



Etude des déterminants de l'efficacité et la toxicité des inhibiteurs de kinase utilisés dans le traitement du mélanome métastatique

Marine Rousset

► To cite this version:

Marine Rousset. Etude des déterminants de l'efficacité et la toxicité des inhibiteurs de kinase utilisés dans le traitement du mélanome métastatique. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0266 . tel-02724679

HAL Id: tel-02724679

<https://theses.hal.science/tel-02724679>

Submitted on 2 Jun 2020

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

École doctorale Sociétés, Politique, Santé Publique
Pharmacologie, option Pharmaco-épidémiologie, pharmacovigilance

Par Marine ROUSSET

**Etude des déterminants de l'efficacité et la toxicité des
inhibiteurs de kinase utilisés dans le traitement du
mélanome métastatique**

Sous la direction de : Mathieu MOLIMARD

Soutenue le 30 novembre 2018

Membres du jury :

M. PARIENTE, Antoine
M. FUNCK-BRENTANO, Christian
M. CHATELUT, Etienne
Mme MICALLEF, Joëlle
Mme DUTRIAUX, Caroline
M. MOLIMARD, Mathieu

PU-PH, CHU de Bordeaux
PU-PH, CHU Pitié-Salpêtrière
PU-PH, CHU de Toulouse
PU-PH, CHU de Marseille
PH, CHU de Bordeaux
PU-PH, CHU de Bordeaux

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Antoine PARIENTE pour m'avoir accueillie comme doctorante au sein de l'équipe « Pharmaco-épidémiologie et impact des médicaments sur les populations » INSERM U1219 du Bordeaux Population Health Research Center et avoir accepté la présidence de ce jury.

A Monsieur le Professeur Christian FUNCK-BRENTANO envers qui je suis extrêmement reconnaissante d'avoir répondu à chaque sollicitation au cours de cette thèse. C'est un grand honneur que vous ayez accepté de juger ce travail. Avec tout mon respect et ma gratitude.

A Monsieur le Professeur Etienne CHATELUT pour la gentillesse avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail. Avec mon profond respect et ma gratitude.

A Madame le Professeur Joëlle MICALLEF envers qui je suis extrêmement reconnaissante d'avoir accepté de juger ce travail. Avec tout mon respect et ma gratitude.

A Madame le Docteur Caroline DUTRIAUX pour la confiance accordée à l'initiation de ce travail. Merci également d'avoir répondu à chaque sollicitation au cours de ce travail de thèse. Avec mon profond respect et ma gratitude.

A Monsieur le Professeur Mathieu MOLIMARD pour m'avoir accordé votre confiance et m'avoir encadrée tout au long de cette thèse. Merci d'avoir été si disponible, compréhensif, motivant, pertinent et inventif. Avec tout mon respect et ma plus grande reconnaissance.

A toutes les personnes du laboratoire de pharmacologie-toxicologie, du centre de pharmacovigilance, de pharmaco-épidémiologie et de l'unité INSERM U1219 avec lesquelles j'ai grand plaisir à travailler. Je ne peux pas tous vous citer car la liste est longue mais sachez que je vous suis extrêmement reconnaissante de m'avoir aidée à chaque fois que cela était possible d'une manière ou d'une autre. Merci particulièrement à Evelyne, Dominique, Karine, Stéphane, Monsieur le Professeur Bégaud, Monsieur le Professeur Moore, Ghada, Cécile, Amandine, Francesco et Véronique.

A toutes les personnes du service de Dermatologie qui se sont impliquées dans ce travail et avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler.

A mes amis pour m'avoir soutenue, aidée et distraite dans tout ce qui concernait l'extra-thèse.

A ma famille pour avoir toujours cru en moi.

Un grand merci à ma mère pour m'avoir montré l'exemple d'une femme forte, travailleuse, juste, dynamique, drôle, bienveillante, et aimante.

Merci papa pour ton soutien, ton aide et ta décontraction. Avec toi il n'y a jamais de problème, toujours des solutions !

A mes frères, Frédérique et ma belle-famille, particulièrement à Catherine pour ton soutien et ton aide dans de nombreux domaines.

A Maxime pour ton soutien indéfectible. Merci d'être si drôle, si moderne, si gentil et si solide. Avec tout mon amour.

A mes filles Romane et Axelle. Dans la vie grâce à vous tout est relatif !

RESUME

Le traitement par BRAF-inhibiteur (BRAFi) et MEK-inhibiteur (MEKi) en association a permis d'améliorer significativement la survie des patients atteints de mélanome métastatique muté BRAFV600. Cette mutation est présente chez 50 % des patients. Les BRAFi et MEKi sont des inhibiteurs de protéines kinase, dont le métabolisme fait intervenir le CYP 3A4, à l'origine de grandes variabilités des concentrations plasmatiques inter-patients pour une même dose administrée. La moitié des patients répondent au traitement, et 90% des patients présentent des effets indésirables, nécessitant une diminution de la posologie dans 33% des cas.

Dans ce contexte, nous avons décrit les effets indésirables de chacun des BRAFi et MEKi et, pour ceux qui sont dose-dépendants, nous avons cherché à établir un lien entre concentration plasmatique et survenue d'effet indésirable. Grace à la mise au point d'une méthode analytique en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, nous avons mesuré prospectivement les concentrations plasmatiques des BRAFi et MEKi chez les patients bordelais. Ces données permis de définir un seuil de toxicité de 48 ng/ml pour le dabrafenib. La définition de ce seuil constitue une étape essentielle à la conduite d'une étude randomisée visant à évaluer l'intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique.

MOTS CLES :

Inhibiteurs de protéine kinase

Pharmacocinétique

Suivi thérapeutique pharmacologique

Effet indésirable

Mélanome

UNITE DE RECHERCHE

Bordeaux Population Health Research Center INSERM U1219, Equipe « Pharmacopidémiologie et impact des médicaments sur les populations ».

Université de Bordeaux, Site de Carreire, Bâtiment Pharmacie, 4^{ième} tranche, 3^{ième} étage.

Case 121, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cédex, France

TITLE AND ABSTRACT

Determinants of the efficacy and toxicity of kinase inhibitors used for the treatment of metastatic melanoma

The combination of BRAF-inhibitors (BRAFi) and MEK-inhibitors (MEKi) has significantly improved the survival of patients with metastatic melanoma with BRAFV600 mutation. About 50% of patients harbour BRAFV600 mutation. BRAFi and MEKi are kinase inhibitors, metabolized by CYP 3A4, responsible for large between-patients variability in plasma concentrations for the same administered dose. About half of patients respond to treatment, and 90% of patients present adverse drug reactions (ADR), requiring dose reduction in 33% of cases. In this context, we described ADR profiles of each of the BRAFi and MEKi in the global pharmacovigilance database, and for ADR that are dose-dependent; we looked for the link between plasma exposure to the drug and the occurrence of ADR. Using the assay method developed, we prospectively measured the plasma concentrations of BRAFi and MEKi in Bordeaux patients, which allowed us to define a toxicity threshold of 48 ng / ml for dabrafenib.

This work allowed to deepen the knowledge on the profiles and the occurrence of the ADR for each BRAFi and MEKi. The definition of a toxicity threshold for dabrafenib is a prerequisite for a randomized study to evaluate the value of therapeutic drug monitoring.

KEYWORDS

Kinase inhibitors

Pharmacokinetics

Therapeutic drug monitoring

Adverse drug reaction

Melanoma

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Evolution des taux d'incidence et de mortalité par mélanome cutané de 1980 à 2012. D'après INCA Les cancers en France ¹	11
Figure 2. Allongement de la survie globale (SG) avec l'arrivée de nouveaux traitements	18
Figure 3. Activation de la voie des MAPKinases.	19
Figure 4. Mutations activatrices de la voie des MAPK.	21
Figure 5. Structure chimique des BRAFi (vemurafenib, dabrafenib et encorafenib) et MEKi (cobimetinib, trametinib et binimetinib).	25
Figure 6. Facteurs influençant la pharmacocinétique des inhibiteurs de protéines kinase. (adaptée d'Apperley ⁵⁶).....	26
Figure 7. Métabolisme du dabrafenib.	27
Figure 8. Activation paradoxale de MEK puis ERK dans les cellules BRAF sauvage.	33
Figure 9. Schéma simplifié des voies de signalisation conduisant à la résistance aux BRAFi.	35
Figure 10. Arbre décisionnel de prise en charge thérapeutique des mélanomes cutanés métastatiques non résécables (stade III inopérable et stade IV) hors métastase cérébrale.	48
Figure 11. Photo d'une plaque d'extraction MCX 96 puits.	51
Figure 12. Principe de la source d'ionisation en électrospray (ESI).	53
Figure 13. Principe de la spectrométrie de masse en tandem.	54

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification TNM/AJCC des mélanomes cutanés en stades cliniques.	14
Tableau 2. Paramètres pharmacocinétiques des BRAFi et MEKi.	29
Tableau 3. Concentrations inhibitrices des BRAFi en fonction du type de kinase RAF.....	34
Tableau 4. Résumé des études de phase 3 sur les inhibiteurs de BRAF et de MEK.	43
Tableau 5. Demi-vies des BRAFi et MEKi et temps pour atteindre l'état d'équilibre des concentrations plasmatiques.	100

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique	MAPK : Mitogen activated protein kinase
ADNct : ADN circulant	MEK : Mitogen activated protein kinase kinase
ADP : Adénosine diphosphate	MM : Masse molaire
AMM : Autorisation de mise sur le marché	MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem
ATP : Adénosine triphosphate	NF1 : Neurofibromatosis 1
ATU : Autorisation temporaire d'utilisation	NRAS : Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
AUC : Aire sous la courbe	OS : Overall survival
BCRP : Breakpoint cluster region pseudogene	PD : Pharmacodynamie
BRAF : Murine sarcoma viral (v-raf) oncogene homolog B1	PD1 : Programmed cell death 1
CI50 : Concentration inhibitrice 50	PD-L1 : Programmed cell death 1 ligand 1
Cmax : Concentration maximale	PFS : Progression free survival
Cmin : Concentration minimale	P-gp : Glycoprotéine P
CNIL : Commission nationale de l'informatique et des libertés	PK : Pharmacocinétique
CRAF : V-Raf-1 murine leukemia viral oncogene-like protein 1	pKa : $-\log_{10}K_a$, avec K_a constante d'acidité
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4	PTEN : Phosphatase and tensin homolog
CYP : Cytochrome P450	RCP : Réunion de concertation pluridisciplinaire
ECOG : Eastern cooperative oncology group	RECIST : Response evaluation criteria in solid tumors
EGF : Epidermal growth factor	RO : Réponse objective
EMA : European medicine agency	SG : Survie globale
ERK : Extracellular signal-regulated kinases	SSP : Survie sans progression
F : Biodisponibilité	$T_{1/2}$: Temps de demi-vie
FDA : Food and drug administration	UHPLC : Chromatographie liquide ultra-haute performance
GDP : Guanosine diphosphate	UV : Ultraviolets
GTP : Guanosine triphosphate	VEGF : Vascular endothelial growth factor
LDH : Lactate déshydrogénase	
LSN : Limite supérieure normale	

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	6
LISTE DES TABLEAUX	7
LISTE DES ABBREVIATIONS	8
INTRODUCTION	11
1. Généralités sur le mélanome	11
1.1. Epidémiologie	11
1.2. Facteurs de risque	12
1.3. Classification en stades pronostiques	12
2. Evolution du pronostic vital et des traitements.....	15
2.1. La chimiothérapie cytotoxique.....	15
2.2. Les thérapies ciblées	16
2.3. L'immunothérapie	17
3. La voie des MAPKinases dans le mélanome	18
3.1. Rôle de la voie des MAPK.....	18
3.2. Mutations des protéines de la voie des MAPK	20
4. Traitements inhibiteurs de la voie des MAPKinases	24
4.1. Pharmacologie des traitements inhibiteurs de la voie des MAPK.....	25
4.2. Facteurs pronostics de réponse au traitement par BRAFi + MEKi.....	44
4.3. Place des BRAFi et MEKi dans la stratégie thérapeutique	46
OBJECTIFS	49
PARTIE EXPERIMENTALE	50
1. Matériel et méthode	50
1.1. Analyse des effets indésirables des BRAFi et MEKi dans Vigibase.....	50
1.2. Mise au point d'une méthode de dosage des BRAFi et MEKi.....	51
1.3. Constitution d'une base de données pour étude de la relation pharmacocinétique/pharmacodynamie des BRAFi et MEKi.....	54

2.	Effets indésirables des BRAFi et MEKi dans VigiBase - Article 1	55
2.1.	Introduction et présentation.....	56
2.2.	Discussion	56
3.	Mise au point d'une méthode analytique pour le suivi thérapeutique pharmacologique des BRAFi et MEKi - Article 2.....	90
3.1.	Introduction et présentation.....	91
3.2.	Discussion	91
4.	Etude de la relation pharmacocinétique/pharmacodynamie des BRAFi/MEKi - Article 3	99
4.1.	Introduction et présentation.....	100
4.2.	Discussion	101
5.	Cas clinique : Gestion d'effet indésirable grâce au suivi des concentrations plasmatiques du dabrafenib – Article 4	106
5.1.	Introduction et présentation.....	107
5.2.	Discussion	107
	DISCUSSION GENERALE	114
	PERSPECTIVES.....	118
	REFERENCES	120
	ANNEXES.....	136
1.	Feuille de demande de dosage des BRAFi et MEKi	136
2.	Formulaire CNIL pour étude observationnelle.....	137
3.	Mise au point d'une méthode de dosage de 17 ITK dont le dabrafenib- Article 5....	138
4.	Lettre d'intention, protocole de recherche pour PHRC-I 2016 et rapports d'experts	147

INTRODUCTION

1. Généralités sur le mélanome

1.1. Epidémiologie

En France, en termes d'incidence, le mélanome se situe au 6^{ème} rang des cancers chez la femme et au 8^{ème} rang chez l'homme. En 2017, le nombre de cas estimés était de 15 404 et le nombre de décès associés au mélanome attendu était de 1 783. Les études épidémiologiques montrent que le mélanome est l'une des tumeurs ayant un taux de croissance parmi les plus élevés : en France, le nombre de nouveaux cas a plus que doublé en 20 ans. Ainsi, entre 1980 et 2012, le taux d'incidence est passé de 2,5 nouveaux cas à 10,8 pour 100 000 personnes-années chez l'homme et de 4,0 à 11,0 pour 100 000 personnes-années chez la femme (Figure 1). La croissance de l'incidence aurait ralenti entre 2005 et 2012.

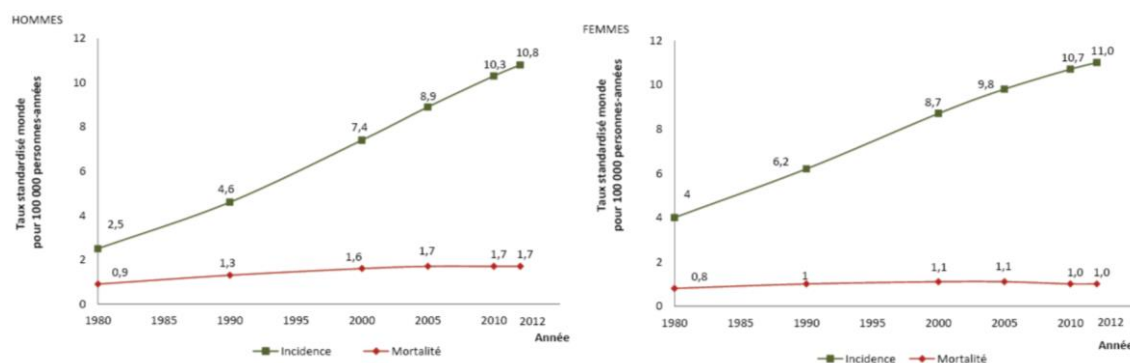


Figure 1. Evolution des taux d'incidence et de mortalité par mélanome cutané de 1980 à 2012. D'après INCA Les cancers en France ¹

En 2012, l'âge médian au diagnostic était de 64 ans chez l'homme et 61 ans chez la femme. L'âge médian au décès est de 69 ans chez l'homme et 74 ans chez la femme. La survie nette à 5 ans est passée de 83% pour les cas diagnostiqués en 1989-1993 à 92% pour les cas diagnostiqués en 2005-2010 ¹. La mortalité augmente moins vite que l'incidence et reste presque stable, en particulier chez la femme alors qu'elle augmente encore légèrement chez l'homme. Le taux de mortalité est ainsi passé de 0,9 à 1,6 pour 100 000 personnes chez l'homme entre 1980 et 2005 et de 0,8 à 1,1 pour la même période chez la femme.

À l'échelle mondiale, les cas de mélanomes sont beaucoup plus fréquents en Australie et en Nouvelle-Zélande qu'en Europe. Le mélanome est rare en Asie du Sud et Centrale ¹.

1.2. Facteurs de risque

Les facteurs de risque principaux mis en évidence sont :

- les caractéristiques physiques : peau claire, cheveux roux ou blonds, yeux clairs, nombreuses éphélides (taches de rousseur) ;
- une sensibilité particulière au soleil : peau qui brûle toujours, ne bronze pas ou peu ;
- les facteurs environnementaux et/ou comportementaux : antécédents personnels de brûlures solaires surtout pendant l'enfance, bronzage par UV artificiels, etc. ;
- le nombre de nævi, la présence d'un nævus atypique ou de nævus géant congénital ;
- les antécédents personnels de cancers cutanés ou familiaux de mélanome (parents au premier degré)
- l'immunodépression constitutionnelle ou acquise

Le mélanome cutané peut apparaître sur peau saine (70 à 80 % des cas) ou résulter de la transformation maligne d'un nævus.

Dix pour cent des mélanomes sont des formes familiales.

1.3. Classification en stades pronostiques

Les facteurs pronostiques du mélanome sont la taille et l'ulcération de la tumeur résumant l'extension tumorale dans l'organe primaire (T), l'atteinte des ganglions lymphatiques drainant la tumeur (N), et la combinaison de la présence de métastases et du taux de lactate déshydrogénase sanguin (LDH) (M) ². La combinaison des 3 facteurs T, N et M aboutit au classement du cancer dans l'un des stades de la 7ème classification AJCC (American Joint Committee on Cancer) des mélanomes cutanés qui se distinguent par des survies différentes (Tableau 1) ². Au stade initial, les facteurs pronostiques sont histologiques : épaisseur de la tumeur (indice de Breslow), présence d'une ulcération, type histologique de mélanome. Le nombre de ganglions atteints et la présence d'une rupture capsulaire sont les facteurs pronostiques au stade III. Au stade métastatique, les localisations cutanées, ganglionnaires ou pulmonaires, avec des LDH normales, sont de meilleur pronostic ².

Le taux sérique de LDH élevé est fortement corrélé à une diminution de la survie dans les stades avancés ^{3,4}. Cependant c'est un marqueur peu spécifique, toute lésion cellulaire pouvant entraîner une augmentation du taux sérique de LDH.

1.3.1. Classification histopathologique TNM (tumeur, ganglions, métastases)

Classification T

- T1 : ≤ 1 mm d'épaisseur

T1a : index mitotique $< 1 \text{ mm}^2$; sans ulcération

T1b : index mitotique $\geq 1 \text{ mm}^2$; ou avec ulcération

- T2 : > 1 et ≤ 2 mm d'épaisseur

T2a : sans ulcération

T2b : avec ulcération

- T3 : > 2 et ≤ 4 mm d'épaisseur

T3a : sans ulcération

T3b : avec ulcération

- T4 : > 4 mm

T4a : sans ulcération

T4b : avec ulcération

Classification N

- N1 : 1 ganglion envahi

N1a : micrométastase*

N1b : macrométastase**

- N2 : 2 à 3 ganglions envahis

N2a : micrométastase*

N2b : macrométastase**

N2c : métastase(s) en transit sans ganglion envahi

- N3 : ≥ 4 ganglions envahis ou agglomérat de ganglions envahis ou métastase(s) en transit avec ganglion envahi

* dans un ganglion sentinelle ou un ganglion non décelable cliniquement ou en échographie, enlevé lors d'un curage de principe

** dans des ganglions décelables cliniquement ou en échographie, enlevés lors d'un curage dit de nécessité ou avec extension extra-capsulaire macroscopique.

Classification M

- M1a : métastases à distance : cutanées ou sous cutanées, ou ganglionnaires. Taux de LDH sérique normal
- M1b : métastases pulmonaires. Taux de LDH sérique normal
- M1c : autres métastases viscérales et taux de LDH sérique normal ; ou toutes métastases à distance et taux de LDH sérique au-dessus de la limite normale supérieure (LSN).

1.3.2. Classification en stades pronostiques

Tableau 1. Classification TNM/AJCC des mélanomes cutanés en stades cliniques.

Stades	Critères
IA	Tumeur in situ
IB	Tumeur ≤ 1 mm d'épaisseur, sans ulcération et index mitotique $<1/\text{mm}^2$ (pT1a), N0, M0
IIA	Tumeur ≤ 1 mm d'épaisseur avec ulcération et mitoses $>1/\text{mm}^2$ (pT1a), N0, M0 Tumeur supérieure > 1 mm et ≤ 2 mm d'épaisseur, sans ulcération (pT2a), N0, M0
IIB	Tumeur >1 mm et ≤ 2 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT2b), N0, M0 Tumeur > 2 mm et ≤ 4 mm d'épaisseur, sans ulcération (pT3a), N0, M0
IIC	Tumeur supérieure à 4 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT4b), N0, M0
IIIA	Tumeur sans ulcération (pT1a-4a), métastases microscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux (N1a, 2a), M0
IIIB	Tumeur sans ulcération (pT1a-4a), métastases macroscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux ou métastases « en transit » (N1b, 2b, 2c), M0 Tumeur avec ulcération (pT1b-4b), métastases microscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux ou métastases « en transit » (N1a, 2a, 2c), M0
IIIC	Tumeur avec ulcération (pT1b-4b), métastases macroscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux (N1b, 2b), M0 Tumeurs avec ou sans ulcération (tous pT), métastases dans 4 ganglions lymphatiques régionaux ou plus ou métastases en transit avec métastase(s) ganglionnaire(s) régionale(s) (N3), M0
IV	Métastases à distance (tous pT, tous N, M1)

2. Evolution du pronostic vital et des traitements

Si les formes diagnostiquées à un stade peu avancé sont de bon pronostic et guéries généralement par la seule chirurgie, les formes évoluées et notamment les formes métastatiques sont de pronostic redoutable. Les formes peu évoluées peuvent être traitées par chirurgie, appelée exérèse diagnostique, elle permet d'enlever la lésion et de confirmer le diagnostic de mélanome. Une seconde intervention chirurgicale (exérèse élargie à but thérapeutique) peut-être programmée afin de la compléter.

Le mélanome est un cancer à fort potentiel métastatique ce qui signifie qu'un faible volume tumoral peut être à l'origine d'une dissémination métastatique majeure. Environ 10 à 15% des patients développent des métastases, rendant le pronostic du mélanome très sombre, avec une survie médiane qui était de 6 à 9 mois avec les traitements classiques, et un taux de survie à 3 ans de seulement 10 à 15% ⁵. Chez les patients présentant des métastases cérébrales (environ 50% des mélanomes de stade IV), la survie globale médiane est réduite, estimée entre 3 et 5 mois ^{6,7}.

Pour les formes métastatiques ou non résécables, peu de traitements avaient jusqu'à récemment fait la preuve de leur efficacité et le traitement de référence était la chimiothérapie cytotoxique.

2.1. La chimiothérapie cytotoxique

La dacarbazine est la molécule la plus utilisée. Les alternatives sont la fotemustine et le temozolomide, notamment en cas de métastases cérébrales. Cette dernière molécule, qui présente l'avantage d'une administration orale, n'a cependant pas l'autorisation de mise sur le marché (AMM) dans cette indication. Aucune de ces chimiothérapies n'a démontré un impact sur la survie globale des patients, et les taux de réponse varient de 5 à 20% ⁸. La dacarbazine était considérée comme la molécule de choix et a souvent été utilisée comme comparateur dans les études sur les nouveaux traitements.

Aujourd'hui, la place de ces chimiothérapies dites conventionnelles est restreinte, après échec de différents traitements incluant les thérapies ciblées, les immunothérapies, et de nouvelles molécules testées dans le cadre d'essais cliniques.

2.2. Les thérapies ciblées

Elles sont destinées aux malades dont la tumeur porte une mutation activatrice de BRAF en position V600^{9,10}. Il s'agit des inhibiteurs de BRAF (BRAFi) : vemurafenib, dabrafenib et encorafenib ; et des inhibiteurs de MEK (MEKi) : cobimetinib, trametinib et binimetinib qui sont disponibles en association aux BRAFi. Les BRAFi sont associés à des taux de réponse objective de l'ordre de 50 % et des durées médianes de survie globale très significativement supérieures à celles de la chimiothérapie, autour de 18 mois en monothérapie. L'association BRAFi + MEKi augmente encore le nombre de répondeurs et la durée médiane de survie globale dépasse 2 ans (25 mois). Les inhibiteurs de MEK bloquent la voie de MAPKinases en aval de BRAF, réduisant ainsi les mécanismes de résistance induits par les BRAFi. Deux associations ont l'AMM: dabrafenib + trametinib ou vemurafenib + cobimetinib et une troisième association est disponible sous autorisation temporaire d'utilisation (ATU) : encorafenib + binimetinib.

En cas de mutation c-kit (beaucoup plus rare que la mutation BRAF), peut se discuter une thérapie ciblée par inhibiteur de c-kit : l'imatinib.

Toutes les molécules de thérapies ciblées sont prises par voie orale, sous forme de comprimés. Elles peuvent être prescrites tant que l'efficacité du traitement est observée.

En cas d'échappement au traitement par bithérapie, ou lorsque le mélanome n'est pas muté BRAF, un traitement par immunothérapie peut être proposé.

2.3. L'immunothérapie

Elle repose sur des anticorps monoclonaux anti-CTLA4 et anti-PD1.

L'Ipilimumab est un anticorps neutralisant l'action de la molécule CTLA-4 (antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques). Le CTLA-4 intervient de façon obligatoire dans le contrôle de certains éléments du système immunitaire en les neutralisant ou en diminuant leur activité. Bloquer le CTLA-4 par un anticorps l'empêche de neutraliser le système immunitaire, et permet à la réaction immunitaire de poursuivre son action, notamment celle visant à la destruction des cellules cancéreuses. L'ipilimumab permet d'obtenir des taux de réponse objective limités de l'ordre de 13 % mais des médianes de survie globale de 12 mois ¹¹.

Les anticorps monoclonaux anti-PD1 (nivolumab et pembrolizumab) se lient au récepteur PD-1 (programmed cell death-1) et bloquent son interaction avec les ligands PD-L1 et PD-L2. Le récepteur PD-1 est un régulateur négatif de l'activité des cellules T, qui a montré son implication dans le contrôle des réponses immunitaires des cellules T. Les anti-PD1 potentialisent les réponses des cellules T, y compris les réponses anti-tumorales, par le blocage de la liaison de PD-1 avec PD-L1 et PD-L2, qui sont exprimés dans les cellules présentatrices d'antigène et peuvent être exprimés par les tumeurs ou par d'autres cellules du microenvironnement tumoral. Les anti-PD1 sont associés à des taux de réponse supérieurs à 30 % et à des durées de réponse prolongées, jusqu'à 17 mois ¹²⁻¹⁵. Les associations d'immunothérapie (nivolumab et ipilimumab notamment) ont obtenu l'AMM au vu d'une efficacité démontrée mais au prix d'une toxicité importante.

La chimiothérapie conventionnelle a été détrônée par les inhibiteurs de BRAF (BRAFi) puis l'association BRAFi + MEKi pour les mélanomes métastatiques mutés BRAF. Pour les mélanomes non mutés BRAF ou en 2^{ème} ligne de traitement, les immunothérapies par Anti-CTLA4 ou Anti-PD1 ont également permis un allongement de la survie globale (Figure 2).

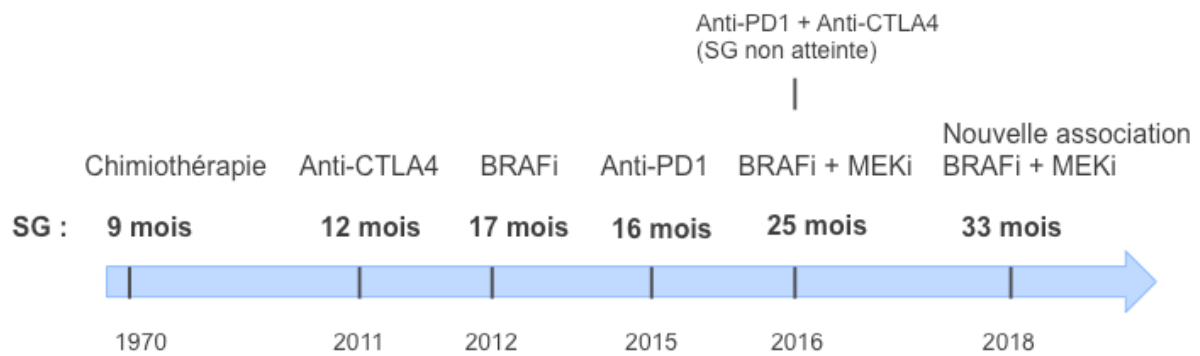


Figure 2. Allongement de la survie globale (SG) avec l'arrivée de nouveaux traitements

Depuis 2010, l'Onco-Dermatologie vit une pleine mutation. Ces dernières années ont été marquées par l'émergence de nouveaux médicaments pour les formes métastatiques avec un bénéfice significatif sur la survie des patients. En particulier l'immunothérapie et les médicaments agissant sur la voie des MAPKinases.

3. La voie des MAPKinases dans le mélanome

3.1. Rôle de la voie des MAPK

De nombreuses études ont montré que la voie RAS/RAF/MEK/ERK est majoritairement impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire, la survie, l'adhésion, la mobilité et la différenciation. La voie MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) est, en général, activée par le biais d'un récepteur membranaire, lui-même stimulé par un facteur de croissance ou une cytokine qui, sans entrer dans la cellule, va transmettre le signal extracellulaire à l'intérieur de la cellule. Les récepteurs membranaires de ces facteurs de croissance ont la particularité d'avoir une activité enzymatique de phosphorylation de résidus tyrosine, appelée « activité tyrosine-kinase » permettant l'activation du récepteur par autophosphorylation, et ainsi l'activation d'une cascade de phosphorylations de nombreuses protéines intra-cytoplasmiques qui sont généralement d'autres kinases. La voie MAPK constitue, avec la voie PI3K /AKT, une des voies de transmission du signal les mieux connues, aboutissant, après une cascade de phosphorylations successives, à la mise en jeu de facteurs de transcription capables d'activer la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, mais aussi dans l'invasion et la migration cellulaire, l'angiogenèse et la survie cellulaire (Figure 3).

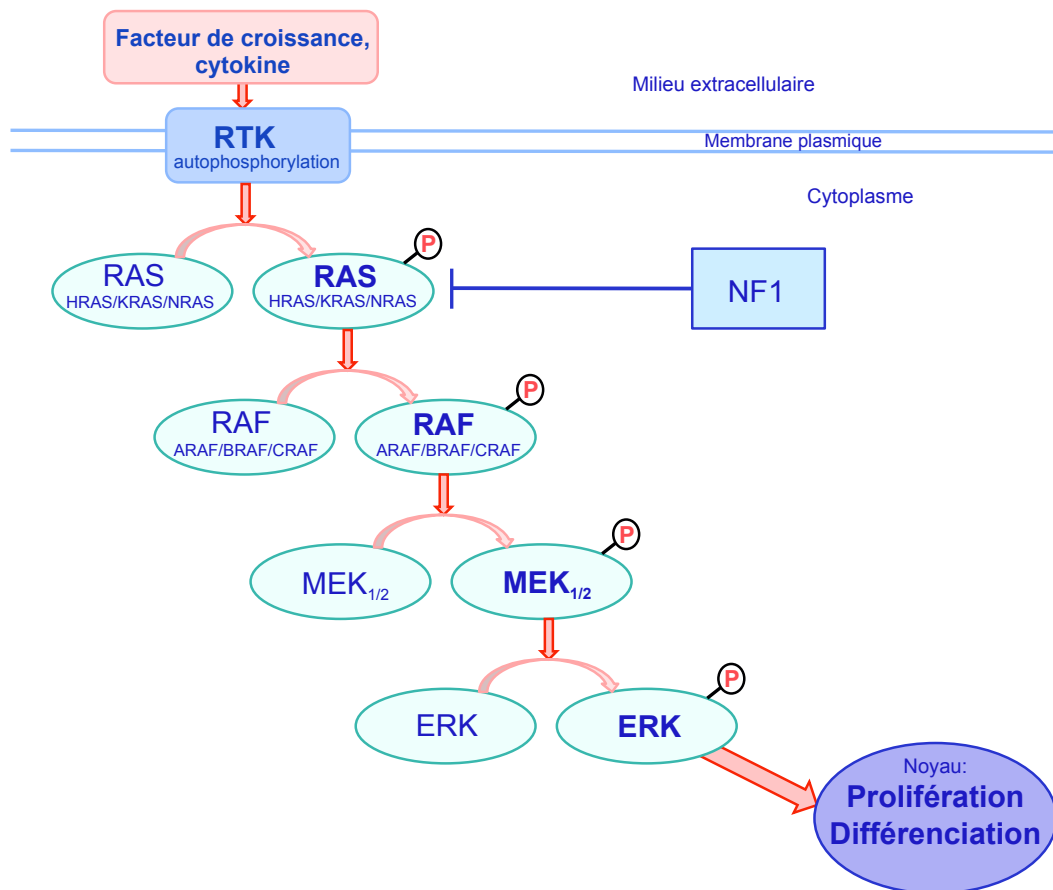


Figure 3. Activation de la voie des MAPKinases.

Parmi les récepteurs de facteurs de croissance capables d'activer la voie des MAPK, les principaux sont l'EGFR et les autres membres de la famille HER, le FGFR, le VEGFR, l'IGFR, le PDGFR, c-Met, c-Kit et des récepteurs couplés aux protéines G. Après liaison d'un facteur de croissance à la partie extracellulaire du récepteur à activité tyrosine kinase (RTK), celui-ci est autophosphorylé, et recrute l'un des 3 membres de la famille RAS (isoformes H-, K-, et N-RAS). La protéine RAS activée devient affine pour de nombreuses protéines effectrices et notamment la protéine RAF¹⁶. Le recrutement de RAF à la membrane provoque son activation par une cascade d'évènements de déphosphorylations puis de phosphorylations ce qui modifie sa conformation et dévoile des sites de dimérisation^{17,18}. Les isoformes A, C-, et B-RAF sont des sérine-thréonine kinases, qui s'associent en homo- ou hétéro-dimères pour permettre la transduction du signal. Ces dimères activent à leur tour par phosphorylation les protéines kinases MEK1/2.

Bien que chaque isoforme RAF joue un rôle dans la voie de signalisation, B-RAF est le principal activateur de MEK ¹⁹. A-RAF active seulement MEK-1 tandis que B-RAF et C-RAF phosphorylent les deux isoformes de MEK : MEK-1 et MEK-2, sur leurs résidus sérines. Les protéines MEK1/2 activent par phosphorylation les sérine-thréonine kinases ERK1/2 qui une fois activées se détachent de MEK1/2 et phosphorylent de nombreux substrats membranaires et cytoplasmiques avant de migrer dans le noyau pour y phosphoryler des facteurs de transcription. Ces facteurs de transcriptions sont impliqués dans la croissance, la prolifération, la différenciation cellulaire, et l'apoptose (Figure 3).

3.2. Mutations des protéines de la voie des MAPK

Historiquement, le mélanome a été classé en fonction de caractéristiques pathologiques et cliniques telles que l'histologie et le site anatomique d'origine. Au cours de la dernière décennie, il est devenu évident que des sous-ensembles de mélanomes peuvent être définis au niveau moléculaire par des mutations "pilotes" récurrentes qui surviennent dans de multiples oncogènes, notamment BRAF, NRAS, MEK1 et Kit (Figure 4). Ces mutations conduisent à une activation constitutive de protéines de signalisation mutées qui induisent et maintiennent la cancérogénèse ²⁰. Ces mutations sont rarement trouvées simultanément dans la même tumeur ²¹. La distribution des mutations varie en fonction du site d'origine (cutané, muqueux, etc.) et de l'absence ou de la présence de dommages liés à l'exposition chronique au soleil. Les rayons UV favorisent la cancérogénèse en provoquant des lésions sur l'ADN, avec la formation notamment de dimères de pyrimidine, des mutations de gènes, un stress oxydatif, une inflammation et une immunodépression ²².

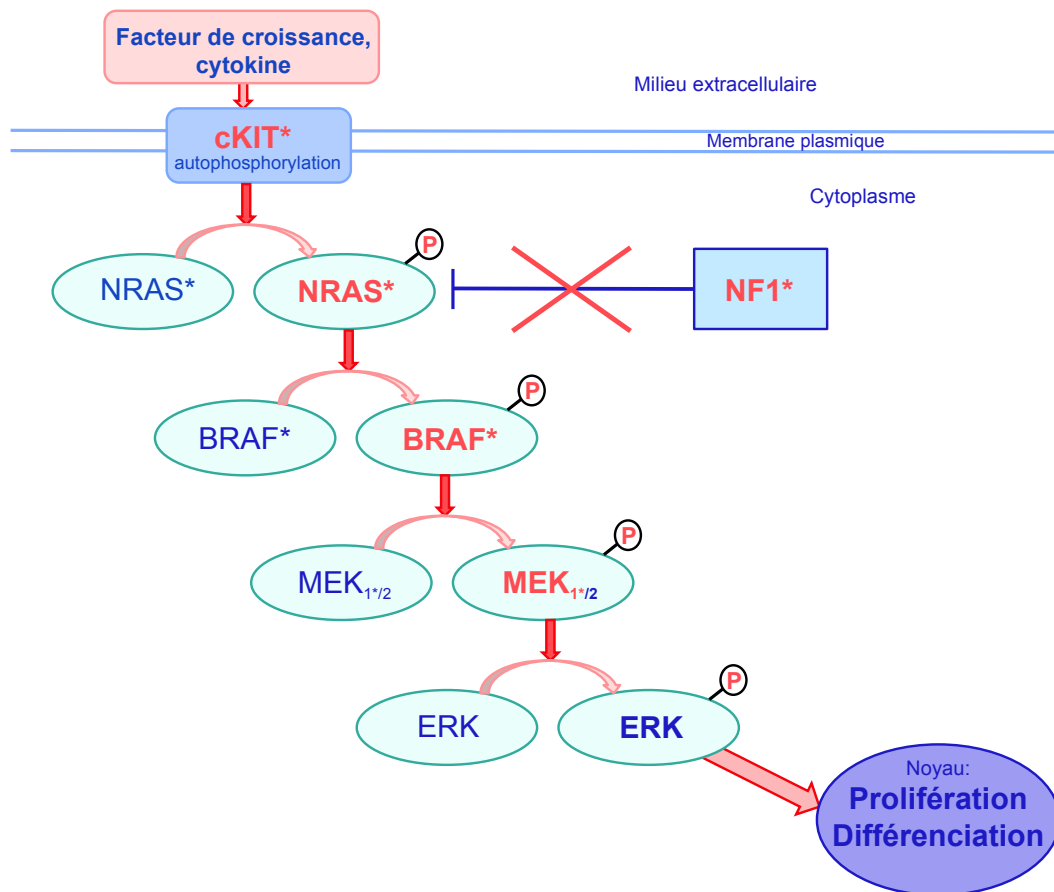


Figure 4. Mutations activatrices de la voie des MAPK.

Des mutations activatrices telles que BRAF, NRAS ou c-Kit ont pour effet l'augmentation de l'activité kinase des protéines mutées correspondantes. La protéine NF1 régule négativement RAS en favorisant sa forme inactive. Des mutations du gène suppresseur de tumeur NF1 induisent la perte d'expression de la protéine NF1, ce qui a pour effet de lever l'inhibition sur RAS et d'activer la voie MAPK.

3.2.1. Sous-type muté BRAF

Les mutations BRAF se retrouvent dans tous les sous-types de mélanomes mais sont plus fréquentes dans les mélanomes cutanés sans lésions chroniques induites par le soleil ²³. La prévalence de la mutation BRAF dans le mélanome est évaluée entre 40 et 60% des mélanomes ²⁴. Le gène BRAF se trouve sur le chromosome 7 du génome humain. La plupart des mutations du gène BRAF sont localisées sur l'exon 11 ou l'exon 15 qui correspondent au domaine kinase de la protéine. Une mutation sur ces exons aboutit à une activation

constitutive de la protéine BRAF. La mutation V600E est la plus fréquente (initialement décrite comme V599E). Cette mutation affecte de façon importante l'activité sérine-thréonine kinase dont l'activité catalytique est 500 fois supérieure à celle de la protéine normale. Viennent ensuite par ordre de fréquences décroissantes les mutations V600K dans 16 à 29% des cas, V600R dans 5%, V600M dans 4% et rarement V600D ^{25,26}. Les mutations BRAF sont aussi retrouvées dans le naevus mélanocytaire ²⁷, laissant supposer qu'elles constituent un événement précoce. Dans la grande majorité des cas, les mutations de BRAF ne se chevauchent pas avec d'autres mutations oncogéniques trouvées dans le mélanome. Une méta-analyse a montré que les mélanomes mutés BRAF étaient associés de façon significative à un jeune âge, à une localisation sur le tronc et sur la peau photo-exposée par intermittence et à des mélanomes de stade avancé ²⁸.

3.2.2. Sous-type muté NRAS

Environ 20% des tumeurs humaines présentent des mutations ponctuelles activatrices de RAS ²⁹. Le type de gène RAS touché par la mutation semble être spécifique d'une tumeur, car les carcinomes du pancréas, du côlon et du poumon présentent tous une fréquence élevée de mutations KRAS alors que les mutations NRAS sont fréquentes dans les mélanomes cutanés ³⁰. Dans le mélanome cutané, les mutations de NRAS sont de l'ordre de 13 à 25 % ^{23,31,32}. Dans la majorité des cas, ces mutations sont des mutations anti-sens qui introduisent une substitution d'acide aminé aux positions 12, 13 ou 61. Les mutations NRAS du codon 61 les plus fréquemment observées sont les modifications Q61R (CAA / CGA) et Q61K (CAA / AAA) conduisant respectivement à des substitutions de la glutamine à l'arginine ou à la lysine ³³. Les protéines RAS jouent un rôle « d'interrupteur » au sein des voies de signalisation et oscillent entre deux états : un état actif où elles sont liées au GTP (Guanosine Tri-Phosphate), ce qui permet transitoirement l'interaction de RAS avec d'autres molécules intracellulaires effectrices et l'activation de différentes voies de signalisation (MAPK, mais aussi PI3K/AKT) et un état inactif où elles sont liées au GDP. Une fois actives, les protéines RAS activent les protéines de la famille RAF1, constituée des sérine-thréonine-kinases A-RAF, B-RAF et C-RAF ³⁴. Les mutations NRAS entraînent l'activation constitutive de la kinase RAS et a donc un impact sur la régulation du cycle cellulaire. Dans les mélanomes mutés NRAS, c'est l'isoforme C-RAF (et non B-RAF) qui active la voie des MAPK ³⁵.

Les mutations NRAS se retrouvent dans tous les sous-types de mélanomes, mais sont plus fréquentes en cas de dommages liés à l'exposition solaire ³⁶ et sont associées à des mélanomes plus épais (indice de Breslow > 1mm) ainsi qu'à des index mitotiques plus élevés que les mélanomes mutés BRAF V600E ou non mutés BRAF ni NRAS ³⁷.

3.2.3. Sous-type muté NF1

Les mutations de NF1 se produisent dans 11,9% des mélanomes malins ³⁸. Le type de mutation observé est une perte de fonction (LoF). L'inactivation ou la perte de NF1 jouerait un rôle dans la mélanogénèse ^{39,40}. En effet, NF1 active une GTPase connue pour réguler négativement l'activité de RAS. La mutation LoF de NF1 peut être considérée comme un moyen alternatif d'activer la voie de signalisation MAPK (et PI3K/AKT) ^{41,42}.

Les mutations de NF1 sont anti-corrélées avec les mutations BRAF « hot spot » mais pas avec les mutations RAS « hot spot » ³³.

3.2.4. Autres mutations

Sous type muté MEK1

Des mutations somatiques dans MEK1 ont été trouvées dans 6-7% des mélanomes malins ⁴³. La prévalence des mutations MEK1 dans différents sous-types de mélanomes n'est pas encore connue. Cependant, la plupart des mutations MEK1 signalées impliquent des modifications des nucléotides C> T et G> A, résultant souvent d'une exposition aux rayons UV ⁴⁴. Les mutations MEK1 peuvent se produire avec les mutations BRAF ou NRAS ⁴⁵.

Sous-type muté c-Kit

La protéine KIT (CD117) est un récepteur à activité tyrosine kinase dont l'activation stimule la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire. Les mutations de c-Kit sont rares et sont retrouvées avec une fréquence de 5,2 % parmi les mélanomes métastatiques ³². Les mutations Kit sont plus fréquentes dans les mélanomes acraux (10-20%) et les mélanomes muqueux (15-20%) ^{46,47}. Ces mutations peuvent induire une dimérisation du récepteur indépendante du ligand et une activité kinase constitutive ^{48,49}. Le spectre des mutations recoupe celui des tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST).

Dans la majorité des cas, les mutations Kit ne se chevauchent pas avec d'autres mutations oncogéniques trouvées dans le mélanome ⁵⁰.

La conjonction des connaissances biochimiques, génétiques et cellulaires associées à la recherche systématique d'inhibiteurs de kinase depuis le début des années 1980 a permis de développer des inhibiteurs de kinase qui ciblent la voie MAPK.

4. Traitements inhibiteurs de la voie des MAPKinases

Les premiers médicaments ayant obtenu l'AMM pour le traitement des mélanomes métastatiques mutés BRAF V600 sont des BRAF-inhibiteurs (BRAFi) : le vemurafenib en 2012 puis le dabrafenib en 2013, et un troisième médicament est actuellement disponible sous autorisation temporaire d'utilisation (ATU) : l'encorafenib. Les inhibiteurs de MEK (MEKi) sont apparus sur le marché juste après le dabrafenib. Ce sont des inhibiteurs allostériques réversibles et hautement sélectifs de l'activation du signal régulé par MEK1 et MEK2, inhibant l'activation de MEK par BRAF et l'activité kinase de MEK. Le trametinib est le premier MEKi à avoir obtenu une AMM (en 2013), d'abord en monothérapie puis en association au dabrafenib pour le traitement des mélanomes métastatiques mutés BRAF V600. Le cobimetinib a obtenu une AMM en 2015 pour le traitement des mélanomes métastatiques mutés BRAF V600, uniquement en association avec le vemurafenib. Le binimetinib est un troisième MEKi en ATU en association avec l'encorafenib.

Pour le traitement des mélanomes mutés NRAS, les données actuelles de la littérature sur les MEKi chez les malades NRAS mutés ne montrent pas de bénéfice en survie globale mais des taux de réponses élevés et un bénéfice en survie sans progression ¹.

Les mutations de c-Kit sont très rares et les essais thérapeutiques avec les anti-c-Kit portent sur des études de phases II/III montrant des taux de réponses de 20 à 53 % avec l'imatinib et inférieurs à 30 % avec le nilotinib ⁵¹⁻⁵⁴. Pour les mutations de c-Kit et de NRAS : aucun médicament ciblant ces mutations n'a actuellement l'AMM dans le mélanome.

4.1. Pharmacologie des traitements inhibiteurs de la voie des MAPK

4.1.1. Structure chimique

Les BRAFi et MEKi ont des structures polycycliques, de masses moléculaires comprises entre 440 et 615. Ce sont des bases faibles (Figure 5).

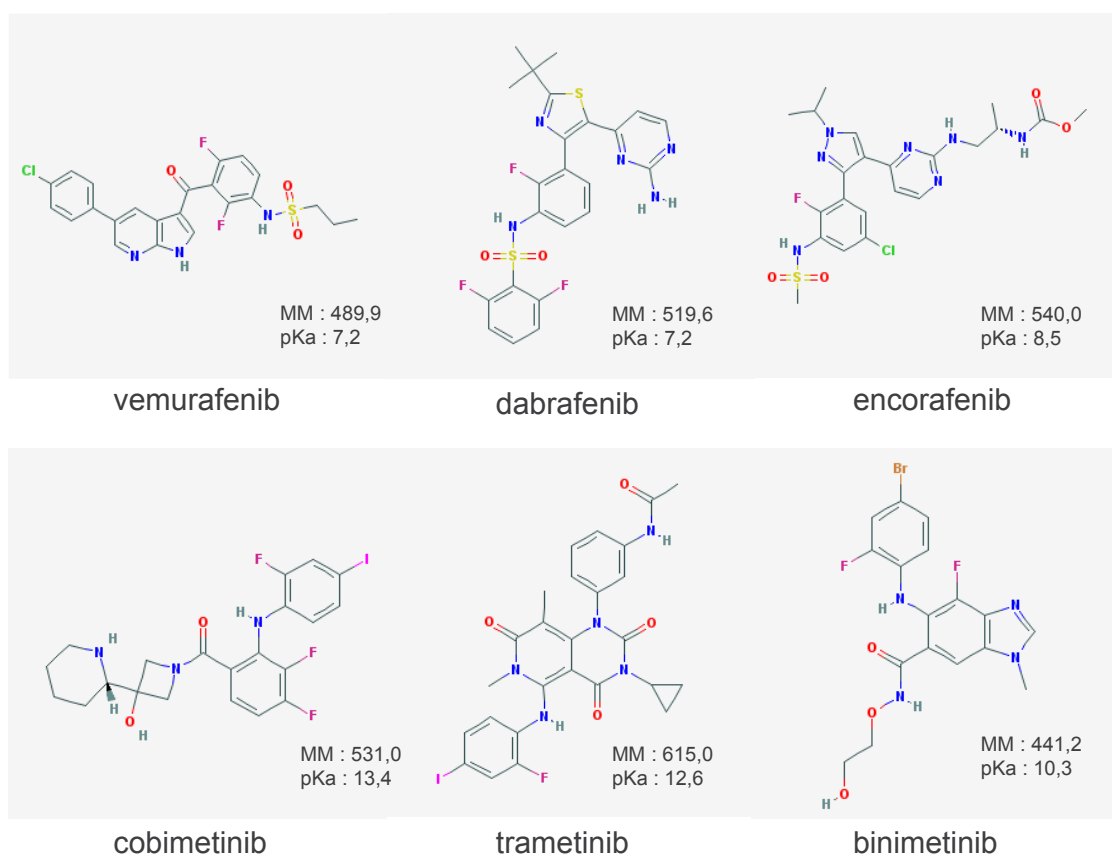


Figure 5. Structure chimique des BRAFi (vemurafenib, dabrafenib et encorafenib) et MEKi (cobimetinib, trametinib et binimetinib).

MM : Masse Moléculaire ; Ka : constante d'acidité

4.1.2. Particularités pharmacocinétiques des BRAFi et MEKi

Tous ces médicaments présentent des caractéristiques pharmacocinétiques susceptibles de varier au cours du temps et entre les individus ⁵⁵. La recherche de dose a été conçue pour donner une même dose à tous les patients. Or ces médicaments sont fortement métabolisés par le CYP450, à l'origine d'une grande variabilité interindividuelle des concentrations plasmatiques pour une même dose. Les variations de concentrations plasmatiques peuvent s'expliquer par différents facteurs (Figure 6) :

- une mauvaise observance des posologies,
- des facteurs de variations d'origine démographique, comme le sexe, l'âge, le poids, la surface corporelle, etc.,
- des différences d'absorption au niveau du tractus gastro-intestinal,
- une variabilité intrinsèque dans l'activité des enzymes du métabolisme (CYP3A4) ou des interactions médicamenteuses sur ces enzymes,
- des différences de liaisons protéiques,
- des différences de pénétration et d'efflux des molécules au niveau des cellules.

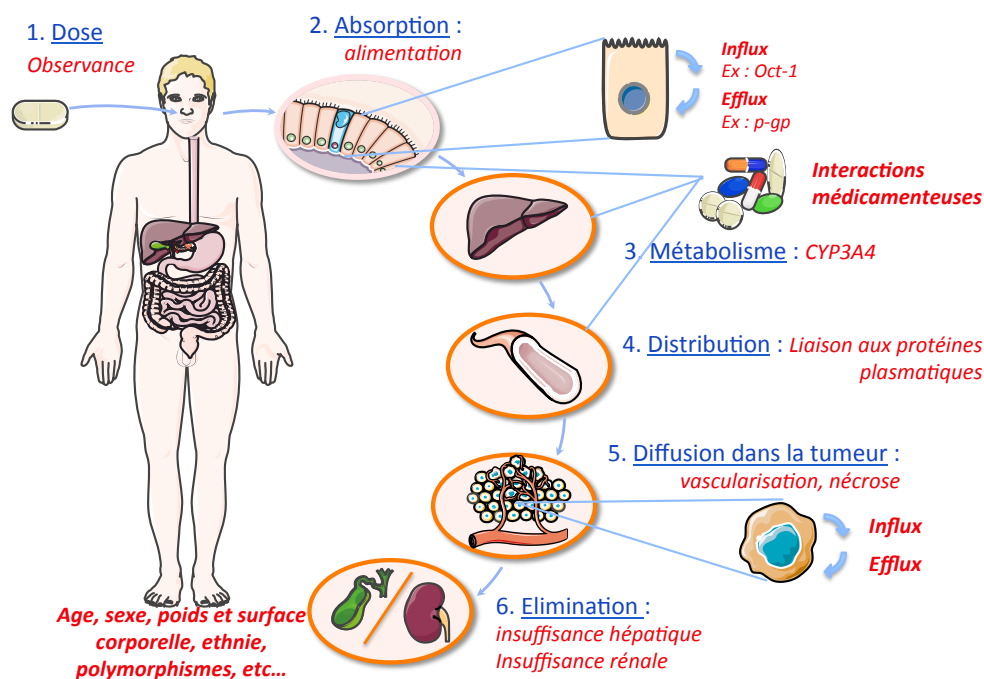


Figure 6. Facteurs influençant la pharmacocinétique des inhibiteurs de protéines kinase. (adaptée d'Apperley ⁵⁶)

En bleu : phases pharmacocinétiques des inhibiteurs de protéines kinase

En rouge : facteurs associés susceptibles de les modifier

BRAF inhibiteurs (BRAFi)

Le vemurafenib est une molécule de très faible solubilité ⁵⁷, dont la biodisponibilité est inconnue et qui présente une variabilité interindividuelle élevée ^{58,59} (Tableau 2). L'absorption du vemurafenib est augmentée en cas d'administration avec un repas riche en graisse ⁶⁰. Le vemurafenib est principalement métabolisé par le CYP 3A4, c'est un substrat des P-gp (transporteur d'efflux P-glycoprotéine) et BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) ⁶¹, à l'origine de grandes variabilités interindividuelles de l'exposition. Sa longue demi-vie peut être à l'origine d'une accumulation.

L'absorption du dabrafénib est influencée par la prise simultanée avec l'alimentation, qui induit une diminution des concentrations plasmatiques. Il est principalement métabolisé par les cytochromes CYP2C8 et CYP3A4 en hydroxy-dabrafénib, ensuite oxydé par le CYP3A4 pour former le carboxy-dabrafénib ⁶². Le carboxy-dabrafénib peut être décarboxylé par un processus non-enzymatique pour former le déméthyl-dabrafénib (Figure 7). L'hydroxy- et le déméthyl-dabrafénib contribuent probablement à l'activité clinique du dabrafénib ; alors qu'il est peu probable que l'activité du carboxy-dabrafénib soit significative ⁶³. L'exposition au dabrafénib (C_{max} et Aire sous la courbe) n'est pas proportionnelle à la dose. Une diminution de l'exposition a été observée avec les doses répétées, probablement due à l'induction de son propre métabolisme ^{64,65}.

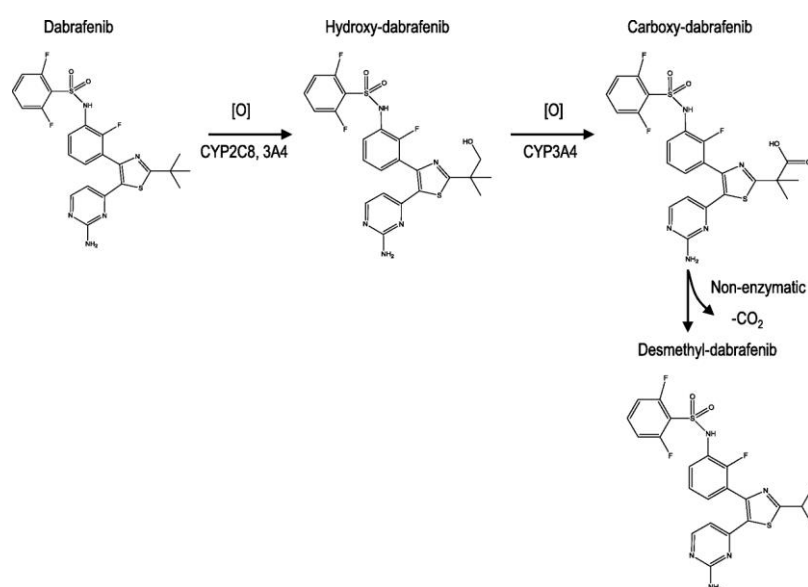


Figure 7. Métabolisme du dabrafénib.

L'encorafenib est métabolisé par les cytochromes 3A4, 2C19 et 2D6 et induit son propre métabolisme. Il a une très courte demi-vie (3 à 5h) qui est contrebalancée par une longue demi-vie réceptorielle ^{66,67}.

MEK inhibiteurs (MEKi)

La biodisponibilité du cobimetinib est de seulement 46 % chez des sujets sains et cela semble être lié au métabolisme intestinal plutôt qu'à une absorption incomplète ^{68,69}. Il est fortement métabolisé par le CYP3A4 ⁷⁰, pouvant contribuer en partie à la variation d'exposition inter-patients. Le cobimetinib est un substrat des P-gp et BCRP ⁷¹.

Le trametinib a une biodisponibilité modérée (72%) et n'est pas métabolisé par le CYP450 ⁷². On s'attend donc à une moindre variabilité interindividuelle des concentrations plasmatiques pour une même dose donnée. En revanche sa demi-vie est très longue (127h) pouvant poser des problèmes d'accumulation.

L'absorption du binimetinib est retardée en cas d'administration concomitante avec la nourriture cependant l'absorption totale n'est pas modifiée. Il est principalement métabolisé par l'UDP glucuronyl transférase 1A1 et d'autres voies via lesquelles il subit une N-désalkylation et hydrolyse. Le métabolisme par le CYP1A2 et le CYP2C19 compte pour moins de 20% ⁷³ et engendre un métabolite actif ⁷⁴.

Les longues demi-vies du vemurafenib, cobimetinib et trametinib peuvent être à l'origine d'une accumulation susceptible d'entraîner une toxicité.

Tous ces inhibiteurs de protéine kinase sont très fortement liés aux protéines plasmatiques (jusqu'à 99 % et plus). Or, tout facteur susceptible de modifier la concentration des protéines plasmatiques ou de déplacer la liaison protéine-médicament peut diminuer ou fortement augmenter la fraction libre de ces traitements. Il peut également y avoir compétition entre BRAFi et MEKi (tous 2 fortement liés aux protéines plasmatiques) au site de liaison des protéines plasmatiques lors d'un traitement par bithérapie.

Tableau 2. Paramètres pharmacocinétiques des BRAFi et MEKi.

