

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
**INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**
—
COURBEVOIE
—

①① N° de publication : **3 051 674**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **16 54931**

⑤① Int Cl⁸ : **A 61 K 47/46 (2016.01), A 61 K 33/24, A 61 P 35/00**

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ LIPOPROTEINES CHARGÉES EN COMPLEXES DE PLATINE POUR LE TRAITEMENT DU CANCER.

②② Date de dépôt : 31.05.16.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public
de la demande : 01.12.17 Bulletin 17/48.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 08.11.19 Bulletin 19/45.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : UNIVERSITE DE BOURGOGNE —
FR, INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) FR et CENTRE
HOSPITALIER UNIVERSITAIRE Etablissement public
— FR.

⑦② Inventeur(s) : LIRUSSI FREDERIC, GARRIDO-
FLEURY CARMEN et LAGROST LAURENT.

⑦③ Titulaire(s) : UNIVERSITE DE BOURGOGNE,
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE
LA RECHERCHE MEDICALE), CENTRE
HOSPITALIER UNIVERSITAIRE Etablissement public.

⑦④ Mandataire(s) : CABINET PLASSERAUD.

FR 3 051 674 - B1



LIPOPROTEINES CHARGÉES EN COMPLEXES DE PLATINE POUR LE TRAITEMENT DU CANCER

DOMAINE DE L'INVENTION

5 La présente invention concerne l'utilisation d'anti-tumoraux pour le traitement du cancer.

INTRODUCTION

Les complexes de platine sont couramment utilisés dans le traitement des cancers. Parmi ces derniers, on peut citer le cisplatine, le carboplatine, l'oxaliplatine, le tétraplatine, l'ipropatine, le satraplatine, le nédaplatine, le lobaplatine, le picoplatine (*Pt-based drugs: The spotlight will be on proteins, O. Pinato, C. Musetti and C.Sissi, Metallomocis February 2014*) ou encore le ProLindac (*ProLindac™ (AP5346): A review of the development of an HPMA DACH platinum Polymer Therapeutic, David P Nowotnika, Esteban Cvitkovic, Advanced Drug Delivery Reviews Volume 61, Issue 13, 12 November 2009, Pages 1214–1219*). Cependant, ces complexes de platine tels qu'utilisés actuellement présentent l'inconvénient majeur de former des adduits avec les protéines dont l'albumine (*Cisplatin Binding Sites on Human Albumin, Andrei I. Ivanov, John Christodoulou, John A. Parkinson, Kevin J. Barnham, Alan Tucker, John Woodrowi, and Peter J. Sadler, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 273, No. 24, Issue of June 20 12, pp. 14721–14730, 1998*). Le cisplatine est un des complexes de platine les plus utilisés.

Le complexe cis-diaminedichloroplatine (II) (CDDP), plus connu sous le nom de cisplatine, est un antinéoplasique utilisé dans le traitement des cancers. Toutefois, comme la plupart des antinéoplasiques utilisés en thérapies contre le cancer, le cisplatine ne permet pas de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses. D'autre part, son utilisation s'accompagne d'effets secondaires tels que la néphrotoxicité, la neurotoxicité, l'ototoxicité, la toxicité pour la moelle osseuse et autres tissus, l'hémolyse, la neuropathie périphérique et l'irritation gastro-intestinale accompagnée de nausées et de vomissements.

30 Il est donc nécessaire de trouver des méthodes pour augmenter l'efficacité et la sélectivité des complexes de platine, en particulier du cisplatine, tout en diminuant la toxicité liée à l'utilisation de ces derniers.

RESUME DE L'INVENTION

La présente invention a pour objet une lipoprotéine de basse densité (LDL) chargée en complexe de platine. Un autre objet de la présente invention concerne une lipoprotéine de haute densité (HDL) chargée en complexe de platine ou une lipoprotéine de basse densité modifiée chargée en complexe de platine.

En outre, un autre objet de la présente invention concerne un kit comprenant :

- une lipoprotéine de haute densité (HDL) chargée en complexe de platine ou une lipoprotéine de basse densité modifiée chargée en complexe de platine ou un mélange de ces dernières, et
- une lipoprotéine de basse densité (LDL) chargée en complexe de platine.

La présente invention a également pour objet une lipoprotéine de basse densité (LDL) chargée en complexe de platine pour son utilisation contre le cancer, caractérisée en ce qu'elle est utilisée en combinaison avec une lipoprotéine de basse densité modifiée chargée en complexe de platine. De même, la présente invention a pour objet une lipoprotéine de haute densité (HDL) chargée en complexe de platine pour son utilisation contre le cancer, caractérisée en ce qu'elle est utilisée en combinaison avec une lipoprotéine de basse densité (LDL) chargée en complexe de platine.

Les inventeurs de la présente invention ont démontré que la vectorisation d'un complexe de platine, en particulier le cisplatine, permettait d'augmenter l'efficacité dudit complexe dans le traitement du cancer, tout en permettant de diminuer la toxicité liée à l'utilisation de ce dernier. Les inventeurs ont aussi démontré que la combinaison de différents types de lipoprotéines chargées en complexe de platine, en particulier le cisplatine, permettait d'obtenir un effet synergique et donc d'améliorer davantage l'efficacité dudit complexe dans le traitement du cancer tout en diminuant sa toxicité pour l'organisme.

