes les deux semaines est couramment pratiquée. Cependant, les données publiées à ce jour[?] n'ont pas permis de démontrer clairement l'équivalence de cette posologie avec celle de l'AMM.

D'autres indications du cetuximab comme le cancer cutané[?] sont également activement explorées. Plusieurs essais de phase II et de phase III ont évalué l'intérêt du cetuximab en association à une chimiothérapie à base de sels de platine en 1ère ligne de traitement de cancers bronchiques non à petites cellules, avancés ou métastatiques^{??}. Les résultats de ces essais montrent un bénéfice modeste en termes de survie globale (OS pour *Overall Survival*) et de survie sans progression (PFS pour *Progression-Free Survival*), associé à une toxicité non négligeable. Ces données ne montrant pas de rapport bénéfice/risque suffisant, le cetuximab n'a pas encore obtenu d'AMM dans cette indication.

1.3.3 Méthodes de mesure des concentrations de cetuximab

Deux types de techniques de dosage ont été rapportées pour mesurer les concentrations sanguines de cetuximab chez l'Homme ou l'animal : les méthodes ELISA^{???} et la résonance plasmonique de surface (BiaCore)[?]. Les limites basses de quantification des méthodes ELISA étaient de l'ordre de $0,1 \text{ mg/L}$ mais les étapes de validation n'ont pas été décrites.

1.3.4 Pharmacocinétique des anticorps anti-EGFR

La pharmacocinétique du cetuximab a été peu décrite. Les analyses qui ont été réalisées sont principalement non-compartmentales^{???}. Cependant, comme pour la plupart des anticorps thérapeutiques, l'élimination du cetuximab est en partie concentration-dépendante en raison de la quantité limitée de cibles (EGFR)^{???}. La vitesse d'élimination varie donc avec la concentration (et donc en fonction du temps), ce qui invalide l'approche non-compartmentale si les données sont pauvres. En revanche, l'approche compartimentale peut permettre de quantifier de manière plus précise des phénomènes d'élimination saturables.

Dirks *et al.* ont décrit la pharmacocinétique du cetuximab chez des patients traités

pour carcinome épidermoïde de la tête et du cou par approche compartimentale de population. L'élimination y était quantifiée grâce à une équation de type Michaelis-Menten (équation ??)[?]. Dans cette étude, le poids idéal et la numération leucocytaire étaient des covariables influençant significativement V_{max} , tandis que le poids influençait significativement V_1 . Chez les patients traités pour cancer colorectal métastatique, il n'existe pas de publication décrivant une analyse compartimentale du cetuximab. Les facteurs influençant la variabilité de sa pharmacocinétique dans cette pathologie n'ont donc pas été étudiés.

Le matuzumab est une autre IgG anti-EGFR dont le développement a été arrêté en février 2008 par manque d'efficacité. Sa pharmacocinétique a cependant été décrite par approche compartimentale, à l'aide d'un modèle à deux compartiments avec élimination linéaire (CL) couplée à une élimination saturable de type Michaelis-Menten^{??}. La masse maigre était une covariable influençant significativement CL . La pharmacocinétique du panitumumab (IgG2 anti-EGFR) a également été décrite par ce modèle[?]. Le poids était la covariable la plus influente, reliée à CL , V_{max} , et V_1 .

1.3.5 Relations dose-réponse et concentration-réponse du cetuximab

Peu de descriptions de la variabilité de la relation dose-réponse ou concentration-réponse ont été publiées.

Dans une étude portant sur 35 patients traités par cetuximab pour un cancer colorectal métastatique, Zhang *et al.* ont quantifié le risque relatif de progression des patients homozygotes $FCGR2A$ -131R/R ou $FCGR3A$ -158V/V comme étant 2,51 fois supérieur à celui des patients porteurs des allèles $FCGR2A$ -158H et $FCGR3A$ -158F ($p = 0,004$)[?]. Cependant, ce sont les allèles $FCGR2A$ -131H et $FCGR3A$ -158V qui sont associées à une meilleure affinité pour la portion Fc des IgG. Dans l'analyse de survie sans progression de Zhang *et al.*, la comparaison du groupe " $FCGR2A$ -131R/R ou $FCGR3A$ -158V/V" avec le groupe " $FCGR2A$ -158H et $FCGR3A$ -158F" n'est donc pas pertinente et invalide les résultats. Bibeau *et al.* ont étudié l'influence des polymorphismes de $KRAS$, $FCGR2A$ et $FCGR3A$ sur la relation dose-réponse[?]. L'étude de 69 patients porteurs de cancer colorectal métastatique traités par cetuximab et irinotecan a montré une meilleure PFS chez les patients porteurs de tumeurs non mutées $KRAS$ (5,3 mois vs 3,0 mois ; $p = 0,021$). Les patients ayant le génotype $Fc\gamma RIIIA$ -131H/H et/ou $Fc\gamma RIIIA$ -158V/V avaient une

1.3. LE CETUXIMAB

meilleure PFS que les autres patients (5,5 vs 3,0 ; $p = 0,005$).

Des études ont décrit une relation entre la toxicité cutanée du cetuximab et son efficacité[?] et entre la concentration de cetuximab et la toxicité cutanée[?]. Dans cette dernière étude, qui est la seule publiée décrivant la relation concentration-effet du cetuximab *in vivo*, Fracasso *et al.* ont monté dans une cohorte de 39 patients traités par cetuximab pour différents types de carcinomes, que les patients répondeurs avaient un grade de première toxicité cutanée plus important que les autres patients. Fracasso *et al.* ont également observé que les patients stables et les patients répondeurs avaient une concentration résiduelle moyenne plus élevée que les patients en progression : 60 mg/L vs 30 mg/L[?].

1.3. LE CETUXIMAB

TABLE 1.2 – Exemples de modèles de population utilisés pour décrire la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux thérapeutiques.

Étude	Anticorps	Cible	Pathologie	Voie	Sujets (n)	Comp.	F	Élim.	Covariab
Mager 2003 [?]	Abciximab	GpIIb/IIIa	Angioplastie coronaire	IV perf	47	2	-	1	-
Weisman 2003 [?]	Adalimumab	TNF α	PR	IV perf	9	2	-	1	CL : sexe
Mould 2007 [?]	Alemtuzumab	CD52	Leucémie lym-phoïde chronique	IV perf	67	2	-	MM	-
Dirks 2008 [?]	Cetuximab	EGFR	Cancer de la tête et du cou	IV perf	143	2	-	MM	-
Mould 2007 [?]	Clenoliximab	CD4	PR	IV perf	32	2	-	MM	-
Ng 2005 [?]	Efalizumab	CD11a	Psoriasis modéré et sévère	SC	240	2	56%	1+MM	-
Dartois 2007 [?]	Ilonimomab	CD25	Maladie du greffon contre l'hôte	IV perf	21	2	-	1	-
Ternant 2008 [?]	Infliximab	TNF α	maladies inflammatoires de l'intestin	IV perf	33	2	-	1	V1 : Poids
Kuester 2009 [?]	Matuzumab	EGFR	Cancer colorectal	IV perf	90+81	2	-	1+MM	CL : Poids
Hayashi 2007 [?]	Omalizumab	IgE	Syndromes atopiques	SC	910	1	62%	1	V ₁ /F : Poi
Ma 2008 [?]	Panitumumab	EGFR	Cancer colorectal	IV perf	1200	2	-	1+MM	Poids sur
Iacona 2000 [?]	Rituximab	CD20	Lymphome NHF	IV perf	7	2	-	1	-
Ng 2005 [?]	Rituximab	CD20	PR	IV perf	102	2	-	1	BSA et sex
Kloft 2004 [?]	Sibrotuzumab	FAP	Cancers colorectal et du poumon	IV perf	60	2	-	1+MM	Poids sur
Frey 2010 [?]	Tocilizumab	IL6R	PR	IV perf	1793	2	-	1+MM	-
Bruno 2005 [?]	Trastuzumab	HER2	Cancer du sein métastatique	IV perf	476	2	-	1	V ₁ : Poids
Zhu 2009 [?]	Ustekinumab	IL12/23	Psoriasis sévère	SC	1937	1	?	1	Poids, dia

1.3. LE CETUXIMAB

2 Objectifs

L'objectif de notre travail était d'étudier la pharmacocinétique du cetuximab afin d'identifier ses sources de variabilité interindividuelles, d'étudier son influence sur la réponse clinique et d'explorer de nouveaux modes d'administration. Pour répondre à cet objectif, les travaux suivants ont été réalisés :

- Étude de la pharmacocinétique du cetuximab durant la dialyse rénale (publication I). Le dysfonctionnement d'organes peut entraîner une modification de la pharmacocinétique des médicaments conventionnels. Peu de données sont disponibles sur la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux chez les patients avec insuffisance rénale terminale traités par dialyse.
- Étude des facteurs influençant la pharmacocinétique du cetuximab dans le cancer colorectal métastatique (Publications II et III). Bien qu'il soit indiqué dans le traitement du cancer colorectal métastatique, la pharmacocinétique du cetuximab n'avait jamais été étudiée de façon précise dans cette pathologie. Notre étude a eu pour but de décrire la relation entre la dose et la concentration de cetuximab au cours du temps, dans le cancer colorectal métastatique par approche de population afin d'identifier ses sources de variabilité.
- Étude de l'influence de la pharmacocinétique sur la réponse au cetuximab dans le cancer colorectal métastatique (publication III). Grâce à l'étude décrite ci-dessus, nous avons étudié la relation entre la pharmacocinétique du cetuximab et la survie sans progression.
- Étude de l'espacement des perfusions sur l'exposition des patients (manuscrit IV). Grâce au modèle de l'étude IV, nous avons simulé les concentrations obtenues avec différentes doses de cetuximab administrées toutes les une, deux ou trois semaines.

-
- Étude de l'exposition au cetuximab après administration pulmonaire (publication V). La nébulisation est une voie d'administration EV prometteuse pour le traitement du cancer broncho-pulmonaire. Nous avons étudié la biodisponibilité du cetuximab administré par nébulisation chez la Souris, étape indispensable avant une éventuelle étude clinique.

3 Méthodes

3.1 Développement et validation de la méthode ELISA de dosage du cetuximab.

3.1.1 Principes de l'ELISA indirect

Nous avons développé et validé une méthode de mesure des concentrations sériques de cetuximab par ELISA indirecte (Publication II). Les différentes étapes de cette méthode schématisées sur la Figure 17 sont les suivantes :

- la sensibilisation des puits de la plaque (une ligne sur deux) avec de l'EGFR recombinant.
- la saturation de tous les puits avec de l'albumine pour limiter les fixations non spécifiques.
- le dépôt des échantillons éventuellement dilués dans du sérum.
- le dépôt du conjugué qui est une portion F(ab)'2 d'anticorps de Chèvre couplée à une peroxydase et qui reconnaît spécifiquement la chaîne γ des IgG humaines.
- le dépôt du substrat, un mélange de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'orthophénylène diamine (OPD).
- La réaction chimique catalysée par la peroxydase qui donne de l'eau (H_2O) et du 2-3 diaminophénazine (coloration jaune).
- Arrêt de la réaction par de l'acide sulfurique (H_2SO_4) qui dénature les protéines.
- Lecture de l'absorbance à 492 et 620 nm puis interprétation.

3.1. DÉVELOPPEMENT ET VALIDATION DE LA MÉTHODE ELISA DE DOSAGE DU CETUXIMAB.

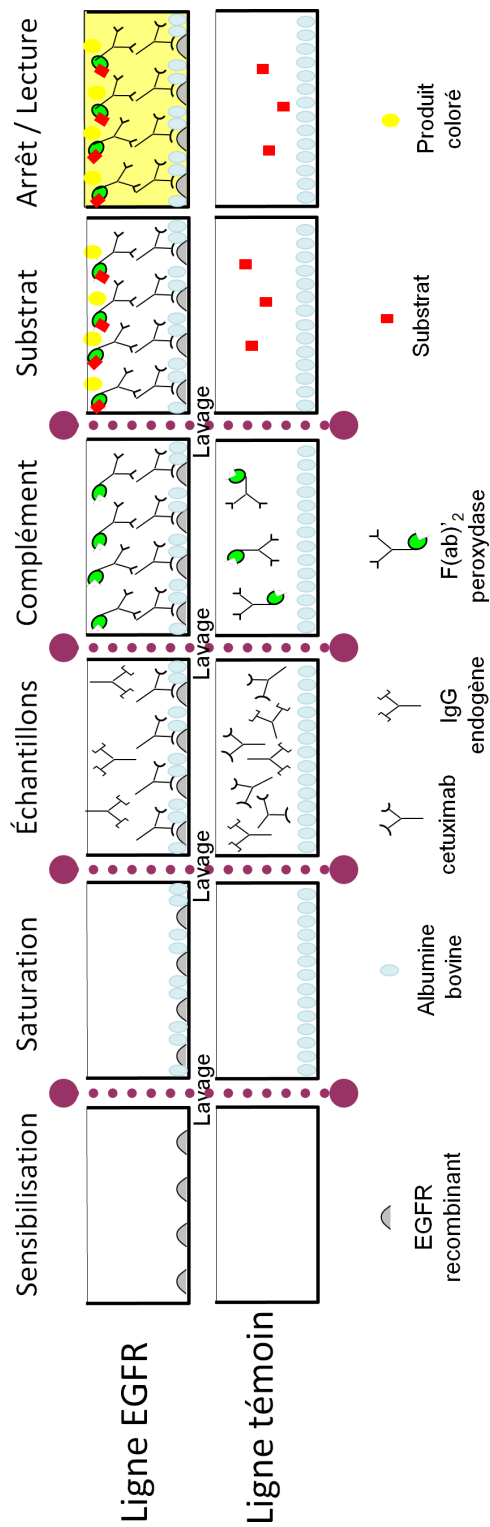


FIGURE 3.1 – Étapes de la technique ELISA de dosage du cetuximab. Chaque échantillon était déposé en double, dans un puits contenant de l'EGFR et dans un puits témoin sans EGFR. Pour chaque plaque, la mesure de 9 points de calibration et de 3 points de contrôle était réalisée. Avec une plaque de 96 puits, il était ainsi possible d'estimer la concentration de cetuximab de 12 échantillons de sérum.

3.1. DÉVELOPPEMENT ET VALIDATION DE LA MÉTHODE ELISA DE DOSAGE DU CETUXIMAB.

3.1.2 Développement

Après avoir testé sans succès deux EGFR recombinants disponibles dans le commerce, nous avons produit notre propre EGFR recombinant. La mise au point et l'optimisation de cette production ont été réalisées par F. Piller (CNRS, Centre de Biophysique Moléculaire UPR 4301, Orléans, France). Des cellules HEK (cellules de rein de Hamster) ont été transfectées par un plasmide codant pour l'EGFR. Des modifications dans la séquence ont été apportées pour que la protéine soit sécrétée dans le surnageant et un *tag* histidines a été ajouté pour permettre la purification sur billes de nickel. L'EGFR obtenu avait une concentration de l'ordre de 1 g/L.

A l'aide de sérums de 28 patients n'ayant jamais reçu de cetuximab, La limite de détection (LOD) était déterminée à 0,012 mg/L grâce à l'équation suivante :

$$54 \quad (3.1)$$

où est la concentration moyenne estimée pour les sérums de patients n'ayant jamais reçu de cetuximab et est l'écart-type.

Les concentrations des points de calibration ont été réparties de façon régulière sur l'échelle logarithmique des concentrations entre 0 et 30 mg/L. La courbe de calibration était obtenue par régression logistique à l'aide de l'équation suivante :

$$55 \quad (3.2)$$

où *Abs* était l'absorbance, et *A*, *B*, *C*, *N* des constantes. La réciproque de cette équation permettait de déduire les concentrations à partir des absorbances :

$$56 \quad (3.3)$$

La méthode de dosage du cetuximab par ELISA a été développée conformément aux recommandations publiées sur le développement des méthodes d'analyse des biomolécules par fixation à un ligand[?]. Ces recommandations préconisent une précision et un biais des concentrations estimées n'excédant pas 20%.

De façon générale, le calcul de la précision est exprimé en pour-cent, par le coefficient

3.1. DÉVELOPPEMENT ET VALIDATION DE LA MÉTHODE ELISA DE DOSAGE DU CETUXIMAB.

de variation P :

$$57 \quad (3.4)$$

où et sont respectivement la moyenne et l'écart-type empirique.

Le biais B est quantifié par l'équation suivante :

$$58 \quad (3.5)$$

où μ est la valeur théorique.

Les concentrations des points de contrôle bas et haut étaient choisies pour donner une incertitude inférieure à 20%. Ces points de contrôle déterminaient ainsi les limites de quantification basse (Lower limit of quantitation, LLOQ) et haute (Upper limit of quantitation, ULOQ). En deçà de la LLOQ, la concentration était censurée, c'est-à-dire exprimée comme inférieure à la LLOQ. Les incertitudes et les biais des contrôles de qualité bas (0,75 mg/L) et haut (15 mg/L) étant inférieurs à 15%, ces concentrations ont été définies respectivement comme étant les limites de quantification LLOQ et ULOQ.

3.1.3 Validation de la méthode

La répétabilité intra-jour et inter-jour de la méthode a été contrôlée. La précision et le biais de chaque contrôle de qualité étaient analysés au moins 5 fois le même jour (intra-jour) et une fois pendant au moins 5 jours consécutifs (inter-jour). L'étude de la reproductibilité intra-jour et inter-jour a montré que la précision et le biais de toutes les concentrations de calibration et de contrôle (en dehors de 0 et 0,1 mg/L) étaient inférieures à 20% (Article 1, Tableau 1).

