

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle

Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2017/207897 A1

(43) Date de la publication internationale
07 décembre 2017 (07.12.2017) W I P O I P C T

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 9/127 (2006.01) A61K 9/51 (2006.01)

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR20 17/05 1320

Publiée:
— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(22) Date de dépôt international :
29 mai 2017 (29.05.2017)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
165493 1 31 mai 2016 (31.05.2016) FR

(71) Déposants : UNIVERSITE DE BOURGOGNE [FR/FR] ;
Esplanade Erasme, 21000 DIJON (FR). INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) [FR/FR] ; 101, rue de Tolbiac, 75013 PARIS (FR). CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE [FR/FR] ; 1 Boulevard Jeanne d'Arc BP77908, 21079 DIJON CEDEX (FR).

(72) Inventeurs : LIRUSSI, Frédéric ; 4bis rue de Dijon, 21560 COUTERNON (FR). GARRIDO-FLEURY, Carmen ; 13 rue des Pépinières, 21240 TALANT (FR). LAGROST, Laurent ; 14 rue Regnard, 21000 DIJON (FR).

(74) Mandataire : CABINET PLASSERAUD ; 66 rue de la Chaussée d'Antin, 75440 PARIS CEDEX 09 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: LIPOPROTEINS CONTAINING PLATINUM COMPLEXES FOR THE TREATMENT OF CANCER

(54) Titre : LIPOPROTEINES CHARGÉES EN COMPLEXES DE PLATINE POUR LE TRAITEMENT DU CANCER

(57) Abstract: The present invention relates to lipoproteins containing platinum complex. The invention also relates to a kit comprising said lipoproteins. In particular, the present invention relates to the use of said platinum-complex-bearing lipoproteins for the specific targeting of macrophages and tumour cells in the treatment of cancer.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet des lipoprotéines chargées en complexe de platine. L'invention a aussi pour objet un kit comprenant lesdites lipoprotéines. En particulier, la présente invention concerne l'utilisation desdites lipoprotéines chargées en complexe de platine pour cibler spécifiquement les macrophages et les cellules tumorales dans le traitement du cancer.



WO 2017/207897 A1

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'iproplatine,
10 le satraplatine, le nédaplatine, le lobaplatine, le picoplatine (*Pt-based drugs: The spotlight will be on proteins, O. Pinato, C. Musetti and C.Sissi, Metallomics 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,
15 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 12, pp. 14721-14730, 1998*). Le cisplatine est un des complexes de
20 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
25 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.

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
30 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'apo lipoprotéine 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.

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

- 10 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 échantillons sont incubés puis dialysés.

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

- 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
25 concentration en cholestérol de Immol/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 concentration en cholestérol de Immol/mL de ladite solution finale.

- 30 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.

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 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 sein.

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

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. 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 Acétylation 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).

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.

30

Plus particulièrement, ladite lipoprotéine de haute densité (HDL) chargée ou ladite lipoprotéine de basse densité modifiée 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 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 sein.

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 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 :

- 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.

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.

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 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.

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.

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 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.

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.

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.

5 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.

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
10 carboplatine, l'oxaliplatin, le tétraplatine, l'iproplatine, le satraplatine, le nédaplatine, le lobaplatine, le picoplatine ou le ProLindac (polymère-platinate-DACH AP5346).

Au sens de la présente invention, on entend par « ProLindac » un complexe
15 diaminocyclohexane (DACH)-platine (Pt) couplé au co-polymère hydroxypropylméthacrylamide (HPMA) (NCI Drug Dictionary, National Cancer Institute).

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
20 satraplatine, le nédaplatine, le lobaplatine, le picoplatine et le ProLindac (polymère-platinate-DACH AP5346).

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 macrophages et de cibler
15 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 complexe de platine ou leur mélange, permet de cibler spécifiquement à la fois les cellules tumorales et les
25 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

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

5 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)

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

15

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

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

20 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

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 100 μ M. 100 μ M d'une solution de cisplatine (à 10 mg/ml, dans du sérum physiologique) ont ensuite été ajoutés pour une concentration finale attendue de 1 mg/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 100 μ M 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, 0,13 mg et 0,26 mg 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.

