Protéine de fusion Robo1-Fc et son utilisation dans le traitement des tumeurs.

La présente invention concerne une protéine recombinante Robo1-Fc et son utilisation pour traiter les maladies dans lesquelles une protéine Slit est surexprimée, notamment le cancer. Elle concerne également une composition comprenant une telle protéine recombinante. Un autre aspect de l'invention consiste en l'utilisation d'une molécule Robo1-Fc en tant qu'outil de diagnostic pour détecter la surexpression d'une molécule de la famille Slit chez un patient.

Les ligands Slits ont tout d'abord été décrits pour leur rôle dans la répulsion de la pousse des axones dans le développement neuronal. Depuis, la voie de régulation Robo/Slit a également été décrite dans l'angiogenèse tumorale. En effet, la voie Robo4/Slit2 a été décrite pour inhiber la réponse des cellules endothéliales au VEGF (Jones C.A. *et al*. *Nat. Med* **14**, 448–453 (2008). La régulation par la voie Robo/Slit permet de canaliser la prolifération excessive de néo vaisseaux non matures ou bourgeons endothéliaux (angiogenèse non productive) et de maturer ces vaisseaux. L'expression de Slit2 au niveau transcriptionnel a été démontré dans plusieurs lignées cancéreuses humaines notamment HCT116 issue de carcinome de colon, Skov-3 issue de carcinome ovarien, HeLa issue de cancer du col de l'utérus, MDA-MB-435 issue de mélanome, Hec-1A issue de cancer de l'utérus et enfin 769-P issue de carcinome rénal (Stella MC *et al.*, Mol Biol Cell. 2009 Vol. 20, Issue 2, 642-657). Une surexpression de la protéine Slit2 a également été démontrée sur des tissus humains issus de carcinomes : carcinome buccal (Wang *et al*. 2008, Cancer Sci. 2008 Mar;99(3):510-7), carcinome de la prostate (Latil et al. 2003 Int J Cancer. 2003 Jan 20;103(3):306-15), du colon (Wang *et al.* 2003, Cancer Cell, Volume 4, Issue 1, July 2003, Pages 19-29), du foie (Avci *et al*, 2008, BMC cancer, **8**:392). Plus récemment, la surexpression de la protéine Slit2 a été montrée sur des échantillons d'endométriose (Shen *et al*, 2009, *AJP* 175 (2): 479).

La protéine Robo1 se présente sous deux isoformes a et b. Le domaine extracellulaire de la protéine Robo1 isoforme b (NP_598334) comprend 5 domaines immunoglobuline : Ig1, Ig2, Ig3, Ig4 et Ig5. La protéine Robo interagit avec les ligands Slit au niveau des domaines Ig1 et Ig2. Liu *et al.* (2004, Mol. Cell Neurosci, 26 :232-240) ont démontré l'importance du domaine Ig2 dans l'interaction avec Slit

et dans l'activité de Robo (chémorépulsion).

L'utilisation d'anticorps spécifiques des protéines Robo1 et Slit2 a été décrite dans la demande WO2003/075860. Ces anticorps permettent d'inhiber l'angiogenèse tumorale.

Cependant, il serait intéressant de proposer une approche alternative pour traiter le cancer, notamment une molécule capable d'inhiber la voie de signalisation de Slit-2.

Les inventeurs ont développé une stratégie de récepteurs Robo1 chimères solubles capables de lier les ligands Slits et par conséquent d'inhiber la signalisation intracellulaire de la voie Robo/Slit. De manière surprenante, les molécules Robo1-Fc selon l'invention ont un effet anti-angiogène en empêchant la formation de vaisseaux matures et non en inhibant la prolifération des cellules endothéliales.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

La présente invention a pour objet une protéine recombinante Robo-Fc comprenant le domaine extracellulaire de la protéine Robo1 isoforme b ou un partie de ce domaine, une région de jonction (linker) et un domaine Fc d'une immunoglobuline.

Dans un mode particulier de réalisation, le domaine extracellulaire de la protéine Robo1 isoforme b est constitué des domaines Ig1 et Ig2. Ces domaines correspondent au peptide de SEQ ID NO.2 codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO.1, ou une séquence présentant au moins 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec les séquences SEQ ID NO.2.

La protéine de fusion comprend également une région de jonction, aussi appelée « linker ». Dans le cadre de la présente invention, le linker permet d'apporter de la stabilité à la protéine recombinante, notamment en limitant le clivage *in vivo*. Des linkers pouvant être utilisés dans une molécule Robo1-Fc sont par exemple GluArgProSerPheVal et GlyGlyGlyGlySer. L'homme du métier a les connaissances suffisantes pour choisir un linker adapté à cette utilisation.

Le domaine Fc des molécules recombinantes Robo1-Fc selon l'invention correspond à un fragment cristallisable d'une immunoglobuline. Ce fragment Fc

peut provenir de différentes immunoglobulines IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Il est responsable de la fonction effectrice de la réponse immune (WO2008/065543).

Dans un mode de réalisation selon l'invention, le domaine Fc provient d'une immunoglobuline IgG4, Dans un mode particulier de réalisation au moins une mutation ou délétion ponctuelle a été introduite dans le domaine Fc de l'IgG4 de sorte à augmenter la stabilité de la molécule, notamment en stabilisant la région charnière constitué par les 2 domaines Fc (Angla *et al.*, 1993, *Mol. Immunol.*, 30: 105-108), à réduire ou éliminer l'activité résiduelle du IgG4-Fc, notamment l'activité effectrice (WO 97/09351) et à augmenter l'homogénéité lors de la production de la protéine recombinante. En particulier au moins deux mutations, de préférence trois mutations ponctuelles ont été introduites dans le domaine Fc de l'IgG4. Dans les molécules Robo1-Fc L1, Robo1-Fc L2 et Robo1-Fc L3 selon l'invention, les mutations préférées sont les suivantes :

- S241P (numérotation Kabat) afin de stabiliser la liaison par pont disulfure dans la région charnière de Fc ;
- L248E (numérotation Kabat) afin d'éliminer l'activité effectrice résiduelle du domaine IgG4-Fc ;
- Absence de la lysine C-terminale afin de réduire l'hétérogénéité de la protéine.

Des molécules Robo1-Fc selon l'invention comprenant les domaines Ig1 et Ig2 de Robo1 isoforme b, un linker et un domaine IgG4 muté comme décrit précédemment sont Robo1-Fc L1, Robo1-Fc L2 et Robo1-Fc L3.

Robo1-Fc L1 correspond à la protéine de séquence SEQ ID NO.4, codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO.3.