3.1.3.1 Contrôle de dilution

Parfois, une concentration sérique d'anticorps pouvait être supérieure à ULOQ (en particulier juste après une perfusion). L'échantillon à mesurer était alors dilué dans du sérum au 10ème ou au 100ème. Puisque cette dilution était une source de variabilité, la reproductibilité des dilutions au 10ème et au 100ème a été testée pour différents sérums surchargés en cetuximab. La précision de la dilution était contrôlée avec des échantillons de sérum surchargés en cetuximab afin d'obtenir les concentrations de 50, 200 et

3.2. MODÉLISATION DE LA PHARMACOCINÉTIQUE

300 mg/L. Les moyennes, CV et imprécisions des concentrations estimées sont reportés dans le tableau ci-dessous :

TABLE 3.1 – Contrôle de la reproductibilité des dilutions avec respectivement μ et $\bar{\mu}$ les concentrations théoriques et moyennes estimées.

μ	dilution	échantillons	$\bar{\mu}$	CV	imprécision
50	1/10	5	51,5	4,5 %	+3,1%
200	1/100	5	205,3	2,6 %	+2,6%
300	1/100	5	291,9	5,5 %	+2,7%

3.1.3.2 Spécificité

La spécificité de la méthode de dosage pour le cetuximab a été contrôlée avec des sérums contenant des facteurs rhumatoïdes, des IgG et d'autres anticorps thérapeutiques (infliximab, bevacizumab, rituximab). Parmi les cinq sérums contenant des facteurs rhumatoïdes issus de patients n'ayant jamais été traités par cetuximab, aucun n'a montré une absorbance correspondant à une concentration supérieure à la LOD. Parmi les cinq sérums contenant une concentration élevée d'IgG issus de patients n'ayant jamais été traités par cetuximab, un seul a montré une absorbance correspondant à une concentration supérieure à la LOD (0,012 mg/L), mais elle était inférieure à la LLOQ (0,75 mg/L). Les sérums de sujets sains surchargés avec de l'infliximab, du bevacizumab ou du rituximab, n'ont pas montré d'absorbance correspondant à une concentration supérieure à la LOD.

3.2 Modélisation de la pharmacocinétique

3.2.1 Choix de l'approche de modélisation

Dans les études de cette thèse, les trois approches non-compartmentale, compartimentale individuelle et compartimentale de population ont été utilisées. L'approche non-compartmentale était utilisée pour disposer de valeurs initiales pour les paramètres du modèle compartimental. L'approche compartimentale individuelle était utilisée lorsque les données étaient "riches" et permettaient une description correcte des concentrations. Les données de l'étude de la pharmacocinétique du cetuximab dans le cancer colorectal métastatique (publications II et III) étaient trop "pauvres" pour une approche non-

compartimentale ou compartimentale individuelle. Cependant, le nombre de patients était suffisamment important pour permettre une analyse compartimentale de population et ainsi rechercher les covariables influençant la pharmacocinétique du cetuximab.

3.2.2 Choix du modèle structural et de variabilité interindividuelle

Dans chaque étude, des modèles à un et deux compartiments, avec constantes de transfert d'ordre 1 et constante(s) d'élimination d'ordre 0 et/ou d'ordre 1 ont été testés. Dans l'étude de la pharmacocinétique de la publication III, un modèle à deux compartiments avec élimination mixte d'ordre 1 et de type Michaelis-Menten a également été testé. Le modèle structural retenu était celui qui présentait les meilleures performances descriptives et permettait une diminution significative de la fonction objective.

La variabilité interindividuelle des paramètres structuraux était décrite par un modèle exponentiel (équation ??).

L'évaluation du modèle final était basée sur l'inspection graphique (*goodness of fit plot*) et sur l'analyse des erreurs standards des paramètres obtenus (r.s.e.%).

3.2.3 Choix du modèle d'erreur résiduelle

Le choix du modèle d'erreur résiduelle était déterminé par la diminution significative de la $-2LL$ et par l'ajustement des concentrations prédites avec les concentrations observées. Dans les travaux de la publication III, les modèles additif, proportionnel, mixte et exponentiel ont été testés.

3.2.4 Sélection des covariables significatives

Dans la publication III, les covariables d'intérêt ont été analysées par une procédure pas à pas ascendante puis pas à pas descendante :

Pas à pas ascendante (ou Forward stepwise) : En partant du modèle structural sans covariable, les covariables d'intérêt étaient testées l'une après l'autre. Si la diminution de la FO était significative ($p < 0,1$), la covariable était retenue dans le modèle. La covariable d'intérêt suivante était testée sur le modèle retenu.

Pas à pas descendante (ou Backward stepwise) : A la fin de l'étape Forward, après inclusion de toutes les covariables d'intérêt significatives, ces covariables étaient

retirées une à une. Si le retrait d'une covariable ne faisait pas augmenter significativement la FO ($p < 0,05$), la covariable n'était pas retenue.

Les covariables continues étaient centrées sur leurs valeurs médianes.

3.3 Analyse de survie sans progression

Le temps de survie sans progression (PFS pour *progression-free survival*) est le temps de traitement pendant lequel le patient n'a pas progressé ou n'est pas décédé. Ce temps peut éventuellement être censuré, si le patient n'a pas encore progressé au moment de l'arrêt du suivi ou de l'analyse. On parle alors de censure "à gauche". La représentation graphique des temps de survie sans progression d'une cohorte de patients se fait par une courbe de Kaplan-Meier. Ce graphique représente le nombre relatif de patients n'ayant pas progressé en fonction du temps de traitement. L'expression la plus courante pour quantifier les PFS d'une cohorte de patients est le temps médian de survie sans progression qui correspond au temps après lequel la moitié des patients a progressé. Bien que cet indice soit fréquemment utilisé, il ne permet pas de caractériser globalement la fonction de survie.

La fonction de survie est la probabilité que la progression intervienne après un temps t donné. Elle est notée S par convention et est définie par :

$$59 \tag{3.6}$$

où t est le temps, T est le temps de progression et P est la fonction de probabilité.

La modélisation de la fonction de survie permet une description globale de la PFS mais également d'identifier des facteurs de variabilité. Cette modélisation peut se faire par approche paramétrique ou semi-paramétrique :

Approche paramétrique : La distribution des temps de survie sans progression peut être décrite par une distribution de Weibull. La fonction de survie correspond alors à l'équation suivante :

$$60 \tag{3.7}$$

où λ est le risque instantané de progression et k le paramètre d'échelle. La recherche de covariables peut se faire comme pour l'analyse pharmacocinétique,

sur les deux paramètres.

Si le risque de progression augmente avec le temps, $k < 1$. Si ce risque diminue, $k > 1$. Lorsque $k = 1$, le risque de progression est constant au cours du temps ; la distribution des temps de survie est alors de type exponentiel.

Approche semi-paramétrique : Le modèle de Cox exprime la fonction de risque instantané de progression $\lambda(t)$ en deux parties :

$$\lambda(t) = \lambda_0(t) \exp(\beta'x) \quad (3.8)$$

où $\lambda_0(t)$ est le risque de base qui dépend du temps mais pas des covariables et où $\exp(\beta'x)$ correspond à l'influence des n covariables sur le risque instantané. Ce modèle est dit semi-paramétrique, car on ne cherche pas à décrire, qui est par hypothèse le même pour tous les patients, mais plutôt les risques relatifs estimés par pour la covariable i .

Dans l'étude des données de survie sans progression de la publication III, des approches paramétriques (distributions exponentielles et de Weibull) ont été testées pour décrire la distribution des temps de survie sans progression. L'approche semi-paramétrique par régression de Cox a permis d'évaluer les risques relatifs instantanés de progression. Toutes les variables continues testées étaient également dichotomisées par rapport à leurs médianes respectives, pour une interprétation et une illustration plus explicites des risques relatifs.

3.4 Simulations

Pour étudier l'impact de l'espacement des injections de cetuximab sur sa pharmacocinétique, trois profils pharmacocinétiques obtenus avec différentes posologies ont été simulés. La surface corporelle de 1000 patients a été générée à l'aide d'une loi normale de moyenne égale à la surface corporelle médiane des patients de la publication III (1,79 m²) et une variabilité de 30%. Ces surfaces corporelles étaient censurées à gauche et à droite en fonction des valeurs extrêmes de la publication III (1,21 – 2,27 m²). A partir du modèle compartimental de population, également issu de la publication III, les paramètres pharmacocinétiques de ces patients ont été générés. Pour être comparables, les simulations d'injection de 250, 500 et 750 mg/m² respectivement, toutes les une, deux

ou trois semaines devaient se faire sur 84 jours (2 fois 3 semaines). Pour chaque heure, les concentrations étaient estimées dans les deux compartiments et l'*AUC* dans le compartiment central.

3.5 Outils informatiques

Toutes les analyses statistiques étaient réalisées grâce au logiciel R[?].

La modélisation non-compartimentale de la publication V a été réalisée avec Excel 2007 et WinNonLin Professional 5.2 (Pharsight, Mountain View, USA). Les résultats obtenus ont facilité la modélisation compartimentale de population des données avec le logiciel WinNonMix Professional 2.0.1 (Pharsight, Mountain View, USA). La modélisation compartimentale individuelle de la publication II a été réalisée avec WinNonLin. La modélisation compartimentale de population de la publication III a été réalisée avec WinNonMix, NONMEM 6 et 7, puis publiée avec les résultats obtenus avec Monolix 3.2.

Les analyses de survie ont été réalisées avec le logiciel R[?] et les « packages » `survival`[?] et `eha`[?].

4 Résultats

4.1 Étude de la pharmacocinétique du cetuximab chez l'Homme.

4.1.1 Introduction

Comme nous l'avons vu plus haut (cf. 1.2.4 page 49) peu d'études ont analysé la pharmacocinétique du cetuximab chez l'Homme et aucune n'a analysé l'influence des insuffisances d'organes (insuffisance hépatique ou rénale) sur la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux, même si on peut penser que la dialyse n'influence pas l'élimination des macromolécules comme les IgG. Une seule étude aborde la faisabilité d'utiliser du cetuximab et du bevacizumab chez un patient ayant un dysfonctionnement rénal, mais elle ne décrit pas la pharmacocinétique du cetuximab dans ce cas[?].

L'utilisation du cetuximab en association à la radiothérapie est approuvée pour le traitement du cancer de la tête et du cou. La variabilité interindividuelle de la relation dose-concentration a été décrite par Dirks *et al.* dans cette pathologie[?]. Cependant, la pertinence des covariables identifiées dans cette étude doit être confirmée dans d'autres pathologies. Aucune étude n'a analysé la pharmacocinétique du cetuximab par approche compartimentale dans le cancer colorectal.

4.1.2 Durant la dialyse rénale (publication I)

L'objectif de l'étude était d'étudier la pharmacocinétique du cetuximab chez un patient hémodialysé. Ce patient, âgé de 57 ans, mesurait 1,76 m pour 86 kg. Il était traité par cetuximab pour un carcinome épidermoïde infiltrant du sinus piriforme gauche T3N2bM0. Pour ce patient, la chirurgie et la chimiothérapie d'induction type TPF avaient été refusées. Il recevait des doses de cetuximab de 250 mg/m² toutes les semaines et était hé-

4.1. ÉTUDE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DU CETUXIMAB CHEZ L'HOMME.

modialysé trois fois par semaine, pendant cinq heures. Les concentrations sériques de cetuximab ont été mesurées au cours du temps par méthode ELISA (Publication II) et la pharmacocinétique a été décrite par un modèle bi-compartimental avec constantes de distribution et d'élimination d'ordre 1 (Figure ??). Les volumes de distribution V_1 et V_2 ainsi que les clairances d'élimination et de distribution étaient respectivement estimés à 3,8 L ; 3,77 L ; 0,6 L·jour⁻¹ et 0,53 L·jour⁻¹.

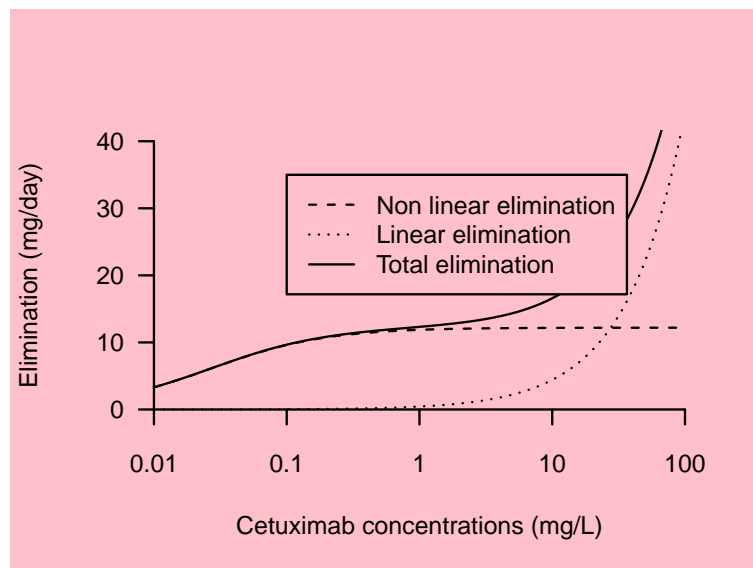


FIGURE 4.1 – Concentration de cetuximab au cours du temps chez un patient hémodialysé. Les points sont les concentrations observées ; la ligne, les concentrations prédites par un modèle à deux compartiments. Dans l'encadré, concentrations prédites vs concentrations observées.

Les estimations des paramètres ne permettaient pas de conclure à une influence du dysfonctionnement rénal ou de l'hémodialyse sur la pharmacocinétique du cetuximab chez ce patient.

4.1.3 Dans le cancer colorectal métastatique (publications II et III)

Dans la publication II, les données de routine de 16 patients (15 traités pour cancer colorectal et 1 pour néoplasie indéterminée) ont été analysées par analyse pharmacocinétique de population. Le modèle décrivant le mieux les données était un modèle à 2 compartiments avec élimination d'ordre 1. Le faible nombre de prises de sang et de patients n'a pas permis d'appliquer un modèle plus complexe.

4.1. ÉTUDE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DU CETUXIMAB CHEZ L'HOMME.

Le premier objectif de la publication III était de décrire la pharmacocinétique du cetuximab chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique et d'en identifier les sources de variabilité.

Il s'agissait d'une étude ancillaire d'un essai de phase II multicentrique (FOLFIRI-CETUX) qui a évalué la tolérance d'un schéma FOLFIRI (acide folinique, 5-fluorouracile [5-FU] et irinotécan), optimisé en prenant en compte de la pharmacogénomique de l'irinotécan et de la pharmacocinétique du 5-FU et associé au cetuximab administré de façon hebdomadaire. La dose d'irinotécan était adaptée individuellement en fonction du polymorphisme génétique de la partie promotrice d'UGT1A1. Les patients 6/7 avaient une dose inchangée de 180 mg/m². Les patients 7/7 avaient une dose initiale réduite de 30% (126 mg/m²). Les patients ayant un autre polymorphisme UGT1A1 avaient une dose initiale de 180 mg/m² augmentée à chaque cycle de 20% si la tolérance le permettait jusqu'à une dose maximale de 300 mg/m². Les doses de 5-FU étaient adaptées au statut de la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) et à chaque cycle, à la pharmacocinétique du 5-FU.

Entre 2007 et 2009, 96 patients ont été inclus (homme 58 %, âge moyen : 63 ans [38-80]). Il s'agissait d'un traitement de 2ème ligne chez 82% des patients. Le cetuximab était administré de façon conventionnelle : une dose de charge de 400 mg/m² suivie d'injections de 250 mg/m² toute les semaines.

Un total de 1322 concentrations sériques de cetuximab a été mesuré avec un nombre moyen de 13 concentrations par patient. Les concentrations sériques résiduelles de cetuximab variaient entre la limite inférieure de quantification (0,75 mg/L) et 300 mg/L.

La pharmacocinétique du cetuximab a été décrite au moyen d'un modèle à 2 compartiments combinant une élimination d'ordre 1 et une élimination d'ordre 0 (Figure ??D). Le modèle d'erreur était proportionnel et les 13 concentrations inférieures à la LLOQ ont été censurées. Ce modèle a permis une description satisfaisante des concentrations et notamment des résiduelles très basses (graphiques diagnostiques Figures ??-??). Le remplacement de l'élimination d'ordre 0 par une élimination de type Michaelis-Menten ne diminuait pas significativement la valeur de la fonction objective. De plus, la valeur de k_M obtenue était inférieure à la LLOQ et n'était donc pas pertinente. Les valeurs de population des cinq paramètres du modèle final étaient correctement estimées avec un CV inférieur à 10%. Ces valeurs sont présentées dans le Tableau 3. La surface corporelle est

4.1. ÉTUDE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DU CETUXIMAB CHEZ L'HOMME.

apparue comme étant une covariable significative de V_1 , V_2 et k_0 , ces paramètres augmentant avec sa valeur. L'albuminémie initiale était une covariable significative de CL : la clairance était d'autant plus importante que l'albuminémie était faible.

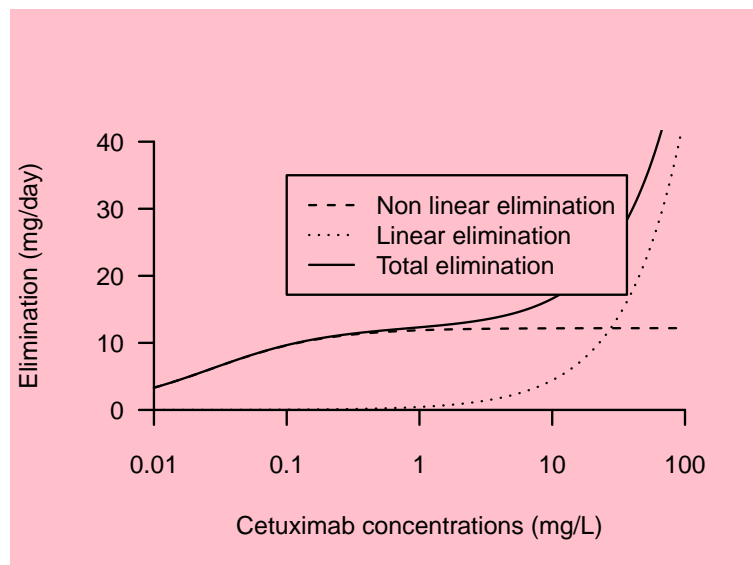


FIGURE 4.2 – Exemples de profils pharmacocinétiques d'un patient obtenus avec les différents modèles testés. **A** et **B** : modèles à un et deux compartiments avec élimination d'ordre 1 (CL). **C** : modèle à deux compartiments avec élimination d'ordre 0 (k_0). La meilleure description des concentrations observées est obtenue avec le dernier modèle (**D**) combinant une élimination d'ordre 0 et une élimination d'ordre 1.