10 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
15 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
25 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
30 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 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).

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
5 LDL oxydées chargées en cisplatine (LDLox + Cis) (voir Figure 2C). 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.

10

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
15 d'augmenter près de 50% l'efficacité du traitement par rapport au 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 cutanée)
20 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.

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
30 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
5 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
10 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
15 (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
20 non vectorisé.

REVENDICATIONS

- I. 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 apoptose
10 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 macrophages.
20
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 un mélange de ces dernières, et
 - 25 - une lipoprotéine de basse densité (LDL) chargée en complexe de platine.
10. Kit selon la revendication 9 utilisé pour traiter le cancer.
- II. Lipoprotéine de basse densité (LDL) chargée en complexe de platine pour son utilisation
30 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.
12. Lipoprotéine de haute densité (HDL) chargée en complexe de platine pour son utilisation
35 contre le cancer, caractérisée en ce qu'elle est utilisée en combinaison avec une lipoprotéine de basse densité (LDL) chargée en complexe de platine.
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'oxaliplatin, le tétraplatine, l'iprop latine, le satraplatine, le nédaplatine, le lobaplatine, le picoplatine et le ProLindac
40 (polymère-platinate-DACH AP5346).
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 :

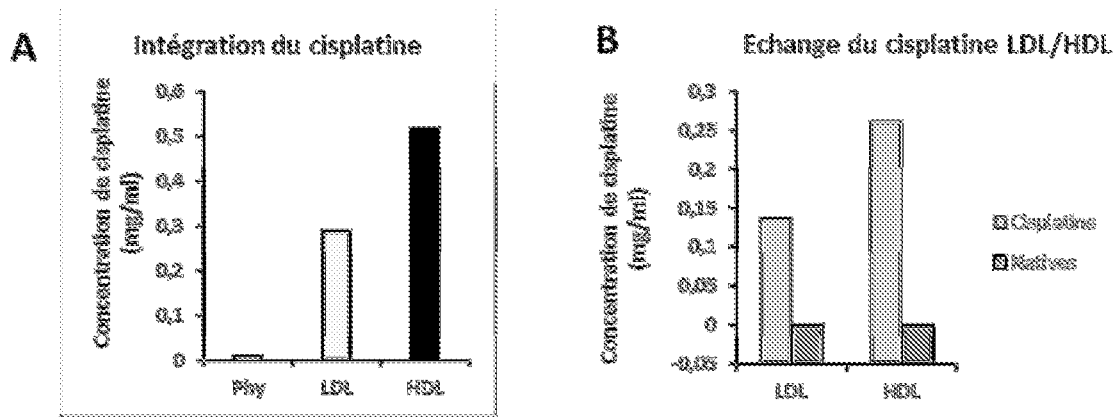


Figure 2 :