Médicament	Absorption	Distribution	Métabolisme	Excrétion	Élimination T _{1/2}
	F	LPP			
Vemurafenib ZELBORAF®	Inconnue ● ↗	>99 %	hépatique via CYP3A4 Substrat des P-gp et BCRP	Biliaire: (>90 %)	50 h
Dabrafenib TAFINLAR®	95% ● ↗	~99,7 %	hépatique via CYP3A4 & CYP2C8 2 métabolites actifs	Biliaire: 71 % Urinaire: 23%	8 - 10 h
Encorafenib BRAFTOVI®	85% Pas d'effet de la ●	86%	CYP3A4 ; CYP2C19 ; CYP2D6	Biliaire et urinaire	3 – 5 h
Cobimetinib COTELLIC®	46%	95 %	hépatique via CYP3A4 & UGT2B7 Substrat des des P-gp et BCRP	Biliaire: (>90 %)	43 h
Trametinib MEKINIST®	72%	97,4	hépatique via désacétylation (CYP3A4 mineur)	Biliaire: 80% Urinaire: 19%	127h
Binimetinib MEKTOVI®	> 50%	97%	UGT1A1 (60%), déméthymation et glucuronidation CYP450 (< 20%) 1 métabolite actif	Biliaire: 62% Urinaire: 38%	5h

4.1.3. Pharmacodynamie et données cliniques

BRAF inhibiteurs (BRAFi)

Ces inhibiteurs se lient au domaine de liaison à l'ATP de BRAFV600, inhibant ainsi son activité kinase et la voie MAPK en aval. Ces médicaments sont associés à des toxicités spécifiques telles que la formation de carcinomes épidermoïdes cutanés secondaires ⁷⁵ et le développement rapide de mécanismes de résistance.

Vemurafenib

Le vemurafenib est un inhibiteur de la sérine-thréonine kinase BRAF. Des données précliniques issues de tests biochimiques ont démontré que le vemurafenib pouvait inhiber de manière puissante la forme activée des protéines kinases BRAF porteuses de mutations au niveau du codon 600 (Tableau 3). Cet effet inhibiteur a été confirmé par les tests de phosphorylation de ERK et d'anti-prolifération cellulaire sur des lignées cellulaires de mélanome exprimant des mutations BRAF V600. Dans les tests d'anti-prolifération cellulaire, la concentration inhibitrice 50 (CI 50) sur les lignées cellulaires mutées V600 (V600E, V600R,

V600D et V600K) variait de 0,016 à 1,131 μM alors que les CI 50 sur les lignées cellulaires BRAF de type sauvage étaient de respectivement 12,06 μM et 14,32 μM ⁷⁶.

Une étude de phase III (BRIM3), multicentrique, internationale, randomisée, menée sur 675 patients comparait le vemurafenib à la dacarbazine. Au total, 337 patients ont reçu le vemurafenib (960 mg x2/j) et 338 ont reçu la dacarbazine (1000 mg/m²). Dans cette étude les patients étaient caucasiens (99 %), d'âge médian de 54 ans et présentaient un indice de performance Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) de 0 ou 1, et majoritairement une maladie au stade M1c (65 %). La survie globale médiane était significativement plus longue dans le groupe vemurafenib que dans le groupe dacarbazine (13,6 mois vs 9,7 mois, HR : 0,70 [95% IC 0,57-0,87]; p = 0,0008), tout comme la médiane de survie sans progression (5,3 mois vs 1,6 mois, HR : 0,26 [IC 95% 0,20-0,33], p < 0,001). Le taux de réponse globale était de 48,4% dans le bras vemurafenib versus 5,5% dans le bras dacarbazine (p < 0,0001) ^{9,77}.

Tous les patients ont présenté des effets indésirables, les événements de grade 3-4 les plus fréquents dans le groupe vemurafenib étaient les carcinomes épidermoïdes cutanés (19%), les kératoacanthomes (10%), les éruptions cutanées (9%) et les anomalies du bilan hépatique (11%). Une diminution de posologie du fait de la survenue d'effet indésirable était nécessaire dans 38% des cas et le traitement a dû être interrompu dans 7% des cas ⁹.

Une étude multicentrique de phase II du vemurafenib chez des patients (n=146) avec métastases cérébrales porteurs d'une mutation BRAF V600 définissait 2 cohortes selon un traitement local préalable des métastases cérébrales ou non. Les patients étaient principalement des hommes (61,6%), majoritairement caucasiens (92,5%), et l'âge médian était de 54 ans. Le nombre médian de lésions cérébrales cibles à l'état initial était de 2 (variant de 1 à 5), dans les deux cohortes. La survie médiane globale était de 9,6 mois et la médiane de survie sans progression était de 3,7 mois. Le taux de réponse globale était de 17,8%. Il n'y avait pas de différences significatives en termes de survie entre les deux cohortes ⁷⁸.

Dabrafenib

Le dabrafenib est un inhibiteur réversible, puissant et compétitif de l'ATP qui inhibe sélectivement la kinase BRAFV600. La concentration du médicament nécessaire pour inhiber 50% de l'activité de kinase de BRAFV600E (CI50) est cinq fois inférieure à celle de BRAF sauvage ou de CRAF (Tableau 3) ⁷⁹. Le dabrafenib a démontré la suppression d'un biomarqueur pharmacodynamique d'aval (ERK phosphorylé) et une inhibition de la prolifération de lignées cellulaires de mélanome exprimant la mutation BRAF V600, *in vitro* et dans les modèles animaux. Chez les sujets atteints de mélanome porteurs d'une mutation BRAF V600, l'administration du dabrafenib a entraîné l'inhibition de la phosphorylation de ERK dans les cellules tumorales comparativement à l'activité initiale.

Une étude de phase III (BREAK 3), multicentrique, internationale, randomisée, menée sur 250 patients comparait le dabrafenib à la dacarbazine. 187 patients ont reçu le dabrafenib (150 mg x2/j) et 63 ont reçu la dacarbazine (1000 mg/m²). Dans cette étude les patients étaient caucasiens (99,6 %), d'âge médian de 52 ans et présentaient un indice de performance ECOG de 0 ou 1, et majoritairement une maladie métastatique (97 %). La survie globale médiane était significativement plus longue dans le groupe dabrafenib que dans le groupe dacarbazine (18,2 mois vs 15,6 mois, HR : 0,76 [95% IC 0,48-1,21]), tout comme la médiane de survie sans progression (6,9 mois vs 2,7 mois, HR : 0,37 [IC 95% 0,23-0,57], p <0,0001) ⁸⁰. Le taux de réponse globale était de 59%.

Des effets indésirables liés au traitement (grade 2 ou plus) sont survenus chez 53% des patients ayant reçu du dabrafenib. Les 4 effets indésirables principaux dans le groupe dabrafenib étaient : hyperkératose (39%), céphalées (35%), arthralgie (35%) et fièvre (32%). Parmi les effets indésirables de grade 3-4, on retrouvait les carcinomes épidermoïdes cutanés, les kératoacanthomes et la fièvre. Une adaptation de dose était requise chez 28% des patients, et 3% des patients ont dû interrompre le traitement en raison de la survenue d'effets indésirables ¹⁰.

L'essai de phase II du dabrafenib chez des patients avec métastases cérébrales (BREAK-MB) définissait deux cohortes selon un traitement local préalable des métastases cérébrales (A) ou non (B). Les patients mutés BRAFV600E présentaient une réponse intracérébrale de

39,2% dans la cohorte A versus 30,8% dans la cohorte B. La médiane de survie sans progression était supérieure à 16 semaines et la survie globale était supérieure à 31 semaines dans les deux cohortes pour les patients mutés BRAFV600E ⁷.

Encorafenib

L'encorafenib est un inhibiteur puissant et compétitif de l'ATP qui inhibe la kinase BRAFV600E. Il inhibe la prolifération de lignées cellulaires de mélanome exprimant la mutation BRAF V600, *in vitro* et dans les modèles animaux ^{67,81}.

Dans une étude de phase III, randomisée, en aveugle, menée chez des patients atteints d'un mélanome cutané non résecable (stade IIIB ou C) ou métastatique (stade IV) porteur d'une mutation BRAF V600E/K, l'encorafenib (300mg/j) en monothérapie constituait un bras comparateur versus vemurafenib (960mg x2/j) en monothérapie et versus bithérapie par encorafenib (450mg/j) + binimetinib (45mg x2/j). Au total 577 patients ont été randomisés 1:1:1, dont 194 dans le groupe encorafenib en monothérapie. Dans ce groupe, la majorité des patients étaient des hommes (68 %) de type caucasien, avec un âge médian de 54 ans et une maladie M1c de stade IV (62 %). La plupart des patients avaient à l'inclusion, un taux de LDH $\leq$ LNS (limite normale supérieure) (76 %), un indice de performance ECOG de 0 ou 1 et une mutation BRAF V600E (89 %). La médiane de survie sans progression était de 9,6 mois dans le groupe encorafenib en monothérapie versus 7,3 mois dans le groupe vemurafenib en monothérapie (HR 0,75 (0,56-1,00) p=0,051). La survie globale était plus longue dans le groupe encorafenib en monothérapie que dans le groupe vemurafenib en monothérapie 23,5 mois versus 16,9 mois. Le taux de réponse globale était de 51% dans le groupe encorafenib ^{82,83}.

Les principaux effets indésirables dans le groupe encorafenib étaient : alopecie (56 %), érythrodysesthésie palmo-plantaire (38 %), hyperkératose (35 %), arthralgie (35 %) et nausée (34 %). Les principaux effets indésirables de grade 3 étaient : érythrodysesthésie palmo-plantaire (14 %), myalgies (10 %) et arthralgie (9 %). La survenue d'effet indésirable grave a nécessité une diminution de posologie dans 71 % des cas dans le groupe encorafenib

Effet prolifératif des 3 BRAFi

De manière assez surprenante, les BRAFi induisent la formation de lésions cutanées prolifératives de type carcinome épidermoïde et kératoacanthome. Ces lésions présentent généralement une croissance très rapide, décrite comme « éruptive », mais sont très bien maîtrisées par la chirurgie ⁸⁴. Une des explications de l'apparition de ces lésions est l'activation paradoxale de la voie MEK/ERK qui survient après l'inhibition de B-RAFV600E. En présence de BRAFi et de RAS activé, BRAF forme avec CRAF un hétérodimère qui déclenche l'activation de la voie MEK/ERK à l'origine des pathologies prolifératives ⁸⁵. Une autre explication est une inhibition d'une unité RAF liée au BRAFi accompagnée d'une activation de la seconde unité du dimère (c'est la *transactivation*), qui lui-même peut ensuite activer les voies sous-jacentes (Figure 8) ⁸⁶. Si l'on augmente les doses d'inhibiteur, toutes les kinases RAF sont saturées d'inhibiteur, et l'effet paradoxal disparaît. En cas de mutation RAF V600E, il n'y a pas besoin de formation de dimère pour activer les voies sous-jacentes, ce qui explique pourquoi ces kinases sont particulièrement sensibles aux BRAFi.

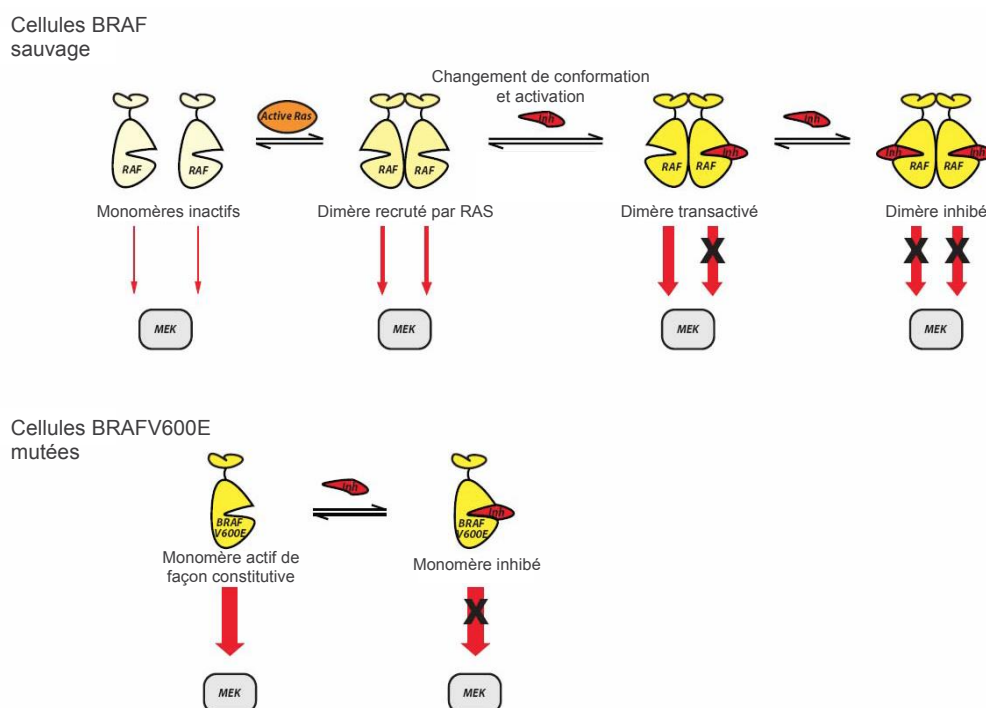


Figure 8. Activation paradoxale de MEK puis ERK dans les cellules BRAF sauvage.
D'après Poulikakos *et al.* ⁸⁶

Cette découverte a des répercussions cliniques importantes: elle confirme la nécessité d'utiliser les BRAFi uniquement en cas de mutation de BRAF.

Si l'on s'intéresse aux concentrations inhibitrices des BRAFi sur les différentes kinases RAF, le dabrafenib est plus sélectif pour BRAF muté que les autres kinases (Tableau 3). Le vemurafenib a une bonne sélectivité pour BRAF muté par rapport au BRAF sauvage en revanche ce n'est pas le cas par rapport au CRAF sauvage. L'encorafenib a des CI50 du même ordre de grandeur pour les 3 kinases. Etant donné que les effets indésirables cutanés prolifératifs des BRAFi ont été reliés à une activation paradoxale de la voie MAPK dans les cellules ne présentant pas de mutation BRAF, on s'attend à plus d'activation paradoxale avec le vemurafenib et le dabrafenib qu'avec l'encorafenib (qui inhibe tout de même BRAF WT à faible concentration) ⁸⁷.

Tableau 3. Concentrations inhibitrices des BRAFi en fonction du type de kinase RAF.

Protéine Kinase	Fréquence estimée dans les mélanomes porteurs de mutations V600	Concentration inhibitrice 50 (nM) (CI50) du vemurafenib	Concentration inhibitrice 50 (nM) (CI50) du dabrafenib	Concentration inhibitrice 50 (nM) (CI50) de l'encorafenib
BRAFV600E	87,3%	10,0	0,6	0,4
BRAFV600K	7,9%	7,0	0,5	ND
BRAFV600D	<0,2%	7,0	1,8	ND
BRAF WT*	N/A	39,0	5,0	0,5
CRAF WT*	N/A	5,0	5,0	0,3

*WT : wild type, signifie non muté. N/A : non applicable. ND : non déterminé

Emergence de mécanismes de résistance aux BRAFi

Alors que le traitement par inhibiteur de BRAF est associé à un bénéfice clinique chez la majorité des patients atteints d'un mélanome à mutation BRAF V600E, la résistance au traitement et la progression tumorale se produisent chez presque tous les patients, généralement la première année^{9,88}. De nombreux mécanismes ont été impliqués dans la résistance primaire et acquise aux inhibiteurs de BRAF, principalement par la réactivation de la voie MAPK et d'autres voies de signalisation cellulaire (Figure 9).

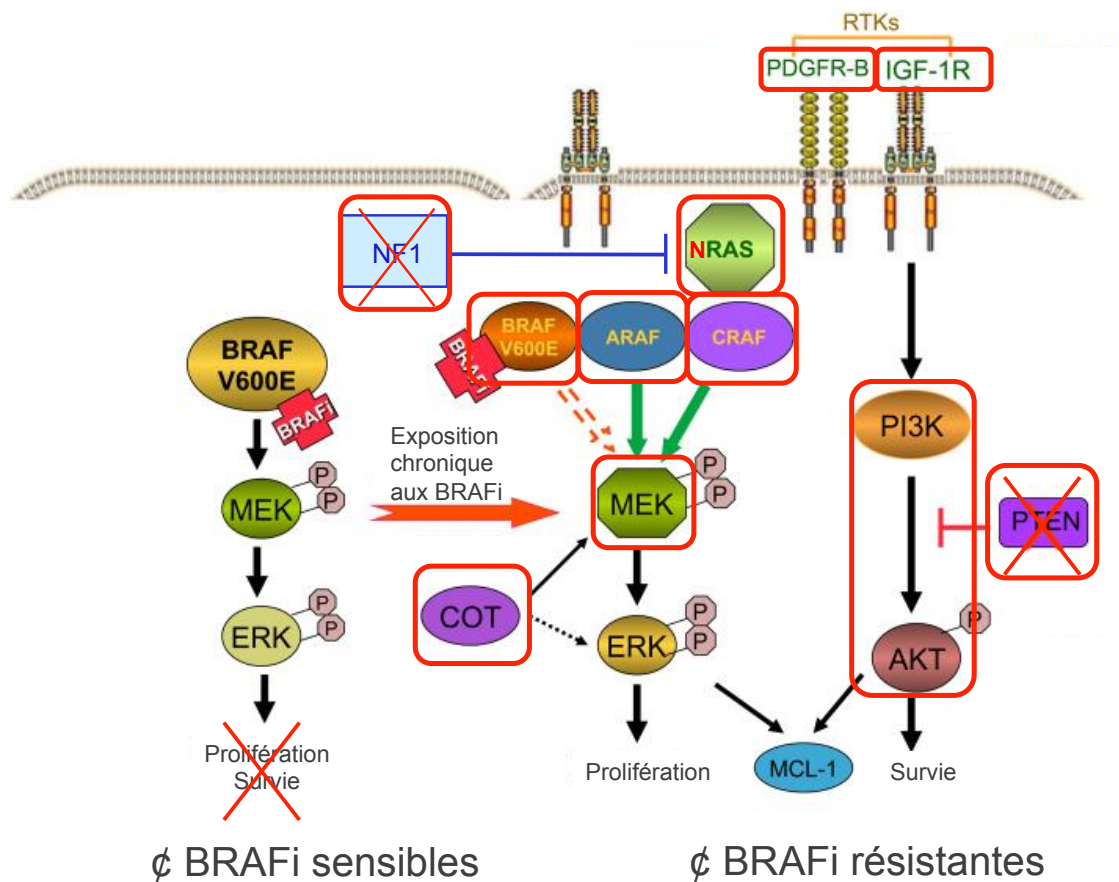


Figure 9. Schéma simplifié des voies de signalisation conduisant à la résistance aux BRAFi.
Adapté de Villanueva. *et al.*⁸⁹

Dans les cellules de mélanome mutées BRAF V600E (à gauche), l'inhibition de BRAF entraîne un arrêt de croissance et une apoptose en bloquant la voie MAPK. Après inhibition chronique de BRAF, les cellules résistantes (à droite) développent un ensemble de mécanismes compensatoires, comprenant la surexpression de PDGFR β et IGF1R ; la perte de fonction NF1 ; l'acquisition de mutations NRAS ; l'amplification du gène BRAF V600 muté ; la

surexpression ARAF/CRAF ; l'acquisition de mutations MEK1 ; la surexpression de COT ; l'acquisition de mutations PI3K / AKT pour favoriser la survie cellulaire ; et la perte de PTEN, entraînant l'activation de la voie PI3K.

Les fréquences de chacun de ces mécanismes de résistance ne sont pas parfaitement connues. Des auteurs ont proposé que les mutations MEK1 dans les tumeurs mutées BRAF V600E confèrent une résistance à l'inhibition de BRAF ^{90,91}. Tandis que d'autres suggèrent que les mutations MEK1 ne jouent pas de rôle significatif dans la sensibilité ou la résistance à l'inhibition de BRAF et de MEK1 ⁴⁵. Le traitement d'association de première intention par BRAFi et MEKi peut retarder ou prévenir certains des mécanismes ci-dessus ⁹². De plus, les inhibiteurs de BRAF ont été étudiés en association aux MEKi dans des sous-groupes de patients atteints d'un mélanome BRAF V600E précédemment résistant aux inhibiteurs de BRAF ⁹³⁻⁹⁵.

MEK inhibiteurs (MEKi)

MEK est une sérine/thréonine et une tyrosine kinase, elle existe sous deux isoformes

MEK1 et MEK2 (mitogen-activated extracellular signal regulated kinases 1 et 2). Elles sont très spécifiques, à ce jour un seul substrat est connu : la protéine ERK sous ses deux isoformes ERK1 et ERK2 (extracellular signal related kinase). L'activation constitutive de MEK est due à des stimuli en amont de la voie de signalisation tels que des mutations au niveau des récepteurs de tyrosine kinase, de RAS ou de BRAF. Les inhibiteurs connus de MEK sont des inhibiteurs allostériques, ils ne se fixent pas dans la poche ATP ce qui explique leur fort degré de spécificité vis-à-vis de MEK.

Cobimetinib

Le cobimetinib, est un inhibiteur allostérique, sélectif et réversible qui bloque la voie des MAPK en ciblant MEK1 et MEK2, conduisant à une inhibition de la phosphorylation de ERK1 et ERK2 (extracellular signal-related kinases). En conséquence, le cobimetinib bloque la prolifération cellulaire induite par la voie MAPK en inhibant le nœud de signalisation MEK1/2. Le cobimetinib n'a pas été utilisé en monothérapie mais directement en association avec un BRAFi : le vemurafenib (détail ci-après).

Trametinib

Le trametinib est un inhibiteur allostérique, réversible et hautement sélectif de l'activation du signal régulé par MEK 1 et MEK2 et de l'activité des kinases. Les protéines MEK sont des composantes de la voie régulée par la kinase ERK. Dans le mélanome et d'autres cancers, cette voie est souvent activée par des formes mutées de BRAF qui activent MEK. Le trametinib inhibe l'activation de MEK par BRAF et inhibe l'activité de la kinase MEK. Le trametinib inhibe la prolifération de lignées cellulaires de mélanome exprimant la mutation BRAF V600 et a démontré des effets anti-tumoraux dans les modèles animaux porteurs d'un mélanome avec une mutation BRAF V600 ⁹⁶.

Chez les patients atteints d'un mélanome porteur des mutations BRAF et NRAS, l'administration de trametinib a montré des modifications doses-dépendantes des biomarqueurs tumoraux dont une inhibition de ERK phosphorylée, une inhibition de Ki67 (un marqueur de prolifération cellulaire) et une augmentation de p27 (un marqueur de l'apoptose). Les concentrations moyennes de trametinib observées à la suite d'une administration de doses répétées de 2 mg une fois par jour ont dépassé la concentration-cible préclinique lors des dosages effectués sur une période de 24h, permettant une inhibition durable de la voie MEK.

L'efficacité et la sécurité du trametinib ont été évaluées chez des patients atteints d'un mélanome porteur d'une mutation BRAF (V600E et V600K) dans une étude de phase III (METRIC), randomisée comparant le trametinib (2 mg par jour) (N=214) à la dacarbazine (1000 mg/m²) ou le paclitaxel (175 mg/m²) (N=108) chez des patients atteints d'un mélanome porteur d'une mutation BRAF V600E/K, à un stade avancé ou métastatique et sans antécédent de métastases cérébrales. Dans cette étude 54 % des patients étaient de sexe masculin et tous étaient caucasiens. L'âge médian était de 54 ans (22 % ≥ 65 ans) ; l'ensemble des patients avaient un indice de performance ECOG de 0 ou 1 et 3 % présentaient des antécédents de métastases cérébrales. La plupart des patients (87 %) de la population en intention de traiter avaient une mutation BRAF V600E et 12 % une mutation BRAF V600K. La majorité des patients (66 %) n'avait jamais reçu de chimiothérapie pour le traitement de leur cancer avancé ou métastatique. La médiane de survie globale était de 15,6 mois dans le groupe trametinib versus 11,3 dans le groupe chimiothérapie (cependant

ces résultats étaient biaisés par la possibilité de cross-over) et la médiane de survie sans progression était de 4,8 mois pour le trametinib versus 1,5 mois pour le groupe chimiothérapie (HR 0,45 (IC 95% 0,33-0,63) $p < 0,001$). Le taux de réponse globale au trametinib était de 22% ⁹².

Les effets indésirables les plus fréquents dans le groupe trametinib étaient les éruptions cutanées (57%), diarrhée (43%), asthénie (26%), et œdème périphérique (26%). Une diminution asymptomatique et réversible de la fraction d'éjection cardiaque (7%) et 2 cas de toxicité cardiaque de grade 3 ont été rapportés. Des cas de toxicité oculaire ont également été rapportés. Les tumeurs cutanées secondaires (retrouvées lors d'un traitement par BRAFi) n'ont pas été observées. La survenue d'effets indésirables a entraîné une interruption de traitement dans 35% des cas une réduction de la dose dans 27% des cas.

Binimetinib

Le binimetinib est un inhibiteur non compétitif de l'ATP qui inhibe la kinase MEK actuellement sous ATU en association avec l'encorafenib pour le traitement des mélanomes métastatiques mutés BRAFV600 (détail ci-après). Son efficacité en monothérapie a été testée non pas sur les mélanomes porteurs de la mutation BRAFV600 mais sur les mélanomes mutés NRAS avec pour comparateur la dacarbazine. Dans l'étude de phase III (NEMO), 402 patients ont été recrutés et assignés au hasard, 269 au binimetinib (45mg x2/j) et 133 à la dacarbazine (1000mg/m²). La médiane de survie sans progression était de 2,8 mois sous binimetinib versus 1,5 mois dans le groupe dacarbazine (HR 0,62 [IC95% 0,47-0,80]; $p < 0,01$). Les données de survie globale ne différaient pas d'un groupe à l'autre : 9,4 mois dans le groupe binimetinib versus 9,3 mois dans le groupe dacarbazine. Le taux de réponse globale était de 41% dans le groupe binimetinib. Les principaux effets indésirables de grade 3-4 étaient : augmentation de la créatine phosphokinase (19%), anémie (2%) et neutropénie (1%). Une réduction de dose pour effet indésirable était nécessaire chez 61 % des patients ⁹⁷.

Associations BRAFi + MEKi

Vemurafenib + cobimetinib

Dans les modèles précliniques, l'association de cobimetinib au vemurafenib a montré que cibler simultanément les protéines BRAF V600 mutées et MEK des cellules du mélanome inhibait la réactivation de la voie MAPK par l'intermédiaire de MEK1/2, conduisant au renforcement de l'inhibition du signal intracellulaire et à la diminution de la prolifération des cellules tumorales.

L'étude de phase III (coBRIM), multicentrique, randomisée, en double aveugle, avait pour objectif d'évaluer la sécurité et l'efficacité du cobimetinib en association avec le vemurafenib, par rapport à vemurafenib plus placebo, chez des patients atteints de mélanome localement avancé non résecable (stade IIIc) ou métastatique (stade IV) porteur d'une mutation BRAF V600 non préalablement traités. Dans cette étude, 495 patients ont été inclus, 247 ont reçu vemurafenib (960mg x 2/j) + cobimetinib (60 mg/j 21j/28) et 248 ont reçu vemurafenib + placebo. L'âge médian était de 55 ans, le statut ECOG de 0 ou 1, 60 % des patients présentaient un mélanome métastatique de stade M1c et la proportion de patients présentant une LDH élevée était de 46,3 % dans le bras cobimetinib associé au vemurafenib et de 43,0 % dans le bras placebo associé au vemurafenib. La médiane de survie sans progression était de 12,3 mois pour le bras vemurafenib + cobimetinib versus 6,2 mois pour le bras placebo associé au vemurafenib (HR 0,58 (0,46-0,72) $p < 0,0001$).

Le taux de réponse objective était de 87 % chez les patients naïfs de traitement par BRAFi (n=63) (69,6% tous patients confondus), dont 16 % avaient présenté une réponse complète. La médiane de survie globale était de 22,3 mois dans le groupe bithérapie versus 17,4 mois dans le groupe vemurafenib + placebo (HR 0,70, IC 95% 0, 55-0,90 ; $p = 0,005$).

Les événements indésirables de grade 3-4 survenant à une fréquence plus élevée chez les patients du groupe vemurafenib + cobimetinib par rapport au groupe vemurafenib étaient l'augmentation de la γ -GT (15% versus 10%), l'augmentation de la CPK sanguine (12% vs <1%) et l'augmentation de l'alanine transaminase (11% vs 6%). La majorité des patients avaient présenté des effets indésirables (98%) toutes gravité confondues. Des événements

indésirables graves sont survenus chez 37% des patients du groupe vemurafenib + cobimetinib versus 28%. La fièvre et la déshydratation étaient les effets indésirables graves les plus fréquemment signalés dans le groupe vemurafenib + cobimetinib. La fréquence des carcinomes épidermoïdes cutanés ou du kératoacanthome était plus faible chez les patients du groupe vemurafenib + cobimetinib, ce qui est en accord avec une inhibition de l'activation paradoxale de la voie MAPK en cas d'ajout d'un MEKi. Les effets indésirables spécifiques des MEKi mis en évidence dans le groupe vemurafenib + cobimetinib étaient notamment la rétinopathie séreuse, la diminution de la fraction d'éjection du ventricule gauche et l'augmentation du taux de créatine phosphokinase.

La survenue d'effets indésirables a entraîné une diminution de posologie du vemurafenib chez 35% des patients et du cobimetinib chez 30% des patients du groupe vemurafenib + cobimetinib. Dans le groupe vemurafenib + placebo, 29% des patients ont nécessité une diminution de posologie du vemurafenib pour effet indésirable et 11% pour le placebo ⁹⁸⁻¹⁰⁰.

Dabrafenib + trametinib

L'efficacité et la sécurité du trametinib (2 mg 1 fois par jour) en association au dabrafenib (150 mg 2 fois par jour) pour le traitement des patients présentant un mélanome BRAF V600 muté non résecable ou métastatique ont été étudiées au cours de deux études de phase III et une étude de support de phase I/II.

COMBI-D était une étude de phase III, randomisée, en double aveugle comparant l'association dabrafenib + trametinib avec le dabrafenib + placebo en première ligne de traitement chez les patients atteints d'un mélanome cutané non résecable (stade IIIC) ou métastatique (stade IV) porteur d'une mutation BRAF V600E/K. Au total 423 patients ont été randomisés 1:1 dans le bras associant dabrafenib + trametinib (N = 211) ou dans le bras dabrafenib + placebo (N = 212). La majorité des patients étaient des hommes (53 %) de type caucasien (> 99 %), avec un âge médian de 56 ans (dont 28 % ≥ 65 ans) et une maladie M1c de stade IV (67 %). La plupart des patients avaient, à l'inclusion, un taux de LDH ≤ LSN (65 %), un indice de performance ECOG de 0 ou 1 et une mutation BRAF V600E (85 %). La médiane de survie sans progression était de 11,0 mois dans le groupe bithérapie versus 8,8 mois dans le groupe dabrafenib + placebo (HR 0,67 (0,53-0,84) p=0,0004). La survie globale était plus longue dans le groupe dabrafenib + trametinib : 25,1 mois versus 18,7 mois (HR 0,71 (0,55-

0,92) $p=0,01$). Le taux de réponse objective était de 69% dans le groupe dabrafenib + trametinib et de 53% dans le groupe dabrafenib+ placebo ^{101,102}.

Des effets indésirables sont survenus chez 87 % des 209 patients du groupe dabrafenib + trametinib et chez 90% des 211 patients du groupe dabrafenib + placebo. Les effets les plus rapportés étaient : fièvre (52%), frissons, asthénie, éruption, et nausées dans le groupe dabrafenib + trametinib, et hyperkératose (33 %), asthénie, syndrome main-pied, alopecie, fièvre et arthralgie dans le groupe dabrafenib + placebo. Des effets indésirables de grade 3 ou 4 sont survenus chez 32 % patients du groupe dabrafenib + trametinib et chez 31 % patients du groupe dabrafenib + placebo ¹⁰¹⁻¹⁰³.

COMBI-V était une étude de phase III, randomisée, en double aveugle comparant l'association dabrafenib + trametinib au vemurafenib en monothérapie dans le mélanome métastatique porteur d'une mutation BRAF V600. La majorité des patients étaient des hommes (55 %) de type caucasien (> 96 %), avec un âge médian de 55 ans (dont 24 % $\geq$ 65 ans) et une maladie M1c de stade IV (61 %). La plupart des patients avaient, à l'inclusion, un taux de LDH $\leq$ LSN (67 %), un indice de performance ECOG de 0 à 1 et portaient une mutation BRAF V600E (89 %). Les sujets présentant des métastases cérébrales n'ont pas été inclus dans l'essai. La survie sans progression médiane était de 12,1 mois dans le groupe dabrafenib + trametinib versus 7,3 mois dans le groupe vemurafenib (HR : 0,61 (0,51-0,73) $p<0,001$). Une amélioration statistiquement significative de la survie globale a été démontrée pour les patients du bras avec l'association par rapport au bras avec le vemurafenib en monothérapie : 26,1 mois versus 18,7 mois (HR 0,68 [0,56-0,83] $p=0,005$). Le taux de réponse objective était de 64 % dans le groupe dabrafenib + trametinib et de 51 % dans le groupe vemurafenib + placebo. Les principaux effets indésirables de la bithérapie étaient : fièvre (53%), nausées (35%), diarrhée (32%), frissons (31%), asthénie (29%) et céphalées (29%). Dans le groupe vemurafenib, les effets indésirables les plus fréquents étaient ceux préalablement mis en évidence dans les études de phase 3 de la monothérapie : arthralgie, éruption cutanée, alopecie, diarrhée, nausées et fatigue. Les effets indésirables cutanés ont été plus fréquents dans le groupe vemurafenib que dans le groupe sous bithérapie, en particulier : éruption cutanée (43% contre 22%), papillomes cutanés (23% contre 2%), carcinomes épidermoïdes et kératoacanthomes (18% contre 1%)

et hyperkératose (25% contre 4%). Les effets indésirables nécessitant une réduction de dose sont survenus chez 33 % des patients traités par dabrafenib + trametinib versus 39 % dans le groupe vemurafenib ¹⁰⁴.

Encorafenib + binimetinib

Dans une étude de phase III, randomisée, en double aveugle comparant l'association encorafenib (450mg/j) + binimetinib (45mg x2/j) avec d'une part l'encorafenib (300mg/j) en monothérapie et d'autre part le vemurafenib (960mg x2/j) en monothérapie chez les patients atteints d'un mélanome cutané non résecable (stade IIIB ou C) ou métastatique (stade IV) porteur d'une mutation BRAF V600E/K. Au total 577 patients ont été randomisés 1:1:1. La majorité des patients étaient des hommes (58 %) de type caucasien, avec un âge médian de 56 ans et une maladie M1c de stade IV (64 %). La plupart des patients avaient à l'inclusion, un taux de LDH $\leq$ LNS (73 %), un ECOG de 0 ou 1 et une mutation BRAF V600E (89 %). La médiane de survie sans progression était de 14,9 mois dans le groupe bithérapie versus 9,6 mois dans le groupe encorafenib en monothérapie versus 7,3 mois dans le groupe vemurafenib en monothérapie (HR 0,75 0,56-1,00) $p=0,05$ ^{82,83}. La survie globale était plus longue dans le groupe encorafenib + binimetinib : 33,6 mois versus 23,5 mois pour l'encorafenib seul, versus 16,9 mois pour le vemurafenib seul ⁸³. Le taux de réponse globale était de 63% dans le groupe encorafenib + binimetinib versus 51% dans le groupe encorafenib et 40% dans le groupe vemurafenib.

Les principaux effets indésirables de l'association encorafenib + binimetinib étaient : nausées (42 %), diarrhée (35 %), vomissements (30 %), fatigue (27 %) et arthralgie (27 %). Les effets indésirables de grade 3 ou 4 survenus dans le groupe encorafenib + binimetinib étaient une augmentation des gamma-GT (9%), une élévation de la CPK (7%) et une hypertension (6%). Une diminution de posologie pour effet indésirable était nécessaire chez 53 % des patients traités par l'association ⁸³.

Le Tableau 4 reprend l'ensemble des informations de survie sans progression, survie globale, réponse globale, et survenue d'effet indésirable nécessitant une diminution de posologie dans les études de phase 3 citées ci-dessus.

Tableau 4. Résumé des études de phase 3 sur les inhibiteurs de BRAF et de MEK.

SSP : survie sans progression ; SG : survie globale ; RG : réponse globale ; DR : réduction de dose ; EI : effet indésirable. *biaisé par cross-over.

Nom de l'étude	Bras de traitements	Patients (n)	SSP (médiane, mois)	SG (médiane, mois)	RG (%)	DR pour EI (%)
BRIM-3	Vemurafenib 960 mg x2/j	337	5,3	13,6	48	38
	Dacarbazine 1000 mg/m ²	338	1,6	9,7	6	
BREAK-3	Dabrafenib 150 mg x2/j	187	6,9	18,2	59	28
	Dacarbazine 1000 mg/m ²	63	2,7	15,6*	24	
METRIC	Trametinib	214	4,8	15,6	22	35
	Dacarbazine 1000 mg/m ² or Paclitaxel 175 mg/m ²	108	1,5	11,3*	8	
COMBI-D	Dabrafenib 150 mg x2/j + Trametinib 2 mg/j	211	11,0	25,1	69	N.D
	Dabrafenib 150 mg x2/j	212	8,8	18,7	53	N.D
COMBI-V	Dabrafenib 150 mg x2/j + Trametinib 2 mg/j	352	12,1	26,1	64	33
	Vemurafenib 960 mg x2/j	352	7,3	17,8	51	39
coBRIM	Vemurafenib 960 mg x2/j = Cobimetinib 60 mg x2/j 21/7	247	12,3	22,3	70	30-35
	Vemurafenib 960 mg x2/j	248	7,2	17,4	50	29
COLOMBUS	Encorafenib 450 mg/j + Binimetinib 45 mg x2/j	192	14,9	33,6	63	53
	Encorafenib 300 mg/j	194	9,6	23,5	51	71
	Vemurafenib 960 mg x2/j	191	7,3	16,9	40	62

La monothérapie par BRAFi est associée à des taux de réponse objective de l'ordre de 55 % et des durées médianes de survie globale très significativement supérieures à celles de la chimiothérapie, autour de 17 mois (Tableau 4). L'association BRAFi + MEKi augmente encore le nombre de répondeurs et la durée de survie globale. Les résultats des études contrôlées randomisées COMBI-V, COMBI-D, coBRIM, et COLOMBUS montrent toutes et de manière cohérente une amélioration de la survie sans récurrence et des taux de réponses importants par rapport à la monothérapie. Il n'y a pas d'arguments dans la littérature pour préférer une association plutôt qu'une autre.

4.2. Facteurs pronostics de réponse au traitement par BRAFi + MEKi

Plusieurs études ont porté sur la détermination des facteurs pronostics la survie sans progression (SSP), la survie globale (SG) et la réponse (globale ou complète, selon RECIST) à l'initiation d'un traitement par bithérapie par BRAFi + MEKi.

Les publications sur la bithérapie par dabrafenib et trametinib rapportent les facteurs suivants :

- le taux sérique de LDH (normal versus ≥ 2 fois la limite supérieure de la normale (LSN)),
- le nombre de sites métastatiques < 3 (versus ≥ 3),
- le statut de performance ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) = 0 (versus ≥ 1),
- la somme des diamètres des lésions ≤ 45 ou 66 mm selon les publications (versus > 45 ou 66 mm resp.)
- le sexe (moins bon pronostic pour le sexe masculin) ;
- l'âge

Le facteur de risque le plus déterminant était le taux sérique de LDH (normal versus ≥ 2 fois la LSN).

Parmi les patients « progresseurs », la médiane de survie après progression était plus longue en cas de progression des lésions initiales ou de nouvelles lésions hors système nerveux central (SNC) 10,0 mois versus 4,0 mois en cas de nouvelles lésions du SNC ou de progression concomitante des lésions initiales et des nouvelles lésions.

La somme des diamètres des lésions cibles initiales était le facteur prédictif le plus puissant de réponse complète. En effet, 34% des patients présentant une somme des diamètres de lésions cibles initiales inférieure à 58 mm (et moins de trois sites métastatiques) présentaient une réponse complète. En revanche, seulement 2% des patients présentant une somme des diamètres de lésions cibles initiales d'au moins 58 mm et une concentration élevée de LDH initiale ($\geq 1 \times$ LSN) avaient obtenu une réponse complète^{105,106}.

Dans les études sur la réponse au traitement par vemurafenib + cobimetinib les facteurs prédictifs de meilleures survie sans progression et survie globale étaient :

- le taux sérique de LDH normal (versus $\geq 1\text{LSN} \leq 2\text{LSN}$ versus $> 2\text{LSN}$),
- le statut de performance ECOG = 0 (versus ≥ 1),
- la somme des diamètres des lésions SDL ≤ 44 mm (versus > 44 mm)

Pour la prédiction de la survie globale, un facteur supplémentaire était mis en avant : l'absence de métastases hépatiques (versus présence de métastases hépatiques).

Dans le sous-groupe traité par vemurafenib en monothérapie la signature génétique constituait un facteur pronostic de la survie sans progression. La signature immunitaire se traduit par forte expression des gènes immuno-régulateurs et une faible expression des gènes du cycle cellulaire tandis que la signature cycle cellulaire se traduit par une faible expression des gènes régulateurs immunitaires et une forte expression des gènes du cycle cellulaire. La signature du cycle cellulaire est caractérisée par une activité accrue des voies oncogéniques ¹⁰⁷.

Parmi les patients traités par le vemurafenib, la signature du cycle cellulaire était associée à une moins bonne survie sans progression par rapport à la signature immunitaire [HR : 1,8; IC95% (1,3-2,6), $p = 0,0001$]. La survie sans progression médiane associée à la signature immunitaire était de 7,8 mois (IC à 95%, 6,8–9,6) et celle associée à la signature du cycle cellulaire était de 5,6 mois (IC à 95%, 3,6 à 7,6). Il n'y avait pas d'impact de la signature génétique chez les patients traités par vemurafenib + cobimetinib ¹⁰⁸.

Une étude récente a évoqué le « paradoxe de l'obésité » puisqu'il a été montré que bien que l'obésité fasse partie des facteurs favorisant la survenue du mélanome ^{109,110}, elle constitue un facteur pronostic de survie sans progression et de survie globale plus longue chez les patients traités par bithérapie BRAFi + MEKi ou par immunothérapie. Comme le sexe féminin était auparavant associé de manière indépendante à une amélioration de la survie dans la cohorte traitée par dabrafenib + trametinib ¹⁰⁵, des sous-analyses par sexe ont été réalisées. Ces analyses ont montré que l'obésité était associée à une amélioration de la survie sans progression et de la survie globale chez les hommes et non pas chez les femmes (traités par dabrafenib + trametinib). La survie sans progression médiane et la survie globale étaient de

7,4 mois et de 16,0 mois respectivement pour les hommes ayant un indice de masse corporelle (IMC) normal, et de 12,8 mois et 36,5 mois respectivement pour les hommes obèses. En revanche, il n'y avait pas de différences significatives dans la SSP, la SG ou les taux de réponse par IMC chez les femmes traitées par dabrafenib + trametinib. Des différences similaires selon le sexe ont été observées chez les patients traités par vemurafenib + cobimetinib ¹¹¹.

4.3. Place des BRAFi et MEKi dans la stratégie thérapeutique

4.3.1. Traitement médical chez les malades porteurs d'une mutation BRAF

En première ligne

Une association BRAFi + MEKi est recommandée (Figure 10). Il n'y a pas d'argument pour privilégier une association plutôt qu'une autre.

L'utilisation d'un BRAFi seul n'est pas recommandée sauf en cas de contre-indication formelle, notamment cardiaque ou ophtalmologique, ou d'intolérance aux MEKi.

Chez les maladies à évolution lente et avec une masse tumorale limitée, l'utilisation d'un anti-PD1 peut être proposée.

En raison de la toxicité potentielle sévère, l'association ipilimumab-nivolumab n'est pas recommandée en 1ère ligne chez les patients BRAF mutés (avis d'experts).

En deuxième ligne

L'utilisation d'un anti-PD1 aux posologies de l'AMM est recommandée.

Si le traitement de première ligne était un anti-PD1, une combinaison BRAFi + MEKi sera proposée.

En troisième ligne

L'ipilimumab, une chimiothérapie et/ou des soins de support sont à discuter en fonction de l'état clinique du malade, son taux de LDH, son indice de performance (ECOG) et le nombre de sites métastatiques.

4.3.2. Traitement médical chez les malades BRAF sauvages

En première ligne

L'utilisation d'un anti-PD1 selon les modalités de l'AMM est recommandée (Figure 10).

L'association nivolumab et ipilimumab peut être proposée chez des patients en bon état général, porteurs de peu de comorbidités. Il est important de disposer d'un environnement médical permettant le traitement des complications. Compte tenu de la fréquence des effets secondaires de grade 3 ou 4, cette association ne doit être utilisée que par des équipes entraînées à l'utilisation de l'immunothérapie anti-cancéreuse et dans des centres disposant des ressources médicales indispensables à la gestion de ces effets indésirables (réanimation polyvalente, compétences multidisciplinaires...).

Il n'y a pas d'indication pour l'ipilimumab seul.

En deuxième ligne

L'utilisation de l'ipilimumab est recommandée selon les modalités et posologies de l'AMM.

En troisième ligne

La chimiothérapie ou des soins de support peuvent être proposés selon l'état clinique du malade, son taux de LDH, son indice de performance (ECOG) et le nombre de sites métastatiques.

4.3.3. Traitement médical chez les malades porteurs de mutations NRAS ou c-Kit

En l'absence de mutation BRAF, la recherche de mutation NRAS ou c-Kit reste du domaine de la recherche clinique.

Les malades porteurs d'une anomalie de c-Kit ou de NRAS doivent bénéficier d'un traitement de première ligne par anti-PD1. En cas d'échec, le dossier de ces malades nécessite une discussion en RCP.

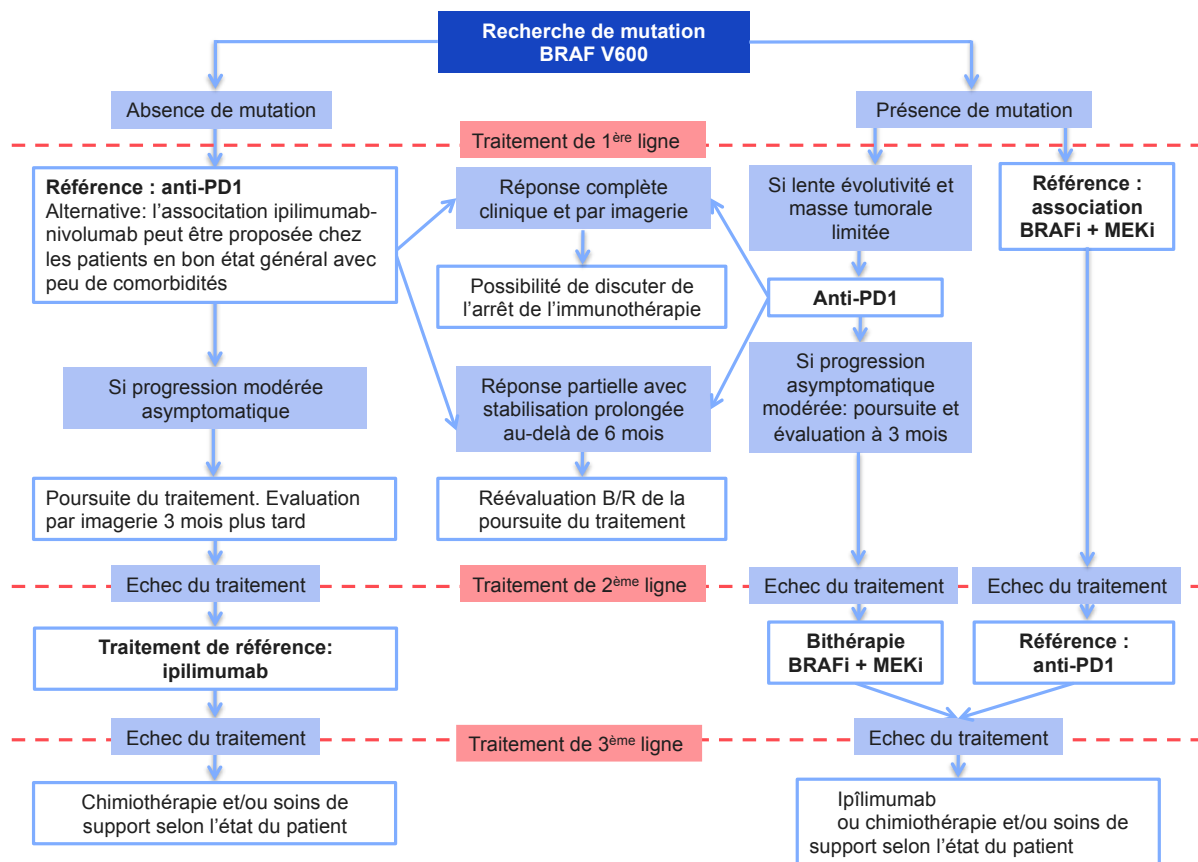


Figure 10. Arbre décisionnel de prise en charge thérapeutique des mélanomes cutanés métastatiques non résectables (stade III inopérable et stade IV) hors métastase cérébrale.

OBJECTIFS

Le traitement par association BRAFi + MEKi a permis une nette amélioration de la survie des patients atteints de mélanome métastatique. Cependant, seulement 50% des patients porteurs de la mutation BRAFV600 répondent au traitement, et 90% des patients présentent des effets indésirables, parfois très graves, nécessitant une diminution de posologie dans 33% des cas ^{9,10,92,98-103}. Le management des effets indésirables reposant sur une diminution de posologie du médicament suspect, le premier objectif de cette thèse était de définir les profils d'effets indésirables de ces médicaments en vraie-vie, dans la base de données de l'OMS : VigiBase et détecter de nouveaux signaux de pharmacovigilance pour être en mesure d'attribuer un effet indésirable à un médicament afin d'améliorer l'adaptation de la posologie.

Ces traitements sont donnés à dose identique pour tous les patients malgré leurs particularités pharmacocinétiques. On s'attend donc à une grande variabilité inter-individuelle des concentrations plasmatiques pour une même dose, comme présenté en introduction. Or il a été démontré dans plusieurs études sur les inhibiteurs de protéines kinases que l'efficacité et la toxicité sont liées à la concentration plasmatique plutôt qu'à la dose administrée ¹¹²⁻¹¹⁵. Nous avons donc pour objectifs de mettre au point une méthode de dosage fiable et robuste permettant de mesurer la concentration plasmatique de tous les BRAFi et MEKi, puis de constituer une base de données rassemblant les concentrations mesurées et les paramètres cliniques des patients afin de déterminer une zone thérapeutique pour ces médicaments et envisager dans un second temps une individualisation du traitement afin d'en améliorer le bénéfice.

PARTIE EXPERIMENTALE

1. Matériel et méthode

1.1. Analyse des effets indésirables des BRAFi et MEKi dans Vigibase

La base internationale de pharmacovigilance Vigibase comprend les données des notifications spontanées d'effets indésirables de 120 pays correspondant, au 1^{er} janvier 2018, à plus de 16 millions de cas de pharmacovigilance. Elle permet donc d'étudier la sécurité d'emploi de toutes les thérapies ciblées, y compris les moins fréquemment utilisées, quelles que soient la pratique courante ou les spécificités régionales. C'est pourquoi nous avons utilisé cette base de données plutôt que la base nationale de pharmacovigilance pour notre étude ^{116,117}.

La tutelle du CRPV nous permet d'accéder à un portail internet pour identifier les cas intéressants pour l'étude, cependant l'extraction est limitée à 1000 cas. Au-delà, il est possible de demander l'extraction auprès de l'Uppsala Monitoring Centre (UMC). Une recherche préliminaire dans Vigibase nous a permis d'identifier plus de 10000 cas de pharmacovigilance, permettant une puissance statistique suffisante pour les analyses comparatives et de disproportionnalité pour chaque thérapie ciblée.

Nous n'avons analysé que les effets indésirables considérés comme graves dans notre étude puisque ce sont ceux qui nécessitent une diminution de posologie ou un arrêt transitoire. En plus de l'extraction de tous les cas de pharmacovigilance avec les médicaments d'intérêt dans l'indication mélanome, nous avons demandé à l'UMC des calculs de Proportional Reporting Ratio (PRR). Il s'agit d'un paramètre statistique calculé sur le principe d'un risque relatif. Pour un effet indésirable donné, il informe sur la quantité de cas retrouvés en excès avec le médicament d'intérêt par rapport aux autres médicaments. Le PRR peut être calculé pour un médicament donné ou un groupe de médicaments (par exemple une classe thérapeutique) et pour un effet indésirable donné ou groupe d'effets indésirables. Pour pouvoir calculer un PRR, un minimum de 3 cas est nécessaire et l'association entre un médicament et un effet indésirable est considérée comme statistiquement significative si le PRR est supérieur ou égal à 2 et si la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95% est supérieure à 1 ¹¹⁸.

1.2. Mise au point d'une méthode de dosage des BRAFi et MEKi

1.2.1. Extraction en phase solide

Les BRAFi et MEKi présentent des différences en terme de pKa, ce qui nous a amené à choisir un mode d'extraction en phase solide (SPE). Ce mode d'extraction permet de diminuer la probabilité d'observer un effet matrice dans le dosage et a la possibilité d'être automatisable ^{119,120}. Ces molécules sont basiques et comportent des fonctions amines primaires ou secondaires qui sont généralement protonées au pH de travail. Pour une bonne extraction, le support doit comporter un greffage anionique afin de générer un mécanisme rétentif de type ionique en plus des liaisons hydrophiles et lipophiles. Nous avons choisi pour l'extraction la plaque Waters® Oasis MCX® (= Mixed mode Cation eXchange) qui est greffée de résidus sulfonâtes (Figure 11).



Figure 11. Photo d'une plaque d'extraction MCX 96 puits.

1.2.2. Séparation : Chromatographie liquide

La chromatographie liquide permet séparer des analytes à l'aide d'une colonne chromatographique remplie de phase stationnaire solide (silice greffée) en utilisant une phase mobile liquide. La séparation se fait en fonction de l'affinité de l'analyte respectivement pour les deux phases, qui dépend généralement de sa polarité et son coefficient de partage. Un système de chromatographie liquide à ultra haute pression (UHPLC) permet d'utiliser une phase stationnaire composée de particules dont le diamètre est inférieur à 2µm. Le faible diamètre des particules de silice greffée augmente les interactions physico-chimiques avec les molécules contenues dans la phase mobile, permettant une discrimination plus importante en sortie de colonne.

En contrepartie, cette diminution de la granulométrie se traduit par une augmentation générale de la contre-pression. La technologie utilisée (Waters Acquity-TQD®) permet d'obtenir une amélioration de la résolution des pics chromatographiques, se traduisant par un raccourcissement du temps d'analyse et/ou une augmentation de la sensibilité ^{121,122}.

1.2.3. Détection : Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est un système de détection permettant d'obtenir une sensibilité et une spécificité importante, tout en s'affranchissant des possibles interférences spectrales des molécules co-éluées. Elle est basée sur la détermination des rapports masses/charge (m/z) des molécules présentes dans un échantillon.

A la sortie de la colonne chromatographique, les molécules sont ionisées par la source d'ionisation par électrospray (ESI) qui permet la production d'ions en phase gazeuse (Figure 12). La nébulisation et l'ionisation de la phase mobile chromatographique sont effectuées simultanément, par application d'un champ électrique intense (plusieurs milliers de volts) entre l'aiguille de nébulisation et le corps de la source ESI. Il en résulte l'accumulation d'espèces chargées négativement ou positivement, selon la tension appliquée. Le gaz de nébulisation utilisé est l'azote et permet d'assister l'ESI. Après éjection du capillaire, la phase mobile s'évapore progressivement et des ions désolvatés par le gaz de désolvatation sont émis en phase gazeuse. Avant l'entrée dans l'analyseur, les ions passent à travers le gaz rideau. Il s'agit d'un flux d'azote qui permet de désolvater complètement les ions lorsque des molécules de solvant leur sont encore associées et d'éviter l'entrée de molécules neutres ou d'ions parasites.

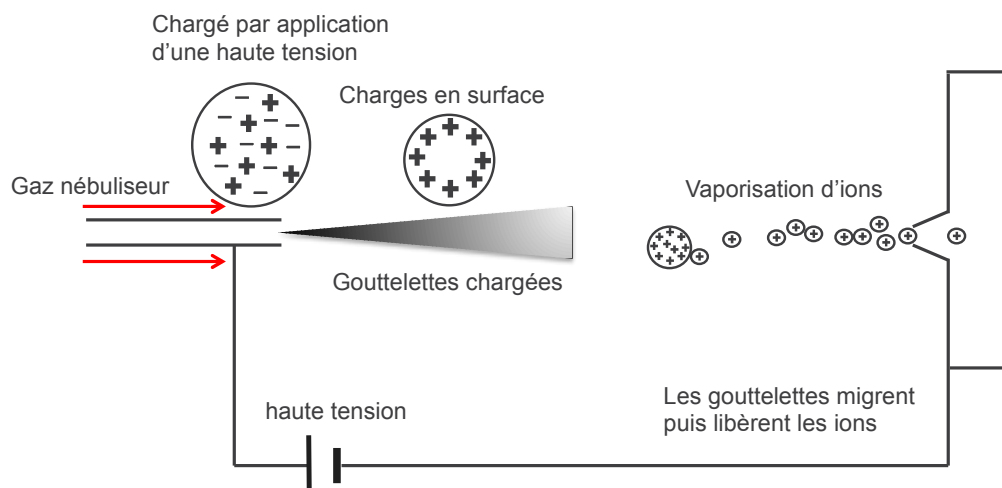


Figure 12. Principe de la source d'ionisation en électrospray (ESI).

Les ions entrent dans l'analyseur de masse, attirés par une charge opposée, et sont sélectionnés par le premier quadripôle Q1 selon leurs rapports masse/charge (m/z) et attirés à l'aide d'un potentiel d'entrée paramétrable (Figure 13). Les premier et troisième quadripôles (Q1 et Q3) fonctionnent comme analyseurs de masse tandis que le second quadripôle (Q2) sert de cellule de collision et de guide d'ions. A la sortie du Q1, les ions entrent dans une cellule de collision où ils sont accélérés avec une énergie de collision. L'ion est fragmenté par percussion avec des atomes d'azote. Un potentiel de sortie de la cellule de collision est alors appliqué et seuls les ions fils d'intérêt issus de cette fragmentation sont sélectionnés en Q3 (MS/MS) selon leur rapport m/z et dirigés vers le détecteur de type multiplicateur d'électrons ¹²³.

Le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) est le mode le plus sensible et le plus spécifique pour quantifier les ions précurseurs multiples. En bref, Q1 est paramétré de sorte qu'un seul ion puisse passer à travers la cellule de collision (Q2). L'ion est fragmenté et transmis à Q3, qui est également paramétré pour permettre à un seul fragment de passer au détecteur. L'instrument surveille la transition de masse entre un ion précurseur spécifique et un produit spécifique. Souvent, deux transitions de masse d'un seul ion précurseur sont utilisées pour quantifier et confirmer l'identité d'un composé spécifique, respectivement. Plusieurs analytes peuvent être quantifiés en même temps en mode MRM ¹²⁴. Une fois que les ions ont traversé Q3, ils entrent en collision avec le détecteur, qui mesure l'abondance

des ions. Les quadripôles et le détecteur fonctionnent conjointement pour déterminer la masse des ions ainsi que leur abondance. Le détecteur amplifie leurs signaux pour générer un spectre de masse.