DESCRIPTION DETAILLEE

Les lipoprotéines de basse densité (LDL) et lipoprotéines de haute densité (HDL) sont bien connues de l'homme du métier (*Introduction to Lipids and Lipoproteins, Kenneth R Feingold MD, Car Grunfeld, PhD, NCBI Bookshelf*).

Typiquement, les lipoprotéines de haute densité (HDL) sont des lipoprotéines riches en cholestérol, phospholipides et comprenant les apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, et E, de densité comprise entre 1,063 et 1,210 g/mL et de diamètre variant entre 5 et 12 nm.

Typiquement, les lipoprotéines de basse densité (LDL) natives, de forme non-oxydée et non-acétylée, sont des lipoprotéines riches en cholestérol et comprenant l'apolipoprotéine B-100, de densité comprise entre 1.019 et 1.063 g/mL et de diamètre variant entre 18 et 25 nm.

5

Au sens de la présente invention, on entend par « lipoprotéine de basse densité modifiée » ou « lipoprotéine LDL modifiée » une lipoprotéine de basse densité (LDL) oxydée ou acétylée.

10 Typiquement, les lipoprotéines HDL et LDL sont obtenues à partir de plasma de donneurs par une technique de séparation par ultracentrifugation.

Typiquement, pour la fabrication d'une lipoprotéine (LDL, HDL ou LDL modifiée) chargée en complexe de platine, le complexe de platine est ajouté à la lipoprotéine en milieu physiologique. Typiquement, afin de permettre l'association dudit complexe de platine à la lipoprotéine et d'éliminer la fraction non liée dudit complexe de platine, les

15 échantillons sont incubés puis dialysés.

Typiquement, la concentration dudit complexe de platine est déterminée par spectrométrie d'absorption atomique en four graphite.

Typiquement, la concentration en complexe de platine retrouvée dans les lipoprotéines est de 0,1 à 1 mg/mL, préférentiellement de 0,2 à 0,8 mg/mL et encore plus

20 préférentiellement de 0,3 à 0,6 mg/mL de solution finale, *i.e.* la solution obtenue par addition de lipoprotéines dans une solution de tampon de phosphate salin (PBS) contenant du cis-platine. Cette concentration est mesurée pour une concentration en cholestérol de 1mmol/mL de ladite solution finale.

25 Typiquement, la concentration en complexe de platine retrouvée dans les lipoprotéines LDL est de 0,3 mg/mL de ladite solution finale. Cette concentration est mesurée pour une concentration en cholestérol de 1mmol/mL de ladite solution finale.

Typiquement, la concentration en complexe de platine retrouvée dans les lipoprotéines HDL est de 0,5 mg/ml de ladite solution finale. Cette concentration est mesurée pour une

30 concentration en cholestérol de 1mmol/mL de ladite solution finale.

La présente invention a pour objet une lipoprotéine de basse densité (LDL) chargée en complexe de platine.

Selon la présente invention, ladite lipoprotéine de basse densité (LDL) chargée est utilisée en tant que médicament.

5 Plus particulièrement, ladite lipoprotéine de basse densité (LDL) chargée est utilisée pour traiter le cancer.

On pourra traiter tout type de cancer, en particulier les cancers pour lesquels les complexes de platine sont déjà utilisés couramment : le cancer colorectal, le cancer du colon, le cancer de l'estomac, les cancers de la sphère oto-rhino-laryngée (ORL), le cancer du sein, le cancer du pancréas, le cancer du foie, le cancer du poumon, le cancer
10 du cerveau, le cancer de la prostate, le cancer de l'ovaire, le cancer du testicule, le cancer de l'œsophage, le cancer de la vessie, les cancers épidermoïdes, le cancer du col de l'utérus, le cancer de l'endomètre, le cancer des os, les lymphomes, les tumeurs du système nerveux central, les sarcomes, les leucémies et les adénomes.

Dans un mode de réalisation particulier, le cancer est le cancer colorectal ou le cancer du
15 sein.

Encore plus particulièrement, ladite lipoprotéine de basse densité (LDL) chargée est utilisée en thérapie pour induire la mort par apoptose des cellules tumorales.

20 La présente invention a également pour objet une lipoprotéine de haute densité (HDL) chargée en complexe de platine ou une lipoprotéine de basse densité modifiée chargée en complexe de platine.

Les lipoprotéines de basse densité (LDL) modifiées sont connues par l'homme du métier pour être reconnues par les récepteurs éboueurs (scavenger receptors) des macrophages.

25 Typiquement, elles peuvent être obtenues par incubation en présence de sulfate de cuivre ou d'un générateur de radicaux libres (LDL oxydées) ou par acétylation (LDL acétylées) (cf. *A Modification Method for Isolation and Acetylation of Low Density Lipoprotein of Human Plasma by Density Discontinuons Gradient Ultracentrifugation*, J.Z. Reza et al., *Journal of Biological Sciences* 10 (8): 785-789, 2010 ISSN 1727-3048).