Robo1-Fc L2 correspond à la protéine de séquence SEQ ID NO.6, codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO.5.

Robo1-Fc L1 et Robo1-Fc L2 diffèrent par la nature du linker.

Robo1-Fc L3 correspond à la protéine de séquence SEQ ID NO.24, codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO.23.

Dans un mode particulier de l'invention, une ou plusieurs mutations ou délétions ponctuelles ont été introduites afin d'augmenter l'homogénéité lors de la production. En particulier, un acide aminé, de préférence deux acides aminés ont été tronqués en position N-terminale. Une telle molécule Robo-1-Fc selon l'invention est la molécule Robo1-Fc L3, dans laquelle les deux acides aminés (Ser20 et Arg21) ont été tronqués et dans laquelle l'acide aminé Leu 22 a été fusionné au peptide signal de l'interleukine 2.

L'homogénéité des molécules Robo1-Fc selon l'invention est également augmentée en délétant la Lys C-terminale comme décrit précédemment.

L'invention a également pour objet des protéines dont la séquence protéique correspond aux séquences SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.6 ou SEQ ID NO.24 ou présente au moins 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec les séquences SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.6 ou SEQ ID NO.24. Ces variants protéiques présentent la même activité biologique que les protéines de ayant pour séquence SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.6 ou SEQ ID NO.24, en particulier leur capacité à interagir avec les protéines de la famille Slit.

Les protéines Robo1-Fc selon l'invention peuvent être produite par transfection des plasmides d'expression codant pour ces protéines dans tout type cellulaire adapté à l'expression de protéines recombinantes eucaryotes : HEK293, CHO, … puis récupérées dans le surnageant de culture et purifiées selon les méthodes classiques.

La caractérisation des protéines Robo1-Fc L1, Robo1-Fc L2 et Robo1-Fc L3 selon l'invention a permis de confirmer qu'elles présentent les qualités requises pour leur administration en tant qu'agent biothérapeutique.

Une protéine Robo1-Fc selon l'invention a la capacité d'interagir avec une protéine de la famille Slit.

Les protéines Robo1-Fc selon l'invention reconnaissent spécifiquement les protéines Slit1, Slit2 et Slit3 humaines et la protéine Slit2 murine, en particulier par interaction avec leur domaine D2. Leur affinité est similaire vis-à-vis des 3 membres de la famille Slit.

Un autre objet selon l'invention correspond aux molécules d'acides nucléiques codant les protéines selon l'invention.

Ainsi les molécules d'acides nucléiques correspondant aux séquences SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.5 ou SEQ ID NO.23 ou présentant au moins 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec les molécules ayant pour séquence SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.5 ou SEQ ID NO.23 font partie de l'invention.

Un autre objet selon l'invention consiste en l'utilisation d'une protéine Robo1-Fc selon l'invention pour traiter les maladies dans lesquelles une protéine de la famille Slit est surexprimée.

Les protéines de la famille Slit qui peuvent être ciblées par les Robo1-Fc selon l'invention sont Slit-1, Slit-2 ou Slit-3.

Il a été montré que Robo1 pouvaient interagir avec les différents membres de la famille Slit. De ce fait, il est avantageux de noter que les protéines Robo1-Fc selon l'invention sont capables d'inhiber simultanément les voies de signalisation médiées par Slit1, Slit2 et Slit3, ce qui permet d'élargir le spectre thérapeutique en comparaison aux anticorps qui ne sont spécifiques que d'une de ces voies.

Dans un autre mode de réalisation, une protéine Robo1-Fc est utilisée pour traiter les maladies dans lesquelles une protéine de la famille Slit est surexprimée en inhibant l'angiogenèse sans inhiber la prolifération des cellules endothéliales. Cette activité antiangiogénique liée à un défaut de maturation des vaisseaux est appelée « angiogenèse non-productive ».

En effet, les études expérimentales ont montré que les molécules Robo1-Fc selon l'invention sont capables d'inhiber la formation de tubules, sans inhiber la prolifération des cellules endothéliales. Elles permettent de réduire de façon très significative le volume tumoral dans un modèle murin de cancer pulmonaire.

Dans un mode préféré de réalisation, les protéines Robo1-Fc pouvant être utilisées pour traiter les maladies dans lesquelles une protéine Slit est surexprimée sont Robo1-Fc L1, Robo1-Fc L2 et Robo1-Fc L3, de même que les molécules qui en dérivent en incluent notamment des mutations ou délétions ponctuelles visant à augmenter l'homogénéité pendant la production sans altérer significativement les

propriétés biologiques de ces molécules.

De manière générale, les maladies susceptibles d'être traitées par une protéine Robo1-Fc selon l'invention sont toutes les maladies dans lesquelles une inhibition de la voie Slit peut avoir un effet thérapeutique, en particulier les maladies dans lesquelles une protéine de la famille Slit est surexprimée, et notamment celles dans lesquelles Slit2 est surexprimée.

Les molécules Robo1-Fc selon l'invention liant spécifiquement la molécule Slit-2, il est intéressant de noter que celles-ci sont capables d'inhiber simultanément les deux voies dans lesquelles Slit-2 est impliquée, à savoir les voies Robo1/Slit-2 et Robo4/Slit-2.

Les protéines Robo1-Fc selon l'invention peuvent donc être utilisées pour traiter le cancer, notamment le cancer du pancréas, le cancer du colon, le cancer colorectal avec ou sans métastase lymphatique, le cancer du sein, le cancer du poumon et les métastases pulmonaires, le cancer ovarien, le cancer du col de l'utérus, les mélanomes, le cancer rénal, le cancer buccal, le cancer de la prostate, le cancer du foie…

Dans un mode de réalisation particulier, les protéines Robo-Fc sont utilisées pour traiter le cancer du poumon et les métastases pulmonaires.

Les molécules Robo1-Fc selon l'invention peuvent également utilisées en tant que médicament anticancéreux en alternative ou en complément aux thérapeutiques actuelles.

En particulier, ces molécules peuvent être administrées en association (simultanée ou non) avec des composés anti-cancéreux.

Un autre objet de l'invention concerne une composition comprenant une protéine Robo1-Fc telle que définie précédemment et un ou plusieurs excipients pharmaceutiquement acceptable.

Les protéines Robo1-Fc selon l'invention peuvent être formulées dans des compositions pharmaceutiques en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée,

intraoculaire, etc. Préférentiellement, les compositions pharmaceutiques contiennent des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc., ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

Un autre aspect de l'invention consiste en l'utilisation d'une molécule Robo1-Fc en tant qu'outil de diagnostic pour détecter la surexpression d'une molécule de la famille Slit chez un patient. En effet, il a été montré que la voie Slit est impliquée dans de nombreux cancers. La mise à disposition d'un test pour évaluer une dérégulation de la voie de signalisation des Slit est très utile dans le but de sélectionner les patients susceptibles de répondre à un traitement reposant sur l'administration d'une molécule Robo1-Fc.