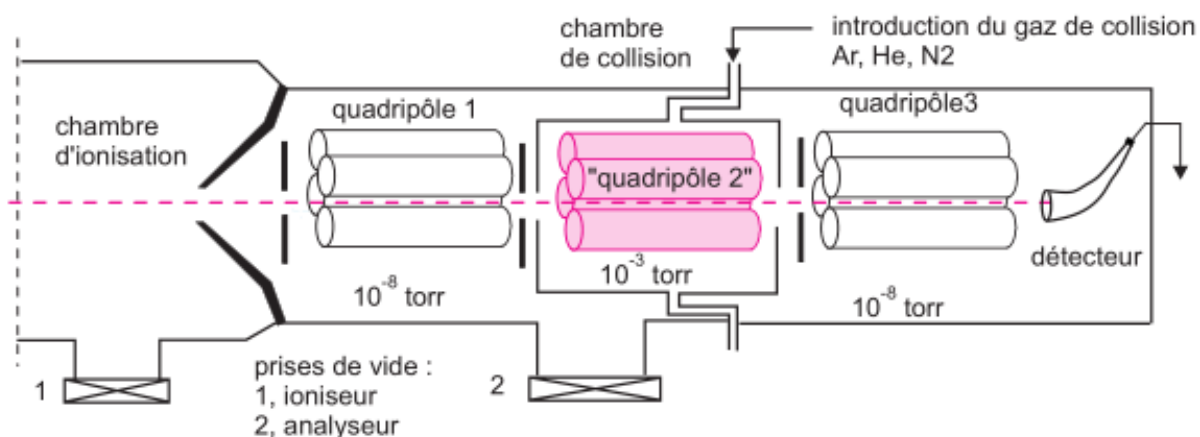


Figure 13. Principe de la spectrométrie de masse en tandem.

1.3. Constitution d'une base de données pour étude de la relation pharmacocinétique/pharmacodynamie des BRAFi et MEKi

Afin de mettre en relation les concentrations plasmatiques en BRAFi/MEKi et les données cliniques et biologiques des patients, il était demandé avec chaque prélèvement, de remplir une feuille spécifique de renseignements comportant les informations nécessaires à l'étude. Un exemple de feuille de demande est présenté en annexe (Annexe 1). Ces informations étaient alors compilées et saisies avec les concentrations plasmatiques dans une base de données. La base de données a été approuvée par la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL) en décembre 2016 (Annexe 2).

2. Effets indésirables des BRAFi et MEKi dans Vigibase - Article 1

« Safety profiles of BRAF-inhibitors and MEK-inhibitors: analysis of the WHO database of adverse drug reactions, Vigibase »

Marine Rousset, Amandine Gouverneur, Antoine Pariente,

Ghada Miremont, Mathieu Molimard

Soumission pour publication au journal « British Journal of Clinical Pharmacology »

2.1. Introduction et présentation

Dans les essais cliniques les BRAFi et MEKi entraînent des effets indésirables chez 90% des patients. Le management des effets indésirables graves consiste en une diminution de posologie (ou un arrêt transitoire) du médicament *a priori* responsable de l'effet indésirable. Nous avons souhaité définir les profils d'effets indésirables de chaque médicament pour pouvoir optimiser l'adaptation de posologie du médicament suspect. Des profils d'effets indésirables se dégagent des essais cliniques cependant il n'y a pas de données publiées en vraie-vie, or les conditions d'inclusion dans les essais cliniques sont drastiques et excluent les patients âgés, insuffisants rénaux ou hépatiques, ou avec un taux de LDH élevé. Ainsi les profils d'effets indésirables dans la population réelle de patients traités peuvent différer de ceux issus des essais cliniques. Nous avons également étudié les résultats de disproportionnalité, afin de détecter des nouveaux signaux de pharmacovigilance.

2.2. Discussion

VigiBase est une mine d'informations dont il est parfois difficile de se servir à bon escient. Il a été difficile de sélectionner certains effets indésirables attribuables à un médicament plutôt qu'un autre sur la base d'une fréquence plus élevée. En effet, pour le cobimetinib nous disposons de 84 rapports correspondant à 193 effets indésirables versus 2000 rapports pour le vemurafenib, il était difficile de conclure sur la survenue d'un effet indésirable plus fréquent sous vemurafenib que sous cobimetinib. Toutefois la description des effets indésirables du cobimetinib était nécessaire car ce médicament n'a pas été commercialisé en monothérapie. Il y avait donc peu d'informations sur son profil de toxicité dans l'étude de phase 3 en association au vemurafenib. Les profils d'effets indésirables mis en évidence correspondaient généralement à ceux qui avaient émergé dans les essais cliniques, avec tout de même un plus grand panel d'effets indésirables. Le traitement par BRAFi en monothérapie entraînait beaucoup de carcinomes cutanés épidermoïdes et d'hyperkératoses. Comme préalablement observé dans les études cliniques, l'ajout d'un MEKi permettait de réduire la fréquence de ces effets indésirables. De nouveaux effets indésirables ont été mis en évidence pour chaque médicament ainsi que des signaux de pharmacovigilance à explorer.

Cette étude a permis de définir les profils d'effets indésirables pour chaque médicament, chaque classe thérapeutique et chaque bithérapie. La nécessité de diminuer la dose en cas d'effet indésirable grave suggère une relation « exposition/toxicité » que nous avons explorée dans l'article 3 de ce travail de thèse.

Safety profiles of BRAF-inhibitors and MEK-inhibitors: analysis of the WHO database of adverse drug reactions, Vigibase®

Running title: Safety profiles of BRAF- and MEK-inhibitors

Marine Rousset ^{a,b}, Amandine Gouverneur ^{a,b}, Antoine Pariente ^{a,b}, Ghada Miremont ^{a,b}, Mathieu Molimard ^{a,b}.

^a Département de Pharmacologie, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Bordeaux, France

^b Univ. Bordeaux INSERM, Bordeaux Population Health Research Center, team PHARMACOEPIDEMIOLOGY, UMR 1219, F-33000 Bordeaux, France

Corresponding Author:
Marine ROUSSET
Centre de Pharmacovigilance
CHU Pellegrin
4 place Amélie Raba Léon
33076 BORDEAUX
France

Phone. + 33 5 56 79 55 08
Fax. + 33 5 56 79 57 95
E-mail. marine.rousset@[u-bordeaux.fr](mailto:marine.rousset@u-bordeaux.fr)

Abstract

Aims

Association of BRAF-inhibitor (BRAFi) and MEK-inhibitor (MEKi) is the gold standard treatment in patients with BRAFV600 mutated metastatic melanoma. As 90% of treated patients presented adverse drug reactions (ADRs) and required dose reduction in more than 33% of cases in clinical trials, we aimed to define the safety profiles of BRAFi and MEKi in real-life settings.

Methods

An extraction of Vigibase, the World Health Organization database of ADRs, was performed. All reports of serious ADRs in patients treated with BRAFi (vemurafenib, dabrafenib), MEKi (cobimetinib, trametinib) or bitherapy with vemurafenib + cobimetinib or with dabrafenib + trametinib for metastatic melanoma were considered. A descriptive analysis of ADRs was performed for all drugs. For selected ADRs, the proportional reporting ratio for each drug in comparison to all other anticancer drugs was estimated.

Results

A total of 8,224 individual case safety reports were included corresponding to 25,452 serious ADRs. Vemurafenib was mostly associated with rashes, bullous conditions, alopecia and photosensitivity. Dabrafenib was associated with hyperpyrexia, chills, pancreatitis and uveitis. Both BRAFi were associated with skin neoplasms and hyperkeratosis. Cobimetinib was particularly associated with rhabdomyolysis, haematuria and eye disorders. For trametinib, specific respiratory disorders were detected. Cardiac disorders as bradycardia, heart failure and tachycardia were also reported. Both MEKi were associated with decreased cardiac ejection fraction. New ADRs were highlighted as potential signals.

Conclusions

The safety profiles of BRAFi and MEKi differ. Accordingly, there is a safety rationale in switching between drugs or bitherapies because of their different profiles of adverse reactions.

Keywords:

Adverse drug reaction; melanoma; targeted therapy; vemurafenib, dabrafenib

What is already known on the subject?

- Almost 90% of patients present adverse drug reactions with BRAFi and/or MEKi
- The management of serious ADRs consist in dose reduction or treatment interruption in 30% of patients
- Clinical trials gave little information on ADRs

What this study adds?

- Safety profiles of BRAFi, MEKi and approved combinations in real-life settings
- New ADR signals are highlighted

INTRODUCTION

Raf-mitogen-activated protein kinase (Raf-MAPK) pathway inhibition with the BRAF inhibitors (BRAFi) vemurafenib and dabrafenib in combination with a MEK inhibitor (MEKi: cobimetinib and trametinib) has become a standard therapeutic approach in patients with BRAFV600-mutated metastatic melanoma. Historically vemurafenib was the first BRAFi approved by FDA in 2011, followed by dabrafenib in 2013. Trametinib was first approved as a monotherapy in 2013 and in combination with dabrafenib in 2014. Cobimetinib was approved only in combination with vemurafenib in 2015. Both combinations (vemurafenib+cobimetinib or dabrafenib+trametinib) have shown an improved efficacy compared to BRAFi monotherapy with a median overall survival of 25 months and less than 17 months, respectively ¹⁻⁵. The addition of a MEKi that improves blockade of the MAPK pathway may overcome resistance mechanisms and thereby improve efficacy ⁶. However, the gain of efficiency is accompanied by concerns of toxicity. Almost 90% of patients experience adverse drug reactions (ADRs) ¹. Treatment is continued until disease progression or unacceptable toxicity occurs. According to clinical trials, severe ADRs requiring dose reduction of one or both drugs occurred in 38% of patients ¹. The management of intolerable grade 2 or more ADRs (Common Toxicity Criteria of Adverse Events, CTCAE v4.0) is based on the interruption of the drug until toxicity is grade 0-1 and reduction by one dose level when therapy is being resumed or even permanent discontinuation. The understanding of which ADRs are most likely BRAFi or MEKi associated is necessary for dose modification of the appropriate drug ⁷.

Although the safety profiles of treatments for melanoma have been pre-assessed during clinical trials, little is known in real-life settings. The objective of this study was to describe adverse drug reactions profiles of each BRAFi, each MEKi and each BRAFi + MEKi combinations in real-life and to detect new signals of ADRs.

METHODS

Data source

Since 1978, the World Health Organization (WHO) Program for International Drug Monitoring is coordinated by the Uppsala Monitoring Centre (UMC)^{8,9}. All individual case safety reports (ICSRs) on suspected drugs in the occurrence of ADRs sent by national pharmacovigilance centres are stored in VigiBase®. This database contains over 16 millions ICSR from 120 countries. The indications and adverse events are coded using the Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA®), while Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification is used to code drugs.

Data extraction and selection

ICSRs were extracted from VigiBase® on January the 3rd, 2018. Inclusion criteria were: i) at least one adverse event with the following suspected targeted therapies (vemurafenib, dabrafenib, cobimetinib, trametinib), and ii) indication of metastatic melanoma. Exclusion criteria were as follow: i) inappropriate BRAFi + MEKi combination, for instance dabrafenib+cobimetinib or dabrafenib+vemurafenib, and ii) ADRs classified as “Not serious” or missing seriousness. ICSR provide information on (i) patient data: sex, age; (ii) characteristics of reported ADRs: description of ADRs, date of onset, seriousness; (iii) drugs involved: name, role in ADRs (suspected, interacting, concomitant), date of treatment start; and (iv) administrative information: date of initial entry in VigiBase®, country. A serious ADR is defined as any untoward medical occurrence at any dose that results in congenital anomalies or birth defects, death, life threatening, hospital admission or prolongation of existing hospital stay, persistent or significant disability/incapacity, or were judged as other serious medical situation (*i.e.* resulting in specific medical care or considered to have significantly altered patient’s quality of life)¹⁰. According to international guidelines, appropriate BRAFi + MEKi combination considered in the present study were: i) vemurafenib + cobimetinib, and ii) dabrafenib + trametinib. Analyses were also performed according to therapeutic class: i) BRAFi (vemurafenib, dabrafenib), and ii) MEKi (cobimetinib + trametinib).

Data analysis

A descriptive analysis was performed according to each considered targeted therapy alone (without targeted therapy of interest as concomitant drug), according to therapeutic class, and to the 2 bitherapies. Number and proportion of patients in each class were presented for qualitative variables, median and interquartile range (IQR) for continuous variables. Frequencies of adverse events were reported according to System Organ Class (SOC), High Level Term (HLT) and Preferred Term (PT).

For disproportionality analysis, the proportional reporting ratio (PRR) was estimated with its 95% confidence interval (95% CI). The PRR is a statistical parameter used in spontaneous reporting databases to detect drug-ADR associations that are reported more frequently than expected. For a given ADR, it informs about the quantity of spontaneous reports found in excess with the drug of interest compared to other drugs, and can be interpreted as an appropriation of a relative risk in spontaneous reporting databases. The PRR was calculated for each targeted therapy in comparison with all other anticancer drugs (ATC code L01 “antineoplastic agents”) considering HLT for adverse event. For the PRR analyses, a minimum of three ICSRs of the drug-ADR association tested was also needed. Drug-ADR associations were considered statistically significant if $PRR > 2$, and lower boundary of the $95\%CI > 1$ ¹¹.

All descriptive and comparative analyses were performed using SAS® statistical software (SAS Institute, version 9.4, Cary, NC, USA) and disproportionality analysis was performed by the UMC.

RESULTS

General characteristics of reported cases

Up to January the 3rd, 2018, we retrieved 12,549 ICSRs from 48 countries. We excluded 4,288 ICSRs without seriousness criteria and 37 ICSRs with the wrong combination of drugs (Figure 1). We included 8,224 ICSRs corresponding to 25,452 serious ADRs. Among them 3,772 ICSRs involved vemurafenib, 659 dabrafenib, 84 cobimetinib, 473 trametinib, 585 bitheraPy with vemurafenib and cobimetinib and 2,651 bitheraPy with dabrafenib and trametinib (Figure 1). The evolution of the number of ICSRs for each molecule or bitheraPy is presented in Figure 2. For vemurafenib, approved in monotherapy on 2011 by the FDA, notifications were significantly increased in 2014 and are relatively stable since 2015. Cobimetinib was approved on November 2015 only in combination with vemurafenib (no monotherapy use), and number of ICSRs increased in 2016 and 2017. Dabrafenib and trametinib were first approved on May 2013 for monotherapy use. The bitheraPy with dabrafenib + trametinib was approved on January 2014. For dabrafenib and trametinib, in mono- or bitheraPy, most notifications were registered between 2015 and 2017.

ICSRs came principally from USA (55.9%), Germany (9.3%), Canada (5.0%), France (4.0%) and United Kingdom (3.9%). The median age of patients ranged from 59 to 62 years. ICSRs concerned more men than women (Table 1).

Among seriousness criteria, “Caused or Prolonged hospitalization” and “Other serious medical situation” were the most reported followed by “Death” (Table 1). The main ADRs (HLT of MedDRA) associated with “Death” and “Caused or prolonged hospitalization” seriousness criteria were: *Death and sudden death, General signs and symptoms NEC, Asthenic conditions, Skin melanomas (excl ocular), Neoplasms malignant site unspecified NEC, Metastases to specified sites* and *Nausea and vomiting symptoms* (Supplementary material Table S1). For vemurafenib and trametinib, *Rashes, eruptions and exanthems NEC* were also often reported. *Febrile disorders* and *Feelings and sensation NEC* (corresponding mostly to preferred term *Chills*) were notified with dabrafenib alone or in combination with trametinib. For the bitheraPy with vemurafenib + cobimetinib, *Liver function analyses, Renal failure and impairment, Total fluid volume decrease* and *Sepsis, bacteraemia, viraemia and fungaemia NEC* were reported in ICSRs associated with “Death” seriousness criteria.

Description of ADRs at SOC level of MedDRA

The top five of most frequently reported SOC were: *General disorders and administration site conditions*, *Skin and subcutaneous tissue disorders*, (often associated with BRAFi, especially vemurafenib), *Gastrointestinal disorders* (more frequently reported with cobimetinib), *Neoplasms benign, malignant and unspecified (incl cysts and polyps)* (reported with both BRAFi) and *Musculoskeletal and connective tissue disorders* (frequently associated with vemurafenib) (Supplementary material Table S2). Looking behind the 5 most reported SOC, *Respiratory, thoracic and mediastinal disorders* were more often assigned to trametinib, *Eye disorders* and *Renal and urinary disorders* to cobimetinib, and *Infections and infestations* and *Cardiac disorders* to both MEKi (Figure 3A). Concerning bitherapies, most reported SOC were the same as SOC associated with each drug of the combination except for SOC *Nervous system disorders* and *Blood and lymphatic system disorders* with bitherapy with dabrafenib + trametinib (Figure 3B).

Description of ADRs according to each targeted therapy, therapeutic class or bitherapy and HLT and PT

Some ADRs were common to all the four drugs: *Asthenic conditions*, *Death and sudden death*, *General signs and symptoms*, *Nausea and vomiting symptoms* *Not Elsewhere Classified (NEC)*, *Neoplasms malignant site unspecified NEC*, *Metastases to specified sites*, *Skin melanomas (excl ocular)*, *Musculoskeletal and connective tissue pain and discomfort* and *Visual disorders NEC* (Supplementary material Table S2). Within these common ADRs, others were still more described with one drug (Figure 4) or type of inhibition or bitherapy (Table 2), drawing safety profiles.

Vemurafenib

Most frequent ADRs with vemurafenib were *Rashes, eruptions and exanthems NEC, Joint related signs and symptoms (arthralgia), Appetite disorders, Bullous conditions, Alopecias, Pruritus NEC and Erythemas* (Figure 4).

Main specific ADRs were: *Sunburn, Photosensitivity reaction, Weight decreased, Mass, Blister, Rash generalised, Electrocardiogram QT prolonged, Dysgeusia, Poor quality sleep and Skin exfoliation* (Table 2).

Dabrafenib

Most frequent ADRs with dabrafenib were *Febrile disorders and Feelings and sensations NEC* (corresponding to the PT chills).

Specific ADRs were *Chills, Hyperpyrexia, Pancreatitis and Uveitis*.

BRAF_i (vemurafenib and dabrafenib)

BRAF_i were associated with skin neoplasms (benign or malignant) corresponding principally to: *Squamous cell carcinoma, Keratoacanthoma and Skin papilloma*. They were also associated with *Hyperkeratoses, Alopecias, Joint related signs and symptoms, Acute and chronic pancreatitis, Bladder and urethral symptoms, Bullous conditions, Erythemas, Paraesthesias and dysaesthesias, and ECG investigations* (Table 2).

Cobimetinib

Most frequent ADRs with cobimetinib were *Diarrhoea (excl infective), Renal failure and impairment, and Oedema NEC* (Figure 4). *Rhabdomyolysis, Haematuria* and eye disorders (*Chorioretinopathy, Retinal detachment and Retinopathy*) were the more specific serious ADRs reported (Table 2).

Trametinib

Most frequent ADRs with trametinib were *Lower respiratory tract and lung infections, Breathing abnormalities, Total fluid volume decreased (mainly dehydration), Anaemias NEC, Rate and rhythm disorders NEC* and *Pneumothorax and pleural effusions NEC*.

Specific respiratory disorders were detected: *Pleural effusion, Pulmonary embolism, Pneumonitis and Lung infection*. Cardiac disorders such as *Bradycardia, Cardiac failure* and *Tachycardia* were more often reported with trametinib, as blood disorders (*Anaemia, Thrombocytopenia* and *Pancytopenia*). *Neuropathy peripheral and cerebrovascular accident* and *Hypertension* were specific to trametinib.

MEKi (cobimetinib and trametinib)

MEKi were associated with *Blood creatine phosphokinase increased* and *Ejection fraction decreased*.

Bitherapy with vemurafenib and cobimetinib

As for each drug of the combination, bitherapy with vemurafenib and cobimetinib was often associated with skin and subcutaneous tissue disorders (*Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms, Photosensitivity reaction* or *Stevens-Johnson syndrome*); hepatobiliary disorders (*Hepatocellular injury* and *Cholestasis*) and retinal disorders encoded as *Retinal detachment* or *Retinopathy*.

Bitherapy with dabrafenib and trametinib

The bitherapy with dabrafenib and trametinib was mainly associated with *Febrile disorders, Neutropenia* and *Leukopenia, Pulmonary embolism, Colitis*, and nervous system disorders: *Epilepsy* and *Cerebral haemorrhage*.

Disproportionality analysis / PRR analysis

We collected 268 drug-ADR pairs with $PRR > 2$ and $95\%CI > 1$. All ADRs mentioned in summary of product characteristics of drugs were excluded. We analysed 12 reactions, according to

their statistical and clinical relevance (Table 3).

Among selected signals, *Breast signs and symptoms*, *Ocular infections*, *Non infectious pericarditis*, *Taste disorders* and *Dyssomnias* were associated with vemurafenib.

Significant disproportionality emerged for dabrafenib associated with *Chronic polyneuropathies* and *Seizures and seizure disorders*.

Hepatocellular damage and hepatitis NEC, *Cholestasis and jaundice* and *Renal failure and impairment* were identified as emergent signals with cobimetinib.

Trametinib was associated with *Retinal bleeding and vascular disorders*.

Facial cranial nerve disorders were highlighted with both drugs of bitherapy with vemurafenib+cobimetinib.

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study to provide relative safety of BRAFi and MEKi in metastatic melanoma based on data of daily clinical practice. Although clinical trials have been conducted on large numbers of patients, they do not reflect the real-life treated population. In fact, the patients included in clinical trials were selected for their age, renal or hepatic function, lactate dehydrogenase (LDH) level and few comorbidities¹². The use of the largest pharmacovigilance database (VigiBase), containing more than 16 million reported ICSRs from more than 120 countries allows accurately describing and identify the real-life drug-ADR association, within the limits of spontaneous reporting.

Generally, our findings were consistent with those of randomized controlled trial. For instance, vemurafenib was associated with photosensitivity, dabrafenib with febrile disorders and chills, cobimetinib with rhabdomyolysis, trametinib with lung infections and both BRAFi with hyperkeratosis, thought to be the result of paradoxical activation of the MAPK pathway in wild-type BRAF keratinocyte^{13,14}. As previously shown, the addition of a MEKi reduced squamoproliferative toxic effects to the skin^{15,16}. New ADRs were highlighted such as Mass with vemurafenib, Confusional state with dabrafenib, Haematuria with cobimetinib, Neuropathy peripheral, Pulmonary embolism and Thrombosis with trametinib. Another item evaluated in this study are the potential cobimetinib induced hepatobiliary disorders. Since cobimetinib is extensively metabolized by cytochrome P450 isoform 3A4 in the liver, hepatic disorders can lead to overdosage of cobimetinib and occurrence of ADRs¹⁷⁻¹⁹.

The principal limitation of disproportionality analyses is that we did not study co-medications. ADRs with cobimetinib in monotherapy are probably underreported since it was not marketed in monotherapy but only in combination with vemurafenib. Dabrafenib and trametinib in monotherapy are also probably underreported since these drugs have been used in combination very soon after their marketing. Although there are few ICSRs corresponding to these drugs in monotherapy, this study is informative on ADRs reported in real-life and allowed to highlight new signals.

The disproportionality observed for *Breast signs and symptoms* reported for vemurafenib has been described in the literature from post-marketing daily practice^{20,21} whereas there

was no case reported for the disproportionality signal of non-infectious pericarditis. *Chronic polyneuropathies* highlighted with dabrafenib has never been described, however, 2 cases of demyelinating polyneuropathies have been published with another BRAFi ^{22,23}, suggesting a therapeutic class effect. *Seizures and seizure disorders NEC* were also a new signal associated with dabrafenib. Retinal changes are considered as a class effect of MEKi, retinal vein occlusion (RVO) and chorioretinopathy have been regularly reported with MEKi ²⁴⁻²⁶. The significant PRR for retinal bleeding and vascular disorders with trametinib was a new kind of retinopathy notified with MEKi. Both drugs of bitherapy with vemurafenib and cobimetinib had significant association with facial cranial nerve disorders. A research in the literature reported two cases of facial paralysis with vemurafenib ^{27,28}.

Most ADRs of BRAFi and MEKi can be managed conservatively by dose modifications of treatment ²⁹, suggesting a role of drug overexposure. Different PK/PD studies have shown an association between severe adverse events and plasma concentration of dabrafenib or vemurafenib, and of tyrosine kinase inhibitors (sunitinib, sorafenib, erlotinib)³⁰⁻³⁴.

These results should be taken into account for the prevention and monitoring of ADRs. Early recognition of ADRs through knowledge of BRAFi and MEKi safety profiles and help of therapeutic drug monitoring is essential to provide optimal care. The increasing use of new drugs in melanoma is forcing clinicians to monitor known and new side effects. In the future, attention should be paid to the ADRs in VigiBase of immunotherapies involved in the revolution in the therapeutic management of melanoma.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Uppsala Monitoring Centre (UMC), which provided and gave permission to use the data analyzed in the present study. The authors are indebted to the National Pharmacovigilance Centers that contributed data. The opinions and conclusions in this study are not necessarily those of the various centers or of the WHO. The authors would like to acknowledge Camilla Westerberg for help with extracting data. We thank Pr Nicholas Moore for reviewing of the report.

References

1. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2507-2516.
2. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2012;380(9839):358-365.
3. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2015;386(9992):444-451.
4. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med*. 2015;372(1):30-39.
5. Ascierto PA, McArthur GA, Dreno B, et al. Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(9):1248-1260.
6. Simeone E, Grimaldi AM, Festino L, Vanella V, Palla M, Ascierto PA. Combination Treatment of Patients with BRAF-Mutant Melanoma: A New Standard of Care. *BioDrugs*. 2017;31(1):51-61.
7. Daud A, Tsai K. Management of Treatment-Related Adverse Events with Agents Targeting the MAPK Pathway in Patients with Metastatic Melanoma. *Oncologist*. 2017;22(7):823-833.
8. Lindquist M. Vigibase, the WHO Global ICSR Database System: Basic Facts. *Drug Information Journal*. 2008;42:409-419.
9. Vigibase. Uppsala Monitoring Centre. <http://www.who-umc.org>. Accessed 02/10/2018.
10. Edwards IR, Aronson JK. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *Lancet*. 2000;356(9237):1255-1259.

11. Evans SJ, Waller PC, Davis S. Use of proportional reporting ratios (PRRs) for signal generation from spontaneous adverse drug reaction reports. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2001;10(6):483-486.
12. Talarico L, Chen G, Pazdur R. Enrollment of elderly patients in clinical trials for cancer drug registration: a 7-year experience by the US Food and Drug Administration. *J Clin Oncol.* 2004;22(22):4626-4631.
13. Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, et al. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell.* 2010;140(2):209-221.
14. Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature.* 2010;464(7287):431-435.
15. Flaherty KT, Infante JR, Daud A, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med.* 2012;367(18):1694-1703.
16. King AJ, Arnone MR, Bleam MR, et al. Dabrafenib; preclinical characterization, increased efficacy when combined with trametinib, while BRAF/MEK tool combination reduced skin lesions. *PLoS One.* 2013;8(7):e67583.
17. Budha NR, Ji T, Musib L, et al. Evaluation of Cytochrome P450 3A4-Mediated Drug-Drug Interaction Potential for Cobimetinib Using Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling and Simulation. *Clin Pharmacokinet.* 2016;55(11):1435-1445.
18. Deng Y, Musib L, Choo E, et al. Determination of cobimetinib in human plasma using protein precipitation extraction and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2014;972:117-123.
19. Han K, Jin JY, Marchand M, et al. Population pharmacokinetics and dosing implications for cobimetinib in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015;76(5):917-924.
20. Carr ES, Brown SC, Fiala KH. Painful nipple hyperkeratosis secondary to vemurafenib. *Dermatol Ther.* 2017;30(3).

21. Martinez-Garcia E, Taibjee S, Koch D, Osborne R. Vemurafenib-induced hyperkeratosis of the areola treated with topical adapelene. *Clin Exp Dermatol*. 2016;41(2):148-151.
22. Johnson DB, Wallender EK, Cohen DN, et al. Severe cutaneous and neurologic toxicity in melanoma patients during vemurafenib administration following anti-PD-1 therapy. *Cancer Immunol Res*. 2013;1(6):373-377.
23. Devic P, Amini-Adle M, Camdessanche JP, Dalle S. Demyelinating polyradiculoneuropathy under combined BRAF/MEK inhibitors. *Eur J Cancer*. 2017;78:103-104.
24. Duncan KE, Chang LY, Patronas M. MEK inhibitors: a new class of chemotherapeutic agents with ocular toxicity. *Eye (Lond)*. 2015;29(8):1003-1012.
25. Urner-Bloch U, Urner M, Stieger P, et al. Transient MEK inhibitor-associated retinopathy in metastatic melanoma. *Ann Oncol*. 2014;25(7):1437-1441.
26. Urner-Bloch U, Urner M, Jaberg-Bentele N, Frauchiger AL, Dummer R, Goldinger SM. MEK inhibitor-associated retinopathy (MEKAR) in metastatic melanoma: Long-term ophthalmic effects. *Eur J Cancer*. 2016;65:130-138.
27. Klein O, Ribas A, Chmielowski B, et al. Facial palsy as a side effect of vemurafenib treatment in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2013;31(12):e215-217.
28. Shailesh FN, Singh M, Tiwari U, Hutchins LF. Vemurafenib-induced bilateral facial palsy. *J Postgrad Med*. 2014;60(2):187-188.
29. Dreno B, Ribas A, Larkin J, et al. Incidence, course, and management of toxicities associated with cobimetinib in combination with vemurafenib in the coBRIM study. *Ann Oncol*. 2017;28(5):1137-1144.
30. Narjoz C, Cessot A, Thomas-Schoemann A, et al. Role of the lean body mass and of pharmacogenetic variants on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of sunitinib in cancer patients. *Invest New Drugs*. 2015;33(1):257-268.

31. Boudou-Rouquette P, Narjoz C, Golmard JL, et al. Early sorafenib-induced toxicity is associated with drug exposure and UGT1A9 genetic polymorphism in patients with solid tumors: a preliminary study. *PLoS One*. 2012;7(8):e42875.
32. Petit-Jean E, Buclin T, Guidi M, et al. Erlotinib: another candidate for the therapeutic drug monitoring of targeted therapy of cancer? A pharmacokinetic and pharmacodynamic systematic review of literature. *Ther Drug Monit*. 2015;37(1):2-21.
33. Rousset M, Dutriaux C, Bosco-Levy P, et al. Trough dabrafenib plasma concentrations can predict occurrence of adverse events requiring dose reduction in metastatic melanoma. *Clin Chim Acta*. 2017;472:26-29.
34. Kramkimel N, Thomas-Schoemann A, Sakji L, et al. Vemurafenib pharmacokinetics and its correlation with efficacy and safety in outpatients with advanced BRAF-mutated melanoma. *Target Oncol*. 2016;11(1):59-69.

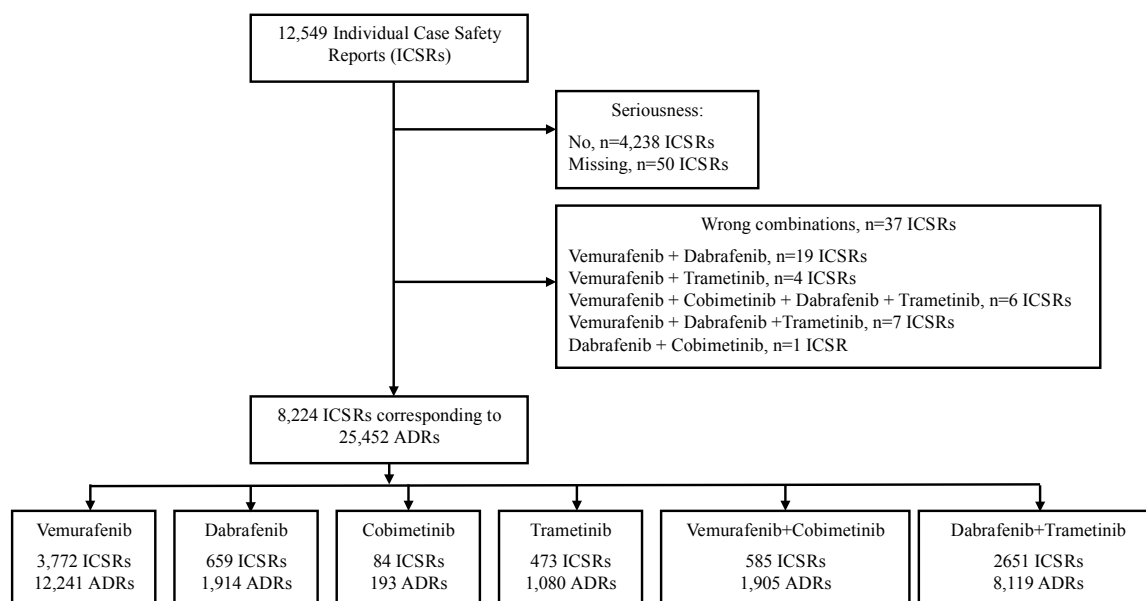


Figure 1. Population selection flow chart and distribution of ADRs according to seriousness
ICSRs, individual case safety reports; ADRs, adverse drug reactions.

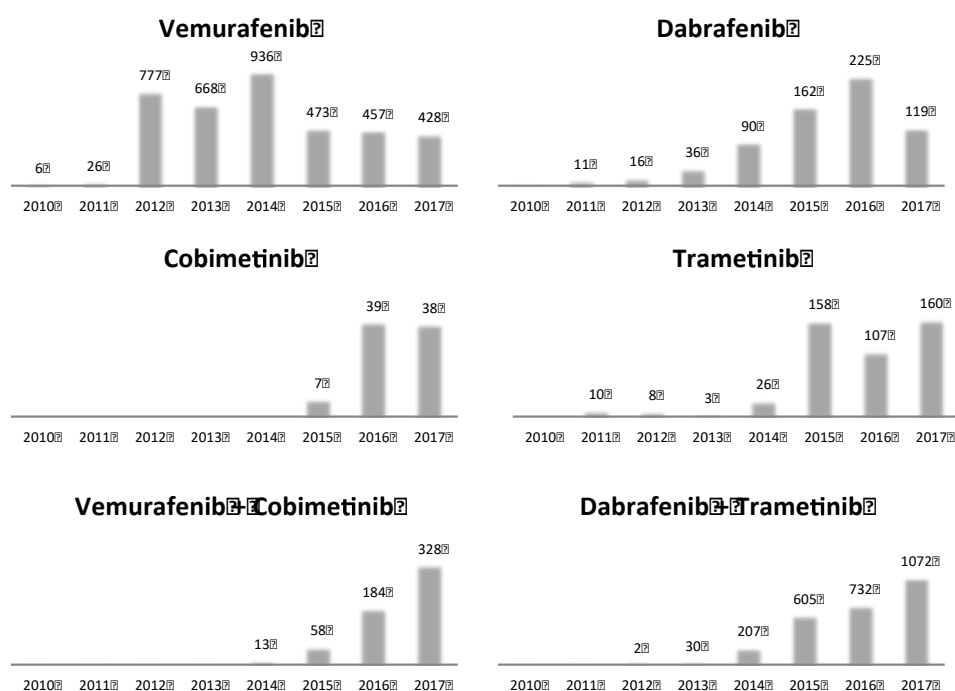


Figure 2. Number of ICSRs per year.
ICSRs, individual case safety reports.

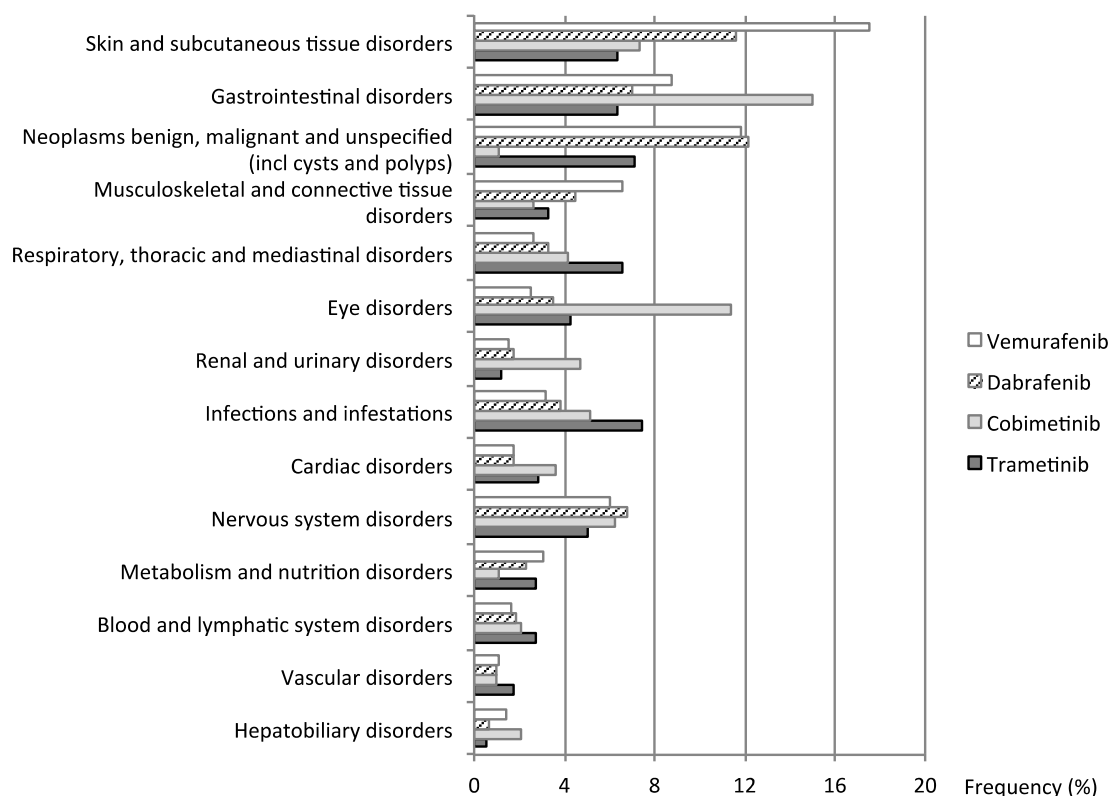


Figure 3A. Frequencies of serious adverse drug reactions in each System Organ Class of interest according to each targeted therapy .

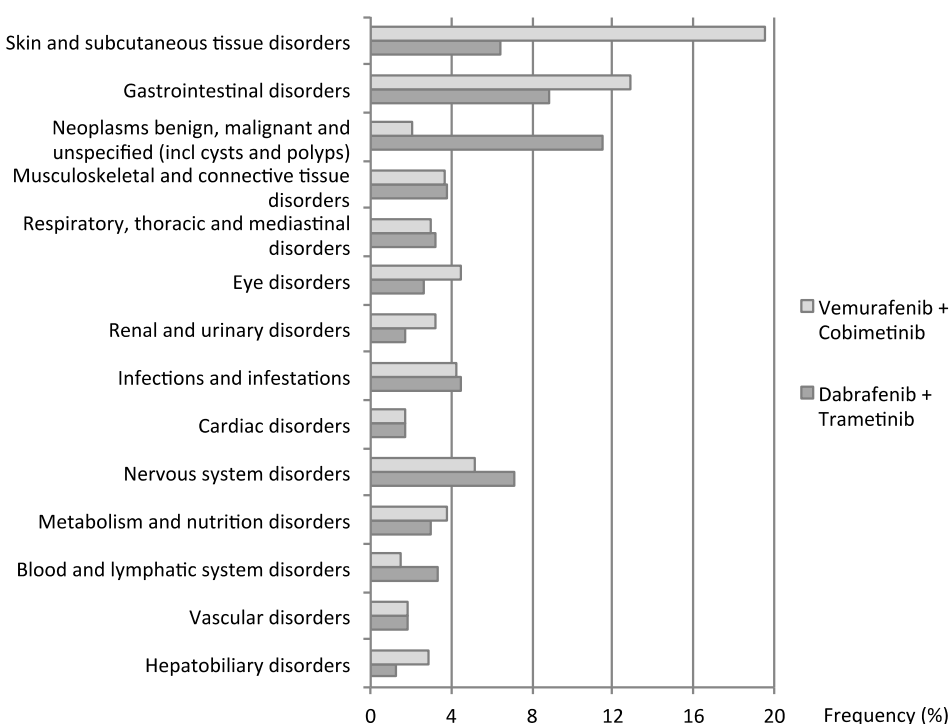


Figure 3B. Frequencies of serious adverse drug reactions in each System Organ Class of interest according to bitherapies.

Table 1. Characteristics of included individual case safety reports (n= 8,224).

Characteristics,	Vemurafenib	Dabrafenib	Cobimetinib	Trametinib	Vemurafenib Cobimetinib	+ Dabrafenib + Trametinib
n (% of total number of ICSRs)	n=3,772 (45.9)	n=659 (8.0)	n=84 (1.0)	n=473 (5.8)	n=585 (7.1)	n=2,651 (32.2)
Median age, years	62.0 [50.0-70.3]	62.3 [50.2-71.8]	61.0 [51.0-69.3]	62.3 [51.8-71.3]	59.0 [48.1-71.0]	59.8 [48.3-69.0]
Gender						
Male	1,987 (52.7)	346 (52.5)	47 (56.0)	231 (48.8)	286 (48.9)	1,298 (49.0)
Female	1,531 (40.6)	258 (39.2)	31 (36.9)	203 (42.9)	274 (46.8)	1,039 (39.2)
Missing data	254 (6.7)	55 (8.4)	6 (7.1)	39 (8.3)	25 (4.3)	314 (11.8)
Seriousness criteria^a						
Caused/Prolonged hospitalization	1,244 (33.0)	225 (34.1)	39 (46.4)	185 (39.1)	341 (58.3)	1,052 (39.7)
Death	902 (23.9)	186 (28.2)	11 (13.1)	200 (42.3)	58 (9.9)	790 (29.8)
Life-threatening	125 (3.3)	31 (4.7)	4 (4.8)	20 (4.2)	23 (3.9)	239 (9.0)
Incapacitating	75 (2.0)	41 (6.2)	2 (2.4)	16 (3.4)	17 (2.9)	219 (8.3)
Other serious medical situation	2,023 (53.6)	374 (56.8)	42 (50.0)	216 (45.7)	248 (42.4)	1,523 (57.5)

^aPatients can have more than one seriousness criterion.

Table 2. Safety profiles of targeted therapies. ADRs with n ≥ 3 and frequency ≥ 0.2% reported only with one drug, one kind of inhibition (BRAFi or MEKi) or one of the 2 bitherapies.

Vemurafenib, n (%)	Dabrafenib, n (%)	Cobimetinib, n (%)	Trametinib, n (%)
Sunburn, 140 (1.1) Photosensitivity reaction, 120 (1.0) Weight decreased, 105 (0.9) Mass, 84 (0.7) Blister, 73 (0.6) Rash generalized, 66 (0.5) Electrocardiogram QT prolonged, 62 (0.5) Dysgueusia, 62 (0.4) Poor quality sleep, 52 (0.3) Skin exfoliation, 47 (0.4)	Chills, 29 (1.5) Palmar-plantar erythrodysesthesia, 13 (0.7) Basal cell carcinoma, 12 (0.6) Uveitis, 9 (0.5) Pancreatitis, 8 (0.4) Confusional state, 7 (0.4) Hyperpyrexia, 7 (0.4) Palmoplantar keratoderma, 7 (0.4) Acrochordon, 7 (0.4)	Rhabdomyolysis, 3 (1.6) Haematuria, 3 (1.6) Chorioretinopathy, 3 (1.6) Retinal detachment, 3 (1.6) Retinopathy, 3 (1.6)	Anaemia, 11 (1.0) Pleural effusion, 9 (0.8) Neuropathy peripheral, 7 (0.7) Cerebrovascular accident, 7 (0.7) Hypertension, 5 (0.5) Thrombocytopenia, 5 (0.5) Bradycardia, 4 (0.4) Tachycardia, 4 (0.4) Cardiac failure, 4 (0.4) Pulmonary embolism, 4 (0.4) Thrombosis, 4 (0.4) Pneumonitis, 4 (0.4)

Both BRAFi (vemurafenib, n (%) ; dabrafenib, n (%))	Both MEKi (cobimetinib, n (%); trametinib, n (%))
Arthralgia, (367 (3.0); 21 (1.1)) Alopecia, (190 (1.6); 11 (0.6)) Squamous cell carcinoma, (203 (1.7); 24 (1.3)) Squamous cell carcinoma of skin, (130 (1.1); 10 (0.5)) Keratoacanthoma, (113 (0.9); 8 (0.4)) Skin papilloma, (100 (0.8); 10 (0.5)) Hyperkeratoses, (66 (0.5); 15 (0.8))	Blood creatine phosphokinase increased, (6 (3.1); 5 (0.5)) Ejection fraction decreased (4 (2.1); 4 (0.4))

Vemurafenib + cobimetinib, n (%)	Dabrafenib + trametinib, n (%)
Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms, 29 (1.5) Photosensitivity reaction, 28 (1.5) Stevens-Johnson syndrome, 13 (0.7) Hepatocellular injury, 12 (0.6) Cholestasis, 8 (0.4) Retinal detachment, 7 (0.4)	Febrile disorders, 599 (7.4) Neutropenia, 66 (0.8) Cerebral haemorrhage, 35 (0.3) Pulmonary embolism, 29 (0.4) Influenza like illness, 24 (0.3) Colitis, 15 (0.2) Epilepsy, 14 (0.2)

Table 3. HLT of Adverse drug reactions statistically significant (PRR >2, lower boundary of the 95%CI >1) associated with vemurafenib, dabrafenib, cobimetinib and trametinib in comparison with all other anticancer drugs.

MedDRA HLT	n	PRR	95% CI
<i>Vemurafenib</i>			
Facial cranial nerve disorders	24	3.89	2.60-5.83
Breast signs and symptoms	13	3.29	1.90-5.69
Ocular infections, inflammations and associated manifestations	86	3.12	2.53-3.86
Noninfectious pericarditis	14	3.01	1.78-5.10
Taste disorders	169	2.52	2.17-2.93
Dyssomnias	93	2.50	2.04-3.06
<i>Dabrafenib</i>			
Chronic polyneuropathies	7	6.57	3.11-13.89
Seizures and seizure disorders NEC	70	2.18	1.73-2.76
<i>Cobimetinib</i>			
Facial cranial nerve disorders	7	6.35	1.73-2.76
Hepatocellular damage and hepatitis NEC	27	3.57	2.46-5.18
Cholestasis and jaundice	19	3.45	2.21-5.39
Renal failure and impairment	54	2.73	2.11-3.54
<i>Trametinib</i>			
Retinal bleeding and vascular disorders (excl retinopathy)	10	2.32	1.25-4.32

95% CI: 95% confidence interval

Appendix

Table S1. Description of ADRs seriousness according to targeted therapy.

Table S2. Description of main serious adverse drug reactions (HLT) in each SOC of clinical interest according to targeted therapy. (n=25,452)

Table S1. Description of ADRs seriousness according to targeted therapy.

	Seriousness criteria ^a	
	Hospitalization	Led to death
Vemurafenib		
General disorders and administration site conditions, n=2251	653 (29.0)	850 (37.8)
Death and sudden death, n=540	28 (5.2)	540 (100)
General signs and symptoms NEC, n=422	112 (26.5)	143 (33.9)
Asthenic conditions, n=556	192 (34.5)	79 (14.2)
Skin and subcutaneous tissue disorders, n=2143	715 (33.4)	221 (10.3)
Rashes, eruptions and exanthems NEC, n=659	254 (38.6)	65 (9.9)
Neoplasms, n=1447	288 (19.9)	253 (17.5)
Skin melanomas (excl ocular), n=176	24 (13.6)	79 (44.9)
Neoplasms malignant site unspecified NEC, n=318	53 (16.7)	60 (18.9)
Gastrointestinal disorders, n=1068	465 (43.5)	122 (11.4)
Nausea and vomiting symptoms, n=413	174 (42.1)	49 (11.9)
Musculoskeletal disorders, n=802	278 (34.7)	70 (8.7)
Investigations, n=786	316 (40.2)	95 (12.1)
Nervous system disorders, n=742	312 (42.1)	119 (16.0)
Infections and infestations, n=386	238 (61.7)	77 (20.0)
Metabolism and nutrition disorders, n=377	188 (49.9)	64 (17.0)
Respiratory, thoracic and mediastinal disorders, n=323	184 (57.0)	49 (15.2)
Injury, n=285	101 (35.4)	46 (16.1)
Dabrafenib		
General disorders and administration site conditions, n=479	169 (35.3)	204 (42.6)
Death and sudden death, n=116	7 (6.0)	116 (100.0)
General signs and symptoms NEC, n=60	19 (31.7)	29 (48.3)
Asthenic conditions, n=80	33 (41.3)	22 (27.5)
Febrile disorders, n=108	64 (59.3)	12 (11.1)
Neoplasms, n=233	41 (17.6)	75 (32.2)
Metastases to specified sites, n=42	11 (26.2)	24 (57.1)
Neoplasms malignant site unspecified NEC, n=64	5 (7.8)	21 (32.8)
Skin melanomas, n=33	7 (21.2)	11 (33.3)
Skin and subcutaneous tissue disorders, n=221	56 (25.3)	28 (12.7)

	Seriousness criteria ^a	
	Hospitalization	Led to death
Dabrafenib (continued)		
Investigations, n=143	81 (56.6)	16 (11.2)
Gastrointestinal disorders, n=134	58 (43.3)	34 (25.4)
Nausea and vomiting symptoms, n=60	25 (41.7)	15 (25.0)
Nervous system disorders, n=131	70 (53.4)	37 (28.2)
Infections and infestations, n=73	238 (61.7)	19 (26.0)
Eye disorders, n=66	15 (22.7)	10 (15.2)
Respiratory, thoracic and mediastinal disorders, n=62	37 (59.7)	16 (25.8)
Cobimetinib		
General disorders and administration site conditions, n=28	10 (35.7)	8 (28.6)
Death and sudden death, n=5	0 (0.0)	5 (100.0)
General signs and symptoms NEC, n=		
Nervous system disorders, n=12	9 (75.0)	2 (16.7)
Infections and infestations, n=10	9 (90.0)	2 (20.0)
Respiratory, thoracic and mediastinal disorders, n=8	7 (87.5)	2 (25.0)
Trametinib		
General disorders and administration site conditions, n=290	82 (28.3)	186 (64.1)
Death and sudden death, n=145	6 (4.1)	145 (100.0)
General signs and symptoms NEC, n=41	16 (39.0)	20 (48.8)
Infections and infestations, n=80	63 (78.8)	15 (18.8)
Neoplasms, n=77	34 (44.2)	34 (44.2)
Neoplasms malignant site unspecified NEC, n=36	3 (8.3)	17 (47.2)
Respiratory, thoracic and mediastinal disorders, n=71	49 (69.0)	28 (39.4)
Skin and subcutaneous tissue disorders, n=68	21 (30.9)	21 (30.9)
Rashes, eruptions and exanthems NEC, n=35	13 (37.1)	11 (31.4)
Injury, poisoning and procedural complications, n=41	22 (53.7)	14 (34.2)
Cardiac disorders, n=39	25 (64.1)	10 (25.6)

^aPatients can have more than one seriousness criterion .

ADR: Adverse Drug Reaction; NEC: Not elsewhere classified

	Seriousness criteria ^a	
	Hospitalization	Led to death
Vemurafenib + Cobimetinib		
Skin and subcutaneous tissue disorders, n=372	215 (57.8)	9 (2.4)
General disorders and administration site conditions, n=311	174 (56.0)	63 (20.3)
Death and sudden death, n=26	2 (7.7)	26 (100.0)
General signs and symptoms NEC, n=50	28 (56.0)	12 (24.0)
Asthenic conditions, n=74	46 (62.2)	11 (14.9)
Gastrointestinal disorders, n=244	162 (66.4)	22 (9.0)
Diarrhea (excluding infective), n=88	54 (61.4)	8 (9.1)
Nausea and vomiting symptoms, n=80	53 (66.3)	7 (8.8)
Investigations, n=197	104 (52.8)	19 (9.7)
Liver function analyses, n=69	34 (49.3)	8 (11.6)
Nervous system disorders, n=99	69 (69.7)	17 (17.2)
Eye disorders, n=86	29 (33.7)	3 (3.5)
Infections and infestations, n=82	66 (80.5)	9 (11.0)
Sepsis, bacteraemia, viraemia and fungaemia NEC, n=19	19 (100.0)	4 (21.1)
Metabolism and nutrition disorders, n=73	52 (71.2)	8 (11.0)
Musculoskeletal disorders, n=69	34 (49.3)	7 (10.1)
Renal disorders, n=62	48 (77.4)	6 (9.7)
Renal failure and impairment, n=54	42 (77.8)	6 (11.1)
Respiratory, thoracic and mediastinal disorders, n=57	31 (54.4)	9 (15.8)
Hepatic disorders, n=54	36 (66.7)	5 (9.3)
Neoplasms, n=39	14 (35.9)	12 (30.8)
Vascular disorders, n=34	22 (64.7)	4 (11.8)
Cardiac disorders, n=32	21 (65.6)	8 (25.0)

^aPatients can have more than one seriousness criterion .

ADR: Adverse Drug Reaction; NEC: Not elsewhere classified

	Seriousness criteria ^a	
	Hospitalization	Led to death
Dabrafenib + Trametinib		
General disorders and administration site conditions, n=2016	950 (47.1)	801 (39.7)
Death and sudden death, n=417	40 (9.6)	417 (100.0)
Febrile disorders, n=599	380 (63.4)	97 (16.2)
Asthenic conditions, n=286	174 (60.8)	86 (30.1)
General signs and symptoms NEC, n=225	108 (48.0)	84 (37.3)
Feelings and sensation NEC, n=228	132 (57.9)	44 (19.3)
Neoplasms, n=929	254 (27.3)	318 (34.2)
Neoplasms malignant site unspecified NEC, n=474	82 (17.3)	112 (23.6)
Metastases to specified sites, n=205	78 (38.1)	101 (49.3)
Skin melanomas (excl ocular), n=100	41 (41.0)	61 (61.0)
Investigations, n=731	453 (62.0)	223 (30.5)
Liver function analyses, n=164	97 (59.2)	42 (25.6)
Gastrointestinal disorders, n=714	454 (63.6)	194 (27.2)
Nausea and vomiting symptoms, n=275	185 (67.3)	71 (25.8)
Nervous system disorders, n=575	360 (62.6)	178 (31.0)
Skin and subcutaneous tissue disorders, n=518	233 (45.0)	127 (24.5)
Infections and infestations, n=364	253 (69.5)	120 (33.0)
Musculoskeletal disorders, n=310	174 (56.1)	73 (23.6)
Blood and lymphatic system disorders, n=267	151 (56.6)	57 (21.4)
Respiratory, thoracic and mediastinal disorders, n=263	154 (58.6)	96 (36.5)
Metabolism and nutrition disorders, n=245	176 (71.8)	73 (29.8)
Injury, n=157	91 (58.0)	61 (38.9)
Vascular disorders, n=147	97 (66.0)	47 (32.0)
Cardiac disorders, n=136	92 (67.7)	40 (29.4)
Psychiatric disorders, n=125	84 (67.2)	51 (40.8)

^aPatients can have more than one seriousness criterion .