30

Selon la présente invention, ladite lipoprotéine de haute densité (HDL) chargée ou ladite lipoprotéine de basse densité modifiée chargée est utilisée en tant que médicament.

Plus particulièrement, ladite lipoprotéine de haute densité (HDL) chargée ou ladite lipoprotéine de basse densité modifiée chargée est utilisée pour traiter le cancer.

5 On pourra traiter tout type de cancer, en particulier les cancers pour lesquels les complexes de platine sont déjà utilisés couramment : le cancer colorectal, le cancer du colon, le cancer de l'estomac, les cancers de la sphère oto-rhino-laryngée (ORL), le cancer du sein, le cancer du pancréas, le cancer du foie, le cancer du poumon, le cancer du cerveau, le cancer de la prostate, le cancer de l'ovaire, le cancer du testicule, le cancer de l'œsophage, le cancer de la vessie, les cancers épidermoïdes, le cancer du col de
10 l'utérus, le cancer de l'endomètre, le cancer des os, les lymphomes, les tumeurs du système nerveux central, les sarcomes, les leucémies et les adénomes.

Dans un mode de réalisation particulier, le cancer est le cancer colorectal ou le cancer du sein.

15 Plus particulièrement, ladite lipoprotéine de haute densité (HDL) chargée ou ladite lipoprotéine de basse densité modifiée chargée est utilisée en thérapie pour activer les macrophages.

Typiquement, l'activation de macrophage entraîne une production de nombreux produits de sécrétion intervenant dans l'inflammation. Des produits de sécrétion intervenant dans
20 l'inflammation sont par exemple des espèces réactives de l'oxygène (ROS - *Reactive Oxygen Species*), des enzymes (protéases et lipases), des cytokines et des composants de la coagulation.

La présente invention a également pour objet un kit comprenant :

- 25 - une lipoprotéine de haute densité (HDL) chargée en complexe de platine ou une lipoprotéine de basse densité modifiée chargée en complexe de platine ou un mélange de ces dernières, et
- une lipoprotéine de basse densité (LDL) chargée en complexe de platine.

30 Plus particulièrement, le kit est utilisé pour traiter le cancer.

On pourra traiter tout type de cancer, en particulier les cancers pour lesquels les complexes de platine sont déjà utilisés couramment : le cancer colorectal, le cancer du colon, le cancer de l'estomac, les cancers de la sphère oto-rhino-laryngée (ORL), le cancer du sein, le cancer du pancréas, le cancer du foie, le cancer du poumon, le cancer

du cerveau, le cancer de la prostate, le cancer de l'ovaire, le cancer du testicule, le cancer de l'œsophage, le cancer de la vessie, les cancers épidermoïdes, le cancer du col de l'utérus, le cancer de l'endomètre, le cancer des os, les lymphomes, les tumeurs du système nerveux central, les sarcomes, les leucémies et les adénomes.

- 5 Dans un mode de réalisation particulier, le cancer est le cancer colorectal ou le cancer du sein.

En outre, la présente invention a pour objet une lipoprotéine de basse densité (LDL) chargée en complexe de platine pour son utilisation contre le cancer, caractérisée en ce
10 qu'elle est utilisée en combinaison avec une lipoprotéine de basse densité modifiée chargée en complexe de platine.

De même, la présente invention a pour objet une lipoprotéine de haute densité (HDL) chargée en complexe de platine pour son utilisation contre le cancer, caractérisée en ce
15 qu'elle est utilisée en combinaison avec une lipoprotéine de basse densité (LDL) chargée en complexe de platine.

On pourra traiter tout type de cancer, en particulier les cancers pour lesquels les complexes de platine sont déjà utilisés couramment : le cancer colorectal, le cancer du
20 colon, le cancer de l'estomac, les cancers de la sphère oto-rhino-laryngée (ORL), le cancer du sein, le cancer du pancréas, le cancer du foie, le cancer du poumon, le cancer du cerveau, le cancer de la prostate, le cancer de l'ovaire, le cancer du testicule, le cancer de l'œsophage, le cancer de la vessie, les cancers épidermoïdes, le cancer du col de l'utérus, le cancer de l'endomètre, le cancer des os, les lymphomes, les tumeurs du
25 système nerveux central, les sarcomes, les leucémies et les adénomes.

Dans un mode de réalisation particulier, le cancer est le cancer colorectal ou le cancer du sein.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant
30 une lipoprotéine de haute densité (HDL) chargée en complexe de platine telle que définie précédemment ou une lipoprotéine de basse densité modifiée chargée en complexe de platine telle que définie précédemment.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant une lipoprotéine basse densité (LDL) chargée en complexe de platine telle que définie précédemment.

- 5 La présente invention concerne également l'utilisation desdites lipoprotéines chargées en complexe de platine telles que définies précédemment ou dudit kit tel que défini précédemment pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du cancer.