Cet outil de diagnostic peut se présenter sous forme d'un kit prêt à l'emploi, comprenant une molécule Robo1-Fc sous une forme adaptée à sa mise en contact avec un échantillon biologique de patient (sang, urine, biopsie de tumeurs) susceptible de présenter une surexpression d'une molécule Slit. La molécule Robo-Fc peut être préalablement marquée ou non, et l'association Robo-Fc et Slit est détecter de sorte à évaluer une augmentation de l'expression d'une protéine Slit dans l'échantillon biologique en comparaison avec un échantillon témoin. Ce kit peut par exemple se présenter sous forme d'un kit ELISA.

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : Plasmides d'expression des protéines Robo1-Fc L1, Robo1-Fc L2 et Robo1-Fc L3.

Figure 2 : Evaluation de l'interaction des variants de protéine de fusion Robo1-Fc avec la protéine Slit2 par ELISA.

Figure 3 : Affinité de Robo1-Fc pour les cellules HEK293 n'exprimant pas Slit-2 mesurée par FACS.

Figure 4 : Affinité de Robo1-Fc pour les cellules HEK293 exprimant Slit2 mesurée par FACS.

Figure 5 : Profil pharmacocinétique des protéines Robo1-Fc après une injection iv chez la souris. **A.** Administration de Robo1-Fc L1 **B.** Administration de Robo1-Fc L2.

Figure 6 : Effet de la molécule Robo1-Fc L1 dans un test co-culture avec des cellules endothéliales et des cellules mesenchymateuses **A.** Robo1-Fc L1 inhibe la formation de tubule en culture. **B**. Robo1-Fc L1 inhibe significativement la formation de pseudo-tubule induite par le VEGF.

Figure 7 : Evaluation de l'effet de la molécule Robo1-Fc L1sur un modèle *ex vivo* d'anneau aortique chez la souris. **A** : Description du protocole de préparation d'un anneau aortique et de la mesure des tubules. **B** : a. Contrôle ; b. Robo1-Fc Slit-2-moins 500 µg/mL + VEGF 10 ng/mL ; c. Robo1-Fc L1 500 µg/mL + VEGF 10 ng/mL.

EXEMPLES

Exemple 1 : Préparation des protéines Robo1-Fc

a. Constructions permettant l'expression des protéines recombinantes Robo1-Fc utilisées comme agents biothérapeutiques.

Les protéines recombinantes Robo1-Fc sont constituées d'une fusion entre les 2 premiers domaines immunoglobuline (Ig1-Ig2) de la protéine Robo1 humaine isoforme b (NP_598334) et le domaine Fc de l'immunoglobuline G4 humaine (hIgG4-Fc, SwissProt IGHG4_HUMAN).

Pour obtenir la construction Robo1-Fc L1, un fragment du cDNA (SEQ ID NO.1) correspondant aux domaines immunoglobuline (Ig) Ig1 et Ig2 de cette protéine (SEQ ID NO.2) suivi d'un linker GluArgProSerPheVal a été amplifié par PCR à partir de la banque de cDNA de cœur fœtal humain (ref. HL5042T Clontech). Ce fragment amplifié a ensuite été cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pXL4904 (décrit à la Figure 1) afin que les deux domaines Ig de Robo1 soient exprimés en fusion avec le domaine Fc de l'IgG4 humaine en position C-terminale. Trois mutations

ponctuelles ont été introduites dans le domaine IgG4-Fc pour obtenir les caractéristiques suivantes : S241P (numérotation Kabat) afin de stabiliser la liaison par pont disulfure dans la région charnière de Fc ; L248E afin d'éliminer l'activité effectrice résiduelle du domaine IgG4-Fc ; Absence de la lysine C-terminale afin de réduire l'hétérogénéité de la protéine. La séquence du cDNA utilisée pour exprimer cette protéine recombinante correspond à la séquence SEQ ID NO.3. La protéine recombinante obtenue est nommée Robo1-Fc L1 et correspond à la séquence protéique SEQ ID NO.4.

Pour obtenir la construction Robo1-Fc L2, le même cDNA correspondant aux domaines Ig1-Ig2 mais sans le linker mentionné a été cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pXL4909 (décrit à la Figure 1) qui permet l'expression de ces domaines Ig en fusion avec le même domaine Fc de l'IgG4 contenant les 3 mutations ponctuelles décrites dans la construction de Robo1-Fc L1, mais en introduisant cette fois un linker GlyGlyGlyGlySer en amont du domaine Fc . La séquence du cDNA utilisée pour exprimer cette protéine recombinante correspond à la séquence SEQ ID NO.5 La protéine recombinante obtenue est nommée Robo1-Fc L2 et correspond à la séquence protéique SEQ ID NO.6.

b. Construction des protéines Robo1-Fc utilisées comme contrôles

Pour obtenir la construction Robo1-Fc Slit-2-moins, le cDNA cloné précédemment dans le plasmide pXL4904 a été modifié par PCR pour introduire les mutations ponctuelles permettant les substitutions de la leucine position 38 en glutamine et la phénylalanine en position 89 en tyrosine. La séquence du cDNA utilisée pour exprimer cette protéine recombinante correspond à la séquence SEQ ID NO.7. La protéine recombinante obtenue est nommée Robo1-Fc Slit-2 moins et correspond à la séquence protéique SEQ ID NO.8.

Pour obtenir la construction Robo1-Fc Héparine-moins, le cDNA cloné dans le plasmide pXL4904 a été modifié par PCR pour introduire les mutations ponctuelles permettant les substitutions de l'arginine position 97 en alanine et la lysine position 98 en alanine. La séquence du cDNA utilisée pour exprimer cette protéine recombinante correspond à la séquence SEQ ID NO.9. La protéine recombinante obtenue est nommée Robo1-Fc Héparine-moins et correspond à la séquence protéique SEQ ID NO. 10.

c. Production des différentes protéines Robo1-Fc

Les deux protéines Robo1-Fc L1 et Robo1-Fc L2 ont été produites par transfection transitoire dans la lignée HEK293 (cellules FreeStyle 293-F réf 51-0029 Invitrogen selon les recommandations du fournisseur) à l'aide des plasmides pXL4904 et pXL4909 respectivement, et des plasmides accessoires pXL4544 et pXL4551 permettant l'expression de deux enzymes de glycosylation des N-glycans, *i.e.* la α-2,3-sialyltransférase et la β-1,4-galactosyltransférase comme cela a été décrit dans la demande WO2008/065543. Ces protéines ont aussi été produites par transfection dans la lignée CHO (cellules CHO-S, réf 11619-012 Invitrogen selon les recommandations du fournisseur) à l'aide des plasmides pXL4904 et pXL4909 respectivement.