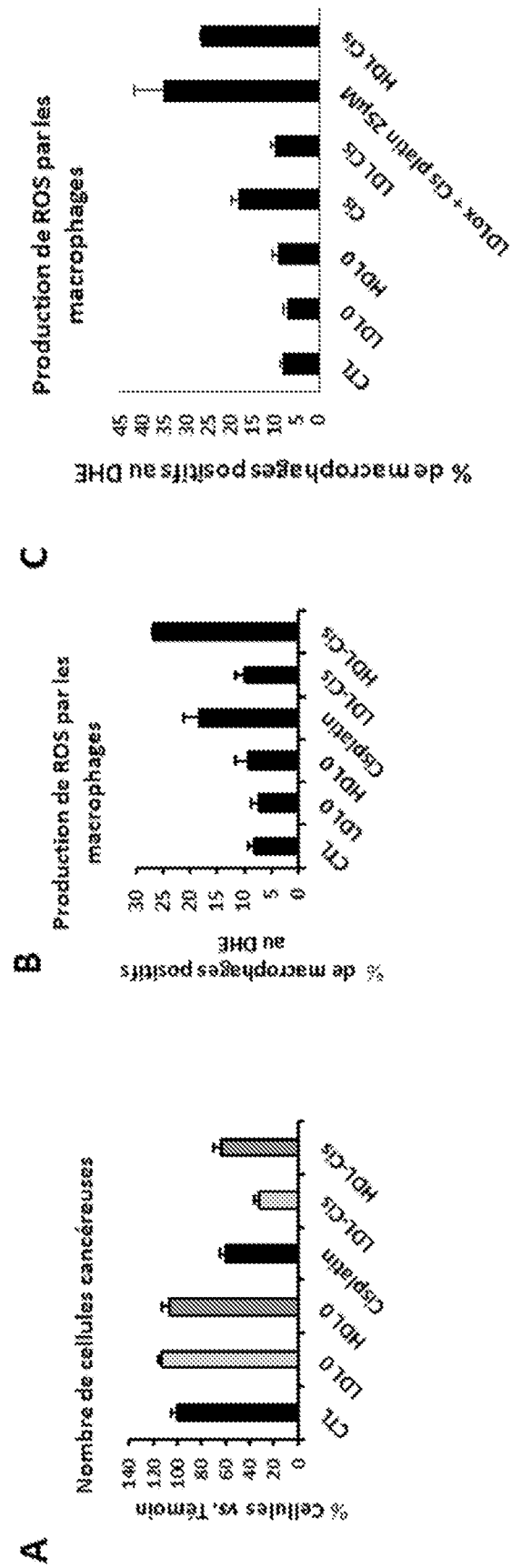


Figure 3 :

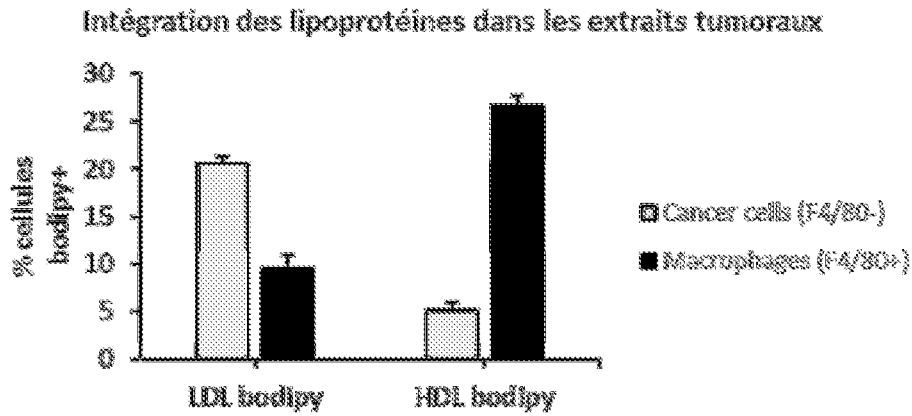
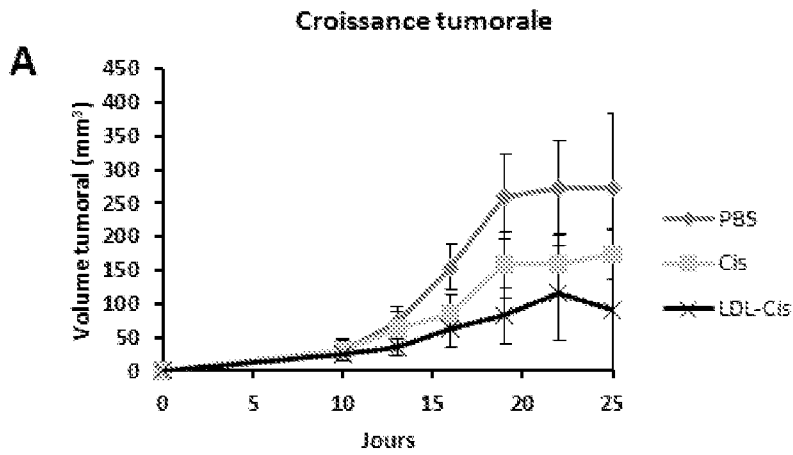
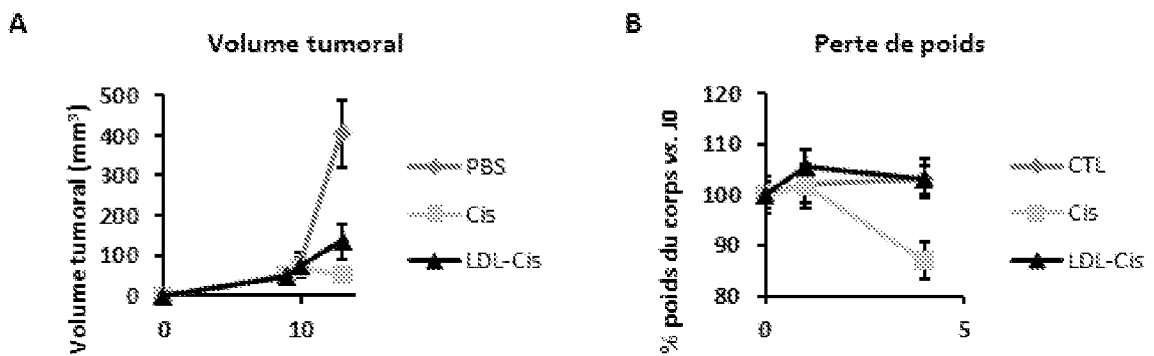