4.1.4 Conclusion sur la pharmacocinétique du cetuximab chez l'Homme.

Les études des publications II et III ont permis d'obtenir les premières descriptions compartimentales de la pharmacocinétique du cetuximab chez l'Homme dans le cas d'un dysfonctionnement rénal et dans le cas du cancer colorectal métastatique. Le modèle de l'étude IV était identifiable "grâce" aux pauses thérapeutiques qui ont eu pour conséquence des concentrations résiduelles très basses.

Le modèle utilisé dans l'étude IV (FOLFIRICETUX) n'est pas significativement meilleur pour décrire les concentrations du patient de l'étude III (patient hémodialysé) que le modèle à deux compartiments avec élimination d'ordre 1. Dans l'étude IV, des modèles plus complexes (Michaelis-Menten, TMDD...) ont été testés mais n'étaient pas applicables en raison du nombre insuffisant de données.

4.1. ÉTUDE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DU CETUXIMAB CHEZ L'HOMME.

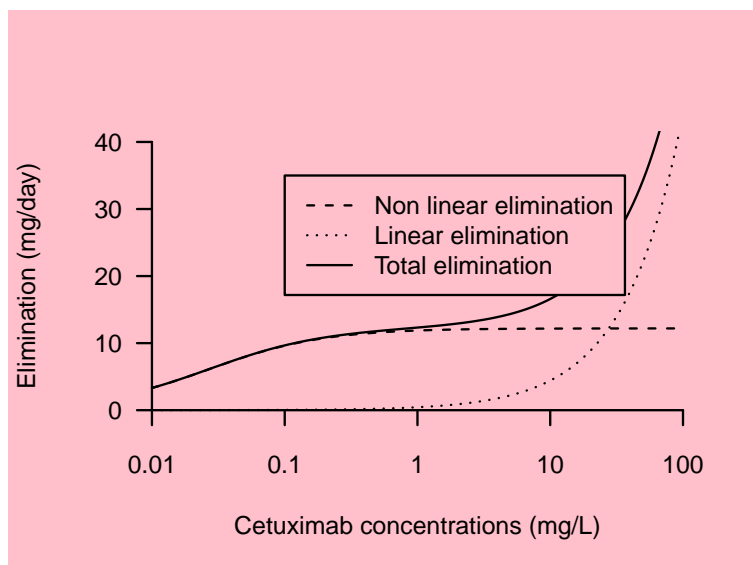


FIGURE 4.3 – Concentrations de cetuximab observées chez des patients traités pour cancer colorectal métastatique vs. concentrations prédites au moyen d'un modèle à 2 compartiments combinant une élimination d'ordre 1 et une élimination d'ordre 0.

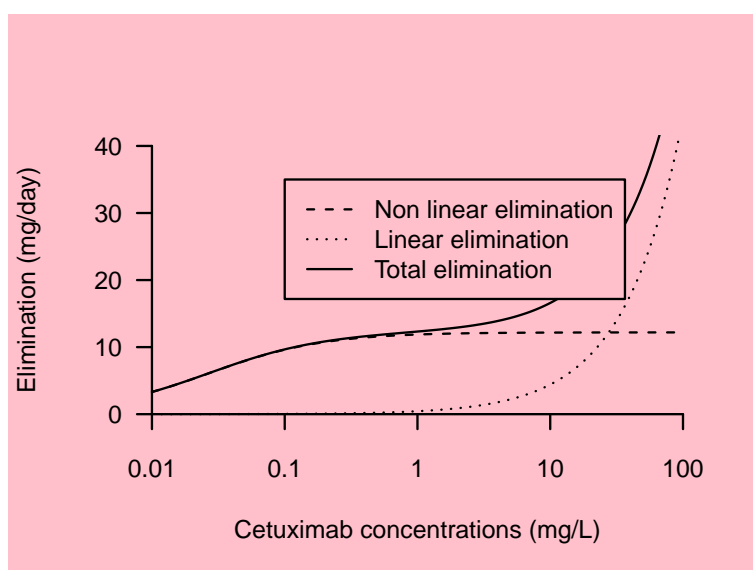


FIGURE 4.4 – Distribution normalisée des résidus (Normalized prediction distribution errors, NPDE). (A) : distribution (histogramme) et densité de probabilité de la loi normale centrée réduite (courbe). (B) : quantiles des NPDE vs. quantiles de la loi normale centrée réduite. En rouge, les 5^{ème} et 95^{ème} percentiles.

4.2. INFLUENCE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DU CETUXIMAB SUR SON EFFICACITÉ (PUBLICATION III)

TABLE 4.1 – Valeur estimées des paramètres pharmacocinétique du cetuximab dans l'étude de la publication III.

	paramètre	s.e.	r.s.e.(%)	p
V_1 (L)	2,96	0,12	4	
CL (L/jour)	0,497	0,021	4	
V_2 (L)	4,65	0,29	6	
Q (L/day)	0,836	0,07	8	
k_0 (mg/jour)	8,71	0,84	10	
$\beta_{V_1,BSA}$	0,42	0,17	41	0,015
$\beta_{V_2,BSA}$	0,56	0,27	49	0,039
$\beta_{k_0,BSA}$	1,58	0,35	22	0,0000078
$\beta_{CL,Alb}$	-0,0244	0,009	37	0,0064
$\omega_{V_1}^2$	0,0725	0,02	28	
ω_{CL}^2	0,11	0,018	17	
$\omega_{V_2}^2$	0,21	0,048	23	
ω_Q^2	0,305	0,076	25	
$\omega_{k_0}^2$	0,215	0,041	19	
σ_{prop}^2	0,222	0,0053	2	

4.2 Influence de la pharmacocinétique du cetuximab sur son efficacité (publication III)

4.2.1 Modélisation pharmacocinétique-pharmacodynamique

Les connaissances de la relation concentration-effet du cetuximab sont assez limitées 122. Les études concernant l'influence du polymorphisme *FCGR3A-V158F* portent sur la relation dose-effet alors que ce facteur génétique devrait concerner la relation concentration-effet du cetuximab.

La recherche d'un modèle PK-PD stable avec prise en compte ou non des doses de la chimiothérapie associée a été réalisée. Les critères d'efficacité étudiés étaient le critère RECIST, l'ACE et le CA 19.9 ainsi que leurs valeurs relatives par rapport à celles mesurées à l'initiation du traitement. Les modèles TMDD ou PK-PD indirects n'ont pas permis pas de décrire les données pharmacodynamiques, car les paramètres de ces modèles n'étaient

4.2. INFLUENCE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DU CETUXIMAB SUR SON EFFICACITÉ (PUBLICATION III)

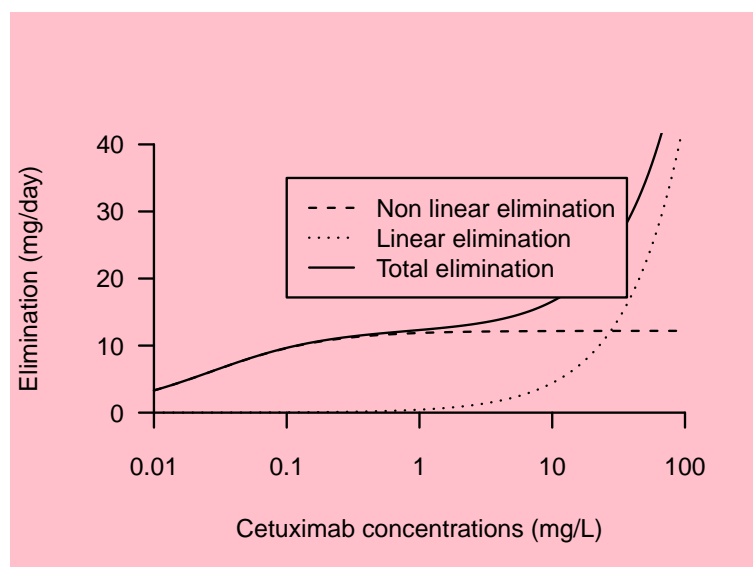


FIGURE 4.5 – Clairance d'élimination en fonction de la concentration de cetuximab. L'élimination globale du cetuximab (en noir) a été décrite comme la combinaison d'une élimination d'ordre 1 (pointillés) et d'une élimination d'ordre 0 (tirets).

pas identifiables. Puisque les données disponibles apparaissaient insuffisantes pour décrire la relation concentration-effet, nous avons choisi de décrire la relation entre concentration et survie sans progression, par approche paramétrique, puis semi-paramétrique.

Dans la cohorte de la publication III, la médiane de survie sans progression (PFS) était de 6,5 mois pour l'ensemble des 96 patients inclus (Figure ??). L'influence sur la PFS des facteurs suivant a été recherchée :

- exposition au cetuximab et paramètres pharmacocinétiques du cetuximab,
- facteurs génétiques reliés au cetuximab (statut *KRAS* tumoral et polymorphisme *FCGR3A-V158F*),
- dose moyenne et nombre d'injections de la chimiothérapie associée,
- et polymorphismes reliés à cette chimiothérapie.

L'approche de modélisation de la PFS utilisée a d'abord été paramétrique, par modèle de Weibull. Le modèle ne permettait cependant pas de décrire de façon satisfaisante les fonctions de survie de sous-groupes de patients. Pour cette raison, nous avons utilisé un modèle de Cox.

4.2. INFLUENCE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DU CETUXIMAB SUR SON EFFICACITÉ (PUBLICATION III)

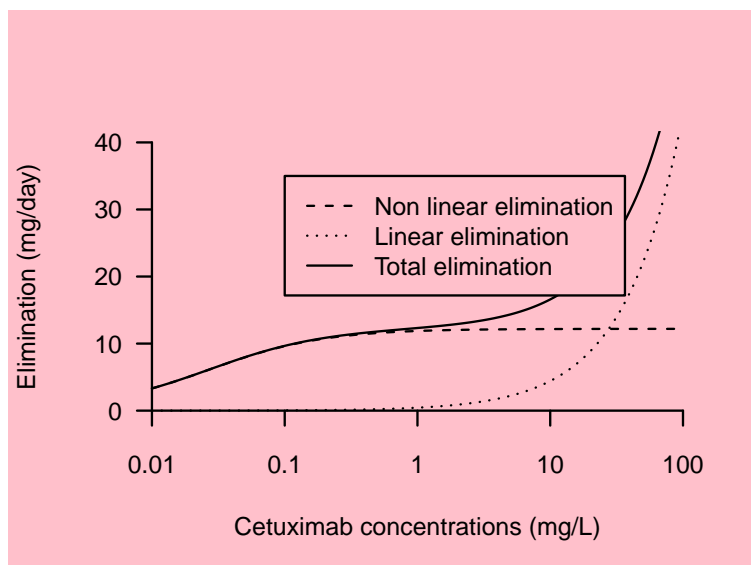


FIGURE 4.6 – Survie sans progression (PFS) des 96 patients traités par cetuximab pour cancer colorectal métastatique.

4.2.2 Influence de l'exposition au cetuximab sur la PFS

L' AUC est le meilleur reflet de l'exposition. Cependant, c'est une valeur qui varie au cours du temps : un patient qui a progressé au bout de 6 mois a, à ce moment-là, une AUC approximativement deux fois supérieure à celle d'un patient qui a progressé (et donc arrêté son traitement) trois mois plus tôt. Un tel paramètre dit "temps-dépendant" peut être intégré dans un modèle de Cox mais son interprétation est difficile. Afin d'obtenir un facteur indépendant du temps, nous avons normalisé l' AUC par la dose cumulée. Cette AUC normalisée (AUC_n) avait la dimension d'un temps par unité de volume ($[T] \cdot [L]^{-3}$). Pour faciliter l'interprétation, la "clairance globale" qui correspond à l'inverse de l' AUC_n a été préférée (Volume par unité de temps). La clairance globale a été calculée par l'équation ??, l' AUC étant estimée par approche compartimentale.

Les patients dont la clairance globale était inférieure à la valeur médiane (0,66 L/jour) avaient un temps de progression médian plus long que ceux dont la clairance globale était supérieure à la valeur médiane (8,9 mois vs 3,3 mois) et un risque relatif de progression 2,6 fois moins élevé ($p < 5 \cdot 10^{-5}$) (Figure ??). Le statut $KRAS$ de la tumeur des patients inclus dans l'étude a pu être déterminé rétrospectivement chez 51 patients et la tumeur était non mutée $KRAS$ chez 32 d'entre eux. Dans cette étude, la PFS n'était pas influencée

4.2. INFLUENCE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DU CETUXIMAB SUR SON EFFICACITÉ (PUBLICATION III)

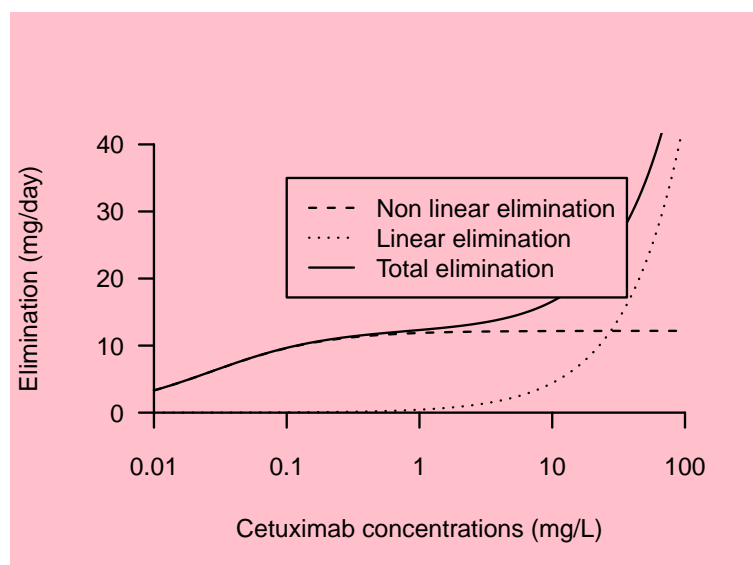


FIGURE 4.7 – Survie sans progression (PFS) selon la clairance globale médiane (0,66 L/jour). En bleu, le groupe des patients ayant une clairance globale inférieure à la médiane ($n = 48$); en rouge le groupe des patients ayant une clairance globale supérieure à la médiane ($n = 48$) ($p < 0,00005$).

par le statut *KRAS* tumoral ($p = 0,66$) (Figure ??). Parmi les patients avec une tumeur non mutée *KRAS*, ceux dont la clairance globale était inférieure à la valeur médiane avaient un temps de progression médian plus long que les autres (10,1 mois *vs.* 2,8 mois). Ces patients avaient également un risque de progression 2,8 fois moins élevé ($p = 0,014$). Cette différence n'était pas significative chez les patients ayant une tumeur mutée *KRAS* ($p = 0,21$) (Figure ??). Dans cette étude, le polymorphisme *FCGR3A-V158F* n'influait pas significativement la PFS. Dans le sous-groupe des patients *KRAS* non mutés, six patients étaient homozygotes *FCGR3A-V/V*. Cependant, parmi ces six patients, trois n'ont plus reçu de cetuximab après 6 mois de traitement, ce qui pourrait expliquer la perte de l'avantage d'être *FCGR3A-V/V* (Figure ??).

4.2.3 Relation entre la toxicité et la PFS

Nous avons étudié la relation entre la PFS et la présence/absence de toxicité cutanée et une toxicité cutanée supérieure ou non au grade 1, à J7, J14 et J21. La relation entre la PFS et la toxicité cutanée à 21 jours n'était pas significative ($p = 0,077$, Figure ??). Cependant, k_0 était significativement plus important chez les patients ayant présenté

4.2. INFLUENCE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DU CETUXIMAB SUR SON EFFICACITÉ (PUBLICATION III)

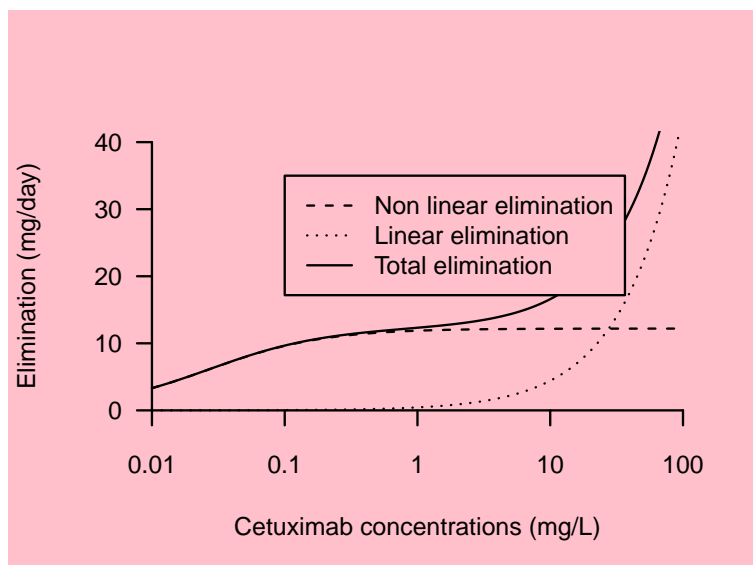


FIGURE 4.8 – Survie sans progression (PFS) selon le statut *KRAS* tumoral. En bleu, le groupe des patients portant une tumeur non mutés *KRAS*; en rouge le groupe des patients porteur de tumeur mutée *KRAS* ($p = 0,66$).