10 La présente invention concerne également une méthode pour le traitement du cancer qui comprend l'administration à un patient d'une quantité thérapeutiquement efficace desdites lipoprotéines chargées en complexe de platine telles que définies précédemment. Par quantité thérapeutiquement efficace, on entend toute quantité de lipoprotéines chargées selon la présente invention qui est suffisante pour induire une réponse anti-tumorale ou activer les macrophages.

15

Comme mentionné précédemment, les complexes de platine sont couramment utilisés dans le traitement des cancers. Des exemples de complexe de platine sont le cisplatine, le carboplatine, l'oxaliplatin, le tétraplatine, l'iproplatine, le satraplatine, le nédaplatine, le lobaplatine, le picoplatine ou le ProLindac.

20

Ainsi, dans un mode de réalisation particulier, le complexe de platine est choisi parmi le groupe comprenant le cisplatine, le carboplatine, l'oxaliplatin, le tétraplatine, l'iproplatine, le satraplatine, le nédaplatine, le lobaplatine, le picoplatine et le ProLindac.

- 25 Dans un mode de réalisation préféré, le complexe de platine est le cisplatine.

RESUME DES EXEMPLES

Les inventeurs ont démontré que la vectorisation de complexes de platine, en particulier le cisplatine, était possible via des lipoprotéines de haute densité (HDL) mais aussi via des lipoprotéines de faible densité (LDL).

- 5 En comparaison avec des complexes de platine non vectorisés, la vectorisation des complexes de platine, en particulier le cisplatine, par les lipoprotéines permet d'améliorer l'efficacité de la réponse anti-tumorale tout en diminuant la toxicité liée à l'utilisation des complexes de platine.

10 Les lipoprotéines chargées en complexe de platine, en particulier le cisplatine, telles que définies selon la présente invention, permettent de cibler efficacement différents types cellulaires. Typiquement, les lipoprotéines de type HDL et LDL modifiées chargées permettent de cibler les macrophages et les lipoprotéines de type LDL chargées permettent de cibler les cellules tumorales. En outre, la vectorisation des complexes de platine, en particulier le cisplatine, par les lipoprotéines, permet d'activer davantage les
15 macrophages et de cibler d'avantage les cellules tumorales en comparaison avec des complexes de platine non vectorisés.

Plus particulièrement, l'utilisation à la fois de lipoprotéines LDL chargées en complexe de platine et l'utilisation de lipoprotéines HDL chargées en complexe de platine ou de lipoprotéines LDL modifiées chargées en complexe de platine ou leur mélange, permet
20 d'apporter un effet synergique et donc d'améliorer l'efficacité anti-tumorale en ciblant spécifiquement et simultanément deux types cellulaires. En effet, l'utilisation combinée de lipoprotéines LDL chargées en cisplatine et l'utilisation de lipoprotéines HDL chargées en complexe de platine ou de lipoprotéines LDL modifiées chargées en
25 complexe de platine ou leur mélange, permet de cibler spécifiquement à la fois les cellules tumorales et les macrophages. Cette utilisation permet donc d'exercer un effet cytotoxique plus puissant et de renforcer la réponse immunitaire via l'activation des macrophages tout en diminuant la toxicité liée à l'utilisation du complexe de platine seul.

FIGURES

Figure 1 : Etude de la vectorisation du cisplatine dans les LDL et les HDL

Figure 1A : Vectorisation du cisplatine

5 Figure 1B : Evaluation des échanges du cisplatine entre les LDL/HDL chargées et LDL/HDL natives

Figure 2 : Effet de la vectorisation du cisplatine sur les cellules cancéreuses et sur les macrophages

Figure 2A : Effet de la vectorisation du cisplatine sur les cellules tumorales

10 Figure 2B : Effet de la vectorisation du cisplatine sur les macrophages

Figure 2C : Effet de la vectorisation du cisplatine sur les macrophages (avec LDL oxydée)

15 Figure 3 : Etude de l'activité des LDL chargés en cisplatine et des HDL chargés en cisplatine sur les cellules cancéreuses et sur les macrophages dans les extraits tumoraux

Figure 4 : Vectorisation du cisplatine par les LDL – amélioration de l'efficacité tumorale – *in vivo*

20 Figure 4A : Evolution de la taille des tumeurs en fonction du temps

Figure 5 : Vectorisation du cisplatine par les LDL – diminution de la toxicité *in vivo*

Figure 5A : Effet de la vectorisation du cisplatine par les LDL - volume de la tumeur