Les protéines Robo1-Fc L1 et Robo1-Fc L2 exprimées dans le surnageant de culture des cellules HEK293 ont été purifiées par chromatographie sur colonne d'affinité protéine A (MabSelect ref. 17-5199-02 Amersham Biosciences) et élution en tampon 20 mM NaCl / 100 mM acide acétique puis formulée en tampon PBS (réf. 14190-094, Invitrogen).

Les protéines recombinantes Robo1-Fc Slit-2-moins et Robo1-Fc Héparine-moins ont été produites et purifiées de la même manière.

d. Caractérisation physico-chimique des protéines recombinantes Robo1-Fc

L'analyse en SDS-PAGE et en gel perméation ont permis de montrer que les protéines étaient dimériques et pures à plus de 96%. L'analyse par masse spectrométrie a permis de démontrer l'identité de ces protéines, la masse mesurée de la protéine déglycosylée étant en parfait accord avec la masse calculée *in silico.* L'analyse de la composition en monosaccharides et la quantification des acides sialiques des N-glycans comme décrit par Saddic *et al.* 2002. (Methods Mol. Biol. 194:23-36 and Anumula *et al.*1998. Glycobiology 8:685-694) ont permis de démontrer que les protéines étaient très largement sialylées. Les résultats sont présentés dans le tableau 1. On notera que l'analyse N-terminale des molécules Robo1-Fc L1 et Robo1-Fc L2 ont montré que ces protéines purifiées contenaient une proportion variable (0 à 40%) d'une forme tronquée des 2 premiers résidus (Ser20 et Arg21).

Tableau 1 : Identité des protéines Robo1-Fc

	Robo1-Fc L1	**Robo1-Fc L2**
Masse (SDS-PAGE conditions réductrices)	56 kDa	55 kDa
Masse (SEC, HPLC)	180 kDa	180 kDa
Masse (LC/MS après déglycosylation)	48812 Da	48410 Da
Profil des N-Glycans (HPLC)	fortement sialylés 21.4 % asialoglycans	fortement sialylés 20.1 % asialoglycans
Composition en monosaccharides (HPLC)	N-glycans complexes entièrement fucosylés pas de O-glycans	N-glycans complexes entièrement fucosylés pas de O-glycans

Exemple 2 : Préparation des protéines Slit utilisées comme ligand.

Le cDNA codant pour la protéine Slit2 humaine, correspond à la protéine de référence NP_004778. Des fragments de ce cDNA ont été amplifiés par PCR à partir de la banque de cDNA de cerveau humain (réf. 639300, Clontech).

Le cDNA correspondant au domaine D2 a été cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pXL4911 afin d'exprimer ce domaine contenant un Histag en position C-terminale. La séquence du cDNA utilisée pour exprimer cette protéine recombinante correspond à la séquence SEQ ID NO.11. La protéine recombinante obtenue est nommée Slit-2-D2 et correspond à la séquence protéique SEQ ID NO.12.

Le cDNA correspondant aux domaines D1-D2 a été cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pXL4912 afin d'exprimer ces deux domaines contenant un Histag en position C-terminale. La séquence du cDNA utilisée pour exprimer cette

protéine recombinante correspond à la séquence SEQ ID NO.13. La protéine recombinante obtenue est nommée Slit-2-D1D2 et correspond à la séquence protéique SEQ ID NO.14.

Le cDNA correspondant à la partie extracellulaire (Nt) de la protéine Slit2 a été cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pXL5033 afin d'exprimer cette protéine avec un Histag en position C-terminale. La séquence du cDNA utilisée pour exprimer cette protéine recombinante correspond à la séquence SEQ ID NO.15. La protéine recombinante obtenue est nommée Slit-2-N et correspond à la séquence protéique SEQ ID NO.16.

Le cDNA codant pour le domaine D2 de la protéine Slit2 murine, et correspondant au domaine D2 de la protéine de référence décrite NP_848919 a été obtenu à partir du cDNA cloné dans le plasmide pXL4911. Quatre fragments permettant de générer les cinq mutations ponctuelles ont été générés par PCR avec le pXL4911 comme matrice puis ces fragments ont été utilisés comme matrice pour amplifier le cDNA codant pour le domaine D2 total par PCR séquentielle. La protéine porte les mutations Thr311Ser, Lys313Arg, Ile329Leu, Ile411Val et Pro418Ala lui permettant d'être identique au domaine D2 de la protéine Slit2 murine. Ce plasmide permet d'exprimer le domaine D2 de la protéine Slit2 murine avec un Histag en position C-terminale. La séquence du cDNA utilisée pour exprimer cette protéine recombinante correspond à la séquence SEQ ID NO.17. La protéine recombinante obtenue est nommée mSlit-2-D2 et correspond à la séquence protéique SEQ ID NO.18.

Le cDNA codant pour la protéine Slit1 humaine, correspond à la protéine de référence décrite NP_003052. Un fragment de ce cDNA a été amplifié par PCR à partir de la banque de cDNA de cerveau humain (réf. 639300, Clontech). Le cDNA correspondant au domaine D2 a été cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pXL5020 afin d'exprimer ce domaine contenant un Histag en position C-terminale. La séquence du cDNA utilisée pour exprimer cette protéine recombinante correspond à la séquence SEQ ID NO.19. La protéine recombinante obtenue est nommée Slit-1-D2 et correspond à la séquence protéique SEQ ID NO.20.

Le cDNA codant pour la protéine Slit3 humaine, correspond à la protéine de référence décrite NP_003053. Un fragment de ce cDNA a été amplifié par PCR à partir de la banque de cDNA de cerveau humain (réf. 639300, Clontech). Le cDNA

correspondant au domaine D2 a été cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pXL5021 afin d'exprimer ce domaine contenant un Histag en position C-terminale. La séquence du cDNA utilisée pour exprimer cette protéine recombinante correspond à la séquence SEQ ID NO.21. La protéine recombinante obtenue est nommée Slit-3-D2 et correspond à la séquence protéique SEQ ID NO.22.