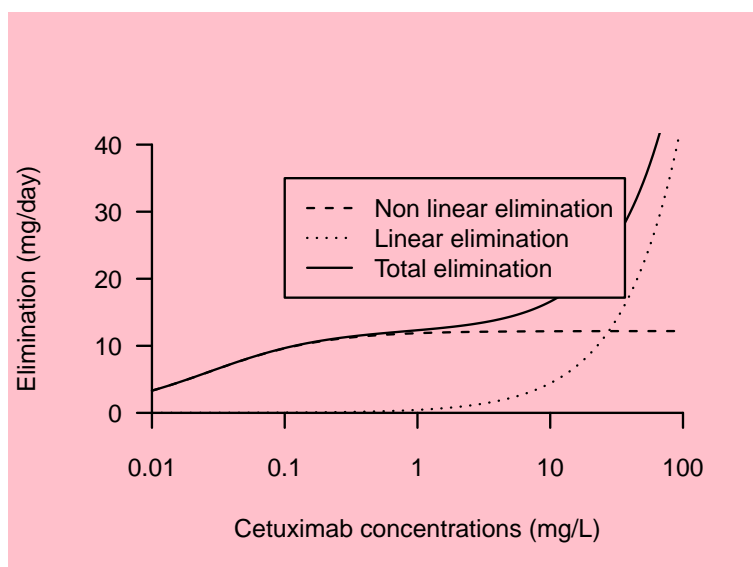


FIGURE 4.9 – Survie sans progression (PFS) selon la clairance globale médiane. A gauche, le groupe des patients portant une tumeur non mutés *KRAS* ($p = 0,014$); A droite, le groupe des patients porteur de tumeur mutée *KRAS* ($p = 0,21$) - En bleu, le groupe des patients ayant une clairance globale inférieure ou égale à la médiane; en rouge le groupe des patients ayant une clairance globale supérieure à la médiane.

4.2. INFLUENCE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DU CETUXIMAB SUR SON EFFICACITÉ (PUBLICATION III)

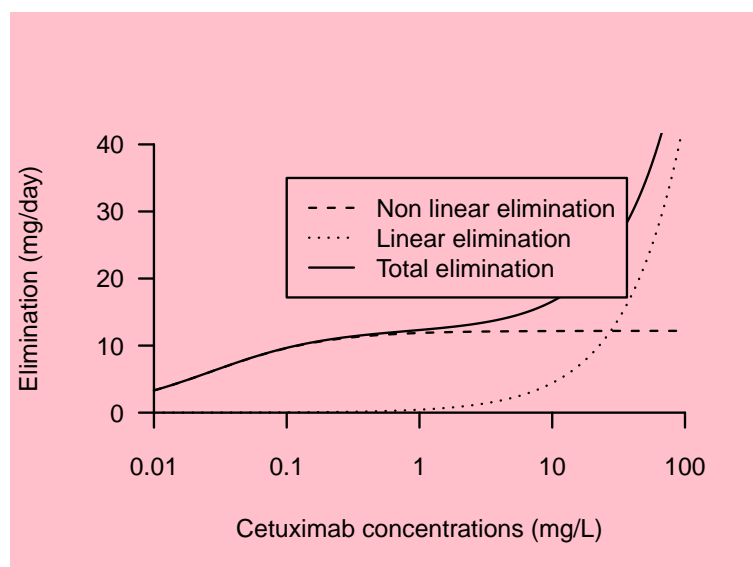


FIGURE 4.10 – Survie sans progression (PFS) selon le polymorphisme *FCGR3A*-V158F. A gauche, chez les 96 patients ; au milieu, chez les patients porteurs de tumeur non mutée *KRAS* ; à droite, chez les patients porteur de tumeur mutée *KRAS* - En rouge, patients homozygotes *FCGR3A*-V/V ; en bleu, patients porteurs de l'allèle *FCGR3A*-F.

une toxicité cutanée pendant les 21 premiers jours de traitement ($p = 0,04$). De plus, les valeurs de k_0 étaient significativement plus élevées chez les patients ayant présenté un grade de toxicité cutanée supérieur à 1 avant J7 et J14 (respectivement $p = 0,014$ et $p = 0,04$).

4.2.4 Relation entre les concentrations résiduelles et la PFS

Pour que l'influence de la pharmacocinétique du cetuximab sur la PFS puisse être estimée le plus tôt possible après l'initiation du traitement en clinique, nous avons étudié la relation entre les concentrations résiduelles avant réinjection et la clairance globale. Les patients du groupe dont la clairance globale était supérieure à la valeur médiane avaient des concentrations résiduelles de l'ordre de 30 mg/L, inférieures à celles de l'autre groupe qui étaient de l'ordre de 60 mg/L (Figure ??). La seule étude décrivant la relation concentration-effet in vivo du cetuximab montre que les patients en progression ont des concentrations résiduelles moyennes autour de 30 mg/L alors que les patients stables ou répondeurs ont des concentrations résiduelles moyennes autour de 60 mg/L[?]. Il semblait donc exister un lien entre concentration résiduelle et survie sans progression. Dans notre

4.2. INFLUENCE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DU CETUXIMAB SUR SON EFFICACITÉ (PUBLICATION III)

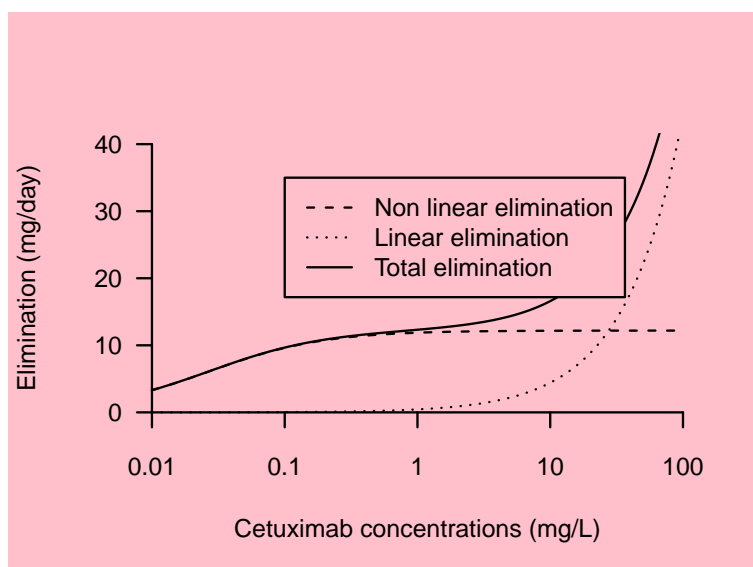


FIGURE 4.11 – Survie sans progression (PFS) selon la toxicité cutanée à 21 jours. En bleu, groupe des patients n'ayant pas présenté de toxicité cutanée les 21 premiers jours ($n = 21$); en rouge le groupe des patients ayant présenté une toxicité cutanée pendant cet intervalle de temps ($n = 69$) ($p = 0,077$).

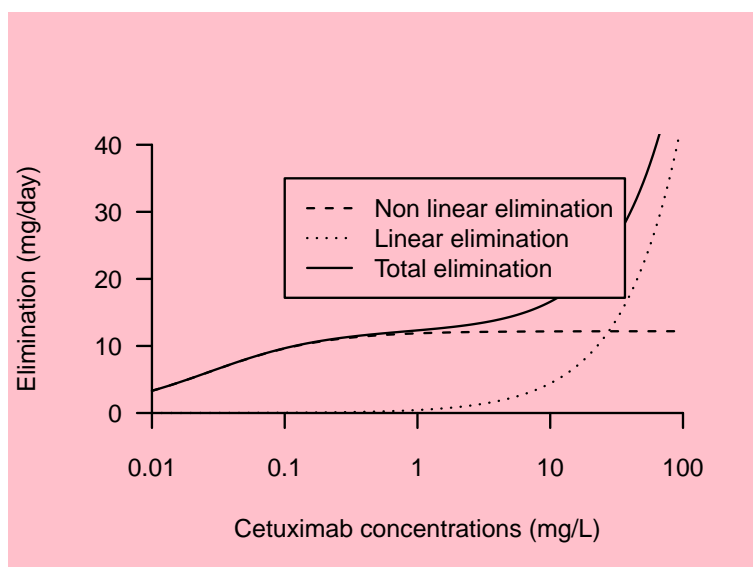


FIGURE 4.12 – Concentrations résiduelles au cours du temps, en fonction de la clairance globale. En bleu, clairance globale supérieure à la valeur médiane; En rouge, clairance globale inférieure. Les lignes correspondent aux 5ème, 50ème et 95ème percentiles dans les deux groupes.

4.2. INFLUENCE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DU CETUXIMAB SUR SON EFFICACITÉ (PUBLICATION III)

étude, les concentrations résiduelles les plus nombreuses étaient celles de J14 (avant la troisième injection de cetuximab, $n = 71$) et J28 (avant la cinquième injection, $n = 62$). Après avoir contrôlé la corrélation entre ces concentrations et les valeurs de clairance globale (Figure ??), nous avons quantifié leur relation avec la PFS. Les patients dont la concentration résiduelle à J14 était supérieure à la valeur médiane avaient un risque relatif de progression 1,9 fois plus faible que les autres patients ($p = 0,014$). Les patients dont la concentration résiduelle à J28 était supérieure à la valeur médiane avaient un risque relatif de progression également 1,9 fois plus faible que les autres patients ($p = 0,025$) (Figure ??).

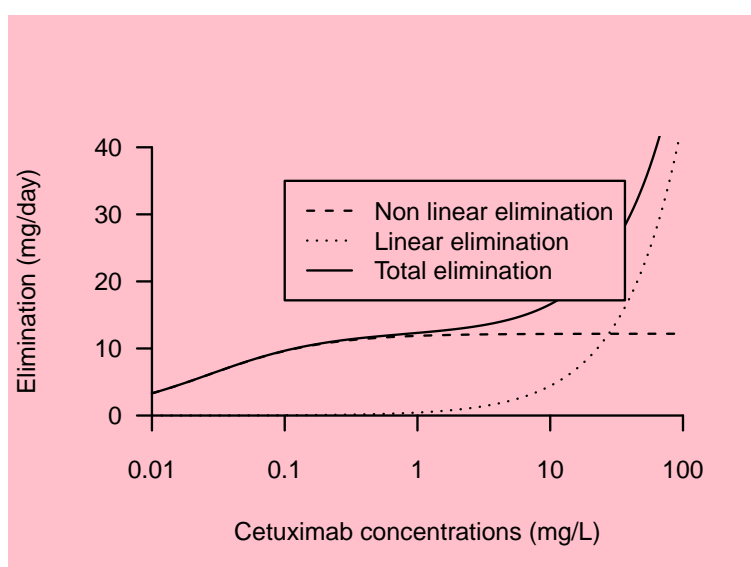


FIGURE 4.13 – Clairances globales des patients représentées en fonction des concentrations résiduelles à J14 (en haut) et à J28 (en bas). Les courbes représentent des régressions exponentielles, les droites en pointillés représentent le 25ème, 50ème et 75ème percentile des clairances globales.

4.2.5 Conclusion

Cette étude a permis de montrer l'influence de l'exposition au cetuximab sur la survie sans progression de patients traités pour cancer colorectal métastatique. Le statut *KRAS* des tumeurs n'était pas directement associé à la survie sans progression. Les deux principales hypothèses pour expliquer cette absence d'influence sont celle d'un manque de puissance statistique due à un faible nombre de patients et celle d'une compensation

4.2. INFLUENCE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DU CETUXIMAB SUR SON EFFICACITÉ (PUBLICATION III)

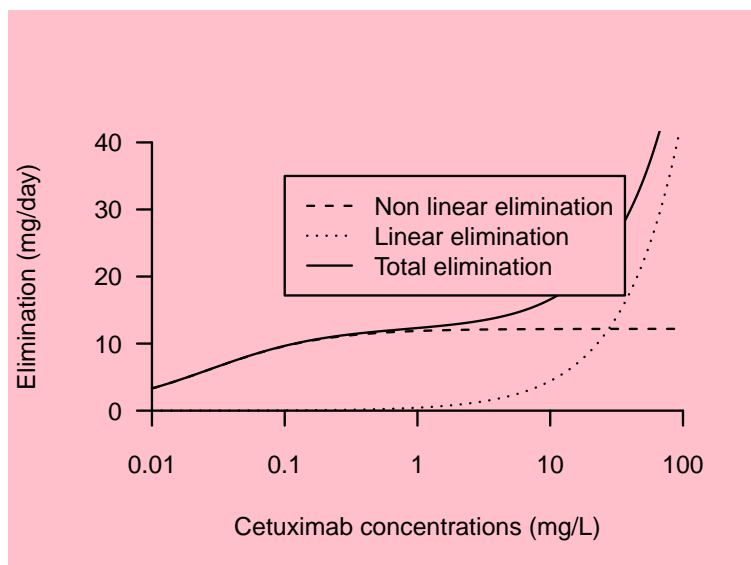


FIGURE 4.14 – Survie sans progression (PFS) selon la concentration résiduelle de cetuximab avant réinjection. A gauche, concentration résiduelle à J14 ($p = 0,014$); à droite, concentration résiduelle à J28 ($p = 0,025$) - En rouge, patients ayant une concentration résiduelle supérieure ou égale à la médiane; en bleu, patients ayant une concentration résiduelle inférieure à la médiane.

du manque d'effet du cetuximab chez les porteurs de tumeurs mutées *KRAS* par la chimiothérapie individualisée associée. Le statut *KRAS* a initialement été identifié comme influençant significativement la PFS, sur un nombre moins important de patients[?]. La première hypothèse optant pour un manque de puissance statistique est donc peu plausible. La seconde hypothèse est en revanche plus intéressante. Pour la confirmer, il sera nécessaire de quantifier l'effet des trois médicaments dans un même modèle. Cependant, pour des raisons éthiques, le cetuximab n'est maintenant plus administré aux patients porteurs de tumeurs *KRAS* mutées. Les données de l'étude FOLFIRICETUX sont donc parmi les dernières permettant de quantifier une éventuelle compensation de l'effet des médicaments entre eux. Il serait donc intéressant d'analyser l'influence des concentrations de 5-FU et d'irinotecan sur la relation concentration-effet du cetuximab.

Par ailleurs, le cetuximab a été arrêté relativement tôt chez les six patients *FCGR3A-V/V*, ce qui pourrait expliquer l'absence d'influence significative de ce génotype sur la PFS de nos patients.

Enfin, nous avons pu mettre en évidence à la fois une relation entre la clairance globale du cetuximab et la concentration sérique résiduelle à J14, et une relation entre cette

concentration et la PFS. Ce résultat pourrait permettre d'adapter individuellement la posologie de cetuximab rapidement après l'initiation du traitement si l'intérêt d'une telle procédure est confirmé de façon prospective.

4.3 Simulation des concentrations obtenues avec différentes posologies de cetuximab (manuscrit IV)

4.3.1 Contexte

Dans le cadre du traitement du cancer colorectal métastatique et du cancer ORL, le cetuximab est approuvé pour être administré avec une dose de charge de 400 mg/m² suivi de perfusions de 250mg/m² toute les semaines. Cette posologie a montré son efficacité, mais l'intervalle d'injection (τ) n'est pas adapté à celui d'une chimiothérapie concomitante. En effet, pour le cancer colorectal, les injections d'irinotecan ou de 5-fluorouracile (5-FU) sont espacées de deux semaines. Pour le confort du patient, l'injection d'une double dose de cetuximab (500mg/m²) toute les deux semaines est une posologie de plus en plus utilisée. Cependant, les études visant à justifier l'équivalence de cette posologie avec celle recommandée ne se basent que sur la comparaison des toxicités cutanées ou des réponses cliniques dans des petites cohortes[?],^{???}. Dans le traitement du cancer ORL, la chimiothérapie est administrée toute les trois semaines^{??}. Il est donc également envisagé d'ajuster l'intervalle d'injection du cetuximab à celui de la chimiothérapie dans cette pathologie.

La variabilité de la pharmacocinétique du cetuximab a été rapportée dans différentes études^{??} ainsi que dans les études des publications II et III. Une relation entre les concentrations résiduelles de cetuximab et la réponse objective a été décrite précédemment[?]. Cette étude montre que les patients en progression ont des concentrations résiduelles moyennes autour de 30 mg/L alors que les patients stables ou répondeurs ont des concentrations résiduelles moyennes autour de 60 mg/L[?]. Dans la publication III, nous avons également montré que la clairance globale du cetuximab ainsi que la concentration résiduelle à 14 jours, qui en est le reflet, étaient des facteurs reliés significativement avec la survie sans progression (PFS). Il est également reconnu que la pharmacocinétique du cetuximab est dose-dépendante, car elle fait intervenir une élimination saturable^{?????}.

4.3. SIMULATION DES CONCENTRATIONS OBTENUES AVEC DIFFÉRENTES POSOLOGIES DE CETUXIMAB (MANUSCRIT IV)

Cette dose-dépendance rend le choix de posologies équivalentes complexe et peut entraîner une sous-exposition des patients recevant du cetuximab toute les deux ou trois semaines si la posologie est fondée sur une pharmacocinétique considérée comme linéaire.

L'étude de l'équivalence entre différentes posologies de cetuximab doit comparer l'efficacité des traitements, mais doit tout d'abord être fondée sur une bonne description de l'exposition des patients. Nous avons utilisé les paramètres de population obtenus lors de l'analyse de la pharmacocinétique du cetuximab chez des patients traités pour cancer colorectal métastatique (publication III) pour simuler l'exposition de patients virtuels traités par cetuximab avec différentes posologie, faisant intervenir différentes doses injectées toutes les une, deux ou trois semaines.