ADR: Adverse Drug Reaction; NEC: Not elsewhere classified

Table S2. Description of main serious adverse drug reactions (HLT) in each SOC of clinical interest according to targeted therapy. (n=25,452)

SOC, n (%)	Vemurafenib n=12,241	Dabrafenib n=1,914	Cobimetinib n=193	Trametinib n=1,080	Vemurafenib + cobimetinib n=1,905	Dabrafenib + trametinib n=8,119
General disorders and administration site conditions	2,251 (18.4)	479 (25.0)	28 (14.5)	290 (26.9)	311 (16.3)	2,016 (24.8)
Asthenic conditions	556 (4.5)	80 (4.2)	4 (2.1)	37 (3.4)	74 (3.9)	286 (3.5)
Febrile disorders	192 (1.6)	108 (5.6)	3 (1.6)	26 (2.4)	72 (3.8)	599 (7.4)
Death and sudden death	540 (4.4)	116 (6.1)	5 (2.6)	145 (13.4)	26 (1.4)	417 (5.1)
General signs and symptoms NEC	422 (3.5)	60 (3.1)	6 (3.1)	41 (3.8)	50 (2.6)	225 (2.8)
Skin and subcutaneous tissue disorders	2,143 (17.5)	221 (11.6)	14 (7.3)	68 (6.3)	372 (19.5)	518 (6.4)
Rashes, eruptions and exanthems NEC	659 (5.4)	49 (2.6)	4 (2.1)	35 (3.2)	127 (6.7)	149 (1.8)
Dermal and epidermal conditions NEC	182 (1.5)	31 (1.6)	1 (0.5)	9 (0.8)	19 (1.0)	20 (0.3)
Erythemas	140 (1.1)	10 (0.5)	0 (0.0)	3 (0.3)	33 (1.5)	40 (0.4)
Pruritus NEC	152 (1.2)	12 (0.6)	0 (0.0)	5 (0.5)	15 (0.8)	38 (0.5)
Hyperkeratoses	84 (0.7)	22 (1.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (0.5)	10 (0.1)
Gastrointestinal disorders	1,068 (8.7)	34 (7.0)	29 (15.0)	68 (6.3)	244 (12.8)	714 (8.8)
Nausea and vomiting symptoms	413 (3.4)	60 (3.1)	5 (2.6)	18 (1.7)	80 (4.2)	275 (3.4)
Diarrhoea (excl infective)	199 (1.6)	15 (0.8)	10 (5.2)	12 (1.1)	88 (4.6)	109 (1.3)
Gastrointestinal signs and symptoms NEC	75 (0.6)	11 (0.6)	6 (3.1)	2 (0.2)	7 (0.4)	30 (0.4)
Acute and chronic pancreatitis	36 (0.3)	11 (0.6)	0 (0.0)	2 (0.2)	7 (0.4)	12 (0.2)
Neoplasms benign, malignant and unspecified (incl cysts and polyps)	1,447 (11.8)	233 (12.2)	2 (1.0)	77 (7.1)	39 (2.1)	929 (11.4)
Neoplasms malignant site unspecified NEC	318 (2.6)	64 (3.3)	0 (0.0)	36 (3.3)	5 (0.3)	474 (5.8)
Metastases to specified sites	192 (1.6)	42 (2.2)	1 (0.5)	8 (0.7)	11 (0.6)	205 (2.5)
Skin neoplasms benign	183 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.2)	12 (0.2)
Skin neoplasms malignant and unspecified (excl melanoma)	308 (2.5)	37 (1.9)	1 (0.5)	0 (0.0)	4 (0.2)	35 (0.4)
Skin melanomas (excl ocular)	176 (1.4)	33 (1.7)	0 (0.0)	8 (0.7)	3 (0.2)	100 (1.2)
Musculoskeletal and connective tissue disorders	802 (6.6)	86 (4.5)	5 (2.6)	36 (3.3)	69 (3.6)	310 (3.8)
Joint related signs and symptoms	417 (3.4)	25 (1.3)	0 (0.0)	2 (0.2)	23 (1.2)	75 (0.9)
Musculoskeletal and connective tissue pain and discomfort	121 (1.0)	31 (1.6)	0 (0.0)	7 (0.7)	7 (0.4)	5 (0.1)
Muscle pains	117 (1.0)	10 (0.5)	1 (0.5)	3 (0.3)	11 (0.6)	42 (0.5)

SOC, n (%)	Vemurafenib n=12,241	Dabrafenib n=1,914	Cobimetinib n=193	Trametinib n=1,080	Vemurafenib + cobimetinib n=1,905	Dabrafenib + trametinib n=8,119
Nervous system disorders	742 (6.1)	131 (6.8)	12 (6.2)	54 (5.0)	99 (5.2)	575 (7.1)
Headaches NEC	109 (0.9)	26 (1.4)	0 (0.0)	1 (0.1)	11 (0.6)	82 (1.1)
Central nervous system haemorrhages and cerebrovascular accidents	52 (0.4)	9 (0.5)	2 (1.0)	9 (0.8)	6 (0.3)	56 (0.7)
Neurological signs and symptoms NEC	48 (0.4)	14 (0.7)	3 (1.6)	4 (0.4)	5 (0.3)	57 (0.7)
Seizures and seizure disorders NEC	50 (0.4)	12 (0.6)	1 (0.5)	3 (0.3)	6 (0.3)	61 (0.8)
Disturbances in consciousness NEC	39 (0.3)	12 (0.6)	0 (0.0)	7 (0.7)	13 (0.7)	52 (0.6)
Paraesthesias and dysaesthesias	80 (0.7)	6 (0.3)	0 (0.0)	1 (0.1)	7 (0.4)	32 (0.4)
Eye disorders	308 (2.5)	66 (3.5)	22 (11.4)	46 (4.3)	86 (4.5)	215 (2.7)
Visual disorders NEC	99 (0.8)	12 (0.6)	3 (1.6)	10 (0.9)	21 (1.1)	45 (0.6)
Iris and uveal tract infections, irritations and inflammations	36 (0.3)	14 (0.7)	1 (0.5)	3 (0.3)	9 (0.5)	48 (0.6)
Ocular disorders NEC	37 (0.3)	9 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.1)	7 (0.4)	17 (0.2)
Choroid and vitreous structural change, deposit and degeneration	4 (0.0)	5 (0.3)	3 (1.6)	6 (0.6)	13 (0.7)	19 (0.2)
Retinal bleeding and vascular disorders (excl retinopathy)	6 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (0.6)	2 (0.1)	4 (0.1)
Retinal structural change, deposit and degeneration	5 (0.0)	1 (0.1)	6 (3.1)	3 (0.3)	13 (0.7)	18 (0.2)
Ocular infections, inflammations and associated manifestations	37 (0.3)	5 (0.3)	0 (0.0)	2 (0.2)	3 (0.2)	9 (0.1)
Infections and infestations	386 (3.2)	73 (3.8)	10 (5.2)	80 (7.4)	82 (4.3)	364 (4.5)
Lower respiratory tract and lung infections	86 (0.7)	10 (0.5)	1 (0.5)	23 (2.1)	12 (0.6)	54 (0.7)
Sepsis, bacteraemia, viraemia and fungaemia NEC	29 (0.2)	14 (0.2)	1 (0.5)	10 (0.9)	19 (1.0)	41 (0.5)
Urinary tract infections	34 (0.3)	6 (0.3)	0 (0.0)	5 (0.5)	6 (0.3)	37 (0.5)
Infections NEC	36 (0.3)	7 (0.4)	1 (0.5)	7 (0.7)	7 (0.4)	58 (0.7)
Metabolism and nutrition disorders	377 (3.1)	45 (2.4)	2 (1.0)	30 (2.8)	73 (3.8)	245 (3.0)
Appetite disorders	217 (1.8)	15 (0.8)	1 (0.5)	3 (0.3)	16 (0.8)	78 (1.0)
Total fluid volume decreased	69 (0.6)	6 (0.3)	1 (0.5)	15 (1.4)	22 (1.2)	62 (0.8)

SOC, n (%)	Vemurafenib n=12,241	Dabrafenib n=1,914	Cobimetinib n=193	Trametinib n=1,080	Vemurafenib + cobimetinib n=1,905	Dabrafenib + trametinib n=8,119
Injury, poisoning and procedural complications	285 (2.3)	39 (2.0)	3 (1.5)	41 (3.8)	26 (1.4)	157 (1.9)
Radiation injuries	162 (1.3)	5 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (0.4)	0 (0.0)
Physical examination procedures and organ system status	102 (1.0)	10 (0.5)	1 (0.5)	3 (0.3)	15 (0.8)	64 (0.8)
Respiratory, thoracic and mediastinal disorders	323 (2.6)	62 (3.2)	8 (4.2)	71 (6.6)	57 (3.0)	263 (3.2)
Breathing abnormalities	94 (0.8)	17 (0.9)	2 (1.0)	19 (1.8)	7 (0.4)	57 (0.7)
Upper respiratory tract signs and symptoms	42 (0.3)	6 (0.3)	0 (0.0)	4 (0.4)	10 (0.5)	17 (0.2)
Coughing and associated symptoms	40 (0.3)	15 (0.8)	0 (0.0)	6 (0.6)	8 (0.4)	50 (0.6)
Pneumothorax and pleural effusions NEC	28 (0.2)	5 (0.3)	0 (0.0)	9 (0.8)	3 (0.2)	17 (0.2)
Pulmonary oedemas	21 (0.2)	2 (0.1)	0 (0.0)	3 (0.2)	0 (0.0)	7 (0.1)
Blood and lymphatic system disorders	207 (1.7)	37 (1.9)	4 (2.1)	30 (2.8)	28 (1.5)	267 (3.3)
Neutropenias	49 (0.4)	5 (0.3)	2 (1.0)	6 (0.6)	2 (0.1)	79 (1.0)
Anaemias NEC	36 (0.3)	5 (0.2)	3 (1.1)	11 (1.0)	9 (0.5)	37 (0.5)
Leukopenias NEC	44 (0.4)	6 (0.3)	0 (0.0)	2 (0.2)	5 (0.3)	43 (0.5)
Thrombocytopenias	23 (0.2)	6 (0.3)	2 (1.0)	5 (0.5)	4 (0.2)	41 (0.5)
Cardiac disorders	216 (1.8)	32 (1.7)	7 (3.6)	39 (2.8)	32 (1.7)	136 (1.7)
Supraventricular arrhythmias	37 (0.3)	9 (0.5)	0 (0.0)	8 (0.7)	4 (0.2)	18 (0.2)
Heart failures NEC	36 (0.3)	6 (0.3)	1 (0.5)	6 (0.6)	7 (0.4)	19 (0.2)
Rate and rhythm disorders NEC	24 (0.2)	4 (0.2)	1 (0.5)	10 (0.9)	3 (0.2)	15 (0.2)
Ischaemic coronary artery disorders	29 (0.2)	3 (0.2)	0 (0.0)	5 (0.5)	4 (0.2)	17 (0.2)
Renal and urinary disorders	181 (1.5)	33 (1.7)	9 (4.7)	13 (1.2)	62 (3.3)	144 (1.8)
Renal failure and impairment	126 (1.0)	18 (0.9)	5 (2.6)	8 (0.7)	54 (2.8)	78 (1.0)
Bladder and urethral symptoms	18 (0.2)	8 (0.4)	1 (0.5)	1 (0.1)	0 (0.0)	19 (0.2)
Urinary abnormalities	18 (0.2)	1 (0.1)	3 (1.6)	2 (0.2)	2 (0.1)	13 (0.2)
Psychiatric disorders	170 (1.4)	21 (1.1)	5 (2.6)	14 (1.3)	18 (1.0)	125 (1.5)
Disturbances in initiating and maintaining sleep	28 (0.2)	3 (0.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.1)	12 (0.2)
Confusion and disorientation	38 (0.3)	8 (0.4)	3 (1.6)	4 (0.4)	10 (0.5)	41 (0.5)

SOC, n (%)	Vemurafenib n=12,241	Dabrafenib n=1,914	Cobimetinib n=193	Trametinib n=1,080	Vemurafenib + cobimetinib n=1,905	Dabrafenib + trametinib n=8,119
Vascular disorders	140 (1.1)	19 (1.0)	2 (1.0)	18 (1.7)	34 (1.8)	147 (1.8)
Vascular hypertensive disorders NEC	24 (0.2)	2 (0.1)	1 (0.5)	5 (0.5)	10 (0.5)	20 (0.3)
Vascular hypotensive disorders	22 (0.2)	6 (0.3)	0 (0.0)	4 (0.4)	7 (0.4)	46 (0.6)
Haemorrhages NEC	20 (0.2)	2 (0.1)	1 (0.5)	1 (0.1)	3 (0.2)	17 (0.2)
Non-site specific embolism and thrombosis	8 (0.1)	1 (0.1)	0 (0.0)	5 (0.5)	2 (0.1)	15 (0.2)
Hepatobiliary disorders	180 (1.5)	13 (0.7)	4 (2.1)	6 (0.6)	54 (2.8)	105 (1.3)
Hepatic and hepatobiliary disorders NEC	19 (0.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (0.2)	6 (0.1)
Hepatocellular damage and hepatitis NEC	78 (0.6)	2 (0.1)	2 (1.0)	0 (0.0)	24 (1.3)	45 (0.6)
Cholestasis and jaundice	36 (0.3)	4 (0.2)	0 (0.0)	1 (0.1)	16 (0.8)	18 (0.2)
Hepatic failure and associated disorders	11 (0.1)	2 (0.1)	0 (0.0)	3 (0.3)	3 (0.2)	10 (0.1)

3. Mise au point d'une méthode analytique pour le suivi thérapeutique pharmacologique des BRAFi et MEKi - Article 2

« An UPLC-MS/MS method for the quantification of BRAF inhibitors (vemurafenib, dabrafenib) and MEK inhibitors (cobimetinib, trametinib, binimetinib) in human plasma. Application to treated melanoma patients »

Marine Rousset, Karine Titier, Stéphane Bouchet, Caroline Dutriaux, Anne Pham-Ledard,
Sorilla Prey, Mireille Canal-Raffin, Mathieu Molimard

Clinica Chimica Acta 470 (2017) 8-13

3.1. Introduction et présentation

A l'initiation de ce travail, six méthodes de simple précipitation permettant de doser le vemurafenib dans le plasma humain existaient : une méthode en chromatographie liquide couplée à une détection ultraviolet utilisant le sorafenib comme standard interne ¹²⁵, et cinq méthodes couplées à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS / MS) utilisant le vemurafenib marqué: [13C6] –vemurafenib comme étalon interne ^{58,126-128}. Aucune de ces méthodes ne permettait la détermination simultanée du cobimetinib, le MEKi associé au vemurafenib.

Une méthode HPLC-MS / MS permettait la quantification du cobimetinib ¹²⁹ et deux méthodes permettaient le dosage du dabrafenib (dont une permettant le dosage simultané du trametinib) ^{63,130}. Dans ces méthodes, les limites de quantification choisies pour le dabrafenib semblaient trop élevées pour la mesure des concentrations résiduelles tandis que la limite supérieure de quantification semblait trop faible pour la mesure des concentrations du cobimetinib par rapport à celles décrites dans la littérature ¹³¹. Aucune de ces méthodes n'utilisait l'extraction en phase solide (SPE) qui réduit l'effet matriciel souvent rencontré dans les méthodes de précipitation ^{119,120}. Aucune méthode de dosage du binimetinib n'avait été publiée.

Le but de cette étude était de développer une méthode UPLC-MS / MS avec extraction en phase solide adaptée à l'application de routine, permettant une détermination rapide, spécifique et sensible du vemurafenib, dabrafenib, cobimetinib, trametinib et du binimetinib.

3.2. Discussion

La méthode présentée permet de doser en moins de 5 minutes tous les BRAFi et MEKi : les quatre commercialisés au moment de la mise au point, et le binimetinib pour lequel le laboratoire était impliqué dans une étude clinique ⁹⁷. Cette méthode a été validée selon les exigences qualité de la norme NF ISO 15189 applicable aux laboratoires de biologie médicale. Les procédures de validation suivaient les recommandations des guides COFRAC (Santé Humaine, Guides Techniques d'Accréditation), ainsi que les recommandations de l'EMA « Guideline on bioanalytical method validation 2012 » et de la FDA : « Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics ».

Pour le vemurafenib, dont les concentrations plasmatiques sont 1000 fois supérieures à celles des autres médicaments, la source avait tendance à être saturée, c'est pourquoi nous avons dû utiliser une prise d'essai bien inférieure.

Les valeurs de concentrations plasmatiques retrouvées chez les patients de cette étude préliminaire ont permis de valider les valeurs de gamme choisies et la limite de quantification pour chaque médicament. Nous avons également montré une large variabilité inter-individuelle des concentrations plasmatiques de chacun des médicaments dosés, la plus importante concernait le dabrafenib (CV 90%) puis le vemurafenib et cobimetinib (CV $\approx$ 70%). Enfin une moindre variabilité était observée pour le trametinib (CV $\approx$ 40%) ce qui confortait notre hypothèse de recherche qui postule que les médicaments métabolisés par le cytochrome P450 sont plus susceptibles d'entraîner une grande variabilité interindividuelle d'exposition.

L'association encorafenib + binimetinib a été approuvée le 27 juin 2018 par la FDA aux USA et a récemment obtenu une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) nominative en France. Il va donc être nécessaire d'ajouter l'encorafenib à la méthode de dosage car les onco-dermatologues du CHU voient en ces dosages d'inhibiteur de protéine kinase un véritable avantage dans leur pratique clinique.



An UPLC-MS/MS method for the quantification of BRAF inhibitors (vemurafenib, dabrafenib) and MEK inhibitors (cobimetinib, trametinib, binimetinib) in human plasma. Application to treated melanoma patients



Marine Rousset^{a,b,*}, Karine Titier^a, Stephane Bouchet^{a,b}, Caroline Dutriaux^c, Anne Pham-Ledard^{c,d}, Sorilla Prey^c, Mireille Canal-Raffin^{a,e}, Mathieu Molimard^{a,b}

^a Department of Pharmacology, University Hospital Bordeaux, F-33000, France

^b Univ. Bordeaux INSERM, Bordeaux Population Health Research Center, team PHARMACOEPIDEMIOLOGY, UMR 1219, F-33000 Bordeaux, France

^c Department of Dermatology, University Hospital Bordeaux, F-33000, France

^d EA2406 Histology and Molecular Pathology of Tumors, University of Bordeaux, F-33000, France

^e Univ. Bordeaux INSERM, Bordeaux Population Health Research Center, team Cancer-environnement-EPICENE, UMR 1219, F-33000 Bordeaux, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Melanoma
Vemurafenib
Dabrafenib
Plasma
Therapeutic drug monitoring
LC-MS/MS

ABSTRACT

Targeted therapies for cancers are fast-growing therapies. For instance kinase inhibitors such as BRAF inhibitors (BRAFi) and MEK inhibitors (MEKi) are increasingly used to treat malignant melanoma. The metabolic profile of these drugs can result in great interindividual variability, justifying therapeutic drug monitoring (TDM). We describe a rapid and specific method for quantification of 2 BRAFi (vemurafenib, dabrafenib) and 3 MEKi (cobimetinib, trametinib and binimetinib). Chromatography was performed on a Waters Acquity-UPLC system with CORTECS C18 + column, under a gradient of 10% acetic acid in water/acetonitrile. An Acquity-TQD® with electrospray ionization was used for detection. Samples were prepared by solid phase extraction (Oasis® MCX microElution) before injection in the system. Calibration curves ranges from 0.4 to 100 µg/ml for vemurafenib, from 1 to 1000 ng/ml for dabrafenib, from 0.5 to 500 ng/ml for cobimetinib and binimetinib, and from 0.75 to 250 ng/ml for trametinib. At all concentrations the bias was within $\pm 15\%$ of the nominal concentrations and precision was $\leq 15\%$. All results were within the acceptance criteria of the EMA guidelines on method validation. This rapid, sensitive and specific UPLC-MS/MS method can perform simultaneous quantification of targeted therapies used in malignant melanoma and is usable for routine TDM.

1. Introduction

Malignant melanoma is a lethal skin cancer. The incidence of melanoma increases each year. Historically the prognosis of patients with inoperable malignant melanoma was approximately 6 months with 26% of subjects alive at 1 year, and a median time to progression of 1.7 months [1].

The therapeutic strategy in melanoma has been completely redesigned by the development of molecular targeted agents and immune checkpoints inhibitors. Activating mutations in BRAF kinase leads to a constitutive activation of the mitogen-activated protein kinase pathway (MAPK pathway). This pathway (also called RAS/RAF/MEK/ERK) is a critical proliferation pathway in many human cancers, and BRAF mutations have been identified in 40%–60% of melanoma [2,3].

Clinical trials have demonstrated that BRAF inhibitors (BRAFi: vemurafenib and dabrafenib) combined with MEK inhibitors (MEKi: cobimetinib, trametinib) produce high response rates and a prolonged overall survival in advanced stage BRAF mutant malignant melanoma patients [4,5]. The BRAFi + MEKi combination is a current standard of care in BRAF mutated advanced melanoma. There are two studied combinations: vemurafenib + cobimetinib and dabrafenib + trametinib. The MEKi binimetinib has shown promising results in treating patients with NRAS mutant melanoma in monotherapy, and clinical trials are currently assessing the potential utility of this therapy [6].

BRAFi and MEKi are kinase inhibitors such as imatinib, for which therapeutic drug monitoring (TDM) is of interest. A trough concentration (C_{min}) threshold of 1000 ng/ml imatinib has been associated with better cytogenetic and molecular responses in chronic myeloid leukaemia.

Abbreviations: BRAFi, BRAF inhibitors; MEKi, MEK inhibitors; C_{min}, Trough concentration; CV, Coefficient of variation; EMA, European Medical Agency; ESI, Electrospray ionization; LC-UV, Liquid chromatography combined to UV detection; LLOQ, Low limit of quantification; MS/MS, Tandem mass spectrometry; QC, Quality control; SPE, Solid phase extraction; TQD, Triple quadrupole; UPLC, Ultra performance liquid chromatography

* Corresponding author at: Laboratoire de Pharmacologie Clinique et Toxicologie, 2e étage Tripode, CHU Pellegrin, 4 place Amélie Raba Léon, 33076 Bordeaux, France.

E-mail address: marine.rousset@chu-bordeaux.fr (M. Rousset).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2017.04.009>

Received 22 December 2016; Received in revised form 24 February 2017; Accepted 11 April 2017

Available online 12 April 2017

0009-8981/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

mia, and C_{min} up to 760 ng/ml has been associated with prolonged progression free survival in real-life setting in gastrointestinal stromal tumor [7,8]. This suggests that plasma levels may be more predictive than absolute dose in predicting treatment response and adverse effects [9,10]. The C_{min} appears more reproducible and predictive than C_{max}.

For vemurafenib used in monotherapy, a high interpatient variability has been described [11–13] while little is known about dabrafenib, trametinib, cobimetinib and binimetinib. Dabrafenib and cobimetinib are predominantly metabolized by CYP3A4, which is a predictive factor for interindividual pharmacokinetic variability [14]. Dabrafenib is also an inducer of cytochrome P450 [15]. Trametinib is a P-glycoprotein p (P-gp) substrate and has a long half-life (127 h), which can lead to its accumulation [16]. As previously shown for other orally targeted therapies, TDM of these drugs should be important to predict efficacy and toxicity (lack of therapeutic response, adverse drug reactions, anticipated drug-drug interactions and concerns over adherence to these oral treatments).

Six methods have been described determining vemurafenib in human plasma. A high performance liquid chromatography (LC)-UV method has been described for simultaneous quantification of vemurafenib and erlotinib, using sorafenib as internal standard [17]. The five other methods were LC coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), using a labelled internal standard of vemurafenib: [¹³C₆]-vemurafenib [11,18–21]. None of these methods allow the simultaneous determination of cobimetinib, the MEKi used in association with vemurafenib. An HPLC-MS/MS assay has been developed for cobimetinib quantification in the range of 0.20 to 100 ng/ml [22]. Dabrafenib quantification in human plasma has been described by Nijenhuis et al. [23]. This LC-MS/MS method presents the advantage of determining simultaneously dabrafenib and trametinib compared to the UHPLC-MS/MS method by Bershas et al. [23,24]. However the range chosen for dabrafenib (50 to 5000 ng/ml) seems too high compared to C_{min} described in the literature (26 ng/ml) [25]. None of these methods use solid phase extraction (SPE) that reduces the matrix effect often found in precipitation methods (one of the key limitations of mass spectrometry, and which could also enable automation of the process) [26,27]. No bioanalytical assay has been described for binimetinib as far as we know.

The aim of this study was to develop an UPLC-MS/MS method with SPE, adapted to the routine application, allowing rapid, specific and sensitive determination of vemurafenib, dabrafenib, cobimetinib, trametinib and binimetinib.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Vemurafenib and [¹³C₆]-vemurafenib, dabrafenib and [²H₉]-dabrafenib, cobimetinib and [¹³C₆]-cobimetinib, trametinib and [¹³C₆]-trametinib, binimetinib and [¹³C₂, ²H₄]-binimetinib were purchased from Alsachim® (Illkirch-Graffenstaden, France). HPLC grade solvents

were purchased from Prolabo® (Paris, France). Human plasma was provided by EFS (Établissement Français du Sang, Bordeaux).

2.2. Stock solutions, calibration standards and quality control samples

Stock solutions for calibration standard and quality control samples (QC) were prepared in DMSO for vemurafenib, and in acetonitrile/methanol/DMSO (v/v/v) for dabrafenib, trametinib, cobimetinib and binimetinib. Isotopes stock solutions were prepared at 1 mg/ml in DMSO for [¹³C₆]-vemurafenib, and in acetonitrile/methanol/DMSO (v/v/v) for [²H₉]-dabrafenib, [¹³C₆]-trametinib, [¹³C₆]-cobimetinib and [¹³C₂, ²H₄]-binimetinib. All solutions were stored at –20 °C in a light protected container.

Calibration standards were prepared in drug-free plasma before each validation run at different concentrations: 0.4, 1, 10, 20, 40, 70, 100 µg/ml for vemurafenib; 1, 5, 10, 25, 50, 100, 400, 700, 1000 ng/ml for dabrafenib; 0.5, 2.5, 5, 25, 50, 200, 350, 500 ng/ml for cobimetinib and binimetinib; and 0.75, 1.5, 2.5, 12.5, 25, 100, 175, 250 ng/ml for trametinib.

Quality controls (QC) were prepared in drug-free plasma at 1.2, 50, 75 µg/ml for vemurafenib; 3, 500, 750 ng/ml for dabrafenib; 1.5, 250, 375 ng/ml for cobimetinib and binimetinib; and 2.25, 125, 187.5 ng/ml for trametinib.

Internal standard (IS) working solution was prepared before each analysis from the stock solution by mixing internal standards in water/propylene glycol/H₃PO₄ (86/10/4). Target concentrations were: 1 µg/ml for [¹³C₆]-vemurafenib; 500 ng/ml for [²H₉]-dabrafenib, 1000 ng/ml for [¹³C₆]-cobimetinib and [¹³C₂, ²H₄]-binimetinib and 500 ng/ml for [¹³C₆]-trametinib.

2.3. Chromatography

The UPLC system was an Acquity UPLC® system (Waters®, Milford, USA) with the MassLynx software. The column was a CORTECS® C18 + UPLC d_p = 5 µm, 2.1 × 100 mm (Waters®, Milford, USA) maintained at 25 °C. The mobile phase consisted of a combination of phase A (acetic acid buffer 0.01%) and phase B (acetonitrile). The conditions of chromatography were as follows: phase B was initiated at 12% of the mobile phase and increased linearly to 40% at 2 min, 60% at 2.9 min, and 90% at 3.6 min, then back to 12% until the end of the run at a flow rate of 0.4 ml/min.

2.4. Mass spectrometry

The mass spectrometry system used for detection was an Acquity TQD® detector (Waters®, Milford, USA) with electro-spray ionization (ESI) in positive ion mode. ESI was operated at 150 °C, with desolvation temperature at 420 °C, cone gas flow adjusted at 20 l/h, desolvation gas flow at 1000 l/h and capillary voltage set up at 2 kV. MS collision was carried out by argon at 3.10^{–3} mBar. Mass spectrometer settings, including parent ions, daughter ions of quantification and identifica-

Table 1

Retention times and MRM transitions for the detection of vemurafenib, dabrafenib, cobimetinib, trametinib, binimetinib and internal standards (IS) by UPLC-MS/MS.

Molecule	Retention time (min)	Parent ion (m/z)	Quantification transition ion (m/z)	Confirmation transition ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Vemurafenib	3.47	490	255.4	383.3	60	40/30
[¹³ C ₆]-Vemurafenib (IS)	3.47	496	261.4	–	60	40
Dabrafenib	3.40	520.2	292.3	307.4	30	50/30
[² H ₉]-Dabrafenib (IS)	3.34	529	316.4	–	50	55
Cobimetinib	2.28	532.1	249.1	140.4	30	40/20
[¹³ C ₆]-Cobimetinib (IS)	2.28	538	255.4	–	40	40
Trametinib	3.30	616.2	491	254.4	40	30/30
[¹³ C ₆]-Trametinib (IS)	3.30	622	497.6	–	60	30
Binimetinib	2.20	443.1	165.4	381.3	40	30/20
[¹³ C ₂ , ² H ₄]-Binimetinib (IS)	2.20	448.9	165.1	–	50	30

tion, retention times, cone voltage and collision energy of each molecule and internal standards are presented in Table 1.

2.5. Sample preparation

Three hundred microliters of plasma (for dabrafenib, cobimetinib, trametinib and binimetinib determination) or 25 μ l of plasma (for vemurafenib determination) were spiked with 600 μ l IS working solution. Eight hundred and forty microliters of the mixture (or 600 μ l for vemurafenib determination) were applied to a micro-elution plate (Oasis MCX, 2 mg sorbent per well, 30 μ m particle size, Waters, Milford, USA) preconditioned by 200 μ l of methanol, followed by 200 μ l of purified water. After a wash by 200 μ l of 2% formic acid, elution was performed with twice 25 μ l of water/methanol/ammonia (57/38/5), followed by 50 μ l of 4% formic acid into a 96-well collection plate and mixed. Seven microliters of the eluate (for dabrafenib, cobimetinib, trametinib and binimetinib determination) or 1 μ l of the eluate (for vemurafenib determination) was directly injected into the UPLC unit.

2.6. Assay validation procedures

Assay validation procedures were performed according to the EMA “Guideline on Bioanalytical Method Validation” 2011 [28].

2.6.1. Specificity and selectivity

The lack of interference from endogenous compounds was examined by analysing six different blank human plasma samples with or without IS. The lack of interference from each drug and IS with the MRM channels of the other drugs was checked by injecting pure solutions of each drug separately and searching for the total absence of signal in the MRM channels of other drugs (both quantification and confirmation transitions) [9].

2.6.2. Linearity

Six standard curves were analysed. A weighted least squares linear regression model was used to calculate the equation relating the peak area ratio (drug versus internal standard) and the concentration of each compound in the calibrators. The inverse of the concentration (1/x) was used as the weighing factor. To confirm the calibration curve was linear, the difference between the observed values and the fitted y-values expressed as coefficient of variation (CV) was examined for each calibration concentration. The CV should be < 15% for each plot of all calibration curves.

2.6.3. Precision

Intra-day variation was assessed by injecting five replicate for each QC level on the same day. Inter-day variation was assessed by injecting a further 5 samples of each concentration on three subsequent days. The CV was used to report the intra- and inter-assay precision. The mean of each set of concentrations, standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV by ANOVA test) were determined using Excel (Microsoft, Redmond, USA) and XLStat (Addinsoft, Paris, France). The precision expressed as CV should be < 15% for each QC sample.

2.6.4. Bias

Bias was measured as the percentage of difference from theoretical concentration according to the equation:

$$\text{Bias (\%)} = (\text{measured concentration} - \text{theoretical concentration}) / \text{theoretical concentration} \times 100$$

The bias should be < 15% for all QC samples.

2.6.5. Limit of quantification

The lower limit of quantification (LLOQ) was determined as the lowest concentration of a given drug giving a response that could be quantified with both inter-assay variation and bias lower than 20%.

2.6.6. Extraction recovery

Extraction recoveries were determined by comparing response obtained from blank plasma samples spiked before extraction with reference solutions at the same nominal concentration. Quality controls were tested in 3 replicates.

2.6.7. Matrix effect

Blank extracts spiked with drugs and each internal standard were compared with reference solutions at the same nominal concentration. For drugs, the low QC level was tested in 3 replicates using six different blood samples. For internal standards, the target concentrations (1 μ g/ml for [$^{13}\text{C}_6$]-vemurafenib; 500 ng/ml for [$^2\text{H}_9$]-dabrafenib, 1000 ng/ml for [$^{13}\text{C}_6$]-cobimetinib and [$^{13}\text{C}_2, ^2\text{H}_4$]-binimetinib and 500 ng/ml for [$^{13}\text{C}_6$]-trametinib) were tested in 3 replicates using six different blood samples. Variation within 20% of the nominal concentration was accepted. Further assessment of the ion suppression was performed on six different human blood samples using post-column infusion (five-fold the LOQ at flow-rate of 5 μ l/min).

2.6.8. Stability

The stability of BRAFi and MEKi in plasma samples was assessed at two QC levels (1.2, 50 μ g/ml for vemurafenib; 3, 500 ng/ml for dabrafenib; 1.5, 50 ng/ml for cobimetinib and binimetinib; and 1.25, 125 ng/ml for trametinib) in triplicate. Plasma samples were stored at room temperature for 24 h without light protection, at +4 $^\circ\text{C}$ up to 3 days and at -20 $^\circ\text{C}$ up to 1 month. Stability was also tested after 3 freeze and thaw cycles. The bias should be < 15% for all QC samples.

2.7. Applications to treated melanoma patients

The recommended oral doses are 960 mg bi-daily (BID) for vemurafenib alone or in association with 60 mg once daily cobimetinib (21/28 days); 150 mg BID for dabrafenib alone or in association with 2 mg once daily trametinib. Binimetinib is tested in monotherapy in phase III trial at the dosage 45 mg BID. To test the applicability of this assay, vemurafenib and cobimetinib were determined in plasma samples of 8 patients treated by the bitherapy; dabrafenib and trametinib concentrations were determined in plasma samples of 13 patients treated by the bitherapy. Blood samples were collected into 7 ml lithium heparinised tubes at steady state, i.e. after at least 15 days of treatment, just before the next administration (trough plasma concentration or $C_{\min}$). This study was approved by the French CNIL (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés).

3. Results

3.1. Chromatography

Representative chromatograms of the first quality control concentration level of each drug are presented in Fig. 1. Under the described chromatographic conditions, all compounds were separated in 5 min, retention time for each analyte being between 2.20 and 3.47 min (detailed in Table 1).

3.2. Specificity and selectivity

No endogenous interference was observed in 6 different blank human plasma samples with or without IS. No interference was observed between each drug and IS and the MRM channels of the other drugs.

3.3. Linearity

The assay was linear over the validated concentration range from 0.4 to 100 μ g/ml for vemurafenib, 1 to 1000 ng/ml for dabrafenib, 0.5 to 500 ng/ml for cobimetinib and binimetinib, and 0.75 to 250 ng/ml

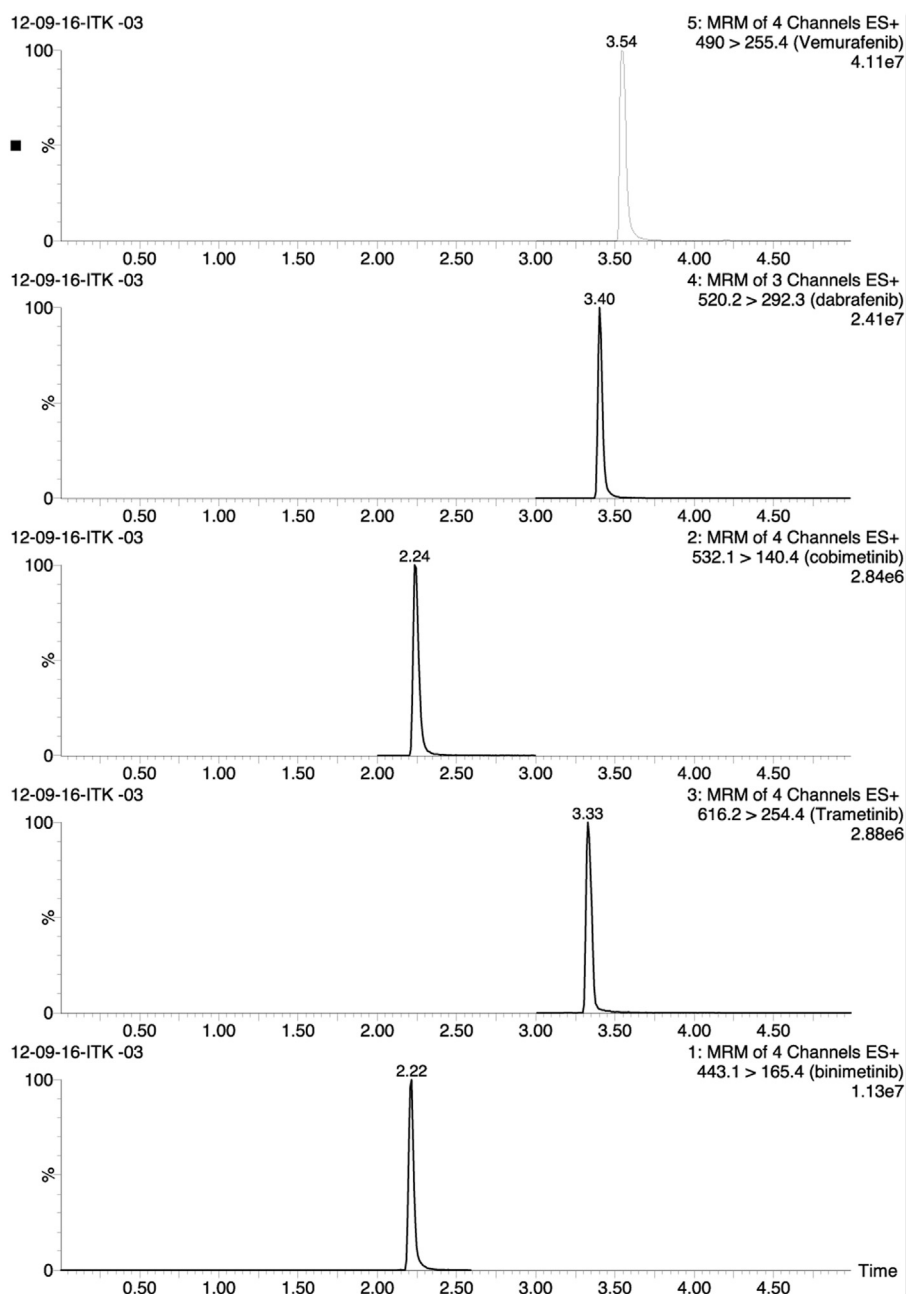


Fig. 1. Representative chromatogram of first quality control concentration level in plasma for each drug.

for trametinib in human plasma. Correlation coefficients (r^2) were at least 0.997 with a slope CV lower than 15% ($n = 6$ for each molecule).

3.4. Precision

The results obtained for precision are presented in Table 2. The method showed an intra-day and inter-day precision, expressed as CV, of < 14.7%. A bias of < 8.9% was achieved.

3.5. Limit of quantification

For vemurafenib LLOQ was 0.4 $\mu\text{g/ml}$, 1 ng/ml for dabrafenib, 0.5 ng/ml for cobimetinib and binimetinib, and 0.75 ng/ml for trametinib.

3.6. Extraction recovery and matrix effect

The extraction recoveries obtained at the different tested concentrations are presented in Table 2. The extraction recoveries ranged from 80 to 117.9%, except for trametinib (38.1%).

The matrix effect assay did not show any significant modification of each transition observed for all blank plasma samples at the corresponding elution times of the BRAFi and MEKi. The mean matrix effect ranged from 80.6 to 115.4%, which is acceptable (Table 2). The mean matrix effect of isotopic internal standards was similar to drug of interest.

3.7. Stability

BRAFi and MEKi were stable under the tested conditions, the bias being < 15% for all QC samples.

Table 2

Intra-day and inter-day precision and accuracy data. Vemurafenib concentrations are expressed in µg/ml; dabrafenib, cobimetinib, binimetinib, trametinib are expressed in ng/ml.

Molecule	Theoretical concentration	Intra-day		Inter-day			Matrix effect (%)	Extraction recovery (%)
		Observed concentration (mean)	CV (%)	Observed concentration (mean)	CV (%)	Bias		
Vemurafenib	0.4 (LOQ)	0.4	9.1	0.4	8.8	−5.6	–	–
	1.2	1.1	4.3	1.1	6.5	−8.4	80.6	98.6
	50	50.1	3.9	47.3	5.7	−5.5	–	80.0
	75	73.3	4.1	73.5	6.2	−2.0	–	89.6
[¹³ C ₆]-Vemurafenib							89.0	
Dabrafenib	1 (LOQ)	1.0	1.5	0.9	6.9	−5.5	–	–
	3	3.1	3.5	3.1	8.0	4.5	108.9	111.5
	500	511.4	4.1	524.5	5.2	4.9	–	102.4
	750	771.4	1.5	783.5	2.6	4.5	–	100.8
[² H ₉]-Dabrafenib							100.9	
Cobimetinib	0.5 (LOQ)	0.6	7.0	0.5	12.4	6.5	–	–
	1.5	1.5	6.7	1.4	6.1	−6.6	112.3	115.1
	250	254.7	2.0	260.5	3.6	4.2	–	101.1
	375	386.2	2.0	399.6	4.6	6.6	–	102.4
[¹³ C ₆]-Cobimetinib							110.8	
Trametinib	0.75 (LOQ)	0.7	10.9	0.7	12.9	−3.9	–	–
	2.25	2.0	4.8	2.2	14.7	−2.4	115.4	45.8
	125	128.4	3.9	133.0	5.9	6.4	–	38.9
	187.5	199.1	6.0	204.1	5.0	8.9	–	38.1
[¹³ C ₆]-Trametinib							107.0	
Binimetinib	0.5 (LOQ)	0.5	8.2	0.5	15.3	0.5	–	–
	1.5	1.4	4.8	1.4	5.9	−7.0	114.9	117.8
	250	248.4	3.5	258.4	4.9	3.4	–	103.2
	375	374.4	6.7	398.9	6.5	6.4	–	98.9
[¹³ C ₂ , ² H ₄]-Binimetinib							107.0	

3.8. Clinical application

The results are shown in Fig. 2. All values were within the validated range of 0.4 to 100 µg/ml for vemurafenib, 1–1000 ng/ml for dabrafenib; 0.5–500 ng/ml for cobimetinib and 0.75–250 ng/ml for trametinib. At steady state, mean trough plasma concentration (C_{min}) of patients treated with the recommended dose of vemurafenib and cobimetinib ($n = 8$ patients) was 44.5 µg/ml (CV 71%) for vemurafenib and 131.1 ng/ml (CV 72%) for cobimetinib. The mean C_{min} for patients treated by the bitherapy dabrafenib and trametinib at recommended dose ($n = 13$) was 63.1 ng/ml (CV 90%) for dabrafenib and 13.5 ng/ml (CV 41%) for trametinib. Serious adverse events needing dabrafenib dose reduction occurred in three patients. The mean dabrafenib C_{min} of these 3 patients was 143.3 ng/ml whereas the mean C_{min} in patients who did not required dose reduction ($n = 10$) was 43 ng/ml. No patient

needed dose reduction of trametinib.

4. Discussion

The UPLC-MS/MS method described allows the simultaneous quantification of BRAFi and MEKi used in the treatment of malignant melanoma both rapidly and with high sensitivity. This method conforms to the EMA Guidelines.

Dabrafenib is metabolized to a hydroxy-metabolite, which is further oxidized to carboxy-dabrafenib, and decarboxylated to form desmethyl-dabrafenib. Dabrafenib, hydroxy-dabrafenib, and desmethyl-dabrafenib may contribute to clinical activity, whereas contribution of carboxy-dabrafenib is assumed to be minimal. Given that hydroxy-dabrafenib appears to be formation-rate limited (with terminal phase parallels to that of parent) and that desmethyl-dabrafenib accounted for only 3% of metabolites we decided to quantify only dabrafenib and no active metabolites [24].

The lower limit of quantification (LLOQ) permits analysis of trough concentrations for all the molecules, including low concentrations ones, such as trametinib.

The LLOQ value for dabrafenib quantification was chosen because C_{min} values described in the European public assessment report (EPAR) are around 30 ng/ml, also the range chosen by Nijenhuis et al. (50–5000 ng/ml) would not have allowed our C_{min} analysis [23].

Solid phase extraction (SPE) was chosen because it allowed the use of a single protocol to quantify several BRAFi and MEKi that have a wide range of chemical properties pKa values from 7 to 13 (Marvin 5.0.0 software, www.chemaxon.com).

This could not be done with liquid/liquid extraction because of the different pKa values and thus the need of different steps or buffers to extract all analytes. Another reason to choose SPE concerns the matrix effect because it is considered that protein precipitation using an organic solvent produces more matrix effects than SPE [27]. Solid phase extraction coupled to UPLC/MS-MS remains the most effective sample preparation to reduce matrix effect and specifically ion suppression [29]. Furthermore, the marketing of the SPE-plates makes the method presented herein ready-to use for robotic automation. This is

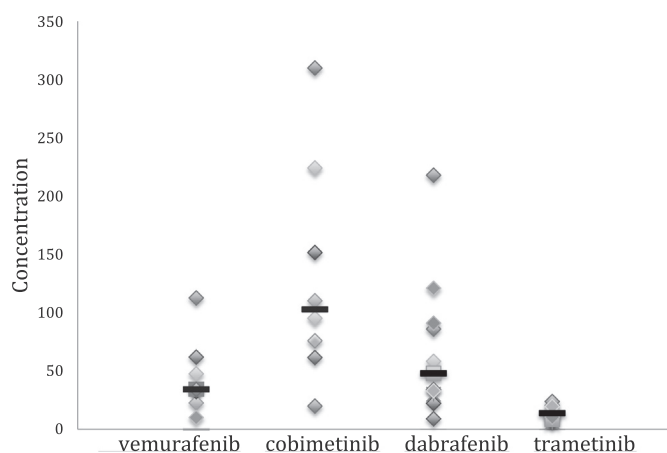


Fig. 2. Plasma concentrations of vemurafenib (µg/ml), cobimetinib, dabrafenib or trametinib (ng/ml) of individual samples. Concentrations were determined once for each patient, at steady-state (after at least 15 days of continuous treatment) just before the next administration (residual concentration: C_{min}). The median is represented by a black bar ($n = 8$ patients for vemurafenib and cobimetinib; $n = 13$ for dabrafenib and trametinib).

less time-consuming and more compatible than SPE-cartridges that often require an evaporation step, or protein precipitation that must be followed by centrifugation.

As previously shown, BRAFi presents great variability in their pharmacokinetics [11,23,30]. The interpatient variability of the trametinib C_{min} is higher than in the study presented by Ouellet et al. [31]. The discordance between the cobimetinib C_{min} variability described here and the one described by Han et al. is probably due to the fact that we considered only trough concentration measured at steady state [32]. Up to now, TDM of BRAFi and MEKi has only been proposed for vemurafenib. The results of two studies showed that a plasma concentration of vemurafenib below 40 µg/ml was significantly associated with a shorter progression free survival [12,13]. Up to now there is no recommended plasma concentration for BRAFi and MEKi. In this preliminary study the mean C_{min} of dabrafenib was higher in patients who presented adverse events requiring dose reduction than in the other patients. However these results were obtained from a small number of patients. Therefore, further studies are necessary to evaluate correlation of individual plasma levels of BRAFi and MEKi with occurrence of adverse events and response to treatment.

By combining SPE and UPLC/MS-MS, this method allowed great sensitivity, which is of particular importance for trametinib. The method presented herein gives a real advantage in pharmacokinetic and pharmacodynamic relation studies.

5. Conclusion

This method, which is routinely used at the Bordeaux university hospital, combines high specificity, sensitivity and throughput, and allows a reliable determination of all BRAFi and MEKi used in malignant melanoma treatment, for both clinical and research uses. Target concentrations should be determined for these new therapies to allow a therapeutic drug monitoring and individualization of prescription when necessary.

Formatting of funding sources

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Acknowledgements

The authors thank Evelyne Deridet and Dominique Ducint for technical contributions.

References

- [1] E.L. Korn, P.Y. Liu, S.J. Lee, et al., Meta-analysis of phase II cooperative group trials in metastatic stage IV melanoma to determine progression-free and overall survival benchmarks for future phase II trials, *J. Clin. Oncol.* 26 (4) (2008) 527–534.
- [2] H. Davies, G.R. Bignell, C. Cox, et al., Mutations of the BRAF gene in human cancer, *Nature* 417 (6892) (2002) 949–954.
- [3] J.C. Rubinstein, M. Sznol, A.C. Pavlick, et al., Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032, *J. Transl. Med.* 8 (2010) 67.
- [4] K.T. Flaherty, C. Robert, P. Hersey, et al., Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma, *N. Engl. J. Med.* 367 (2) (2012) 107–114.
- [5] G.V. Long, D. Stroyakovskiy, H. Gogas, et al., Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma, *N. Engl. J. Med.* 371 (20) (2014) 1877–1888.
- [6] A.M. Menzies, G.V. Long, Recent developments in melanoma therapy, *JAMA Oncol.* 2 (10) (2016) 1259–1260.
- [7] S. Bouchet, K. Titier, N. Moore, et al., Therapeutic drug monitoring of imatinib in chronic myeloid leukemia: experience from 1216 patients at a centralized laboratory, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 27 (6) (2013) 690–697.
- [8] S. Bouchet, S. Poulette, K. Titier, et al., Relationship between imatinib trough concentration and outcomes in the treatment of advanced gastrointestinal stromal tumours in a real-life setting, *Eur. J. Cancer* 57 (2016) 31–38.
- [9] S. Bouchet, E. Chauzit, D. Ducint, et al., Simultaneous determination of nine tyrosine kinase inhibitors by 96-well solid-phase extraction and ultra performance LC/MS-MS, *Clin. Chim. Acta* 412 (11–12) (2011) 1060–1067.
- [10] C. Delbaldo, E. Chatelut, M. Re, et al., Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of imatinib and its main metabolite in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors, *Clin. Cancer Res.* 12 (20 Pt 1) (2006) 6073–6078.
- [11] J.C. Alvarez, E. Funck-Brentano, E. Abe, I. Etting, P. Saïg, A. Knapp, A LC/MS/MS micro-method for human plasma quantification of vemurafenib. Application to treated melanoma patients, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 97 (2014) 29–32.
- [12] E. Funck-Brentano, J.C. Alvarez, C. Longvert, et al., Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600mut melanoma patients: impact on tumour response and tolerance, *Ann. Oncol.* 26 (2015) 1470–1475.
- [13] N. Kramkimel, A. Thomas-Schoemann, L. Sakji, et al., Vemurafenib pharmacokinetics and its correlation with efficacy and safety in outpatients with advanced BRAF-mutated melanoma, *Target. Oncol.* 11 (1) (2016) 59–69.
- [14] N.R. Budha, T. Ji, L. Musib, et al., Evaluation of cytochrome P450 3A4-mediated drug-drug interaction potential for cobimetinib using physiologically based pharmacokinetic modeling and simulation, *Clin. Pharmacokinet.* 55 (11) (2016) 1435–1445.
- [15] S.K. Lawrence, D. Nguyen, C. Bowen, L. Richards-Peterson, K.W. Skordos, The metabolic drug-drug interaction profile of Dabrafenib: in vitro investigations and quantitative extrapolation of the P450-mediated DDI risk, *Drug Metab. Dispos.* 42 (7) (2014) 1180–1190.
- [16] J.R. Infante, L.A. Fecher, G.S. Falchook, et al., Safety, pharmacokinetic, pharmacodynamic, and efficacy data for the oral MEK inhibitor trametinib: a phase 1 dose-escalation trial, *Lancet Oncol.* 13 (8) (2012) 773–781.
- [17] Y. Zhen, A. Thomas-Schoemann, L. Sakji, et al., An HPLC-UV method for the simultaneous quantification of vemurafenib and erlotinib in plasma from cancer patients, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 928 (2013) 93–97.
- [18] C.M. Nijenhuis, H. Rosing, J.H. Schellens, J.H. Beijnen, Development and validation of a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay quantifying vemurafenib in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 88 (2014) 630–635.
- [19] K. Bihan, C. Sauzay, L. Goldwirth, et al., Development and validation of a rapid and simple LC-MS/MS method for quantification of vemurafenib in human plasma: application to a human pharmacokinetic study, *Ther. Drug Monit.* 37 (1) (2015) 132–136.
- [20] M. Herbrink, N. de Vries, H. Rosing, et al., Quantification of 11 therapeutic kinase inhibitors in human plasma for therapeutic drug monitoring using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Ther. Drug Monit.* 38 (6) (2016) 649–656.
- [21] S. Vikingson, M. Stromqvist, A. Svedberg, J. Hansson, V. Hoiom, H. Green, Novel rapid liquid chromatography tandem mass spectrometry method for vemurafenib and metabolites in human plasma, including metabolite concentrations at steady state, *Biomed. Chromatogr.* 30 (8) (2016) 1234–1239.
- [22] Y. Deng, L. Musib, E. Choo, et al., Determination of cobimetinib in human plasma using protein precipitation extraction and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 972 (2014) 117–123.
- [23] C.M. Nijenhuis, H. Haverkate, H. Rosing, J.H. Schellens, J.H. Beijnen, Simultaneous quantification of dabrafenib and trametinib in human plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 125 (2016) 270–279.
- [24] D.A. Bershas, D. Ouellet, D.B. Mamaril-Fishman, et al., Metabolism and disposition of oral dabrafenib in cancer patients: proposed participation of aryl nitrogen in carbon-carbon bond cleavage via decarboxylation following enzymatic oxidation, *Drug Metab. Dispos.* 41 (12) (2013) 2215–2224.
- [25] European Medicines Agency, Summary of Product Characteristics. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002604/WC500149671.pdf (accessed 05.01.17).
- [26] T.M. Annesley, Ion suppression in mass spectrometry, *Clin. Chem.* 49 (7) (2003) 1041–1044.
- [27] P.J. Taylor, Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry, *Clin. Biochem.* 38 (4) (2005) 328–334.
- [28] European Medicines Agency, Guide to Bioanalytical Method Validation, Committee for Medicinal Products for Human Use and European Medicines Agency. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf, (2011) (accessed 05.01.17).
- [29] E. Chambers, D.M. Wagrowski-Diehl, Z. Lu, J.R. Mazzeo, Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 852 (1–2) (2007) 22–34.
- [30] L. Goldwirth, I. Chami, J.P. Feugeas, et al. Reply to ‘Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600mut melanoma patients: impact on tumour response and tolerance’ by Funck-Brentano et al, *Ann. Oncol.* 27(2) 363–4.
- [31] D. Ouellet, N. Kassir, J. Chiu, et al., Population pharmacokinetics and exposure-response of trametinib, a MEK inhibitor, in patients with BRAF V600 mutation-positive melanoma, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 77 (4) (2016) 807–817.
- [32] K. Han, J.Y. Jin, M. Marchand, et al., Population pharmacokinetics and dosing implications for cobimetinib in patients with solid tumors, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 76 (5) (2015) 917–924.

**4. Etude de la relation pharmacocinétique/pharmacodynamie des BRAFi/MEKi -
Article 3**

**« Trough dabrafenib plasma concentrations can predict occurrence of adverse events
requiring dose reduction in metastatic melanoma. »**

Marine Rousset, Caroline Dutriaux, Pauline Bosco-Lévy, Sorilla Prey, Anne Pham-Ledard, Léa
Dousset, Emilie Gérard, Stéphane Bouchet, Mireille Canal-Raffin, Karine Titier,
Mathieu Molimard

Clinica Chimica Acta 472 (2017) 26-29

4.1. Introduction et présentation

La méthode de dosage des BRAFi et MEKi mise au point nous a permis avec l'accord de la CNIL de constituer une base de données issues des dosages prospectifs des BRAFi et MEKi chez les patients traités pour mélanome métastatique muté BRAFV600 dans le service d'onco-dermatologie du CHU de Bordeaux. Les prélèvements devaient être faits après atteinte de l'état d'équilibre des concentrations plasmatiques, qui est obtenu au bout de 5 demi-vies du médicament à partir de la première administration (ou tout changement de posologie). La demi-vie du médicament est le temps nécessaire pour que sa concentration plasmatique diminue de moitié. Les demi-vies et temps pour atteindre l'état d'équilibre pour chaque médicament sont présentés dans le tableau 5. Pour le dabrafenib, le temps pour atteindre l'état d'équilibre est plus élevé qu'attendu du fait qu'il induit son propre métabolisme ¹³².

Tableau 5. Demi-vies des BRAFi et MEKi et temps pour atteindre l'état d'équilibre des concentrations plasmatiques.

Médicament	Demi-vie (h)	Etat d'équilibre (j)
Vemurafenib	52	11
Cobimetinib	44	9
Dabrafenib	10	14j*
Trametinib	127	26

Le meilleur moyen d'obtenir une relation entre les paramètres pharmacocinétiques et l'efficacité utilise en général l'aire sous la courbe (ASC ou AUC), mais ceci n'est réalisable qu'au cours des essais cliniques. En pratique, on utilise les horaires spécifiques de prélèvement, notamment la concentration résiduelle (Cmin) qui a été montrée mieux corrélée à l'AUC que la Cmax ¹³³. Ainsi les prélèvements devaient être effectués pour déterminer la concentration résiduelle (Cmin) c'est à dire la concentration restante dans l'organisme juste avant la prochaine prise du traitement. Ce choix a été fait dans un souci de réduire la variance puisque celle-ci est moindre pour les concentrations résiduelles que pour les concentrations au pic (Cmax) ou proches de l'administration du traitement.

L'objectif de notre étude était de définir un seuil de toxicité pour l'association dabrafenib + trametinib qui était la plus prescrite au moment de l'étude.

Ainsi nous avons construit notre étude autour des prélèvements de Cmin de dabrafenib et trametinib à l'état d'équilibre, et avant toute diminution de posologie pour effet indésirable, afin de diminuer la déplétion des susceptibles. Etant donné que les effets indésirables qui posent le plus de problème aux cliniciens et aux patients sont suivi d'une diminution de posologie ou un arrêt de traitement transitoire ou définitif, nous avons considéré seulement les effets indésirables qui entraînaient une diminution de posologie ou un arrêt du traitement. Très rapidement nous nous sommes aperçus que les patients qui présentaient ces effets indésirables avaient des Cmin de dabrafenib plus élevées que ceux qui ne présentaient pas d'effets indésirables.

4.2. Discussion

Dans cette étude, les concentrations plasmatiques de dabrafenib de 27 patients ont été analysées et mises en relation avec les données démographiques et cliniques.

Nous avons déterminé un seuil de toxicité pour le dabrafenib de 48 ng/ml. Comme attendu, il y avait une large variabilité interindividuelle des concentrations du dabrafenib et cette variabilité était moindre pour le trametinib qui n'est pas métabolisé par le CYP450. Les patients de plus de 60 ans avaient des concentrations de dabrafenib plus élevées.

Les valeurs de survie sans progression ne différaient pas significativement entre les 2 groupes de concentration : < 48 ng/ml versus > 48 ng/ml.

Une étude sur un plus grand nombre de patients pour une meilleure puissance, avec considération de la survie sans progression mais également de la survie globale est nécessaire pour déterminer le seuil d'efficacité du dabrafenib. Ces valeurs nous permettraient de définir une zone thérapeutique qui constituerait un pré-requis indispensable à la mise en place d'une étude prospective d'adaptation de posologie pour démontrer l'intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique du dabrafenib pour prévenir la survenue d'effets indésirables nécessitant une diminution de posologie sans perdre en efficacité. Cela nous a permis de déposer deux projets hospitaliers de recherche clinique interrégionaux (PHRC-I) acceptés en lettre d'intention mais non retenus au stade de protocole (Annexe 3).



Trough dabrafenib plasma concentrations can predict occurrence of adverse events requiring dose reduction in metastatic melanoma



Marine Rousset^{a,b}, Caroline Dutriaux^c, Pauline Bosco-Lévy^{a,b}, Sorilla Prey^c, Anne Pham-Ledard^{c,d}, Léa Dousset^c, Emilie Gérard^c, Stephane Bouchet^{a,b}, Mireille Canal-Raffin^{a,e}, Karine Titier^a, Mathieu Molimard^{a,b,*}

^a Département de Pharmacologie, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Bordeaux, France

^b Univ. Bordeaux INSERM, Bordeaux Population Health Research Center, team PHARMACOEPIDEMIOLGY, UMR 1219, F-33000 Bordeaux, France

^c Département de Dermatologie, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Bordeaux, France

^d EA2406 Histology and Molecular Pathology of Tumors, University of Bordeaux, F-33000, France

^e Univ. Bordeaux INSERM, Bordeaux Population Health Research Center, team Cancer-environnement-EPICENE, UMR 1219, F-33000 Bordeaux, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Dabrafenib
Trametinib
Trough plasma concentration
Safety
Adverse events
Therapeutic drug monitoring
Pharmaco-epidemiology

ABSTRACT

Introduction: Dabrafenib and trametinib bitherapy provides significant benefits in *BRAFV600^{mut}* metastatic melanoma patients; however, adverse events (AE) occur, leading to dose reduction in 33% of patients. We aimed to investigate a relation between plasma dabrafenib and trametinib concentrations and occurrence of AE.

Methods: Plasma samples from metastatic *BRAFV600^{mut}* melanoma patients treated with dabrafenib ± trametinib were prospectively collected at trough concentration before any dose reduction. Dabrafenib and trametinib were measured by UPLC-MS/MS. Plasma threshold of concentration associated with dose reduction for AE was studied by ROC-curve analysis.

Results: Twenty-seven patients (13M/14F) were included. Dabrafenib trough plasma concentrations displayed high interindividual variability, ranging from 15.4 to 279.6 ng/ml, mean ± SD 58.7 ± 61.1 ng/ml. Trough trametinib plasma concentrations ranged from 4.1 to 23.8 ng/ml, mean ± SD 11.9 ± 4.1 ng/ml. Mean trough dabrafenib plasma concentration was higher in patients with AE requiring dose reduction (30%) than in other patients: 118.6 ng/ml and 33.5 ng/ml respectively ($P < 0.0001$). Adverse events leading to dabrafenib dose reduction were all grade ≥ 2. No differences in mean trametinib trough plasma concentrations were observed in patients requiring or not dose reduction.

A dabrafenib trough plasma threshold of 48 ng/ml can predict the occurrence of adverse events requiring dose reduction.

1. Introduction

The combination of a BRAF inhibitor and a MEK inhibitor is the current standard of care for treatment of metastatic melanoma in patients harbouring *BRAFV600* mutations. Bitherapy by BRAF inhibitor (BRAFi) dabrafenib and MEK inhibitor (MEKi) trametinib has improved response rate, progression-free survival, and overall survival compared to BRAFi monotherapy [1–3].

Although this bitherapy has significantly improved survival in metastatic melanoma, adverse events are frequent [2]. Pyrexia syndrome is the most frequent adverse event (71%); others include chills (58%), fatigue (53%), nausea (44%), vomiting (33%), and neutropenia (11%)

which is less frequent but with a higher gravity (grade 3–4 according to CTC-AE) [1]. These adverse events lead to dose reduction or treatment interruption in 33% of cases for the bitherapy by dabrafenib and trametinib [3]. Dose reduction is in most cases sufficient to manage adverse event, suggesting different plasma exposure between patients treated with the same initiated dose.