Les trois protéines nommées Slit-2-D2 Slit-2-D1D2 et Slit-2-N ont été produites par transfection transitoire dans la lignée HEK293 (cellules FreeStyle 293-F selon les recommandations du fournisseur Invitrogen) à l'aide du plasmide pXL4911 (respectivement pXL4912 ou pXL5033).

Les protéines Slit-2-D2 et Slit-2-D1D2 exprimées dans le surnageant de culture des cellules HEK293 ont été purifiées par chromatographie sur colonne de Sépharose Ni-chelating (réf. 17-0409-03, Amersham Biosciences) et élution en tampon imidazole puis formulée en tampon PBS (réf. 14190-094, Invitrogen) ajusté à 1 M NaCl. L'analyse par masse spectrométrie (LC/MS) a permis de démontrer l'identité de ces protéines.

De façon comparable, les trois protéines nommées mSlit2-D2, Slit1-D2 et Slit3-D2 ont été produites purifiées et caractérisées.

Exemple 3 : Etude de l'affinité des protéines recombinantes Robo1-Fc pour les protéines Slit et pour l'héparine à l'aide de trois méthodes : ELISA, SPR et FACS

a. Affinité des protéines Robo1-Fc pour l'héparine

Pour déterminer l'affinité des constructions Robo1-Fc à l'héparine, 2 mg de protéine Robo1-Fc, purifié et formulée dans 10 mM phosphate pH 7.0 a été chromatographié sur une colonne héparine (1 mL HiTrap Heparin-Sepharose HP, GE Heathcare) par élution avec un gradient linéaire de NaCl de 0 à 1,5 M.

Sur le tableau 2 est indiquée la concentration en NaCl de 448 mM nécessaire pour éluer la protéine Robo1-Fc L1 comme décrit dans la littérature (Fukuhara, N. et al. 2008 J. Biol. Chem. 283 p16226-16234).

Tableau 2 : Affinité de Robo1-Fc à l'héparine

Construit Robo1-Fc	**Décrochage de la colonne héparine [NaCl], mM**
Robo1-Fc L1	448
Robo1-Fc Héparine-moins	Absence de fixation

Ces résultats montrent que la protéine Robo1-Fc Héparine-moins qui n'est pas retenue sur cette colonne donc qu'elle n'a plus d'affinité à l'héparine. Cette protéine est donc un mutant héparine négatif.

b. Evaluation de l'interaction des variants de protéine Robo1-Fc avec le domaine D2 de la protéine Slit2 humaine

Cet exemple décrit l'interaction des 2 variants nommés Robo1-Fc L1 et Robo1-Fc L2 avec leur ligand naturel (dans ces expériences le domaine D2 de Slit2 humain) par dosage ELISA.

La protéine humaine Slit2-D2 a été fixé sur des boîtes Immulon-4 enzyme-linked (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). Une gamme de concentration (de 20 µg/mL à 0.02 µg/mL) des variants Robo1-Fc L1 et Robo1-Fc L2 ont été ajoutés puis détectés grâce à l'anticorps de chèvre anti-humain IgG conjugué à la péroxidase (Sigma ; réf. A0170-dilution au 1:50000). La révélation a été réalisée avec le substrat TMB- H_2O_2 (Interchim ; réf UP664780) et les mesures avec le lecteur de plaques à 450 nm. Les résultats obtenus sont reportés dans la figure 2. Ils montrent que Les deux variants Robo1-Fc L1 et L2 interagissent spécifiquement avec la protéine Slit-2 humaine (en particulier avec le domaine D2).

c. Evaluation de l'interaction de la protéine Robo1-Fc avec les variants humains de la famille Slit, à savoir Slit-1 et Slit-3

Cet exemple décrit l'interaction de la protéine de fusion Robo1-Fc L1 avec les variants Slit-1-D2, Slit-2-D2 et Slit-3-D2 par dosage ELISA.

Le domaine D2 des variants Slit humains ont été fixé sur des boîtes Immulon-4 enzyme-linked (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). Une gamme de concentration (de 1 µg/mL à 0.001 µg/mL) de la protéine de fusion Robo1-Fc L1 a été ajouté puis détecté grâce à l'anticorps de chèvre anti-humain IgG conjugué à la péroxidase (Sigma ; réf. A0170-dilution au 1:50000). La révélation a été réalisée avec le substrat TMB-H_2O_2 (Interchim ; réf UP664780) et les mesures avec le lecteur de plaques à 450 nm. De même le variant Robo1-Fc Slit-2-moins qui est muté au niveau du site de liaison à Slit2, a été évalué suivant une gamme de concentration (de 20 µg/mL à 0.02 µg/mL) par dosage ELISA dans les mêmes conditions décrites ci-dessus. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3 : Affinité de Robo1-Fc pour les variants humains de la protéine Slit

Protéine Slit (ligand)	**Protéine Robo1-Fc**	**EC50 (µg/mL)**	**CV (%)**
Slit-2-D2	Robo1-Fc L1	1.32 E-01	3.3
Slit-1-D2	Robo1-Fc L1	7.88 E-02	3.9
Slit-3-D2	Robo1-Fc L1	2.60 E-01	12
Slit-2-D2	Robo1-Fc Slit-2-moins	1.78 E+01	18

Ces résultats montrent que la protéine Robo1-Fc interagit spécifiquement avec les trois protéines de la famille, Slit-1, Slit-2 et Slit-3 (en particulier avec leur domaine D2).

De plus, la protéine Robo1-Fc Slit-2-moins n'a plus d'affinité à l'héparine et elle est donc un mutant héparine négatif.

d. Evaluation de l'interaction de la protéine Robo1-Fc avec la protéine Slit-2 murine

Cet exemple décrit l'interaction de la protéine de fusion Robo1-Fc L1 avec la protéine murine mSlit-2-D2 par dosage ELISA.

La protéine murine mSlit-2-D2 a été fixée sur une boîte Immulon-4 enzyme-linked (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). Une gamme de concentration (de 2 µg/mL à 0.002 µg/mL) de la protéine de fusion Robo1-Fc L1 a été ajouté puis détecté grâce à l'anticorps de chèvre anti-humain IgG conjugué à la péroxidase (Sigma ; réf. A0170-dilution au 1:50000). La révélation a été réalisée avec le substrat TMB-H_2O_2 (Interchim ; réf UP664780) et les mesures avec le lecteur de plaques à 450 nm. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 : Affinité de Robo1-Fc L1 à la protéine Slit-2 murine

Protéine étudiée	EC50 (µg/mL)	CV (%)
mSlit2-D2	2.21 E-01	18

Ces résultats montent que la protéine Robo1-Fc interagit spécifiquement avec la protéine Slit-2 murine

e. Affinité de Robo1-Fc à la protéine Slit mesurée par SPR

Cet exemple décrit la détermination de la constante d'affinité de la protéine de fusion Robo1-Fc L1 avec la protéine Slit-2 humaine (dans cette expérience Slit-2-D2) par SPR (Surface Plasmon Resonance ; BIAcore 2000). L'interaction entre la protéine Robo1-Fc et la protéine Slit2 humaine a été analysée après avoir fixé la protéine de fusion Robo1-Fc sur une chips CM5. Les mesures de cinétiques sont réalisées selon le protocole de Canziani *et al* (2004. Anal. Biochem. 325 :301-307).