4.3.2 Simulations

A l'aide d'une cohorte virtuelle de 1000 patients générés avec les valeurs des paramètres pharmacocinétiques du modèle de la publication III, nous avons simulé 3 essais cliniques, avec les trois posologies de cetuximab suivantes :

Posologie 1 : Dose de charge de 400 mg/m^2 suivie de 250 mg/m^2 toute les semaines (posologie approuvée).

Posologie 2 : Dose de 500 mg/m^2 de cetuximab toute les deux semaines (posologie déjà utilisée en clinique).

Posologie 3 : Dose de 750 mg/m^2 de cetuximab toute les trois semaines (correspondant à $3 \times 250 \text{ mg/m}^2$ toute les semaines)

4.3.3 Analyses

Les trois différents profils pharmacocinétiques obtenus avec les différentes posologies présentaient des différences importantes en termes de concentrations résiduelles (Figure ??). La posologie 3 entraînait les concentrations résiduelles de cetuximab les plus faibles, avec une médiane à 48 mg/L et plus de 5% des patients en deçà de 30 mg/L . Les quantiles des distributions des concentrations résiduelles sont présentés dans le tableau ?? suivant.

4.3. SIMULATION DES CONCENTRATIONS OBTENUES AVEC DIFFÉRENTES POSOLOGIES DE CETUXIMAB (MANUSCRIT IV)

TABLE 4.2 – Quantiles des distributions des concentrations résiduelles et des *AUC* cumulées de cetuximab à 84 jours en fonction de la posologie, pour 1000 patients virtuels

4.3.4 Conclusions

Nos résultats objectivent les conséquences potentielles de la non-linéarité du cetuximab sur ses concentrations sériques lors de l'espacement des injections. Bien que les différences observées en termes d'*AUC* ne soient pas cliniquement pertinentes, les différences en termes de concentrations résiduelles à l'équilibre sont importantes et leur pertinence doit être étudiée. De plus, l'espacement des injections associé à une augmentation proportionnelle de la dose des perfusions entraîne de grands écarts entre les concentrations avant et après injection (pic). Nos résultats donnent des outils pour une adaptation posologique raisonnée lors de l'augmentation des intervalles de perfusion. Nos résultats doivent bien entendu être confirmés par des études pharmacocinétiques prospectives.

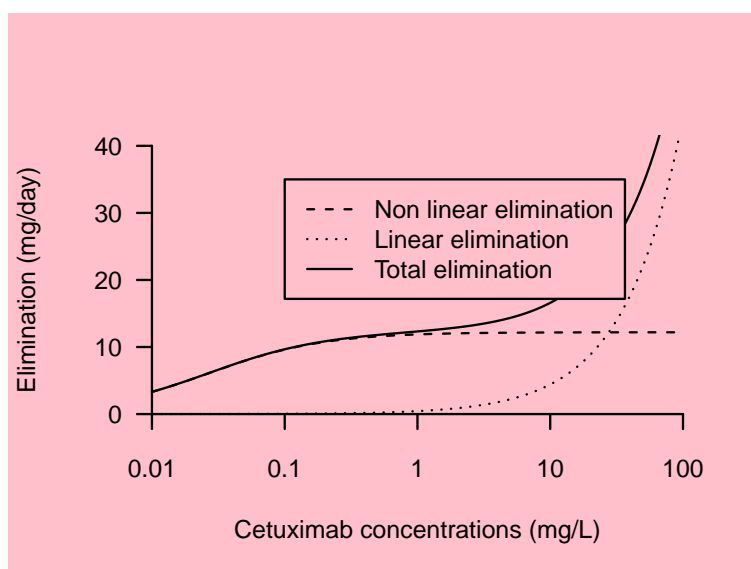


FIGURE 4.15 – Concentrations de cetuximab simulées avec trois différentes posologies ayant la même dose cumulée sur trois semaines. (Médiane et 90% **interval of the patients**) – En rouge, 400 mg/m² suivie de 250 mg/m² toute les semaines – En vert, 500 mg/m² toute les deux semaines – En bleu, 750 mg/m² toute les trois semaines.

4.4 Étude de l'absorption pulmonaire du cetuximab dans un modèle murin (publication V)

4.4.1 Contexte

Un des problèmes majeurs associé à l'utilisation du cetuximab est sa toxicité, notamment cutanée, qui limite parfois son emploi 139. Dans le cas du cancer broncho-pulmonaire, son administration par voie inhalée pourrait permettre d'augmenter sa concentration au niveau du site tumoral dans le poumon tout en diminuant sa toxicité systémique. En effet, la présence de FcRn dans le poumon a été montrée⁷ et les travaux de Maillot *et al.* ont démontré in vitro la possibilité de nébuliser le cetuximab tout en conservant ses propriétés de fixation à l'EGFR⁷. L'objectif de l'étude était d'analyser par modélisation pharmacocinétique la biodisponibilité du cetuximab administré par nébulisation chez la Souris. L'analyse de ce modèle préclinique était en effet indispensable dans le cadre du développement de cette potentielle nouvelle voie d'administration. Afin de décrire l'évolution des concentrations au cours du temps et d'analyser la biodisponibilité du cetuximab, une modélisation pharmacocinétique a été réalisée à la fois par approches non-compartimentale et compartimentale.

4.4.2 Modèle murin

Des cellules A431 issues de lignées cellulaires de carcinome épidermoïde cutané ont été obtenues auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection). Ces cellules surexpriment de manière constitutive l'EGFR et représentent les cellules de référence pour les études du cetuximab⁷. Dans cette étude, $2,5 \times 10^6$ cellules ont été instillées par voie endotrachéale chez 13 souris (femelles nude Balb/c de 5 semaines). Le dépôt des cellules marquées par du ^{99m}Tc a été suivi par scintigraphie. Six à sept semaines plus tard, les souris ayant développé une tumeur de taille supérieure à 1 mm ont reçu 60 à 80 μg de cetuximab-Xenofluor750 par voie IV (groupe IV, $n = 7$) ou par nébulisation dans l'arbre respiratoire (groupe nébulisation, $n = 6$). Des échantillonnages de sang de 100 à 200 μL , à H0, H2, H8, J1, J3, J7 et J14 ont permis de mesurer les concentrations sériques de cetuximab par méthode ELISA.

4.4. ÉTUDE DE L'ABSORPTION PULMONAIRE DU CETUXIMAB DANS UN MODÈLE MURIN (PUBLICATION V)

4.4.3 Modélisation de la pharmacocinétique

En ce qui concerne l'approche non-compartimentale, l'AUC de chaque souris a été estimée par la méthode des trapèzes (équations ?? et ??). Les moyennes étaient respectivement de 612 et 55,2 h \times μ g/L pour les souris du groupe IV et nébulisation. La fraction d'AUC extrapolée n'excédait pas 2,5% sauf pour une souris du groupe nébulisation (27,15%). La fraction biodisponible F (équation ??), estimée à partir des deux groupes parallèles de souris, était de 9%. Les moyennes (équations ?? et ??) étaient respectivement de 59185 et 6745,5 h² μ g/L pour les souris du groupe IV et nébulisation. Le temps de résidence moyen MRT (équation ??) était en moyenne de 95 h pour le groupe IV et de 111,5 h pour le groupe nébulisation. Le temps d'absorption moyen MAT était donc de 34 h.

L'approche compartimentale a d'abord été réalisée en séparant les groupes. Cependant, la vitesse d'absorption ne permettant pas de bien identifier les paramètres de distribution après nébulisation, les deux voies d'administration ont été analysées de façon conjointe. Le modèle utilisé était bicompartimental avec un compartiment d'absorption pour les souris du groupe nébulisation (équation 19). Les valeurs initiales des paramètres k_a et F ont été obtenues par les équations 23 et 5 grâce aux résultats de l'analyse non-compartimentale. Ce modèle a permis une description satisfaisante des concentrations. Les estimations des paramètres et leurs CV interindividuels étaient $V_1 = 5,73$ mL (6,3%), $CL = 0,12$ mL \cdot h⁻¹ (13%) $V_2 = 9,16$ mL (9,6%), $Q = 0,63$ mL \cdot h⁻¹ (16%) et pour le groupe nébulisation, $k_a = 0,04$ h⁻¹ (25%). Le poids des souris n'influait pas significativement les paramètres du modèle.

4.4.4 Conclusions

La comparaison des profils pharmacocinétiques après administration de cetuximab par nébulisation (Figure ??A) et IV (Figure ??B) chez la Souris a permis de décrire la phase d'absorption en quantifiant une constante d'absorption k_a et une fraction absorbée F . La bonne description de cette absorption par une constante d'ordre 1 suggère que le FcRn pulmonaire, qui est vraisemblablement le principal acteur du passage des IgG à travers la barrière alvéolo-capillaire[?], n'est pas saturé chez la Souris aux doses utilisées.

Dans le cas d'un cancer broncho-pulmonaire, l'effet recherché du cetuximab est loco-

4.4. ÉTUDE DE L'ABSORPTION PULMONAIRE DU CETUXIMAB DANS UN MODÈLE MURIN (PUBLICATION V)

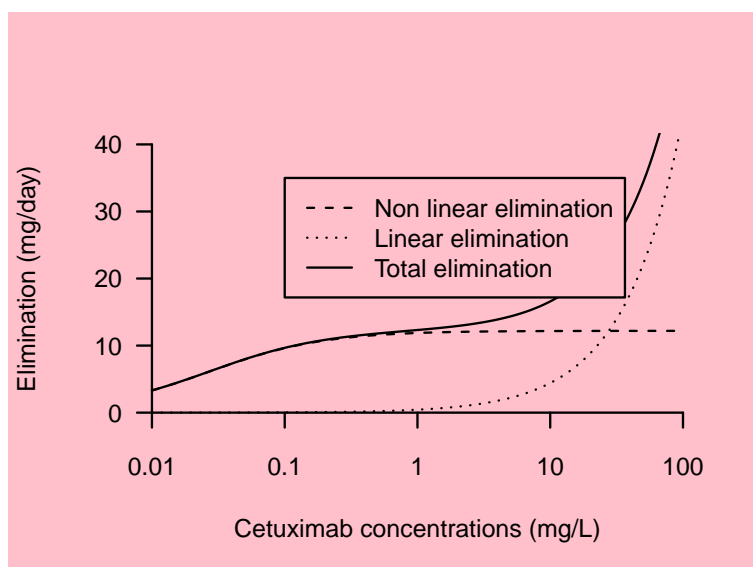


FIGURE 4.16 – Pharmacocinétique du cetuximab chez la Souris, administré par voie nébulisée (A) et par voie IV (B). Les points représentent les concentrations moyennes ainsi que les écart-types observées pour les souris de chaque groupe. Les traits représentent les concentrations prédites par le modèle final. A noter : l'échelle des concentrations est différente selon la voie d'administration.

régional. La faible fraction absorbée ($F = 9$ à 11%) et la persistance du cetuximab dans le poumon (MAT de 34 h et persistance du marquage pulmonaire par le Xenofluor) suggèrent une bonne exposition des tissus pathologiques après nébulisation. Dans le modèle murin utilisé, l'administration de cetuximab en aérosol a permis une régression significative de la masse tumorale (Publication V, Figure 5A).

5 Discussion

Le développement et la validation de la méthode de dosage de cetuximab par technique ELISA ont permis d'obtenir des mesures fiables des concentrations sériques de cetuximab. Un certain nombre de techniques de dosage du cetuximab dans le sérum sont mentionnées dans la littérature mais aucune n'est décrite de façon détaillée. Il ne nous est donc pas possible de comparer les performances de notre technique avec celles rapportées par d'autres équipes. L'utilisation d'une protéine recombinante produite dans le cadre d'une collaboration régionale implique que nos résultats devront, à terme, être comparés avec ceux obtenus par d'autres techniques ELISA. Les concentrations cibles données dans la publication IV sont donc à interpréter avec prudence si une autre technique est utilisée. Toutefois, ceci ne modifie pas la conclusion principale de ce travail, qui est que le suivi thérapeutique des concentrations sériques de cetuximab chez les patients traités pour cancer colorectal métastatique pourrait être utile.

De façon générale, l'erreur résiduelle d'un modèle pharmacocinétique de population décrivant des concentrations mesurées par une méthode ELISA est décrite de façon satisfaisante par un modèle mixte additif et proportionnel^{2,3}. La partie additive du modèle prend en compte le bruit de fond de la technique, tandis que la partie proportionnelle suit la portion linéaire croissante de la courbe de calibration. En deçà de la limite basse de quantification de la technique (LLOQ), il est recommandé de censurer la valeur de la concentration, pour permettre une meilleure estimation de l'élimination à concentration basse². Cette censure, bien que justifiée pour des raisons analytiques, peut poser problème lors du choix du modèle structural². Dans l'étude pharmacocinétique de la publication III, qui prenait en compte la censure des concentrations inférieures à la LLOQ, un problème d'identifiabilité entre la variabilité interindividuelle de k_0 et la partie additive du modèle d'erreur résiduelle a été rencontré : la variabilité de l'erreur résiduelle

additive était très proche de zéro et la variabilité de k_0 présentait un important "shrinkage" (variabilité interindividuelle estimée trop élevée). Le problème a été contourné en utilisant un modèle d'erreur résiduelle proportionnel (équation ??). La variabilité interindividuelle de k_0 correspondait donc également au « bruit de fond » de la technique analytique. Dans les études publiées, les modèles d'erreur utilisés pour décrire l'élimination des anti-EGFR étaient de type mixte additif et proportionnel²⁷. Cependant, les concentrations inférieures aux limites de quantification des techniques de dosage utilisées n'étaient pas censurées. Dans l'étude pharmacocinétique de la publication III, les concentrations basses étaient très informatives pour la quantification de l'élimination saturable. Supprimer les concentrations inférieures à la LLOQ n'est pas recommandé ; ceci serait une perte d'information². Le problème d'identifiabilité rencontré ici pourrait sans doute être résolu en adaptant le modèle d'erreur résiduelle au profil de la courbe de calibration de la technique de dosage. Dans ce modèle, les concentrations proches des limites basse et haute de quantification seraient prises en compte par une pondération moins importante que celle des concentrations issues de la partie linéaire de la courbe de calibration.

Les résultats de la modélisation individuelle du cetuximab réalisée chez un patient insuffisant rénal dialysé ont montré que la pharmacocinétique de cet anticorps était comparable à celle décrite chez des patients sans insuffisance rénale. La pharmacocinétique du cetuximab ne semble donc être influencée ni par un dysfonctionnement rénal ni par une dialyse chronique, bien que ces résultats doivent être confirmés sur un plus grand nombre de sujets. Les injections étaient trop rapprochées pour identifier une élimination saturable chez ce patient, bien que les concentrations observées entre le 49ème et le 56ème jour aient un profil comparable à celle des patients de la publication III.

La publication III confirme la non-linéarité de la pharmacocinétique du cetuximab décrite par Dirks *et al.*, bien qu'ils aient décrit l'ensemble de l'élimination comme étant de type Michaelis-Menten². Notre modèle semble plus mécanistique car il permet la description des deux types d'éliminations connues pour les anticorps thérapeutiques. Cette approche a déjà été appliquée par Ma *et al.* au panitumumab² et par Kuester *et al.* au matuzumab². Dans notre travail, l'élimination non saturable (CL) était reliée à l'albuminémie, ce qui pourrait correspondre à l'implication du FcRn dans ce mode d'élimination. En effet, un FcRn avec une moins bonne affinité pour la portion Fc des anti-

corps et pour l'albumine et/ou un FcRn présent en plus petite quantité va recycler une plus faible quantité d'anticorps et d'albumine. La clairance de ces deux protéines sera donc augmentée. Le paramètre k_0 étant relié à la surface corporelle (BSA) et à la toxicité cutanée, l'élimination saturable pourrait quant à elle décrire l'élimination spécifique du cetuximab, consécutive à sa fixation sur l'EGFR, présent en quantité importante sur les épithéliums. Une publication récente présente des résultats *in vitro* de mesure de la constante de dissociation $K_d = k_{off}/k_{on}$ de trois anticorps anti-EGFR (cetuximab, panitumumab et matuzumab)⁹. Cette étude rapporte des K_d très faibles pour les trois anticorps, ce qui justifie une simplification d'un modèle de type TMDD en un modèle intégrant une élimination de type Michaelis-Menten ou même une élimination d'ordre 0 (k_0) pour décrire l'élimination spécifique d'un anticorps anti-EGFR. Cependant, cette simplification ne permet pas de prendre en compte les variations de quantité de cible de l'anticorps au cours du temps. L'explication de ces variations est pourtant indispensable à une bonne description de l'élimination spécifique de l'anticorps et donc à la description de sa relation concentration-effet. Dans le cadre de cette thèse, toutes les tentatives de description de la pharmacocinétique du cetuximab (publication III) par des modèles plus complexes (approches TMDD notamment), prenant en compte une variation de la quantité de cible, étaient tous sur-paramétrés.

Compte tenu de cette non linéarité, une modification de la posologie telle qu'une augmentation de l'intervalle de temps entre les injections doit reposer sur une simulation pharmacocinétique. Nous avons utilisé le modèle pharmacocinétique décrit dans la publication III pour simuler les concentrations attendues avec différentes doses de perfusion pour des intervalles d'une, deux et trois semaines (manuscrit IV). Les résultats montrent que le doublement ou le triplement de la dose sont insuffisants pour maintenir des concentrations résiduelles comparables lorsque l'intervalle entre deux perfusions est doublé ou triplé. Bien que significativement différente en raison du grand nombre de patients simulés, la distribution des valeurs d'AUC pour les posologies ayant la même dose cumulée sur trois semaine mais des intervalles d'injection différents, ne montre pas de différences d'échelle aussi importante que les concentrations résiduelles. Néanmoins, ces résultats préliminaires justifient un suivi minutieux des concentrations de cetuximab dans les études testant un espacement des perfusions.