Menzies et al. studied characteristics of pyrexia in metastatic melanoma patients treated with dabrafenib and trametinib and observed a trend toward an increased proportion of patients with pyrexia and increased dabrafenib plasma concentration [4]. BRAFi (dabrafenib and vemurafenib) are metabolized by CYP3A4 and CYP2C8, with well described genetic polymorphisms [5,6]. These molecules can also induce

Abbreviations: AUC, area under the curve; BMI, body mass index; BRAFi, BRAF-inhibitor; Cmin, trough plasma concentration; CV, coefficient of variation; CYP, cytochrome P450; MEKi, MEK-inhibitor; PK/PD, pharmacokinetics and pharmacodynamics; ROC, receiver operating characteristic; SD, standard deviation

* Corresponding author at: Laboratoire de Pharmacologie Clinique et Toxicologie, 2e étage Tripode, CHU Pellegrin, 4 place Amélie Raba Léon, 33076 Bordeaux, France.

E-mail addresses: marine.rousset@u-bordeaux.fr (M. Rousset), mathieu.molimard@u-bordeaux.fr (M. Molimard).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2017.07.012>

Received 22 June 2017; Received in revised form 11 July 2017; Accepted 11 July 2017

Available online 12 July 2017

0009-8981/ © 2017 Published by Elsevier B.V.

Table 1
Patients' characteristics according to dabrafenib dose reduction or no.

Characteristics	Patients without dose reduction (n = 19)	Patients with dose reduction (n = 8)	P
Age	59.1 (± 14)	69.4 (± 8.7)	0.0563
Sex ratio M/F	9/10	4/4	1.0000
BMI	25.9 (± 6.7)	25.3 (± 4.7)	0.8150
ECOG performance status score 0–1 (%)	90	78	1.0000
Initial daily dose (mg/d)	268 (± 63)	263 (± 69)	1.0000
Duration of treatment before plasma sampling (month)	3.3 (± 2.8)	3.7 (± 3.6)	1.0000
Trough dabrafenib plasma concentrations (ng/ml)	33.5 (± 18.5)	118.6 (± 84.7)	< 0.0001
Trough trametinib plasma concentrations (ng/ml)	11.3 (± 4.2)	13.9 (± 5.5)	1.0000
Side effect CTC-AE grade, n			< 0.0001
≤ 1	17	0	
≥ 2	2 ^a	8	

Data are mean values (± SD) for quantitative features. Data are proportions (%) for qualitative features. P value was assessed using Wilcoxon test for quantitative variables and exact Fisher test for qualitative variables.

^a One for trametinib specific adverse event.

their own metabolism (to a variable extent) through CYP3A4 induction [7]. Funck-Brentano et al. have shown a high interpatient variability of vemurafenib plasma concentrations [8]. No data are available for a variability of dabrafenib. Trametinib is not metabolised by CYP450 and less variability of plasma concentrations is expected [9].

The aim of this study was to explore the association between trough dabrafenib plasma concentration and occurrence of adverse effects requiring dose reduction in metastatic melanoma.

2. Materials and methods

2.1. Patients and method

In this observational study, data and plasma samples were prospectively collected from patients with metastatic *BRAFV600^{mut}* melanoma treated for less than one year by dabrafenib associated or not with trametinib in the dermatology department of the University Hospital of Bordeaux between March 2016 and March 2017. Patients were followed and monitored in the department according to standard procedures. They had outpatient visits every month after starting treatment until progression. All patients provided informed consent to participate in this study and the institutional committee in charge of data-protection in biomedical research in France (CNIL) in agreement with the Jardé law 2012 (French public health code) approved this observational study.

Patients initiated dabrafenib and trametinib, 150 mg twice daily and 2 mg once daily respectively, according to summary of characteristics of products except in patients over 75 years old, and/or with cardiac disorders and/or intolerant to previous vemurafenib treatment, who were started at half dose.

Plasma concentrations were measured after at least 15 days of treatment (steady state), at trough concentration (C_{min}), before any dose reduction for adverse event: for dabrafenib, taken twice daily, blood samples were collected 12 ± 4 h after last drug administration just before the next intake of drug. For trametinib, which has a very long half-life (127 h), blood samples were collected concurrently with dabrafenib, beyond the absorption phase, i.e., 8–27 h after last drug administration.

Trough dabrafenib and trametinib plasma concentrations were determined using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray-ionization tandem mass spectrometry [10].

Adverse events were routinely graded according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTC-AE) version 4.0.

Physician adapted posology according to their own practice without knowing the results for dabrafenib or trametinib plasma concentrations.

2.2. Statistical analysis

Descriptive results are presented by mean ± standard deviation (SD) and median for quantitative data, and in proportion for qualitative data.

Non-parametric Wilcoxon signed-rank test and Fisher's exact test were used to assess differences between groups. Receiver operating characteristic (ROC) curve was drawn to display the entire set of achievable pairs of sensitivity and specificity for each value of dabrafenib plasma concentration. The trough concentration threshold that predicted the occurrence of serious adverse event leading to dose reduction was identified by the calculation of the highest Youden index value associated with the best sensitivity and specificity.

3. Results

Twenty-seven patients with metastatic melanoma were included. The median age was 62 ± 13 years, with a sex ratio of 0.93 (M13:F14), and 87.5% had an ECOG PS 0–1. Median duration of dabrafenib ± trametinib treatment before sampling was 3.4 ± 3 months.

The daily starting dose of dabrafenib was 150 mg twice daily in 21 patients (78%) and 75 mg twice daily in 6 patients (22%). Twenty patients initiated trametinib 2 mg/day, 4 patients 1 mg/day and 3 patients were not treated by trametinib.

A larger interindividual variability of trough plasma concentration was observed for dabrafenib 15.4 to 279.6 ng/ml (CV: 104%) than for trametinib 4.1 to 23.8 ng/ml (CV: 39%).

Mean trough plasma concentration of dabrafenib was significantly higher in patients over 60 years (*P* < 0.05). No differences in dabrafenib concentrations were observed between patients who were started at full dose or half dose.

Mean trough plasma concentrations were significantly higher in patients requiring dose reduction of dabrafenib (Table 1). No differences in trametinib concentrations were observed in patients with or without trametinib dose reduction.

Eight patients (30%) had adverse events leading to dabrafenib dose reduction. These adverse events were myalgia grade 2, maculo-papular eruption grade 2, arthralgia grade 2, fatigue grade 2, flu syndrome grade 2, syncope grade 3 and neutropenia grade 3.

Of nineteen patients with no dabrafenib dose reduction, one patient had a grade 2 uveitis treated with effective local therapies. Only one patient had an isolated trametinib dose reduction for a grade 3 left ventricular dysfunction which was considered specific and its trametinib C_{min} was low (10.4 ng/ml).

The ROC curve analysis shows the discrimination potential of trough dabrafenib plasma concentrations for prediction of serious adverse reaction leading to dose reduction with an area under the curve (AUC) of 0.941 (Fig. 1A). A plasma threshold of 48 ng/ml predicted the

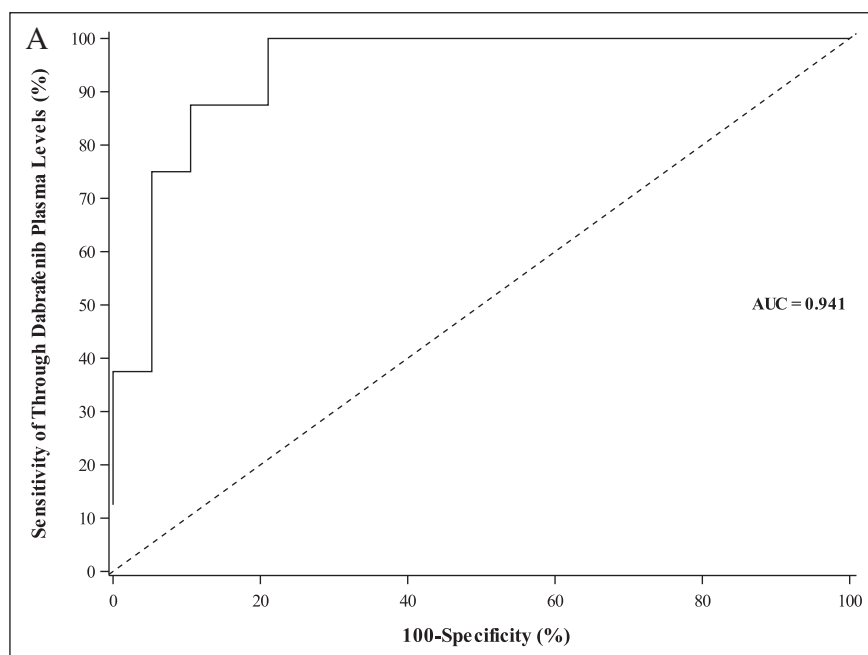
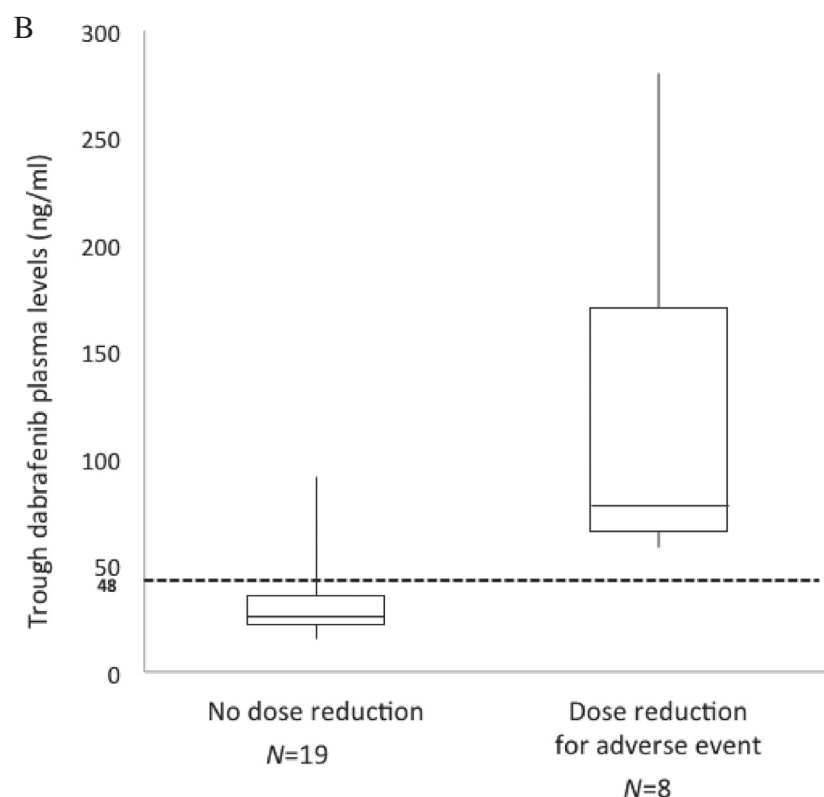


Fig. 1. A: Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. Regarding trough dabrafenib plasma concentrations and their discrimination potential for occurrence of serious adverse events requiring dose reduction, the area under the ROC curve (AUC) was 0.941, with best sensitivity (100%) and specificity (79%) at a plasma threshold of 48 ng/ml.

B: Box plots of trough dabrafenib plasma concentrations. The graph shows the dispersion around the median for patients with dose reduction (median = 75.3 ng/ml) and those without (median = 30.2 ng/ml). The bottom edge of box is the first quartile and the top edge is the third quartile; the error bars represent minimal and maximal values; the line shows the 48 ng/ml dabrafenib plasma threshold for prediction of occurrence of serious adverse events requiring dose reduction.



occurrence of adverse event leading to dose reduction with sensitivity and specificity of 100% and 79% respectively.

Box plots of trough dabrafenib plasma concentrations (Fig. 1B) show the dispersion around the median and the threshold for patients with or without dose reduction.

Clinical response did not differ between groups with a median progression-free survival of 5.9 and 6.9 months and a progressive disease rate in the first year of 50% and 42% in the dose reduction group and no dose reduction group respectively. Three patients died in the group with no dose reduction.

4. Discussion

To the best of our knowledge, this observational study is the first to define plasma trough dabrafenib concentration threshold associated with adverse events leading to dose reduction in patients with metastatic melanoma.

The small number of patients included that allowed to demonstrate a significant association between high dabrafenib C_{min} and adverse events requiring dose reduction suggests the strength of this relation. The high ROC AUC reinforces this demonstration.

The pharmacokinetic analyses identified high interpatient variability in steady-state dabrafenib C_{min}. Such variability may be multifactorial, including age, environmental factors, expression and activity of metabolizing enzymes in the liver (CYP450), polymorphisms on drug transporters or efflux pumps. CYP2C8 and CYP3A4 are the major enzymes responsible for the metabolism of dabrafenib. Polymorphisms affecting expression and activity of CYP3A4 result in a 10-fold variability in CYP3A4 activity among subjects [11]. Since dabrafenib is also an inducer of CYP3A4, its own metabolism enzyme, co-interactions may occur between dabrafenib and modulators of this enzyme, leading to changes in plasma concentration of dabrafenib [12]. Dabrafenib is also an *in vitro* inhibitor of human organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 (OATP1B1) and OATP1B3; efflux transporters P-glycoprotein (P-gp) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) [7]. According to dabrafenib label and physician experience, dabrafenib dose reduction is sufficient to manage adverse events, suggesting a role of drug overexposure. Taking all of this into account, the occurrence of adverse events requiring dabrafenib dose reduction is more likely to be linked to the plasma concentration than to the starting dose itself.

Development of oral anticancer drugs led to the choice of an identical dose for all patients. Most kinase-inhibitors are associated with wide inter-patient pharmacokinetic variability, and it is impossible to predict this plasma concentration from the dose administered to a given patient. There is accumulating evidence that efficacy and safety are more related to plasma concentrations than to dose [13–15]. Forgetting decades of experience, pharmacokinetic data from phases I and II are less and less taken into account in recent drug development programs. Many therapeutic target concentrations are now available from post-authorization academic studies [16].

Different PK/PD studies have shown an association between severe adverse events and plasma concentration of vemurafenib, another BRAF inhibitor, and of tyrosine kinase inhibitors (sunitinib, sorafenib, erlotinib) [17–19]. The present study is the first to document that a high dabrafenib trough concentration is associated with the occurrence of adverse events requiring dose reduction in metastatic melanoma. Our findings confirm that dabrafenib dose is not predictive of drug exposure. Since most adverse events occur during the first months of treatment, early therapeutic drug monitoring could improve the safety of dabrafenib. Therapeutic drug monitoring should also improve adherence to treatment with the right posology.

As expected, plasma concentrations of trametinib varied less than dabrafenib concentration, and there was no association with adverse reactions. This may be due to its main metabolism through deacetylation by hydrolytic enzymes and not by CYP450 more susceptible to polymorphisms. We thus did not find any link between dose reduction of trametinib and concentration.

The clinical impact of our finding has to be confirmed by a prospective dose adaptation study to prevent the occurrence of side effects without loss of efficacy and to define a new role for therapeutic drug monitoring of dabrafenib in metastatic melanoma.

5. Conclusion

The present study is the first to document that a high dabrafenib trough concentration is associated with the occurrence of adverse events requiring dose reduction in metastatic melanoma. A dabrafenib trough plasma threshold of 48 ng/ml can predict the occurrence of

adverse events requiring dose reduction. Therapeutic drug monitoring may have a potential role to improve safety of dabrafenib.

Acknowledgements

We thank the study participants, Dominique Ducint for its technical support and Pr Nicholas Moore for reviewing of the report.

References

- [1] K.T. Flaherty, J.R. Infante, A. Daud, et al., Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations, *N. Engl. J. Med.* 367 (18) (2012) 1694–1703.
- [2] G.V. Long, D. Stroyakovskiy, H. Gogas, et al., Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial, *Lancet* 386 (9992) (2015) 444–451.
- [3] C. Robert, B. Karaszewska, J. Schachter, et al., Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib, *N. Engl. J. Med.* 372 (1) (2015) 30–39.
- [4] A.M. Menzies, M.T. Ashworth, S. Swann, et al., Characteristics of pyrexia in BRAFV600E/K metastatic melanoma patients treated with combined dabrafenib and trametinib in a phase I/II clinical trial, *Ann. Oncol.* 26 (2) (2015) 415–421.
- [5] A.B. Suttle, K.F. Grossmann, D. Ouellet, et al., Assessment of the drug interaction potential and single- and repeat-dose pharmacokinetics of the BRAF inhibitor dabrafenib, *J. Clin. Pharmacol.* 55 (4) (2015) 392–400.
- [6] K. Han, J.Y. Jin, M. Marchand, et al., Population pharmacokinetics and dosing implications for cobimetinib in patients with solid tumors, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 76 (5) (2015) 917–924.
- [7] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002604/WC500149671.pdf. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002604/WC500149671.pdf. 2013.
- [8] E. Funck-Brentano, J.C. Alvarez, C. Longvert, et al., Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600mut melanoma patients: impact on tumour response and tolerance, *Ann. Oncol.* 26 (7) (2015) 1470–1475.
- [9] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002643/WC500169657.pdf. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002643/WC500169657.pdf. 2014.
- [10] M. Rousset, K. Titier, S. Bouchet, et al., An UPLC-MS/MS method for the quantification of BRAF inhibitors (vemurafenib, dabrafenib) and MEK inhibitors (cobimetinib, trametinib, binimetinib) in human plasma. Application to treated melanoma patients, *Clin. Chim. Acta* 470 (2017) 8–13.
- [11] L. Wojnowski, Genetics of the variable expression of CYP3A in humans, *Ther. Drug Monit.* 26 (2) (2004) 192–199.
- [12] D. Ouellet, E. Gibiansky, C. Leonowens, et al., Population pharmacokinetics of dabrafenib, a BRAF inhibitor: effect of dose, time, covariates, and relationship with its metabolites, *J. Clin. Pharmacol.* 54 (6) (2014) 696–706.
- [13] S. Picard, K. Titier, G. Etienne, et al., Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia, *Blood* 109 (8) (2007) 3496–3499.
- [14] S. Bouchet, S. Poulette, K. Titier, et al., Relationship between imatinib trough concentration and outcomes in the treatment of advanced gastrointestinal stromal tumours in a real-life setting, *Eur. J. Cancer* 57 (2016) 31–38.
- [15] A.B. Suttle, H.A. Ball, M. Molimard, et al., Relationships between pazopanib exposure and clinical safety and efficacy in patients with advanced renal cell carcinoma, *Br. J. Cancer* 111 (2014) 1909–1916.
- [16] H. Yu, N. Steeghs, C.M. Nijenhuis, J.H. Schellens, J.H. Beijnen, A.D. Huitema, Practical guidelines for therapeutic drug monitoring of anticancer tyrosine kinase inhibitors: focus on the pharmacokinetic targets, *Clin. Pharmacokinet.* 53 (4) (2014) 305–325.
- [17] C. Narjoz, A. Cessot, A. Thomas-Schoemann, et al., Role of the lean body mass and of pharmacogenetic variants on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of sunitinib in cancer patients, *Investig. New Drugs* 33 (1) (2015) 257–268.
- [18] P. Boudou-Rouquette, C. Narjoz, J.L. Golmard, et al., Early sorafenib-induced toxicity is associated with drug exposure and UGT1A9 genetic polymorphism in patients with solid tumors: a preliminary study, *PLoS One* 7 (8) (2012) e42875.
- [19] E. Petit-Jean, T. Buclin, M. Guidi, et al., Erlotinib: another candidate for the therapeutic drug monitoring of targeted therapy of cancer? A pharmacokinetic and pharmacodynamic systematic review of literature, *Ther. Drug Monit.* 37 (1) (2015) 2–21.

5. Cas clinique : Gestion d'effet indésirable grâce au suivi des concentrations plasmatiques du dabrafenib – Article 4

« Recurrent syncope during treatment with dabrafenib and trametinib for metastatic melanoma: management by dose reduction in a slow CYP2D6 metabolizer. »

Marine Rousset, Léa Dousset, Caroline Dutriaux, Sorilla Prey, Céline Verstuyft, Stéphane Bouchet, Karine Titier, Ghada Miremont-Salamé, Mathieu Molimard

Soumission pour publication au journal « Melanoma Research »

5.1. Introduction et présentation

La définition du seuil de toxicité de 48 ng/ml constitue un nouvel outil dans la prise en charge des effets indésirables nécessitant une diminution de posologie. Parmi les patients de l'étude PK/PD, une femme traitée par dabrafenib + trametinib pour mélanome métastatique présentait des syncopes à répétition. La mesure de la concentration résiduelle plasmatique du dabrafenib après une première réduction de dose a rapporté une valeur de 280 ng/ml qui constituait la valeur résiduelle observée la plus élevée parmi les patients ayant été prélevés pour le dosage de dabrafenib. Les cliniciens ont à nouveau diminué la dose de dabrafenib puis ont été contraints de changer de traitement. Après traitement par pembrolizumab, puis bithérapie par vemurafenib + cobimetinib puis radiothérapie cérébrale, le traitement par dabrafenib + trametinib a été repris à posologie réduite d'un facteur 12 par rapport à la posologie recommandée : dabrafenib 50 mg un jour sur deux. La concentration plasmatique résiduelle de dabrafenib à l'état d'équilibre a été contrôlée à 43 ng/ml, soit en-dessous du seuil de toxicité, la maladie était stable et la malade ne présentait pas d'effet indésirable. Le traitement a été arrêté pour cause de progression de la maladie et un traitement par ipilimumab a été débuté. Après une nouvelle progression de la maladie, l'ipilimumab a été arrêté et le traitement par dabrafenib + trametinib a été repris : dabrafenib 50 mg un jour sur 2 et trametinib 0,5 mg un jour sur deux. La concentration plasmatique résiduelle de dabrafenib a été contrôlée à 27,6 ng/ml à l'état d'équilibre. La malade ne présentait pas d'effet indésirable.

5.2. Discussion

La concentration plasmatique du dabrafenib constitue un biomarqueur de toxicité facilement mesurable. La détermination du seuil d'efficacité est maintenant indispensable pour s'assurer qu'une diminution de posologie basée sur la concentration plasmatique résiduelle ne se fait pas au détriment de l'efficacité.

Par ailleurs, pour explorer ce cas clinique, nous avons effectué un génotypage des principaux cytochromes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques. Les résultats indiquaient un profil métaboliseur lent pour le CYP2D6, aucune expression du CYP3A5, et une expression normale du CYP3A4. Etant donné la valeur très élevée du dosage de dabrafenib avant diminution de posologie, il est probable que le CYP2D6 et le CYP3A5 soient

impliqués dans le métabolisme du dabrafenib. Des études de métabolisme *in vivo* sont nécessaires pour valider cette hypothèse.

Recurrent syncope during treatment with dabrafenib and trametinib for metastatic melanoma: management by dose reduction in a slow CYP2D6 metabolizer.

Marine Rousset^{*a,b}, Léa Dousset^{*c}, Caroline Dutriaux^c, Sorilla Prey^c, Céline Verstuyft^d, Stéphane Bouchet^{a,b}, Karine Titier^a, Ghada Miremont-Salamé^{a,b}, Mathieu Molimard^{a,b}

* co-primary authors

^a Department of Pharmacology, University Hospital Bordeaux, Bordeaux, France

^b Univ. Bordeaux INSERM, Bordeaux Population Health Research Center, team

PHARMACOEPIDEMIOLOGY, UMR 1219, F-33000 Bordeaux, France

^c Department of Dermatology, University Hospital Bordeaux, Bordeaux, France

^d Service de génétique moléculaire, pharmacogénétique et hormonologie, Hôpital Bicêtre, Groupe Hospitalier Paris Sud, AP-HP, Le Kremlin Bicêtre

Corresponding Author:

Marine ROUSSET

Centre de Pharmacovigilance

CHU Pellegrin

4 place Amélie Raba Léon

33076 BORDEAUX

France

Phone. + 33 5 56 79 55 08

Fax. + 33 5 56 79 57 95

E-mail. marine.rousset@u-bordeaux.fr

Abstract

Combination therapy with BRAF- and MEK- inhibitors significantly improves both progression-free and overall survival in patients with BRAF V600-mutated stage IV melanoma. A variety of adverse drug reactions have been observed with combination therapy including pyrexia, fatigue, nausea, and vomiting. We report a case of a woman with BRAF V600E-mutated malignant melanoma who had recurrent syncope during treatment with dabrafenib and trametinib. After 53 days of full doses treatment she presented with 3 episodes of syncope with prodromes and complete loss of consciousness. After a first dose reduction of dabrafenib, she presented with syncope and dabrafenib trough plasma concentration was 280 ng/ml. Pharmacogenetics analysis reported a slow metabolizer profile for CYP2D6, no expression of CYP3A5 and mutation of CYP1A2*1F. A second dose reduction of dabrafenib was applied. Fifteen days later, the patient did not report any syncope and dabrafenib trough plasma concentration was 43 ng/ml. Dose reduction assisted with therapeutic drug monitoring is helpful for keeping patient under treatment.

Keywords

dabrafenib; trametinib ; adverse drug reaction; toxicity ; syncope ; therapeutic drug monitoring ; cytochrome P-450 CYP3A ; cytochrome P-450 CYP2D6 ;

Background

In recent years, combination therapy of a BRAF-inhibitor and a MEK-inhibitor has significantly improved both progression-free and overall survival in patients with BRAF V600-mutated stage IV melanoma (1). However, adverse drug reactions (ADR) occur in almost 90% of patients. Severe ADR, requiring dose reduction of one or two of molecules, occur in 38% of patients (2-4). We report the first case of syncope occurring in a patient treated with bitherapy with dabrafenib and trametinib.

Case report:

A 79-year-old woman was hospitalized for repeated episodes of syncope. She was treated for a BRAFV600E mutated advanced melanoma involving the lungs with dabrafenib 150 mg twice daily and trametinib 2 mg daily. After 53 days of treatment she presented with 3 episodes of syncope with prodromes and complete loss of consciousness. Medical examination only revealed postural hypotension and grade 2 asthenia (Common Toxicity Criteria of Adverse Events, CTCAE v4.0). Dabrafenib and trametinib were discontinued. Two weeks later, a favorable tumor response was assessed, with regression of pulmonary lesions. Half-doses of dabrafenib (75 mg twice daily) and full dose trametinib (2 mg daily) were resumed. Twenty-four hours later she had syncope without any prodrome. Electrocardiogram showed a triplet of atrial extra-systoles that could not explain syncope. The tilt-test was positive. Dosage was further reduced: dabrafenib 50 mg twice daily and trametinib 0.5mg daily. After one month, laboratory tests revealed a dabrafenib trough plasma concentration of 280 ng/ml (toxic threshold > 48 ng/ml (5)) and albuminemia 19 mg/l. Bitherapy was then discontinued because of repeated syncopes. Progression was observed one month later and treatment with pembrolizumab was initiated. After 3 courses and further progression (pulmonary and brain metastasis), targeted therapies with vemurafenib 480 mg twice daily and cobimetinib 60 mg daily (21/28 days) were initiated. After 15 days, the patient was referred for febrile erythema multiforme and malaise. Bitherapy was interrupted and the patient recovered within 2 weeks. Two months later, MRI showed a cerebral progression. Dabrafenib was resumed, but at a very low dosage: 50 mg daily only 3 days a week. After 15 days, trough plasma concentration of dabrafenib was 43 ng/ml. Genetic analysis reported non-expression of CYP3A5, slow metabolizer profile of CYP2D6, CYP1A2 mutation

(CYP1A2*1F) and normal expression of CYP3A4. After 2 months of treatment she had a stable disease according to RECIST 1.1. Trametinib was resumed at 0.5 mg daily.

Discussion :

To our knowledge, this is the first case of recurrent syncope associated with bitherapy dabrafenib and trametinib. Dabrafenib is metabolized by CYP3A (6). It has been demonstrated that loss of function alleles, predominantly CYP3A5*3, may influence the clearance of CYP3A substrates (7). A recent study identified CYP2D6 poor metabolizer profile and CYP1A2 as significant characteristics driving between-subject variability in dabrafenib exposure. Despite common genetic profile of CYP3A4, dabrafenib appears to be less metabolized in this patient (8). CYP2D6 slow metabolizer profile and CYP3A5 non-expression may have play a role in dabrafenib poor metabolism. Dose reduction of dabrafenib to a plasma level below toxic threshold 48ng/ml has suppressed the occurrence of syncope while maintaining treatment efficacy.

We recommend a therapeutic drug monitoring for dabrafenib, as a between-subject variability in plasma exposure is likely, while it is not the case for trametinib (not metabolized by CYP450). Dose reduction assisted with therapeutic drug monitoring is helpfull for keeping patient under treatment

References:

1. Larkin J, Ascierto PA, Dreno B, Atkinson V, Liszkay G, Maio M, et al. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med*. 2014;371(20):1867-76.
2. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med*. 2015;372(1):30-9.
3. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2015;386(9992):444-51.
4. Welsh SJ, Corrie PG. Management of BRAF and MEK inhibitor toxicities in patients with metastatic melanoma. *Ther Adv Med Oncol*. 2015;7(2):122-36.
5. Rousset M, Dutriaux C, Bosco-Levy P, Prey S, Pham-Ledard A, Dousset L, et al. Trough dabrafenib plasma concentrations can predict occurrence of adverse events requiring dose reduction in metastatic melanoma. *Clin Chim Acta*. 2017;472:26-9.
6. Bershas DA, Ouellet D, Mamaril-Fishman DB, Nebot N, Carson SW, Blackman SC, et al. Metabolism and disposition of oral dabrafenib in cancer patients: proposed participation of aryl nitrogen in carbon-carbon bond cleavage via decarboxylation following enzymatic oxidation. *Drug Metab Dispos*. 2013;41(12):2215-24.
7. Shin KH, Choi MH, Lim KS, Yu KS, Jang IJ, Cho JY. Evaluation of endogenous metabolic markers of hepatic CYP3A activity using metabolic profiling and midazolam clearance. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;94(5):601-9.
8. Rowland A, van Dyk M, Hopkins AM, Mounzer R, Polasek TM, Rostami-Hodjegan A, et al. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling to Identify Physiological and Molecular Characteristics Driving Variability in Drug Exposure. *Clin Pharmacol Ther*. 2018. Mar 25. doi: 10.1002/cpt.1076.

DISCUSSION GENERALE

La stratégie de traitement du mélanome métastatique connaît une révolution depuis 2010 avec le développement des inhibiteurs de BRAF et de MEK et des immunothérapies anti-CTLA4 et anti-PD1. La dynamique évolution de la prise en charge a permis d'augmenter très significativement la survie des patients atteints de mélanome métastatique, passant de 6 à 9 mois de survie à maintenant plus de 33 mois pour la bithérapie BRAFi + MEKi ⁸³. Cependant 90% des patients présentent des effets indésirables et 33% nécessitent une diminution de la posologie initiale ^{9,10,92,98-103}.

L'étude dans VigiBase a permis de décrire les effets indésirables des BRAFi et MEKi en vraie vie, sur de plus larges effectifs que ceux des essais cliniques. Les profils de sécurité d'emploi comportaient de nouveaux effets indésirables par rapport à ceux définis lors des essais cliniques, ainsi que des signaux qu'il sera nécessaire d'évaluer en pratique courante. Parmi les fréquents effets indésirables, certains semblaient être dose-dépendants c'est pourquoi nous avons cherché à déterminer un seuil de toxicité pour les BRAFi et MEKi. Pour le dabrafenib, Menzies *et al.* suggéraient une relation entre concentration élevée en dabrafenib + hydroxydabrafenib (métabolite actif) et survenue de fièvre, sans toutefois donner de valeur seuil ¹³⁴. Le seuil plasmatique de toxicité du dabrafenib de 48 ng/ml défini dans notre étude PK/PD était discriminant pour plusieurs types d'effets indésirables, dont l'érythème maculo-papuleux pour lequel on imagine bien un mécanisme toxique, ainsi que pour des effets indésirables pour lesquels on pense plutôt à un mécanisme immuno-allergique comme la neutropénie ou les myalgies. Cela étant, un seuil toxique ne semble pas aberrant pour des effets indésirables de nature allergique puisqu'il est admis que le risque de crise d'asthme est accru en cas de concentration supérieure à 240 µg/m³ d'ozone dans l'air ambiant ¹³⁵ et que l'allergie au pollen d'arbres est majorée au-delà du seuil de 80 grains de pollen/m³ ^{136,137}. Ainsi une concentration plasmatique résiduelle de dabrafenib supérieure à 48 ng/ml à l'état d'équilibre constitue un marqueur prédictif de toxicité du dabrafenib. Ce seuil a servi de base pour la recherche d'autres marqueurs prédictifs de toxicité dans l'étude de Rowland *et al.* ¹³⁸. Un âge supérieur à 65 ans, une origine japonaise ou chinoise (patients généralement métaboliseurs lents pour le CYP 2C19 ¹³⁹), une insuffisance hépatique même modérée et une insuffisance rénale sont ressortis comme marqueurs prédictifs d'une concentration plasmatique résiduelle > 48 ng/ml en analyse

univariée. L'analyse multivariée a permis de mettre en évidence également l'influence du poids, de l'indice de masse corporelle, du phénotype métaboliseur lent pour le CYP 2D6 et de l'abondance hépatique absolue en CYP 1A2, CYP 3A4 (qui n'était pas ressorti comme marqueur prédictif de concentration élevée de dabrafenib dans l'analyse univariée) et de la P-gp. Nous avons également souligné une différence significative d'âge entre le groupe de patients n'ayant pas nécessité de diminution de posologie et le groupe de patients ayant présenté un effet indésirable nécessitant une diminution de posologie. L'effet de l'âge a également été mentionné dans l'article de Crombag *et al.* ¹⁴⁰. Par ailleurs, nous avons exploré le cas d'une patiente de l'étude PK/PD, qui avait présenté des syncopes récurrentes de grade 3 et une concentration plasmatique de dabrafenib de 280 ng/ml. Les analyses de pharmacogénétique avaient rapporté un profil métaboliseur lent pour le CYP2D6, ce qui est cohérent avec les résultats de l'étude de Rowland *et al.*

Le MEKi associé au dabrafenib est le trametinib, pour lequel nous n'avons pas mis en évidence de lien entre concentration plasmatique et toxicité. Le trametinib n'est pas métabolisé par le CYP450 et est donc moins soumis à variabilité inter-individus des concentrations plasmatiques pour une même dose administrée. Aucune relation exposition-toxicité n'a été mise en évidence ⁵⁵.

Pour l'autre association de BRAFi + MEKi (vemurafenib + cobimetinib) nous nous sommes heurtés à un désintérêt des cliniciens vis à vis de cette bithérapie, et ce probablement à cause de son profil d'effets indésirables. En effet la phototoxicité ainsi que les fréquentes éruptions cutanées induites par le vemurafenib et le cobimetinib sont devenues un frein à leur utilisation, de même que les diarrhées graves sous cobimetinib. Concernant la survenue de rash de grade ≥ 2 sous vemurafenib, un seuil de toxicité au-dessus de 52,3 mcg/ml a été déterminé par courbe ROC par Kramkimel *et al.* ¹⁴¹.

Par ailleurs les taux de réponse au traitement par BRAFi + MEKi sont seulement de l'ordre de 50% et à l'initiation de cette thèse, il était impossible de prédire quels patients allaient répondre au traitement. Depuis, le taux de LDH avant traitement, le nombre de sites métastatiques, l'âge et le sexe du patient ont été décrits comme facteurs prédictifs de réponse au traitement par BRAFi + MEKi ¹⁰⁶. Nous souhaitons étudier le lien entre concentration plasmatique de BRAFi et/ou MEKi et efficacité. Le nombre de sujets nécessaires à la détermination d'un seuil d'efficacité pour le dabrafenib a été estimé à 104,

avec un suivi nécessaire de 2 ans. La file active de patients bordelais ne permettait pas ce recrutement et nous avons dû convaincre 8 autres centres de participer à une étude pharmacocinétique/pharmacodynamique (PK/PD) pour atteindre le nombre de sujets nécessaires. Nous avons déposé plusieurs dossiers aux appels à projets hospitaliers de recherche clinique (2 PHRC-I et un PHRC-K) et à l'appel à projet API-K jeunes chercheurs. Les PHRC-I ont été retenus en lettre d'intention puis non sélectionnés au stade protocole (Annexe 4). Nous avons continué à implémenter notre base de données et disposons maintenant de nombreux résultats de pharmacocinétique et d'un suivi des patients suffisamment long, ce qui devrait nous permettre de définir très prochainement le seuil d'efficacité du dabrafenib en association au trametinib. Le lien entre efficacité et concentration plasmatique de trametinib a été étudié en pharmacocinétique de population et a montré une survie sans progression plus longue chez les patients dont la concentration plasmatique de trametinib était supérieure à 10,6 ng/ml ¹⁴².

Au cours de ce travail de thèse, plusieurs équipes ont publié une concentration cible efficace autour de 40 mcg/ml pour le vemurafenib en monothérapie ^{141,143,144}. Une équipe avait déterminé ce seuil par comparaison de la courbe de survie sans progression du premier quartile avec celle des trois autres quartiles ¹⁴¹. Tandis qu'une autre avait comparé les concentrations de vemurafenib entre deux groupes de patients : les patients qui progressaient ($38,8 \pm 19,7$ mcg/ml) versus les patients avec maladie stable, réponse partielle ou complète selon RECIST ($56,4 \pm 21,0$ mcg/ml), $P=0,013$ ¹⁴³. Ces résultats donnent des indications sur les concentrations cibles du vemurafenib en monothérapie. Pour le cobimetinib, les analyses exploratoires de pharmacocinétique montraient une tendance à l'augmentation de la diarrhée lors d'une exposition accrue au cobimetinib et au vemurafenib ⁵⁵. En revanche nous ne disposons pas d'informations sur la zone thérapeutique du cobimetinib qui est fortement métabolisé par le CYP450 et pris en association avec le vemurafenib : un faible inducteur du CYP 3A ¹⁴⁵.

Nous avons soumis en objectif secondaire dans l'un des dossiers de PHRC-I l'étude du lien entre concentration plasmatique de BRAFi/MEKi et l'évolution de la concentration d'ADN circulant BRAF V600 muté (Annexe 4). L'ADN portant la mutation peut être libéré dans la circulation sous forme de micro ADN muté BRAFV600, détectable par PCR digitale (ddPCR ou droplet dPCR), une technique analytique sensible permettant de quantifier de très faibles concentrations d'ADN. Dans trois études réalisées chez respectivement 36, 20 et 11 patients

traités respectivement par dabrafenib + trametinib, dabrafenib et vemurafenib, la charge d'ADN circulant muté BRAFV600 (ADNct BRAF V600mut) a diminué rapidement au début du traitement jusqu'à devenir indétectable à la meilleure réponse et a augmenté au moment de la progression ¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Une équipe a exploré le lien entre charge d'ADNct BRAFV600mut et concentration plasmatique de vemurafenib (n=11 patients). Une corrélation inverse a été démontrée (p = 0,026), cependant tous les patients ne présentaient pas une charge d'ADNct BRAFV600mut initiale détectable ¹⁴⁸. Une charge initiale d'ADNct BRAFV600mut plus faible était significativement associée à une survie globale et à une survie sans progression plus longues que les charges initiales plus élevées ^{147,148}. Ce marqueur est potentiellement prédictif de la réponse précoce et de la résistance acquise. Des travaux approfondis doivent encore être menés pour mieux définir les marqueurs prédictifs de l'efficacité des BRAFi et MEKi.

Il sera donc nécessaire de poursuivre l'étude PK/PD pour définir la zone thérapeutique de l'association vemurafenib + cobimetinib d'autant que les effets indésirables fréquents du cobimetinib comme la diarrhée semblent être dose-dépendants. En réalité ces données de pharmacocinétiques existent déjà, elles sont recueillies au cours des essais cliniques de tout médicament mais ne sont pas exploitées pour déterminer la zone thérapeutique du médicament. Les thérapies ciblées bénéficient d'un index thérapeutique plus large que les composés cytotoxiques puisqu'elles modulent les voies de signalisation aberrantes spécifiques dans les cellules cancéreuses, épargnant le plus souvent les tissus sains ^{149,150}. Les laboratoires se basent sur cet index thérapeutique plus large pour donner la même dose à tous les patients, bien que les inhibiteurs de protéine kinase soient des médicaments à marge thérapeutique étroite, avec au maximum un facteur 2 à 3 entre la concentration efficace et la concentration toxique ¹⁵¹. La démonstration de l'intérêt du suivi thérapeutique pour ces traitements doit donc être poursuivie dans le but d'optimiser la prise en charge et administrer le bon médicament à la bonne dose, au bon moment, au bon patient.

PERSPECTIVES

La bithérapie BRAFi + MEKi : encorafenib + binimetinib a obtenu l'AMM européenne le 14/09/2018. Etant donné que ces deux médicaments sont métabolisés par le CYP450, nous devons mettre au point le dosage de l'encorafenib (le binimetinib est dans la méthode publiée) et mener une étude PK/PD afin de définir la zone thérapeutique pour cette association.

Comme évoqué en introduction, le traitement du mélanome ne se résume pas aux BRAFi et MEKi. Les immunothérapies ont pris une grande place dans l'arsenal thérapeutique et constituent le traitement de première ligne des mélanomes métastatiques non mutés BRAFV600. Les cliniciens valident même leur intérêt en première ligne chez les patients mutés BRAFV600. En effet, bien que les inhibiteurs de MAPK entraînent des réponses rapides et relativement durables, l'immunothérapie offre, en regard d'une réponse moins rapide, des réponses beaucoup plus durables et un contrôle de la maladie à plus long terme. S'il est admis qu'un patient présentant un mélanome métastatique mettant en jeu le pronostic vital doit être traité par un traitement combiné par BRAFi + MEKi ; un patient avec un taux de LDH > 2 x LSN devrait recevoir un traitement combiné par ipilimumab et nivolumab car il offre les meilleurs résultats de survie à long terme dans cette population ¹⁵². Les associations d'immunothérapie et de BRAFi + MEKi sont actuellement testées dans les essais cliniques. Deux approches sont envisageables : une approche séquencée, avec un enchaînement de BRAFi + MEKi puis immunothérapie ou l'inverse, et une approche combinée, avec une trithérapie BRAFi + MEKi + immunothérapie. Les études en cours aideront à identifier l'approche séquentielle optimale et l'intérêt d'une trithérapie. Comme pour les thérapies ciblées, seulement 30 à 40% des patients répondent au traitement et 70 à 80% des patients présentent des effets indésirables ^{12,153}. A l'avenir il sera important d'étudier les effets indésirables des immunothérapies utilisées dans le traitement du mélanome notifiés dans Vigibase : ipilimumab, nivolumab et pembrolizumab pour définir leurs profils d'effets indésirables. Aucun biomarqueur prédictif de l'efficacité ou la toxicité des immunothérapies n'est encore clairement validé. Une étude compilant les résultats de quatre essais de phase 2 sur des patients traités par ipilimumab pour mélanome métastatique avait montré une meilleure survie globale chez les patients présentant les concentrations plasmatiques résiduelles à l'état d'équilibre les plus élevées ¹⁵⁴. Il existe donc

probablement des seuils d'exposition prédictifs de la réponse thérapeutique et/ou de la toxicité pour les immunothérapies. Il sera nécessaire de mettre au point une méthode de dosage sensible, fiable et reproductible de ces immunothérapies, ainsi que des immunothérapies testées actuellement durvalumab (anti PD-L1) ¹⁵⁵ et atézolizumab (anti PD1) ¹⁵⁶ pour pouvoir ensuite commencer une étude PK/PD et définir les zones thérapeutiques de ces traitements.

REFERENCES

1. INCA. *Les cancers en France 2017 - L'essentiel des faits et chiffres*. http://www.e-cancer.fr/ressources/cancers_en_france/. consulté le 21/08/2018.
2. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009;27(36):6199-6206.
3. Eton O, Legha SS, Moon TE, et al. Prognostic factors for survival of patients treated systemically for disseminated melanoma. *J Clin Oncol*. 1998;16(3):1103-1111.
4. Agarwala SS, Keilholz U, Gilles E, et al. LDH correlation with survival in advanced melanoma from two large, randomised trials (Oblimersen GM301 and EORTC 18951). *Eur J Cancer*. 2009;45(10):1807-1814.
5. Balch CM, Balch GC, Sharma RR. Identifying early melanomas at higher risk for metastases. *J Clin Oncol*. 2012;30:1406-1407.
6. Falchook GS, Long GV, Kurzrock R, et al. Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2012;379(9829):1893-1901.
7. Long GV, Trefzer U, Davies MA, et al. Dabrafenib in patients with Val600Glu or Val600Lys BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK-MB): a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(11):1087-1095.
8. Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med*. 2004;351(10):998-1012.
9. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2507-2516.
10. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2012;380(9839):358-365.

11. Ascierto PA, Del Vecchio M, Robert C, et al. Ipilimumab 10 mg/kg versus ipilimumab 3 mg/kg in patients with unresectable or metastatic melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(5):611-622.
12. Schachter J, Ribas A, Long GV, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet.* 2017;390(10105):1853-1862.
13. Ribas A, Puzanov I, Dummer R, et al. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(8):908-918.
14. Larkin J, Minor D, D'Angelo S, et al. Overall Survival in Patients With Advanced Melanoma Who Received Nivolumab Versus Investigator's Choice Chemotherapy in CheckMate 037: A Randomized, Controlled, Open-Label Phase III Trial. *J Clin Oncol.* 2018;36(4):383-390.
15. Long GV, Atkinson V, Cebon JS, et al. Standard-dose pembrolizumab in combination with reduced-dose ipilimumab for patients with advanced melanoma (KEYNOTE-029): an open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(9):1202-1210.
16. Marshall CJ. Ras effectors. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8(2):197-204.
17. Dhillon AS, Kolch W. Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Arch Biochem Biophys.* 2002;404(1):3-9.
18. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(11):875-885.
19. Rushworth LK, Hindley AD, O'Neill E, Kolch W. Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Mol Cell Biol.* 2006;26(6):2262-2272.
20. Dalle S, Martin-Denavit T, Thomas L. Genotypic hypervariability of melanoma: a therapeutic challenge. *Med Sci.* 2006;22(2):178-182.
21. Dumaz N, Bagot M, Bensussan A. When CRAF takes over BRAF in melanoma. *Med Sci.* 2011;27:817-819.

22. Sample A, He YY. Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2018;34(1):13-24.
23. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005;353(20):2135-2147.
24. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(9):809-819.
25. Thomas NE. BRAF somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res*. 2006;16(2):97-103.
26. Lovly CM, Dahlman KB, Fohn LE, et al. Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials. *PLoS One*. 2012;7(4):e35309.
27. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet*. 2003;33(1):19-20.
28. Kim SY, Kim SN, Hahn HJ, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ. Metaanalysis of BRAF mutations and clinicopathologic characteristics in primary melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(6):1036-1046.e1032.
29. Platz A, Egyhazi S, Ringborg U, Hansson J. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol Oncol*. 2008;1(4):395-405.
30. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*. 1989;49(17):4682-4689.
31. Ball NJ, Yohn JJ, Morelli JG, Norris DA, Golitz LE, Hoeffler JP. Ras mutations in human melanoma: a marker of malignant progression. *J Invest Dermatol*. 1994;102(3):285-290.
32. INCa. *Plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers : faits marquants et synthèse d'activité 2013*.

33. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015;161(7):1681-1696.
34. Barbacid M. ras genes. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:779-827.
35. Dumaz N, Hayward R, Martin J, et al. In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. *Cancer Res*. 2006;66(19):9483-9491.
36. Lovly C, W. Pao, J. Sosman. NRAS in Melanoma. *My Cancer Genome* <https://http://www.mycancergenome.org/content/disease/melanoma/nras/> Published 2015. Accessed 02/10/2018.
37. Devitt B, Liu W, Salemi R, et al. Clinical outcome and pathological features associated with NRAS mutation in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011;24(4):666-672.
38. Lovly C, W. Pao, J. Sosman. NF1 (NF1) in Melanoma. *My Cancer Genome* <https://http://www.mycancergenome.org/content/disease/melanoma/nf1/> (Updated June 16). Published 2015. Accessed 02/10/2018.
39. Maertens O, Johnson B, Hollstein P, et al. Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. *Cancer Discov*. 2013;3(3):338-349.
40. Whittaker SR, Theurillat JP, Van Allen E, et al. A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer Discov*. 2013;3(3):350-362.
41. Gibney GT, Smalley KS. An unholy alliance: cooperation between BRAF and NF1 in melanoma development and BRAF inhibitor resistance. *Cancer Discov*. 2013;3(3):260-263.
42. Yap YS, McPherson JR, Ong CK, et al. The NF1 gene revisited - from bench to bedside. *Oncotarget*. 2014;5(15):5873-5892.
43. Nikolaev SI, Rimoldi D, Iseli C, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic MAP2K1 and MAP2K2 mutations in melanoma. *Nat Genet*. 2011;44(2):133-139.
44. Emery CM, Vijayendran KG, Zipser MC, et al. MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(48):20411-20416.

45. Shi H, Moriceau G, Kong X, et al. Preexisting MEK1 exon 3 mutations in V600E/KBRAF melanomas do not confer resistance to BRAF inhibitors. *Cancer Discov.* 2012;2(5):414-424.
46. Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res.* 2008;14(21):6821-6828.
47. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(26):4340-4346.
48. Kitayama H, Kanakura Y, Furitsu T, et al. Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood.* 1995;85(3):790-798.
49. Hirota S, Nishida T, Isozaki K, et al. Gain-of-function mutation at the extracellular domain of KIT in gastrointestinal stromal tumours. *J Pathol.* 2001;193(4):505-510.
50. Lovly C, W. Pao, J. Sosman. KIT in Melanoma. *My Cancer Genome* <https://http://www.mycancergenome.org/content/disease/melanoma/kit/>. Published 2015. Accessed 02/10/2018.
51. Blay JY, Shen L, Kang YK, et al. Nilotinib versus imatinib as first-line therapy for patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumours (ENESTg1): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(5):550-560.
52. Carvajal RD, Lawrence DP, Weber JS, et al. Phase II Study of Nilotinib in Melanoma Harboring KIT Alterations Following Progression to Prior KIT Inhibition. *Clin Cancer Res.* 2015;21(10):2289-2296.
53. Kim KB, Eton O, Davis DW, et al. Phase II trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma. *Br J Cancer.* 2008;99(5):734-740.
54. Guo J, Si L, Kong Y, et al. Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J Clin Oncol.* 2011;29(21):2904-2909.

55. Verheijen RB, Yu H, Schellens JHM, Beijnen JH, Steeghs N, Huitema ADR. Practical Recommendations for Therapeutic Drug Monitoring of Kinase Inhibitors in Oncology. *Clin Pharmacol Ther.* 2017;102(5):765-776.
56. Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* 2007;8(11):1018-1029.
57. Szmulewitz RZ, Ratain MJ. Vemurafenib oral bioavailability: an insoluble problem. *J Clin Pharmacol.* 2014;54(4):375-377.
58. Alvarez JC, Funck-Brentano E, Abe E, Etting I, Saiag P, Knapp A. A LC/MS/MS micro-method for human plasma quantification of vemurafenib. Application to treated melanoma patients. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;97:29-32.
59. Nijenhuis CM, Huitema AD, Blank C, et al. Clinical Pharmacokinetics of Vemurafenib in BRAF-Mutated Melanoma Patients. *J Clin Pharmacol.* 2017;57(1):125-128.
60. Ribas A, Zhang W, Chang I, et al. The effects of a high-fat meal on single-dose vemurafenib pharmacokinetics. *J Clin Pharmacol.* 2014;54(4):368-374.
61. Zhang W, Heinzmann D, Grippo JF. Clinical Pharmacokinetics of Vemurafenib. *Clin Pharmacokinet.* 2017;56(9):1033-1043.
62. Lawrence SK, Nguyen D, Bowen C, Richards-Peterson L, Skordos KW. The metabolic drug-drug interaction profile of Dabrafenib: in vitro investigations and quantitative extrapolation of the P450-mediated DDI risk. *Drug Metab Dispos.* 2014;42(7):1180-1190.
63. Bershas DA, Ouellet D, Mamaril-Fishman DB, et al. Metabolism and disposition of oral dabrafenib in cancer patients: proposed participation of aryl nitrogen in carbon-carbon bond cleavage via decarboxylation following enzymatic oxidation. *Drug Metab Dispos.* 2013;41(12):2215-2224.
64. Falchook GS, Long GV, Kurzrock R, et al. Dose selection, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436). *Clin Cancer Res.* 2014;20(17):4449-4458.

65. Ouellet D, Gibiansky E, Leonowens C, et al. Population pharmacokinetics of dabrafenib, a BRAF inhibitor: effect of dose, time, covariates, and relationship with its metabolites. *J Clin Pharmacol*. 2014;54(6):696-706.
66. Delord JP, Robert C, Nyakas M, et al. Phase I Dose-Escalation and -Expansion Study of the BRAF Inhibitor Encorafenib (LGX818) in Metastatic BRAF-Mutant Melanoma. *Clin Cancer Res*. 2017;23(18):5339-5348.
67. Koelblinger P, Thuerigen O, Dummer R. Development of encorafenib for BRAF-mutated advanced melanoma. *Curr Opin Oncol*. 2018;30(2):125-133.
68. Takahashi RH, Choo EF, Ma S, et al. Absorption, Metabolism, Excretion, and the Contribution of Intestinal Metabolism to the Oral Disposition of [14C]Cobimetinib, a MEK Inhibitor, in Humans. *Drug Metab Dispos*. 2016;44(1):28-39.
69. Musib L, Choo E, Deng Y, et al. Absolute bioavailability and effect of formulation change, food, or elevated pH with rabeprazole on cobimetinib absorption in healthy subjects. *Mol Pharm*. 2013;10(11):4046-4054.
70. Wilkinson GR. Cytochrome P4503A (CYP3A) metabolism: prediction of in vivo activity in humans. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1996;24(5):475-490.
71. Choo EF, Woolsey S, DeMent K, et al. Use of transgenic mouse models to understand the oral disposition and drug-drug interaction potential of cobimetinib, a MEK inhibitor. *Drug Metab Dispos*. 2015;43(6):864-869.
72. Leonowens C, Pendry C, Bauman J, et al. Concomitant oral and intravenous pharmacokinetics of trametinib, a MEK inhibitor, in subjects with solid tumours. *Br J Clin Pharmacol*. 2014;78(3):524-532.
73. Koelblinger P, Dornbierer J, Dummer R. A review of binimetinib for the treatment of mutant cutaneous melanoma. *Future Oncol*. 2017;13(20):1755-1766.
74. Bendell JC, Javle M, Bekaii-Saab TS, et al. A phase 1 dose-escalation and expansion study of binimetinib (MEK162), a potent and selective oral MEK1/2 inhibitor. *Br J Cancer*. 2017;116(5):575-583.

75. Anforth R, Fernandez-Penas P, Long GV. Cutaneous toxicities of RAF inhibitors. *Lancet Oncol*. 2013;14(1):e11-18.
76. EPAR Zelboraf. http://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/zelboraf-epar-public-assessment-report_en.pdf. Published 2012. Accessed 03/10/2018.
77. McArthur GA, Chapman PB, Robert C, et al. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol*. 2014;15(3):323-332.
78. McArthur GA, Maio M, Arance A, et al. Vemurafenib in metastatic melanoma patients with brain metastases: an open-label, single-arm, phase 2, multicentre study. *Ann Oncol*. 2017;28(3):634-641.
79. EPAR Tafinlar. http://www.ema.europa.eu/documents/product-information/tafinlar-epar-product-information_en.pdf. Published 2013. Accessed 03/10/2018.
80. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, et al. *An update on BREAK-3, a phase III, randomized trial: dabrafenib (DAB) versus dacarbazine (DTIC) in patients with BRAF V600E-positive mutation metastatic melanoma (MM)*. ASCO congress 2013; Abstract 9013.
81. Rahman MA, Salajegheh A, Smith RA, Lam AK. BRAF inhibitors: From the laboratory to clinical trials. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014;90(3):220-232.
82. Dummer R, Ascierto PA, Gogas HJ, et al. Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(5):603-615.
83. Dummer R, Ascierto PA, Gogas HJ, et al. Overall survival in patients with BRAF-mutant melanoma receiving encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018.
84. Arnault JP, Mateus C, Escudier B, et al. Skin tumors induced by sorafenib; paradoxical RAS-RAF pathway activation and oncogenic mutations of HRAS, TP53, and TGFBR1. *Clin Cancer Res*. 2012;18(1):263-272.

85. Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, et al. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell*. 2010;140(2):209-221.
86. Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature*. 2010;464(7287):427-430.
87. Adelman CH, Ching G, Du L, et al. Comparative profiles of BRAF inhibitors: the paradox index as a predictor of clinical toxicity. *Oncotarget*. 2016;7(21):30453-30460.
88. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med*. 2012;366(8):707-714.
89. Villanueva J, Vultur A, Herlyn M. Resistance to BRAF inhibitors: unraveling mechanisms and future treatment options. *Cancer Res*. 2011;71(23):7137-7140.
90. Wagle N, Emery C, Berger MF, et al. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol*. 2011;29(22):3085-3096.
91. Greger JG, Eastman SD, Zhang V, et al. Combinations of BRAF, MEK, and PI3K/mTOR inhibitors overcome acquired resistance to the BRAF inhibitor GSK2118436 dabrafenib, mediated by NRAS or MEK mutations. *Mol Cancer Ther*. 2012;11(4):909-920.
92. Flaherty KT, Robert C, Hersey P, et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med*. 2012;367(2):107-114.
93. Johnson DB, Flaherty KT, Weber JS, et al. Combined BRAF (Dabrafenib) and MEK inhibition (Trametinib) in patients with BRAFV600-mutant melanoma experiencing progression with single-agent BRAF inhibitor. *J Clin Oncol*. 2014;32(33):3697-3704.
94. Ribas A, Gonzalez R, Pavlick A, et al. Combination of vemurafenib and cobimetinib in patients with advanced BRAF(V600)-mutated melanoma: a phase 1b study. *Lancet Oncol*. 2014;15(9):954-965.
95. Lovly C, W. Pao, J. Sosman. MEK1 (MAP2K1) in Melanoma. *My Cancer Genome* <https://http://www.mycancergenome.org/content/disease/melanoma/map2k1/> Published 2015. Accessed 03/10/2018.