Figure 4 :



5

Figure 5 :



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2017/051320

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K9/127 A61K9/51
 ADD.
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification **System** followed by classification **symbols**)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal , EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009/110739 AI (LACKO ANDRAS G [US] ET AL) 30 April 2009 (2009-04-30) paragraphs [0024] - [0037] , [0098] - [0100] tabl es 2,3 claims; figures	5-14
X	US 2016/015636 AI (CORBIN IAN R [US]) 21 January 2016 (2016-01-21) paragraphs [0008] - [0013] , [0056] - [0060] , [0100] , [0112] - [0119] claims; examples	1-14
A	US 6 511 676 BI (BOULI KAS TENI [US]) 28 January 2003 (2003-01-28) the whole document	1-14
	----- -/- .	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Spécial catégories of cited documents :

<p>"A" document defining the général state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other spécial reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 30 August 2017	Date of mailing of the international search report 08/09/2017
--	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Ceyte, Mathi l de
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2017/051320

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2008/096185 A1 (PUTZ GERHARD [DE] ET AL) 24 April 2008 (2008-04-24) the whole document -----	1-14
A	US 5 945 122 A (ABRA ROBERT M [US] ET AL) 31 August 1999 (1999-08-31) the whole document -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/FR2017/051320
--

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009110739	A1	30-04-2009	NONE
US 2016015636	A1	21-01-2016	US 2016015636 A1 21-01-2016
			WO 2014159851 A2 02-10-2014
US 6511676	B1	28-01-2003	AT 321541 T 15-04-2006
			AU 777151 B2 07-10-2004
			CA 2358948 A1 17-05-2001
			CN 1343118 A 03-04-2002
			DE 60027039 T2 12-04-2007
			DK 1156789 T3 07-08-2006
			EP 1156789 A1 28-11-2001
			ES 2261251 T3 16-11-2006
			GR 20000100384 A 31-07-2001
			JP 5711099 B2 30-04-2015
			JP 2003513911 A 15-04-2003
			JP 2012041364 A 01-03-2012
			PT 1156789 E 31-08-2006
			TW 1259770 B 11-08-2006
			US 6511676 B1 28-01-2003
			US 2003185879 A1 02-10-2003
			US 2009280164 A1 12-11-2009
			WO 0134130 A1 17-05-2001
US 2008096185	A1	24-04-2008	AT 400309 T 15-07-2008
			CA 2443237 A1 17-10-2002
			DE 10117043 A1 07-11-2002
			EP 1372758 A1 02-01-2004
			US 2004115278 A1 17-06-2004
			US 2008096185 A1 24-04-2008
			WO 02081006 A1 17-10-2002
US 5945122	A	31-08-1999	AT 252372 T 15-11-2003
			AU 714992 B2 13-01-2000
			CA 2263455 A1 26-02-1998
			DE 69725747 D1 27-11-2003
			DE 69725747 T2 29-07-2004
			DK 0929293 T3 02-02-2004
			EP 0929293 A1 21-07-1999
			ES 2208946 T3 16-06-2004
			HK 1021320 A1 19-03-2004
			JP 2001501173 A 30-01-2001
			PT 929293 E 31-03-2004
			TW 483759 B 21-04-2002
			US 5945122 A 31-08-1999
			US 6126966 A 03-10-2000
			WO 9807409 A1 26-02-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2017/051320