Pour réaliser une modélisation de type TMDD du cetuximab et de l'EGFR, il faut

drait disposer d'une estimation des quantités d'EGFR libres et/ou liées au cetuximab, mais également de la proportion d'EGFR présente sur les cellules cancéreuses, et sur les cellules saines (épithéliums et endothéliums entre autres). Cependant, la difficulté de quantification de l'EGFR *in vivo* et sa double localisation sur les tissus tumoraux et sains rendent cette modélisation difficile. Le critère RECIST est un indicateur efficace de la réponse d'un patient, mais c'est un critère composite qui présente une forte variabilité interindividuelle. La description de son évolution par approche PK-PD s'est révélée impossible. Une modélisation reposant sur un modèle de type TMDD aurait eu pour conséquences une sur-paramétrisation compte tenu des données disponibles. L'utilisation d'autres biomarqueurs tels que le CA19.9 ou l'ACE présentaient les mêmes types de limitations.

De plus, dans l'étude de la publication III, les doses de chimiothérapie associée étaient ajustées individuellement. Cette influence a été recherchée sans succès dans les essais de modélisation PK-PD du cetuximab et dans l'étude de la survie sans progression, par le biais de la dose cumulée ou du nombre d'injections. Cependant, il semble logique de penser que l'effet de cette chimiothérapie ne doit pas être séparé de la relation dose-concentration-effet du cetuximab dans le cancer colorectal. Il faudrait donc modéliser de façon conjointe la relation dose-concentration-effet du cetuximab, de l'irinotecan et du 5-FU pour quantifier l'influence de l'exposition à ces trois médicaments. Ce modèle entièrement paramétrique pourrait permettre de comparer par simulation l'intérêt de différentes posologies d'irinotecan, de 5-FU et de cetuximab, lors de leur association.

Les résultats de la publication III montrent que la survie sans progression (PFS) n'est pas influencée par l'élimination saturable ou l'élimination non-saturable du cetuximab, mais par la clairance globale estimée sur le temps avant progression, c'est-à-dire, la combinaison de CL et k_0 . Ce ne sont donc pas les phénomènes d'élimination mais l'exposition au cetuximab qui en résulte qui influence la PFS des patients traités.

Une bonne estimation de la clairance globale nécessite une étude de la pharmacocinétique pendant un temps assez long. Si cela est possible rétrospectivement à partir des données d'une étude clinique comme celle-ci, cela n'est pas réalisable couramment en clinique. Les travaux de la publication III montrent que la concentration résiduelle de cetuximab à J14 est un bon reflet de la clairance globale et est liée à la survie sans progression. Cette concentration résiduelle à J14 pourrait donc être utilisée en clinique

comme indicateur précoce de la clairance globale et donc de la survie sans progression. Après confirmation par une étude prospective, les patients ayant une concentration résiduelle trop basse pourraient alors bénéficier d'un ajustement précoce de dose pour optimiser leur réponse clinique.

Une relation entre la concentration résiduelle et la réponse a été rapportée pour un autre anticorps monoclonal antitumoral indiqué dans les tumeurs solides, le trastuzumab⁷. Notre approche pourrait donc s'appliquer à d'autres anticorps antitumoraux.

La modélisation de la pharmacocinétique du cetuximab administré par voie pulmonaire chez la Souris a permis la description de son absorption. Cette faible biodisponibilité (F proche de 10 %) est un élément positif car il montre une faible exposition systémique (donc un faible risque d'effets indésirables tels que les effets cutanés) et devrait correspondre à une forte exposition loco-régionale (pulmonaire). Cette accumulation du cetuximab dans le poumon est confirmée par les données d'imagerie obtenues avec le cetuximab marqué au Xenofluor. Ces résultats encourageants ont incité l'équipe INSERM U618 à lancer une nouvelle étude équivalente chez le Singe. Cette étude est actuellement en cours d'analyse.

Notre travail montre que, comme les autres anticorps thérapeutiques, le cetuximab a une grande variabilité pharmacocinétique interindividuelle. Ceci justifie la recherche des sources de cette variabilité pharmacocinétique et nécessite d'étudier l'impact de cette variabilité sur la réponse au traitement, c'est-à-dire la relation concentration-effet. Ces deux domaines d'étude reposent sur une description quantitative précise de la pharmacocinétique, ce qui est un défi compte tenu de la complexité des phénomènes impliqués dans le devenir des anticorps dans l'organisme. Nous avons pu appliquer avec succès un modèle bicompartimental avec ou sans absorption d'ordre 1 au modèle murin, un modèle bicompartimental "simple" au patient en insuffisance rénale traité par hémodialyse et un modèle avec élimination mixte (non saturable et saturée) aux patients traités pour cancer colorectal métastatique. Ce dernier modèle nous a permis d'identifier des facteurs de variabilité pharmacocinétique associés au traitement de cette pathologie. Il semble cependant nécessaire de développer des modèles plus complexes, faisant intervenir éventuellement la quantité d'antigène-cible et/ou l'influence des médicaments associés, pour identifier plus précisément l'ensemble des facteurs de variabilité pharmacocinétique. Le modèle obtenu pourrait permettre de mieux prédire la pharmacocinétique du cetuxi-

mab et ainsi d'argumenter de façon plus pertinente une optimisation individuelle de sa posologie. Un modèle pharmacocinétique mieux ajusté aux données pourrait également permettre d'améliorer l'étude de la relation concentration-réponse et donc de permettre, si un biomarqueur pertinent est disponible, d'étudier les sources individuelles de variabilité de sensibilité au traitement, tels que les polymorphismes des récepteurs Fc γ R.

Annexes

6 Une annexe

...

7 Une autre annexe

...

Liste des tableaux

LISTE DES TABLEAUX

Table des figures

Yuji Tanaka

Division of Exploratory Research, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan

Tomohiro Sawa and Yoshinori Nakata

Medical Information and System Research Center, Teikyo University School of Medicine, Tokyo, Japan

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Toshiteru Nobue (Maikai Solutions, Tokyo, Japan) for his technical support. Supported by Grant from Health and Labor Sciences Research Grants, the third-term comprehensive control for cancer (H18-012 to Dr Nakata) from the Ministry of Health Welfare and Labor of the Japanese Government, Tokyo, Japan.

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The author(s) indicated no potential conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: Hiroto Narimatsu, Masahiro Kami, Tomohiro Sawa, Yoshinori Nakata

Collection and assembly of data: Hiroto Narimatsu, Tomoko Matsumura, Tomohiro Morita, Yukiko Kishi, Koichiro Yuji, Tsunehiko Komatsu, Yuji Tanaka

Data analysis and interpretation: Hiroto Narimatsu, Masahiro Kami, Tomohiro Sawa, Yoshinori Nakata

Manuscript writing: Hiroto Narimatsu, Masahiro Kami, Yoshinori Nakata

Final approval of manuscript: Hiroto Narimatsu, Tomoko Matsumura, Tomohiro Morita, Yukiko Kishi, Koichiro Yuji, Masahiro Kami, Tsunehiko Komatsu, Yuji Tanaka, Tomohiro Sawa, Yoshinori Nakata

REFERENCES

1. Newnham GM, Burns WI, Snyder RD, et al: Information from the Internet: Attitudes of Australian oncology patients. *Intern Med J* 36:718-723, 2006
2. Overture. <http://inventory.jp.overture.com/d/searchinventory/suggestion/>
3. Yahoo! Japan. Homepage. <http://www.yahoo.co.jp/>
4. Nikkei BP Consulting Inc: Access analysis. <http://consult.nikkeibp.co.jp/consult/bizmark/feature.html>
5. Alper BS: Usefulness of online medical information. *Am Fam Physician* 74:482-485, 2006
6. Berland GK, Elliott MN, Morales LS, et al: Health information on the internet: Accessibility, quality, and readability in English and Spanish. *JAMA* 285:2612-2621, 2001
7. D'Alessandro DM, Kingsley P, Johnson-West J: The readability of pediatric patient education materials on the World Wide Web. *Arch Pediatr Adolesc Med* 155:807-812, 2001
8. Morita T, Narimatsu H, Matsumura T, et al: A study of cancer information for cancer patients on the internet. *Int J Clin Oncol* 12:440-447, 2007
9. MSN Japan: Homepage. <http://jp.msn.com/>
10. Google Japan: Homepage. <http://www.google.co.jp/>

DOI: 10.1200/JCO.2008.18.7468

Cetuximab Pharmacokinetics in End-Stage Kidney Disease Under Hemodialysis

TO THE EDITOR: Cetuximab, an anti-epidermal growth factor receptor chimeric mouse/human immunoglobulin 1 monoclonal antibody against the epidermal growth factor (Merck, Darmstadt, Germany), has been approved as a treatment for advanced head and neck cancer in combination with radiation therapy.^{1,2} However, there is very little data on cetuximab in patients undergoing chronic dialysis.³ The treatment of cancer in patients with impaired renal function is an emerging problem because the population is getting older and the rate of chronic dialysis increases by 5% yearly in Western countries. We report a pharmacokinetic study of cetuximab in a patient with renal insufficiency requiring hemodialysis. Cetuximab was instituted at a dose of 250 mg/kg weekly for a 55-year-old patient with head and neck cancer.

We characterized the pharmacokinetics and efficacy of cetuximab at conventional efficacious dose levels in combination with radiation therapy in a hemodialyzed patient with head and neck cancer. The aim of the study was to determine whether conventional doses of cetuximab in combination with radiotherapy were appropriate for hemodialyzed patients.

Cetuximab serum concentration was measured by a validated enzyme-linked immunosorbent assay. The enzyme-linked immunosorbent assay method used a recombinant human epidermal growth factor receptor (extracellular domain) adsorbed onto microtiter plates to capture cetuximab in serum. The captured cetuximab was detected using a peroxidase-conjugated goat antihuman F(ab')₂ specific for Fc

fragment (horseradish peroxidase anti-human immunoglobulin G). Lower limit of quantitation and upper limit of quantitation were 0.75 and 15 µg/mL, respectively. The limit of detection was 0.012 µg/mL. Concentrations higher than the upper limit of quantification were diluted 1:10 or 1:100, deviation and variability of this procedure being lower than 4.5%. Serum samples were used to estimate cetuximab pharmacokinetics, assuming no time-dependence, with WINNonlin (Scientific Consultant, Apex, NC; Pharsight Corporation). One- and two-compartment models with first order distribution and elimination constants were tested. The best model was selected using the usual methods, which included the analysis of plots of observed versus predicted concentrations and the Akaike information criteria. The model that best fitted the observed data was a two-compartment model with first-order elimination from the central compartment (Fig 1). Clearance from central compartment was 0.025 L/h, central compartment volume was 3.8 L, and terminal elimination half-life was 11.9 days (Table 1).

Although analyses of cetuximab pharmacokinetics were previously reported, the results obtained in our patient cannot be readily compared with these publications. Tan et al⁴ did not use a formal compartment model. In the studies of Baselga et al⁵ and Delbaldo et al,⁶ cetuximab pharmacokinetics were described by a one-compartment model. However, a two-compartment model has previously been shown to be the best to describe the pharmacokinetics of immunoglobulin 1 monoclonal antibodies, including trastuzumab,⁷ inotumomab,⁸ rituximab,⁹ basiliximab,¹⁰ clenoliximab,¹¹ alemtuzumab,¹² and adalimumab.¹³ Dirks et al¹⁴ used a two-compartment model but with a Michaelis-Menten type of elimination. This last approach necessitates a large number of patients and the study of different dose regimens, and could not be applied to our patient.

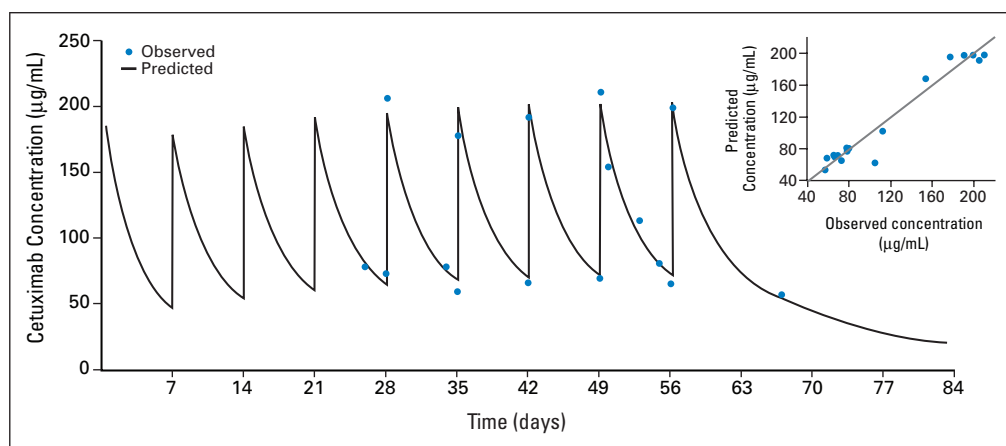


Fig 1. Observed (blue dots) and predicted (continuous lines) cetuximab concentrations over time. The correlation between predicted and observed concentrations are presented in the insert.

The longer half-life estimated in our patient, as compared with the studies of Baselga et al⁵ and Delbaldo et al,⁶ may be explained by their use of a one-compartment model, which is known to underestimate the elimination half-life when a two-compartment model is needed. The concentrations measured in our patient were clinically effective, because tumor response was more than 70%. In contrast, his concentrations did not lead to a significant dose-dependent toxicity because only xeroderma and grade 1 acneiform rash were observed. Clinical response to cetuximab was previously reported to increase with the degree of cutaneous toxicity and a relationship was found between cetuximab trough concentrations and clinical response.¹⁵

Although, as indicated earlier, our results cannot be directly compared with the literature, the pharmacokinetic parameters estimated in our hemodialyzed patient are similar to those reported for other monoclonal antibodies in patients with normal kidney function. A lack of influence of hemodialysis was described for other monoclonal antibodies, such as bevacizumab.¹⁶ Inauen et al³ observed no effect of hemodialysis on cetuximab concentrations but the small number of blood samples did not allow them to estimate cetuximab pharmacokinetic parameters. These preliminary data indicate that treating dialyzed patients with monoclonal antibodies as a cancer therapy may be done safely. Further prospective studies are warranted to elucidate the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies in patients with end-stage kidney disease. This report suggests that previously used pharmacokinetics models may not be appropriate.

Another important implication for the practicing oncologist is that hemodialyzed patients, who now have prolonged survival, should not be denied optimal treatment with monoclonal antibodies on the sole basis on their renal replacement. Translational research is needed to elucidate the pharmacokinetics and pharmacodynamics at the level of the normal and damaged kidney.

Juliette Thariat

Centre Lacassagne, Centre National de la Recherche Scientifique-UMR6543, Nice, France

Nicolas Azzopardi

Centre Hospitalier Régional Universitaire, Centre National de la Recherche Scientifique-UMR6239, Tours, France

Frederic Peyrade

Centre Lacassagne, Centre National de la Recherche Scientifique-UMR6543, Nice, France

Vincent Launay-Vacher

Centre Hospitalier Régional Universitaire, Pitié Salpêtrière, Paris, France

José Santini

Centre Hospitalier Universitaire de Pasteur, Nice, France

Thierry Lecomte

Centre Hospitalier Régional Universitaire, Centre National de la Recherche Scientifique-UMR6239, Tours, France

Marie-Christine Etienne-Grimaldi

Centre Lacassagne, Centre National de la Recherche Scientifique-UMR6543, Nice, France

Gilles Paintaud

Centre Hospitalier Régional Universitaire, Centre National de la Recherche Scientifique-UMR6239, Tours, France

Gerard Milano

Centre Lacassagne, Centre National de la Recherche Scientifique-UMR6543, Nice, France

ACKNOWLEDGMENT

We thank Sophie Dubbiosi, Merck, France, for independent logistic support.

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The author(s) indicated no potential conflicts of interest.

Table 1. Estimated Pharmacokinetic Parameters

Parameter	Abbreviation	Estimated Value
Volume of central compartment, L	V1	3.8
Clearance from the central compartment, L/hour	CL	0.025
Volume of peripheral compartment, L	V2	3.77
Intercompartment clearance, L/hour	CLD2	0.022
Distribution half-life, days	$T_{1/2\alpha}$	1.84
Elimination half-life, days	$T_{1/2\beta}$	11.90
Mean residence time, days	MRT	12.62
Volume of distribution at steady state, L	Vss	7.56

REFERENCES

1. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al: Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354:567-578, 2006
2. Thariat J, Milas L, Ang KK: Integrating radiotherapy with epidermal growth factor receptor antagonists and other molecular therapeutics for the treatment of head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 69:974-984, 2007
3. Inauen R, Cathomas R, Boehm T, et al: Feasibility of using cetuximab and bevacizumab in a patient with colorectal cancer and terminal renal failure. *Oncology* 72:209-210, 2007
4. Tan AR, Moore DF, Hidalgo M, et al: Pharmacokinetics of cetuximab after administration of escalating single dosing and weekly fixed dosing in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 12:6517-6522, 2006
5. Baselga J, Pfister D, Cooper MR, et al: Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J Clin Oncol* 18:904-914, 2000
6. Delbaldo C, Pierga JY, Dieras V, et al: Pharmacokinetic profile of cetuximab (Erbix) alone and in combination with irinotecan in patients with advanced EGFR-positive adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 41:1739-1745, 2005
7. Bruno R, Washington CB, Lu JF, et al: Population pharmacokinetics of trastuzumab in patients with HER2+ metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 56:361-369, 2005
8. Dartois C, Freyer G, Michallet M, et al: Exposure-effect population model of inolimomab, a monoclonal antibody administered in first-line treatment for acute graft-versus-host disease. *Clin Pharmacokinet* 46:417-432, 2007
9. Regazzi MB, Iacona I, Avanzini MA, et al: Pharmacokinetic behavior of rituximab: A study of different schedules of administration for heterogeneous clinical settings. *Ther Drug Monit* 27:785-792, 2005
10. Kovarik JM, Nashan B, Neuhaus P, et al: A population pharmacokinetic screen to identify demographic-clinical covariates of basiliximab in liver transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 69:201-209, 2001
11. Mould DR, Davis CB, Minthorn EA, et al: A population pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of single doses of clenoliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacol Ther* 66:246-257, 1999
12. Mould DR, Baumann A, Kuhlmann J, et al: Population pharmacokinetics-pharmacodynamics of alemtuzumab (Campath) in patients with chronic lymphocytic leukaemia and its link to treatment response. *Br J Clin Pharmacol* 64:278-291, 2007
13. Weisman MH, Moreland LW, Furst DE, et al: Efficacy, pharmacokinetic, and safety assessment of adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor- α monoclonal antibody, in adults with rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate: A pilot study. *Clin Ther* 25:1700-1721, 2003
14. Dirks NL, Nolting A, Kovar A, et al: Population pharmacokinetics of cetuximab in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pharmacol* 48:267-278, 2008
15. Fracasso PM, Burris III H, Arquette MA, et al: A phase 1 escalating single-dose and weekly fixed-dose study of cetuximab: Pharmacokinetic and pharmacodynamic rationale for dosing. *Clin Cancer Res* 13:986-993, 2007
16. Garnier-Viougat N, Rixe O, Paintaud G, et al: Pharmacokinetics of bevacizumab in haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 22:975, 2007

DOI: 10.1200/JCO.2008.18.7674

Pharmacologic Intervention for Cancer-Related Dyspnea

TO THE EDITOR: We have read with great interest the work carried out by Ben-Aharon et al¹, who conducted a systematic review of randomized controlled trials assessing all pharmacologic and non-pharmacologic intervention for dyspnea palliation in patients with cancer. We would like to make some comments.