96. EPAR Mekinist. http://www.ema.europa.eu/documents/product-information/mekinist-epar-product-information_en.pdf. Published 2014. Accessed 03/10/2018.
97. Dummer R, Schadendorf D, Ascierto PA, et al. Results of NEMO: A phase III trial of binimetinib (BINI) vs dacarbazine (DTIC) in *NRAS*-mutant cutaneous melanoma. Paper presented at: 2016 ASCO Annual Meeting.
98. Larkin J, Ascierto PA, Dreno B, et al. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med*. 2014.
99. Ascierto PA, McArthur GA, Dreno B, et al. coBRIM: a phase 3, double-blind, placebo-controlled study of vemurafenib versus vemurafenib + cobimetinib in previously untreated BRAF (V600) mutation-positive patients with unresectable locally advanced or metastatic melanoma (NCT01689519). *J Transl Med*. 2015;13:2061.
100. Ascierto PA, McArthur GA, Dreno B, et al. Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(9):1248-1260.
101. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, et al. Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *N Engl J Med*. 2014;371(20):1877-1888.
102. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2015;386(9992):444-451.
103. Long GV, Flaherty KT, Stroyakovskiy D, et al. Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with metastatic BRAF V600E/K-mutant melanoma: long-term survival and safety analysis of a phase 3 study. *Ann Oncol*. 2017;28(7):1631-1639.
104. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med*. 2015;372(1):30-39.
105. Long GV, Grob JJ, Nathan P, et al. Factors predictive of response, disease progression, and overall survival after dabrafenib and trametinib combination treatment: a pooled

- analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet Oncol.* 2016;17(12):1743-1754.
106. Schadendorf D, Long GV, Stroiakovski D, et al. Three-year pooled analysis of factors associated with clinical outcomes across dabrafenib and trametinib combination therapy phase 3 randomised trials. *Eur J Cancer.* 2017;82:45-55.
107. Wongchenko MJ, McArthur GA, Dreno B, et al. Gene Expression Profiling in BRAF-Mutated Melanoma Reveals Patient Subgroups with Poor Outcomes to Vemurafenib That May Be Overcome by Cobimetinib Plus Vemurafenib. *Clin Cancer Res.* 2017;23(17):5238-5245.
108. Hauschild A, Larkin J, Ribas A, et al. Modeled Prognostic Subgroups for Survival and Treatment Outcomes in BRAF V600-Mutated Metastatic Melanoma: Pooled Analysis of 4 Randomized Clinical Trials. *JAMA Oncol.* 2018;4(10):1382-1388.
109. Sergentanis TN, Antoniadis AG, Gogas HJ, et al. Obesity and risk of malignant melanoma: a meta-analysis of cohort and case-control studies. *Eur J Cancer.* 2013;49(3):642-657.
110. Skowron F, Berard F, Balme B, Maucourt-Boulch D. Role of obesity on the thickness of primary cutaneous melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015;29(2):262-269.
111. McQuade JL, Daniel CR, Hess KR, et al. Association of body-mass index and outcomes in patients with metastatic melanoma treated with targeted therapy, immunotherapy, or chemotherapy: a retrospective, multicohort analysis. *Lancet Oncol.* 2018;19(3):310-322.
112. Rousselot P, Molica L, et al. Dasatinib daily dose optimization based on residual drug levels resulted in reduced risk of pleural effusions and high molecular response rates: final results of the randomized OPTIM DASATINIB trial In. *Haematologica.* 2014;99:237.
113. Picard S, Titier K, Etienne G, et al. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2007;109(8):3496-3499.

114. Suttle AB, Ball HA, Molimard M, et al. Relationships between pazopanib exposure and clinical safety and efficacy in patients with advanced renal cell carcinoma. In: *Br J Cancer*. 2014;111:1909-1916.
115. Bouchet S, Poulette S, Titier K, et al. Relationship between imatinib trough concentration and outcomes in the treatment of advanced gastrointestinal stromal tumours in a real-life setting. *Eur J Cancer*. 2016;57:31-38.
116. Bate A, Lindquist M, Edwards IR. The application of knowledge discovery in databases to post-marketing drug safety: example of the WHO database. *Fundam Clin Pharmacol*. 2008;22(2):127-140.
117. Montastruc JL, Sommet A, Bagheri H, Lapeyre-Mestre M. Benefits and strengths of the disproportionality analysis for identification of adverse drug reactions in a pharmacovigilance database. *Br J Clin Pharmacol*. 2011;72(6):905-908.
118. Evans SJ, Waller PC, Davis S. Use of proportional reporting ratios (PRRs) for signal generation from spontaneous adverse drug reaction reports. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2001;10(6):483-486.
119. Annesley TM. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem*. 2003;49(7):1041-1044.
120. Taylor PJ. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem*. 2005;38(4):328-334.
121. Churchwell MI, Twaddle NC, Meeker LR, Doerge DR. Improving LC-MS sensitivity through increases in chromatographic performance: comparisons of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005;825(2):134-143.
122. Sherma J. UPLC: Ultra-performance liquid chromatography. *J AOAC Int*. 2005;88(3):63A-67A.
123. Wooding KM, Auchus RJ. Mass spectrometry theory and application to adrenal diseases. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;371(1-2):201-207.

124. Kushnir MM, Rockwood AL, Nelson GJ, Yue B, Urry FM. Assessing analytical specificity in quantitative analysis using tandem mass spectrometry. *Clin Biochem*. 2005;38(4):319-327.
125. Zhen Y, Thomas-Schoemann A, Sakji L, et al. An HPLC-UV method for the simultaneous quantification of vemurafenib and erlotinib in plasma from cancer patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013;928:93-97.
126. Nijenhuis CM, Rosing H, Schellens JH, Beijnen JH. Development and validation of a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay quantifying vemurafenib in human plasma. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;88:630-635.
127. Bihan K, Sauzay C, Goldwirt L, et al. Development and validation of a rapid and simple LC-MS/MS method for quantification of vemurafenib in human plasma: application to a human pharmacokinetic study. *Ther Drug Monit*. 2015;37(1):132-136.
128. Vikingsson S, Stromqvist M, Svedberg A, Hansson J, Hoim V, Green H. Novel rapid liquid chromatography tandem massspectrometry method for vemurafenib and metabolites in human plasma, including metabolite concentrations at steady state. *Biomed Chromatogr*. 2016;30(8):1234-1239.
129. Deng Y, Musib L, Choo E, et al. Determination of cobimetinib in human plasma using protein precipitation extraction and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2014;972:117-123.
130. Nijenhuis CM, Haverkate H, Rosing H, Schellens JH, Beijnen JH. Simultaneous quantification of dabrafenib and trametinib in human plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2016;125:270-279.
131. EPAR Cotellic. http://www.ema.europa.eu/documents/product-information/cotellic-epar-product-information_en.pdf. Published 2015. Accessed 03/10/2018.
132. Puszkiel A, Noe G, Bellesoeur A, et al. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Dabrafenib. *Clin Pharmacokinet*. 2018. doi: 10.1007/s40262-018-0703-0.

133. Ward MB, Reuter SE, Martin JH. How 'Optimal' are Optimal Sampling Times for Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer? Practical Considerations. *Clin Pharmacokinet*. 2016;55(10):1171-1177.
134. Menzies AM, Ashworth MT, Swann S, et al. Characteristics of pyrexia in BRAFV600E/K metastatic melanoma patients treated with combined dabrafenib and trametinib in a phase I/II clinical trial. *Ann Oncol*. 2015;26(2):415-421.
135. Directive 2008/50/CE du Parlement européen et du Conseil du 21 mai 2008 concernant la qualité de l'air ambiant et un air pur pour l'Europe. 2008.
136. Negrini AC, Arobba D. Allergenic pollens and pollinosis in Italy: recent advances. *Allergy*. 1992;47(4 Pt 2):371-379.
137. Geller-Bernstein C, Portnoy JM. The Clinical Utility of Pollen Counts. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2018. doi: 10.1007/s12016-018-8698-8.
138. Rowland A, van Dyk M, Hopkins AM, et al. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling to Identify Physiological and Molecular Characteristics Driving Variability in Drug Exposure. *Clin Pharmacol Ther*. 2018. doi: 10.1002/cpt.1076.
139. Li GF, Yu G, Liu HX, Zheng QS. Ethnic-specific in vitro-in vivo extrapolation and physiologically based pharmacokinetic approaches to predict cytochrome P450-mediated pharmacokinetics in the Chinese population: opportunities and challenges. *Clin Pharmacokinet*. 2014;53(2):197-202.
140. Crombag MBS, van Doremalen JGC, Janssen JM, et al. Therapeutic drug monitoring of small molecule kinase inhibitors in oncology in a real-world cohort study: does age matter? *Br J Clin Pharmacol*. 2018.
141. Kramkimel N, Thomas-Schoemann A, Sakji L, et al. Vemurafenib pharmacokinetics and its correlation with efficacy and safety in outpatients with advanced BRAF-mutated melanoma. *Target Oncol*. 2016;11(1):59-69.

142. Ouellet D, Kassir N, Chiu J, et al. Population pharmacokinetics and exposure-response of trametinib, a MEK inhibitor, in patients with BRAF V600 mutation-positive melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;77(4):807-817.
143. Funck-Brentano E, Alvarez JC, Longvert C, et al. Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600mut melanoma patients: impact on tumour response and tolerance. *Ann Oncol*. 2015;26(7):1470-5.
144. Goldwirt L, Chami I, Feugeas JP, et al. Reply to 'Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600mut melanoma patients: impact on tumour response and tolerance' by Funck-Brentano et al. In: *Ann Oncol*. 2016;27(2):363-364.
145. Han K, Jin JY, Marchand M, et al. Population pharmacokinetics and dosing implications for cobimetinib in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015;76(5):917-924.
146. Schreuer M, Meersseman G, Van Den Herrewegen S, et al. Quantitative assessment of BRAF V600 mutant circulating cell-free tumor DNA as a tool for therapeutic monitoring in metastatic melanoma patients treated with BRAF/MEK inhibitors. *J Transl Med*. 2016;14:95.
147. Sanmamed MF, Fernandez-Landazuri S, Rodriguez C, et al. Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digital PCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors. *Clin Chem*. 2015;61(1):297-304.
148. Garlan F, Blanchet B, Kramkimel N, et al. Circulating Tumor DNA Measurement by Picoliter Droplet-Based Digital PCR and Vemurafenib Plasma Concentrations in Patients with Advanced BRAF-Mutated Melanoma. *Target Oncol*. 2017;12(3):365-371.
149. LoRusso PM, Boerner SA, Seymour L. An overview of the optimal planning, design, and conduct of phase I studies of new therapeutics. *Clin Cancer Res*. 2010;16(6):1710-1718.
150. Korn EL, Arbuck SG, Pluda JM, Simon R, Kaplan RS, Christian MC. Clinical trial designs for cytostatic agents: are new approaches needed? *J Clin Oncol*. 2001;19(1):265-272.
151. Herviou P, Thivat E, Richard D, et al. Therapeutic drug monitoring and tyrosine kinase inhibitors. *Oncol Lett*. 2016;12(2):1223-1232.

152. Larkin J, Ferrucci PF, Gonzalez R, et al. Efficacy of nivolumab plus ipilimumab combination in patients with advanced melanoma and elevated serum lactate dehydrogenase: a pooled analysis. Oral communication at Society for Melanoma Research 2016 Congress. November 6–9, Boston; 2016.
153. Robert C, Long GV, Brady B, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med*. 2015;372(4):320-330.
154. Feng Y, Roy A, Masson E, Chen TT, Humphrey R, Weber JS. Exposure-response relationships of the efficacy and safety of ipilimumab in patients with advanced melanoma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(14):3977-3986.
155. Ribas A, Butler M, Lutzky J, et al. Phase I study combining anti-PD-L1 (MEDI4736) with BRAF (dabrafenib) and/or MEK (trametinib) inhibitors in advanced melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(15):3003-3003.
156. Hwu P, Hamid O, Gonzalez R, et al. Preliminary safety and clinical activity of atezolizumab combined with cobimetinib and vemurafenib in BRAF V600-mutant metastatic melanoma. *Ann Oncol*. 2016;27:1109.

ANNEXES

1. Feuille de demande de dosage des BRAFi et MEKi



CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE BORDEAUX
LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE CLINIQUE ET TOXICOLOGIE
Pr M. MOLIMARD
Centre Hospitalier Pellegrin – Tripode
Plateau Technique 2^e étage – 33076 BORDEAUX CEDEX
Tel : +33 (0)5 56 79 59 91 – Fax : + 33 (0)5 56 79 47 95
tdm@chu-bordeaux.fr



Demande de dosage: BRAF inhibiteurs et MEK inhibiteurs utilisés dans le traitement du Mélanome (code enregistrement PITK)
Joindre obligatoirement le bon de demande de dosage de Pharmacologie

Identité du malade		Coordonnées du service clinique	
Etiquette avec numéro identifiant ou Nom : Nom de jeune fille : Prénom : Sexe : Date de naissance :/...../.....		Téléphone : Fax : Médecin prescripteur : Service :	
Molécule dosée :			
☐ Vemurafenib (ZELBORAF®)	Dernière prise du médicament : ➤ Date :/...../..... Heure exacte : Posologie : Matin Midi Soir		Prélèvement *: ➤ Date :/...../..... Heure exacte : ☐ ☐
☐ Dabrafenib (TAFINLAR®)			
☐ Cobimetinib (COTELLIC®)	Dernière prise du médicament : ➤ Date :/...../..... Heure exacte : Posologie : Matin Midi Soir		Prélèvement *: ➤ Date :/...../..... Heure exacte : ☐
☐ Trametinib* (MEKINIST®)			
*Conditions de prélèvement : TUBE Hépariné sans gel (vert foncé) Dosage de concentration résiduelle : ➤ 24 ±3 h après la prise si 1 prise/j ➤ 12 ±2 h après la prise si 2 prises/j Prévoir l'heure de prélèvement en fonction de l'heure habituelle de prise du traitement par le patient. Le patient doit être informé qu'il ne prendra son traitement qu'après le prélèvement			
Traitement :		Date d'initiation/...../.....	
Toxicité :	☐ effets indésirables (préciser) : ➤ Grade ☐ I ☐ II ☐ III ☐ IV a priori attribué au :		
Traitements associés :			
Réponse au traitement ☐ Réponse complète ☐ Réponse Partielle ☐ Maladie Stable ☐ Progression (date :/...../.....)			

Transport : Le plasma doit être acheminé à + 4° C si <4h ; à -20°C si >4h

2. Formulaire CNIL pour étude observationnelle



RÉCÉPISSÉ

DÉCLARATION NORMALE

Numéro de déclaration

1994989 v 0

du 27 octobre 2016

Madame ROUSSET Marine
CHU DE BORDEAUX
PHARMACOLOGIE
PLACE AMÉLIE RABA LEON
33076 BORDEAUX

À LIRE IMPÉRATIVEMENT

La délivrance de ce récépissé atteste que vous avez transmis à la CNIL un dossier de déclaration formellement complet. Vous pouvez désormais mettre en oeuvre votre traitement de données à caractère personnel.

La CNIL peut à tout moment vérifier, par courrier, par la voie d'un contrôle sur place ou en ligne, que ce traitement respecte l'ensemble des dispositions de la loi du 6 janvier 1978 modifiée en 2004. Afin d'être conforme à la loi, vous êtes tenu de respecter tout au long de votre traitement les obligations prévues et notamment :

- 1) La définition et le respect de la finalité du traitement,
- 2) La pertinence des données traitées,
- 3) La conservation pendant une durée limitée des données,
- 4) La sécurité et la confidentialité des données,
- 5) Le respect des droits des intéressés : information sur leur droit d'accès, de rectification et d'opposition.

Pour plus de détails sur les obligations prévues par la loi « informatique et libertés », consultez le site internet de la CNIL : www.cnil.fr

Organisme déclarant

Nom : CHU DE BORDEAUX

Service : PHARMACOLOGIE

Adresse : PLACE AMÉLIE RABA LEON

Code postal : 33076

Ville : BORDEAUX

N° SIREN ou SIRET :

263305823 00019

Code NAF ou APE :

8610Z

Tél. : 05 57 82 11 59

Fax. : 05 57 82 00 38

Traitement déclaré

Finalité : CRÉATION D'UNE BASE DE SOIN DANS LE CADRE DU SUIVI THÉRAPEUTIQUE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DE DABRAFENIB, VEMURAFENIB, TRAMETINIB ET COBIMETINIB AFIN DE PRÉCISER LEUR ZONE DE TOXICITÉ ET D'EFFICACITÉ DANS LE TRAITEMENT DU MÉLANOME MÉTASTATIQUE

Fait à Paris, le 27 octobre 2016
Par délégation de la commission

Isabelle FALQUE PIERROTIN
Présidente

3. Mise au point d'une méthode de dosage de 17 ITK dont le dabrafenib- Article 5



High throughput routine determination of 17 tyrosine kinase inhibitors by LC–MS/MS

Camille Merienne^{a,b}, Marine Rousset^{a,b}, Dominique Ducint^a, Nadège Castaing^a,
Karine Titier^{a,b}, Mathieu Molimard^{a,b}, Stéphane Bouchet^{a,b,*}

^a CHU de Bordeaux, Bordeaux, F-33000, France

^b Univ. Bordeaux, Inserm, Bordeaux Population Health Research Center, Team PHARMACOEPIDEMIOLOGY, UMR 1219, F-33000 Bordeaux, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 June 2017

Received in revised form

22 November 2017

Accepted 26 November 2017

Available online 28 November 2017

Keywords:

Tyrosine kinase inhibitors

Therapeutic drug monitoring

Ultra high pressure liquid chromatography

Mass spectrometry

Targeted anticancer therapy

ABSTRACT

Several studies have shown that therapeutic drug monitoring of tyrosine kinase inhibitors (TKI) can improve their benefit in cancer. An analytical tool has been developed in order to quantify 17 tyrosine kinase inhibitors and 2 metabolites in human plasma (afatinib, axitinib, bosutinib, crizotinib, dabrafenib, dasatinib, erlotinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, ponatinib, regorafenib, regorafenib M2, regorafenib M5, ruxolitinib, sorafenib, sunitinib, vandetanib). Drugs were arranged in four groups, according to their plasma concentration range: 0.1–200 ng/ml, 1–200 ng/ml, 4–800 ng/ml and 25–5000 ng/ml. Solid phase extraction was used and separation was performed with HPLC using a gradient system on a solid core particle C18 column (5 × 2.1 mm, 1.6 μm). Ions were detected with a triple quadrupole mass spectrometry system. This assay allows rapid determination of 19 TKI in less than 5 min per run. This high throughput routine method will be useful to adjust doses of oral anticancer drugs in order to improve treatments efficacy.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

According to the World Health Organization, there were 14.1 million new cancer cases, 8.2 million cancer deaths and 32.6 million peoples living with cancer in 2012 worldwide. Breast, lung and colorectal cancers have the highest mortality rates for women whereas lung, liver and stomach were the most fatal cancers for men [1]. Cancer is the second leading cause of death globally and even the first cause in several developed countries.

Tyrosine Kinase Inhibitors (TKI) were developed in the early 2000s. Imatinib was the first TKI, indicated in Chronic Myeloid

Leukemia (CML). This molecule has revolutionized CML treatment, increasing overall survival dramatically [2].

Thereupon, many new drugs have been developed, targeting tyrosine and other kinase proteins, with currently more than 20 TKI indicated against numerous cancers.

Despite their efficacy, TKI pharmacokinetic characteristics seem to have generated less interest. All these drugs are given orally and at only one starting dose, whereas some have shown wide intra- and inter-individual variability such as imatinib as “model” [3]. Most are metabolized by CYP450, particularly CYP3A4. This pharmacokinetic variability leads to highly variable drug exposure between patients, resulting in too high or too low plasma concentrations in many. Other factors can reduce the effectiveness of TKI such as bad prognosis or other clinical factors, pharmacodynamics factors such as receptor mutations, or lack of compliance [3].

Many studies have pointed out, on the one hand, lack of patient adherence to treatment [4,5] and, on the other hand, a correlation between compliance and treatment efficacy [6,7]. Lack of compliance, increased by the oral route, drug-drug interactions (DDI) or particular pharmacokinetic profiles can lead to underdosing: efficacy may then be compromised and resistant cell clones selected.

At the opposite, overdosing caused by DDI, poor elimination or old age can lead to toxicity, such as pleurisy with dasatinib,

Abbreviations: ALL, Acute Lymphoid Leukemia; CML, Chronic Myeloid Leukaemia; CV, Coefficient of Variation; EGFR, Epidermal growth factor Receptor; EMA, European Medicines Agency; ER, Extraction Recovery; FDA, Food and Drug Administration; GIST, Gastro Intestinal Stromal Tumour; HCC, Hepatic Cell Carcinoma; IS, Internal Standard; LLOQ, Low Limit Of Quantification; ME, Matrix Effect; MS/MS, Tandem Mass Spectrometry; NSCLC, Non Small Cell Lung Cancer; QC, Quality Control; RCC, Renal Cell Carcinoma; SPE, Solid Phase Extraction; TKI, Tyrosine Kinase inhibitors; TQD, Triple Quadrupole; UHPLC, Ultra High Pressure Liquid Chromatography; VEGFR, Vascular Endothelial derived growth factor Receptor.

* Corresponding author at: Laboratoire de Pharmacologie Clinique et Toxicologie, 2e étage Triptode, 1 place Amélie Raba Léon, CHU Pellegrin, 33076 BORDEAUX, France.

E-mail address: stephane.bouchet@chu-bordeaux.fr (S. Bouchet).

severe rashes with EGFR-inhibitors or hand-foot syndrome with anti-VEGFR.

Considering the severe prognosis of the diseases, the wide pharmacokinetic variability, the chronic use and the high cost of the medicines, therapeutic drug monitoring (TDM) could be a very useful tool to assist clinicians with individual dose adjustment. Many studies have highlighted the clinical benefit of TDM for the first tyrosine kinase inhibitors [8–12]. In this context, it might be interesting to develop new tools to measure plasma concentrations of tyrosine kinase inhibitors.

Several methods have been developed to quantify tyrosine kinase inhibitors in plasma, hence there were multiresidual methods published [13–18], but none can quantify all the TKI simultaneously. Numbers of them have included the determination of metabolites (active or inactive) as TKI are extensively metabolized by CYP450 (especially CYP3A4). Actually, the proportion of metabolite(s) remains below 20% compared to parent drug except for regorafenib: the 2 active metabolites represent more than 50% of the regorafenib AUC.

The aim of the present study was to develop a fast analytical tool, measuring the concentrations of 17 TKI and 2 metabolites, with a wide range of concentrations in order to be used for TDM investigations but also for PK/PD studies. Analytical tools used are Solid Phase Extraction (SPE), Ultra High Pressure Chromatography (UHPLC) and tandem Mass Spectrometry allowing easy, fast, specific and sensitive quantification of TKI in human plasma.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Afatinib, afatinib- $^{13}\text{C}_6$, bosutinib, bosutinib- $^2\text{H}_9$, crizotinib, crizotinib- $^{13}\text{C}_2$ - $^2\text{H}_5$, dasatinib, dasatinib- $^{13}\text{C}_6$, dabrafenib, dabrafenib- $^2\text{H}_9$, gefitinib, gefitinib- $^2\text{H}_8$, imatinib, imatinib- $^2\text{H}_8$, ponatinib, ponatinib- $^2\text{H}_8$, regorafenib, its metabolites (regorafenib M2, regorafenib M5), regorafenib- $^{13}\text{C}_1$ - $^2\text{H}_3$, ruxolitinib and ruxolitinib- $^2\text{H}_9$, sorafenib and sorafenib- $^{13}\text{C}_1$ - $^2\text{H}_3$ tosylate were provided by Alsachim[®] (Illkirch-Grattenstaden, France). Axitinib, axitinib- $^{13}\text{C}_1$ - $^2\text{H}_3$, lapatinib and vandetanib were supplied by Sequoia Research Products (Pangbourne, UK) while sunitinib, sunitinib- $^2\text{H}_{10}$, erlotinib erlotinib- $^{13}\text{C}_6$, nilotinib, nilotinib- $^{13}\text{C}_1$ - $^2\text{H}_3$ were brought from Selleckchem (Houston, USA). HPLC grade solvents were provided by Prolabo[®] (Paris, France). Human plasma came from EFS (Etablissement Français du Sang, Bordeaux).

2.2. Standard solutions

Accurate 1 mg/ml stock solutions were prepared from powders dissolved in a 1/1/1 methanol/acetonitrile/DMSO diluent and stored at -20°C in a light protected container. Routine daily calibration and controls were prepared from stock solutions to stock daughter solutions. This daughter stock solution was diluted in the same ternary solvent to increase solubility.

We sorted the drugs in four groups, according to human plasma concentration found in pharmacokinetic and therapeutic drug monitoring studies as reported [12,19]. The high concentrations group included imatinib, dabrafenib, lapatinib, nilotinib, sorafenib, erlotinib, regorafenib, regorafenib M5 and regorafenib M2; the medium concentration group included afatinib, bosutinib, ruxolitinib, gefitinib, crizotinib; the low concentration group included ponatinib, vandetanib, sunitinib, and axitinib; a very low concentration group included only dasatinib. Standard calibration points were 25, 62.5, 250, 625, 1250, 2500, 3750 and 5000 ng/ml for the high concentration group, 4, 10, 40, 100, 200, 400, 600, 800 ng/ml for the medium concentration group and 0.1, 0.25 (only for dasa-

tinib) 1, 2.5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 ng/ml for the low and very low concentration groups. Quality control samples were 25, 75, 1000 and 4000 ng/ml for the high concentration group, 3, 12, 160 and 640 ng/ml for the medium concentration group and 0.1 (only for dasatinib), 1, 3, 40, 160 ng/ml for the low and very low concentration groups.

Internal standard daughter stock solution was prepared from the stock solution by mixing all the internal standards (IS) in a 50/50 methanol/acetonitrile diluent. Target concentrations are: 30 $\mu\text{g/ml}$ for sorafenib- $^{13}\text{C}_1$ - $^2\text{H}_3$, erlotinib- $^{13}\text{C}_6$ and regorafenib- $^{13}\text{C}_1$ - $^2\text{H}_6$, 20 $\mu\text{g/ml}$ for imatinib- $^2\text{H}_8$, nilotinib- $^{13}\text{C}_1$ - $^2\text{H}_3$ and ponatinib- $^2\text{H}_8$, 15 $\mu\text{g/ml}$ for bosutinib- $^2\text{H}_9$, 12 $\mu\text{g/ml}$ for dasatinib- $^{13}\text{C}_6$ and ruxolitinib- $^2\text{H}_9$, 6 $\mu\text{g/ml}$ for sunitinib- $^2\text{H}_{10}$, 3 $\mu\text{g/ml}$ for afatinib- $^{13}\text{C}_6$, crizotinib- $^{13}\text{C}_2$ - $^2\text{H}_5$ and 2 $\mu\text{g/ml}$ for dabrafenib- $^2\text{H}_9$, gefitinib- $^2\text{H}_8$ and axitinib- $^{13}\text{C}_1$ - $^2\text{H}_3$. Daughter stock solution was stored at -20°C in a light protected container for 6 months.

2.3. Chromatography

The HPLC system was an Acquity UPLC[®] system (Waters[®], Milford, USA) with the MassLynx software. The column was a CORTECS[®] C18+ UPLC $d_p = 1.6 \mu\text{m}$, $2.1 \times 50 \text{ mm}$ (Waters[®], Milford, USA) maintained at 25°C . The mobile phase A was an acetic acid buffer 0.01% in water; mobile phase B was acetonitrile added with 10% A. The following gradient was applied: starting at 12% B/88% A mobile phases, increasing linearly to 15% B at 0.25 min, 23% B at 0.75 min, 30% B at 1.5 min, 40% at 2 min, 60% at 2.9 min, and 90% at 3.6 min. At 4.2 min, B was reduced to 12% and stayed at the same ratio until 5 min, the end of the run. Flow rate was 0.4 mL/min. Column temperature was fixed at 25°C , 5 μL was injected in partial loop mode.

2.4. Mass spectrometry

The mass spectrometry system used for detection was an Acquity TQD[®] detector (Waters[®], Milford, USA) with electrospray ionization (ESI) in positive ion mode. ESI was operated at 150°C , with desolvation temperature at 420°C , cone gas flow adjusted at 20 L/h, desolvation gas flow at 1000 L/h and capillary voltage set up at 2 kV. MS collision was carried out by argon at $3 \cdot 10^{-3}$ mBar.

Mass spectrometer settings, including parent ions, daughter ions of quantification and identification, retention times, cone voltage and collision energy of each molecule and internal standards are shown in Table 1.

2.5. Sample preparation

The samples were prepared as follows: 300 μL of plasma (spiked plasma for standards and controls or plasma sample) + 250 μL of internal standard solution diluted in 1% H_3PO_4 .

The samples were extracted by solid phase extraction (96-well micro-elution plate, Oasis[®] MCX, Waters, Milford, USA) as follows: 200 μL methanol then 200 μL of purified water for activation, 500 μL sample, then 200 μL of 2% acid formic solution to wash. Elution was performed by $2 \times 50 \mu\text{L}$ of acetonitrile/methanol/ammonia 25% (57/38/5) followed by 25 μL of formic acid 8%.

2.6. Assay validation procedures

Assay validation procedures were performed according to the EMA "Guideline on bioanalytical method validation 2012" and FDA guidelines "Guidance for industry: bioanalytical method validation" [20,21].

Table 1
retention time and MRM transitions for the detection of tyrosine kinase inhibitors and internal standard (IS) by UPLC–MS/MS.

Drugs	Retention time (min)	Parent ion (m/z)	Quantification transition ion (m/z)	Confirmation transition ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Sunitinib	1.14/1.73	399.1	283.2	326.15	39	27/21
Sunitinib- ² H ₁₀ (IS)	1.13/1.74	409.9	284.0	–	39	40
Gefitinib	0.95	447.0	128.1	100.0	44	24/44
Gefitinib- ² H ₈ (IS)	0.95	455.1	136.1	–	35	30
Vandetanib	1.14	475.0	112.0	83.0	22	22/78
Crizotinib	1.17	450.0	177.1	260.2	44	50/25
Crizotinib- ¹³ C ₂ - ² H ₅ (IS)	1.17	457.1	177.0	–	40	35
Afatinib	1.18	486.0	305.1	371.2	54	40/26
Afatinib- ¹³ C ₆ (IS)	1.18	492.2	377.0	–	50	28
Imatinib	1.37	494.2	394.2	217.1	50	27
Imatinib- ² H ₈ (IS)	1.37	502.2	394.2	–	50	27
Dasatinib	1.60	488.2	401.1	232.1	55	30/30
Dasatinib- ¹³ C ₆ (IS)	1.60	494.6	407.1	–	55	30
Bosutinib	1.76	532.0	141.3	113.2	42	22/48
Bosutinib- ² H ₉ (IS)	1.68	541.1	150.3	–	42	25
Erlotinib	1.89	394.1	336.2	278.1	25	27/33
Erlotinib- ¹³ C ₆ (IS)	1.89	400.1	284.1	–	54	28
Axitinib	2.12	387.1	356.3	221.0	37	20/40
Axitinib- ¹³ C ₁ - ² H ₃ (IS)	2.12	391.0	356.3	–	38	20
Ruxolitinib	2.28	307.0	186.2	105.1	52	28/60
Ruxolitinib- ² H ₉ (IS)	2.28	316.1	186.2	–	48	30
Lapatinib	2.34	581.1	365.0	379.1	54	40/38
Ponatinib	2.39	533.0	260.2	101.0	42	30/22
Ponatinib- ² H ₈ (IS)	2.38	541.2	260.2	–	42	32
Nilotinib	2.42	530.1	289.1	259.1	70	30/55
Nilotinib- ¹³ C ₁ - ² H ₃ (IS)	2.41	534.1	289.1	–	60	27
Regorafenib M5	3.04	485.0	202.0	229.0	56	34/22
Regorafenib M2	3.13	499.0	304.2	229.2	60	30/38
Dabrafenib	3.22	520.0	307.2	277.0	62	36/64
Dabrafenib- ² H ₉ (IS)	3.22	529.0	316.3	–	58	38
Sorafenib	3.32	465.2	252.2	211.2	50	34/43
Sorafenib- ¹³ C ₁ - ² H ₃ (IS)	3.32	469.1	256.0	–	50	34
Regorafenib	3.35	483.0	270.0	288.2	58	40/28
Regorafenib- ¹³ C ₁ - ² H ₃ (IS)	3.35	487.0	292.1	–	52	42

2.6.1. Specificity and selectivity

The absence of interference from endogenous blood compounds (specificity) was examined by injecting 10 different blank human plasmas (among them, 4 pathological samples were haemolytic or lipidic) extracted without IS. The lack of interference between each drug, IS and other drugs was evaluated by analysing pure solutions for each drug individually and searching for the total absence of other drugs. Absence of interfering components was accepted when the response was less than 20% of the lower limit of quantification (LLOQ) for the analyte and 5% for the internal standard.

2.6.2. Linearity

Linearity was assessed by preparing eight non-zero calibration standards (ten for dasatinib) plus a blank and a zero, in drug-free plasma in 3 independent analytical runs on 3 different days. A weighted least square linear regression model was used to calculate the relation between the peak area ratio (corrected by internal standard) and the theoretical concentration. The inverse of the concentration (1/x) was used as a weighting factor. The deviation from the nominal concentration should be within $\pm 20\%$ for the LLOQ and $\pm 15\%$ for the other concentrations. At least 75% of the calibration standards must fulfil this criterion. Moreover, the determination coefficient (R^2) must be at least 0.990.

2.6.3. Precision and accuracy

Precision and accuracy were evaluated by analysing 3 levels of extracted and injected quality control (QC) and a level of LLOQ, repeated 5 times a day, for 3 days (within run and between run).

Mean concentrations, standard deviations and coefficient of variation (CV) were determined by ANOVA tests using the XLstat software. Bias is the percentage of difference from theoretical concentration. The bias should be $\leq 15\%$ for all the QC samples and $\leq$

20% for the LLOQ. Coefficient of variation should not exceed 15% for the QC samples and 20% for the LLOQ.

2.6.4. Extraction recovery

As introduced by Buhrman et al., the “extraction efficiency”, or Extraction Recovery (ER) was assessed by the response obtained from drug-free plasma spiked before extraction with known amount of each drug compared with those obtained from drug-free plasma spiked after extraction with the same nominal concentration of each drug [22]. Extraction recovery was studied at three concentrations corresponding to the quality controls (excluding the LLOQ). Each was analysed three times. The absolute extraction recovery should not vary with the concentration.

The “process efficiency” takes into account the internal standard and was calculated as the comparison of the response (=ratio molecule/IS) in the same conditions as above. It is considered as the relative extraction recovery. The resulting value should be as near to 100% as possible (deviation $<20\%$ may be expected).

2.6.5. Matrix effect

Matrix effect (ME) was evaluated by calculating the ratio of the peak area between a blank spiked with known amount of drugs concentration and drug-free plasma extracted then spiked with the same amount of drugs concentration. ME was studied at three concentrations (corresponding to the QCs), each repeated three times. Absolute CV and relative CV (normalized by IS) should not vary with concentration.

2.6.6. Carry over

During each day of validation assay, a blank was injected after the highest standard point. Area was compared with LLOQ. The

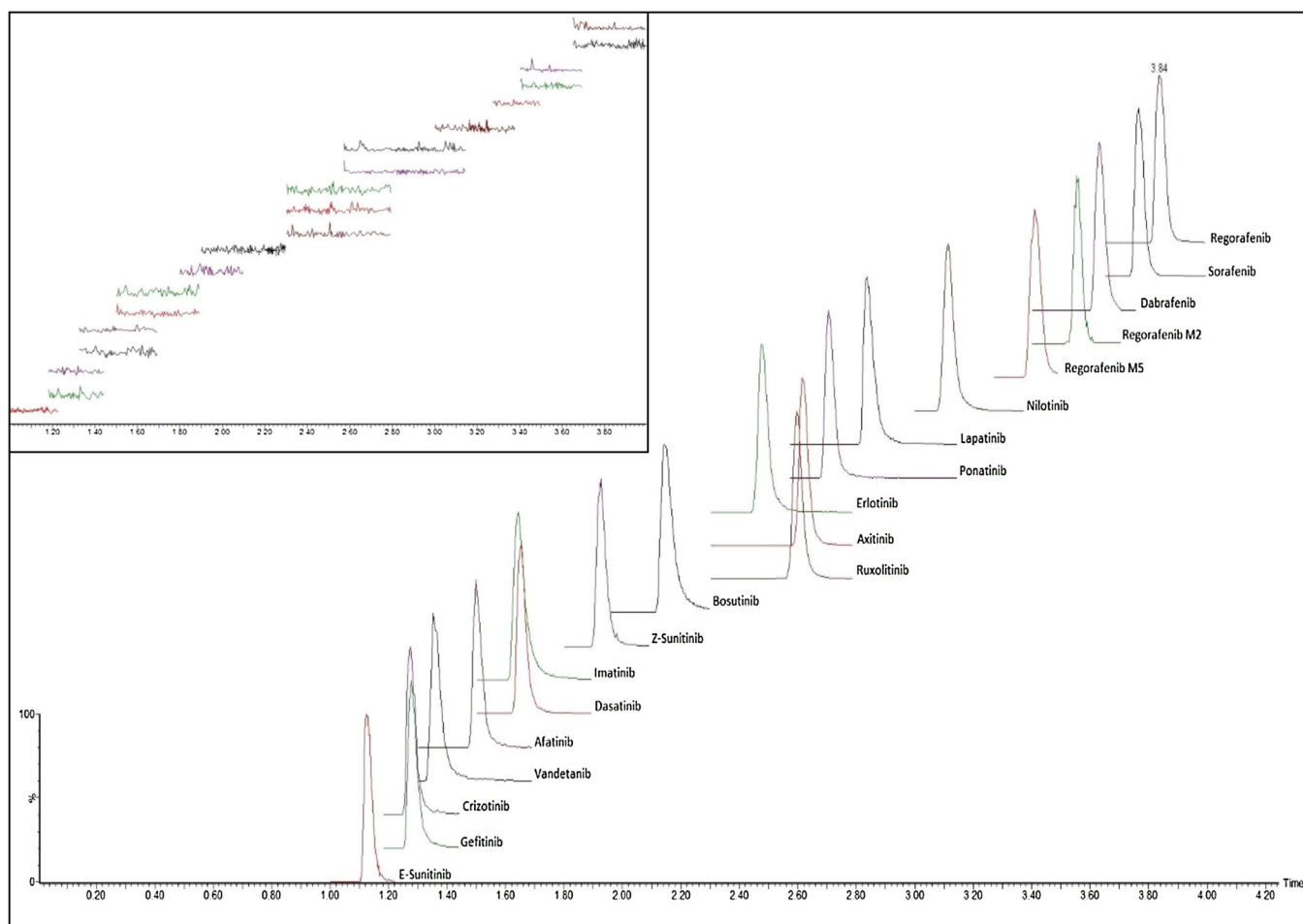


Fig. 1. representative chromatogram of quality control in plasma for each drug (the insert show blank extract from pathological sample).

carry over percentage should not be over 20% of the LLOQ area and 5% of the internal standard area.

2.6.7. Processed sample stability

The stability of processed samples, including the resident time in the autosampler, was determined by reinjection of all the samples after 24, 48 and 72 h. The deviation of the QC values should be within $\pm 15\%$ compared to the first injection (T0).

2.6.8. Application to patients treated by TKI

To test the applicability of this assay, 3 batches of patients treated by TKI samples were analysed with both our old method and this new one [14]. This concerns 38 patients who benefited from TDM (13 imatinib, 4 nilotinib, 15 dasatinib, 2 erlotinib and 4 sorafenib). The newest molecules were also tested on physician's demand (for inefficiency, toxicity or drug-drug interaction or lack of compliance suspicion) with real samples of patients treated by afatinib (n = 8), bosutinib (n = 13), crizotinib (n = 3), ponatinib (n = 13) and ruxolitinib (n = 33). Blood samples were collected into 7 mL lithium heparinised tubes at steady state, i.e. after at least 15 days of treatment, just before the next administration (trough plasma concentration or Cmin). If a sample gave a result higher than the ULOQ, it was reanalysed with an adequate dilution.

3. Results

3.1. Chromatography

Chromatogram of high concentration quality control (QC) is represented in Fig. 1. All the compounds were separated in 4 min. Retention times are given in Table 1. Sunitinib has 2 isomers: Z and E. The isomerization reaction of the Z-isomer into the E-isomer is light dependent and reversible. [23] Sunitinib quantification was based on the addition of the two peaks.

3.2. Specificity and selectivity

Ten extracted blank plasmas were injected to assess specificity. Blank plasma showed no peaks co-eluting with any of the compounds. No interference was found by the analysis of ten blank plasmas for every drug and internal standard from endogenous compounds either with lipids or haemoglobin in the 4 pathological samples. Moreover, there was no interference between drugs, IS and other drugs when pure solutions of each drug were injected individually.

3.3. Linearity

Calibration curves were linear for the very low, the low and the medium concentration group, and was quadratic for the high concentration group. Correlation coefficients (r^2) were at least 0.997 with a slope CV lower than 15% (n = 3 for each molecule). All the

validation criteria for linearity were fulfilled, according to EMA and FDA recommendations.

3.4. Extraction recovery

Results of extraction recovery are shown in Table 2. Several molecules were not well-extracted and the absolute extraction recovery remained below 50%: this affects dabrafenib (24.7%), lapatinib (21.7%), ruxolitinib (28.4%) and all the sorafenib-derived drugs such as regorafenib (fluoro-sorafenib, 22.7%), regorafenib M2 (N-oxyde-fluoro-sorafenib, 27.2%), regorafenib M5 (N-demethyl-N-oxyde-fluoro-sorafenib, 23.4%) and sorafenib (17.9%).

Whereas the absolute extraction recovery was only about 20–30%, the percentages were constant among the desired concentrations.

The process efficiency results showed the role played by internal standards: the relative extraction recovery reached the expected deviation of less than 20% (range –17.05%–15.33%) excepted for metabolites of regorafenib that were not sufficiently corrected by a non-isotopic labelled internal standard (nonetheless constant over the concentration range).

3.5. Precision and accuracy

Results of precision and accuracy are presented Table 2. We analysed 4 QC concentrations ($n = 5$). Intraday assay was acceptable. CV calculated with ANOVA were less than 15% for three QCs and less than 20% for the LLOQ. Likewise, interday assay was acceptable for all the drugs. Bias of all the molecules was less than 20% for the LLOQ and less than 15% for the quality control. Consequently, according to the international guidelines (EMA, FDA), the acceptance criteria for accuracy and precision were met.

3.6. Matrix effect

Results of matrix effect (ME) for the three QCs (presented in Table 2) exhibited ionization suppression/enhancement between 83.4% (crizotinib) and 116.40% (gefitinib). The assay didn't show any difference of ME between drugs. Thus, ME did not appear to interfere significantly with the integrity of our analytical method.

3.7. Carry over

Carry over percentages were less than 20% of the LLOQ area for all drugs, and 5% of each internal standard. Thus, carry over met the requirements.

3.8. Processed sample stability

The post preparative stability experiment showed that all the molecules were stable after 24, 48 and 72 h. The deviation of the QC values was less than $\pm 15\%$ compared to the first injection (T0).

3.9. Application to patients treated by TKI

The results of patient samples analysed by old and new methods gave very similar results, with less than 10% of differences (except for one sorafenib sample that differed from 17%). Data concerning newest molecules (given in Table 3) were clinically compared to Table 4 (elaborated according to Yu et al. and Rood et al. [12,19]). The results showed a very high intervariability (from 42% for bosutinib to about 90% for afatinib, ponatinib and ruxolitinib).

4. Discussion

This validated assay allows the simultaneous quantification of 17 tyrosine kinase inhibitors (afatinib, axitinib, bosutinib, crizotinib, dabrafenib, dasatinib, erlotinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, ponatinib, regorafenib, ruxolitinib, sorafenib, sunitinib, vandetanib) and 2 metabolites (regorafenib M2 and regorafenib M5) simultaneously. Our assay was validated over four ranges of concentrations: 25–5000 ng/ml (dabrafenib, erlotinib, imatinib, nilotinib, regorafenib and its metabolites M2 and M5, sorafenib), 4–800 ng/ml (afatinib, bosutinib, crizotinib, gefitinib, ruxolitinib), 1–200 ng/ml (axitinib, ponatinib, sunitinib, vandetanib) and 0.1–200 ng/ml for dasatinib. Each compound was analysed with a labelled stable isotope, except for vandetanib, lapatinib and metabolites of regorafenib (respective internal standards: afatinib- $^{13}\text{C}_6$, sorafenib- $^{13}\text{C}_1\text{-}^2\text{H}_3$ and regorafenib- $^{13}\text{C}_1\text{-}^2\text{H}_3$) because their labelled stable isotopes were unavailable or unnecessary. Indeed, too many transitions during the detection windows would have reduced dwell time of other molecules and thus performance of the method. Despite this absence, the method has shown good results in terms of specificity, accuracy and process efficiency.

The lower limit of quantification permits analysis of residual concentrations for all the molecules, including the low concentration ones, such as dasatinib (0.1 ng/ml), axitinib (1 ng/ml), sunitinib (1 ng/ml), vandetanib (1 ng/ml) and ponatinib (1 ng/ml). A large range of plasma concentrations was covered, including the plasma concentrations found during pharmacokinetic studies or therapeutic drug monitoring, allowing to cover all the patients, even the ones excluded from phase I pharmacokinetic studies.

We could not include all the approved TKI (at the beginning of the method development) in the assay, particularly those with very high trough concentration: pazopanib and vemurafenib have plasma concentration targets higher than 20 $\mu\text{g/ml}$, which is much higher than the other TKI. They have to be separated from this method and quantified with a specific method because, in the other case, they could interfere during the ionization in the source (if retention times were closed) and could also saturate the micro-elution solid phase during the extraction.

The solid core particle technology column permits an efficient separation of these 19 molecules in 3.84 min, thereby accelerating the global process. Almost all the TKI can be quantified in a one-run fast method, saving time. It can be used for pharmacokinetic studies, pharmacokinetic/pharmacodynamic threshold studies and therapeutic drug monitoring.

Several studies have shown benefits of TDM with TKI [12]. According to Yu et al. and Rood et al. [12,19], target concentrations of the main TKI are presented Table 4. The older ones are well-known, such as imatinib for which a residual concentration above 1 000 ng/ml was associated with a higher probability of major molecular response, as shown by Picard et al. [24]. Rousset et al., showed that a $C_{\min} > 1.5 \text{ ng/ml}$ of dasatinib increased the risk of pleurisy [10]. New TKI should also be studied, as they are also very sensitive to pharmacokinetic variability. This assay allowed us to analyse 70 samples from patients treated with several of these new molecules: afatinib, bosutinib, crizotinib, ponatinib and ruxolitinib. Values were consistent with data of Table 4, but ruxolitinib concentrations seemed to be lower. It was probably due to the fact that most of our patients were children (high clearance) or elderly patients (low-dosed). Moreover, the results showed a very high interpatient variability for every molecule that could be explained by modified dose regimen (to reduce toxicity or increase efficiency), drug-drug interaction or lack of compliance, justifying the use of TDM and the need of a threshold determination for these molecules.

This was found in literature: some TKI show a huge inter-individual variability, such as pazopanib [25], others are very

Table 2
intra-day, inter-day precision and bias data extraction recovery and matrix effect.

Molecule	Theoretical concentration. (ng/mL)	Intra-day		Inter-day		Bias.	Matrix. effect.	Extraction recovery.		Processed sample stability.		
		Observed concentration. (mean $\pm$ SD, n = 5)	CV. (ANOVA test). (%) (n = 15)	Observed concentration. (mean $\pm$ SD, n = 15)	CV. (ANOVA test). (%) (n = 15)			Absolute	Process efficiency (%) (n = 3)	24 h	48 h	72 h
Afatinib	4	4.16 $\pm$ 0.24	5.80	3.79 $\pm$ 0.35	10.39	–5.25	–	–	–	–	–	–
	12.1	11.85 $\pm$ 0.39	7.47	11.19 $\pm$ 0.99	9.36	–7.52	–4.21	–0.70	0.00	–1.0	3.2	–4.3
	162.5	145.0 $\pm$ 3.8	5.75	139.5 $\pm$ 8.5	6.22	–14.18	–12.41	8.82	–3.46	–1.1	–1.0	–2.0
	650	649.7 $\pm$ 47.8	6.51	621.8 $\pm$ 59.2	10.49	4.34	–12.52	9.70	–2.66	1.3	–0.4	–1.7
Axitinib	1	1.04 $\pm$ 0.07	9.54	0.95 $\pm$ 0.35	14.61	4.93	–	–	–	–	–	–
	3	3.06 $\pm$ 0.26	8.44	2.92 $\pm$ 0.27	9.44	–2.51	18.70	–27.21	11.60	12.7	1.4	11.5
	40	38.37 $\pm$ 0.70	5.78	37.29 $\pm$ 2.16	5.79	–6.77	5.34	–41.30	8.63	–0.0	–0.5	1.4
	160	161.9 $\pm$ 8.3	6.30	159.7 $\pm$ 9.7	6.30	–0.21	–7.06	–35.60	0.31	2.9	3.7	8.0
Bosutinib	4	3.99 $\pm$ 0.15	10.01	3.83 $\pm$ 0.33	3.96	–5.70	–	–	–	–	–	–
	12.1	11.75 $\pm$ 0.67	7.06	10.64 $\pm$ 1.23	12.89	–12.07	–12.74	–23.28	13.74	7.8	3.0	13.8
	162.5	153.0 $\pm$ 5.8	6.17	143.0 $\pm$ 11.7	8.46	–12.03	–12.15	–13.77	1.68	–6.3	–1.5	1.8
	650	639.6 $\pm$ 48.1	6.04	644.0 $\pm$ 69.4	12.16	–0.93	–3.83	–5.89	–13.53	–8.7	0.5	5.6
Crizotinib	4	3.83 $\pm$ 0.33	5.89	3.83 $\pm$ 0.50	13.17	–9.21	–	–	–	–	–	–
	12.1	11.23 $\pm$ 0.52	7.68	10.81 $\pm$ 0.89	8.17	–10.63	–16.62	–11.08	–14.29	2.2	–5.7	8.4
	162.5	142.6 $\pm$ 7.3	8.32	142.8 $\pm$ 10.4	7.12	–12.15	–9.11	4.50	1.06	0.1	–1.2	–1.8
	650	609.1 $\pm$ 27.0	14.25	621.8 $\pm$ 44.7	7.65	–4.33	–11.17	14.99	–4.82	0.3	–2.8	–2.5
Dabrafenib	25	25.43 $\pm$ 0.7	8.95	23.58 $\pm$ 1.74	8.54	–5.67	–	–	–	–	–	–
	75	71.20 $\pm$ 2.90	6.61	70.48 $\pm$ 5.86	9.02	–6.03	4.47	–81.07	–17.05	12.1	–0.1	7.6
	1000	895 $\pm$ 33	6.18	900 $\pm$ 64	7.37	–10.03	–5.29	–74.36	–12.50	3.0	7.8	9.2
	4000	3995 $\pm$ 388	3.02	3992 $\pm$ 337	8.26	–0.20	–8.73	–70.45	–7.75	5.6	9.1	1.2
Dasatinib	0.1	0.12 $\pm$ 0.02	17.68	0.11 $\pm$ 0.02	18.96	5.33	–	–	–	–	–	–
	1	0.98 $\pm$ 0.11	8.22	0.94 $\pm$ 0.07	10.26	–6.00	–10.50	–19.74	5.26	11.8	–0.8	13.2
	40	35.70 $\pm$ 1.32	6.78	35.95 $\pm$ 2.35	6.44	–5.89	5.49	–21.95	3.54	3.0	–4.7	3.3
	160	154.9 $\pm$ 7.8	4.95	159.1 $\pm$ 7.9	4.97	–10.13	1.35	–23.85	7.16	5.6	–4.4	3.5
Erlotinib	25	25.97 $\pm$ 1.04	3.80	24.66 $\pm$ 1.31	5.79	–1.38	–	–	–	–	–	–
	75	69.81 $\pm$ 3.04	5.61	66.11 $\pm$ 4.50	7.23	–11.86	0.92	–17.38	–2.18	–2.3	–2.9	–0.6
	1000	931 $\pm$ 18	5.26	881 $\pm$ 56	6.76	–11.82	–0.60	–15.94	3.87	–0.6	0.9	1.8
	4000	4178 $\pm$ 195	4.97	3975 $\pm$ 275	7.55	–0.62	–2.28	–6.99	14.70	1.1	4.3	2.5
Gefitinib	4	3.90 $\pm$ 0.19	5.12	3.73 $\pm$ 0.37	11.20	–8.14	–	–	–	–	–	–
	12.1	11.05 $\pm$ 0.60	9.61	11.26 $\pm$ 1.43	13.70	–6.90	16.40	–2.95	–6.82	2.0	1.6	4.7
	162.5	141.1 $\pm$ 2.4	7.63	142.4 $\pm$ 14.3	10.81	–12.37	–4.36	21.25	–14.75	1.6	–1.0	3.5
	650	572.5 $\pm$ 26.7	4.55	621.8 $\pm$ 45.0	8.07	–4.35	–11.20	35.83	1.56	–1.9	–1.5	–1.0
Imatinib	25	23.83 $\pm$ 1.07	4.75	22.84 $\pm$ 1.75	8.55	–8.66	–	–	–	–	–	–
	75	72.15 $\pm$ 2.80	6.75	71.12 $\pm$ 4.55	6.25	–5.17	–4.21	–11.17	1.97	7.5	6.7	11.8
	1000	939 $\pm$ 31	5.89	917 $\pm$ 54	5.86	–8.29	–5.84	–7.56	1.22	3.6	3.2	5.9
	4000	3989 $\pm$ 204	4.96	3956 $\pm$ 227	6.01	–1.09	–1.81	1.36	3.02	–3.7	0.6	–1.5
Lapatinib	25	24.11 $\pm$ 2.00	14.07	24.72 $\pm$ 3.30	13.05	–1.12	–	–	–	–	–	–
	75	66.55 $\pm$ 13.32	12.05	75.15 $\pm$ 11.18	14.86	0.19	5.77	–81.58	12.26	–6.6	–13.1	–5.5
	1000	871 $\pm$ 26	9.19	1010 $\pm$ 137	14.98	0.96	–4.77	–78.38	5.63	–14.3	0.7	–14.0
	4000	3956 $\pm$ 171	7.20	4041 $\pm$ 429	11.69	1.02	3.68	–74.96	11.12	6.6	6.4	2.2
Nilotinib	25	22.27 $\pm$ 0.55	3.09	22.11 $\pm$ 0.84	4.02	–11.57	–	–	–	–	–	–
	75	65.28 $\pm$ 1.45	6.02	65.56 $\pm$ 4.76	7.69	–12.59	–2.86	–72.19	15.14	–0.4	–5.1	12.4
	1000	889 $\pm$ 23	6.83	903 $\pm$ 79	9.46	–9.74	–1.89	–74.44	–3.65	9.1	0.2	12.1
	4000	3662 $\pm$ 182	5.12	3909 $\pm$ 277	7.72	–2.26	–1.91	–70.57	9.93	–3.1	–3.9	–3.2

Table 2 (Continued)

Molecule	Theoretical concentration. (ng/mL)	Intra-day		Inter-day			Matrix. effect. (%) (n = 3)	Extraction recovery.		Processed sample stability.		
		Observed concentration. (mean $\pm$ SD, n = 5)	CV. (ANOVA test). (%) (n = 15)	Observed concentration. (mean $\pm$ SD, n = 15)	CV. (ANOVA test). (%) (n = 15)	Bias. (%)		Absolute (%) (n = 3)	Process efficiency (%) (n = 3)	24 h (%) (n = 5)	48 h (%) (n = 5)	72 h (%) (n = 5)
Ponatinib	1	1.05 $\pm$ 0.03	5.26	0.96 $\pm$ 0.08	10.26	−3.80	–	–	–	–	–	–
	3	2.92 $\pm$ 0.14	5.51	2.8 $\pm$ 0.21	7.79	−6.69	−5.50	−36.91	−3.57	−13.3	9.6	3.3
	40	37.79 $\pm$ 0.90	7.26	36.11 $\pm$ 2.42	7.13	−9.73	−4.50	−34.68	−2.00	6.6	2.8	4.5
	160	161.4 $\pm$ 7.9	2.95	157.9 $\pm$ 11.1	7.66	−1.33	4.82	−34.31	9.30	−6.0	5.2	4.8
	25	24.14 $\pm$ 1.12	3.35	23.06 $\pm$ 1.41	6.94	−7.77	–	–	–	–	–	–
Regorafenib	75	69.79 $\pm$ 3.75	6.62	68.47 $\pm$ 4.89	7.33	−8.70	15.91	−78.19	10.34	−0.4	−6.7	0.0
	1000	919 $\pm$ 30	6.94	907 $\pm$ 59	6.30	−9.27	−6.04	−78.66	2.83	−0.1	10.1	−1.2
	4000	3729 $\pm$ 166	4.96	3843 $\pm$ 228	6.28	−3.93	−5.77	−75.12	4.05	2.9	1.7	2.9
	25	22.13 $\pm$ 0.60	4.64	22.54 $\pm$ 1.02	4.45	−11.21	–	–	–	–	–	–
	75	61.68 $\pm$ 3.97	6.50	64.26 $\pm$ 4.34	6.86	−14.33	2.11	−79.70	33.69	7.2	5.7	8.6
Regorafenib M2	1000	826 $\pm$ 41	6.43	877 $\pm$ 67	8.00	−12.32	−0.47	−72.29	37.10	−8.1	−3.2	−5.7
	4000	3488 $\pm$ 183	4.33	3791 $\pm$ 304	9.09	−5.21	−3.11	−66.45	39.38	−12.2	−7.8	−9.3
	25	28.09 $\pm$ 1.99	11.07	23.61 $\pm$ 4.10	19.35	−5.58	–	–	–	–	–	–
	75	68.39 $\pm$ 6.47	11.31	63.67 $\pm$ 7.60	14.11	−12.17	−0.77	−76.61	22.22	10.0	−0.1	−12.4
	1000	847 $\pm$ 34	6.42	889 $\pm$ 65	7.70	−11.09	4.89	76.98	23.64	−0.3	−9.8	−10.2
Regorafenib M5	4000	3790 $\pm$ 283.4	7.16	3942 $\pm$ 333	8.92	−1.45	7.00	−76.09	13.79	5.5	−11.5	−14.3
	4	3.68 $\pm$ 0.16	4.66	3.69 $\pm$ 0.17	4.71	−9.05	–	–	–	–	–	–
	12.1	10.67 $\pm$ 0.49	6.44	11.02 $\pm$ 0.70	6.37	−9.06	−1.22	−75.34	13.77	−1.2	3.9	−0.9
	162.5	135.8 $\pm$ 3.4	5.65	141.4 $\pm$ 9.1	6.75	−12.97	−0.25	−75.29	1.79	−2.1	2.7	1.6
	650	583.1 $\pm$ 13.3	4.98	619.46 $\pm$ 47.2	8.45	−4.70	−0.08	−71.58	8.04	1.1	−1.9	1.3
Ruxolitinib	25	22.32 $\pm$ 0.75	7.04	22.73 $\pm$ 1.56	6.81	−9.07	–	–	–	–	–	–
	75	75.09 $\pm$ 4.10	7.58	73.59 $\pm$ 5.44	7.58	−1.88	−10.43	−87.69	8.66	1.8	5.5	14.1
	1000	1000 $\pm$ 35	7.74	962 $\pm$ 73	7.74	−3.76	4.20	−84.32	15.24	12.7	10.1	0.3
	4000	4075 $\pm$ 224	5.79	3973 $\pm$ 252	6.54	−0.68	−7.75	−74.45	15.33	5.5	10.4	0.8
	1	0.97 $\pm$ 0.04	4.03	0.89 $\pm$ 0.13	17.43	−10.94	–	–	–	–	–	–
Sunitinib	3	3.09 $\pm$ 0.15	7.53	2.95 $\pm$ 0.29	10.77	−1.66	−12.94	−10.05	−8.47	3.3	−1.5	5.8
	75	39.48 $\pm$ 1.10	6.40	38.11 $\pm$ 2.53	6.73	−4.72	−10.19	−3.07	5.28	−4.2	0.2	3.5
	160	155.4 $\pm$ 8.5	5.87	156.7 $\pm$ 9.6	6.23	−2.04	−10.59	6.50	9.75	1.4	1.8	12.2
	1	0.84 $\pm$ 0.09	11.01	0.85 $\pm$ 0.09	10.86	−15.27	–	–	–	–	–	–
	3	2.65 $\pm$ 0.23	13.10	2.69 $\pm$ 0.35	12.91	−10.24	19.51	25.69	0.00	13.8	0.2	7.4
Vandetanib	75	35.55 $\pm$ 2.43	8.83	34.47 $\pm$ 2.93	8.36	−13.84	−3.22	32.86	−5.05	−0.1	−3.3	−10.0
	160	145.8 $\pm$ 7.1	7.12	143.4 $\pm$ 11.0	7.86	−10.36	−5.46	39.35	−12.50	−1.0	0.7	−3.1

Table 3

Results of the 70 samples of patients treated with afatinib, bosutinib, crizotinib, ponatinib or ruxolitinib.