Tableau 5 : Constante d'affinité de Robo-Fc L1avec Slit2-D2 humain par SPR (analyse de type steady-state)

Protéine	K_D (nM)
Robo1-Fc L1	32

Une seconde méthode qui consiste à déterminer la constante d'affinité entre la protéine de fusion Robo1-Fc L1 et la protéine Slit2 humaine a été analysée après avoir fixé la protéine Slit-2-D2 sur la chips CM5. Les mesures de cinétiques sont réalisées selon le protocole de Canziani *et al* (2004. Anal. Biochem. 325 :301-307) par la méthode de Sctachard suivant un modèle avec deux sites de liaison non équivalents.

Tableau 6 : Constante d'affinité de Robo1-Fc avec Slit2-D2 humain par SPR selon le modèle bi-phasique de Scatchard

Robo1-Fc L1	**K_D (nM)**
Site de haute affinité	K_{D1} : 1,5
Site de faible affinité	K_{D2} :160

f. Affinité de Robo1-Fc à Slit mesurée par FACS

Cet exemple décrit l'affinité de la protéine Robo1-Fc sur cellules mammifères HEK293 exprimant Slit2.

Les cellules HEK293 décrites et utilisées comme dans l'exemple 1, ont été transfectées soit avec un plasmide ballast, n'ayant pas de cDNA codant dans la cellule mammifère, soit le plasmide pXL4911 codant pour la protéine Slit-2-D2; soit le plasmide pXL4912 codant pour la protéine Slit-2-D1D2 ; ou soit pXL5033 codant pour la protéine Slit-2-N décrit dans l'exemple 2. Les cellules ont été réparties en plaque 96-puits 48 heures post-transfection, et la protéine Robo1-Fc a été ajoutée dans une gamme de concentrations de 0,01 à 3mg/L pendant 30 min à 4°C. La protéine Robo1-Fc est soit l'agent bio-thérapeutique Robo-Fc L1, soit le mutant Robo1-Fc Slit-2-moins, soit le mutant Robo1-Fc Héparine-moins. Les cellules ont été lavées et l'anticorps anti-Fc humain marqué à l'Alexa 488 (réf : A-11013, Invitrogen) a été incubé pendant 30 min à 4°C. Puis les cellules HEK293 marquées sont quantifiées par FACS (Geomean).

La figure 3 décrit la fixation des cellules HEK293 à la protéine Robo1-Fc *via* la fluorescence mesurée en FACS en absence d'expression de Slit-2. La protéine Robo1-Fc ainsi que le mutant Robo1-Fc Slit-2-moins se fixent aux cellules HEK293 alors que le mutant Robo1-Fc Héparine-moins ne se fixe pas. Robo1-Fc se fixe donc en partie aux cellules HEK293 via le binding à l'héparine aux faibles concentrations en Robo1-Fc de 0,3 à 0,03 mg/L.

La figure 4 décrit le binding des cellules HEK293 à la protéine Robo1-Fc *via* la fluorescence mesurée en FACS quand Slit-2-N est exprimée par transfection transitoire. Seule la protéine Robo1-Fc se fixe aux cellules HEK293 exprimant Slit-2-N. Les mutants Robo1-Fc Slit-2-moins et Robo1-Fc Héparine-moins ne se fixent pas (ou quasiment pas) dans la gamme de concentrations de Robo1-Fc de 3.0 à 0, 3 mg/L par rapport à la protéine Robo1-Fc L1 biothérapeutique.

Le tableau 7 décrit les constantes d'affinité mesurées par FACS de la protéine Robo1-Fc lorsque les protéines Slit-2-N, Slit-2-D1D2 ou Slit-2-D2 sont exprimées dans la lignée HEK293.

Tableau 7 : Affinité de Robo1-Fc à la protéine Slit-2 sur cellule par FACS

Robo1-Fc ligand	**Protéine exprimée transitoirement dans HEK293**	**K_D (nM)**
Robo1-Fc L1	Slit-2-N	1,2
	Slit-2-D1D2	0,98
	Slit-2-D2	Fixation très faible
Robo1-Fc Héparine-moins	Slit-2-N	43
	Slit-2-D1D2	41
Robo1-Fc Slit-2-moins	Slit-2-N	Pas de fixation

Comme dans les exemples précédents, le mutant Robo1-Fc Slit-2-moins s'est avéré Slit-2 négatif et le mutant Robo1-Fc Héparine-moins présente une affinité plus faible à Slit2 que la protéine bio-thérapeutique.

Robo1-Fc se fixe sur Slit-2-N et Slit-2-D1D2 exprimées par les cellules HEK293 avec des affinités comparables qui sont meilleures que celle avec Slit-2-D2.

Exemple 4 : Propriétés pharmacocinétiques des protéines Robo1-Fc L1 et Robo1-Fc L2

Cet exemple décrit le profil pharmacocinétique et la concentration plasmatique de la protéine Robo1-Fc injectée une fois chez la souris en intraveineuse (iv).

Trois souris Balb/C (pour chaque temps) ont été injectées via la veine caudale avec chacune des protéines Robo1-Fc à 2.5 mg/mL à raison de 100 µL/10 g (≈ 25 mg/kg). Aux temps prédéterminés (0,5 ; 1 ; 6 ; 24 ; 48 ; et 72 h après administration), les souris ont été anesthésiées, le sang a été prélevé et collecté dans un tube contenant 10 µL de citrate (CPD-A, C-4431 Sigma) et 2 µL d'inhibiteurs de protéase (Complete Protease Inhibitor Mix, Roche Molecular Biochemical). Les tubes ont été centrifugés et les échantillons de plasma ont été collectés et congelés à -20°C.

La protéine Slit2 (Slit-2-D2) a été coatée dans les puits des boites de 96-puits, les échantillons de plasma dilués au 1/5000 et 1/20000 ont été mis en contact pendant une heure à 37°C. L'anticorps anti-Fc humain conjugué à la péroxidase (réf. 31413, Pierce) a été ensuite incubé puis révélé avec le TMB-H_2O_2 (ref UP664780, Interchim) et l'absorbance a été lue à 450 nm. Une gamme étalon a été réalisée avec chaque protéine Robo1-Fc purifiée.