25 Figure 5B : Effet de la vectorisation du cisplatine par les LDL - perte de poids

EXEMPLES

Préparation des lipoprotéines chargées en cisplatine

Les lipoprotéines de basse densité et les lipoprotéines de haute densité ont été isolées à partir de plasma de donneurs sains par une technique de séparation par ultracentrifugation sur gradient de densité différentielle au bromure de potassium (KBr) (Technique de Redgrave, 1975). Après extraction, les lipoprotéines ont été ajustées à une concentration en cholestérol de 1mM. 100µl d'une solution de cisplatine (à 10mg/ml, dans du sérum physiologique) ont ensuite été ajoutés pour une concentration finale attendue de 1mg/ml. Afin de permettre l'association du cisplatine avec les lipoprotéines et d'éliminer la fraction non liée de cisplatine, les échantillons ont été incubés 3 heures à 37°C, puis soumis à deux dialyses successives (contre 1000 fois le volume de tampon phosphate salin (PBS), Cutoff 7000Da) de 1 heure et 18 heures respectivement. Après la dialyse, la concentration de cisplatine a été déterminée par spectrométrie d'absorption avec four en graphite (GF-AAS) (Figure 1A). Comme le démontre la figure 1A, la concentration de cisplatine dans les LDL est de 0,3 mg/mL de solution finale, *i.e.* la solution obtenue par addition de lipoprotéines dans une solution de tampon de phosphate salin (PBS) contenant du cis-platine. La concentration de cisplatine dans les HDL est de 0,5 mg/mL de ladite solution finale. Ces concentrations sont mesurées pour une concentration en cholestérol de 1mmol/mL de ladite solution finale.

Ainsi, plus de 30% de la concentration initiale de cisplatine a été vectorisée dans les fractions de HDL et de LDL purifiées.

Etude de la stabilité des lipoprotéines chargées en cisplatine (Figure 1B)

Des LDL contenant du cisplatine vectorisé (LDL-Cis) ont été incubées 18 heures à 37°C avec des HDL natives (HDL 0). De même, des HDL contenant du cisplatine vectorisé (HDL-Cis) ont donc été incubées 18 heures à 37°C avec des LDL natives (LDL 0). Après incubation, ces fractions de lipoprotéines ont été extraites par une technique de séparation par ultracentrifugation sur gradient de densité différentielle au bromure de potassium (KBr). La quantité de cisplatine liée aux différentes fractions a ensuite été déterminée par spectrométrie d'absorption avec four en graphite (GF-AAS).

Comme le démontre la figure 1B, après 18 heures d'incubation, 0,13mg et 0,26mg de cisplatine par mL de ladite solution finale étaient toujours présents respectivement dans les fractions LDL-Cis et HDL-Cis. En revanche, aucune trace de cisplatine n'a été détectée dans les fractions LDL et HDL natives (Figure 1B).

Ces résultats démontrent donc que l'association du cisplatine avec les lipoprotéines est stable. En effet, après 18 heures d'incubation, environ 50% du cisplatine initialement vectorisé était toujours présent dans les fractions de lipoprotéines, et aucun échange de cisplatine avec d'autres classes de lipoprotéines n'est survenu.

5

Etude *in vitro* des effets de la vectorisation du cisplatine par des lipoprotéines HDL et LDL sur des cellules d'adénocarcinome ou de macrophages en culture (Figure 2A)

Les cellules d'adénocarcinome et les macrophages sont majoritairement retrouvés dans les tumeurs du colon.

Pour ce test, des lignées de cancer colorectaux SW480 ont été traitées 48 heures avec des LDL natives (LDL 0), des HDL natives (HDL 0), du cisplatine non vectorisé, des LDL-Cis ou des HDL-Cis (concentration finale de cisplatine : 25 μ M). La viabilité des cellules a ensuite été évaluée par cytométrie de flux. D'après la figure 2A, le cisplatine non vectorisé a induit une mortalité de 41% des cellules cancéreuses. En revanche, les LDL et les HDL natives n'ont induit aucun effet sur les cellules cancéreuses. Par ailleurs, les HDL-Cis ont induit une mortalité de 37% des cellules cancéreuses, ce qui est comparable à l'effet du cisplatine non vectorisé. En revanche, les LDL-Cis ont induit une mortalité de 58% des cellules SW480, soit un effet bien supérieur à celui obtenu pour le cisplatine non vectorisé (Figure 2A).

20

Etude de l'impact de la vectorisation du cisplatine sur la production de ROS (figure 2B)

Après 7 jours de culture dans du M-CSF humain de chez Miltenyi, Biotec. (Macrophage Colony-Stimulating Factor) à 100ng/ml, des macrophages humains ont été différenciés, à partir de monocytes, en macrophages de phénotype alternatif M2 (pro-tumoral). Ces macrophages ont ensuite été stimulés 2 heures avec des LDL natives (LDL 0), des HDL natives (HDL 0), du cisplatine non vectorisé, des LDL-Cis ou des HDL-Cis (concentration finale de cisplatine : 25 μ M). La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*, représentative d'une action anti-tumorale) par les macrophages a ensuite été déterminée par cytométrie de flux après un marquage au Dihydroethidium (DHE). Ce test démontre donc que l'utilisation du cisplatine non vectorisé permet de faire passer la production basale de ROS de 8,2% à 18,2% par les macrophages en comparaison avec l'échantillon témoin (CTL). D'autre part, les HDL

30

natives, les LDL natives et les LDL-Cis n'ont eu aucun effet sur la production de ROS par les macrophages. En revanche, les HDL-Cis induisent une activation des macrophages de 26,8%, soit un effet environ 50% plus efficace que le cisplatine non vectorisé (Figure 2B).