Molecules	Nb of samples/ nb of patients	Median (Min-max) ng/mL	interpatient CV%
Afatinib	8/6	16,7 (5–38,8)	95%
Bosutinib	13/10	68 (33–318,7)	42%
Crizotinib	3/2	19, 177, 201*	Not applicable
Ponatinib	13/10	22,4 (ND–319)	92%
Ruxolitinib	33/19	11 (ND–155)	89%

(ND = below limit of quantification, * = real values).

Table 4

indications, dosage, targeted concentrations, half-life of the main TKI, according to Yu et al. and Rood et al. CML = chronic myelogenous leukemia; Ph+ = Philadelphia Chromosome positive; GIST = gastrointestinal stromal tumor; ALL = Acute lymphoblastic leukemia; NSCLC = non small cells lung cancer; mRCC = Metastatic renal cell carcinoma; HCC = Hepatocellular Carcinoma.

Main pharmacological target	Molecule	Indications and usual dosage	Target concentrations (ng/ml)		PK	
			C _{min}	C _{max}	T _{MAX}	T _{1/2}
Bcr-abl	Bosutinib	CML 500 mg/d	>150	<600	6 h	34 h
	Dasatinib	CML (Ph+) 100 mg/d	<1,5	>50	0,5–3 h	3–6 h
	Imatinib	CML (Ph+)	1 000		2–4 h	18–22 h
		GIST	800			
		Myelodysplastic Syndrome				
		400 mg/d				
JAK	Nilotinib	ALL (Ph+)				
		600 mg/d				
	Ponatinib	CML (Ph+)	>800		2–4 h	17 h
		400 mg/d				
	Ruxolitinib	CML (Ph+), T315I	>22		6 h	34 h
		45 mg/d				
ALK	Crizotinib	Myelofibrosis		1160	1 h	3 h
		15 ou 20 mg BID				
	Afatinib	Polycythemia vera				
		10 mg BID				
	Erlotinib	NSCLC ALK positive	>250		4–6 h	42 h
		500 mg/d				
ErbB1: EGF-R	Gefitinib	NSCLC EGF-R positive	>20–55	<250	2–5 h	37 h
		40 mg/d				
	Lapatinib	NSCLC EGF-R positive	>500			
		150 mg/d			4 h	36 h
	Vandetanib	Pancreatic carcinoma	700–1 700			
		100 mg/d				
ErbB2: HER-2	Sunitinib	NSCLC EGF-R positive	>200		3–7 h	36 h
		250 mg/d				
	Pazopanib	Breast cancer HER2 positive	>300–600		4 h	24 h
		1 250 mg/d				
	Regorafenib	Medullary Thyroid cancer RET positive	1 000–1 497		4–10 h	19 days
		300 mg/d				
VEGF-R	Axitinib	mRCC	>10	45,2–56,4	4 h	2,5–6 h
		5 mg BID				
	Sorafenib	HCC, mRCC	3750–4300	<5 800	2–6 h	25–48 h
		400 mg BID				
	Dabrafenib	mRCC	>50			
		GIST	>37,5	<100	6–12 h	40–60 h
RAF kinase	Pazopanib	50 mg/d (4 w/6)				
		mRCC				
	Regorafenib	Sarcoma	>20 000		2–4 h	22 h
		800 mg/d				
	Dabrafenib	Metastatic colorectal cancer, GIST	>1 000	<2 500	3,5–4 h	20–30 h
		160 mg/d				

sensitive to cytochrome activity, such as ruxolitinib. Shi et al. have shown that coadministration of ruxolitinib and ketoconazole, a potent CYP3A4 inhibitor, increased total ruxolitinib exposure ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$) by 91%, while coadministration of ruxolitinib with rifampicin, a potent CYP3A4 inducer, reduced ruxolitinib $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ by 71%, decreasing its pharmacodynamics activity by 10% [26].

We have observed this phenomenon in clinical practice: a patient with primary myelofibrosis well equilibrated by ruxoli-

tinib 15 mg twice a day since November 2013, received in July 2015 an anti-tuberculosis quadritherapy with rifampicin, isoniazid, pyrazinamid, and dexambutol after discovering a ganglionic granulomatous lesion with *Mycobacterium tuberculosis* positive PCR. After three weeks, the patient complained of night sweats and a soft splenomegaly was observed, indicating a resurgence of the primary myelofibrosis. Her ruxolitinib plasma concentration has dramatically dipped (down to undetectability); a drug-drug interaction between rifampicin, a well-known enzyme inducer, and ruxolitinib

was suggested. Ruxolitinib dosage was adjusted until concentrations increased to 25 ng/mL and symptoms disappeared.

This case, one of the many we observed, shows the increasing interest of TDM with TKI. It allows optimization of treatment efficiency while preventing side effects as well as possible. This kind of tool was developed to permit this monitoring, over an adapted range of concentrations.

Having a single method for many different molecules is efficient in the context of routine TDM in a multidisciplinary environment: all patients on TKI, whatever the indication, can be monitored without having to change methods, always a time-consuming process.

5. Conclusion

This high throughput assay allows fast quantification of multiple TKI in human plasma. It can be used routinely to perform TDM, pharmacokinetic studies and threshold definition. The next analytical step is to automate the extraction process with a liquid handling automate (Tecan® Evo75 at the laboratory) for even more efficiency.

References

- [1] D. Forman, F. Bray, D.H. Brewster, C. Gombe Mbalawa, B. Kohler, M. Piñeros, E. Steliarova-Foucher, R. Swaminathan, J. Ferlay (Eds.), *Cancer Incidence in Five Continents, I.A.F.R.o. Cancer*, 2014, p. 1365, Editor.
- [2] S.G. O'Brien, F. Guilhot, R.A. Larson, I. Gathmann, M. Baccarani, F. Cervantes, J.J. Cornelissen, T. Fischer, A. Hochhaus, T. Hughes, K. Lechner, J.L. Nielsen, P. Rousselot, J. Reiffers, G. Saglio, J. Shepherd, B. Simonsson, A. Gratwohl, J.M. Goldman, H. Kantarjian, K. Taylor, G. Verhoef, A.E. Bolton, R. Capdeville, B.J. Druker, Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 994–1004.
- [3] J.F. Apperley, I. Part, Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia, *Lancet Oncol.* 8 (2007) 1018–1029.
- [4] A.M. Levine, J.L. Richardson, G. Marks, K. Chan, J. Graham, J.N. Selser, C. Kishbaugh, D.R. Shelton, C.A. Johnson, Compliance with oral drug therapy in patients with hematologic malignancy, *J. Clin. Oncol.* 5 (1987) 1469–1476.
- [5] J. Tsang, I. Rudychev, S.L. Pescatore, Prescription compliance and persistency in chronic myelogenous leukemia (CML) and gastrointestinal stromal tumor (GIST) patients (pts) on imatinib (IM), *ASCO Meet. Abstr.* 24 (18_Suppl) (2006) 6119.
- [6] V. Gebbia, M. Bellavia, G.L. Banna, P. Russo, F. Ferrau, P. Tralongo, N. Borsellino, Treatment monitoring program for implementation of adherence to second-line erlotinib for advanced non-small-cell lung cancer, *Clin. Lung Cancer* 14 (2013) 390–398.
- [7] D. Marin, A. Bazeos, F.X. Mahon, L. Eliasson, M. Milojkovic, J.F. Apperley, R. Szydlo, R. Desai, K. Kozlowski, C. Paliompeis, V. Latham, L. Foroni, M. Molimard, A. Reid, K. Rezvani, H. de Lavallade, C. Guallar, J. Goldman, J.S. Khorashad, Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinib, *J. Clin. Oncol.* 28 (2010) 2381–2388.
- [8] S. Bouchet, S. Poulette, K. Titier, N. Moore, R. Lassalle, A. Abouelfath, A. Italiano, C. Chevreau, E. Bompas, O. Collard, F. Duffaud, M. Rios, D. Cupissol, A. Adenis, I. Ray-Coquard, O. Bouché, A. Le Cesne, B. Bui, J.Y. Blay, M. Molimard, Relationship between imatinib trough concentration and outcomes in the treatment of advanced gastrointestinal stromal tumours in a real-life setting, *Eur. J. Cancer* 57 (2016) 31–38.
- [9] S. Bouchet, K. Titier, N. Moore, R. Lassalle, B. Ambrosino, S. Poulette, P. Schuld, C. Belanger, F.X. Mahon, M. Molimard, Therapeutic drug monitoring of imatinib in chronic myeloid leukemia: experience from 1216 patients at a centralized laboratory, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 27 (2013) 690–697.
- [10] P. Rousselot, L. Mollica, A. Guerci-Bresler, F.E. Etienne, L. Legros, A. Charbonnier, V. Coiteux, C. Dartigues, M. Escoffier-Barbe, L. Roy, P. Cony-Makhoul, V. Dubruille, M. Gardembas, C. Berthou, F. Huguet, B. Deau, E. Jourdan, L. Fouillard, S. Malak, D. Réa, L. Busque, F. Guilhot, M. Molimard, J. Guilhot, J.M. Cayuela, S. Bouchet, F.X. Mahon, Dasatinib daily dose optimization based on residual drug levels resulted in reduced risk of pleural effusions and high molecular response rates: final results of the randomized OPTIM dasatinib trial, *Haematologica (EHA Congress)* 99 (s1) (2014), p. 237, abstract S678.
- [11] B. Suttle, H.A. Ball, M. Molimard, D. Rajagopalan, R.S. Swann, R.G. Amado, Relationship between exposure to pazopanib (P) and efficacy in patients (pts) with advanced renal cell carcinoma (mRCC), *ASCO Meet. Abstr.* 28 (15_Suppl) (2010) 3048.
- [12] H. Yu, N. Steeghs, C.M. Nijenhuis, J.H. Schellens, J.H. Beijnen, A.D. Huitema, Practical guidelines for therapeutic drug monitoring of anticancer tyrosine kinase inhibitors: focus on the pharmacokinetic targets, *Clin. Pharmacokinet.* 53 (2014) 305–325.
- [13] I. Andriamanana, I. Gana, B. Duret, A. Hulin, Simultaneous analysis of anticancer agents bortezomib imatinib, nilotinib, dasatinib, erlotinib, lapatinib, sorafenib, sunitinib and vandetanib in human plasma using LC/MS/MS, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 926 (2013) 83–91.
- [14] S. Bouchet, E. Chauzit, D. Ducint, N. Castaing, M. Canal-Raffin, N. Moore, K. Titier, M. Molimard, Simultaneous determination of nine tyrosine kinase inhibitors by 96-well solid-phase extraction and ultra performance LC/MS–MS, *Clin. Chim. Acta* 412 (2011) 1060–1067.
- [15] N.A. Lankheet, M.J. Hillebrand, H. Rosing, J.H. Schellens, J.H. Beijnen, A.D. Huitema, Method development and validation for the quantification of dasatinib erlotinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, sorafenib and sunitinib in human plasma by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Biomed. Chromatogr.* 27 (2013) 466–476.
- [16] N.P. van Erp, D. de Wit, H.J. Guchelaar, H. Gelderblom, T.J. Hessing, J.D. Hartigh, A validated assay for the simultaneous quantification of six tyrosine kinase inhibitors and two active metabolites in human serum using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 937 (2013) 33–43.
- [17] H.H. Huynh, C. Pressiat, H. Sauvageon, I. Madelaine, P. Maslanka, C. Lebbé, C. Thieblemont, L. Goldwirt, S. Mourah, Development and validation of a simultaneous quantification method of 14 tyrosine kinase inhibitors in human plasma using LC–MS/MS, *Ther. Drug Monit.* 39 (2017) 43–54.
- [18] M. Herbrink, M.N. de Vries, H. Rosing, A.D. Huitema, B. Nuijen, J.H. Schellens, J.H. Beijnen, Quantification of 11 therapeutic kinase inhibitors in human plasma for therapeutic drug monitoring using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Ther. Drug Monit.* 38 (2016) 649–656.
- [19] J.J.M. Rood, J.H.M. Schellens, J.H. Beijnen, R.W. Sparidans, Recent developments in the chromatographic bioanalysis of approved kinase inhibitor drugs in oncology, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 130 (2016) 244–263.
- [20] E.M. Agency, Guideline on Bioanalytical Method Validation, 2012.
- [21] F.a.D. Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2013.
- [22] D.L. Buhrman, P.I. Price, P.J. Rudewiczcor, Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography–tandem mass spectrometry: a study of ion suppression, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 7 (1996) 1099–1105.
- [23] P. de Bruijn, S. Sleijfer, M.H. Lam, R.H. Mathijssen, E.A. Wiemer, W.J. Loos, Bioanalytical method for the quantification of sunitinib and its n-desethyl metabolite SU12662 in human plasma by ultra performance liquid chromatography/tandem triple–quadrupole mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 934–941.
- [24] S. Picard, K. Titier, G. Etienne, E. Teilhet, D. Ducint, M.A. Bernard, R. Lassalle, G. Marit, J. Reiffers, B. Begaud, N. Moore, M. Molimard, F.X. Mahon, Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia, *Blood* 109 (2007) 3496–3499.
- [25] D.-C. Imbs, S. Négrier, P. Cassier, A. Hollebecque, A. Varga, E. Blanc, T. Lafont, B. Escudier, J.C. Soria, D. Pérol, E. Chatelut, Pharmacokinetics of pazopanib administered in combination with bevacizumab, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 73 (2014) 1189–1196.
- [26] J.G. Shi, X. Chen, R.F. McGee, R.R. Landman, T. Emm, Y. Lo, P.A. Scherle, N.G. Punwani, W.V. Williams, S. Yeleswaram, The pharmacokinetics: pharmacodynamics, and safety of orally dosed INCB018424 phosphate in healthy volunteers, *J. Clin. Pharmacol.* 51 (12) (2011) 1644–1654.

4. Lettre d'intention et protocole de recherche pour PHRC-I 2016



LETTRE D'INTENTION EN VUE DE LA SOUMISSION D'UN PROJET DANS LE CADRE DU PHRC INTERREGIONAL 2016

A retourner au plus tard le **vendredi 6 mai 2016** à l'adresse électronique suivante :
aurelie.pouzet@chu-bordeaux.fr

DRCI : ☒ CHU BORDEAUX ☐ INSTITUT BERGONIE ☐ CHU LIMOGES
☐ CHU MARTINIQUE ☐ CHU MONTPELLIER ☐ ICM
☐ CHU NIMES ☐ CHU POINTE-A-PITRE ☐ CHU POITIERS
☐ CENTRE C. REGAUD ☐ CHU LA REUNION ☐ CHU TOULOUSE

INFORMATIONS GENERALES

Titre du projet : BRAF-inhibiteurs/MEK-inhibiteurs : détermination des seuils plasmatiques d'Efficacité et de Toxicité dans le mélanome métastatique.

Acronyme : BRACKET
(15 caractères maximum)

Investigateur coordonnateur (joindre CV)

Prénom, Nom : Dr Marine ROUSSET

Fonction : Assistant Hospitalo-Universitaire Spécialité : Pharmacologie et Toxicologie

Service : Pharmacologie médicale

Adresse électronique : marine.rousset@chu-bordeaux.fr

Groupe hospitalier : CHU Pellegrin

Téléphone : 05 56 79 59 91

(à cocher)

☐ Médecin

☒ Pharmacien

☐ Infirmière

☐ Chirurgien-Dentiste

☐ Biologiste

☐ Autre.....

Première soumission de ce projet à un appel à projets DGOS ?

☐ OUI

☒ NON

Si "NON", préciser l'année de soumission antérieure⁽¹⁾ : 2015

Financement(s) antérieur(s) dans le cadre des appels à projet de la DGOS

Non applicable

Etablissement-coordonnateur responsable du budget pour le Ministère de la santé

Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux
12 rue Dubernat, 33400 Talence

Domaine de Recherche

Pharmacologie appliquée à l'onco-dermatologie

(Si oncologie, organe, localisation tumorale) : Mélanome métastatique

Méthodologiste (joindre CV)

Nom : Pr MOLIMARD Mathieu

Téléphone : 0557571560

Adresse électronique : mathieu.molimard@chu-bordeaux.fr

Economiste de la santé (si nécessaire)

Non applicable

Nom :

Téléphone :

Adresse électronique :

Structure responsable de la gestion de projet

Direction de la Recherche Clinique et de l'Innovation
Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux
12 rue Dubernat, 33 400 Talence

Structure responsable de l'assurance qualité

Direction de la Recherche Clinique et de l'Innovation
Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux
12 rue Dubernat, 33 400 Talence

Structure responsable de la gestion de données et des statistiques

Centre de Méthodologie et de Gestion des données
Service de Pharmacologie Médicale
CHU de Bordeaux

Nombre prévisionnel de centres d'inclusion (NC)

9 centres :

CHU de Bordeaux ;

CH de la Côte basque ;

CHU de Limoges ;
 CHU de Montpellier ;
 CHU de Nîmes ;
 CH de Pau ;
 CHU de Poitiers ;
 CHU de Saint-Denis, La Réunion
 CHU de Toulouse ;

Co-investigateurs (1 à N)

Nom, Prénom	Service, spécialité, Tél, e-mail	Etablissement
DUTRIAUX Caroline	Dermatologie Unité de cancérologie Tél : 05 56 79 47 05 Caroline.dutriaux@chu-bordeaux.fr	CHU de Bordeaux
DEVAUX Suzanne	Dermatologie Tél : 05 59 44 43 63 sdevaux@ch-cotabasque.fr	CH de la Côte basque
BEDANE Christophe	Dermatologie Tél : 05 55 05 64 31 Christophe.bedane@chu-limoges.fr	CHU de Limoges
DEREURE Olivier	Dermatologie Unité de cancérologie Tél : 04.67.33.69.06 olivier-dereure@chu-montpellier.fr	CHU Montpellier
STOEBNER Pierre	Dermatologie Unité de cancérologie Tél : 04 66 68 31 71 pierre.stoebner@chu-nimes.fr	CHU de Nîmes
JOUARY Thomas	Dermatologie Unité de cancérologie Tél : 05 59 92 49 91 Thomas.jouary@ch-pau.fr	CH de Pau
HAINAUT Ewa	Dermatologie Tél : 05.49.44.44.44 Ewa.hainaut@chu-poitiers.fr	CHU de Poitiers
OSDOIT-MEDART Sophie	Dermatologie Médecine interne et dermatologie Tél : 02.62.90.58.62 Sophie.osdoit@chu-reunion.fr	CHU Saint-Denis La Réunion
MEYER Nicolas	Dermatologie Unité de cancérologie Tél : 05 67 77 81 34 Meyer.n@chu-toulouse.fr	CHU de Toulouse

PROJET DE RECHERCHE

Rationnel (contexte et hypothèses)

(maximum 320 mots)

Le rôle de la voie des MAP-kinases (BRAF/MEK/ERK) dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses est bien décrit. Pour les mélanomes, une mutation du codon V600 de la kinase BRAF est présente dans plus de 50% des cas. Les thérapies ciblées sur ces kinases par association de BRAF-inhibiteurs (BRAFi : vemurafenib et dabrafenib) et MEK-inhibiteurs (MEKi : cobimetinib et trametinib) ont permis d'améliorer la survie sans progression. Le taux de réponse au traitement est de 50% en moyenne mais la réponse varie entre les patients. Les effets indésirables surviennent chez 90% des patients traités par bithérapie, et leur gravité nécessite une diminution de posologie chez 1/3 des patients traités (1-2).

Les inhibiteurs de kinase sont tous caractérisés par un métabolisme par le CYP3A4 et une large variabilité pharmacocinétique inter-patients alors qu'ils sont initiés à posologie unique (3). Dans une étude menée auprès de 23 patients traités par vemurafenib, les concentrations plasmatiques résiduelles variaient de 13 à 110 µg/ml pour une même dose (4). Une telle variabilité est attendue pour le dabrafenib et les MEKi.

Plusieurs études ont montré que la toxicité et l'efficacité des inhibiteurs de kinase étaient associées à leur concentration plasmatique plutôt qu'à la dose administrée, y compris dans le traitement du mélanome. Une zone thérapeutique de 40 à 100 µg/ml semble se dessiner pour le vemurafenib en monothérapie (5).

Les traitements sont maintenant utilisés en bithérapie associant BRAFi et MEKi. Aucun seuil de toxicité n'a été publié pour ces associations, malgré la fréquente survenue d'effets indésirables, et leur gravité.

L'hypothèse de recherche est la suivante : la variabilité inter-individuelle des concentrations plasmatiques de BRAFi et MEKi pourrait avoir un retentissement sur le plan clinique et thérapeutique. Une concentration élevée pourrait entraîner la survenue d'effets indésirables, à l'inverse une concentration « sous-optimale » pourrait réduire l'efficacité du traitement. Déterminer les seuils de concentration plasmatique de toxicité et d'efficacité de l'association BRAFi et MEKi représente donc un enjeu majeur en oncologie.

Originalité et caractère innovant

(maximum 160 mots)

Le projet vise à déterminer les seuils de concentration plasmatique associés à la toxicité et à l'efficacité des bithérapies BRAFi+MEKi.

Ces bithérapies sont devenues le traitement de 1^{ère} ligne du mélanome métastatique muté BRAF, or aucun seuil de toxicité n'a été publié pour ces associations, malgré la fréquente survenue d'effets indésirables et leur gravité.

De même, aucun seuil d'efficacité n'est connu à ce jour pour ces bithérapies. Il est pourtant primordial de s'assurer que les diminutions de posologie pour toxicité ne se font pas au détriment de l'efficacité.

Outre la recherche de seuils, cette étude vise à explorer le lien entre concentration plasmatique de BRAFi/MEKi et concentration en ADN circulant muté, non exploré à ce jour.

Cette étude est un préliminaire indispensable à l'adaptation précoce des posologies des bithérapies BRAFi+MEKi, avant la survenue d'effet indésirable tout en assurant l'efficacité du traitement. Ce travail pourrait amener à de nouvelles recommandations de suivi

thérapeutique et d'adaptation posologique chez les patients atteints de mélanome métastatique.

Objet de la Recherche

Technologies de santé (cocher & préciser) :

- ☒ médicaments
- ☐ dispositifs médicaux
- ☐ actes;
- ☐ organisations du système de soins (incluant les services de santé) (2).

➔ préciser : vemurafenib + cobimetinib ; dabrafenib + trametinib ;

Si pertinent :

date du marquage CE :

Autorisation de Mise sur le Marché :

Vemurafenib (octobre 2012)

Dabrafenib (mai 2013)

Trametinib (avril 2014)

Cobimetinib (janvier 2016)

Mots Clés (5)

Mélanome métastatique ; BRAF-inhibiteurs ; MEK-inhibiteurs ; seuil de toxicité ; seuil d'efficacité

Objectif Principal

(A cocher)

- ☐ Description d'hypothèses
- ☐ Efficacité
- ☐ Organisation des soins

- ☐ Faisabilité
- ☐ Sécurité Efficience

- ☒ Tolérance
- ☐ Impact budgétaire

(A cocher)

- ☐ Etiologie
- ☐ Causalité (3)
- ☐ Diagnostic
- ☒ Pronostic
- ☐ Recherche sur les méthodes
- ☐ Recherche qualitative
- ☐ Autre

- ☐ Thérapeutique
(impact sur des critères de jugement cliniques "durs") (4)
- ☐ Thérapeutique
(impact sur des critères de jugement intermédiaires) (5)
- ☐ Observance
- ☐ Pratique courante

(Préciser, maximum 48 mots)

Déterminer les seuils de concentrations plasmatiques de chacune des bithérapies BRAFi+MEKi (mesurées à la première visite de suivi du traitement) associés à la survenue d'effets indésirables graves au cours des 3 premiers mois de traitement chez des patients atteints de mélanome métastatique.

Objectifs Secondaires

(Préciser, maximum 160 mots)

- Etudier l'association entre les concentrations plasmatiques de chacune des bithérapies BRAFi+MEKi (mesurées à la première visite de suivi du traitement) et la survie sans progression à 12 mois
- Etudier l'association entre les concentrations plasmatiques de chacune des bithérapies BRAFi+MEKi (mesurées à la première visite de suivi du traitement) et l'évolution de la concentration d'ADN circulant muté BRAF V600 mesurée à la visite d'initiation du traitement (V1) à la première visite de suivi (V2), à 3 mois (M3) et 6 mois (M6)

Critères d'évaluation principaux (en lien avec l'objectif principal)

- **Concentrations plasmatiques résiduelles** de BRAFi+MEKi mesurées à la première visite de suivi (après au moins 8 jours de traitement continu par vemurafenib+cobimetinib et 15 jours de traitement continu par dabrafenib+trametinib) par méthode chromatographique couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS)
- **Survenue d'effet indésirable grave** (EIG) au cours des 3 premiers mois de traitement. L'EIG étant défini par tout EI attribuable au traitement, de grade 3 ou 4 (classification CTC-AE) ou ayant nécessité une diminution de posologie d'au moins 25%

Critères d'évaluation secondaires (en lien avec les objectifs secondaires)

- Concentrations plasmatiques résiduelles de BRAFi+MEKi mesurées à la première visite de suivi
- Survie sans progression à 12 mois, évaluée selon les critères RECIST 1.1
- Concentrations d'ADN circulant muté BRAF V600 mesurées à la visite d'initiation du traitement (V1) à la première visite de suivi (V2), à 3 mois (M3) et à 6 mois (M6) par PCR digitale (QX200 Biorad) à l'aide du kit Biorad : ddPCR™ BRAF V600 Screening Kit

Population d'étude

(Principaux critères d'inclusion et de non inclusion)

Critères d'inclusion :

- Patient âgé de plus de 18 ans
- Patient atteint de mélanome métastatique muté BRAF V600 initiant un traitement par bithérapie BRAFi+MEKi
- Accord de participation à l'étude (formulaire de consentement écrit spécifique pour le dosage l'ADN circulant muté BRAF pour les patients inclus à Bordeaux et Toulouse)

Critères de non inclusion :

- Patient dont la survie est estimée à moins de 3 mois
- Traitement antérieur par BRAFi ou MEKi

Plan expérimental

(A cocher) :

☐ Méta-analyse

☐ Etude contrôlée randomisée

Si oui :

☐ Ouvert

☐ Simple Aveugle

☐ Double Aveugle

☐ Revue systématique

☐ Etude pragmatique

☐ Etude quasi-expérimentale (cohortes non randomisées, ...)

☐ Etude de cohorte prospective

☐ Etude cas-contrôle

☐ Etude transversale

☐ Etude de cohorte rétrospective

☐ Recherche dans les bases de données médico-administratives

☐ Modélisation

☐ Série de cas

☒ Autre

☐ Etude qualitative

(Préciser, maximum 320 mots)

Il s'agit d'une recherche non interventionnelle menée chez des patients atteints de mélanome métastatique traités par vemurafenib+cobimetinib ou dabrafenib+trametinib.

Les patients seront vus en consultation selon le suivi habituel imposé par leur pathologie, classiquement 1 visite par mois. Aucun acte spécifique à la recherche ne sera réalisé. Seuls les dosages de BRAFi, MEKi et d'ADN circulant muté ne font pas partie de la prise en charge courante, mais les échantillons sanguins nécessaires à leur dosage seront prélevés au cours d'un bilan biologique usuel.

A chaque visite, un interrogatoire et un examen clinique seront pratiqués pour recueillir les informations suivantes : âge, sexe, poids, taille, pression artérielle, traitements et pathologies associées, antécédents, effets indésirables et adaptation de posologie.

A la visite d'initiation du traitement (V1), une information sur l'étude sera délivrée au patient et son consentement oral sera recueilli.

Lors de la visite habituelle de suivi (V2), une prise de sang prévue dans le suivi, sera réalisée avant la prise du traitement. Un tube supplémentaire issu de ce prélèvement permettra de doser les concentrations de BRAFi et MEKi. Le prélèvement sera effectué 12h +/-2h après la prise de BRAFi et 24h +/-4h après la prise de MEKi. Les patients devront avoir pris leur traitement de façon continue pendant au moins 8 jours pour l'association vemurafenib+cobimetinib et au moins 15 jours pour dabrafenib+trametinib.

Au cours des 6 mois suivant V1, un tube supplémentaire sera prélevé lors d'un bilan sanguin usuel si la posologie de BRAFi ou MEKi a été diminuée sur l'avis du clinicien (maximum un par patient). Les prélèvements pour dosage de BRAFi et MEKi seront analysés au Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie du CHU de Bordeaux en fin d'étude.

Pour les patients inclus à Bordeaux et Toulouse, un consentement écrit sera recueilli et un tube de sang supplémentaire sera prélevé à V1, V2, M3 et M6 au cours d'un bilan usuel pour dosage d'ADN circulant muté. Les prélèvements seront analysés dans les services de biologie des tumeurs de Bordeaux et de Toulouse.

Si Analyse Médico-économique :

Non applicable

(A cocher) :

- ☐ Analyse coût-utilité
- ☐ Analyse coût-efficacité
- ☐ Analyse coût-bénéfices
- ☐ Analyse d'impact budgétaire

- ☐ Analyse de minimisation de coûts
- ☐ Analyse coût-conséquence
- ☐ Analyse coût de la maladie
- ☐ Autre

(préciser 320 mots)

Niveau de maturité de la technologie de santé*

(1 chiffre + 1 lettre)

9A

* <https://www.medicalcountermeasures.gov/federal-initiatives/guidance/about-the-trls.aspx>

En cas d'essai sur un médicament, phase : Non applicable

(A cocher)

☐ I

☐ II

☐ III

☐ IV

☐ V

Si groupe comparateur :

Non applicable

Groupe expérimental

(préciser, maximum 48 mots)

Groupe contrôle

(préciser, maximum 48 mots]

Durée de la participation de chaque patient

(3 chiffres : jours / mois / années)

12 mois

Durée prévisionnelle de Recrutement (DUR)

(2 chiffres, en mois)

24 mois

Nombre de patients / observations prévu(e)s à recruter (NP)*(3 chiffres et Justification de la taille de l'échantillon maximum 80 mots)*

208

Méthode de Hajian-Tilaki (2013): comparaison d'AUC ROC (observée versus théorique).

- hypothèse : $AUC_{\text{observée}} > 0,70$ pour une bonne discrimination par rapport à la diagonale et pour déterminer un seuil de toxicité.

- Alpha=0,05

- Puissance=0,90

- Formulation unilatérale,

Le nombre de patients présentant un effet indésirable avec diminution de posologie doit être au moins de 33.

1/3 des patients présenteront cette toxicité, ainsi, avec 5% de perdus de vue NSN=104 par groupe de traitement.

Nombre de patients / observations à recruter / mois / centre ((NP/DUR)/NC)*(2 chiffres + justification si plus de 2 patients/mois/centre)*

01 patient à inclure par mois et par centre

Nombre attendu de patients éligibles dans les centres

Nom, Prénom	Ville, Pays	Recrutement attendu par mois	Total
DUTRIAUX Caroline	Bordeaux	2,9	70
DEVAUX Suzanne	Bayonne	0,33	8
BEDANE Christophe	Limoges	0,92	22
DEREURE Olivier	Montpellier	1,66	40
STOEBNER Pierre	Nîmes	0,83	20
JOUARY Thomas	Pau	0,5	12
HAINAUT Ewa	Poitiers	1,42	34
OSDOIT-MEDART Sophie	La Réunion	0,33	8
MEYER Nicolas	Toulouse	2,9	70
TOTAL			284 patients

Participation d'un réseau de recherche

(Préciser, maximum 32 mots)

Cancéropole Grand Sud-Ouest

Participation de partenaires industriels

(Préciser, maximum 64 mots)

Autres éléments garantissant la faisabilité du projet

(Préciser, maximum 64 mots)

- expertise reconnue du service de Pharmacologie du CHU de Bordeaux dans le dosage et l'interprétation pharmacocinétique des thérapies ciblées en oncologie.

- forte implication du service de Dermatologie du CHU de Bordeaux en recherche sur les traitements du mélanome.

Ces services ont travaillé ensemble et en concertation avec les centres associés et les services de biologie des tumeurs de Bordeaux et Toulouse pour élaborer ce projet.

Bénéfices attendus pour le patient et/ou pour la santé publique

(Préciser, maximum 320 mots)

Ce projet s'inscrit dans une démarche de rationalisation et d'optimisation des soins.

La détermination de seuils de toxicité de chacune des bithérapies BRAFi+MEKi aurait un impact majeur sur la prise en charge clinique en permettant d'ajuster précocement le traitement afin de minimiser la toxicité et de maximiser l'efficacité de ces traitements innovants dans une pathologie gravissime.

L'attitude actuelle consiste à prescrire une dose fixe avec adaptation de dose en fonction de la survenue d'effets indésirables. Cette stratégie expose plus de 30% des patients à des effets indésirables graves de grade 3 et 4. Une adaptation de posologie plus précoce, d'après les dosages plasmatiques, permettrait de réduire significativement la survenue de tels événements chez des patients dont l'espérance de vie est limitée. De nouvelles recommandations sur le suivi thérapeutique pharmacologique de la bithérapie BRAFi+MEKi pourraient être élaborées.

De même, la détermination de la concentration plasmatique efficace de la bithérapie BRAFi+MEKi aurait un impact majeur sur la prise en charge des patients, en maximisant les chances de succès, et en proposant au patient une posologie lui permettant d'atteindre une concentration efficace sans dépasser la concentration toxique.

De plus, la recherche à titre exploratoire d'une possible association entre concentration plasmatique de BRAFi+MEKi et concentration d'ADN circulant muté BRAF, pourrait mettre en évidence l'importance de leur suivi combiné comme marqueur d'efficacité.

Outre les bénéfices importants pour les patients, ce travail pourrait avoir des retombées favorables en santé publique en termes de réduction de coût.

En effet, en diminuant la survenue d'effets indésirables chez les patients traités, l'adaptation de posologie entraînerait une réduction des coûts liés à la prise en charge de ces effets indésirables.

BIBLIOGRAPHIE

*Merci de joindre 5 articles maximum justifiant l'intérêt du projet
au niveau national / international.*

1- Larkin, J., *et al.* Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutated Melanoma. N Engl J Med 2014 ; **371** : 1867-76.

2- Long, G., *et al.* Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma : a multicentric double-blind, phase 3 randomised controlled trial. Lancet 2015 ; **386** : 444-51

3- Widmer, N., *et al.* Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two--targeted therapies Eur J Cancer 2014; **50**: 2020-36.

4- Funck-Brentano, E., *et al.* Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600mut melanoma patients: impact on tumour response and tolerance. Ann Oncol 2015; **26**:1466-75.

5- Kramkimel, N., *et al.* Vemurafenib pharmacokinetics and its correlation with efficacy and safety in outpatients with advanced BRAF-mutated melanoma. Targ Oncol 2016; **11**: 59-69.

NIVEAU APPROXIMATIF DE FINANCEMENT DEMANDE

[GIRCI SOOM, maximum par projet : 300 k€]

(en k euros)

261

DONT CO-FINANCEMENT :

MOTS CLES

Domaine du coordinateur : Pharmacologie

Domaine du rapporteur suggéré : Pharmacologie ; onco-dermatologie

COMMENTAIRES DES EXPERTS ⁽⁶⁾

(citer)

Expert scientifique 1 :

1- « L'étude d'E. Funck-Brentano et al. (2015, citée par la lettre d'intention) a déjà étudié les relations entre les concentrations plasmatiques de vemurafenib et ses effets thérapeutiques et indésirables dans le mélanome métastatique.

2- Il n'est pas décrit comment se fera, pour un patient donné, le choix entre l'administration de dabrafenib et celle de vemurafenib. Chaque centre recruteur choisira-t-il un des deux inhibiteurs ?

3- Quelle est la proportion de patients attendue pour le traitement par bithérapie ?

4- D'autres traitements sont en développement dans le mélanome métastatique, comme les anticorps anti-PD-1 et anti-PD-L1, dont certains sont en phase III. L'arrivée de ces nouveaux traitements risque de créer une concurrence en termes de recrutement. »

Expert scientifique 2 :

5- « A noter que ce travail a déjà été publié par une autre équipe française chez 59 patients traités par vemurafenib (Kramkimel 2015).

6- Actuellement, le traitement de 1^{ère} ligne du mélanome métastatique avec mutation BRAF est une bithérapie associant un BRAFi et un MEKi. Le projet doit être réécrit en tenant compte des bithérapies BRAFi+MEKi. Dans cette situation, les effets secondaires des MEKi sont aussi potentiellement sévères (cardiomyopathie, rétinite) et mériteraient d'être reliés à une concentration plasmatique. Le dosage des 4 drogues paraît donc indispensable.

7- Le projet repose sur les modifications de posologie entraînées par les effets secondaires des BRAFi. Or l'auteur ne présente pas de grille de ces effets secondaires. Il conviendrait d'harmoniser entre les différents centres co-investigateurs les règles de modifications posologiques.

8- La méthode de dosage prévue par l'auteur : UPLC MS/MS (Ultra Performance Liquid Chromatography couplée à la spectrométrie de masse en tandem) doit être mise au point. »

Expert méthodologiste

9- « La critique majeure est la non prise en compte d'au moins un facteur majeur dans l'analyse de l'objectif principal : le traitement en mono ou bithérapie.

10- Il aurait été préférable que l'analyse de l'objectif principal repose sur la détermination de l'aire sous la courbe ROC plutôt que sur des comparaisons de moyennes. Cela aurait permis de quantifier le pouvoir discriminant de la concentration plasmatique en BRAF-inhibiteur sur la survenue d'EI.

11- Il est impossible de calculer le nombre de sujets à partir des informations fournies dans le paragraphe 9.1 car la fréquence attendue des EI n'est pas précisée ».

ET REPONSES CORRESPONDANTES (6)

(maximum 320 mots)

Commentaires 3, 6, 9 :

Le projet révisé inclut uniquement des patients sous bithérapie, désormais gold standard. La recherche de seuil s'effectuera donc sur l'association BRAFi+MEKi avec dosage des 4 molécules.

Commentaires 1, 5 :

Le projet révisé n'entre pas en concurrence avec les travaux déjà publiés, mais s'inscrit plutôt dans la complémentarité, puisque nous souhaitons étudier les bithérapies et non la monothérapie par vemurafenib.

Commentaire 2 :

Afin de se rapprocher au plus près des conditions réelles de soin, le choix du traitement sera laissé à l'appréciation du médecin.

Commentaire 4 :

La concurrence en termes de recrutement a été anticipée par la réalisation d'enquêtes de faisabilité auprès des centres, demandant de préciser le nombre de patients éligibles par an, en tenant compte des études concurrentes.

Commentaire 7 :

Compte tenu du nombre de mots limités dans la lettre d'intention (LI) ces recommandations ne sont pas détaillées, mais le seront dans le dossier complet de sorte à harmoniser les règles de modifications posologiques sachant que pour les 2 bithérapies étudiées, les RCP des médicaments répertorient les effets indésirables amenant à diminuer la posologie.

Commentaire 8 :

Un an s'étant écoulé depuis le dernier dépôt, les méthodes de dosage des 4 molécules sont désormais au point et validées (article soumis pour publication).

Commentaire 10 :

L'objectif principal et le NSN ont été revus en fonction de cette remarque. L'hypothèse utilisée ($AUC_{\text{observée}} > 0,70$) est celle qui a servi à déterminer le seuil d'efficacité d'imatinib (Picard, S. *et al.* Blood 2007).

Commentaire 11 :

Nous espérons avoir répondu à cette remarque dans la présente LI.

Remarque : Le projet BRACKET 2015 comportait 10 centres, dont La Martinique et La Rochelle. Ces 2 centres n'ont pas répondu à l'enquête de faisabilité à ce jour, c'est pourquoi ils ne sont pas mentionnés dans la LI. Le CHU de Poitiers a intégré le projet 2016 du fait du nouveau découpage interrégional.

**BRAF-inhibiteurs/MEK-inhibiteurs : détermination des seuils plasmatiques
d'Efficacité et de Toxicité dans le mélanome métastatique.**

BRACKET

Code : CHUBX 2016/XX

PROTOCOLE DE RECHERCHE NON INTERVENTIONNELLE

Version n° 2.0 du 16/09/2016

Cette recherche a obtenu le financement du

Gestionnaire :

Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux
12 rue Dubernat
33 400 Talence
FRANCE

Personne qui dirige et surveille la recherche :

Dr Marine ROUSSET
Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie
Hôpital Pellegrin
Place Amélie Raba Léon
33076 Bordeaux Cedex
Tel : 05 56 79 59 91
Fax : 05 56 79 47 95
Courriel : marine.rousset@chu-bordeaux.fr

Centre de Méthodologie et de Gestion des données :

Pr Mathieu MOLIMARD
Service Hospitalo-Universitaire de Pharmacologie Médicale
CHU de Bordeaux
Tel : 05 57 57 15 60
Courriel : mathieu.molimard@chu-bordeaux.fr

**Ce protocole a été conçu et rédigé à partir de la version 2.0 du 01/09/2011
du protocole-type de la DIRC Sud-Ouest Outre-Mer**

HISTORIQUE DES MISES A JOUR DU PROTOCOLE

VERSION	DATE	RAISON DE LA MISE A JOUR
1.0	14/09/2015	Version initiale déposée à l'appel à projet PHRC-I 2015
2.0	16/09/2016	Version déposée à l'appel à projet PHRC-I 2016

Page de signature du protocole

**BRAF-inhibiteurs/MEK-inhibiteurs : détermination des seuils plasmatiques
d'Efficacité et de Toxicité dans le mélanome métastatique.**

BRaCKET

Code : CHUBX 2016/XX

Gestionnaire

Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux
12, rue Dubernat
33400 Talence

à Bordeaux, le : *date*

Le Directeur Général du CHU de Bordeaux
P. VIGOUROUX
Par délégation, le Directeur de la
Recherche Clinique et de l'Innovation,
J. MARTINEZ

Personne qui dirige et surveille la recherche

Dr Marine ROUSSET
Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie
CHU de Bordeaux
Tel : 05 56 79 59 91
Fax : 05 56 79 47 95
Courriel : marine.rousset@chu-bordeaux.fr

à Bordeaux, le : *date*

Dr Marine ROUSSET

Signature

Personne qui réalise la recherche

Dr Marine ROUSSET
Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie
CHU de Bordeaux
Tel : 05 56 79 59 91
Fax : 05 56 79 47 95
Courriel : marine.rousset@chu-bordeaux.fr

Dr Marine ROUSSET

Signature

SOMMAIRE

1. RESUME DE LA RECHERCHE	7
2. JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE	10
2.1. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES	10
2.1.1. <i>Sur le mélanome</i>	10
2.1.2. <i>Sur les traitements du mélanome métastatique</i>	10
2.1.3. <i>Sur les relations Pharmacocinetique / Pharmacodynamie des BRAFi et MEKi</i>	12
2.2. HYPOTHESES DE LA RECHERCHE	13
2.3. JUSTIFICATION DES CHOIX METHODOLOGIQUES	13
2.4. RETOMBES ATTENDUES	14
3. OBJECTIFS	14
3.1. OBJECTIF PRINCIPAL	14
3.2. OBJECTIFS SECONDAIRES	14
4. CONCEPTION DE LA RECHERCHE	14
5. CRITERES D'ELIGIBILITE	15
5.1. CRITERES D'INCLUSION	15
5.2. CRITERES DE NON INCLUSION	15
5.3. FAISABILITE ET MODALITES D'IDENTIFICATION DES PATIENTS	15
5.3.1. <i>Faisabilité de l'étude</i>	15
5.3.2. <i>Modalités d'identification des patients</i>	16
6. CRITERES D'EVALUATION	16
6.1. CRITERES D'EVALUATION PRINCIPAUX	16
6.2. CRITERES D'EVALUATION SECONDAIRES	16
7. DEROULEMENT DE LA RECHERCHE	17
7.1. CALENDRIER DE LA RECHERCHE	17
7.2. TABLEAU RECAPITULATIF DU SUIVI PARTICIPANT	17
7.3. INFORMATION DES PERSONNES CONCERNEES	18
7.4. DEROULEMENT DE LA RECHERCHE	18
7.5. CIRCUIT DES ECHANTILLONS	19
8. ASPECTS STATISTIQUES	19
8.1. CALCUL DE LA TAILLE D'ETUDE	19
8.2. METHODES STATISTIQUES EMPLOYEES	19
9. DROITS D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCE	20
9.1. ACCES AUX DONNEES	20
9.2. DONNEES SOURCES	21
9.3. CONFIDENTIALITE DES DONNEES	21
10. CONTROLE ET ASSURANCE DE LA QUALITE	21
10.1. CONSIGNES POUR LE RECUEIL DES DONNEES	21
10.2. SUIVI DE LA RECHERCHE	21
10.3. CONTROLE DE QUALITE	22
10.4. GESTION DES DONNEES	22
10.4.1. <i>Modalités de saisie</i>	22
10.4.2. <i>Contrôle qualité des données</i>	22

10.4.3. Gel de base	22
10.5. AUDIT ET INSPECTION	22
11. CONSIDERATIONS ETHIQUES ET REGLEMENTAIRES	22
11.1. CONFORMITE AUX TEXTES DE REFERENCE	22
11.2. AMENDEMENT AU PROTOCOLE	23
12. CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE	23
13. REGLES RELATIVES A LA PUBLICATION	23
13.1. COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	23
13.2. COMMUNICATION DES RESULTATS AUX PARTICIPANTS	23
13.3. CESSIION DES DONNEES	23
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	24

LISTE DES ABBREVIATIONS

AUC : Area under the curve/aire sous la courbe

BRAF : La protéine BRAF est une protéine kinase de la famille Raf qui régule les protéines de la voie des MAPK kinases aussi appelée RAS-RAF-MEK-ERK. C'est une voie de signalisation intracellulaire qui joue un rôle important dans la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de la migration cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse.

CMG : Centre de Méthodologie et de Gestion des données

CTC-AE : Common Terminology Criteria for Adverse Events. C'est une terminologie descriptive utilisée pour la déclaration des événements indésirables. Une échelle de grade (ou sévérité) est fournie pour chaque terme.

CYP 3A4 : isoforme 3A4 du cytochrome P450

CYP 2C8 : isoforme 2C8 du cytochrome P450

ECOG Performance Status : score développé par l'Eastern Cooperative Oncology Group permettant d'évaluer l'état de santé général et les activités du quotidien effectuées par des patients atteints de cancer.

EI : Effet Indésirable

EIG : Effet indésirable grave

EMA : European Medicine Agency

FDA : Food and Drug Administration

MEK : La protéine kinase MEK fait référence à la voie de signalisation des MAPK kinases aussi appelée RAS-RAF-MEK-ERK. C'est une voie de signalisation intracellulaire qui joue un rôle important dans la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de la migration cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse.

N.A : Non applicable

OS : Overall survival/survie globale

PFS : Progression Free Survival/survie sans progression

RCP : Résumé des caractéristiques du produit

RECIST : Response Evaluation Criteria In Solid Tumors. Critères d'évaluation de la réponse tumorale

ROC : Receiver Operating Characteristic. La courbe ROC est un outil d'évaluation et de comparaison de modèles

SOOM : Sud-Ouest Outre-Mer

UPLC MS/MS : Ultra Performance Liquid Chromatography couplée à la spectrométrie de masse en tandem

1. RESUME DE LA RECHERCHE

GESTIONNAIRE	CHU de Bordeaux
PERSONNE QUI DIRIGE ET SURVEILLE LA RECHERCHE	Dr Marine ROUSSET Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie Hôpital Pellegrin Place Amélie Raba Léon 33076 Bordeaux Cedex 05.56.79.59.91
TITRE	BRACKET BRAF-inhibiteurs/MEK-inhibiteurs : détermination des seuils plasmatiques d'Efficacité et de Toxicité dans le mélanome métastatique.
VERSION DU PROTOCOLE	2.0 du 16/09/2016
JUSTIFICATION / CONTEXTE	Les BRAF-inhibiteurs (BRAFi) et MEK-inhibiteurs (MEKi) sont prescrits en bithérapie en première intention dans le traitement du mélanome métastatique muté, à dose unique pour tous les patients. Il existe deux associations sur le marché : vemurafenib+cobimetinib et dabrafenib+trametinib. Les études pharmacologiques montrent une grande variabilité interindividuelle de la cinétique des BRAFi (vemurafenib et dabrafenib) et des MEKi (trametinib et cobimetinib). Ces variations pourraient avoir un retentissement sur le plan clinique et thérapeutique. Une surexposition aux BRAFi et MEKi pourrait expliquer la survenue d'une toxicité sévère alors qu'inversement, une exposition « sous-optimale » aux traitements pourrait réduire leur efficacité.
OBJECTIFS	<u>Objectif principal :</u> Déterminer les seuils de concentrations plasmatiques de chacune des bithérapies BRAFi+MEKi (mesurées à la première visite de suivi du traitement) associés à la survenue d'effets indésirables graves (au cours des 3 premiers mois) chez des patients atteints de mélanome métastatique <u>Objectifs secondaires :</u> - Etudier l'association entre les concentrations plasmatiques de chacune des bithérapies BRAFi+MEKi (mesurées à la première visite de suivi du traitement) et la survie sans progression à 12 mois - Etudier l'association entre les concentrations plasmatiques de chacune des bithérapies BRAFi+MEKi (mesurées à la première visite de suivi du traitement) et l'évolution de la concentration d'ADN circulant muté BRAF V600 mesurée à la visite d'initiation du traitement (V1), à la première visite de suivi (V2), à 3 mois (M3), et à 6 mois (M6)

SCHEMA DE LA RECHERCHE	Recherche non interventionnelle, multicentrique, menée chez des patients atteints de mélanome métastatique avec indication d'une première mise sous traitement par BRAFi+MEKi
CRITERES D'INCLUSION	- Patient âgé de plus de 18 ans - Patient atteint de mélanome métastatique muté BRAF V600 initiant un traitement par bithérapie BRAFi+MEKi - Accord de participation à l'étude
CRITERES DE NON INCLUSION	- Patient dont la survie est estimée à moins de 3 mois - Traitement antérieur par BRAFi et/ou MEKi
CRITERES D'EVALUATION	<u>Critères d'évaluation principaux :</u> - Concentrations plasmatiques résiduelles de BRAFi+MEKi mesurées à la première visite de suivi (après au moins 8 jours de traitement continu par vemurafenib+cobimetinib et au moins 15 jours de traitement continu par dabrafenib+trametinib) La mesure de ce critère se fera par méthode LC-MS/MS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem) mise au point et validée selon les critères de l'EMA et de la FDA. - Survenue d'effet indésirable grave (EIG) dans les 3 premiers mois de traitement - o L'EIG étant défini par tout EI attribuable au traitement, de grade 3 ou 4 (classification CTC-AE) ou ayant nécessité une diminution de posologie d'au moins 25%. <u>Critères d'évaluation secondaires :</u> - Concentrations plasmatiques résiduelles de BRAFi+MEKi mesurées à la première visite de suivi - Survie sans progression à 12 mois, évaluée selon les critères RECIST 1.1 - Concentrations d'ADN circulant muté BRAF V600 à V1, V2, M3, M6 mesurées par PCR digitale (QX200 Biorad) à l'aide du kit Biorad : ddPCR™ BRAF V600 Screening Kit.
TAILLE D'ETUDE	208 patients : - un bras de 104 patients traités par vemurafenib + cobimetinib - un bras de 104 patients traités par dabrafenib + trametinib
NOMBRE PREVU DE CENTRES	9 centres de l'inter-région sud-ouest outre-mer
DUREE DE LA RECHERCHE	- Durée de la période d'inclusion : 24 mois - Durée de suivi par participant : 12 mois - Dernier patient dernière visite : 36 mois - Remise du rapport final : 48 mois
ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES	<u>Nombre de sujets nécessaires :</u> Il s'agit d'une comparaison d'aires sous la courbe ROC (AUC ROC : Receiving Operationg Characteristics). La méthode de Hajian-Tilaki

	(2013) permet le calcul du nombre de sujets nécessaires lors de comparaison d'AUC ROC observée versus théorique (1). Pour une bonne discrimination par rapport à la diagonale et permettre la détermination du seuil de toxicité on fait l'hypothèse suivante : - H_1 : $AUC_{ROC_{observée}} > 0,70$ (AUC théorique). Le seuil de 0,7 est choisi en prenant pour référence la recherche de seuil de l'imatinib (2). Avec : - Alpha = 0,05 - Puissance = 0,90 - Formulation unilatérale Le nombre de patients présentant un effet indésirable grave doit être au moins de 33. Etant donné qu'1/3 des patients présenteront cette toxicité, il faut 99 patients (3-5). En considérant 5% de perdus de vue, il faut inclure 104 patients par groupe de traitement. <u>Analyse statistique :</u> 1. <u>Objectif principal :</u> - Détermination des seuils de concentration plasmatique associés à la toxicité pour chacune des associations BRAFi+MEKi à l'aide de l'AUC de la courbe ROC 2. <u>Objectifs secondaires :</u> - Détermination des seuils de concentration plasmatique associés à l'efficacité pour chacune des associations BRAFi+MEKi à l'aide de l'AUC de la courbe ROC - Etude exploratoire de la relation « concentration plasmatique/variation de la concentration d'ADN circulant muté BRAF » à l'aide d'un modèle de régression linéaire avec données répétées
RETOMBÉES ATTENDUES	La détermination de seuils de toxicité de chacune des bithérapies BRAFi+MEKi aurait un impact majeur sur la prise en charge clinique en permettant d'ajuster précocement le traitement afin de minimiser la toxicité et d'optimiser l'efficacité de ces traitements innovants dans une pathologie gravissime. Les résultats de ce travail pourraient faire évoluer les recommandations de prise en charge du mélanome métastatique. Par ailleurs l'étude exploratoire sur l'ADN circulant muté permettra d'améliorer les connaissances sur l'association entre concentration plasmatique en médicament et ADN circulant muté, cela pourrait mettre en évidence l'importance de leur suivi combiné comme marqueur d'efficacité. Outre les bénéfices importants pour les patients, ce travail pourrait avoir des retombées favorables en santé publique en termes de réduction de coût. En diminuant la survenue d'effets indésirables, l'adaptation de posologie entraînerait une réduction des coûts liés à la prise en charge de ces effets indésirables.

2. JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE

Depuis 2004 en France, la principale cause de décès est le cancer, tous cancers confondus.

Avec 11 176 nouveaux cas estimés en France en 2012, le mélanome cutané se situe au 9^{ème} rang des cancers. C'est le cancer dermatologique le plus agressif et, au stade métastatique, la survie globale médiane est de 6 à 12 mois. Le traitement par chimiothérapie et biothérapie du mélanome métastatique a un taux de réponse de seulement 20% (6).

La découverte de cibles thérapeutiques telles que les protéines kinases et la compréhension des mutations génétiques du mélanome ont permis le développement de nouvelles thérapies ciblées. Parmi celles-ci le vemurafenib et le dabrafenib : BRAF-inhibiteurs (BRAFi) associés respectivement au cobimetinib et au trametinib, deux MEK-inhibiteurs (MEKi) ont montré une augmentation de la survie sans progression et de la survie globale dans le traitement du mélanome métastatique. Ces traitements ont obtenu leurs Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) dans cette indication entre 2012 et 2016. Ils sont prescrits à posologie unique pour tous les patients.

2.1. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

2.1.1. SUR LE MELANOME

Le mélanome cutané est un cancer fréquent, dont l'incidence est en augmentation régulière de 10 % par an depuis 50 ans. C'est le premier des cancers en termes d'augmentation de fréquence. Il se situe au 11^{ème} rang des cancers les plus fréquents chez l'homme et au 9^{ème} rang chez la femme. L'âge moyen au diagnostic est de 56 ans (6). La mutation BRAF est présente dans 50% des mélanomes (7).

Les principaux facteurs de risque du mélanome cutané sont les caractéristiques physiques (peau claire, cheveux roux ou blonds, yeux clairs, nombreuses éphélides, sensibilité particulière au soleil, nombre élevé de nævi), les facteurs environnementaux et/ou comportementaux liés à l'exposition solaire et aux ultraviolets artificiels, les antécédents personnels de cancers cutanés ou familiaux de mélanome et l'immunodépression.

Pour les formes métastatiques, peu de traitements avaient jusque récemment fait la preuve de leur efficacité et la survie globale médiane était de 6 à 12 mois (8-10). Au cours des dernières années, des avancées majeures dans le traitement du mélanome métastatique ont permis de disposer d'un plus grand nombre d'options thérapeutiques.

2.1.2. SUR LES TRAITEMENTS DU MELANOME METASTATIQUE

Ces dernières années ont été marquées par l'introduction dans l'arsenal thérapeutique du mélanome métastatique des inhibiteurs de protéine kinase (BRAF et MEK inhibiteurs) et de l'immunothérapie (anticorps anti-PDL1 anti-PD1) avec un bénéfice significatif sur la survie des patients. Le traitement de première ligne du mélanome métastatique muté consiste en une association d'un BRAF inhibiteur (BRAFi) et un MEK inhibiteur (MEKi). La mutation du gène BRAF est présente dans 50 à 60 % des mélanomes, induisant l'activation constitutive de la voie des MAPK-kinases (autrement appelée RAS-RAF-MEK-ERK) (8). Cette voie de signalisation intracellulaire joue un rôle important dans la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de la migration cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse.

Les BRAFi et MEKi sont des molécules de bas poids moléculaire administrées par voie orale, inhibant respectivement les formes activées de l'enzyme sérine-thréonine kinase BRAF et l'activation du signal régulé par MEK 1 et 2 de la voie des MAPK.

Il existe deux associations sur le marché: vemurafenib+cobimetinib ou dabrafenib+trametinib. Ces bithérapies ont montré des avantages en terme d'amélioration de la survie sans progression (PFS) et de la survie globale (OS).

L'essai de phase 3 CoBRIM comparant l'effet d'un traitement par vemurafenib+cobimetinib à celui par vemurafenib seul chez 1049 patients atteints de mélanome muté a montré une amélioration de la PFS sous bithérapie : 9.9 mois versus 6.2 mois pour le vemurafenib seul (3). Dans de précédentes études, la PFS était de 5.3 mois pour le vemurafenib seul et de 1.6 mois avec la dacarbazine (ancien traitement de référence dans cette indication) (9, 11).

L'essai de phase III comparant l'effet d'un traitement par dabrafenib+trametinib à celui par dabrafenib seul chez 947 patients atteints de mélanome muté a montré une PFS de 11 mois sous bithérapie versus 8.8 mois pour le dabrafenib seul (5). Auparavant, l'essai clinique international de phase III « BREAK-3 » comparant le traitement par dabrafenib seul à celui par dacarbazine avait montré une PFS de 5.1 mois versus 2.7 mois pour la dacarbazine (8).

Les résultats de l'étude de Robert *et al.* comparant la bithérapie par dabrafenib+trametinib au traitement par vemurafenib seul sont comparables à ceux observés dans l'essai de Long *et al.*, la PFS est de 11.4 mois sous bithérapie et de 7.3 mois sous vemurafenib seul (12).

La fréquence élevée de survenue d'effets indésirables observés en cas de bithérapie par vemurafenib+cobimetinib est comparable à celle observée lors d'un traitement par vemurafenib seul (respectivement 95% et 96%) (4). Pour la bithérapie dabrafenib+trametinib, la fréquence est également élevée et comparable à celle observée lors d'un traitement par dabrafenib seul ou vemurafenib seul (respectivement 89%, 90% et 98%) (5, 12).