It is surprising that in the search terms for PubMed, chlorpromazine was not included (decreases breathlessness without affecting ventilation or producing sedation in healthy subjects).² In an open-labeled trial, McIver et al³ found chlorpromazine effective for relief of dyspnea in advanced cancer.

The authors do not explain, within the study population, if those patients with cancer and other comorbidity (mainly chronic obstructive pulmonary disease) are excluded. We believe that this information is important, because if there is comorbidity, we can not discern if the cause of breathlessness was cancer or chronic obstructive pulmonary disease. In the longitudinal study conducted by our group,⁴ there were two or more causes to explain the etiology of dyspnea at the end of life (both the equal importance).

As the authors note, the single trial that assessed the role of midazolam as adjunct therapy⁵ to morphine, demonstrated that the beneficial effects of morphine in controlling baseline levels of dyspnea could be improved by the addition of midazolam, without increased somnolence. However, no other benzodiazepines were assessed in randomized controlled trials. Moreover, there are studies in non-oncological terminal respiratory illness, which suggest the possibility of an improvement in terminal breathlessness treated with other benzodiazepines.⁶

We think it is important to emphasize in the final discussion, one aspect that is essential for clinicians, and reflecting a common practice

in our midst: our terminally ill patients with cancer who are already receiving regular doses of opioids have almost equal benefit from a supplemental equivalent of 25% to 50% of their 4-hourly oral or suncutaneous regular opioid dose, to improve their breathlessness.⁷

At present, our group is conducting a phase II randomized controlled trial to determine the effectiveness of oral transmucosal fentanyl citrate for the exertion dyspnea treatment in seriously ill patients with cancer and to contribute to drug security data in that population.

Miguel Ángel Cuervo Pinna, Rafael Mota Vargas, María José Redondo Moralo, and Miguel Ángel Sánchez Correás

Regional Palliative Care Program of Extremadura, Palliative Care Team of Badajoz, Spain

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The author(s) indicated no potential conflicts of interest.

REFERENCES

1. Ben-Aharon I, Gafer-Gvili A, Paul M, et al: Interventions for alleviating cancer-related dyspnea: A systematic review. *J Clin Oncol* 26:2396-2404, 2008
2. O'Neil PA, Morton PB, Stara RD: Chlorpromazine: A specific effect on breathlessness? *Br J Clin Pharmacol* 19:793-797, 1985
3. McIver B, Walsh D, Nelson K: The use of chlorpromazine for symptom control in dying cancer patients. *J Pain Symptom Manage* 9:341-345, 1994
4. Cuervo Pinna MA, Mota Vargas R, Redondo Moralo MJ, et al: Etiology factors of the dyspnea at the end of life. *Med Pal* 15:143-148, 2008
5. Navigante AH, Cerchietti LC, Castro MA, et al: Midazolam as adjunct therapy to morphine in the alleviation of severe dyspnea perception in patients with advanced cancer. *J Pain Symptom Manage* 31:38-47, 2006
6. Man GC, Hsu K, Sproule BJ: Effects of alprazolam on exercise and dyspnea in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chest* 90:832-836, 1986
7. Allard P, Lamontagne C, Bernard P, et al: How effective are supplementary doses of opioids for dyspnea in terminally ill cancer patients? A randomized continuous sequential clinical trial. *J Pain Symptom Manage* 17:256-265, 1999

DOI: 10.1200/JCO.2008.18.3566

An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Therapeutic Drug Monitoring of Cetuximab

Nicolas Cézé, MD,*†‡ David Ternant, PharmD, PhD,*†§¶ Friedrich Piller, PhD,||
 Danielle Degenne, PharmD,†**¶ Nicolas Azzopardi,*† Etienne Dorval, MD, PhD,‡
 Hervé Watier, MD, PhD,*†**¶ Thierry Lecomte, MD, PhD,*†‡ and Gilles Paintaud, MD, PhD*†§¶

Abstract: Cetuximab is an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody used in the treatment of colorectal and head and neck cancers. Part of the interindividual differences in response may be explained by interindividual variability in pharmacokinetics. An assay measuring cetuximab serum concentrations is therefore needed. An enzyme-linked immunosorbent assay was developed using microtiter plates sensitized with a recombinant human epidermal growth factor receptor extracellular domain. Lower and upper limits of quantitation and limit of detection were determined. Eight standard calibrators (SCs) and 3 quality controls (QCs), that is, 0.75, 7.5, and 15 mg/L, were tested on 5 occasions on 1 day and on 5 occasions on different days. Trough and peak serum concentrations of cetuximab were measured in 15 patients with metastatic colorectal cancer and 1 patient with undetermined neoplasia undergoing cetuximab-based chemotherapy. Cetuximab concentrations were described using a 2-compartment population pharmacokinetic model. Imprecision and accuracy of SC and QC were $\leq 20\%$, except for the 0 and 0.1 mg/L SC concentrations ($\leq 20\%$). The limit of detection was 0.012 mg/L. Lower and upper limits of quantitation were 0.75 and 15 mg/L, respectively. A total number of 198 blood samples were available from the 16 patients. Median (range) trough and peak concentrations during the treatment were 49.6 (5.8–105.4) and 177.2 (97.5–235) mg/L, respectively. This method is rapid, accurate, and reproducible and may be useful for pharmacokinetic and pharmacokinetic-pharmacodynamic studies, as well as in therapeutic drug monitoring of cetuximab.

Key Words: cetuximab, enzyme-linked immunosorbent assay, pharmacokinetics

(*Ther Drug Monit* 2009;31:597–601)

INTRODUCTION

Cetuximab is a 170 kDa human-mouse chimeric immunoglobulin (Ig) G1 κ monoclonal antibody (mAb), selectively directed against the extracellular domain III of the epidermal

growth factor receptor (EGFR), also known as HER1 or ErbB1.¹ EGFR is a tyrosine kinase receptor triggering a complex intracellular signaling network, including the mitogen-activated protein kinases, phosphatidylinositol-3 kinase, and the signal transducer and activator of transcription pathways.² EGFR is constitutively expressed in many epithelial tissues and is overexpressed in many malignancies such as colorectal, head and neck, and lung cancers. The consequences of EGFR overexpression in tumor cells are increased cellular proliferation, angiogenesis, metastatic capacity,² and poorer prognosis. Cetuximab binds to EGFR with high affinity and antagonizes endogenous ligands; it is therefore a potent inhibitor of EGFR-mediated signaling pathways in tumor cells. This mAb inhibits tumor growth efficiently and has a synergistic antitumor activity with conventional anticancer drugs³ or radiation therapy.⁴ A major cetuximab side effect is a cutaneous acneiform-like rash, due to high EGFR expression in the epidermis.

Since its approval by Food and Drug Administration for cancer treatment in 2004, cetuximab (Erbix) became widely used in the treatment of colorectal and head and neck cancers. However, cetuximab pharmacokinetics and concentration-effect relationship remain poorly understood. Phase I and II studies^{5–9} reported cetuximab trough and peak concentrations of 0–108 mg/L⁵ and 130–298 mg/L,^{5,6} respectively. Elimination half-life was estimated to be between 40⁷ and 168 hours.^{8,9} Initial studies reported relationships both between cetuximab cutaneous toxicity and therapeutic effect and between cetuximab concentrations and cutaneous toxicity.^{3,10} More recently, Fracasso et al¹¹ reported an influence of cetuximab concentrations on both skin toxicity and treatment efficacy. These data provide indirect evidence for the potential interest of therapeutic drug monitoring of cetuximab, based on the measurement of its serum concentrations in treated patients. Additional studies are nevertheless required to improve our knowledge of concentration-effect relationship. Most cetuximab pharmacokinetic studies are based on enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) but neither the techniques used nor their validation criteria and results were described.

We report here the development and validation of an ELISA measuring serum cetuximab concentrations in treated patients.

PATIENTS, MATERIALS, AND METHODS

Reagents

Microtiter Nunc Maxisorp 96-well plates were purchased from Fischer Scientific Labosi (Elancourt, France).

Received for publication January 23, 2009; accepted June 17, 2009.

From the *GICC, Université François Rabelais Tours, Tours, France; †CNRS, UMR 6239; Departments of ‡Hepato-Gastroenterology; §Pharmacology-Toxicology; ¶Pilot centre for Therapeutic Antibodies Monitoring (PiTAM), CHRU de Tours, Tours, France; ||Centre de Biophysique Moléculaire UPR 4301, Orleans, France; and **Department of Immunology, CHRU de Tours, Tours, France.

Supported by the Cancéropôle Grand Ouest.

Correspondence: David Ternant, PharmD, PhD, Department of Pharmacology-Toxicology, Tours University Hospital, 2 Boulevard Tonnellé, F-37044 TOURS Cedex 9, France (e-mail: david.ternant@free.fr).

Copyright © 2009 by Lippincott Williams & Wilkins

Bovine serum albumin (BSA), Tween 20, anti-human IgG Fc peroxidase-conjugated goat F(ab')₂, and FAST orthophenylenediamine dihydrochloride tablet sets (peroxidase substrate) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Phosphate-buffered saline (PBS) was purchased from BMD (Marne la Vallée, France). Pooled human serum was purchased from the local blood transfusion center (EFS Centre-Atlantique, Tours, France). The capture antigen used was a 100 kDa recombinant form of the extracellular region of human EGFR (EGFR-ECD 404GS mutant)¹² produced in the human cell line HEK293 and purified from the culture medium by Tag affinity chromatography. Cetuximab (buffered saline 2 mg/mL solutions) was obtained from the manufacturer (Merck Lipha Santé, Lyon, France).

Reagent Preparation

Stock solutions of 2 mg/mL cetuximab were stored at +4°C. Calibrator solutions and quality controls (QCs) were prepared in pooled normal human serum and stored at -20°C until use. Concentrations of the standard calibrators (SCs) were 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 20, and 30 mg/L. The QC concentrations for assay validation were 0.75, 7.5, and 15 mg/L. Samples, SC, and QC were extemporaneously diluted 1:100 in PBS containing 1% BSA (PBS-BSA).

Assay Procedure

Microtiter 96-well plates were sensitized by incubating 100 µL of a 1.25 mg/L solution of EGFR-ECD 404GS in coating buffer (1 N carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6) overnight at +4°C. The plates were then washed 4 times with PBS containing 0.05% Tween 20. The remaining protein-binding sites were blocked by 2 hours incubation at ambient temperature with 200 µL blocking buffer (PBS-BSA). Plates were washed another time like above and 100 µL of 1:100 diluted standards, QC, or unknown samples were added in the different wells of the plate. After incubation of the plates for 1 hour at ambient temperature and another washing round, 100 µL of a solution of the goat anti-human IgG peroxidase-conjugated F(ab')₂ was added to each well. After 1 hour at room temperature followed by washings, 100 µL of orthophenylenediamine dihydrochloride substrate was added to each well and the color reaction was stopped by adding 50 µL of 4 N sulfuric acid per well. Reading was performed at 2 wavelengths (492 and 620 nm), using an iEMS ELISA plate reader (Labsystems). Indeed, the absorbance at 492 nm wavelength corresponds to the background signal related notably to the plates and was subtracted from the absorbance at 620 nm. Nonspecific background optical density was determined by performing the assay using well coated with carbonate buffer alone and subtracted from absorbance test for each determination. SCs, QC, and unknown samples were run in duplicates, and the mean was calculated. Results were rejected if the difference between the 2 duplicates was > 20%. Cetuximab serum concentrations were extrapolated from the standard curve, obtained from the standards using a 4-parameter logistic curve-fitting program (Genesis; Labsystems).

Prestudy Validation

Each SC was tested on 5 occasions on the same day (intraday) and on 5 occasions on separate days (interday).

Intraday and interday precisions were determined as coefficients of variation (CV%). Intraday and interday accuracies were determined as bias (%) from actual concentrations. The limit of detection (LOD) was calculated using 28 cetuximab-free sera (obtained from patients who had never received cetuximab) and was defined as the observed mean concentration plus 2 SDs. SCs and QC performances were determined by the lowest and highest SC for which the intra- and interday precision and bias are both ≤20% and the sum of the 2 is ≤30%. Lower and upper limits of quantitation (LLOQ, respectively) were determined by the low and high QC values.

Specificity was studied by analyzing 5 serum samples containing rheumatoid factor and 5 serum samples containing high IgG levels. Interactions with other mAbs were tested by assaying serum samples spiked with high concentrations (150–250 mg/L) of bevacizumab (3 samples), infliximab (2 samples) and rituximab (2 samples).

To detect matrix effects, calibration curve was prepared in PBS-BSA, and each QC control was prepared both in PBS-BSA and in human serum. These samples were tested 5 times. Measured concentrations were compared in terms of precision and bias.

Because serum samples could be kept at room temperature within 1 day, at +4°C within 2 weeks, and kept several months at -20°C, stability was assessed by repeatedly assaying at days 0, 1, 3, 7, 10, 14, and 17 the 7.5 mg/L QC kept at room temperature and +4°C, and after 1, 2, 3, and 4 freeze-thaw cycles. In stock solutions, the IgG concentration is regularly verified by nephelometry.

Because peak cetuximab concentrations are expected to be outside of the quantification limits, we also tested the reproducibility of the dilution. This was done by performing straight 1:10 and 1:100 dilutions of 50, 200, and 300 mg/L cetuximab-spiked serum samples, respectively, with normal human serum. These diluted samples were assayed 5 times on the same plate and on the same day.

Detection of Monovalently Bound Cetuximab

Cetuximab is a bivalent molecule and is able to bind 2 molecules of EGFR. Because shedding of EGFR in serum (sEGFR) can be detected in healthy subjects and patients with colorectal cancer,¹³ 3 different cetuximab species may be present in the serum during cetuximab treatment: free cetuximab and cetuximab bound to either 1 or 2 sEGFR molecules. Among these species, only free cetuximab and cetuximab monovalently bound to a molecule of sEGFR are biologically active. We therefore tested our ELISA by assaying serum samples containing different cetuximab to EGFR-ECD 404GS molar ratios. Cetuximab 5.10⁻⁸ mol/L (8.45 mg/L) was mixed with increasing EGFR-ECD 404GS concentrations in the following cetuximab to EGFR-ECD 404GS ratios: 1:0, 1:0.5, 1:1, and 1:2 and incubated for 1 hour at room temperature. Each ratio was assayed on 5 occasions on the same day.

Patients and Pharmacokinetic Analysis

Patients and Blood Samples

As part of routine monitoring of patients treated for colorectal cancer, blood samples were collected to measure cetuximab serum concentrations. Sixteen patients were treated

by chemotherapy including weekly infusions of cetuximab, in which 15 were patients with metastatic colorectal cancer and 1 was an undetermined patient with neoplasia. The first infusion (400 mg/m²) was administered over 2 hours and the following ones (250 mg/m²) were administered over 1 hour. All the patients were treated with irinotecan (180 mg/m² every 2 weeks). Trough samples were collected just before the infusion, and peak samples were collected 2 hours (T2h) after the end of the infusion to estimate individual pharmacokinetic parameters, which were compared with the literature.^{6,8,9,11} Individual results were sent to the prescriber within the framework of a routine therapeutic drug monitoring service and were discussed during clinical interdisciplinary rounds. The samples were not drawn specifically for this study, which was done retrospectively.