5

Etude de l'impact de la vectorisation du cisplatine sur la production de ROS pour les LDL oxydées chargées en cisplatine (figure 2C)

Le même protocole a été répété afin de comparer l'effet entre les HDL-Cis et les lipoprotéines LDL oxydées chargées en cisplatine (LDLox + Cis) (voir Figure 2C).

10 Ainsi, les LDLox + Cis induisent une activation des macrophages supérieure à celle induite par les HDL-Cis. Les LDL oxydées ont été obtenues par incubation de LDL natives (cholestérol, 1 mM) pendant 24 heures à 37°C en présence de sulfate de cuivre (5 µM). Après oxydation, les LDL oxydées sont dialysées dans un tampon PBS.

15 **Ciblage spécifique**

Les tests précédents permettent donc de démontrer que, *in vitro*, les LDL chargées semblent avoir un effet uniquement sur les cellules cancéreuses, alors que les HDL chargées ont un effet uniquement sur les macrophages. La vectorisation du cisplatine par les HDL permet d'augmenter près de 50% l'efficacité du traitement par rapport au
20 cisplatine non vectorisé. De même, vectorisation du cisplatine par les LDL permet d'augmenter près de 50% l'efficacité du traitement par rapport au cisplatine non vectorisé.

Dans un autre test, des tumeurs provenant d'un modèle d'allogreffe ectopique (sous
25 cutanée) et des tumeurs coliques CT-26 chez la souris BALB-C ont été isolées et mises en contact avec des lipoprotéines fluorescentes (bodipy) de type LDL ou HDL (Figure 3). Comme le démontre la figure 3, les LDL sont préférentiellement captées par les cellules tumorales alors que HDL sont quant à elles majoritairement captées par les macrophages.

30

Tests in vivo

Afin de vérifier les résultats *in vitro* ou *ex vivo* ci-dessus pour un modèle *in vivo*, le modèle d'allogreffe ectopique (sous cutanée) de tumeurs coliques CT-26 chez la souris BALB-C a été utilisé. Comme démontré par la figure 4A, après 25 jours de traitement,

les souris traitées par le LDL-Cis à 1,5 mg/kg présentent des tumeurs bien moins développées en comparaison avec le groupe témoin (CLT) et avec le groupe cisplatine à 1,5 mg/kg non vectorisé. De plus, comme le prouve l'analyse histologique des tumeurs (non montré), la vectorisation améliore la production d'espèces radicalaires (DHE) et induit plus d'apoptose (clivage de la caspase-3) par rapport au groupe cisplatine non vectorisé. Ces expérimentations ont donc montré que la vectorisation d'un agent cytotoxique améliorerait son efficacité anti-tumorale.

Etude de la néphrotoxicité et autres effets secondaires pour le cisplatine vectorisé

Ce test a pour but de vérifier que la vectorisation du cisplatine permet bien de réduire la toxicité générale et rénale en comparaison avec le cisplatine non vectorisé. Pour ce test, du cisplatine a administré à une dose de 20 mg/kg pendant 3 jours à notre modèle murin précédemment décrit, i.e. le modèle d'allogreffe ectopique (sous cutanée) de tumeurs coliques CT-26 chez la souris BALB-C, (protocole validé de néphrotoxicité induite par le cisplatine).

Comme le démontre la figure 5B, le cisplatine non vectorisé induit, d'une part, une perte de poids de près de 15% par rapport à l'échantillon témoin (CTL). D'autre part, comme le prouve les analyses histologiques (non montré), le cisplatine non vectorisé induit une forte néphrotoxicité qui se caractérise par des désépithélialisations, la présence de corps hyalins et des phénomènes de nécrose et d'apoptose. En comparaison, aucune perte de poids ou de signes de néphrotoxicité n'ont été observés pour le groupe cisplatine vectorisé par les LDL (cf. figure 5B). Ainsi, la vectorisation du cisplatine permet de diminuer la toxicité liée à l'utilisation de ce dernier en comparaison avec le cisplatine non vectorisé. D'autre part, le cisplatine vectorisé par les LDL engendre l'apoptose des cellules au sein de la tumeur mais pas celle des cellules rénales (analyse histologique non montrée). L'utilisation du cisplatine vectorisé permet donc de s'affranchir des effets secondaires liés à l'utilisation du cisplatine non vectorisé.