Les concentrations plasmatiques des protéines Robo1-Fc L1 et Robo1-Fc L2 sont représentées sur la figure 5. Les paramètres pharmacocinétiques sont décrits dans le tableau 8 suivant et montrent que la protéine est stable après injection chez la souris.

Tableau 8 : Paramètres pharmacocinétiques des protéines Robo1-Fc après injection iv chez la souris

Protéine à 25 mg/kg	C_0 µg/mL	$T_{1/2}$ h	AUC (0-last) µg.h/mL	AUC (0-24h) µg.h/mL	Cl mL/H/kg	Vdss mL/kg
Robo1-Fc L1	203	158	3655	1879	2,2	470
Robo1-Fc L2	198	142	3973	2042	2,2	417

Exemple 5 : Description de la protéine bio-thérapeutique Robo1-Fc améliorée pour son homogénéité en position N-terminale.

Cet exemple décrit le plasmide d'expression, la production et la caractérisation physico-chimique d'une autre protéine Robo1-Fc nommée Robo1-Fc L3 qui est différente de la protéine Robo1-Fc L1 par l'absence des deux premiers résidus Ser20 et Arg21.

Le cDNA cloné dans le plasmide pXL4904 a été modifié par PCR pour éliminer les codons Ser20 et Arg21 et fusionné le codon suivant (Leu22) à la séquence codante du signal peptide de l'nterleukine 2. Le plasmide d'expression pXL5004 a alors été généré, voir figure 1. La séquence du cDNA utilisée pour exprimer cette protéine recombinante correspond à la séquence SEQ ID NO.23.

La protéine Robo1-Fc L3 a été produite, purifiée et caractérisée comme décrit dans l'exemple 1. L'analyse N-terminale a montré que cette protéine purifiée était parfaitement homogène. La protéine recombinante obtenue est nommée Robo1-Fc L3 et correspond à la séquence protéique SEQ ID NO.24.

Exemple 6 : Evaluation de l'interaction de la protéine Robo1-Fc L3 avec la protéine Slit2 humaine.

Cet exemple décrit l'interaction de la protéine de fusion Robo1-Fc L3 avec la protéine Slit2 humaine (Slit-2-D2) par dosage ELISA.

La protéine Slit-2-D2 humaine a été fixée sur des boîtes Immulon-4 enzyme-linked (VWR Scientific Inc. Swedesboro, NJ). Une gamme de concentration (de 1 µg/mL à 0.001 µg/mL) de la protéine de fusion Robo1-Fc L3 a été ajouté puis détecté grâce à l'anticorps de chèvre anti-humain IgG conjugué à la péroxidase (Sigma ; réf. A0170-dilution au 1:50000). La révélation a été réalisée avec le substrat TMB-H_2O_2 (Interchim ; réf UP664780) et les mesures avec le lecteur de plaques à 450 nm. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 9 ci-dessous.

Tableau 9 : Affinité de la protéine Robo1-Fc L3 pour la protéine Slit2 – Comparaison avec la protéine Robo1-Fc L1

Protéines étudiées	**EC50 (µg/ml)**	**CV (%)**
Robo1-Fc L1	0,13	3,3
Robo1-Fc L3	0,17	4,4

Ces résultats montrent que les affinités des deux variants Robo1-Fc L1 et Robo1-Fc L3 pour la protéine Slit2-D2 sont comparables.

Exemple 7 : Evaluation de l'activité de la protéine Robo-Fc sur la neovascularisation

a. Modèle *in vitro* de co-culture de cellules endothéliales et de fibroblastes : activité spécifique de la molécule Robo1-Fc L1

Le modèle d'angiogenèse *in vitro* correspond à un réarrangement de cellules endothéliales veineuses humaines sur une monocouche de fibroblastes de derme humain. Brièvement, les fibroblastes (Lonza) sont ensemencés dans des plaques de 24 puits (Becton Dickinson) à 40 000 cellules/puits dans 1 ml de milieu. Après 3 jours de prolifération (J3), des cellules endothéliales veineuses humaines (HUVEC-Lonza) sont ensemencées sur la monocouche de cellules fibroblastiques à 10

000 cellules/puits dans 500 µl de milieu EGM® (Endothelial Basal Medium, Lonza) + 2% SVF (sérum de veau fœtal - Lonza) + hEGF (Epidermal Growth Factor Humaine Recombinante - Lonza) 10 µg/ml. Les cellules sont stimulées avec le VEGF (R&D Systems) 30 ng/ml, avec la molécule Robo1-Fc L1 ou un contrôle négatif Robo1-Fc Slit-2-moins à la concentration de 500µg/ml (J3 à J9). Après 3 jours, le milieu est remplacé et les puits sont stimulés en fonction des conditions de l'expérimentation.

Après 2 jours, les cellules sont fixées par de l'éthanol et marquées avec un anticorps spécifique des HUVECs anti-CD31, suivi d'un anticorps anti-alkaline phosphaphatase puis révélés avec un substrat alkaline-phosphatase (J11). Une quantification des tubules marqués avec l'anticorps anti-CD31 est réalisée grâce à des acquisitions d'image faite au microscope (objectif X4) et l'analyse de la longueur des pseudo-tubules est effectuée à l'aide d'un logiciel d'image (BIOCOM-logiciel Visiolab 2000) (Figure 6).

Dans ce test d'angiogenèse *in vitro,* Robo1-Fc L1 (500µg/ml) montre une activité inhibitrice de la formation des tubules formés par les HUVECs. Cette inhibition s'élève à 82% et elle est statistiquement significative par rapport à l'effet obtenu avec la molécule Robo1-Fc Slit-2-moins (contrôle négatif).

b. Modèle *ex vivo* d'anneau aortique de souris: activité spécifique de la molécule Robo1-Fc L1

La molécule Robo1-Fc L1 a été évaluée dans un modèle d'anneau aortique de souris. Brièvement, des aortes de souris sont prélevées et nettoyées et découpées en tronçon de 1 mm (J0). Ces anneaux sont inclus dans du collagène de rat en présence de VEGF à 10 ng/ml, de la molécule Robo1-Fc L1 ou d'un contrôle négatif Robo1-Fc Slit-2-moins à la concentration de 500µg/ml. Des tubules vont se former à partir de l'anneau mimant ainsi *in vitro* la formation de néovaisseaux. Après 6 jours, une quantification des tubules marqués est réalisée grâce à des acquisitions d'image faite au microscope (objectif X3) (Figure 7A) et l'analyse de la longueur des pseudo-tubules est effectuée à l'aide d'un logiciel d'image (BIOCOM-logiciel Visiolab 2000) (Figure 7).

Dans ces conditions expérimentales, Robo1-Fc L1 (500µg/ml) montre une forte

activité inhibitrice de la formation des tubules formés en comparaison avec la molécule Robo1-Fc Slit-2-moins utilisée comme contrôle négatif.

Ces résultats suggèrent que Robo1-Fc L1 est capable d'inhiber la formation de néovaisseaux sans inhiber la prolifération des cellules endothéliales. Cette activité antiangiogénique liée à un défaut de maturation des vaisseaux est appelée « angiogenèse non-productive ».

Exemple 8 : Evaluation de la protéine Robo1-Fc L1 dans un modèle de tumeur pulmonaire chez la souris.

La molécule Robo1-Fc L1 a été évaluée dans un modèle de tumeur cancéreuse pulmonaire chez la souris C57/Bl6.

a. Modèle murin de tumeur pulmonaire

Pour établir le modèle murin de tumeur pulmonaire, des souris C57/Bl6 femelles âgées de 8 sem ont été anesthésiées. La zone au niveau de l'omoplate gauche de la souris a été rasée et désinfectée. Une incision de 1 cm a été pratiquée au dessus de l'omoplate.

Les cellules à injecter sont issues d'une lignée tumorale Lewis lung carcinoma (ATCC, CRL-1642). Les cellules ont été mélangées à du Matrigel® dans un rapport de 1 vol de Matrigel pour 4 vol de cellules .La concentration cellulaire était de 62500 cellules/ml. Les cellules ont été injectées dans le poumon à raison de 20µl par souris puis la plaie a été suturée.

Au bout de 23 jours, les souris ont été euthanasiées. La cage thoracique a été ouverte, le poumon gauche et la chaine médiastinale ont été prélevés. La tumeur présente sur le poumon gauche a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse électronique pour déterminer le volume tumoral selon la formule : l2xLx0.52. La chaine médiastinale est pesée. Les résultats sont exprimés en valeur moyenne ± ecart-type à la moyenne. L'analyse statistique a été faite par un test paramétrique de Student.

b. Traitement des souris porteuses d'une tumeur pulmonaire avec la protéine recombinante Robo1-Fc

Le traitement à l'aide de la protéine Robo1-Fc a été réalisé comme suit : Une préparation contenant la protéine Robo1-Fc a été injectée à la dose de 25 mg/kg/jour par voie intrapéritonéale à J10, J14, J17, et J21 post injection des cellules tumorales. Le groupe contrôle a été injecté avec du tampon PBS (10ml/kg).

c. Résultats

A J23, le volume moyen des tumeurs obtenues dans le groupe traité avec la protéine recombinanate Robo1-Fc etait de 21,45± 2,16 mm3 ; le volume moyen des tumeurs obtenues dans le groupe contrôle était de 39,93±8,41 mm3. La réduction du volume tumoral chez les animaux traités avec la protéine Robo1-Fc est de 46%. Cette différence est statistiquement significative ($p<0.05$). Le poids moyen de la chaîne médiastinale (ganglions métastatiques) obtenue dans le groupe traité avec la protéine Robo1-Fc est de 12.50± 1.26 mg. Le poids moyen de la chaîne médiastinale obtenue dans le groupe contrôle est de 30.67± 7.69 mg. La réduction du poids de la chaine médiastinale pour le groupe traité avec la protéine Robo1-Fc est de 59% à la limite de la significativité ($p=0.07$).

Revendications

1. Protéine recombinante Robo-Fc comprenant le domaine extracellulaire de la protéine Robo1 ou une partie de ce domaine, un linker et un domaine Fc d'une immunoglobuline, dans laquelle ledit domaine extracellulaire provient de l'isorforme b de la protéine Robo1.

2. Protéine selon la revendication 1, dans laquelle le domaine extracellulaire de Robo1 comprend les domaines immunoglobuline Ig1 et Ig2.

3. Protéine selon la revendication 2, dans laquelle le domaine extracellulaire de Robo1 présente au moins 80 % d'identité avec la séquence SEQ ID NO.2.

4. Protéine selon l'une des revendications précédentes dans laquelle le domaine Fc provient de l'immunoglobuline G4 humaine.

5. Protéine selon la revendication 4, dans laquelle le domaine Fc contient au moins une mutation ponctuelle visant augmenter la stabilité de la protéine et/ou à éliminer l'activité effectrice résiduelle du domaine Fc et/ou à augmenter l'homogénéité lors de sa production.

6. Protéine selon la revendication 5 dans laquelle le domaine Fc comporte les mutations S241P et L248E et dans lequel de la lysine située en position C-terminale est absente.

7. Protéine selon l'une des revendications 2 à 4 dans laquelle les acides aminés Ser20 et Arg21 ont été délétés de sorte à augmenter l'homogénéité lors de sa production

8. Protéine selon l'une des revendications 1 à 4 dont la séquence présente au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO.6 ou SEQ ID NO. 24.

9. Molécule d'acides nucléiques codant pour l'une des protéines telles que définies aux revendications 1 à 8.

10. Molécule d'acides nucléiques correspondant à la séquence SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.5 ou SEQ ID NO.23 ou présentant au moins 80% d'identité avec les molécules ayant pour séquence SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.5 ou SEQ ID NO.23.

11. Protéine recombinante Robo1-Fc selon l'une des revendications 1 à 8 pour usage comme médicament.

12. Protéine pour usage selon la revendication 11 dans le traitement des maladies dans lesquelles une protéine de la famille Slit est surexprimée.

13. Protéine pour usage selon la revendication 11 pour traiter un cancer.

14. Protéine pour usage selon l'une des revendications 12 ou 13 qui n'inhibe pas la prolifération des cellules endothéliales.

15. Protéine pour usage selon la revendication 13 pour traiter le cancer du poumon ou les métastases pulmonaires.

16. Protéine pour usage selon l'une des revendications 11 à 15, cette protéine dérivant de l'isoforme b de la protéine Robo1.

17. Protéine pour usage selon la revendication 16, cette protéine étant telle que définie aux revendications 2 à 8.

18. Composition pharmaceutique comprenant une protéine recombinante Robo1-Fc telle que définie aux revendications 1 à 8 et au moins un excipient.

19. Utilisation d'une molécule Robo1-Fc selon l'invention en tant qu'outil de diagnostic pour détecter la surexpression d'une molécule de la famille Slit chez un patient.