Pharmacokinetic Modeling

Cetuximab serum concentrations were used to estimate its pharmacokinetic parameters by a population approach (WinNonMix 2.0.1; Pharsight Corporation). One- and 2-compartment models, with first-order distribution and elimination constants and with nonlinear Michaelis–Menten elimination, were tested. The interindividual (η) and residual (ϵ) variabilities of the pharmacokinetic parameters were described using an exponential and an additive model, respectively. Estimation of typical values of pharmacokinetic parameters and of random parameters used the conditional first-order estimation (FOCE) method.¹³

RESULTS

ELISA Assay Parameters

Calibration Curve and Limit of Detection

Four standard curves obtained on separate occasions are shown on Figure 1. Mean (SD) concentration obtained for blank sera was 0.003 (0.0043) mg/L. The LOD of our assay was therefore 0.012 mg/L. Among the 28 blank sera assayed, 5 had nonspecific absorbances exceeding the LOD

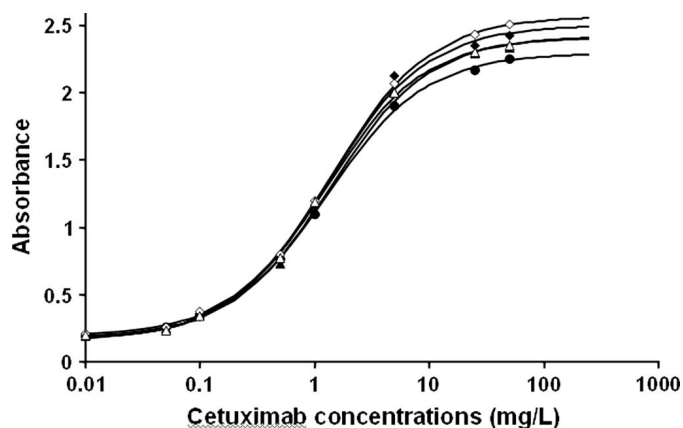


FIGURE 1. Four calibration curves of the ELISA. Absorbance reading is performed at 492 and 620 nm. Absorbance at 492 nm was subtracted to that at 620 nm. Resulting absorbance is plotted against cetuximab serum concentrations.

(corresponding to cetuximab concentrations between 0.02 and 0.095 mg/L).

Imprecision and Accuracy of the Assay

For the intrarun and interrune reproducibility, imprecision and accuracy of all SC and QC were $\leq 20\%$, except for 0 and 0.1 mg/L (Table 1). Because both imprecision and bias for low and high QCs were $\leq 15\%$ (Table 1), LLOQ and upper limit of quantitation were 0.75 and 75 mg/L, respectively.

Matrix Effect

For low, medium, and high QC prepared in PBS-BSA, the mean (CV, bias) was 0.72 (2.0%, -3.4%), 8.1 (14.1%, $+8.7\%$), and 16.6 mg/L (10.2%, $+10.4\%$), respectively. For 1 QC prepared in human serum, these values were 0.71 (7.6%, -5.7%), 6.3 (10.0%, -15.9%), and 12.7 mg/L (14.4%, -15.4%). For medium QC, concentrations in PBS-BSA were significantly lower than those in human serum (Mann–Whitney test, $P = 0.02$).

Specificity and Interferences

Among the 5 rheumatoid factor-containing sera obtained from patients untreated with cetuximab, none had

TABLE 1. Results of QC Analysis

Spiked Concentration	Average Measured Concentration	Imprecision (CV%)	Inaccuracy (bias, %)	Absolute Bias + CV
Intrabatch				
0	0.005	21.1	—	—
0.1	0.09	4.1	-14.6	18.7
0.25	0.21	4.4	-14.2	18.6
0.5	0.52	2.7	3.4	6.1
1	1.0	1.1	4.7	5.9
5	5.3	1.9	5.7	7.6
10	8.8	3.0	-11.8	14.8
20	22.8	9.9	13.8	23.6
30	28.9	6.8	-3.8	10.6
0.75	0.79	4.0	5.3	9.3
7.5	7.0	8.9	-6.5	15.4
15	14.3	5.1	-4.8	9.8
Interbatch				
0	0.007	26.3	—	—
0.1	0.08	8.9	-22.8	31.7
0.25	0.24	8.9	-5.2	14.1
0.5	0.55	5.8	10.8	16.6
1	1.0	6.5	1.0	7.6
5	4.7	4.9	-6.2	11.1
10	10.5	5.3	5.2	10.5
20	22.3	4.5	11.6	16.1
30	26.8	5.7	-10.5	16.2
0.75	0.73	7.9	-2.6	10.5
7.5	7.4	14.1	-1.4	15.5
15	14.2	8.5	-5.1	13.6

Each SC and QC sample was tested on 5 occasions on the same day (intrarun) and on 5 occasions on 5 separate days (interrun).

CV percentage = (SD of estimate/mean) \times 100.

an absorbance corresponding to a concentration above LOD. Among the 5 sera with high IgG concentrations obtained from patients untreated with cetuximab, one had an absorbance corresponding to a concentration above LOD (0.024 mg/L) but that is below LLOQ. Among the infliximab-, bevacizumab-, and rituximab-spiked sera tested, none had an absorbance corresponding to a concentration exceeding LOD.

Stability

For QC kept at room temperature and at +4°C, concentrations of cetuximab fluctuated around 7.5 mg/L in solutions and no trend of increase or decrease in concentrations could be observed; mean concentration across time was 7.8 and 8.1 mg/L, respectively, and concentration (bias) at day 17 was 9.1 (+21%) and 8.7 mg/L (+16%), respectively.

Dilution Reproducibility

Mean concentration obtained by assaying five 50 mg/L cetuximab-spiked samples after 1:10 dilution in normal human serum on the same day was 51.5 mg/L. Corresponding CV and inaccuracy were 4.5% and +3.1%, respectively. After a 1:100 dilution in normal human serum on the same day, the mean concentrations (CV, bias) obtained by assaying five 200 and 300 mg/L cetuximab-spiked samples were 205.3 (2.6%, +2.6%) and 291.9 mg/L (5.5%, +2.7%).

Detection of Free and Monovalently Bound Cetuximab

Mean cetuximab concentrations (SD) were 8.26 (0.58), 6.57 (0.31), 5.13 (0.38), and 3.78 (0.08) mg/L for 1:0, 1:0.5, 1:1, and 1:2 cetuximab to EGFR-ECD 404SG ratios, respectively.

Concentrations in Cetuximab-Treated Patients

A total number of 198 blood samples were available from 16 patients (Table 2). All the blood samples collected before the beginning of cetuximab treatment were below LOD. All other sera had cetuximab concentrations above LLOQ. Median (range) trough and T2h concentrations during the treatment were 49.6 (5.8–105.4) and 177.2 (97.5–235) mg/L, respectively.

Cetuximab concentrations were best described with a 2-compartment pharmacokinetic model with first-order

distribution and elimination constants (Fig. 2). Michaelis–Menten elimination could not be described using our data.

DISCUSSION

Relationships between cetuximab concentrations and therapeutic effects and between concentration and adverse side effects need to be studied to understand the sources of the interindividual variability in cetuximab effects. This knowledge should allow optimizing the use of this biopharmaceutical in patients. Such studies require an accurate, reproducible, and validated assay to measure cetuximab serum concentrations in treated patients. Previous studies used 2 different approaches: ELISA^{6,9,11} or BiaCore technology.^{5,8} Because they are rapid, inexpensive, sensitive, and reliably reproducible techniques, ELISA techniques are most commonly used. However, only 2 studies report technical details on the ELISA assay used.^{9,11} The most complete description is given by Fracasso et al,¹¹ who report that the antigen used was

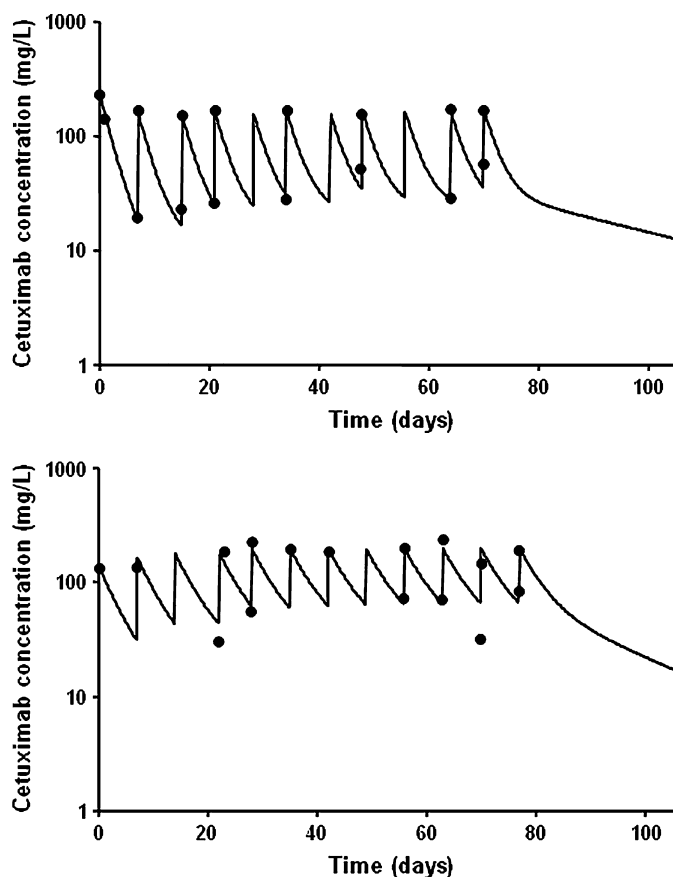


FIGURE 2. Observed (●) and model-predicted (lines) cetuximab concentrations in 2 representative subjects: patient 8 (upper panel) and patient 11 (lower panel). Estimated parameters of patient 8 were central volume of distribution: 3.6 L, peripheral volume of distribution: 5.5 L, systemic clearance: 0.77 L/d, and distribution clearance: 0.21 L/d. Estimated parameters of patient 11 were central volume of distribution: 2.5 L, peripheral volume of distribution: 7.8 L, systemic clearance: 0.98 L/d, and distribution clearance: 0.37 L/d, respectively.

TABLE 2. Summary of Patients Characteristics

	Number	Median (Range)
Pathology		
Colorectal cancer	15	
Undetermined neoplasia	1	
Demographic characteristics		
Age (yr)		68 (34–78)
Weight (kg)		69 (38–95)
Sex (women/men)	3/13	
Blood samples		
Trough concentrations (mg/L)	96	46.7 (5.8–105.4)
Peak concentrations (mg/L)	102	174.4 (97.5–235.0)

a recombinant form of the human EGFR-ECD and that the LLOQ was 0.475 mg/L. Intra- and interrun variabilities were 5.4% and 4.6%, respectively, and the inaccuracy of the controls did not exceed 3.7%. However, this study provides no information on LOD, specificity, interferences, and dilution-induced inaccuracy or imprecision.

The ELISA described in the present study is rapid and simple. Because the validation parameters meet the criterion of acceptability (Table 2), this assay can be considered as accurate and reproducible when cetuximab concentrations are between 0.75 and 15 mg/L, imprecision and inaccuracy being < 15%. The LLOQ is 0.75 mg/L, a value that is far lower than that of trough serum concentration expected in patients treated with the recommended regimen (between 30 and 100 mg/L in most of the studies).⁵⁻⁹ Sample dilution does not decrease precision significantly. The observer underestimation of QC concentrations in human serum when the calibrators are prepared in PBS-BSA suggests that there may be a matrix effect, which justifies the use of human serum for standards and QC when cetuximab concentrations are realized in human serum.

Among the 28 blank sera and the 13 pretreatment sera assayed, 5 blank sera displayed nonspecific antibody binding exceeding LOD (corresponding to cetuximab concentrations between 0.02 and 0.095 mg/L), but all these values are well below LLOQ. Nevertheless, serum samples should be obtained from all patients before their first cetuximab infusion to determine the extent of nonspecific binding to EGFR-ECD.

The presence of bevacizumab, rituximab, or infliximab (other IgG1 mAbs) in the serum did not interfere with our assay, which can therefore be considered as highly specific of cetuximab. This lack of interference with other humanized or chimeric mAbs was mandatory because patients may receive other mAbs during associated or overlapping treatments. For example, patients with colorectal cancer may be successively treated with bevacizumab and cetuximab and the 2 mAbs may be present in their serum simultaneously.

As a bivalent molecule, cetuximab is expected to bind 1 or 2 EGFR molecules. Biologically active cetuximab species are free cetuximab and cetuximab with 1 bound EGFR molecule. We used our assay to measure cetuximab concentrations in solutions containing cetuximab mixed with increasing amounts of EGFR-ECD. We found that cetuximab was still detected despite of the added EGFR-ECD. Measured cetuximab concentration for the 1:2 cetuximab to EGFR-ECD 404GS ratio was 2.2 times lower than that for the 1:0 ratio. EGFR bound to cetuximab might therefore be displaced by coated EGFR. A fraction of cetuximab bound to 2 EGFR molecules may therefore be detected by our assay.

In the present study, cetuximab concentrations were assessed in 15 patients with metastatic colorectal cancer and 1 patient with undetermined neoplasia. Mean trough and T2h concentrations were 49.6 and 177.2 mg/L, respectively. These results are close to those reported from previous studies.⁵⁻⁹ The 2-compartment model gave a satisfactory description of cetuximab concentrations (Fig. 2). The present pharmacokinetic modeling was performed on a small number of patients and did not pretend to describe cetuximab pharmacokinetics

but rather to show that our assay is suitable in “real life” studies of cetuximab. We used our assay and this pharmacokinetic model to describe the pharmacokinetics of cetuximab in a patient with end-stage kidney disease under hemodialysis.¹⁴

CONCLUSIONS

We developed a sensitive, reproducible, and accurate immunoassay to measure cetuximab serum concentrations in cetuximab-treated patients. This assay can be easily and reliably applied to both pharmacokinetic and concentration–effect relationship studies of cetuximab.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Me Anne-Claire Duveau for her excellent technical assistance and Prof K. Dane Wittrup, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, for providing us EGFR-ECD 404GS complementary DNA.

REFERENCES

- Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, et al. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell*. 2005;7: 301–311.
- Marshall J. Clinical implications of the mechanism of epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer*. 2006;107:1207–1218.
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:337–345.
- Milas L, Mason K, Hunter N, et al. In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Clin Cancer Res*. 2000;6:701–706.
- Lenz HJ, Van Cutsem E, Khambata-Ford S, et al. Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J Clin Oncol*. 2006;24:4914–4921.
- Delbaldo C, Pierga JY, Dieras V, et al. Pharmacokinetic profile of cetuximab (ErbixTM) alone and in combination with irinotecan in patients with advanced EGFR-positive adenocarcinoma. *Eur J Cancer*. 2005;41:1739–1745.
- FDA approval package for cetuximab. 2004. Available at: <http://www.fda.gov/cder/foi/label/2004/125081b1.pdf>. Accessed November 01, 2007.
- Baselga J, Pfister D, Cooper MR, et al. Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J Clin Oncol*. 2000;18: 904–914.
- Tan AR, Moore DF, Hidalgo M, et al. Pharmacokinetics of cetuximab after administration of escalating single dosing and weekly-fixed dosing in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2006;12:6517–6522.
- Perez-Soler R, Saltz L. Cutaneous adverse effects with HER-1/EGFR targeted agents: is there a silver lining? *J Clin Oncol*. 2005;23:5235–5246.
- Fracasso PM, Burris H, Arquette MA, et al. A phase 1 escalating single-dose and weekly-fixed-dose study of cetuximab: pharmacokinetic and pharmacodynamic rationale for dosing. *Clin Cancer Res*. 2007;13: 986–993.
- Kim YS, Bandhori R, Cochran JR, et al. Directed evolution of the epidermal growth factor receptor extracellular domain for expression in yeast. *Proteins*. 2006;62:1026–1035.
- Winonmix Professional 2.0.1 User's Guide. Mountain View, CA: Pharsight Corp, 2000.
- Thariat J, Azzopardi N, Peyrade F, et al. Cetuximab pharmacokinetics in end-stage kidney disease under hemodialysis. *J Clin Oncol*. 2008;26: 4223–4225.



**Apport de la modélisation pharmacocinétique à
l'étude de la variabilité de réponse aux anticorps
monoclonaux antitumoraux : Application au
cetuximab**
Nicolas AZZOPARDI



Résumé :

Les anticorps monoclonaux ont révolutionné le traitement de nombreuses pathologies. Cependant, leur pharmacocinétique (PK) et l'influence de leur concentration sur la réponse clinique restent mal connues. Nous avons étudié les sources de variabilité interindividuelle de la PK du cetuximab, un anticorps anti-EGFR, ainsi que l'influence de l'exposition à cet anticorps sur la réponse. Nous avons validé une méthode ELISA de dosage du cetuximab. Dans un modèle murin, nous avons étudié l'absorption pulmonaire du cetuximab. Nous avons étudié la PK du cetuximab chez un patient hémodialysé. Nous avons décrit la PK du cetuximab chez des patients traités pour cancer colorectal métastatique, à l'aide d'un modèle combinant des éliminations d'ordre 0 et 1. Enfin, nous avons identifié la clairance globale du cetuximab, paramètre pouvant être estimé précocement par la concentration résiduelle à J14, comme un facteur influençant la survie sans progression des patients. Nos travaux montrent qu'une description de la PK d'un anticorps par approche compartimentale permet d'identifier les sources de variabilité et d'étudier l'impact de la PK sur la réponse clinique.

Mots clés : anticorps monoclonaux, cetuximab, ELISA, pharmacocinétique, relation dose-réponse, survie sans progression, polymorphisme génétique, récepteurs Fc

Abstract :

Monoclonal antibodies have profoundly modified the treatment of many diseases. However, their pharmacokinetics (PK) and the influence of their concentrations on the clinical response are poorly known. We studied the sources of the interindividual variability of PK of cetuximab, an anti-EGFR, and the influence of the exposure to this antibody on the response. We validated an ELISA technique to measure cetuximab concentrations. We studied the pulmonary absorption of cetuximab in a murine model. We studied cetuximab PK in a hemodialysed patient. In metastatic colorectal cancer patients, we described cetuximab PK with the help of a model combining zero- and first-order eliminations. Finally, we identified the global clearance of cetuximab, a parameter which can be estimated by residual concentration on day 14, as a factor influencing progression-free survival of the patients. Our work shows that the description of the PK of an antibody by compartmental approach allows to identify sources of variability and to study the impact of PK on the clinical response.

Keywords : monoclonal antibodies, cetuximab, ELISA, pharmacokinetics, dose-response relationship, genetic polymorphism, Fc receptors