REVENDICATIONS

1. Lipoprotéine de basse densité (LDL) chargée en complexe de platine.
- 5 2. Lipoprotéine selon la revendication 1 utilisée en tant que médicament.
3. Lipoprotéine selon la revendication 1 utilisée pour traiter le cancer.
4. Lipoprotéine selon la revendication 1 utilisée en thérapie pour induire la mort par
10 apoptose des cellules tumorales.
5. Lipoprotéine de haute densité (HDL) chargée en complexe de platine ou lipoprotéine de basse densité oxydée ou acétylée chargée en complexe de platine.
- 15 6. Lipoprotéine selon la revendication 5 utilisée en tant que médicament.
7. Lipoprotéine selon la revendication 5 utilisée pour traiter le cancer.
8. Lipoprotéine selon la revendication 5 utilisée en thérapie pour activer les
20 macrophages.
9. Kit comprenant :
 - une lipoprotéine de haute densité (HDL) chargée en complexe de platine ou une lipoprotéine de basse densité oxydée ou acétylée chargée en complexe de platine ou
25 un mélange de ces dernières, et
 - une lipoprotéine de basse densité (LDL) chargée en complexe de platine.
10. Kit selon la revendication 9 utilisé pour traiter le cancer.
- 30 11. Lipoprotéine de basse densité (LDL) chargée en complexe de platine pour son utilisation contre le cancer, caractérisée en ce qu'elle est utilisée en combinaison avec une lipoprotéine de basse densité oxydée ou acétylée chargée en complexe de platine.
- 35 12. Lipoprotéine de haute densité (HDL) chargée en complexe de platine pour son utilisation contre le cancer, caractérisée en ce qu'elle est utilisée en combinaison avec une lipoprotéine de basse densité (LDL) chargée en complexe de platine.
- 40 13. Lipoprotéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 et 11 à 12 ou kit selon la revendication 9 ou 10, caractérisé(e) en ce que le complexe de platine est choisi parmi le groupe comprenant le cisplatine, le carboplatine, l'oxaliplatine, le tétraplatine, l'iproplatine, le satraplatine, le nédaplatine, le lobaplatine, le picoplatine et le ProLindac.

14. Lipoprotéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 et 11 à 12 ou kit selon la revendication 9 ou 10, caractérisé(e) en ce que le complexe de platine est le cisplatine.

FIGURES

Figure 1 :

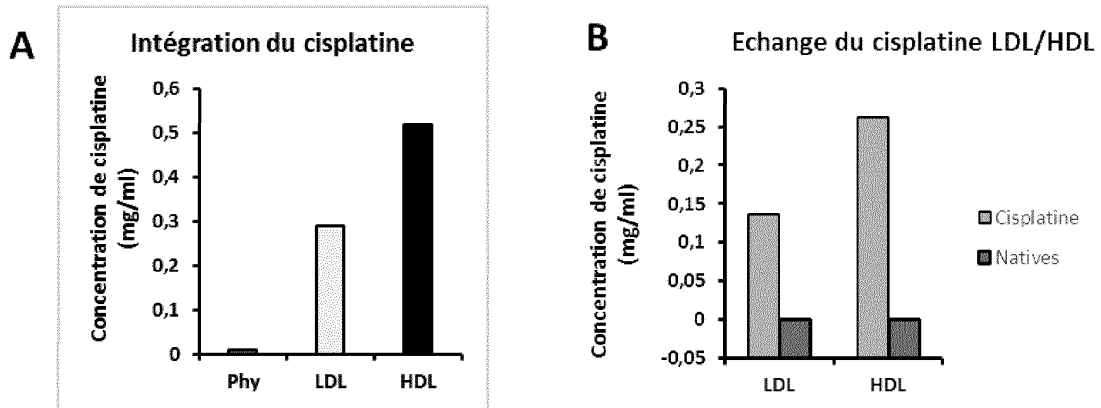


Figure 2 :

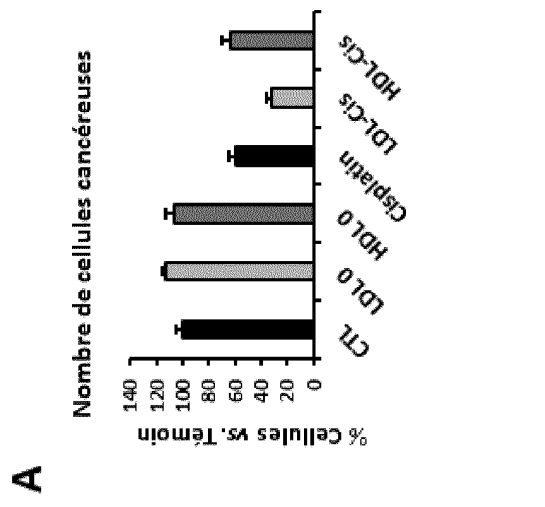
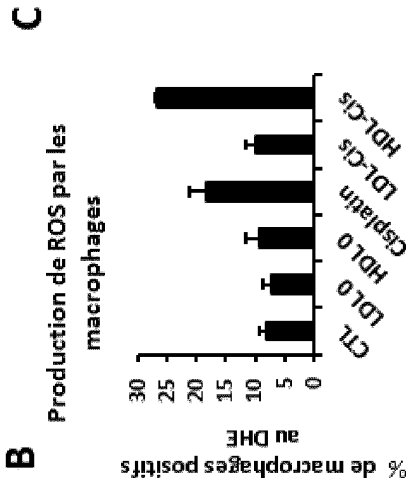
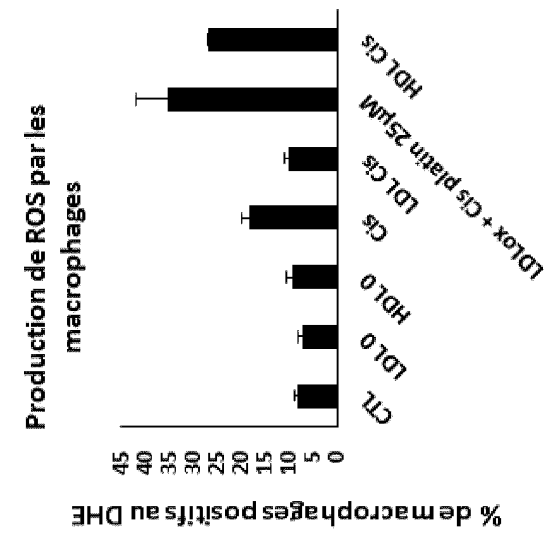