<p>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A61K9/127 A61K9/51 ADD.</p>				
<p>Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB</p>				
<p>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</p>				
<p>Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A61K</p>				
<p>Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche</p>				
<p>Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal , EMBASE, WPI Data</p>				
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</p>				
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées		
X	US 2009/110739 A1 (LACKO ANDRAS G [US] ET AL) 30 avril 2009 (2009-04-30) alinéas [0024] - [0037], [0098] - [0100] tableaux 2,3 revendications; figures -----	5-14		
X	US 2016/015636 A1 (CORBIN IAN R [US]) 21 janvier 2016 (2016-01-21) alinéas [0008] - [0013], [0056] - [0060], [0100], [0112] - [0119] revendications; exemples -----	1-14		
A	US 6 511 676 B1 (BOULIKAS TENI [US]) 28 janvier 2003 (2003-01-28) le document en entier ----- -/- .	1-14		
<p><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</p>				
<p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </td> <td style="width: 50%; border: none;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </td> </tr> </table>			<p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p>	<p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>
<p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p>	<p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>			
<p>Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée</p> <p style="text-align: center;">30 août 2017</p>		<p>Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale</p> <p style="text-align: center;">08/09/2017</p>		
<p>Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale</p> <p style="text-align: center;">Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016</p>		<p>Fonctionnaire autorisé</p> <p style="text-align: center;">Ceyte, Mathilde</p>		

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 2008/096185 A1 (PUTZ GERHARD [DE] ET AL) 24 avril 2008 (2008-04-24) le document en entier -----	1-14
A	US 5 945 122 A (ABRA ROBERT M [US] ET AL) 31 août 1999 (1999-08-31) le document en entier -----	1-14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2017/051320

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2009110739	AI	30-04-2009	AUCUN	
US 2016015636	AI	21-01-2016	US 2016015636 WO 2014159851	AI A2 21-01-2016 02-10-2014
US 6511676	BI	28-01-2003	AT 321541 AU 777151 CA 2358948 CN 1343118 DE 60027039 DK 1156789 EP 1156789 ES 2261251 GR 20000100384 JP 5711099 JP 2003513911 JP 2012041364 PT 1156789 TW 1259770 US 6511676 US 2003185879 US 2009280164 Wo 0134130	T B2 AI A T2 T3 AI T3 A B2 A A E B BI AI AI AI 15-04-2006 07-10-2004 17-05-2001 03-04-2002 12-04-2007 07-08-2006 28-11-2001 16-11-2006 31-07-2001 30-04-2015 15-04-2003 01-03-2012 31-08-2006 11-08-2006 28-01-2003 02-10-2003 12-11-2009 17-05-2001
US 2008096185	AI	24-04-2008	AT 400309 CA 2443237 DE 10117043 EP 1372758 US 2004115278 US 2008096185 Wo 02081006	T AI AI AI AI AI AI 15-07-2008 17-10-2002 07-11-2002 02-01-2004 17-06-2004 24-04-2008 17-10-2002
US 5945122	A	31-08-1999	AT 252372 AU 714992 CA 2263455 DE 69725747 DE 69725747 DK 0929293 EP 0929293 ES 2208946 HK 1021320 JP 2001501173 PT 929293 TW 483759 US 5945122 US 6126966 wo 9807409	T B2 AI DI T2 T3 AI T3 AI A E B A A AI 15-11-2003 13-01-2000 26-02-1998 27-11-2003 29-07-2004 02-02-2004 21-07-1999 16-06-2004 19-03-2004 30-01-2001 31-03-2004 21-04-2002 31-08-1999 03-10-2000 26-02-1998