Les fréquences élevées des EI de grade 3 ou 4 (CTC-AE) sont de 32% pour la bithérapie dabrafenib+trametinib versus 31% pour la monothérapie par dabrafenib, et de 65% pour la bithérapie vemurafenib+cobimetinib versus 59% pour la monothérapie par vemurafenib dans les essais de phase 3 correspondants (3-5). Il surviennent essentiellement dans les 3 premiers mois et nécessitent une ou des adaptations de posologie successives.

Lors du traitement par l'association vemurafenib+cobimetinib les effets indésirables plus fréquemment observés que dans le groupe recevant vemurafenib seul ont été les suivants: diarrhées (57% contre 28%), nausées (39% contre 24%), photosensibilité (28% contre 16%), anomalies biologiques hépatiques (élévation du taux d'alanine aminotransférase [24% contre 18%], élévation du taux d'aspartate aminotransférase [22% contre 13%]), élévation du taux de créatine phosphokinase (30% contre 3%) et vomissements (21% contre 12%). Les effets indésirables observés moins fréquemment dans le groupe recevant l'association ont été la chute des cheveux (14% contre 29%), l'épaississement de l'épiderme (10% contre 29%) et les douleurs articulaires (33% contre 40%).

En pratique clinique, si des toxicités liées aux bithérapies BRAFi + MEKi surviennent, les doses de l'un ou l'autre ou les deux traitements doivent être réduites, interrompues ou arrêtées en fonction de la gravité de l'événement comme décrit dans le tableau suivant (extrait du résumé des caractéristiques du produit (RCP) de ces traitements) :

Grade (CTC-AE)*	Recommandations de modifications de posologie
Grade 1 ou Grade 2 (Tolérable)	Maintien de la dose et surveillance clinique appropriée.
Grade 2 (Intolérable) ou Grade 3	Interruption du traitement jusqu'au retour à la normale ou à une toxicité de Grade 1 et reprise du traitement à une dose réduite d'un palier
Grade 4	Arrêt définitif ou interruption du traitement jusqu'au retour à la normale ou à un Grade 1 et reprise du traitement à une dose réduite d'un palier
*L'intensité des événements indésirables cliniques est cotée selon les critères communs de terminologie pour les événements indésirables (Common Terminology Criteria for Adverse Events ; CTC-AE) v4.0.	

Les paliers de réduction de dose sont décrits dans ce tableau :

Paliers de dose	Vemurafenib	Cobimetinib	Dabrafenib	Trametinib
Dose initiale	960 mg 2 fois par jour.	60 mg 1 fois par jour	150 mg 2 fois par jour	2 mg 1 fois par jour
1 ^{ère} réduction de dose	720 mg 2 fois par jour.	40 mg 1 fois par jour.	100 mg 2 fois par jour	1,5 mg 1 fois par jour
2 ^{ème} réduction de dose	480 mg 2 fois par jour.	20 mg 1 fois par jour.	75 mg 2 fois par jour	1 mg 1 fois par jour
3 ^{ème} réduction de dose	N.A	N.A	50 mg 2 fois par jour	1 mg 1 fois par jour

En règle générale les 2 traitements de l'association doivent être arrêtés transitoirement et repris à posologie diminuée d'un palier. Cependant certains effets indésirables sont spécifiques des BRAFi ou des MEKi : une rétinopathie ou une diminution de la fraction d'éjection du ventricule gauche sont plus fréquemment associée à un MEKi tandis que la fièvre est plus souvent attribuée à un BRAFi.

Ainsi, les RCP de ces traitements mentionnent quelle molécule arrêter ou diminuer en fonction du type d'effet indésirable, comme résumé dans le tableau ci-dessous :

Type d'effet indésirable	Médicament dont il faut diminuer la posologie
Pyrexie	Dabrafenib
Uvéite	Dabrafenib
Allongement du QT	BRAFi (Dabrafenib ou Vemurafenib)
Réduction de la fraction d'éjection du ventricule gauche	MEKi (Trametinib ou Cobimetinib)
Maladie pulmonaire interstitielle / pneumopathie	Trametinib
Occlusion de la veine rétinienne ou décollement de rétine	Trametinib
Eruption cutanée acnéiforme de grade 2 (intolérable) ou grade ≥ 3	Cobimetinib
Eruption cutanée non acnéiforme ou maculo-papuleuse de grade 2 (intolérable) ou grade ≥ 3	Vemurafenib
Anomalie du bilan hépatique de grade 3	Vemurafenib
Photosensibilité de grade 2 (intolérable) ou de grade ≥ 3	Arrêt du traitement par vemurafenib+cobimetinib jusqu'à résolution à un grade ≤ 1 puis reprise du vemurafenib à dose diminuée d'un palier et du cobimetinib à pleine dose

2.1.3. SUR LES RELATIONS PHARMACOCINETIQUE / PHARMACODYNAMIE DES BRAFi ET MEKi

La recherche de dose des BRAFi et MEKi a été conçue de manière à obtenir une posologie unique pour tous les patients. Or les BRAFi et MEKi sont métabolisés par le cytochrome P450, principalement les CYP 3A4 et CYP2C8, à l'origine d'une grande variabilité inter-individuelle des concentrations plasmatiques pour une même posologie (13-15). Des études portant sur de faibles effectifs de patients traités par vemurafenib ont montré une grande variabilité des concentrations plasmatiques (de 8 à 115 µg/ml) pour une même dose (16-20). Les concentrations plasmatiques de dabrafenib sont augmentées en présence d'inhibiteurs des CYP 3A4 et CYP2C8 et le RCP préconise d'éviter un traitement concomitant par inducteur enzymatique (21). Une faible diminution de la biodisponibilité du trametinib a été estimée lorsqu'il est administré en association au dabrafenib, inducteur du CYP3A4, sur la base d'une analyse pharmacocinétique de population (RCP). Des études de modélisation des concentrations plasmatiques du cobimetinib en présence d'inhibiteur ou inducteur du CYP3A4 (tel que le vemurafenib) ont montré des résultats discordants. Dans l'étude de Han *et al.* l'ajout d'un inducteur du CYP3A4 n'a pas modifié significativement la concentration plasmatique du cobimetinib, cependant l'effectif d'étude est petit. En revanche l'étude de Budha *et al.* met en évidence une diminution de la concentration plasmatique du cobimetinib en présence d'inducteur du CYP3A4 (22, 23). Ces variations cinétiques pourraient être à l'origine de la variabilité de la réponse au traitement et des toxicités. Une surexposition aux BRAFi et MEKi pourrait expliquer la survenue de toxicité sévère, inversement une exposition « sous-optimale » pourrait réduire leur efficacité, comme cela a déjà été montré pour le vemurafenib utilisé en monothérapie. Une valeur de concentration plasmatique de vemurafenib inférieure à 40, 4 ng/ml à l'état d'équilibre des concentrations serait associée à une plus courte PFS (16, 18). Un tel seuil d'efficacité n'a pas été défini pour le dabrafenib en monothérapie. Les traitements sont maintenant utilisés en bithérapie associant BRAFi et MEKi. Aucun seuil de toxicité n'a été publié pour ces associations malgré la fréquente survenue d'effets indésirables et leur gravité.

2.2. HYPOTHESES DE LA RECHERCHE

Plusieurs études ont montré que la toxicité et l'efficacité des inhibiteurs de kinase étaient associées à leur concentration plasmatique plutôt qu'à la dose administrée, y compris dans le traitement du mélanome. Une zone thérapeutique de 40 à 100 µg/ml semble se dessiner pour le vemurafenib en monothérapie (16, 18-20).

Les traitements sont maintenant utilisés en bithérapie associant BRAFi et MEKi. Cependant aucun seuil de toxicité n'est connu pour ces associations.

L'hypothèse de recherche est la suivante : la variabilité inter-individuelle des concentrations plasmatiques de BRAFi et MEKi pourrait avoir un retentissement sur le plan clinique et thérapeutique. Une concentration élevée pourrait entraîner la survenue d'effets indésirables, à l'inverse une concentration « sous-optimale » pourrait réduire l'efficacité du traitement.

Déterminer les seuils de concentration plasmatique de toxicité et d'efficacité des bithérapies BRAFi+MEKi représente donc un enjeu majeur en oncologie.

Outre la recherche de seuils, cette étude vise à explorer le lien entre concentration plasmatique des bithérapies BRAFi+MEKi et concentration en ADN circulant muté, non exploré à ce jour. Plusieurs études ont mis en évidence une association entre taux basal d'ADN circulant muté BRAF V600 et potentielle efficacité d'un traitement par BRAFi (24, 25). La variation de la concentration de ce marqueur au cours du traitement n'a jamais été reliée à une concentration plasmatique en médicament.

Cette étude est un préliminaire indispensable à l'adaptation précoce des posologies des bithérapies BRAFi+MEKi, avant la survenue d'effet indésirable, tout en assurant l'efficacité du traitement. Ce travail pourrait amener à de nouvelles recommandations de suivi thérapeutique et d'adaptation posologique chez les patients atteints de mélanome métastatique.

2.3. JUSTIFICATION DES CHOIX METHODOLOGIQUES

L'objectif principal est de déterminer les seuils de concentrations plasmatiques de chacune des bithérapies BRAFi+MEKi (mesurées à la 1^{ère} visite de suivi) associés à la survenue d'effets indésirables graves (EIG) au cours des 3 premiers mois de traitement, chez des patients atteints de mélanome métastatique.

Le schéma d'étude mis en place est une étude non interventionnelle prospective, multicentrique.

La population d'étude est constituée de patients atteints de mélanome métastatique avec une mutation BRAF V600, indication pour laquelle les associations de BRAFi+MEKi ont reçu l'AMM. Les patients dont la survie estimée par l'investigateur est inférieure à 3 mois ne seront pas inclus dans cette étude car le critère de jugement principal (survenue d'EIG dans les 3 premiers mois de traitement) ne pourra pas être recueilli.

La toxicité des bithérapies BRAFi+MEKi sera évaluée par le recueil des EIG définis comme tout EI attribuable au traitement, de grade 3 ou 4 selon l'échelle CTC-AE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) ou ayant nécessité une diminution de posologie d'au moins 25%.

Le délai de 3 mois a été choisi car la majeure partie des EIG associés aux BRAFi+MEKi se manifeste en début de traitement comme cela est décrit dans la littérature et confirmé par l'expérience des médecins investigateurs (26).

Le tube de sang permettant de déterminer les concentrations plasmatiques de BRAFi et MEKi (mesures nécessaires pour évaluer l'objectif principal) sera prélevé à l'état d'équilibre des concentrations plasmatiques. Cet équilibre est atteint au bout de 4 demi-vies du médicament. Ainsi le prélèvement sera effectué au cours de la première visite de suivi du patient après minimum 8 jours de traitement continu par vemurafenib+cobimetinib ou 15 jours de traitement continu par dabrafenib+trametinib.

Le tube sera prélevé en « concentration résiduelle » c'est à dire juste avant la prochaine prise des médicaments. En effet il apparaît opportun de prélever en « résiduelle » pour pouvoir comparer les concentrations entre patients en s'affranchissant d'une inconnue qu'est le délai d'obtention du pic, celui-ci pouvant varier entre les patients (27). Les prélèvements auront donc lieu 12h +/-2h après la prise du BRAFi (qui est administré 2 fois par jour) et 24h +/-4h après la prise du MEKi (administré 1 fois par jour).

Un objectif secondaire de cette étude est de déterminer le seuil d'efficacité de BRAFi et MEKi. Comme décrit par Flaherty *et al.*, la PFS à 12 mois est un bon indicateur pour l'étude de l'efficacité d'un traitement du mélanome métastatique (28). L'avantage présenté par la PFS est son obtention rapide par rapport à la survie globale qui s'est allongée grâce à l'efficacité de ces traitements. La médiane de PFS étant de 9,9 mois avec le vemurafenib+cobimetinib et de 11 mois avec le dabrafenib+trametinib, nous évaluerons l'efficacité du traitement par la PFS à 12 mois (déterminée selon les critères RECIST 1.1) (3, 4, 29).

2.4. RETOMBÉES ATTENDUES

Ce projet s'inscrit dans une démarche de rationalisation et d'optimisation des soins.

La détermination de seuils de toxicité de chacune des bithérapies BRAFi+MEKi aurait un impact majeur sur la prise en charge clinique en permettant d'ajuster précocément le traitement afin de minimiser la toxicité et de maximiser l'efficacité de ces traitements innovants dans une pathologie gravissime.

L'attitude actuelle consiste à prescrire une dose fixe avec adaptation de dose en fonction de la survenue d'effets indésirables. Cette stratégie expose plus de 30% des patients à des effets indésirables graves de grade 3 et 4. Une adaptation de posologie plus précoce, d'après les dosages plasmatiques, permettrait de réduire significativement la survenue de tels événements chez des patients dont

l'espérance de vie est limitée. De nouvelles recommandations sur le suivi thérapeutique pharmacologique de la bithérapie BRAFi+MEKi pourraient être élaborées.

De même, la détermination de la concentration plasmatique efficace de la bithérapie BRAFi+MEKi aurait un impact majeur sur la prise en charge des patients en maximisant les chances de succès et en proposant au patient une posologie lui permettant d'atteindre une concentration efficace, sans dépasser la concentration toxique.

De plus, la recherche a titre exploratoire d'une possible association entre concentration plasmatique de BRAFi+MEKi et concentration d'ADN circulant muté, pourrait mettre en évidence l'importance de leur suivi combiné comme marqueurs d'efficacité.

Outre les bénéfices importants pour les patients, ce travail pourrait avoir des retombées favorables en santé publique en termes de réduction de coût.

En effet, en diminuant la survenue d'effets indésirables chez les patients traités, l'adaptation de posologie entraînerait une réduction des coûts liés à la prise en charge de ces effets indésirables. Par ailleurs, les adaptations de posologie selon la concentration plasmatique pourraient amener à diminuer les doses chez certains patients et ainsi réduire les coûts associés à ces traitements onéreux.

3. OBJECTIFS

OBJECTIF PRINCIPAL

Déterminer les seuils de concentrations plasmatiques de chacune des bithérapies BRAFi+MEKi (mesurées à la première visite de suivi du traitement) associés à la survenue d'effets indésirables graves (au cours des 3 premiers mois) chez des patients atteints de mélanome métastatique.

3.1. OBJECTIFS SECONDAIRES

- Etudier l'association entre les concentrations plasmatiques de chacune des bithérapies BRAFi+MEKi (mesurées à la première visite de suivi du traitement) et la survie sans progression à 12 mois
- Etudier l'association entre les concentrations plasmatiques de chacune des bithérapies BRAFi+MEKi (mesurées à la première visite de suivi du traitement) et l'évolution de la concentration d'ADN circulant muté BRAF V600 mesurée à la visite d'initiation du traitement (V1), à la première visite de suivi (V2), à 3mois (M3) et à 6mois (M6)

4. CONCEPTION DE LA RECHERCHE

Etude non interventionnelle prospective, multicentrique.

5. CRITERES D'ÉLIGIBILITE

CRITERES D'INCLUSION

- Patient âgé de plus de 18 ans
- Patient atteint de mélanome métastatique muté BRAF V600 initiant un traitement par bithérapie BRAFi+MEKi
- Accord de participation à l'étude (formulaire de consentement écrit spécifique pour le dosage d'ADN circulant muté BRAF pour les patients inclus à Bordeaux et Toulouse)

5.1. CRITERES DE NON INCLUSION

- Patient dont la survie est estimée à moins de 3 mois
- Traitement antérieur par BRAFi ou MEKi

5.2. FAISABILITE ET MODALITES D'IDENTIFICATION DES PATIENTS

5.2.1. FAISABILITE DE L'ETUDE

Le service de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Bordeaux, au sein duquel travaille le porteur de projet, possède une expertise reconnue dans le dosage et l'interprétation pharmacocinétique des thérapies ciblées en oncologie. Il est notamment à l'origine de la définition des seuils d'efficacité/toxicité de nombreuses molécules telles que l'imatinib, le pazopanib et le dasatinib. Le service de Pharmacologie et Toxicologie est donc rompu à la pratique d'études de recherche de seuil. Par ailleurs, le service de Dermatologie du CHU de Bordeaux est particulièrement impliqué dans la recherche sur les traitements du mélanome.

Ces services ont travaillé ensemble et en concertation avec les centres associés et les services de biologie des tumeurs de Bordeaux et Toulouse pour élaborer ce projet.

Au cours de cette étude, les échantillons de sang devront être conservés sur site pendant la durée de l'étude, avant envoi au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Bordeaux. Afin de garantir la capacité logistique des centres participants à l'étude, une enquête de faisabilité portant notamment sur le circuit et le stockage des échantillons biologiques a été réalisée. Les centres participants ont également été contactés par téléphone pour répondre à leurs éventuelles questions sur l'étude, et tous ont su montrer leur engouement pour ce projet.

L'enquête de faisabilité ainsi réalisée a également permis d'apprécier la capacité de recrutement de chaque centre et de vérifier que ces 9 centres permettraient le recrutement des 208 patients, nombre de sujets nécessaires pour garantir une puissance statistique suffisante. Le détail du recrutement par centre est fourni ci-après.

Les 9 centres sélectionnés font partie de l'Inter-Région Sud-Ouest Outre Mer. Le recrutement est inter-régional et tient compte du nouveau découpage des régions.

Les méthodes de dosage des BRAFi et MEKi ont été mises au point au laboratoire (accrédité COFRAC) et validées selon les critères de l'EMA et la FDA (soumis pour publication).

5.2.2. MODALITES D'IDENTIFICATION DES PATIENTS

Les patients seront sélectionnés lors des consultations préalables au démarrage d'un traitement par BRAFi+MEKi.

Chacun des 9 centres participants devra inclure en moyenne 1,3 patient par mois pendant 24 mois, afin d'atteindre l'objectif de 104 patients par bras.

Les engagements de recrutement sur 24 mois selon l'enquête de faisabilité remplie par chaque centre participant sont les suivants :

Nom, Prénom	Ville, Pays	Recrutement attendu par mois	Total
DUTRIAUX Caroline	Bordeaux	2,9	70
DEVAUX Suzanne	Bayonne	0,33	8
BEDANE Christophe	Limoges	0,92	22
DEREURE Olivier	Montpellier	1,66	40
STOEBNER Pierre	Nîmes	0,83	20
JOUARY Thomas	Pau	0,5	12
HAINAUT Ewa	Poitiers	1,42	34
OSDOIT-MEDART Sophie	La Réunion	0,33	8
MEYER Nicolas	Toulouse	2,9	70
TOTAL			284 patients

6. CRITERES D'EVALUATION

CRITERES D'EVALUATION PRINCIPAUX

- **Concentrations plasmatiques résiduelles** de BRAFi+MEKi mesurées à la première visite de suivi (après au moins 8 jours de traitement continu par vemurafenib+cobimetinib et 15 jours de traitement continu par dabrafenib+trametinib).
La mesure de ce critère se fera par méthode LC-MS/MS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem) mise au point et validée selon les critères de l'EMA et de la FDA.
- **Survenue d'effet indésirable grave (EIG)** dans les 3 premiers mois de traitement
 - o L'EIG étant défini par tout EI attribuable au traitement, de grade 3 ou 4 (classification CTC-AE) ou ayant nécessité une diminution de posologie d'au moins 25%,

6.1. CRITERES D'EVALUATION SECONDAIRES

- Concentrations plasmatiques résiduelles de BRAFi+MEKi mesurées à la première visite de suivi
- Survie sans progression à 12 mois, évaluée selon les critères RECIST 1.1. La progression étant définie ainsi :
 - Augmentation de plus de 20 % de la somme des diamètres des lésions cibles en prenant pour référence cette même somme à T0 ou au moment de la meilleure réponse
 - Apparition de nouvelles lésions.
- Concentrations d'ADN circulant muté BRAF V600 mesurées à la visite d'initiation du traitement (V1), à la première visite de suivi (V2), à 3 mois (M3), et à 6 mois (M6) par PCR digitale (QX200 Biorad) à l'aide du kit Biorad : ddPCR™ BRAF V600 Screening Kit.

7. DEROULEMENT DE LA RECHERCHE

7.1. CALENDRIER DE LA RECHERCHE

Début des inclusions : Avril 2017

Durée de la période d'inclusion : 24 mois

Durée de suivi par participant : 12 mois

Dernier patient dernière visite : 36 mois

Remise du rapport final : 48 mois

7.2. TABLEAU RECAPITULATIF DU SUIVI PARTICIPANT

	V1 : Inclusion (J0) (Initiation du traitement)	V2 : 1 ^{ère} visite de suivi (entre 2 et 6 semaines de J0*)	V3 à V13 : Visites de suivi (M2 à M12 par rapport à J0*)
Information du patient et recueil de l'accord de participation à l'étude (R)	✓		
Vérification des critères d'éligibilité (R)	✓		
Examen clinique ¹ (S)	✓	✓	✓
Bilan biologique ² (S)		✓	✓
Tube supplémentaire pour dosage du BRAFi et du MEKi ³ (R)		✓	(✓)
Imagerie (scanner) ⁴ (S)			✓
Recueil des EI (S)		✓	✓
Recueil des traitements concomitants (S)	✓	✓	✓
Détermination de la survie sans progression (S)			✓ à M12
Pour les patients inclus à Toulouse et Bordeaux :			
Consentement pour dosage d'ADN circulant muté (R)	✓		
Tube pour dosage d'ADN circulant ⁵ (R)	✓	✓	✓ à M3 et M6

*Les dates de réalisation des visites sont données à titre indicatif. Aucune visite n'est imposée par l'étude, les visites seront planifiées par le médecin investigateur selon ses habitudes de prise en charge. Il y a en moyenne une visite de suivi par mois.

(R) : recherche

(S) : soin courant

¹ Examen clinique : poids, taille, tension artérielle.

² Bilan biologique : NFS, plaquettes, TP, TCA, urée, créatinine, ionogramme sanguin, ASAT, ALAT, bilirubine, GGT, PAL, LDH, lipase, albumine, calcémie, réalisé dans le cadre du suivi usuel.

³ Dosage du BRAFi et du MEKi : prélèvement d'un tube supplémentaire (quantité nécessaire de plasma inférieure à 1 ml), hépariné sans gel au cours d'un bilan biologique prévu dans le suivi habituel du patient :

- Lors de la première visite de suivi avant la prochaine prise du traitement (soit 12h +/- 2h après la prise de BRAFi et 24h +/- 4h après la prise de MEKi) et après minimum 8 jours de traitement continu par vemurafenib+cobimetinib ou 15 jours de traitement continu par dabrafenib+trametinib.
- Lors d'une visite de suivi ultérieure en cas de modification de la posologie, dans les conditions énoncées ci-dessus. Un seul tube supplémentaire par patient sera prélevé en cas de modification de posologie.

⁴ Imagerie (scanner) : tous les 2 mois selon le suivi habituel de ces patients, pour détermination de la progression selon les critères RECIST 1.1.

⁵ Dosage de l'ADN circulant : à V1, V2, M3 et M6, prélèvement d'un tube supplémentaire, cell-free DNA au moment du bilan biologique prévu dans le suivi habituel du patient

7.3. INFORMATION DES PERSONNES CONCERNEES

Le médecin propose au patient de participer à cette recherche et l'informe de l'objectif de l'étude, du traitement informatisé des données le concernant qui seront recueillies au cours de cette recherche et lui précise également ses droits d'accès, d'opposition et de rectification à ces données.

Le médecin vérifie également les critères d'éligibilité. Si la personne est d'accord pour participer, elle donne oralement son accord.

Pour les patients inclus à Bordeaux et Toulouse, le médecin fait signer un formulaire spécifique d'accord de participation pour le dosage d'ADN circulant muté BRAF. Le participant pourra, à tout moment, s'opposer à l'utilisation de ses données, dans le cadre de la recherche.

7.4. DEROULEMENT DE LA RECHERCHE

Il s'agit d'une recherche non interventionnelle menée chez des patients atteints de mélanome métastatique avec indication de première mise sous traitement par vemurafenib+cobimetinib ou dabrafenib+trametinib.

Les patients seront vus en consultation selon le suivi habituel imposé par leur pathologie, classiquement une visite par mois. Aucun acte spécifique à la recherche ne sera réalisé. Seuls les dosages de BRAFi, MEKi et d'ADN circulant muté ne font pas partie de la prise en charge courante, mais les échantillons sanguins nécessaires à leur dosage seront prélevés au cours d'un bilan biologique usuel. Les posologies de BRAFi et MEKi pourront être diminuées selon l'avis du clinicien en fonction de la tolérance du traitement et les adaptations de posologies seront recueillies (pratique actuelle).

A chaque visite, un interrogatoire et un examen clinique seront pratiqués pour recueillir les informations suivantes : âge, sexe, poids, taille, pression artérielle, traitements et pathologies associées, antécédents, effets indésirables et adaptation de posologie.

Lors de la visite d'initiation du traitement (V1), une information sur l'étude sera délivrée au patient et son accord sera recueilli.

Lors de la visite habituelle de suivi (V2), une prise de sang, prévue dans le suivi du patient, sera réalisée sur site avant la prise du traitement. Un tube supplémentaire issu de ce prélèvement permettra de doser les concentrations résiduelles de BRAFi et MEKi. Le prélèvement sera effectué 12h +/- 2h

après la prise de BRAFi et 24h +/- 4h après la prise de MEKi. Les patients devront avoir pris leur traitement de façon continue pendant au moins 8 jours avant le prélèvement pour un traitement par vemurafenib+cobimetinib et pendant au moins 15 jours pour un traitement par dabrafenib+trametinib. Au cours des 6 mois suivants V1, un tube supplémentaire pourra être prélevé lors d'un bilan sanguin usuel dans les conditions énoncées ci-dessus si la posologie de BRAFi et/ou MEKi a été diminuée sur l'avis du clinicien (maximum un tube supplémentaire par patient). Les prélèvements pour dosage de BRAFi et MEKi seront analysés au Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie du CHU de Bordeaux en fin d'étude.

Pour les patients inclus à Bordeaux et Toulouse, un formulaire de consentement spécifique pour dosage d'ADN circulant muté BRAF sera recueilli et un tube de sang supplémentaire sera prélevé à V1, V2, à 3 mois et à 6 mois au cours d'un bilan biologique usuel. Les prélèvements seront analysés dans les services de biologie des tumeurs de Bordeaux et de Toulouse.

7.5. CIRCUIT DES ECHANTILLONS

Au cours d'un bilan biologique usuel, un tube supplémentaire (hépariné, sans gel) par patient sera prélevé pour mesurer les concentrations plasmatiques de BRAFi et de MEKi à la première visite de suivi (V2) et lors d'une visite ultérieure en cas de diminution de posologie pour cause d'effet indésirable (dans la limite d'un tube supplémentaire par personne, quantité nécessaire inférieure à 1 ml par tube). Le tube sera identifié en collant les étiquettes fournies dans le kit après y avoir noté : le numéro du patient, ses initiales, la date et l'heure de prélèvement. Le tube sera ensuite centrifugé 5 min à 3000 g (à température ambiante) et le surnageant sera transféré dans un aliquote. Cet aliquote sera lui-même étiqueté (numéro du patient, initiales, date et heure de prélèvement) puis stocké sur site à - 20°C.

En fin d'étude tous les aliquotes seront envoyés de manière groupée au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Bordeaux qui réalisera l'ensemble des dosages de vemurafenib, cobimetinib, dabrafenib et trametinib.

Pour les patients inclus à Bordeaux et Toulouse, un tube supplémentaire sera prélevé au cours d'un bilan biologique usuel pour recherche d'ADN circulant muté BRAF V600 à V1, V2, à 3 mois et à 6 mois, il s'agit d'un tube CE-IVD Cell-Free DNA collection (Roche). Le tube sera identifié en collant les étiquettes fournies dans le kit après y avoir noté : le numéro du patient, ses initiales, la date et l'heure de prélèvement. Le tube sera analysé par PCR digitale dans les services de biologie des tumeurs de Bordeaux et Toulouse, après conditionnement (centrifugation puis aliquotage et stockage à -80°C), et extraction de l'ADN.

Une fois les dosages de l'ensemble des aliquotes réalisés, ces derniers seront détruits.

8. ASPECTS STATISTIQUES

8.1. CALCUL DE LA TAILLE D'ETUDE

Il s'agit d'une comparaison d'aires sous la courbe ROC (Receiving Operationg Characteristics). La méthode de Hajian-Tilaki (2013) permet le calcul du nombre de sujets nécessaires lors de comparaison d'aire sous la courbe (AUC) ROC observée à l'AUC ROC théorique (I).

A la diagonale, $AUC\ ROC = 0,5$.

Pour une bonne discrimination par rapport à la diagonale et permettre la détermination de seuil de toxicité on fait l'hypothèse suivante :

- H_1 : AUC observée > 0,70 (AUC théorique). (Le seuil de 0,7 est choisi en prenant pour référence la recherche de seuil de l'imatinib (2)).

Avec :

- Alpha = 0,05
- Puissance = 0,90
- Formulation unilatérale,

Le nombre de patients présentant un effet indésirable avec diminution de posologie doit être au moins de 33.

Etant donné qu'1/3 des patients présenteront cette toxicité, il faut 99 patients, et en considérant 5% de perdus de vue, il faut inclure 104 patients par groupe de traitement (3-5).

METHODES STATISTIQUES EMPLOYEES

Les analyses seront réalisées au sein du Service Hospitalo-Universitaire de Pharmacologie Médicale de Bordeaux à l'aide du logiciel SAS® (SAS Institute, version 9.4, North Carolina, USA) en suivant un plan d'analyse statistique détaillé et validé au préalable.

Les caractéristiques des patients à l'inclusion seront décrites.

L'analyse descriptive des variables qualitatives et ordinales présentera l'effectif et la fréquence de chaque modalité, en particulier les données manquantes. Celle des variables quantitatives présentera l'effectif, le nombre de données manquantes, la moyenne arithmétique, l'écart-type, la médiane, les quartiles (p25%-p75%) et les valeurs extrêmes. Des graphiques seront réalisés lorsqu'ils permettront de faciliter l'interprétation des résultats.

Analyse du critère de jugement principal

Les seuils de concentration plasmatique liés à la toxicité à 3 mois des bithérapies BRAFi+MEKi seront déterminés à l'aide d'un modèle de régression logistique univarié, dont la variable dépendante sera la survenue d'un effet indésirable grave au cours des 3 premiers mois. Le choix du meilleur seuil de concentration sera déterminé avec l'indice de Youden (= sensibilité + spécificité -1).

Afin de quantifier le pouvoir discriminant du meilleur seuil de concentration lié à la toxicité, la borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95% (IC95%) de l'AUC sera estimée avec un risque de 1^{ère} espèce alpha fixé à 5% en formulation unilatérale et comparée à la valeur théorique 0,7 (AUC théorique choisie comme seuil de discrimination).

Analyse des critères de jugement secondaires

- Les seuils de concentration plasmatiques liés à l'efficacité à 12 mois des bithérapies BRAFi+MEKi seront déterminés avec la même méthodologie que pour le critère de jugement principal. La variable dépendante sera la survenue d'une progression au cours des 12 premiers mois de traitement.

Pour les analyses suivantes, le risque de 1^{ère} espèce alpha sera fixé à 5% en formulation bilatérale

- L'étude exploratoire de la relation « concentration plasmatique/variation de la concentration d'ADN circulant muté BRAF au cours du temps » sera effectuée à l'aide d'un modèle de régression linéaire pour données longitudinales, après vérification des hypothèses de linéarité. La concentration d'ADN circulant muté au cours du temps sera la variable dépendante. Le seuil de concentration plasmatique dichotomisé (au-dessus/dessous du seuil) lié à l'efficacité de chacune des bithérapies et le temps seront les paramètres explicatifs indépendants dans le modèle. Les pentes d'évolution de la concentration d'ADN seront déterminées et comparées entre les deux groupes.

- Une étude exploratoire sera menée afin d'identifier des facteurs associés de toxicité et d'efficacité. Deux modèles de régression à risques proportionnels de Cox permettront d'identifier les facteurs associés de toxicité et d'efficacité.

Les variables à expliquer seront la présence d'une toxicité à 3 mois (EIG au cours des 3 premiers mois de traitement) pour l'un des modèles, la survenue d'une progression de la pathologie au cours des 12 premiers mois de traitement pour l'autre (PFS à 12 mois).

Les variables explicatives introduites dans les modèles seront :

- des données démographiques (sexe, âge),
- des données cliniques (poids, taille, score ECOG, etc.)
- des données biologiques (bilans sanguins, type de mutation BRAF, etc.)

L'hypothèse de proportionnalité des risques au cours du temps sera vérifiée pour chaque variable explicative. Les variables explicatives seront présélectionnées au seuil de 25% en analyse univariée, puis introduites et conservées dans le modèle multivarié au seuil de 5% (test de Wald). Une modélisation pas à pas descendante sera utilisée en éliminant une à une dans le modèle les variables les moins significatives. La confusion entre les variables introduites dans le modèle ainsi que les interactions seront vérifiées. L'association de chaque variable explicative avec l'événement considéré (toxicité, PFS) sera mesurée à l'aide d'un risque relatif (RR), son IC95 % ainsi que la p-value associée (test de Wald).

9. DROITS D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCE

9.1. ACCES AUX DONNEES

Le gestionnaire est chargé d'obtenir l'accord de l'ensemble des parties impliquées dans la recherche afin de garantir l'accès direct à tous les lieux de déroulement de la recherche, aux données sources, aux documents sources et aux rapports dans un but de contrôle de qualité et d'audit.

Les personnes qui dirigent et surveillent la recherche mettront à disposition les documents et données individuelles strictement nécessaires au suivi, au contrôle de qualité et à l'audit de la recherche, à la disposition des personnes ayant un accès à ces documents conformément aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur.

9.2. DONNEES SOURCES

Tout document ou objet original permettant de prouver l'existence ou l'exactitude d'une donnée ou d'un fait enregistrés au cours de la recherche est défini comme document source. Dans le cadre de cette étude, les documents sources seront le dossier médical du patient et les originaux des résultats d'imagerie et des bilans biologiques.

9.3. CONFIDENTIALITE DES DONNEES

Conformément aux dispositions législatives en vigueur, les personnes ayant un accès direct aux données sources prendront toutes les précautions nécessaires en vue d'assurer la confidentialité des informations relatives aux recherches, aux personnes qui s'y prêtent et notamment en ce qui concerne leur identité ainsi qu'aux résultats obtenus. Ces personnes, au même titre que les personnes qui dirigent et surveillent la recherche, sont soumises au secret professionnel.

Pendant la recherche ou à son issue, les données recueillies sur les personnes qui s'y prêtent et transmises au gestionnaire par les personnes qui dirigent et surveillent la recherche (ou tous autres

intervenants spécialisés) seront codifiées. Elles ne doivent en aucun cas faire apparaître en clair les noms des personnes concernées ni leur adresse.

Chaque patient sera identifié par un numéro d'identification, composé du numéro permanent du centre investigateur et d'un numéro de patient unique dans l'essai attribué par ordre chronologique d'inclusion dans le centre.

Le gestionnaire s'assurera que chaque personne qui se prête à la recherche a été informée de l'accès aux données individuelles la concernant et strictement nécessaires au contrôle de qualité de la recherche.

10. CONTROLE ET ASSURANCE DE LA QUALITE

10.1. CONSIGNES POUR LE RECUEIL DES DONNEES

Toutes les informations requises par le protocole doivent être consignées sur les cahiers d'observation et une explication doit être apportée pour chaque donnée manquante. Les données devront être recueillies au fur et à mesure qu'elles sont obtenues, et transcrites dans ces cahiers de façon nette et lisible.

Les données seront recueillies sur un cahier d'observation électronique, dont le développement et la maintenance seront assurés par le service de Pharmacologie Médicale de Bordeaux.

10.2. SUIVI DE LA RECHERCHE

Le suivi de la recherche sera assuré par un technicien de recherche clinique. Il sera chargé, auprès de l'investigateur coordonnateur, de :

- la logistique et la surveillance de la recherche,
- l'établissement des rapports concernant son état d'avancement et leur diffusion aux intervenants de la recherche (gestionnaire, CMG,...),
- la vérification de la complétude du cahier d'observation (demande d'informations complémentaires, corrections,...),
- l'envoi des prélèvements.

Il travaillera conformément aux procédures opératoires standardisées, en collaboration avec l'attaché de recherche clinique délégué par le gestionnaire.

10.3. CONTROLE DE QUALITE

Un attaché de recherche clinique mandaté par le gestionnaire visite de façon régulière chaque centre, lors de la mise en place de la recherche, une ou plusieurs fois en cours de recherche selon le rythme des inclusions et en fin de recherche. Lors de ces visites, les éléments suivants seront revus :

- respect du protocole de la recherche, des procédures qui y sont définies et des textes réglementaires en vigueur,
- qualité des données recueillies dans le cahier d'observation : complétude, exactitude, données manquantes, cohérence des données avec les documents sources (dossiers médicaux, carnets de rendez-vous, originaux des résultats de laboratoire, etc,...),
- gestion des produits éventuels et des prélèvements.

Toute visite fera l'objet d'un rapport de monitoring par compte-rendu écrit.

10.4. GESTION DES DONNEES

10.4.1. MODALITES DE SAISIE

La saisie des données sera réalisée par le technicien d'étude clinique sur un cahier d'observation électronique disponible via une adresse web, dont les données seront gérées par le Centre de Méthodologie et de Gestion du service de Pharmacologie. Le codage des effets indésirables et des maladies sera réalisé en utilisant comme référence le dictionnaire MedDRA.

10.4.2. CONTROLE QUALITE DES DONNEES

La validation des données sera réalisée par le Centre de Méthodologie et de Gestion. Des demandes de corrections automatiques seront générées automatiquement lors du remplissage du cahier d'observation électronique au moyen de tests de cohérence pour certaines variables identifiées au préalable. L'hébergement et la sécurisation des données seront de la responsabilité du Centre de Méthodologie et de Gestion, du statisticien et du coordonnateur de l'étude.

10.4.3. GEL DE BASE

Le processus de gel/dégel des données sera réalisé conformément à la procédure mise en place dans le Centre de Méthodologie et de Gestion des données (gel des données brutes au format XML et sous forme de tables SAS).

L'ensemble des données sera sauvegardé chaque soir, avec conservation pendant 4 semaines, puis archivé mensuellement sur bande.

10.5. AUDIT ET INSPECTION

Un audit peut être réalisé à tout moment par des personnes mandatées par le gestionnaire et indépendantes des responsables de la recherche. Il a pour objectif de s'assurer de la qualité de la recherche, de la validité de ses résultats et du respect de la loi et des réglementations en vigueur.

Les personnes qui dirigent et surveillent la recherche acceptent de se conformer aux exigences du gestionnaire et à l'autorité compétente en ce qui concerne un audit ou une inspection de la recherche.

L'audit pourra s'appliquer à tous les stades de la recherche, du développement du protocole à la publication des résultats et au classement des données utilisées ou produites dans le cadre de la recherche.

11. CONSIDERATIONS ETHIQUES ET REGLEMENTAIRES

11.1. CONFORMITE AUX TEXTES DE REFERENCE

Le gestionnaire et les personnes qui dirigent et surveillent la recherche s'engagent à ce que cette recherche soit réalisée en conformité avec la déclaration d'Helsinki (qui peut être retrouvée dans sa version intégrale sur le site <http://www.wma.net>).

Les données enregistrées à l'occasion de cette recherche font l'objet d'un traitement informatisé au service de Pharmacologie Médicale du CHU de Bordeaux, dans le respect de la loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés modifiée par la loi 2004-801 du 6 août 2004.

11.2. AMENDEMENT AU PROTOCOLE

Toute modification substantielle fait l'objet d'un amendement écrit qui est soumis au gestionnaire et au Centre de Méthodologie et de Gestion des données, le cas échéant.

Tous les amendements au protocole doivent être portés à la connaissance de tous les professionnels de santé qui participent à la recherche et qui s'engagent à en respecter le contenu.

12. CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE

Les documents suivants relatifs à cette recherche seront archivés par le gestionnaire pour une durée de 15 ans suivant la fin de la recherche

- Le protocole et les amendements éventuels au protocole
- Les cahiers d'observation
- Tous les autres documents et courriers relatifs à la recherche

Aucun déplacement ou destruction ne pourra être effectué sans l'accord de la personne qui dirige la recherche. Au terme de la durée réglementaire d'archivage, elle sera consultée pour destruction. Toutes les données, tous les documents et rapports pourront faire l'objet d'audit ou d'inspection.

13. REGLES RELATIVES A LA PUBLICATION

13.1. COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

L'analyse des données fournies par les centres est réalisée par le service de Pharmacologie Médicale du CHU de Bordeaux. Cette analyse donne lieu à un rapport écrit qui est soumis au gestionnaire. Ce rapport permet la préparation d'une ou plusieurs publication(s).

Toute communication écrite ou orale des résultats de la recherche doit recevoir l'accord préalable de la personne qui dirige et surveille la recherche et, le cas échéant, de tout comité constitué pour la recherche.

La publication des résultats principaux mentionne le nom du gestionnaire, de tous les investigateurs ayant inclus ou suivi des participants dans la recherche, des méthodologistes, biostatisticiens et data managers ayant participé à la recherche et la source de financement. Il sera tenu compte des règles internationales d'écriture et de publication (Convention de Vancouver, février 2006).

13.2. COMMUNICATION DES RESULTATS AUX PARTICIPANTS

A leur demande, les participants à la recherche sont informés des résultats globaux de celle-ci.

13.3. CESSION DES DONNEES

Le recueil et la gestion des données sont assurés par le service de Pharmacologie Médicale du CHU de Bordeaux. Les conditions de cession de tout ou partie de la base de données de la recherche sont décidées par le gestionnaire de la recherche et font l'objet d'un contrat écrit.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. K. Hajian-Tilaki, Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian J Intern Med* **4**, 627-635 (2013).
2. S. Picard *et al.*, Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* **109**, 3496-3499 (2007).
3. P. A. Ascierto *et al.*, coBRIM: a phase 3, double-blind, placebo-controlled study of vemurafenib versus vemurafenib + cobimetinib in previously untreated BRAF (V600) mutation-positive patients with unresectable locally advanced or metastatic melanoma (NCT01689519). *J Transl Med* **13**, 2061 (2015).
4. J. Larkin *et al.*, Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med*, (2014).
5. G. V. Long *et al.*, Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* **386**, 444-451 (2015).
6. INCa. Institut National du Cancer. <http://www.e-cancer.fr/>
7. P. A. Ascierto *et al.*, in *J Transl Med*. (England, 2012), vol. 10, pp. 85.
8. A. Hauschild *et al.*, Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* **380**, 358-365 (2012).
9. J. A. Sosman *et al.*, Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med* **366**, 707-714 (2012).
10. D. Klinac, E. S. Gray, M. Millward, M. Ziman, Advances in personalized targeted treatment of metastatic melanoma and non-invasive tumor monitoring. *Front Oncol* **3**, 54 (2013).
11. P. B. Chapman *et al.*, Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* **364**, 2507-2516 (2011).
12. C. Robert *et al.*, Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med* **372**, 30-39 (2015).
13. S. K. Lawrence, D. Nguyen, C. Bowen, L. Richards-Peterson, K. W. Skordos, The metabolic drug-drug interaction profile of Dabrafenib: in vitro investigations and quantitative extrapolation of the P450-mediated DDI risk. *Drug Metab Dispos* **42**, 1180-1190 (2014).
14. E. F. Choo *et al.*, Use of transgenic mouse models to understand the oral disposition and drug-drug interaction potential of cobimetinib, a MEK inhibitor. *Drug Metab Dispos* **43**, 864-869 (2015).
15. L. Musib *et al.*, Absolute bioavailability and effect of formulation change, food, or elevated pH with rabeprazole on cobimetinib absorption in healthy subjects. *Mol Pharm* **10**, 4046-4054 (2013).
16. E. Funck-Brentano *et al.*, Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600mut melanoma patients: impact on tumour response and tolerance. *Ann Oncol*, (2015).

17. J. C. Alvarez *et al.*, A LC/MS/MS micro-method for human plasma quantification of vemurafenib. Application to treated melanoma patients. *J Pharm Biomed Anal* **97**, 29-32 (2014).
18. N. Kramkimel *et al.*, Vemurafenib pharmacokinetics and its correlation with efficacy and safety in outpatients with advanced BRAF-mutated melanoma. *Target Oncol* **11**, 59-69 (2016).
19. L. Goldwirt *et al.*, in *Ann Oncol.* (England, 2016), vol. 27, pp. 363-364.
20. C. M. Nijenhuis *et al.*, Clinical Pharmacokinetics of Vemurafenib in BRAF-Mutated Melanoma Patients. *J Clin Pharmacol*, (2016).
21. A. B. Suttle *et al.*, Assessment of the drug interaction potential and single- and repeat-dose pharmacokinetics of the BRAF inhibitor dabrafenib. *J Clin Pharmacol* **55**, 392-400 (2015).
22. N. R. Budha *et al.*, Evaluation of Cytochrome P450 3A4-Mediated Drug-Drug Interaction Potential for Cobimetinib Using Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling and Simulation. *Clin Pharmacokinet*, (2016).
23. K. Han *et al.*, Population pharmacokinetics and dosing implications for cobimetinib in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* **76**, 917-924 (2015).
24. A. C. Knol *et al.*, Clinical significance of BRAF mutation status in circulating tumor DNA of metastatic melanoma patients at baseline. *Exp Dermatol*, (2016).
25. M. F. Sanmamed *et al.*, Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digital PCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors. *Clin Chem* **61**, 297-304 (2015).
26. S. J. Welsh, P. G. Corrie, in *Ther Adv Med Oncol.* (England, 2015), vol. 7, pp. 122-136.
27. J. A. Waddell, D. A. Solimando, Jr., in *Hosp Pharm.* (United States, 2013), vol. 48, pp. 818-821.
28. K. T. Flaherty *et al.*, Surrogate endpoints for overall survival in metastatic melanoma: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet Oncol* **15**, 297-304 (2014).
29. G. V. Long *et al.*, Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *N Engl J Med* **371**, 1877-1888 (2014).



GROUPEMENT INTERREGIONAL DE RECHERCHE CLINIQUE ET D'INNOVATION SUD-OUEST OUTRE-MER
Programme Hospitalier de Recherche Clinique Interrégional 2016

FICHE D'EVALUATION DE L'EXPERT METHODOLOGISTE

INVESTIGATEUR : ROUSSET Marine

TITRE DU PROJET : BRAF-inhibiteurs/MEK-inhibiteurs : détermination des seuils plasmatiques d'Efficacité et de Toxicité dans le mélanome métastatique - étude BRACKET

1 - GRILLE D'EVALUATION

		Notation (de 1, la plus faible à 4, la meilleure)	TOTAL	
Hypothèse, Objectifs			8 /8	
	Hypothèse scientifique principale clairement mentionnée	4		
	Objectif principal clair, en cohérence avec l'hypothèse principale	4		
Méthodologie			14 /20	
	Schéma et méthodes pertinents pour l'hypothèse et l'objectif principal	2		
	Critères d'inclusion et non inclusion: clairs, adaptés	2		
	Calcul du nombre de sujets nécessaire: clair, adapté, calcul vérifiable	4		
	Critère d'évaluation principal: fiable, pertinent	4		
	Stratégie d'analyse et analyse statistique exposées : précises, adaptées	2		
Faisabilité			12 /16	
	Potentiel de recrutement	1		
	Maîtrise des produits, dispositifs et méthodes utilisés	4		
	Moyens matériels et humains	4		
	Qualité et complémentarité des collaborations	3		
Résultats attendus Perspectives			7 /8	
	En termes de connaissances scientifiques	3		
	Conséquences en santé publique et/ou pour les patients	4		
Aspects financiers			4 /4	
	Adéquation des crédits demandés			
TOTAL SUR 56			45 /56	
TOTAL SUR 20 (x 0,36)			16.20 /20	



Tableau de correspondance

Note sur 20		Avis correspondant
17 - 20	☐	Très favorable
14 - 16	☒	Favorable
10 - 13	☐	Réservé (modifications nécessaires à détailler)
<10	☐	A rejeter

2 - RAPPORT ARGUMENTE DE L'EXPERT

(détailler les points forts et les points faibles pour chaque item)

• Hypothèse, Objectifs

Monitorer les taux sériques de médicament anti Braf dans un contexte de mélanomes malin métastatiques traités par une association anti Braf anti MEK. Le but est d'ajuster la toxicité et l'efficacité en fonction des taux sériques ;

• Méthodologie

Le suivi des patients n'est pas harmonisé de centre à centre, cela pose un problème de réalisation de l'objectif principal (Tox à 3 mois) et surtout des objectifs reliés à la survie sans progression, qui oblige par définition à une harmonisation des modalités de suivi.

• Faisabilité

Le chiffre de 209 patients n'est pas réalisable dans les délais prévus. • et seule l'équipe de Bordeaux pourrait atteindre ses objectifs de recrutement. L'analyse de l'incidence des mélanomes rapportées dans les centres de Montpellier et Toulouse ne semble pas correspondre aux données que nous avons eu par ailleurs dans une enquête. Les chiffres proposés de recrutement sont trop optimistes. De plus si on analyse dans un autre contexte de recherche les données de l'étude CoBRIM citée en référence, celle ci a inclus 495 patients, et pour ce faire a du mobiliser 193 centres investigateurs (Ref Clinicaltrials.gov). Dans ce contexte recruter 208 patients sur 9 centres comme cela est proposé dans cette étude semble impossible.

• Résultats attendus Perspectives

Une mise à disposition des résultats est prévue pour 2022, ce qui est trop loin car le référentiel de prise en charge aura sûrement changé d'ici là. Ceci plaide pour une durée d'étude plus courte avec une base de recrutement plus solide

• Aspects financiers

Pas de commentaire

• Conclusion

Ce projet est intéressant sur son thème, en effet de nombreux cliniciens souhaiteraient monitorer les taux sériques des traitements ciblés pour en ajuster la toxicité, l'efficacité et monitorer les potentielles interactions médicamenteuses et problèmes de métabolisme.

Cependant plusieurs gros problèmes doivent être réglés.

- Celui du recrutement. En effet les projections faites par les auteurs sont trop optimistes.
- Celui des objectifs.

- Celui des critères d'inclusion qui doivent être affinés et mis au standard des études cliniques habituelles, PS ECOG 0-2, patients assurés social en France, suivi possible etc
- Celui du timing
- Celui du formulaire d'information et consentement qui est trop complexe utilisant des termes de jargon médical totalement inaccessibles pour un malade. La relecture par un comité de patients est souhaitable.

3 – LIENS D'INTERET ET CONFIDENTIALITE

☒ Je m'engage à respecter la plus stricte confidentialité concernant ce projet

☒ Je déclare avoir examiné ce projet en l'absence de lien d'intérêt avec le projet, le porteur de projet et son équipe.

☐ Je déclare les liens d'intérêt potentiels suivants :

Type de lien	Dates	Commentaire



**GROUPEMENT INTERREGIONAL DE RECHERCHE CLINIQUE ET D'INNOVATION
SUD-OUEST OUTRE-MER
Programme Hospitalier de Recherche Clinique Interrégional 2016**

FICHE D'EVALUATION DE L'EXPERT SCIENTIFIQUE

INVESTIGATEUR : ROUSSET Marine

TITRE DU PROJET : BRAF-inhibiteurs/MEK-inhibiteurs : détermination des seuils plasmatiques d'Efficacité et de Toxicité dans le mélanome métastatique - étude BRACKET

1 - GRILLE D'EVALUATION

Critères/Notation (1, la plus faible à 4, la meilleure)	1	2	3	4	TOTAL
Originalité			3		3
Méthodologie		2			2
Faisabilité		2			2
Qualité rédactionnelle			3		3
Utilité		2			2
Adéquation des Moyens		2			2
Publications antérieures		2			2
TOTAL SUR 28					16/28
TOTAL SUR 20 (x 0,71)					11,36/20



Tableau de correspondance

Note sur 20		Avis correspondant
17 - 20	☐	Très favorable
14 - 16	☐	Favorable
10 - 13	☒	Réservé
<10	☐	A rejeter

ETHIQUE

OUI



NON



2 - RAPPORT ARGUMENTE DE L'EXPERT

(détailler les points forts et les points faibles pour chaque item)

- **Originalité**
Points forts : étude originale, aucune publication concernant les seuils plasmatiques de la bithérapie BRAFi+MEKi
Points faibles : peu d'impact sur la pratique courante car il s'agit d'une étude observationnelle, non-comparative et non-randomisée
- **Méthodologie**
Points forts : validité des méthodes proposées, adéquation avec l'objectif principal et les objectifs secondaires

Points faibles :
 - Trop de variabilité pour la V2, entre 2 et 6 semaines
 - Pas de précision sur le délai de l'imagerie avant l'inclusion
- **Faisabilité**
Points forts : cohorte significative des patients, recueil des échantillons accessibles, équipes expérimentées pour l'analyse de données
Points faibles : centres participants avec peu de patients éligibles (8), mais nécessitant des surcouts
- **Qualité rédactionnelle**
Bonne qualité rédactionnelle
- **Utilité**
(impact direct des résultats attendus sur la prise en charge des patients)
Peu d'impact sur la pratique courante car il s'agit d'une étude observationnelle, non-comparative et non-randomisée
- **Adéquation des objectifs et des moyens**
(démonstration que les méthodes de la recherche permettront d'obtenir des données apportant un haut niveau de preuve)
Niveau de preuve moyen. Même argument : étude observationnelle, non-comparative et non-randomisée
- **Publications antérieures**
Points forts : aucune publication concernant les seuils plasmatiques de la bithérapie BRAFi+MEKi
Points faibles : publications antérieures sur les seuils plasmatiques des BRAFi et l'ADN tumoral
- **Conclusion**
Etude originale. En fonction des résultats, une étude comparative, randomisée sera nécessaire afin de changer les pratiques quotidiennes

3 – LIENS D'INTERET ET CONDIFENTIALITE

- ☒ Je m'engage à respecter la plus stricte confidentialité concernant ce projet
- ☒ Je déclare avoir examiné ce projet en l'absence de lien d'intérêt avec le projet, le porteur de projet et son équipe.
- ☐ Je déclare les liens d'intérêt potentiels suivants :

Type de lien	Dates	Commentaire



**GROUPEMENT INTERREGIONAL DE RECHERCHE CLINIQUE ET D'INNOVATION
SUD-OUEST OUTRE-MER
Programme Hospitalier de Recherche Clinique Interrégional 2016**

FICHE D'EVALUATION DE L'EXPERT SCIENTIFIQUE

INVESTIGATEUR : ROUSSET Marine

TITRE DU PROJET : BRAF-inhibiteurs/MEK-inhibiteurs : détermination des seuils plasmatiques d'Efficacité et de Toxicité dans le mélanome métastatique - étude BRACKET

1 - GRILLE D'EVALUATION

Critères/Notation (1, la plus faible à 4, la meilleure)	1	2	3	4	TOTAL
Originalité		2			2
Méthodologie			3		3
Faisabilité			3		3
Qualité rédactionnelle				4	4
Utilité			3		3
Adéquation des Moyens			3		3
Publications antérieures		2			2
TOTAL SUR 28					20/28
TOTAL SUR 20 (x 0,71)					14,2/20



Tableau de correspondance

Note sur 20		Avis correspondant
17 - 20	☐	Très favorable
14 - 16	x	Favorable
10 - 13	☐	Réservé
<10	☐	A rejeter

ETHIQUE OUI **X** NON ☐

2 - RAPPORT ARGUMENTE DE L'EXPERT

- **Originalité**

Le présent projet est une étude classique de pharmacocinétique s'intéressant aux dosages de BRAF-inhibiteurs / MEK-inhibiteurs utilisés dans le traitement du mélanome métastatique. Il s'agira de doser les taux résiduels de ces médicaments chez des malades traités dans l'objectif de déterminer des seuils de toxicité. Cette recherche se justifie par une variabilité importante des aires sous la courbe de ces médicaments, en raison, à la fois, de polymorphismes génétiques concernant leur métabolisme et la possibilité d'interactions médicamenteuses. Si les méthodes sont tout à fait classiques pour ce type de projet, l'originalité réside essentiellement dans l'absence de données cliniques concernant ces seuils de toxicité chez les malades.

- **Méthodologie**

Il s'agit d'une étude prospective, non interventionnelle et menée en ouvert chez des patients atteints de mélanomes métastatiques. La seule intervention inhérente à la recherche consistera en le prélèvement d'un tube de sang pour le dosage résiduel des BRAF et MEK-inhibiteurs. La partie statistique décrit parfaitement la méthode utilisée pour calculer la taille de l'échantillonnage sur la base d'un taux d'effets indésirables graves d'au moins un tiers, ainsi que sur le calcul de l'AUC à partir d'une AUC théorique, basée sur des résultats obtenus pour l'imatinib. Cette étude est correctement dessinée et devrait pouvoir permettre d'atteindre l'objectif qui est de déterminer une concentration toxique des produits évalués. Le dosage est d'ores et déjà mis au point et doit donner lieu à publication.

- **Faisabilité**

Comme mentionné, ci-dessus, cette étude est simple dans sa construction et ne devrait pas poser de problèmes de réalisation. Le seul questionnement qu'il puisse y avoir concerne le recrutement des patients, mais les auteurs affirment que leur étude multicentrique permettra d'atteindre les patients nécessaires aux 2 groupes de l'étude.

- **Qualité rédactionnelle**

Le document transmis est tout à fait clair, on peut juste reprocher un certain nombre de redondances, probablement inhérentes à la maquette standard transmise pour rédiger ces projets.

- **Utilité**

L'utilité de cette étude aurait mérité un peu plus d'argumentaire. En effet, la détermination du seuil de toxicité des médicaments BRAF et MEK-inhibiteurs est une question importante. Néanmoins, que fera-t-on de ces résultats par la suite ? Est-il envisagé de réaliser du suivi thérapeutique pour limiter l'incidence des effets indésirables au risque de se retrouver en sous-dosage pour des patients dont le pronostic est extrêmement sombre. On présente un tableau de réduction de posologie chez les patients présentant des toxicités. Est-ce que cette étude permettra de donner un substrat plus robuste aux ajustements posologiques, et si oui, comment ?

Au total, il me semble que le projet a un intérêt, mais dont la pertinence clinique aurait pu être un peu plus détaillée.

- **Adéquation des objectifs et des moyens**

Le projet est bien documenté en ce qui concerne le volet budgétaire. L'expert est néanmoins surpris en ce qui concerne l'enveloppe budgétaire globale nécessaire au salaire de tous les personnels qui vont être embauchés sur cette étude. Le coût global, me semble extrêmement élevé pour une étude de ce type.

- **Publications antérieures**

L'équipe du département de pharmacologie du CHU de Bordeaux est reconnue pour ses compétences dans le suivi thérapeutique des médicaments. Elle possède une plateforme technique permettant de réaliser les dosages comme l'atteste les publications de ce groupe.

En ce qui concerne le présent projet une seule publication est actuellement soumise, aux dires des auteurs

• Conclusion

Voici un projet de pharmacocinétique et suivi thérapeutique probablement intéressant pour déterminer le seuil de toxicité des BRAF-inhibiteurs et MEK-inhibiteurs chez les malades atteints de mélanome métastatique. Le projet est bien structuré et parfaitement faisable. On aurait souhaité une discussion plus importante quant à l'utilisation ultérieure des résultats de cette étude en termes de suivi thérapeutique et d'ajustement posologique chez ces malades au pronostic extrêmement sombre et chez lesquels il est clair qu'un abaissement de dose n'est probablement pas souhaitable, en tous cas en terme de pronostic de la maladie.

3 – LIENS D'INTERET ET CONDIFENTIALITE

☒ Je m'engage à respecter la plus stricte confidentialité concernant ce projet

☒ Je déclare avoir examiné ce projet en l'absence de lien d'intérêt avec le projet, le porteur de projet et son équipe.

☐ Je déclare les liens d'intérêt potentiels suivants :

Type de lien	Dates	Commentaire