Figure 3 :

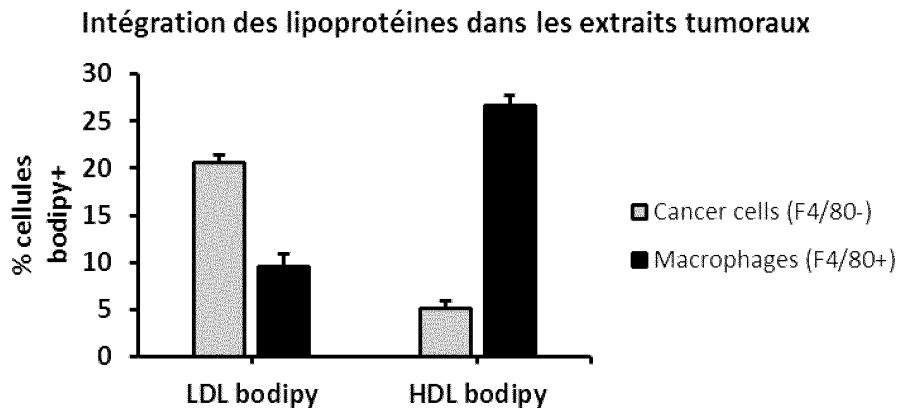
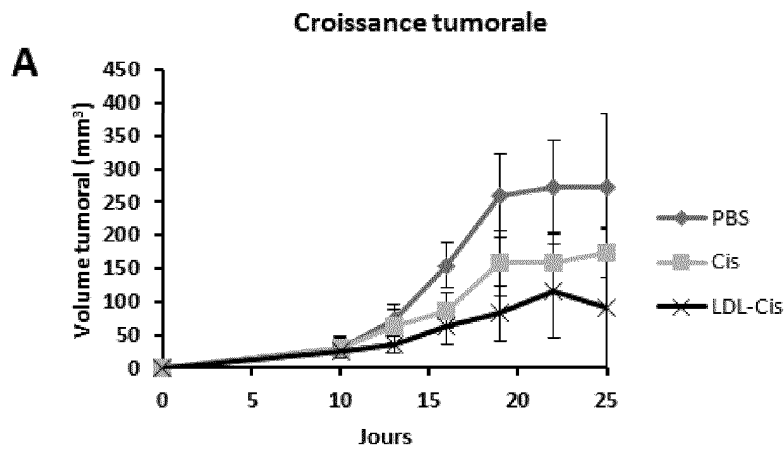
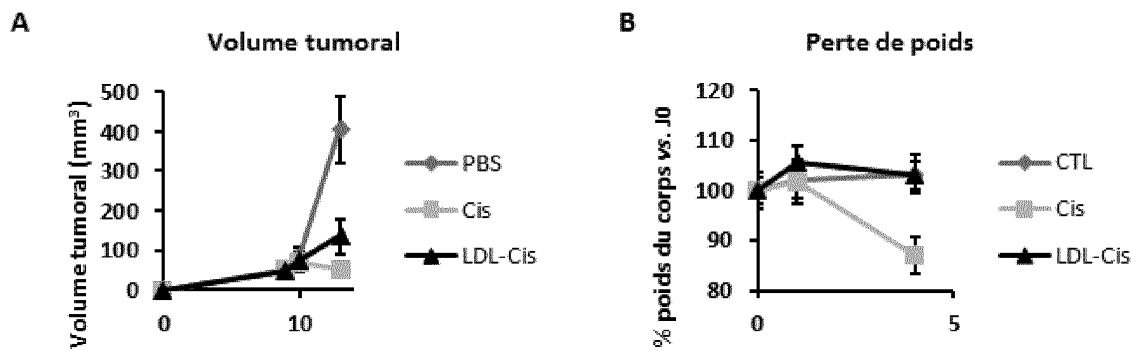


Figure 4 :



5

Figure 5 :



RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

US 2009/110739 A1 (LACKO ANDRAS G [US] ET AL) 30 avril 2009 (2009-04-30)

US 2016/015636 A1 (CORBIN IAN R [US]) 21 janvier 2016 (2016-01-21)

US 6 511 676 B1 (BOULIKAS TENI [US]) 28 janvier 2003 (2003-01-28)

US 2008/096185 A1 (PUTZ GERHARD [DE] ET AL) 24 avril 2008 (2008-04-24)

US 5 945 122 A (ABRA ROBERT M [US] ET AL) 31 août 1999 (1999-08-31)

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

NEANT

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT