Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

DIN
NOV

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 09-341961

54. **TÍTULO** Antagonistas de WNT y su uso en el diagnostico y tratamiento de Trastornos Mediados por WNT

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** A61K 38/17

71. **SOLICITANTE** GENENTECH, INC.

DOMICILIO _____

74. **APODERADO** Juan Pablo Cadena Sarmiento

22. **BOGOTÁ, D.C.,** _____

(FORMA P-10)

PETITORIO

AS: 109.916

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-034961- -00000-0000
Fecha: 2009-04-03 17:42:40 Dep: 2020 NUECREACION
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 757

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)	Nombre: **GENENTECH, INC.** Dirección: 1 Dna Way, South San Francisco, California 94080, Estados Unidos de América Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América Lugar de Constitución: Estados Unidos de América Teléfono: Fax: E-mail	**IDENTIFICACIÓN** C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual_____ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO Dirección: Cra. 7 No. 71-21 Torre B – Piso 4, Bogotá, Colombia. Teléfono: 744-2200 Fax: 742-2200 E-mail:	**IDENTIFICACIÓN** C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 80.410.337 TP 57492
4 INVENTOR (ES) (72)	**Nombre:** James A.ERNST, Paul POLAKIS, Bonnee RUBINFELD, Venita I. DeALMEIDA. **Dirección**: 758 Clayton Street, San Francisco, CA 94117, US; 260 Corte Madera Avenue, Mill Valley, CA 94941, US; 4186 Quail Run Drive, Danville, CA 94506, US; 965 Buckland Avenue, San Carlos, CA 94070, US (Respectivamente). **Nacionalidad o Domicilio:** Estados Unidos de América.	

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/077845 Fecha 07-09-2007
Publicación Internacional No WO 2008/031009 A2 Fecha 13-03-2008

6 Título (54): **ANTAGONISTAS DE WNT Y SU USO EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE TRASTORNOS MEDIADOS POR WNT**

7 Clasificación Internacional (51): A61K 38/17; C07K 14/05; G02N 33/50

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	08-09-2006	60/825,063
US	20-07-2007	60/951,175

9 Comprobante de pago No. 09-4,827; 09-4,896; 09-4,891; 09-4,869; 09-9,292 **Fecha** 01-04-2009

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10 **ANEXOS**

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. $ 540.000
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso. **Fotocopia autenticada**
- [x] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del éxamen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- [ ] Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12x12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros: Tarjeta de Propietarios
  Extracto para Publicación y Tarjeta de Archivo Temático
  Listado de Secuencias
  Documentos PCT
  Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de Reivindicaciones adicionales $900000 (36*25.000)

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:

12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO**

FIRMA:

C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

109916 3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 4,827
FECHA : ENERO 21 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-034961- -00000-0000
Fecha: 2009-04-03 17:42:40 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 757

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105762016	20/01/2009	37,982,200.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL : $	540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

109 916

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 4,896
FECHA : ENERO 21 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-034961- -00000-0000
Fecha: 2009-04-03 17:42:40 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 757

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105762016	20/01/2009	37,982,200.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	998	VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#O ANTR	500,000.00
			TOTAL : $	500,000.00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

109 916

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 4,891
FECHA : ENERO 21 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-034961- -00000-0000

Fecha: 2009-04-03 17:42:40 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 757

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105762016	20/01/2009	37,982,200.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	998	VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#O ANTR	250,000.00
			TOTAL : $	250,000.00

SON: DOSCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

109 916

6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 4,869
FECHA : ENERO 21 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-034961- -00000-0000

Fecha: 2009-04-03 17:42:40 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 757

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105762016	20/01/2009	37,982,200.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	998	VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#O ANTR	125,000.00
			TOTAL : $	125,000.00

SON: CIENTO VEINTICINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

109 916
7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 9,292
FECHA : FEBRERO 4 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-034961- -00000-0000

Fecha: 2009-04-03 17:42:40 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 757

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	104946026	04/02/2009	19,426,320.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	54	INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMI	25,000.00
			TOTAL : $	25,000.00

SON: VEINTICINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

8

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE [X] PCT/US2007/077845 MODELO DE UTILIDAD [ ] DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

SOLICITANTE/S. RAZON SOCIAL O APELLIDOS Y NOMBRES GENENTECH, INC.

DOMICILIO SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

TITULO ANTAGONISTAS DE WNT Y SU USO EN EL DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DE TRASTORNOS... CLASIFICACION

EXPEDIENTE No. FECHA DE SOLICITUD ROLLO MICROFILM

CERTIFICADO No. FECHA DE CONCESION VIGENCIA DESDE HASTA

PRORROGA CAMBIO DE NOMBRE

TRASPASO A

INVENTOR (ES) JAMES A. ERNST, PAUL POLAKIS, BONNEE RUBINFELD, VENITA

OTROS I. DEALMEIDA.

OFICINA DE COMUNICACIONES

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO

9

PATENTE DE INVENCIÓN _X_ PCT _X_ MODELO DE UTILIDAD ___ DISEÑO INDUSTRIAL ___

(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud:
(51) Clasificación Internacional :

(71)Solicitante (s): **GENENTECH, INC.**

(72) Inventor (es): James A.ERNST, Paul POLAKIS, Bonnee RUBINFELD, Venita I. DeALMEIDA.

(74) Agente: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/825,063	08-09-2006	US
	60/951,175	20-07-2007	US

FIGURA CARACTERÍSTICA
6 x 6 cm

(85) Fecha inicio fase nacional: 08-04-2009
(86) Datos relativos a la presentación de la solic. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 07-09-2007
No. de solicitud: PCT/US2007/077845

(87) Publicación internacional:
Fecha: 13-03-2008
No. Publicación: WO 2008/031009 A2

(54) Titulo: ANTAGONISTAS DE WNT Y SU USO EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE TRASTORNOS MEDIADOS POR WNT

(55) Resumen:

Antagonistas de Wnt quiméricos que comprenden un componente del dominio Frz derivado de una proteína Frizzled, de una proteína relacionada con Frizzled secretada o de la proteína Ror, y un componente Fc de inmunoglobulina, composiciones que los contienen, productos relacionados y su uso en el tratamiento y detección diagnóstica de la señalización celular de Wnt y trastornos mediados por Wnt.

10

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) No. de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(30) Prioridad

(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
60/825,063	08-09-2006	US
60/951,175	20-07-2007	US

(85) Fecha inicio fase nacional: 08-04-2009

(86) Datos relativos a la presentación de la solic. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 07-09-2007
No. de solicitud: PCT/US2007/077845

(51) Int Cl:

(71) Solicitante(s): **GENENTECH, INC.**

(72) Inventor (es): James A.ERNST, Paul POLAKIS, Bonnee RUBINFELD, Venita I. DeALMEIDA.

(74) Agente: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

(87) Publicación internacional
Fecha: 13-03-2008
No. publicación: WO 2008/031009 A2

(54) Titulo: ANTAGONISTAS DE WNT Y SU USO EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE TRASTORNOS MEDIADOS POR WNT

(55) Resumen:

Antagonistas de Wnt quiméricos que comprenden un componente del dominio Frz derivado de una proteína Frizzled, de una proteína relacionada con Frizzled secretada o de la proteína Ror, y un componente Fc de inmunoglobulina, composiciones que los contienen, productos relacionados y su uso en el tratamiento y detección diagnóstica de la señalización celular de Wnt y trastornos mediados por Wnt.

109116 U

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
13 March 2008 (13.03.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/031009 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 38/17 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2007/077845

(22) International Filing Date:
7 September 2007 (07.09.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/825,063 8 September 2006 (08.09.2006) US
60/951,175 20 July 2007 (20.07.2007) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **GENENTECH, INC.** [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **ERNST, James, A.** [US/US]; 758 Clayton Street, San Francisco, California 94117 (US). **POLAKIS, Paul** [US/US]; 260 Corte Madera Avenue, Mill Valley, California 94941 (US). **RUBINFELD, Bonnee** [US/US]; 4186 Quail Run Drive, Danville, California 94506 (US). **DEALMEIDA, Venita, I.** [IN/US]; 965 Buckland Avenue, San Carlos, California 94070 (US).

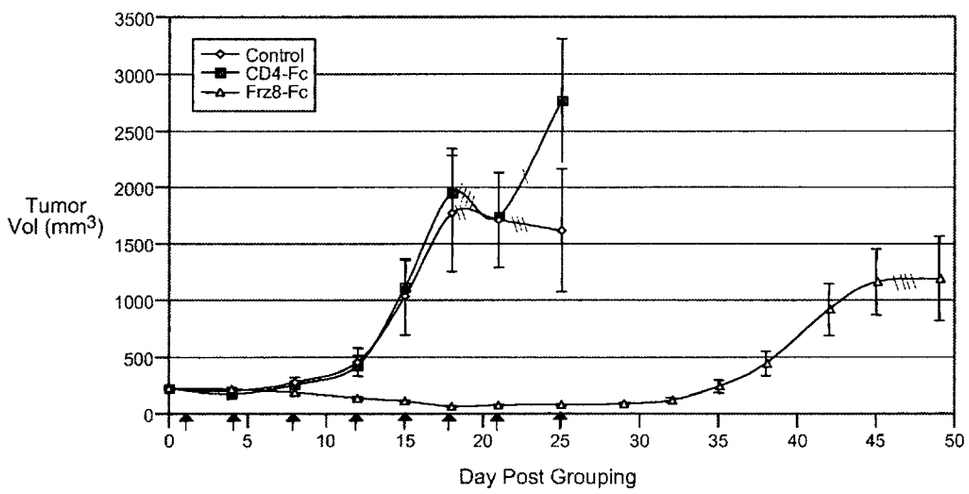
(74) Agents: **ROPP, Traci** et al.; Genentech, Inc., 1 DNA Way, MS-49, South San Francisco, California 94080 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

(54) Title: WNT ANTAGONISTS AND THEIR USE IN THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF WNT-MEDIATED DISORDERS



(57) Abstract: The present invention provides for chimeric Wnt antagonists comprising a Frz domain component derived from a Frizzled protein, a secreted Frizzled related protein or Ror protein and an Fc immunoglobulin component, and their use in the treatment and diagnostic detection of cellular Wnt signaling and Wnt-mediated disorders, including cancer.

WO 2008/031009 A2

WNT ANTAGONISTS AND THEIR USE IN THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF WNT-MEDIATED DISORDERS

RELATED APPLICATIONS

This application claims priority to and the benefit of United States Provisional Application Serial No. 60/825,063, filed September 8, 2006, and United States Provisional Application Serial No. 60/951,175, filed July 20, 2007, both of which are incorporated by reference in their entirety herein.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates generally to the regulation of cell growth. More specifically, the present invention relates to inhibitors of the Wnt pathway as well as to their use in the diagnosis and treatment of disorders characterized by the activation of Wnt pathway signaling, as well as to the modulation of cellular events mediated by Wnt pathway signaling.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The Wnt signaling pathway's association with carcinogenesis began as a result of early observations and experiments in certain murine mammary tumors. Wnt-1 proto-oncogene (Int-1) was originally identified from mammary tumors induced by mouse mammary tumor virus (MMTV) due to an insertion of a viral DNA sequence. Nusse *et al.*, *Cell* 1982; **31**: 99-109. The result of such viral integration was unregulated expression of Int-1 resulting in the formation of tumors. Vanooyen, A. *et al.*, *Cell* 1984; **39**: 233-240; Nusse, R. *et al., Nature* 1984; **307**: 131-136; Tsukamoto *et al., Cell* 1988; **55**: 619-625. Subsequent sequence analysis demonstrated that the Int-1 was a mammalian homolog of the Drosophila gene Wingless (Wg), which was implicated in development, and the terms were then combined to create "Wnt" to identify this family of proteins.

The human Wnt gene family of secreted ligands has now grown to at least 19 members (e.g., Wnt-1 (RefSeq.: NM_005430), Wnt-2 (RefSeq.: NM_003391), Wnt-2B (Wnt-13) (RefSeq.: NM_004185), Wnt-3 (ReSeq.: NM_030753), Wnt3a (RefSeq.: NM_033131), Wnt-4 (RefSeq.: NM_030761), Wnt-5A (RefSeq.: NM_003392), Wnt-5B (RefSeq.: NM_032642), Wnt-6 (RefSeq.: NM_006522), Wnt-7A (RefSeq.: NM_004625), Wnt-7B (RefSeq.: NM_058238), Wnt-8A (RefSeq.: NM_058244), Wnt-8B (RefSeq.:

NM_003393), Wnt-9A (Wnt-14) (RefSeq.: NM_003395), Wnt-9B (Wnt-15) (RefSeq.: NM_003396), Wnt-10A (RefSeq.: NM_025216), Wnt-10B (RefSeq.: NM_003394), Wnt-11 (RefSeq.: NM_004626), Wnt-16 (RefSeq.: NM_016087)). Each member has varying degrees of sequence identity but all contain 23-24 conserved cysteine residues which show highly conserved spacing. McMahon, AP *et al., Trends Genet.* 1992; **8**: 236-242; Miller, JR. *Genome Biol.* 2002; **3(1)**: 3001.1-3001.15. The Wnt proteins are small (i.e., 39-46 kD) acylated, secreted glycoproteins which play key roles in both embryogenesis and mature tissues. During embryological development, the expression of Wnt proteins is important in patterning through control of cell proliferation and determination of stem cell fate. The Wnt molecules are also palmitoylated, and thus are more hydrophobic than would be otherwise predicted by analysis of the amino acid sequence alone. Willert, K. *et al., Nature* 2003; **423**: 448-52. The site or sites of palmitoylation are also believed to be essential for function.

The Wnt proteins act as ligands to activate the Frizzled (Frz) family of seven-pass transmembrane receptors. Ingham, P.W. *Trends Genet.* 1996; **12**: 382-384; YangSnyder, J. *et al., Curr. Biol.* 1996; **6**: 1302-1306; Bhanot, P. *et al., Nature* 1996; **382**: 225-230. There are ten known members of the Frz family (e.g., Frz1, Frz2, Frz3 . . . Frz10), each characterized by the presence of a cysteine rich domain (CRD). Huang et al., *Genome Biol.* 2004; **5**: 234.1-234.8. There is a great degree of promiscuity between the various Wnt-Frizzled interactions, but Wnt-Frz binding must also incorporate the LDL receptor related proteins (LRP5 or LRP6) and the membrane and the cytoplasmic protein Dishevelled (Dsh) to form an active signaling complex.

The binding of Wnt to Frizzled can activate signaling via either the canonical Wnt signaling pathway, thereby resulting in stabilization and increased transcriptional activity of β-catenin [Peifer, M. *et al., Development* 1994; **120**: 369-380; Papkoff, J. *et al., Mol. Cell Biol.* 1996; **16**: 2128-2134] or non-canonical signaling, such as through the Wnt/planar cell polarity (Wnt/PCP) or Wnt-calcium (Wnt/Ca^{2+}) pathway. Veeman, M.T. *et al., Dev. Cell* 2003; 5: 367-377.

The canonical Wnt signaling pathway is the most relevant of the Wnt signaling pathways to the development of cancer. Ilyas, M. *J. Pathol.* 2005; **205**: 130-144. Normal activation of this pathway begins a series of downstream events culminating in the stabilization and increased levels of the protein β-catenin. This protein is normally an inactive cytoplasmic protein, and is found at the cell membrane bound to proteins including e-cadherin. In the absence of Wnt ligand, phosphorylated cytoplasmic β-catenin is normally

rapidly degraded. Upon activation of the canonical pathway, unphosphorylated β-catenin is transported to the nucleus where it further results in transcriptional activation of various target genes. The subsequent upregulation in transcription of these target genes leads to changes in the cell, and continuous, unregulated expression of such target genes results in tumor development. Since aberrant Wnt signaling appears to be a necessary precursor in carcinogenesis, effective inhibitors of Wnt signaling are of great interest as cancer therapeutics.

The use of soluble receptors as antagonists to ligand-receptor interactions is known in the art. Such molecules can be effective therapeutic antagonists if they bind the free ligand in a manner so as to prevent the initial receptor activation step of the signaling pathway. Soluble minimal extracellular domain (ECD) fragments of the cysteine-rich domain (CRD) of a Frizzled receptor which exhibit binding to Wnt have been identified, based on crystallography data. Dann *et al., Nature* 412: 86-90 (2001). However, while such Frizzled fragments did exhibit binding to Wnt ligand, such fragments are unsuitable for therapeutics because of their rapid degradation *in vivo*.

The use of a soluble Frizzled domain coupled to an immunoglobulin Fc as a potential Wnt antagonist has been proposed. Therapeutic Opportunities of the Wnt Signaling Pathway in Cancer, New York Academy of Sciences, Oct. 25, 2005; Hsieh, J-C. et al., *PNAS*, 96: 3546-3551 (1999). However, prior to the present invention, attempts at creating a soluble Frizzled receptor-Fc fusion therapeutic were not successful. For example, one such chimera based on residues 1-173 of the Frz8 CRD (Frz (173)-Fc, SEQ ID NO: 113) had suboptimal efficacy (Figure 12), and was unstable *in vivo* (Figure 11). Moreover, the Frz (173)-Fc chimera only reduced the rate of increase in tumor volume (as opposed to shrinking starting tumor volume). Additionally, while the creation of Fc fusions is generally known as one technique to improve the *in vivo* stability of the resulting construct, the creation of effective therapeutic Fc constructs can be difficult owing to a number of problems, including improper protein folding of the new protein construct and steric hindrance of the fusion construct to the target.

Thus, a need exits for a Wnt antagonist therapeutic with enhanced *in vivo* stability that acts to inhibit Wnt ligand induced cellular signaling.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention provides for compositions and their use in methods of diagnosing and treating Wnt-mediated disorder, such as cancer, and in inhibiting cellular

Wnt signaling. Specifically, the invention provides for Wnt antagonists that are chimeric molecules comprising a Frizzled domain component, such as a polypeptide derived from a Frizzled (Frz) protein, a Frizzled related protein (sFRP) or another protein (e.g., Ror-1, -2, etc.), and an immunoglobulin Fc domain, and their use in methods of diagnosing and treating Wnt-mediated disorders and in inhibiting cellular Wnt signaling.

One aspect of the invention provides for a Wnt antagonist comprising a Frizzled domain component and a Fc domain. The Frizzled domain component of the Wnt antagonist comprises a polypeptide derived from a Frz protein, a FRP protein, or a Ror protein. In one embodiment, the Wnt antagonist is active *in vivo* for at least 1 hour. In another embodiment, the Wnt antagonist is active *in vivo* for at least 5 hours. In another embodiment, the Wnt antagonist has an *in vivo* half-life of at least 1 day. In yet another embodiment, the Wnt antagonist has an *in vivo* half-life of at least 2 days.

In a further embodiment, the Frizzled domain component comprises a minimal CRD (ECD) domain from a Frz polypeptide selected from the group consisting of hFrz1 (SEQ ID NO: 18), hFrz2 (SEQ ID NO: 19), hFrz3 (SEQ ID NO: 20), hFrz4 (SEQ ID NO: 21), hFrz5 (SEQ ID NO: 22), hFrz6 (SEQ ID NO: 23), hFrz7 (SEQ ID NO: 24), hFrz8 (SEQ ID NO: 25), hFrz9 (SEQ ID NO: 26), and hFrz10 (SEQ ID NO: 27), and active variants thereof. In yet a further embodiment, the Frizzled domain component comprises a minimal CRD (ECD) domain from a sFRP polypeptide selected from the group consisting of sFRP1 (SEQ ID NO: 28), sFRP2 (SEQ ID NO: 29), sFRP3 (SEQ ID NO: 30), sFRP4 (SEQ ID NO: 31), and sFRP5 (SEQ ID NO: 32), and active variants thereof. In yet a further embodiment, the Frizzled domain component comprises a minimal CRD (ECD) domain from a Ror polypeptide selected from the group consisting of hRor1 (SEQ ID NO: 33), and hRor2 (SEQ ID NO: 34), and active variants thereof.

In yet a further embodiment, the Frizzled domain component comprises a mature Frz polypeptide selected from the group consisting of hFrz1 (SEQ ID NO: 50), hFrz2 (SEQ ID NO: 51), hFrz3 (SEQ ID NO: 52), hFrz4 (SEQ ID NO: 53), hFrz5 (SEQ ID NO: 54), hFrz6 (SEQ ID NO: 55), hFrz7 (SEQ ID NO: 56), hFrz8 (SEQ ID NO: 57), hFrz9 (SEQ ID NO: 58), and hFrz10 (SEQ ID NO: 59), and active variants thereof, or a mature sFrp polypeptide selected from the group consisting of sFRP1 (SEQ ID NO: 60), sFRP2 (SEQ ID NO: 61), sFRP3 (SEQ ID NO: 62), sFRP4 (SEQ ID NO: 63), and sFRP5 (SEQ ID NO: 64), and active variants thereof, or a mature Ror polypeptide selected from the group consisting of hRor1 (SEQ ID NO: 65), and hRor2 (SEQ ID NO: 66), and active variants thereof.

In a still further embodiment, the Frizzled domain component comprises a pro-Frz polypeptide selected from the group consisting of hFrz1 (SEQ ID NO: 35), hFrz2 (SEQ ID NO: 36), hFrz3 (SEQ ID NO: 37), hFrz4 (SEQ ID NO: 38), hFrz5 (SEQ ID NO: 39), hFrz6 (SEQ ID NO: 40), hFrz7 (SEQ ID NO: 41), hFrz8 (SEQ ID NO: 42), hFrz9 (SEQ ID NO: 43), and hFrz10 (SEQ ID NO: 44), and active variants thereof, or a pro-sFrp polypeptide selected from the group consisting of sFRP1 (SEQ ID NO: 45), sFRP2 (SEQ ID NO: 46), sFRP3 (SEQ ID NO: 47), sFRP4 (SEQ ID NO: 48), and sFRP5 (SEQ ID NO: 49), and active variants thereof.

In one embodiment, the Wnt antagonist comprises a Fc component derived from an immunoglobulin selected from the group consisting of IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4. In another embodiment, the Fc is derived from an IgG1 immunoglobulin. In yet another embodiment the Fc sequence comprises the Fc shown in SEQ ID NO: 67 or SEQ ID NO: 68.

In one embodiment, the Wnt antagonist further comprises a linker connecting the Frizzled domain component to the Fc domain. In one such embodiment, the linker is a peptide linker such as ESGGGGVT (SEQ ID NO: 69), LESGGGGVT (SEQ ID NO: 70), GRAQVT (SEQ ID NO: 71), WRAQVT (SEQ ID NO: 72), and ARGRAQVT (SEQ ID NO: 73).

In particular embodiments, the Wnt antagonist comprises a polypeptide selected from the group consisting of in Frz8-Fc (SEQ ID NO: 74), Frz5-Fc (SEQ ID NO: 75), Frz1-Fc (SEQ ID NO: 76), Frz2-Fc (SEQ ID NO: 77), Frz3-Fc (SEQ ID NO: 78), Frz4-Fc (SEQ ID NO: 79), Frz6-Fc (SEQ ID NO: 80), Frz7-Fc (SEQ ID NO: 81), Frz9-Fc (SEQ ID NO: 82), Frz10-Fc (SEQ ID NO: 83), sFRP1-Fc (SEQ ID NO: 84), sFRP2 (SEQ ID NO: 85), sFRP3-Fc (SEQ ID NO: 86), sFRP4-Fc (SEQ ID NO: 87), and sFRP5-Fc (SEQ ID NO: 88).

Another aspect of the invention provides for a composition comprising at least one pharmaceutically acceptable carrier or excipient and a Wnt antagonist as described above.

Yet another aspect of the invention provides for a nucleic acid sequence encoding any of the Wnt antagonists described above. In one embodiment, the nucleic acid encoding a Wnt antagonist further comprises a vector containing control sequences to which the nucleic acid is operably linked. In another embodiment, the vector is contained in host cells, such as a mammalian, insect, *E. coli* or yeast cell.

Another aspect of the invention provides for an article of manufacture comprising a composition comprising at least one pharmaceutically acceptable carrier or excipient and a Wnt antagonist as described above and a container, wherein the Wnt antagonist is contained

within the container and the container further comprises (a) a label affixed to the container, or (b) a package insert inside the container referring to the use of the Wnt antagonist indicating use of the composition for the therapeutic treatment or diagnostic detection of a Wnt-mediated disorder.

Yet another aspect of the invention provides for a method of inhibiting Wnt signaling in a cell comprising contacting the cell with an effective amount of a Wnt antagonist comprising a Frizzled domain component and a Fc domain. The Frizzled domain component of the Wnt antagonist comprises a polypeptide derived from a Frz protein, a FRP protein, or a Ror protein. In one embodiment, the Wnt antagonist is active *in vivo* for at least 1 hour. In another embodiment, the Wnt antagonist is active *in vivo* for at least 5 hours. In another embodiment, the Wnt antagonist has an *in vivo* half-life of at least 1 day. In yet another embodiment, the Wnt antagonist has an *in vivo* half-life of at least 2 days.

In a further embodiment of this aspect, the Frizzled domain component comprises a minimal CRD (ECD) domain from a Frz polypeptide selected from the group consisting of hFrz1 (SEQ ID NO: 18), hFrz2 (SEQ ID NO: 19), hFrz3 (SEQ ID NO: 20), hFrz4 (SEQ ID NO: 21), hFrz5 (SEQ ID NO: 22), hFrz6 (SEQ ID NO: 23), hFrz7 (SEQ ID NO: 24), hFrz8 (SEQ ID NO: 25), hFrz9 (SEQ ID NO: 26), and hFrz10 (SEQ ID NO: 27), and active variants thereof. In yet a further embodiment, the Frizzled domain component comprises a minimal CRD (ECD) domain from a sFRP polypeptide selected from the group consisting of sFRP1 (SEQ ID NO: 28), sFRP2 (SEQ ID NO: 29), sFRP3 (SEQ ID NO: 30), sFRP4 (SEQ ID NO: 31), and sFRP5 (SEQ ID NO: 32), and active variants thereof. In yet a further embodiment, the Frizzled domain component comprises a minimal CRD (ECD) domain from a Ror polypeptide selected from the group consisting of hRor1 (SEQ ID NO: 33), and hRor2 (SEQ ID NO: 34), and active variants thereof.

In yet a further embodiment, the Frizzled domain component comprises a mature Frz polypeptide selected from the group consisting of: (SEQ ID NO: 50), hFrz2 (SEQ ID NO: 51), hFrz3 (SEQ ID NO: 52), hFrz4 (SEQ ID NO: 53), hFrz5 (SEQ ID NO: 54), hFrz6 (SEQ ID NO: 55), hFrz7 (SEQ ID NO: 56), hFrz8 (SEQ ID NO: 57), hFrz9 (SEQ ID NO: 58), and hFrz10 (SEQ ID NO: 59), and active variants thereof, or a mature sFrp polypeptide selected from the group consisting of sFRP1 (SEQ ID NO: 60), sFRP2 (SEQ ID NO: 61), sFRP3 (SEQ ID NO: 62), sFRP4 (SEQ ID NO: 63), and sFRP5 (SEQ ID NO: 64), and active variants thereof, or a mature Ror polypeptide selected from the group consisting of hRor1 (SEQ ID NO: 65), and hRor2 (SEQ ID NO: 66), and active variants thereof.

In a still further embodiment, the Frizzled domain component comprises a pro-Frz polypeptide selected from the group consisting of hFrz1 (SEQ ID NO: 35), hFrz2 (SEQ ID NO: 36), hFrz3 (SEQ ID NO: 37), hFrz4 (SEQ ID NO: 38), hFrz5 (SEQ ID NO: 39), hFrz6 (SEQ ID NO: 40), hFrz7 (SEQ ID NO: 41), hFrz8 (SEQ ID NO: 42), hFrz9 (SEQ ID NO: 43), and hFrz10 (SEQ ID NO: 44), and active variants thereof, or a pro-sFrp polypeptide selected from the group consisting of sFRP1 (SEQ ID NO: 45), sFRP2 (SEQ ID NO: 46), sFRP3 (SEQ ID NO: 47), sFRP4 (SEQ ID NO: 48), and sFRP5 (SEQ ID NO: 49), and active variants thereof.

In one embodiment, the Wnt antagonist comprises a Fc component derived from an immunoglobulin selected from the group consisting of IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4. In another embodiment, the Fc is derived from an IgG1 immunoglobulin. In yet another embodiment the Fc sequence shown in SEQ ID NO: 67 or SEQ ID NO: 68.

In one embodiment, Wnt antagonist further comprises a linker connecting the Frizzled domain component to the Fc domain. In one embodiment, the linker is a peptide linker such as ESGGGGVT (SEQ ID NO: 69), LESGGGGVT (SEQ ID NO: 70), GRAQVT (SEQ ID NO: 71), WRAQVT (SEQ ID NO: 72), and ARGRAQVT (SEQ ID NO: 73).

In particular embodiments, the Wnt antagonist comprises a polypeptide selected from the group consisting of Frz8-Fc (SEQ ID NO: 74), Frz5-Fc (SEQ ID NO: 75), Frz1-Fc (SEQ ID NO: 76), Frz2-Fc (SEQ ID NO: 77), Frz3-Fc (SEQ ID NO: 78), Frz4-Fc (SEQ ID NO: 79), Frz6-Fc (SEQ ID NO: 80), Frz7-Fc (SEQ ID NO: 81), Frz9-Fc (SEQ ID NO: 82), Frz10-Fc (SEQ ID NO: 83), sFRP1-Fc (SEQ ID NO: 84), sFRP2 (SEQ ID NO: 85), sFRP3-Fc (SEQ ID NO: 86), sFRP4-Fc (SEQ ID NO: 87), and sFRP5-Fc (SEQ ID NO: 88).

In one embodiment of this method, the cell is contained within a mammal and the amount administered is a therapeutically effective amount. In another embodiment, the Wnt signaling results from activation of a Wnt signaling component through somatic mutation. In another embodiment, the inhibition of Wnt signaling results in the inhibition of growth of the cell. In yet another embodiment, the cell is a cancer cell.

Another aspect of the invention provides for a method of treating a Wnt-mediated disorder in a mammal suffering therefrom, comprising administering to the mammal a therapeutically effective amount of a Wnt antagonist comprising a Frizzled domain component and a Fc domain. The Frizzled domain component of the Wnt antagonist comprises a polypeptide derived from a Frz protein, a FRP protein, or a Ror protein. In one embodiment, the Wnt antagonist is active *in vivo* for at least 1 hour. In another embodiment,

the Wnt antagonist is active *in vivo* for at least 5 hours. In another embodiment, the Wnt antagonist has an *in vivo* half-life of at least 1 day. In yet another embodiment, the Wnt antagonist has an *in vivo* half-life of at least 2 days.

In a further embodiment of this aspect, the Frizzled domain component comprises a minimal CRD (ECD) domain from a Frz polypeptide selected from the group consisting of hFrz1 (SEQ ID NO: 18), hFrz2 (SEQ ID NO: 19), hFrz3 (SEQ ID NO: 20), hFrz4 (SEQ ID NO: 21), hFrz5 (SEQ ID NO: 22), hFrz6 (SEQ ID NO: 23), hFrz7 (SEQ ID NO: 24), hFrz8 (SEQ ID NO: 25), hFrz9 (SEQ ID NO: 26), and hFrz10 (SEQ ID NO: 27), and active variants thereof. In yet a further embodiment, the Frizzled domain component comprises a minimal CRD (ECD) domain from a sFRP polypeptide selected from the group consisting of sFRP1 (SEQ ID NO: 28), sFRP2 (SEQ ID NO: 29), sFRP3 (SEQ ID NO: 30), sFRP4 (SEQ ID NO: 31), and sFRP5 (SEQ ID NO: 32), and active variants thereof. In yet a further embodiment, the Frizzled domain component comprises a minimal CRD (ECD) domain from a Ror polypeptide selected from the group consisting of hRor1 (SEQ ID NO: 33), and hRor2 (SEQ ID NO: 34), and active variants thereof.

In yet a further embodiment, the Frizzled domain component comprises a mature Frz polypeptide selected from the group consisting of: (SEQ ID NO: 50), hFrz2 (SEQ ID NO: 51), hFrz3 (SEQ ID NO: 52), hFrz4 (SEQ ID NO: 53), hFrz5 (SEQ ID NO: 54), hFrz6 (SEQ ID NO: 55), hFrz7 (SEQ ID NO: 56), hFrz8 (SEQ ID NO: 57), hFrz9 (SEQ ID NO: 58), and hFrz10 (SEQ ID NO: 59), and active variants thereof, or a mature sFrp polypeptide selected from the group consisting of sFRP1 (SEQ ID NO: 60), sFRP2 (SEQ ID NO: 61), sFRP3 (SEQ ID NO: 62), sFRP4 (SEQ ID NO: 63), and sFRP5 (SEQ ID NO: 64), and active variants thereof, or a mature Ror polypeptide selected from the group consisting of hRor1 (SEQ ID NO: 65), and hRor2 (SEQ ID NO: 66), and active variants thereof.

In still further embodiments, the Frizzled domain component comprises a pro-Frz polypeptide selected from the group consisting of hFrz1 (SEQ ID NO: 35), hFrz2 (SEQ ID NO: 36), hFrz3 (SEQ ID NO: 37), hFrz4 (SEQ ID NO: 38), hFrz5 (SEQ ID NO: 39), hFrz6 (SEQ ID NO: 40), hFrz7 (SEQ ID NO: 41), hFrz8 (SEQ ID NO: 42), hFrz9 (SEQ ID NO: 43), and hFrz10 (SEQ ID NO: 44), and active variants thereof, or a pro-sFrp polypeptide selected from the group consisting of sFRP1 (SEQ ID NO: 45), sFRP2 (SEQ ID NO: 46), sFRP3 (SEQ ID NO: 47), sFRP4 (SEQ ID NO: 48), and sFRP5 (SEQ ID NO: 49), and active variants thereof.

In one embodiment, the Wnt antagonist comprises a Fc component derived from an immunoglobulin selected from the group consisting of IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4. In another embodiment, the Fc is derived from an IgG1 immunoglobulin. In yet another embodiment the Fc sequence shown in SEQ ID NO: 67 or SEQ ID NO: 68.

In one embodiment, Wnt antagonist further comprises a linker connecting the Frizzled domain component to the Fc domain. In one embodiment, the linker is a peptide linker such as ESGGGGVT (SEQ ID NO: 69), LESGGGGVT (SEQ ID NO: 70), GRAQVT (SEQ ID NO: 71), WRAQVT (SEQ ID NO: 72), and ARGRAQ VT (SEQ ID NO: 73).

In particular embodiments, the Wnt antagonist comprises a polypeptide selected from the group consisting of Frz8-Fc (SEQ ID NO: 74), Frz5-Fc (SEQ ID NO: 75), Frz1-Fc (SEQ ID NO: 76), Frz2-Fc (SEQ ID NO: 77), Frz3-Fc (SEQ ID NO: 78), Frz4-Fc (SEQ ID NO: 79), Frz6-Fc (SEQ ID NO: 80), Frz7-Fc (SEQ ID NO: 81), Frz9-Fc (SEQ ID NO: 82), Frz10-Fc (SEQ ID NO: 83), sFRP1-Fc (SEQ ID NO: 84), sFRP2 (SEQ ID NO: 85), sFRP3-Fc (SEQ ID NO: 86), sFRP4-Fc (SEQ ID NO: 87), and sFRP5-Fc (SEQ ID NO: 88).

In one embodiment of this method, the disorder is a cell proliferative disorder associated with aberrant Wnt signaling activity. In another embodiment, the aberrant Wnt signaling activity results from increased expression of a Wnt protein. In yet another embodiment, the cell proliferative disorder is cancer, such as of colon cancer, colorectal cancer, breast cancer, leukemia, gliomas, or medulloblastomas.

Yet another aspect of the invention provides for a method for detecting the presence of a Wnt protein, comprising contacting the sample with a Wnt antagonist as described above, where the presence of a complex, or the binding level between the Wnt antagonist and Wnt protein is indicative of the presence of a Wnt protein and/or signaling. In one embodiment, the method further comprises determining if the level of Wnt signaling is aberrant, the method further comprising comparing the level of binding in the sample to the level in a second sample known to have physiologically normal Wnt signaling. A level of binding in the sample that is higher or lower than that of the second sample is indicative of aberrant Wnt signaling. In yet another embodiment, the aberrant Wnt signaling is further indicative of the presence of a Wnt-mediated disorder, such as cancer.

Another aspect of the invention provides for a method of modulating the expression of a Wnt target gene in a cell characterized by activated or excessive Wnt signaling, comprising contact the cell with an effective amount of a Wnt antagonist described above.

Yet another aspect of the invention provides for a method of therapeutically treating a Wnt-mediated cancer, comprising administering a therapeutically effective amount of a Wnt antagonist comprising a Frizzled domain component and a Fc domain. The Frizzled domain component of the Wnt antagonist comprises a polypeptide derived from a Frz protein, a FRP protein, or a Ror protein. In one embodiment, the Wnt antagonist is active *in vivo* for at least 1 hour. In another embodiment, the Wnt antagonist is active *in vivo* for at least 5 hours. In another embodiment, the Wnt antagonist has an *in vivo* half-life of at least 1 day. In yet another embodiment, the Wnt antagonist has an *in vivo* half-life of at least 2 days.

In a further embodiment of this aspect, the Frizzled domain component comprises a minimal CRD (ECD) domain from a Frz polypeptide selected from the group consisting of hFrz1 (SEQ ID NO: 18), hFrz2 (SEQ ID NO: 19), hFrz3 (SEQ ID NO: 20), hFrz4 (SEQ ID NO: 21), hFrz5 (SEQ ID NO: 22), hFrz6 (SEQ ID NO: 23), hFrz7 (SEQ ID NO: 24), hFrz8 (SEQ ID NO: 25), hFrz9 (SEQ ID NO: 26), and hFrz10 (SEQ ID NO: 27), and active variants thereof. In yet a further embodiment, the Frizzled domain component comprises a minimal CRD (ECD) domain from a sFRP polypeptide selected from the group consisting of sFRP1 (SEQ ID NO: 28), sFRP2 (SEQ ID NO: 29), sFRP3 (SEQ ID NO: 30), sFRP4 (SEQ ID NO: 31), and sFRP5 (SEQ ID NO: 32), and active variants thereof. In yet a further embodiment, the Frizzled domain component comprises a minimal CRD (ECD) domain from a Ror polypeptide selected from the group consisting of hRor1 (SEQ ID NO: 33), and hRor2 (SEQ ID NO: 34), and active variants thereof.

In yet a further embodiment, the Frizzled domain component comprises a mature Frz polypeptide selected from the group consisting of: (SEQ ID NO: 50), hFrz2 (SEQ ID NO: 51), hFrz3 (SEQ ID NO: 52), hFrz4 (SEQ ID NO: 53), hFrz5 (SEQ ID NO: 54), hFrz6 (SEQ ID NO: 55), hFrz7 (SEQ ID NO: 56), hFrz8 (SEQ ID NO: 57), hFrz9 (SEQ ID NO: 58), and hFrz10 (SEQ ID NO: 59), and active variants thereof, or a mature sFrp polypeptide selected from the group consisting of sFRP1 (SEQ ID NO: 60), sFRP2 (SEQ ID NO: 61), sFRP3 (SEQ ID NO: 62), sFRP4 (SEQ ID NO: 63), and sFRP5 (SEQ ID NO: 64), and active variants thereof, or a mature Ror polypeptide selected from the group consisting of hRor1 (SEQ ID NO: 65), and hRor2 (SEQ ID NO: 66), and active variants thereof.

In a still further embodiment, the Frizzled domain component comprises a pro-Frz polypeptide selected from the group consisting of hFrz1 (SEQ ID NO: 35), hFrz2 (SEQ ID NO: 36), hFrz3 (SEQ ID NO: 37), hFrz4 (SEQ ID NO: 38), hFrz5 (SEQ ID NO: 39), hFrz6

(SEQ ID NO: 40), hFrz7 (SEQ ID NO: 41), hFrz8 (SEQ ID NO: 42), hFrz9 (SEQ ID NO: 43), and hFrz10 (SEQ ID NO: 44), and active variants thereof, or a pro-sFrp polypeptide selected from the group consisting of sFRP1 (SEQ ID NO: 45), sFRP2 (SEQ ID NO: 46), sFRP3 (SEQ ID NO: 47), sFRP4 (SEQ ID NO: 48), and sFRP5 (SEQ ID NO: 49), and active variants thereof.

In one embodiment, the Wnt antagonist comprises a Fc component derived from an immunoglobulin selected from the group consisting of IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4. In another embodiment, the Fc is derived from an IgG1 immunoglobulin. In yet another embodiment the Fc sequence shown in SEQ ID NO: 67 or SEQ ID NO: 68.

In one embodiment, Wnt antagonist further comprises a linker connecting the Frizzled domain component to the Fc domain. In one embodiment, the linker is a peptide linker such as ESGGGGVT (SEQ ID NO: 69), LESGGGGVT (SEQ ID NO: 70), GRAQVT (SEQ ID NO: 71), WRAQVT (SEQ ID NO: 72), and ARGRAQVT (SEQ ID NO: 73).

In particular embodiments, the Wnt antagonist comprises a polypeptide selected from the group consisting of Frz8-Fc (SEQ ID NO: 74), Frz5-Fc (SEQ ID NO: 75), Frz1-Fc (SEQ ID NO: 76), Frz2-Fc (SEQ ID NO: 77), Frz3-Fc (SEQ ID NO: 78), Frz4-Fc (SEQ ID NO: 79), Frz6-Fc (SEQ ID NO: 80), Frz7-Fc (SEQ ID NO: 81), Frz9-Fc (SEQ ID NO: 82), Frz10-Fc (SEQ ID NO: 83), sFRP1-Fc (SEQ ID NO: 84), sFRP2 (SEQ ID NO: 85), sFRP3-Fc (SEQ ID NO: 86), sFRP4-Fc (SEQ ID NO: 87), and sFRP5-Fc (SEQ ID NO: 88).

The administration of the antagonist arrests any subsequent increase in size or advancement in severity of the cancer. In one embodiment, the administration of the Wnt antagonist results in the reduction in size or severity of the cancer. In another embodiment, the administration of the Wnt antagonist reduces the tumor burden of the cancer. In yet another embodiment, the administration of the Wnt antagonist kills the cancer.

Another aspect of the invention provides for the use of a Wnt antagonist in the manufacture of a medicament for the treatment of a cell proliferative disorder. Wnt antagonist comprises a Frizzled domain component and a Fc domain. The Frizzled domain component of the Wnt antagonist comprises a polypeptide derived from a Frz protein, a FRP protein, or a Ror protein. In one embodiment, the Wnt antagonist is active *in vivo* for at least 1 hour. In another embodiment, the Wnt antagonist is active *in vivo* for at least 5 hours. In another embodiment, the Wnt antagonist has an *in vivo* half-life of at least 1 day. In yet another embodiment, the Wnt antagonist has an *in vivo* half-life of at least 2 days.

In a further embodiment of this aspect, the Frizzled domain component comprises a minimal CRD (ECD) domain from a Frz polypeptide selected from the group consisting of hFrz1 (SEQ ID NO: 18), hFrz2 (SEQ ID NO: 19), hFrz3 (SEQ ID NO: 20), hFrz4 (SEQ ID NO: 21), hFrz5 (SEQ ID NO: 22), hFrz6 (SEQ ID NO: 23), hFrz7 (SEQ ID NO: 24), hFrz8 (SEQ ID NO: 25), hFrz9 (SEQ ID NO: 26), and hFrz10 (SEQ ID NO: 27), and active variants thereof. In yet a further embodiment, the Frizzled domain component comprises a minimal CRD (ECD) domain from a sFRP polypeptide selected from the group consisting of sFRP1 (SEQ ID NO: 28), sFRP2 (SEQ ID NO: 29), sFRP3 (SEQ ID NO: 30), sFRP4 (SEQ ID NO: 31), and sFRP5 (SEQ ID NO: 32), and active variants thereof. In yet a further embodiment, the Frizzled domain component comprises a minimal CRD (ECD) domain from a Ror polypeptide selected from the group consisting of hRor1 (SEQ ID NO: 33), and hRor2 (SEQ ID NO: 34), and active variants thereof.

In yet a further embodiment, the Frizzled domain component comprises a mature Frz polypeptide selected from the group consisting of: (SEQ ID NO: 50), hFrz2 (SEQ ID NO: 51), hFrz3 (SEQ ID NO: 52), hFrz4 (SEQ ID NO: 53), hFrz5 (SEQ ID NO: 54), hFrz6 (SEQ ID NO: 55), hFrz7 (SEQ ID NO: 56), hFrz8 (SEQ ID NO: 57), hFrz9 (SEQ ID NO: 58), and hFrz10 (SEQ ID NO: 59), and active variants thereof, or a mature sFrp polypeptide selected from the group consisting of sFRP1 (SEQ ID NO: 60), sFRP2 (SEQ ID NO: 61), sFRP3 (SEQ ID NO: 62), sFRP4 (SEQ ID NO: 63), and sFRP5 (SEQ ID NO: 64), and active variants thereof, or a mature Ror polypeptide selected from the group consisting of hRor1 (SEQ ID NO: 65), and hRor2 (SEQ ID NO: 66), and active variants thereof.

In a still further embodiment, the Frizzled domain component comprises a pro-Frz polypeptide selected from the group consisting of hFrz1 (SEQ ID NO: 35), hFrz2 (SEQ ID NO: 36), hFrz3 (SEQ ID NO: 37), hFrz4 (SEQ ID NO: 38), hFrz5 (SEQ ID NO: 39), hFrz6 (SEQ ID NO: 40), hFrz7 (SEQ ID NO: 41), hFrz8 (SEQ ID NO: 42), hFrz9 (SEQ ID NO: 43), and hFrz10 (SEQ ID NO: 44), and active variants thereof, or a pro-sFrp polypeptide selected from the group consisting of sFRP1 (SEQ ID NO: 45), sFRP2 (SEQ ID NO: 46), sFRP3 (SEQ ID NO: 47), sFRP4 (SEQ ID NO: 48), and sFRP5 (SEQ ID NO: 49), and active variants thereof.

In one embodiment, the Wnt antagonist comprises a Fc component derived from an immunoglobulin selected from the group consisting of IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4. In another embodiment, the Fc is derived from an IgG1 immunoglobulin. In yet another embodiment the Fc sequence shown in SEQ ID NO: 67 or SEQ ID NO: 68.

In one embodiment, Wnt antagonist further comprises a linker connecting the Frizzled domain component to the Fc domain. In one embodiment, the linker is a peptide linker such as ESGGGGVT (SEQ ID NO: 69), LESGGGGVT (SEQ ID NO: 70), GRAQVT (SEQ ID NO: 71), WRAQVT (SEQ ID NO: 72), and ARGRAQVT (SEQ ID NO: 73).

In particular embodiments, the Wnt antagonist comprises a polypeptide selected from the group consisting of Frz8-Fc (SEQ ID NO: 74), Frz5-Fc (SEQ ID NO: 75), Frz1-Fc (SEQ ID NO: 76), Frz2-Fc (SEQ ID NO: 77), Frz3-Fc (SEQ ID NO: 78), Frz4-Fc (SEQ ID NO: 79), Frz6-Fc (SEQ ID NO: 80), Frz7-Fc (SEQ ID NO: 81), Frz9-Fc (SEQ ID NO: 82), Frz10-Fc (SEQ ID NO: 83), sFRP1-Fc (SEQ ID NO: 84), sFRP2 (SEQ ID NO: 85), sFRP3-Fc (SEQ ID NO: 86), sFRP4-Fc (SEQ ID NO: 87), and sFRP5-Fc (SEQ ID NO: 88).

In one embodiment, the cell proliferative disorder is cancer such as colon cancer, colorectal cancer, breast cancer, leukemia, gliomas, or medulloblastomas.

DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 is an abbreviated summary of the canonical Wnt signaling pathway both in the "off" or inactive state as well as the "on" or active state.

Figure 2 is a schematic diagram representing a Frizzled extracellular domain linked to the Fc region of a human immunoglobulin domain.

Figure 3 is an alignment of the 17 known Frizzled protein extracellular domains. Figure 3A shows an alignment of the extracellular domains of the 10 pro-Frizzled proteins (SEQ ID NOs: 35-44) and the 5 pro-sFRP proteins (SEQ ID NOs: 45-49), while Figure 3B shows an alignment of the extracellular domains of 10 mature Frizzled proteins (SEQ ID NOs: 50-59), and 5 mature sFRP proteins (SEQ ID NOs: 60-64), as well as the extracellular domains of the mature Ror proteins (SEQ ID NOs: 65-66). Similar residues are boxed in gray, identical residues are indicated by asterisks. Similar residues are grouped as acidic, basic, polar and non-polar. In Figure 3B, the minimal CRD (ECD) domains are indicated between the two boxed arrowed lines (SEQ ID NOs: 18-34).

Figure 4 shows the sequences of the Frz (156)-Fc and Frz (173)-Fc chimeric constructs. Figure 4A shows the longer Frz (173)-Fc sequence (SEQ ID NO: 113). Shown in bold (i.e., first 24 N-terminal amino acid residues) is the leader signal sequence. Residues 25-27 are alanine residues that may be present or absent in the mature protein. Shown in boxed text (i.e., residues 157-173) are the additional sequences of the Frz8 receptors that distinguish the longer (Frz173) from the shorter (Frz156) chimeric constructs. The linker sequence (i.e.,

residues 174-182) is underlined, while the Fc domain sequence is shown in italics (i.e., residues 183-409). Figure 4B shows the shorter Frz (156)-Fc (SEQ ID NO: 74). In bold (i.e., first 24 N-terminal amino acid residues) is the leader signal sequence. Residues 25-27 are alanine residues that may be present or absent in the mature protein. The linker sequence (i.e., residues 157-164) is underlined, while the Fc domain sequence is shown in italics (i.e., residues 165-391).

Figure 5A-5H shows the nucleic acid sequence encoding several Wnt antagonist chimeric constructs (Frz1-Fc (SEQ ID NO: 115), Frz2-Fc (SEQ ID NO: 116), Frz3-Fc (SEQ ID NO: 117), Frz4-Fc (SEQ ID NO: 118), Frz5-Fc (SEQ ID NO: 119), Frz6-Fc (SEQ ID NO: 120), Frz7-Fc (SEQ ID NO: 121), Frz8-Fc (SEQ ID NO: 122), Frz9-Fc (SEQ ID NO: 123), Frz10-Fc (SEQ ID NO: 124), sFRP1-Fc (SEQ ID NO: 125), sFRP2-Fc (SEQ ID NO: 126), sFRP3-Fc (SEQ ID NO: 127), sFRP4-Fc (SEQ ID NO: 128), and sFRP5-Fc (SEQ ID NO:129)).

Figure 6A-6E shows the full length amino acid sequences of the human Frz, sFRP, and Ror proteins.

Figure 7 (A, B, and C) shows the amino acid sequences of several Wnt antagonist chimeric constructs (Frz1-Fc (SEQ ID NO: 76), Frz2-Fc (SEQ ID NO: 77), Frz3-Fc (SEQ ID NO: 78), Frz4-Fc (SEQ ID NO: 79), Frz5-Fc (SEQ ID NO: 75), Frz6-Fc (SEQ ID NO: 80), Frz7-Fc (SEQ ID NO: 81), Frz8-Fc (SEQ ID NO: 74), Frz9-Fc (SEQ ID NO: 82), Frz10-Fc (SEQ ID NO: 83), sFRP1-Fc (SEQ ID NO: 84), sFRP2-Fc (SEQ ID NO: 85), sFRP3-Fc (SEQ ID NO: 86), sFRP4-Fc (SEQ ID NO: 87), and sFRP5-Fc (SEQ ID NO: 88)). The bold text for Frz1-Fc (first 28 N-terminal amino acid residues), Frz2-Fc (first 31 N-terminal amino acid residues), Frz3-Fc (first 31 N-terminal amino acid residues), Frz4-Fc (first 31 N-terminal amino acid residues) Frz5-Fc (first 31 N-terminal amino acid residues), and sFRP3-Fc (first 31 N-terminal amino acid residues) indicates a non-native leader sequence. The linker is underlined and the Fc domain, following the linker, is shown in italics.

Figure 8 shows an alignment of Frizzled extracellular domains where black shows conserved residues across all receptors and gray represents residues conserved across homologous groups.

Figure 9 shows Frizzleds grouped into families based on both full-length and extracellular domain sequence identities.

Figure 10 depicts samples of purified Frizzled-Fc fusion proteins expressed and purified from CHO cells. Samples were separated on non-reducing SDS-PAGE gels and imaged by Coomassie staining.

Figure 11 show a comparison of serum stability of the two different Frz8-Fc chimeras Frz8(173)-Fc and Frz(156)-Fc. Figure 11A is an immunoblot for human FC used to detect the chimeric proteins present at increasing time points in serum of athymic nude mice injected with the chimeras. Figure 11B shows the Wnt inhibitory activity of the chimeric proteins assayed by measuring TOPglow activity shown on the Y axis as relative luciferase activity.

Figure 12 is a graph of tumor volume over time resulting from treatment with Frz8(173)-Fc chimera.

Figure 13 shows pharmacokinetic (PK) data for Frz8-Fc following administration of a single dose of the protein. Figure 13A is an immunoblot of a neat serum from mice treated with Frz8-Fc showing detection in serum at 7 days and beyond from both 20 or 5 mg/kg I.V. or 20 mg/kg I.P. Figures 13B and 13C are a graphical summary of Frz8-Fc serum levels as determined from the pharmacokinetic study. Figure 13D is a summary of the parameters for a biphasic model of Frz8-Fc pharmacokinetics.

Figure 14 demonstrate the enhanced ability of Frz8-ECD to block Wnt3a signaling when linked to a dimeric Fc domain. Figure 14A is an IC_{50} graph of a Wnt3a inhibition assay of two different preparations of Frz8(156)-FC. Figure 14B is a gel confirming the purity of the isolated Frz8(156) CRD (ECD). Shown are: (a) non-reduced Frz8 ECD (Lane 1); (b) molecular weight markers (Lane 2); and reduced Frz8 ECD (Lane 3).

Figure 15 demonstrates direct binding of Wnt3a to the Frz8-Fc chimera. Figure 15A is BIAcore sensogram demonstrating binding of purified soluble Wnt3a to immobilized Frz8-Fc. Figure 15B is an immunoprecipitation of a purified soluble Wnt3a by immobilized Frz8-Fc.

Figure 16 demonstrates direct binding of several Frz-Fc chimeras to Wnt ligands as measured using the OCTET™ system. Figure 16A shows data from the binding of Wnt3a to the Frz1-Frz10-Fc chimeras, Figure 16B shows data from the binding of Wnt3a to sFRP-Fc chimeras. Figure 16C shows data from the binding of Wnt5a to the Frz1-Frz10-Fc chimeras and sFRP-Fc chimeras.

Figure 17 shows the effect of the Wnt antagonists on Wnt-stimulated cells transiently transfected with TOPglow luciferase TCF reporter plasmid. Figure 17A shows cells stimulated with Wnt3a and Figure 17B shows cells stimulated with Wnt-5a. Cells to be treated with Wnt5a were transfected with Frz4 and Lrp5 in addition to the reporter. 293 (human kidney) cells were activated with 100ng/ml Wnt3a or 1ug/ml Wnt5a. Cells then left

untreated, treated with control Fc, or treated with purified Frz-Fc protein in PBS and assayed for luciferase response.

Figure 18 shows inhibition of Wnt signaling by the Wnt antagonists in U2OS (human osteosarcoma) cells stably transfected with a luciferase TCF reporter plasmid. Initial Wnt signaling in cells was obtained with Wnt3a activation.

Figure 19 shows the effect of Frz8-Fc on expression of Wnt-target genes in cultured teratoma cells and tumor xenografts. Figure 19A shows expression of Wnt-target genes in PA-1 cell lines treated with Wnt3a and Frz8-Fc. RNA isolated from PA-1 cells that were treated with Wnt3a, Frz8-Fc, or control Fc protein was subject to microarray analysis and the change in expression levels of the indicated genes in response to exogenously added Wnt3a, Frz8-Fc, and control Fc protein was plotted. Columns, mean expression level from three wells; bars, standard error (S). Figure 19B shows the relative expression of Wnt target genes APCDD1, Gad-1, and Fzd5 in NTera-2 tumors from mice given PBS, CD4-Fc, or Frz8-Fc relative to PBS control. The data represents the mean expression level from the indicated number of tumors and is representative of at least two independent qRT-PCR experiments done in duplicate. Regulation of expression of each gene by the addition of purified Wnt3a to the corresponding cultured cells is also presented.

Figure 20 shows the accession number and sequence of primers and probes used for real-time quantitative PCR analysis of gene expression shown in Figure 19 (Example 9).

Figure 21 is a linear schematic describing the vector construct used in the transfection to create the Wnt animal model.

Figure 22 illustrates the efficacy of Frz8-Fc against MMTV-Wnt tumor transplants in athymic nude mice by intraperitoneal (IP) dosing. Figure 22A is a graph showing data from nude mice hosting MMTV-Wnt-1 tumor transplants were administered PBS, CD4-Fc (10 mg/kg/day) or Frz8-Fc (10 mg/kg/day) by intraperitoneal injection twice weekly. Mean tumor volume is plotted over time and the treatment days are indicated by arrows on the X-axis. Figure 22B is tabular summary of mean tumor volume and mean % change in tumor volume over time in the four treatment groups.

Figure 23 illustrates the efficacy of Frz8-Fc against MMTV-Wnt tumor transplant in athymic nude mice by intravenous (IV) dosing. Figure 23A is a graph showing data from nude mice hosting MMTV-Wnt-1 tumor transplants were administered PBS, CD4-Fc (10 mg/kg/day) or Frz8-Fc (10 mg/kg/day) by intravenous injection three times weekly. Mean tumor volume is plotted over time and the treatment days are indicated by arrows on the X-

axis. Figure 23B is a tabular summary of mean tumor volume and mean % change in tumor volume over time in the four treatment groups.

Figure 24 is a bar graph showing the Wnt signaling antagonist activity in the TOPglow assay of various Wnt antagonists in serum isolated from the MMTV Wnt tumor study. The X-axis samples appear in groups A-E (Figure 24A) or A-F (Figure 24B) according to treatment, mouse study number and dilution. The relative luciferase activity in the TOPGLOW gene reporter assay is shown on the Y-axis. All samples are treated with ~ 40 ng/ml purified Wnt3a except for NA (control). All other protein controls are present in the medium at 5 μg/ml. Figure 24A shows the testing results of serum isolated from IP treated mice, while the IV treated ones appear in Figure 24B.

Figure 25 shows Wnt signaling antagonist activity in the TOPglow assay of various Wnt antagonists in the indicated teratacarcinoma cell lines in the absence (Figure 25A) or presence (Figure 25B) of exogenously added Wnt3a. For each cell line, activity was expressed relative to that observed in the absence of any treatment (NA); representative of at least two independent experiments. Relative luciferase activity (Y-axis) were measured from TOPglow assays from various cancer cell lines in the presence or absence or Wnt inhibitors.

Figure 26 demonstrates the anti-tumor efficacy of Frz8 (156)-Fc treatment on the growth of NTera2 tumor xenografts in athymic nude mice. Figure 26A is procedural flow chart, while Figure 26B is a graph plotting mean tumor volume over time, wherein the treatment days are indicated by arrows on the X-axis. Figure 26C is a bar graph plotting the mean tumor weights at sacrifice of all animals in the group at day 20 of the study. Figures 26D and 26E are tabular summaries of mean tumor volume and mean % change in tumor volume, respectively.

Figure 27 is a bar graph showing Wnt signaling antagonist activity of serum isolated from various animals in the NTera2 tumor study as determined by the TOPglow assay. The Y-axis shows relative luciferase activity (Y-axis) from the TOPglow assay for the controls and Frz8-Fc Wnt antagonist. No additional purified Wnt or Wnt conditioned media was added to the cells.

Figure 28 shows the anti-tumor efficacy of Frz8 (156)-Fc treatment on the growth of PA-1 tumor xenografts in athymic nude mice. Figure 28A is a procedural flow chart, while Figure 28B is a graph plotting mean tumor volume over time. Figure 28C is a graph of mean tumor weight at sacrifice. The mean tumor weight ± SEM is plotted as a function of the group.

Figures 28D and 28E are tabular summaries of mean tumor volume and mean % change in tumor volume, respectively.

Figure 29 shows Wnt signaling inhibition in mice treated with Frz8-Fc or Frz5-Fz as determined by the TOPglow assay. The Y-axis shows relative luciferase activity (Y-axis) from the TOPglow assay for the controls and Frz8-Fc and Frz5-Fc Wnt antagonists.

Figure 30 shows the reduced Axin2 expression in Frz8-Fc and Frz5-Fz treated tumor with Figure 30A showing expression normalized to expression of GAPDH and Figure 30B showing expression normalized to expression of rpl19.

Figure 31 shows immunohistochemistry (IHC) photomicrographs for IHC staining of β-catenin and demonstrate that Frz8-Fc treatment on regenerative tissues such as intestine and skin appear normal. Figure 31A shows IHC for β-catenin in small intestine of PBS (A-1) control protein (A-2) and Frz8-Fc (A-3) treated mice. Figure 31B shows IHC for β-catenin in skin of PBS (B-1) control protein (B-2) and Frz8-Fc (B-3) treated mice.

Figure 32 is an illustration of active Wnt signaling in human breast cancer. Figure 32A shows Wnt-1 expression (as shown by in vitro hybridization) in normal (A-1), low grade (A-2) and high grade (A-3) human breast tumor initially reported in Wong et al., J. Pathol. 196: 145 (2002). Figure 32B shows nuclear (B-1) and cytoplasmic (B-2) localization (as shown by IHC) of β-catenin in breast cancer patients. Also shown is a Kaplan-Meier survival plot (B-3) showing patient survival probability that correlates with the indicated β-catenin expression pattern. This data was initially reported in Lin et al., P.N.A.S. (USA) 97(8): 4262-66 (2000). Figure 32C is a microarray analysis of Wnt-1 expression in a normal breast from a patient without cancer in comparison with tissue isolated from a patient with infiltrating ductal carcinoma, her-2 negative.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

I. DEFINITIONS

A "Wnt protein" is a ligand of the Wnt signaling pathway component which binds to a Frizzled receptor so as to activate Wnt signaling. Specific examples of Wnt proteins include at least 19 members, including: Wnt-1 (RefSeq.: NM_005430), Wnt-2 (RefSeq.:NM_003391), Wnt-2B (Wnt-13) (RefSeq.: NM_004185), Wnt-3 (ReSeq. :NM_030753), Wnt3a (RefSeq.: NM_033131), Wnt-4 (RefSeq.: NM_030761), Wnt-5A (RefSeq.: NM_003392), Wnt-5B (RefSeq.: NM_032642), Wnt-6 (RefSeq.: NM_006522), Wnt-7A (RefSeq.: NM_004625), Wnt-7B (RefSeq.: NM_058238), Wnt-8A

(RefSeq.: NM_058244), Wnt-8B (RefSeq.: NM_003393), Wnt-9A (Wnt-14) (RefSeq.: NM_003395), Wnt-9B (Wnt-15) (RefSeq.: NM_003396), Wnt-10A (RefSeq.: NM_025216), Wnt-10B (RefSeq.: NM_003394), Wnt-11 (RefSeq.: NM_004626), Wnt-16 (RefSeq.: NM_016087)). While each member has varying degrees of sequence identity, each contain 23-24 conserved cysteine residues which show highly conserved spacing. McMahon, AP *et al., Trends Genet.* 8: 236-242 (1992); Miller JR., *Genome Biol.* 3(1): 3001.1-3001.15 (2002). For purposes of this invention, a Wnt protein and active variants thereof is a protein that binds to a Frizzled ECD or the CRD component of such an Frz ECD.

A "Frizzled" (Frz) protein is a Wnt signaling pathway component that is a seven-pass transmembrane receptors that binds to a Wnt protein, and further complexes with other membrane - associated Wnt signaling components, so as to transmit Wnt signaling to downstream intracellular components. Frz proteins include Frz1, Frz2, Frz3, Frz4, Frz5, Frz6, Frz7, Frz8, Frz9, and Frz10. Examples of human full length Frz proteins are hFrz1 (NP_003496) (SEQ ID NO: 1), hFrz2 (NP_001457) (SEQ ID NO: 2), hFrz3 (NP_059108) (SEQ ID NO: 3), hFrz4 (NP_036325) (SEQ ID NO: 4), hFrz5 (NP_003459) (SEQ ID NO: 5), hFrz6 (NP_003497) (SEQ ID NO: 6), hFrz7 (NP_003498) (SEQ ID NO: 7), hFrz8 (NP_114072) (SEQ ID NO: 8), hFrz9 (NP_003499) (SEQ ID NO: 9), and hFrz10 (NP_009128) (SEQ ID NO: 10) (Figures 6A -6C).

A "secreted Frizzled related protein" (sFRP) is a Wnt signaling pathway component that is a secreted extracellular polypeptide that binds to a Wnt protein. sFRP proteins include sFRP1, sFRP2, sFRP3, sFRP4, and sFRP5. Examples of human full length sFRP proteins are sFRP1 (NP_003003) (SEQ ID NO: 11), sFRP2 (NP_003004) (SEQ ID NO: 12), sFRP3 (NP_001454) (SEQ ID NO: 13), sFRP4 (NP_003005) (SEQ ID NO: 14), and sFRP5 (NP_003006) (SEQ ID NO: 15) (Figures 6C-6D).

The "Ror" protein, includes the mammalian homologs, Ror1 and Ror2, which are characterized by extracellular Frizzled-like cysteine-rich domains (CRDs) as well as membrane proximal kringle domains. Ror proteins play crucial roles in developmental morphogenesis and are associated with different components of the cytoskeleton. Ror1 co-localizes with F-actin along stress fibers, while Ror2 partially colocalizes with microtubules. Ror1 and Ror2 share about 58% overall sequence identity. Ror2 associates with the melanoma-associated antigen (MAGE) family protein Dlxin-1 and regulates its intracellular distribution. Ror1 proteins include Ror1 and Ror2. Examples of human full length Ror

proteins are hRor1 (NP_005003) (SEQ ID NO: 16), and hRor2 (NP_004551) (SEQ ID NO: 17) (Figures 6D-6E).

A "Frz domain component" is a polypeptide derived from a Frz protein, a sFRP protein, a Ror protein, or other protein, that is capable of binding with a Wnt protein. A polypeptide "derived from" a protein means a polypeptide that has an amino acid sequence that can be found within the reference protein sequence or within the sequence of active variants of the protein. Examples of a Frz domain component include a minimal cysteine rich domain (CRD) of an extracellular domain "CRD (ECD)" of a Frz protein, a sFRP protein, or a Ror protein, such as the CRD (ECD) of Frz1, Frz2, Frz3, Frz4, Frz5, Frz6, Frz7, Frz8, Frz9, Frz10, sFRP1, sFRP2, sFRP3, sFRP4, sFRP5, Ror1, or Ror2, and active variants thereof. The CRD (ECD) is a conserved structural motif of 100 to 250 amino acids and is defined by 10 highly conserved cysteines. Particular examples of human CRD (ECD)s are shown in boxed text in Figure 3B and presented as SEQ ID NOs: hFrz1 (SEQ ID NO: 18), hFrz2 (SEQ ID NO: 19), hFrz3 (SEQ ID NO: 20), hFrz4 (SEQ ID NO: 21), hFrz5 (SEQ ID NO: 22), hFrz6 (SEQ ID NO: 23), hFrz7 (SEQ ID NO: 24), hFrz8 (SEQ ID NO: 25), hFrz9 (SEQ ID NO: 26), hFrz10 (SEQ ID NO: 27), sFRP1 (SEQ ID NO: 28), sFRP2 (SEQ ID NO: 29), sFRP3 (SEQ ID NO: 30), sFRP4 (SEQ ID NO: 31), sFRP5 (SEQ ID NO: 32), hRor1 (SEQ ID NO: 33), and hRor2 (SEQ ID NO: 34).

Additional examples of a Frz domain component include a pro-Frz domain derived from a pro-Frz or pro-sFRP protein such as Frz1, Frz2, Frz3, Frz4, Frz5, Frz6, Frz7, Frz8, Frz9, Frz10, sFRP1, sFRP2, sFRP3, sFRP4, or sFRP5, and active variants thereof. Particular examples of human pro-Frz domains are shown in Figure 3A and presented as SEQ ID NOs: hFrz1 (SEQ ID NO: 35), hFrz2 (SEQ ID NO: 36), hFrz3 (SEQ ID NO: 37), hFrz4 (SEQ ID NO: 38), hFrz5 (SEQ ID NO: 39), hFrz6 (SEQ ID NO: 40), hFrz7 (SEQ ID NO: 41), hFrz8 (SEQ ID NO: 42), hFrz9 (SEQ ID NO: 43), hFrz10 (SEQ ID NO: 44), sFRP1 (SEQ ID NO: 45), sFRP2 (SEQ ID NO: 46), sFRP3 (SEQ ID NO: 47), sFRP4 (SEQ ID NO: 48), and sFRP5 (SEQ ID NO: 49).

Additional examples of a Frz domain component include a mature Frz domain derived from a mature Frz, sFRP, or Ror protein, such as Frz1, Frz2, Frz3, Frz4, Frz5, Frz6, Frz7, Frz8, Frz9, Frz10, sFRP1, sFRP2, sFRP3, sFRP4, sFRP5, Ror1, or Ror2 and active variants thereof. Particular examples of human mature Frz domains are shown in Figure 3B and presented as SEQ ID NOs: hFrz1 (SEQ ID NO: 50), hFrz2 (SEQ ID NO: 51), hFrz3 (SEQ ID NO: 52), hFrz4 (SEQ ID NO: 53), hFrz5 (SEQ ID NO: 54), hFrz6 (SEQ ID NO:

55), hFrz7 (SEQ ID NO: 56), hFrz8 (SEQ ID NO: 57), hFrz9 (SEQ ID NO: 58), hFrz10 (SEQ ID NO: 59), sFRP1 (SEQ ID NO: 60), sFRP2 (SEQ ID NO: 61), sFRP3 (SEQ ID NO: 62), sFRP4 (SEQ ID NO: 63), sFRP5 (SEQ ID NO: 64), hRor1 (SEQ ID NO: 65), and hRor2 (SEQ ID NO: 66).

A "Wnt antagonist" is a chimeric polypeptide comprising a Frz domain component and an immunoglobulin Fc domain that binds to a Wnt protein and is active by attenuating cellular Wnt signaling, or a physiological symptom resulting therefrom.

In certain embodiments, the Fc domain is a human IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4 Fc domain. In one embodiment, the Fc domain is a human IgG1 Fc domain. Specific examples of Fc domains are shown in Figures 4, 5, and Figures 7 and in SEQ ID NO: 67 and SEQ ID NO: 68.

In some embodiments, the Frz domain component and the Fc domain are fused by a linker. The term "linker" refers to a component that tethers together the Frz domain component to the Fc domain. Linkers that are suitable for use in the invention exhibit minimal or no interference with expression, secretion and folding of the protein domains of the Wnt antagonist molecules and provide minimal or no interference with either the effector function of the Fc domain or Wnt protein interaction function of the Frz domain (*e.g.*, binding to a Wnt protein) through steric or other means. In particular embodiments, the linker is short peptide sequence. A linker sequence may also include additional amino acid residues from either the Frz domain component or Fc domain outside the minimal residues needed for activity. Preferred linkers will also provide for good serum stability and are resistant to protease cleavage. Specific examples of useful linkers appear in Figure 4, Figure 5, and Figure 7, including the sequences ESGGGGVT (SEQ ID NO: 69), LESGGGGVT (SEQ ID NO: 70), GRAQVT (SEQ ID NO: 71), WRAQVT (SEQ ID NO: 72), and ARGRAQVT (SEQ ID NO: 73). As noted above, these linkers may include additional amino acid residues from either the Frz domain component or the Fc domain outside the minimal residues needed for activity. These linkers may also comprise additional amino acid residues other than those from the Frz domain component or Fc domain component.

A "Wnt signaling pathway component" is a component that transduces a signal originating from an interaction between a Wnt protein and an Frz receptor. As the Wnt signaling pathway is complex, and involves extensive feedback regulation, there are numerous and likely not yet discovered members of the Wnt signaling pathway. Example Wnt signaling pathway components include the membrane associated proteins LRP5 and

LRP6, Axin, and Dishevelled, the extracellular Wnt interactive proteins sFRP, WIF-1, the LRP inactivating proteins Dkk and Krn, the cytoplasmic protein β-catenin, members of the β-catenin "degradation complex" APC, GSK3β, CKIα and PP2A, the nuclear transport proteins APC, pygopus and bcl9/legless, and the transcription factors TCF/LEF, Groucho and various histone acetylases such as CBP/p300 and Brg-1.

A "Wnt-mediated disorder" is a disorder, condition, or disease state characterized by aberrant Wnt signaling. In a specific aspect, the aberrant Wnt signaling is a level of Wnt signaling in a cell or tissue suspected of being diseased that exceeds the level of Wnt signaling in a similar non-diseased cell or tissue. In a specific aspect, a Wnt-mediated disorder includes cancer.

The term "cancer" refers to the physiological condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth/proliferation. Examples of cancer include, but are not limited to: carcinoma, lymphoma, blastoma, and leukemia. More particular examples of cancers include, but are not limited to: chronic lymphocytic leukemia (CLL), lung, including non small cell (NSCLC), breast, ovarian, cervical, endometrial, prostate, colorectal, intestinal carcinoid, bladder, gastric, pancreatic, hepatic (hepatocellular), hepatoblastoma, esophageal, pulmonary adenocarcinoma, mesothelioma, synovial sarcoma, osteosarcoma, head and neck squamous cell carcinoma, juvenile nasopharyngeal angiofibromas, liposarcoma, thyroid, melanoma, basal cell carcinoma (BCC), medulloblastoma and desmoid.

The term "control sequences" refers to DNA sequences necessary for the expression of an operably linked coding sequence in a particular host organism. The control sequences that are suitable for prokaryotes, for example, include a promoter, optionally an operator sequence, and a ribosome binding site. Eukaryotic cells are known to utilize promoters, polyadenylation signals, and enhancers.

Nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not

have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

An "active" polypeptide, variant polypeptide, or fragments thereof, retain a biological activity of native or naturally-occurring component of the active polypeptide. Biological activity refers to a function mediated by the native or naturally-occurring counterpart of the active polypeptide. For example, binding or a protein-protein interaction constitutes a biological activity. In a specific sense, an active Wnt signaling pathway component is one which can effectively transduce a signal through interaction with other Wnt signaling pathway components. In another specific sense, an active Wnt antagonist is one which detectably attenuates Wnt signaling or a physiological condition resulting therefrom, relative to the level prior to administration of the Wnt antagonist.

"Stringency" of hybridization reactions is readily determinable by one of ordinary skill in the art, and generally is an empirical calculation dependent upon probe length, washing temperature, and salt concentration. In general, longer probes require higher temperatures for proper annealing, while shorter probes need lower temperatures. Hybridization generally depends on the ability of denatured DNA to reanneal when complementary strands are present in an environment below their melting temperature. The higher the degree of desired homology between the probe and hybridizable sequence, the higher the relative temperature which can be used. As a result, it follows that higher relative temperatures would tend to make the reaction conditions more stringent, while lower temperatures less so. For additional details and explanation of stringency of hybridization reactions, see Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"High stringency conditions", as defined herein, may be identified by those that: (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example 0.015 M sodium chloride/0.0015 M sodium citrate/0.1% sodium dodecyl sulfate at 50°C; (2) employ during hybridization a denaturing agent, such as formamide, for example, 50% (v/v) formamide with 0.1% bovine serum albumin/0.1% Ficoll/0.1% polyvinylpyrrolidone/50mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 with 750 mM sodium chloride, 75 mM sodium citrate at 42°C; or (3) overnight hybridization in a solution that employs 50% formamide, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5 x Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (50 μg/ml), 0.1%

SDS, and 10% dextran sulfate at 42°C, with a 10 minute wash at 42°C in 0.2 x SSC (sodium chloride/sodium citrate) followed by a 10 minute high-stringency wash consisting of 0.1 x SSC containing EDTA at 55°C.

"Moderately stringent conditions" may be identified as described by Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, and include the use of washing solution and hybridization conditions (e.g., temperature, ionic strength and %SDS) less stringent that those described above. An example of moderately stringent conditions is overnight incubation at 37°C in a solution comprising: 20% formamide, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 7.6), 5 x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 20 mg/ml denatured sheared salmon sperm DNA, followed by washing the filters in 1 x SSC at about 37-50°C. The skilled artisan will recognize how to adjust the temperature, ionic strength, etc. as necessary to accommodate factors such as probe length and the like.

The term "epitope tagged" refers to a polypeptide that is fused to a "tag polypeptide." The tag polypeptide has enough residues to provide an epitope against which an antibody can be made, yet is short enough such that it does not interfere with activity of the polypeptide to which it is fused. The tag polypeptide preferably also is fairly unique so that the antibody does not substantially cross-react with other epitopes. Suitable tag polypeptides generally have at least six amino acid residues and usually between about 8 and 50 amino acid residues (preferably, between about 10 and 20 amino acid residues). Example epitope tag sequences include HA, GD, c-myc, poly-His and FLAG.

"Treating" or "treatment" or "alleviation" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures, wherein the object is to prevent or slow down (lessen) the targeted pathologic disease or condition or disorder. Those in need of treatment include those already with the disorder as well as those prone to having the disorder or those in whom the disorder is to be prevented (prophylaxis). When the Wnt-mediated disorder is cancer, a subject or mammal is successfully "treated" or shows a reduced tumor burden if, after receiving a therapeutic amount of a Wnt antagonist according to the methods of the present invention, the patient shows observable and/or measurable reduction in or absence of one or more of the following: reduction in the number of cancer cells or absence of the cancer cells; reduction in the tumor size; inhibition (i.e., slow to some extent and preferably stop) of cancer cell infiltration into peripheral organs including the spread of cancer into soft tissue and bone; inhibition (i.e., slow to some extent and preferably stop) of tumor

metastasis; inhibition, to some extent, of tumor growth; and/or relief to some extent, one or more of the symptoms associated with the specific cancer; reduced morbidity and mortality, and improvement in quality of life issues. To the extent the Wnt antagonist may prevent growth and/or kill existing cancer cells, it may be cytostatic and/or cytotoxic. Reduction of these signs or symptoms may also be felt by the patient.

The above parameters for assessing successful treatment and improvement in the disorder are readily measurable by routine procedures familiar to a physician. For cancer therapy, efficacy can be measured, for example, by assessing the time to disease progression (TDP) and/or determining the response rate (RR). Metastasis can be determined by staging tests and by bone scan and tests for calcium level and other enzymes to determine spread to the bone. CT scans can also be done to look for spread to the pelvis and lymph nodes in the area. Chest X-rays and measurement of liver enzyme levels by known methods are used to look for metastasis to the lungs and liver, respectively. Other routine methods for monitoring the disease include transrectal ultrasonography (TRUS) and transrectal needle biopsy (TRNB).

"Chronic" administration refers to administration of the agent(s) in a continuous mode as opposed to an acute mode, so as to maintain the initial therapeutic effect (activity) for an extended period of time. "Intermittent" administration is treatment that is cyclic, or subject to periodic interruptions, as opposed to continuous or consecutive.

"Mammal" refers to any animal classified as a mammal, including humans, domestic and farm animals, and zoo, sports, or pet animals, such as dogs, cats, cattle, horses, sheep, pigs, goats, rabbits, *etc.* Preferably, the mammal is human.

Administration "in combination with" one or more further therapeutic agents includes simultaneous (concurrent) and consecutive administration in any order.

"Carriers" as used herein include pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers which are nontoxic to the cell or mammal being exposed thereto at the dosages and concentrations employed. Often the physiologically acceptable carrier is an aqueous pH buffered solution. Examples of physiologically acceptable carriers include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptide; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrins; chelating

agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as TWEEN®, polyethylene glycol (PEG), and PLURONICS®.

An "effective amount" of a *Wnt* antagonist is an amount sufficient to carry out a specifically stated purpose. An "effective amount" may be determined empirically and in a routine manner, in relation to the stated purpose.

The term "therapeutically effective amount" refers to an amount of a *Wnt* antagonist effective to "treat" a Wnt-mediated disorder in a subject or mammal. In the case of cancer, the therapeutically effective amount of the drug may reduce the number of cancer cells; reduce the tumor size; inhibit (*i.e.*, slow to some extent and preferably stop) cancer cell infiltration into peripheral organs; inhibit (*i.e.*, slow to some extent and preferably stop) tumor metastasis; inhibit, to some extent, tumor growth; and/or relieve to some extent one or more of the symptoms associated with the cancer. See the definition herein of "treating". To the extent the drug may prevent growth and/or kill existing cancer cells, it may be cytostatic and/or cytotoxic.

A "growth inhibitory amount" of a Wnt antagonist is an amount capable of inhibiting the growth of a cell, especially tumor, *e.g.*, cancer cell, either *in vitro* or *in vivo*. A "growth inhibitory amount" of a *Wnt* antagonist for purposes of inhibiting neoplastic cell growth may be determined empirically and in a routine manner.

A "cytotoxic amount" of a Wnt antagonist is an amount capable of causing the destruction of a cell, especially tumor, *e.g.*, cancer cell, either *in vitro* or *in vivo*. A "cytotoxic amount" of a *Wnt* antagonist for purposes of inhibiting neoplastic cell growth may be determined empirically and in a routine manner.

The terms "antibody" and "immunoglobulin" are used interchangeably, and in the broadest sense, including monoclonal antibodies (*e.g.*, full length or intact monoclonal antibodies), polyclonal antibodies, multivalent antibodies, multispecific antibodies (*e.g.*, bispecific antibodies exhibiting the desired biological activity) and may also include certain antibody fragments, as described herein in greater detail. An antibody can be chimeric, human, humanized or affinity matured.

The light chain from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, called kappa (κ) and lambda (λ), based on the amino acid sequences of their constant domains. Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their

heavy chains (C_H), immunoglobulins can be assigned to different classes or isotypes. There are five classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, having heavy chains designated α, δ, ε, γ, and μ, respectively. The γ and α classes are further divided into subclasses on the basis of relatively minor differences in C_H sequence and function, *e.g.*, humans express the following subclasses: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, and IgA2. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known and described generally in, for example, Abbas *et al.*, Cellular and Molecular Biology, 4th Ed. (2000). An antibody may be part of a larger fusion molecule, formed by covalent or non-covalent associated of the antibody with one or more other proteins or peptides.

"Antibody fragments" comprise a portion of an intact antibody, preferably the antigen binding or variable region of the intact antibody. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', $F(ab')_2$ and Fv fragments, diabodies, linear antibodies (U.S.P. 5,641,870); Zapata *et al., Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 (1995), single chain antibody molecules and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

Papain digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments, called "Fab" fragments, and a residual "Fc" fragment, a designation reflecting the ability to crystallize readily. The Fab fragment consists of an entire light chain along with the variable region domain of the heavy chain (V_H), and the first constant domain of one heavy chain (C_H1). Each Fab fragment is monovalent with respect to antigen binding, *i.e.*, it has a single antigen-binding site. Pepsin treatment of an antibody yields a single large $F(ab')_2$ fragment which roughly corresponds to two disulfide linked Fab fragments having divalent antigen-binding activity and is still capable of cross-linking antigen. Fab' fragments differ from Fab fragments by having additional few residues at the carboxy terminus of the C_H1 domain including one or more cysteines from the antibody hinge region. Fab'-SH is the designation herein for Fab' in which the cysteine residue(s) of the constant domains bear a free thiol group. $F(ab')_2$ antibody fragments originally were produced as pairs of Fab' fragments which have hinge cysteines between them. Other chemical couplings of antibody fragments are also known.

The Fc fragment comprises the carboxy-terminal portions of both heavy chains held together by disulfides. The effector functions of antibodies are determined by sequences in the Fc region, which region is also the part recognized by Fc receptors (FcR) found on certain types of cells.

"Fv" is the minimum antibody fragment which contains a complete antigen-recognition and -binding site. This fragment consists of a dimer of one heavy- and one light-chain variable region domain in tight, non-covalent association.

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogenous antibodies, *i.e.* the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigen. In contract to polyclonal antibody preparations that typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen.

The term "chimeric" antibody, specifically included within the definition of monoclonal antibody, means antibodies in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragment of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity U.S.P. 4,816,567; Morrison *et al., P.N.A.S. USA* 81: 6851-6855 (1984).

"Humanized" forms of non-human (*e.g.,* rodent) antibodies are chimeric antibodies that contain minimal sequence derived from the non-human antibody. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a hypervariable region of the recipient are replaced by residues from a hypervariable region of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, rabbit or non-human primate having the desired antibody specificity, affinity, and capability. In some instances, framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues that are not found in the recipient antibody or in the donor antibody. These modifications are made to further refine antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the hypervariable loops correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FRs are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody optionally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human

immunoglobulin. For further details, see Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). See also, Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Trans.* 23: 1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5: 428-433 (1994).

"Polynucleotide" or "nucleic acid" are used interchangeably herein, and refer to polymers of nucleotides of any length, including, but are not limited to DNA and RNA. The nucleotides can be deoxyribonucleotides, ribonucleotides, modified nucleotides or bases, and/or their analogs, or any substrate that can be incorporated into a polymer by DNA or RNA polymerase, or by a synthetic reaction. A polynucleotide may comprise modified nucleotides, such as methylated nucleotides and their analogs. If present, modification to the nucleotide structure may be imported before or after assembly of the polymer. The sequence of nucleotides may be interrupted by non-nucleotide components. A polynucleotide may be further modified after synthesis, such as by conjugation with a label. Other types of modifications include, for example, "caps", substitution of one or more of the naturally occurring nucleotides with an analog, internucleotide modifications such as, for example: uncharged linkages (*e.g.*, methyl phosphonates, phosphotriesters, phosphoamidates, carbamates, *etc.*); charged linkages (*e.g.*, phosphorothioates, phosphorodithioates, *etc.*); pendant moieties, such as, for example, proteins (*e.g.*, nucleases, toxins, antibodies, signal peptides, poly-L-lysine, *etc.*); intercalators (*e.g.*, acridine, psoralen, *etc.*); chelators (*e.g.*, metals, radioactive metals, boron, oxidative metal, *etc.*), alkylators, modified linkages (*e.g.*, alpha anomeric nucleic acids, *etc.*). Further, any of the hydroxyl groups ordinarily present in the sugars may be replaced, for example, by phosphonate groups, phosphate groups, protected by standard protecting groups, or activated to prepare additional linkages to additional nucleotides, or may be conjugated to solid or semi-solid supports. The 5' and 3' terminal OH can be phosphorylated or substituted with amines or organic capping group moieties of from 1 to 20 carbon atoms. Other hydroxyls may also be derivatized to standard protecting groups. Polynucleotides can also contain analogous forms of ribose or deoxyribose sugars that are generally known in the art, including, for example, 2'-O-methyl, 2'-O-allyl, 2'-fluoro- or 2'-azido-ribose, carbocyclic sugar analogs, α-anomeric sugars, epimeric sugars such as arabinose, xylose or lyxose, pyranose sugars, furanose sugars, sedoheptuloses, acyclic analogs and abasic nucleoside analogs such as methyl riboside. One or more phosphodiester linkages may be replaced by alternative linking groups. These alternative linking groups include, but are not limited to, embodiments wherein phosphate is

replace by P(O)-S-(thioate), P(S)-S-(dithioate)-, (O)NR_2-amidate, P(O)R, P(O)OR', CO or CH_2-(formacetal), in which each R or R' is independently H or substituted or unsubstituted C_{1-20} alkyl, optionally containing an ether, aryl, alkenyl, cycloalkenyl or aralkyl linkage. Not all linkages in a polynucleotide need be identical. The preceding description applies to all polynucleotides referred to herein, including RNA and DNA.

The term "peptide" generally refers to a contiguous and relatively short sequence of amino acids linked by peptidyl bonds. Typically, but not necessarily, a peptide has length of about 2 to 50 amino acids, 4-40 amino acids or 10-30 amino acids. Although the term "protein" generally refers to longer forms of a "polypeptide," the two terms can be and are used interchangeably in some contexts herein, and refer to amino acid sequences that are generally longer and perhaps more complex (*e.g.*, multiple sequence, secondary and higher structure).

A "region" of a polypeptide is a contiguous sequence of 2 or more amino acid residues. In alternative embodiments, a region is at least about 3, 5, 10, 15 or more contiguous amino acid residues.

"C-terminal region", "C-terminal sequence" and variations thereof, as used herein, refer to an amino acid sequence that is located at or in close proximity to the C-terminal (generally 3') end. Generally, the sequence includes an amino acid that has a free carboxyl group. In one embodiment, a C-terminal regions or sequence refers to a region of a polypeptide that includes about 1-15 residues located closest to the C-terminus.

"N-terminal region", "N-terminal sequence", and variations thereof, as used herein, refer to an amino acid sequence that is located at or in close proximity to the N-terminal (generally 5') end. Generally, the sequence includes an amino acid that has free amino group. In one embodiment, an N-terminal region or sequence refers to a region of a polypeptide that includes about 1-15 residues located closest to the N terminus of the polypeptide.

"Internal region" or "internal sequence", and variations thereof, refer to an amino acid sequence that is located within a polypeptide and is flanked on both its N- and C-termini by one or more amino acids that are not part of the sequence. Generally, the sequence does not include an amino acid with either a free carboxyl or amino group.

A "ligand" refers to a naturally-occurring or synthetic molecule or moiety that is capable of a binding interaction with a specific site on a protein or other molecule, such as a

receptor. A *Wnt* ligand is a molecule that specifically interacts with a *Frizzled* receptor. A "receptor" is often, but need not be located on the cell surface or membrane.

A "fusion protein" refers to a polypeptide having two portions covalently linked together, where each of the portions is derived from different proteins. The two portions may be linked directly by a single peptide bond or through a peptide linker containing one or more amino acid residues. Generally, the two portions and the linker will be in reading frame with each other and are produced using recombinant techniques.

A Wnt antagonist that "inhibits the growth of tumor cells" or a "growth inhibitory" Wnt antagonist is one which results in measurable growth inhibition of tumor cells having aberrant Wnt signaling activity. Preferred growth inhibitory Wnt antagonists inhibit growth of tumor cells having aberrant Wnt signaling activity by greater than 20%, preferably from about 20% to about 50%, and even more preferably, by greater than 50% (*e.g.*, from about 50% to about 100%) as compared to the appropriate control, the control typically being cancer cells not treated with the Wnt antagonist molecule being tested. In one embodiment, growth inhibition can be measured at a Wnt antagonist concentration of about 0.1 to 30 μg/ml or about 0.5 nM to 200 nM in cell culture, where the growth inhibition is determined 1-10 days after exposure of the tumor cells to the Wnt antagonist. Growth inhibition of tumor cells *in vivo* can be determined in various ways such as is described in the Experimental Examples section below. The Wnt antagonist is growth inhibitory *in vivo* if administration of the Wnt antagonist at about 1 μg/kg to about 100 mg/kg body weight results in reduction in tumor size or cell proliferation within about 5 days to 3 months from the first administration of the antibody, preferably within about 5 to 30 days. In a specific aspect, the tumor size is reduced relative to its size at the start of therapy.

The terms "cell proliferative disorder" and "proliferative disorder" refer to disorders that are associated with some degree of abnormal cell proliferation. In one embodiment, the cell proliferative disorder is cancer.

"Tumor", as used herein, refers to all neoplastic cell growth and proliferation, whether malignant or benign, and all pre-cancerous and cancerous cells and tissues.

A Wnt antagonist molecule which "induces cell death" is one which causes a viable cell to become nonviable. The cell is one having aberrant Wnt signaling activity as compared to a normal cell of the same tissue type. Preferably, the cell is a cancer cell, as defined herein. Cell death *in vitro* may be determined in the absence of complement and immune effector cells to distinguish cell death induced by antibody-dependent cell-mediated

cytotoxicity (ADCC) or complement dependent cytotoxicity (CDC). Thus, the assay for cell death may be performed using heat inactivated serum (*i.e.*, in the absence of complement) and in the absence of immune effector cells. To determine whether the *Wnt* antagonist is able to induce cell death, loss of membrane integrity as evaluated by uptake of propidium iodide (PI), trypan blue (see Moore *et al.* Cytotechnology 17:1-11 (1995)) or 7AAD can be assessed relative to untreated cells. Preferred cell death-inducing antibodies, oligopeptides or other organic molecules are those which induce PI uptake in the PI uptake assay in BT474 cells.

The word "label" when used herein refers to a detectable compound or composition which is conjugated directly or indirectly to the antibody, oligopeptide or other organic molecule so as to generate a "labeled" antibody, oligopeptide or other organic molecule. The label may be detectable by itself (*e.g.* radioisotope labels or fluorescent labels) or, in the case of an enzymatic label, may catalyze chemical alteration of a substrate compound or composition which is detectable.

The term "cytotoxic agent" as used herein refers to a substance that inhibits or prevents the function of cells and/or causes destruction of cells. The term is intended to include radioactive isotopes (*e.g.*, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32} and radioactive isotopes of Lu), chemotherapeutic agents, enzymes and fragments thereof such as nucleolytic enzymes, antibiotics, and toxins such as small molecule toxins or enzymatically active toxins of bacterial, fungal, plant or animal origin, including fragments and/or variants thereof, and the various antitumor or anticancer agents disclosed below. Other cytotoxic agents are described below. A tumoricidal agent causes destruction of tumor cells.

A "chemotherapeutic agent" is a chemical compound useful in the treatment of cancer. Examples of chemotherapeutic agents include alkylating agents such as thiotepa and CYTOXAN® cyclosphosphamide; alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, trietylenephosphoramide, triethiylenethiophosphoramide and trimethylolomelamine; acetogenins (especially bullatacin and bullatacinone); delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachone; lapachol; colchicines; betulinic acid; a camptothecin (including the synthetic analogue topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetylcamptothecin, scopolectin, and 9-aminocamptothecin);

bryostatin; callystatin; CC-1065 (including its adozelesin, carzelesin and bizelesin synthetic analogues); podophyllotoxin; podophyllinic acid; teniposide; cryptophycins (particularly cryptophycin 1 and cryptophycin 8); dolastatin; duocarmycin (including the synthetic analogues, KW-2189 and CB1-TM1); eleutherobin; pancratistatin; a sarcodictyin; spongistatin; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, cholophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil mustard; nitrosureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, and ranimnustine; antibiotics such as the enediyne antibiotics (e. g., calicheamicin, especially calicheamicin gamma1I and calicheamicin omega1I (see, *e.g.*, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dynemicin, including dynemicin A; an esperamicin; as well as neocarzinostatin chromophore and related chromoprotein enediyne antiobiotic chromophores), aclacinomysins, actinomycin, authramycin, azaserine, bleomycins, cactinomycin, carabicin, carminomycin, carzinophilin, chromomycinis, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, ADRIAMYCIN® doxorubicin (including morpholino-doxorubicin, cyanomorpholino-doxorubicin, 2-pyrrolino-doxorubicin and deoxydoxorubicin), epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycins such as mitomycin C, mycophenolic acid, nogalamycin, olivomycins, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolites such as methotrexate and 5-fluorouracil (5-FU); folic acid analogues such as denopterin, methotrexate, pteropterin, trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine, thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitiostanol, mepitiostane, testolactone; anti- adrenals such as aminoglutethimide, mitotane, trilostane; folic acid replenisher such as frolinic acid; aceglatone; aldophosphamide glycoside; aminolevulinic acid; eniluracil; amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquone; elfornithine; elliptinium acetate; an epothilone; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidainine; maytansinoids such as maytansine and ansamitocins; mitoguazone; mitoxantrone; mopidanmol; nitraerine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; losoxantrone; 2-ethylhydrazide; procarbazine; PSK® polysaccharide complex (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxane; rhizoxin; sizofiran; spirogermanium; tenuazonic acid; triaziquone; 2,2',2"-trichlorotriethylamine; trichothecenes (especially T-2 toxin, verracurin A, roridin A and anguidine); urethan; vindesine

(ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazine; mannomustine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside ("Ara-C"); thiotepa; taxoids, *e.g.*, TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANETM Cremophor-free, albumin-engineered nanoparticle formulation of paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois), and TAXOTERE® doxetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); chloranbucil; gemcitabine (GEMZAR®); 6-thioguanine; mercaptopurine; methotrexate; platinum analogs such as cisplatin and carboplatin; vinblastine (VELBAN®); platinum; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitoxantrone; vincristine (ONCOVIN®); oxaliplatin; leucovovin; vinorelbine (NAVELBINE®); novantrone; edatrexate; daunomycin; aminopterin; ibandronate; topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluorometlhylornithine (DMFO); retinoids such as retinoic acid; capecitabine (XELODA®); pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above; as well as combinations of two or more of the above such as CHOP, an abbreviation for a combined therapy of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone, and FOLFOX, an abbreviation for a treatment regimen with oxaliplatin (ELOXATINTM) combined with 5-FU and leucovovin.

Also included in this definition are anti-hormonal agents that act to regulate, reduce, block, or inhibit the effects of hormones that can promote the growth of cancer, and are often in the form of systemic, or whole-body treatment. They may be hormones themselves. Examples include anti-estrogens and selective estrogen receptor modulators (SERMs), including, for example, tamoxifen (including NOLVADEX® tamoxifen), EVISTA® raloxifene, droloxifene, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone, and FARESTON® toremifene; anti-progesterones; estrogen receptor down-regulators (ERDs); agents that function to suppress or shut down the ovaries, for example, leutinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists such as LUPRON® and ELIGARD® leuprolide acetate, goserelin acetate, buserelin acetate and tripterelin; other anti-androgens such as flutamide, nilutamide and bicalutamide; and aromatase inhibitors that inhibit the enzyme aromatase, which regulates estrogen production in the adrenal glands, such as, for example, 4(5)-imidazoles, aminoglutethimide, MEGASE® megestrol acetate, AROMASIN® exemestane, formestanie, fadrozole, RIVISOR® vorozole, FEMARA® letrozole, and ARIMIDEX® anastrozole. In addition, such definition of chemotherapeutic agents includes bisphosphonates such as clodronate (for example, BONEFOS® or OSTAC®), DIDROCAL® etidronate, NE-58095, ZOMETA® zoledronic acid/zoledronate, FOSAMAX® alendronate, AREDIA® pamidronate, SKELID® tiludronate, or ACTONEL® risedronate; as well as

troxacitabine (a 1,3-dioxolane nucleoside cytosine analog); antisense oligonucleotides, particularly those that inhibit expression of genes in signaling pathways implicated in abherant cell proliferation, such as, for example, PKC-alpha, Raf, H-Ras, and epidermal growth factor receptor (EGF-R); vaccines such as THERATOPE® vaccine and gene therapy vaccines, for example, ALLOVECTIN® vaccine, LEUVECTIN® vaccine, and VAXID® vaccine; LURTOTECAN® topoisomerase 1 inhibitor; ABARELIX® rmRH; lapatinib ditosylate (an ErbB-2 and EGFR dual tyrosine kinase small-molecule inhibitor also known as GW572016); and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above.

A "growth inhibitory agent" when used herein refers to a compound or composition which inhibits growth of a cell, especially a cancer cell having *Wnt* signaling activity, either *in vitro* or *in vivo*. Thus, the growth inhibitory agent may be one which significantly reduces the percentage of such cells in S phase. Examples of growth inhibitory agents include agents that block cell cycle progression (at a place other than S phase), such as agents that induce G1 arrest and M-phase arrest. Classical M-phase blockers include the vincas (vincristine and vinblastine), taxanes, and topoisomerase II inhibitors such as doxorubicin, epirubicin, daunorubicin, etoposide, and bleomycin. Those agents that arrest G1 also spill over into S-phase arrest, for example, DNA alkylating agents such as tamoxifen, prednisone, dacarbazine, mechlorethamine, cisplatin, methotrexate, 5-fluorouracil, and ara-C. Further information can be found in The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especially p. 13. The taxanes (paclitaxel and docetaxel) are anticancer drugs both derived from the yew tree. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derived from the European yew, is a semisynthetic analogue of paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel and docetaxel promote the assembly of microtubules from tubulin dimers and stabilize microtubules by preventing depolymerization, which results in the inhibition of mitosis in cells.

"Doxorubicin" is an anthracycline antibiotic. The full chemical name of doxorubicin is (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy-α-L-lyxo-hexapyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8-(hydroxyacetyl)-1-methoxy-5,12-naphthacenedione.

The term "package insert" is used to refer to instructions customarily included in commercial packages of therapeutic products, that contain information about the indications,

usage, dosage, administration, contraindications and/or warnings concerning the use of such therapeutic products.

II. DESCRIPTION OF SPECIFIC EMBODIMENTS

The Wnt antagonists described herein are capable of binding to Wnt ligands *in vitro* and are capable of inhibiting or suppressing Wnt stimulated cell signaling. Additionally, the Wnt antagonists have a long *in vivo* half life and exhibit anti-tumor activity *in vivo*, inhibiting the growth of *Wnt*-1 driven tumors in a mouse MMTV breast tumor model. The Wnt antagonists are also capable of inhibiting the growth in mice of tumor xenografts derived from human teratoma cell lines. Regenerative tissues taken from mice that were treated with a Wnt antagonist appear to be within physiological norms. The Wnt antagonists are also capable of inhibiting autocrine Wnt signaling in human tumor cell lines *in vitro*.

The Frizzled receptor proteins can be grouped into families based on both full-length and extracellular domain sequence identities. This grouping is illustrated in the alignments shown in Figures 8 and 9. The underlined residues in this figure are conserved across all the Frz receptors and the shadowed residues are conserved across homologous groupings. The Frz proteins can be grouped into the following families 1) Frz1, Frz2, and Frz7 having a shared homology of 68-77% for the full length sequence and 90% for the ECD; 2) Frz5 and Frz8 having a shared homology of 57% for the full length sequence and 80% for the ECD; 3) Frz9 and Frz10 having a shared homology of 61% for the full length sequence and 74% for the ECD; 4) Frz3 and Frz6 having a shared homology of 49% for the full length sequence and 50% for the ECD; and 5) Frz4 (which exhibits a shared homology of 46% for the full length sequence and 48% for the ECD with Frz10). The family of Frz1, Frz2, and Frz7 also has significant homology to Drosophila Frz1 and the family of Frz5 and Frz8 has significant homology to Drosophila Frz2, shown to be responsible for planar cell polarity and Wnt signaling, respectively.

Wnt ligand-Frizzled binding behavior appears to cluster within Frizzled families. Both Wnt3a and Wnt5a bind Frz5, Frz8, and Frz4 fastest relative to the other Frz proteins while Wnt3a binds Frz1, Frz 2, and Frz7 at a slower rate. The amplitude and linear nature of Wnt5a binding behavior is indicative of lower binding affinity, relative to Wnt3a binding, as determined by the OCTET™ binding assay. The presence of both high affinity and low affinity receptors may confer ability for acute and long term signaling.

The ability of the Wnt antagonists to inhibit Wnt ligand induced signaling also appears to cluster within Frizzled families. Both Frz5 and Frz8 show complete inhibition of the Wnt3a signal and significant inhibition of the Wnt5a signal in a cell-based assay (Example 7). Frz4, Frz2, and Frz7 show significant inhibition of the Wnt3a signal. This finding mirrors the observation in Drosophila that dFrz2 (with homology to Frz 5 and Frz 8) strongly activates and dFrz1 (with homology to Frz 1, Frz2, and Frz7) can weakly activate the Wnt pathway.

While not being bound to a particular theory of action, the data presented herein indicate that cell-based Wnt signaling inhibition data generated using the Wnt antagonists correlates with data obtained by measuring the direct binding of Wnt ligands to the Wnt antagonists, indicating that the Wnt antagonists bind directly to Wnt ligands thus blocking them from binding the full-length Frizzled receptors on the cell. The data presented herein further provides validation that *in vitro* activity can be used to predict *in vivo* Wnt signaling blocking activity of the Wnt antagonists.

As indicated in the studies with Fz8-Fc set forth in the Examples, the Wnt antagonists comprising both a Frizzled domain and an immunoglobulin FC domain surprisingly exhibit increased binding affinity to Wnt ligand over the Frizzled domain alone. For example, Figure 14 shows that binding affinity increased over two orders of magnitude when the Fz ECD domain was converted to the Fz (156)-Fc construct. The finding of the Fz (156)-Fc construct as a stable and highly efficacious Wnt signaling inhibitor, in which conjugation to Fc resulted in a two order of magnitude increase in binding affinity, was greatly unexpected and non-obvious.

A. Compositions and methods of the invention

1. Polypeptides

The present invention is directed toward compositions and methods for the treatment of Wnt-mediated disorders, including cancer, and for inhibiting cellular Wnt signaling. One aspect of the invention provides Wnt antagonists that are chimeric molecules comprising a Frizzled (Frz) domain component and an immunoglobulin Fc domain. In particular embodiments of this aspect, the Frz domain component and Fc domain are fused through a linker. Another aspect provides for use of these *Wnt* antagonists for inhibiting cellular Wnt signaling and for treatment of Wnt-mediated disorders, such as cancer.

In one aspect, the invention provides for Wnt antagonists that are chimeric molecules with a Frz domain component comprising a minimal cysteine rich domain (CRD) of an extracellular domain "CRD (ECD)". The CRD (ECD) is a conserved structural motif of 100 to 250 amino acids and is defined by 10 highly conserved cysteines. This protein domain appears in two classes of the Wnt signaling family - the integral membrane Wnt receptor proteins known as Frizzled, and the secreted extracellular proteins known as the Frizzled related protein (sFrp).

In one aspect, the invention provides for Wnt antagonists that are chimeric molecules having a Frz domain component comprising a CRD (ECD) of a Frizzled protein such as Frz1, Frz2, Frz3, Frz4, Frz5, Frz6, Frz7, Frz8, Frz9, or Frz10. Examples of such CRD (ECD)s are provided in Figure 3B. In specific embodiments, the Frz domain component is selected from the group consisting of CRD (ECD)s of hFrz1 (SEQ ID NO: 18), hFrz2 (SEQ ID NO: 19), hFrz3 (SEQ ID NO: 20), hFrz4 (SEQ ID NO: 21), hFrz5 (SEQ ID NO: 22), hFrz6 (SEQ ID NO: 23), hFrz7 (SEQ ID NO: 24), hFrz8 (SEQ ID NO: 25), hFrz9 (SEQ ID NO: 26), and hFrz10 (SEQ ID NO: 27), and active variants thereof.

Alternatively, the Frz domain component comprises, for example, a CRD (ECD) from a secreted Frizzled related protein (sFRP) such as sFRP1, sFRP2, sFRP3, sFRP4, or sFRP5. Examples of such CRD (ECD)s are provided in Figure 3B. In specific embodiments, the Frz domain component is selected from the group consisting CRD (ECD)s of sFRP1 (SEQ ID NO: 28), sFRP2 (SEQ ID NO: 29), sFRP3 (SEQ ID NO: 30), sFRP4 (SEQ ID NO: 31), sFRP5 (SEQ ID NO: 32), and active variants thereof.

Alternatively, the Frz domain component comprises, for example, a CRD(ECD) of the receptor tyrosine kinases Ror1 and Ror2. Examples of such CRD (ECD)s are provided in Figure 3B. In specific embodiments, the Frz domain component is selected from the group consisting of CRD (ECD)s of hRor1 (SEQ ID NO: 33), and hRor2 (SEQ ID NO: 34), and active variants thereof.

In another aspect, the Frz domain component is a pro-Frz or pro-sFrp sequence, examples of which are shown in Figure 3A. In specific embodiments, the Frz domain component is selected from the group consisting of hFrz1 (SEQ ID NO: 35), hFrz2 (SEQ ID NO: 36), hFrz3 (SEQ ID NO: 37), hFrz4 (SEQ ID NO: 38), hFrz5 (SEQ ID NO: 39), hFrz6 (SEQ ID NO: 40), hFrz7 (SEQ ID NO: 41), hFrz8 (SEQ ID NO: 42), hFrz9 (SEQ ID NO: 43), hFrz10 (SEQ ID NO: 44), sFRP1 (SEQ ID NO: 45), sFRP2 (SEQ ID NO: 46), sFRP3

(SEQ ID NO: 47), sFRP4 (SEQ ID NO: 48), and sFRP5 (SEQ ID NO: 49), and active variants thereof.

In yet another aspect, the Frz domain component is derived from a mature Frz, sFRP or hRor sequence, examples of which are shown in Figure 3B. In specific embodiments, the Frz domain component is selected from the group consisting of hFrz1 (SEQ ID NO: 50), hFrz2 (SEQ ID NO: 51), hFrz3 (SEQ ID NO: 52), hFrz4 (SEQ ID NO: 53), hFrz5 (SEQ ID NO: 54), hFrz6 (SEQ ID NO: 55), hFrz7 (SEQ ID NO: 56), hFrz8 (SEQ ID NO: 57), hFrz9 (SEQ ID NO: 58), hFrz10 (SEQ ID NO: 59), sFRP1 (SEQ ID NO: 60), sFRP2 (SEQ ID NO: 61), sFRP3 (SEQ ID NO: 62), sFRP4 (SEQ ID NO: 63), sFRP5 (SEQ ID NO: 64), hRor1 (SEQ ID NO: 65), and hRor2 (SEQ ID NO: 66), and active variants thereof.

In particular embodiments, the Frz domain component and the immunoglobulin Fc domain of the chimeric Wnt antagonist molecules are fused through a linker. In one embodiment, the linker is a peptide linker. In another embodiment, the linker is selected from the group consisting of ESGGGGVT (SEQ ID NO: 69), LESGGGGVT (SEQ ID NO: 70), GRAQVT (SEQ ID NO: 71), WRAQVT (SEQ ID NO: 72), and ARGRAQVT (SEQ ID NO: 73). Optionally, the linkers may include additional amino acid residues from either the Frz domain component or the Fc domain outside the minimal residues needed for activity. These linkers may also comprise additional amino acid residues other than those from the Frz domain component or Fc domain component.

In one embodiment, the Wnt antagonist is Frz8-Fc chimera comprising a Frz8 CRD (ECD) and a Fc domain. In some embodiments, the Frz8-Fc chimera further comprises a linker, such as a peptide linker. In a further embodiment, the Frz8-Fc further comprises a leader sequence. In a particular embodiment, the Frz domain component comprises amino acids 1-156 of the Frz8 protein (SEQ ID NO: 8). In another embodiment, the Fc component is a human Fc. In a further embodiment, the Fc component is a human IgG Fc. In yet a further embodiment, the Frz8-Fc has a Frz domain component comprising amino acids 1-156 of the Frz8 protein fused with a linker to a human IgG Fc. In a further embodiment, the Frz8-Fc is a chimera with the amino acid sequence as shown in Figure 4B (SEQ ID NO: 74). As used in the Examples and accompanying Figures, unless otherwise noted, "Frz8-Fc" refers to the chimera shown in Figure 4B (SEQ ID NO: 74).

In a further embodiment, the Wnt antagonist is Frz5-Fc chimera comprising a Frz5 CRD (ECD) and a Fc domain. In some embodiments, the Frz5-Fc chimera further comprises a linker, such as a peptide linker. In a further embodiment, the Frz5-Fc further

comprises a leader sequence. In a particular embodiment, the Frz domain component comprises amino acids 27-155 of the Frz5 protein (SEQ ID NO: 5). In another embodiment, the Fc component is a human Fc. In a further embodiment, the Fc component is a human IgG Fc. In yet a further embodiment, the Frz5-Fc has a leader sequence and a Frz domain component comprising amino acids 27-155 of a mature Frz5 protein fused with a linker to a human IgG Fc. In a further embodiment, the Frz5-Fc is a chimera with the amino acid sequence as shown in Figure 7A (SEQ ID NO: 75). As used in the Examples and accompanying Figures, unless otherwise noted, "Frz5-Fc" refers to the chimera shown in Figure 7A (SEQ ID NO: 75).

Similarly, further embodiments include Frz1-Fc, Frz2-Fc, Frz3-Fc, Frz4-Fc, Frz6-Fc, Frz7-Fc, Frz9-Fc, Frz-10-Fc, sFRP1-Fc, sFRP2-Fc, sFRP3-Fc, sFRP4-Fc and sFRP5-Fc chimeras comprising a Frz domain component comprising a Frz CRD (ECD) from each respective Frz or sFRP protein and a Fc component. In some embodiments, the Frz-Fc chimera further comprises a linker, such as a peptide linker. In further embodiments, these chimeras comprise a leader sequence. In some embodiments, the Fc component is a human Fc. In further embodiments, the Fc component is a human IgG Fc. In yet further embodiments, these chimeras have a leader sequence and a Frz CRD (ECD) fused with a linker to a human IgG Fc. In further embodiment, these chimeras have the amino acid sequences as shown in Figures 7A, 7B and 7C (SEQ ID NOs: 76 - 88). As used in the Examples and accompanying Figures, unless otherwise noted, "Frz1-Fc, Frz2-Fc, Frz3-Fc, Frz4-Fc, Frz6-Fc, Frz7-Fc, Frz9-Fc, Frz-10-Fc, sFRP1-Fc, sFRP2-Fc, and sFRP4-Fc" refer to the respective chimeras shown in Figures 7A, 7B and 7C (SEQ ID NOs: 76 – 85, and 87).

The Wnt antagonists are stable *in vivo*. Prior constructs utilizing a Frizzled domain attached to a Fc component were rapidly degraded *in vivo* making them unsuitable for use as therapeutic compounds (Hsieh, J-C. et al., *PNAS*, 96: 3546-3551 (1999)). The Wnt antagonists described herein remain stable *in vivo* for substantially longer than the prior constructs. As shown in Example 4 (Figure 13), the Frz8-Fc Wnt antagonist displayed an *in vivo* half- life of about 4 days. Accordingly, the invention provides for Wnt antagonists that have an *in vivo* half-life of at least 1 day, 2 days, 3 days, or 4 days after being administered to a mammal.

Furthermore, as shown in Example 3 (Figure 11), the Wnt antagonists retain activity *in vivo* for substantially longer than the prior constructs. In one embodiment, the Wnt antagonist is active for at least 30 minutes, 1 hour, 2 hours, 3 hours, 4 hours, 5 hours, 6

hours, 8 hours, 10 hours, 12 hours, 14 hours, 16 hours, 18 hours, 20 hours, 22 hours, 24 hours, 30 hours, 36 hours, 40 hours, 44 hours, 48 hours, 52 hours, 56 hours, 60 hours, 64 hours, 68 hours, 72 hours, 80 hours, 90 hours, or 100 hours after being administered to a mammal. Activity is measured, for example, by testing the serum of the mammal administered the Wnt antagonist for the ability to inhibit Wnt signaling as set forth in Examples 3 and 11, or by using other methods known in the art.

2. Nucleic acids

One aspect of the invention provides for a nucleic acid encoding the Wnt antagonists described herein. In specific embodiments, the nucleic acid encodes a Wnt antagonist comprising a CRD (ECD)s of hFrz1 (SEQ ID NO: 18), hFrz2 (SEQ ID NO: 19), hFrz3 (SEQ ID NO: 20), hFrz4 (SEQ ID NO: 21), hFrz5 (SEQ ID NO: 22), hFrz6 (SEQ ID NO: 23), hFrz7 (SEQ ID NO: 24), hFrz8 (SEQ ID NO: 25), hFrz9 (SEQ ID NO: 26), hFrz10 (SEQ ID NO: 27), sFRP1 (SEQ ID NO: 28), sFRP2 (SEQ ID NO: 29), sFRP3 (SEQ ID NO: 30), sFRP4 (SEQ ID NO: 31), sFRP5 (SEQ ID NO: 32), hRor1 (SEQ ID NO: 33), or hRor2 (SEQ ID NO: 34).

In other embodiments, the nucleic acid encodes a Wnt antagonist comprising a pro-Frz or pro-sFrp proteins selected from among hFrz1 (SEQ ID NO: 35), hFrz2 (SEQ ID NO: 36), hFrz3 (SEQ ID NO: 37), hFrz4 (SEQ ID NO: 38), hFrz5 (SEQ ID NO: 39), hFrz6 (SEQ ID NO: 40), hFrz7 (SEQ ID NO: 41), hFrz8 (SEQ ID NO: 42), hFrz9 (SEQ ID NO: 43), hFrz10 (SEQ ID NO: 44), sFRP1 (SEQ ID NO: 45), sFRP2 (SEQ ID NO: 46), sFRP3 (SEQ ID NO: 47), sFRP4 (SEQ ID NO: 48), and sFRP5 (SEQ ID NO: 49).

In still other embodiments, the nucleic acid encodes a Wnt antagonist comprising a mature Frz, sFRP or hRor proteins selected from among hFrz1 (SEQ ID NO: 50), hFrz2 (SEQ ID NO: 51), hFrz3 (SEQ ID NO: 52), hFrz4 (SEQ ID NO: 53), hFrz5 (SEQ ID NO: 54), hFrz6 (SEQ ID NO: 55), hFrz7 (SEQ ID NO: 56), hFrz8 (SEQ ID NO: 57), hFrz9 (SEQ ID NO: 58), hFrz10 (SEQ ID NO: 59), sFRP1 (SEQ ID NO: 60), sFRP2 (SEQ ID NO: 61), sFRP3 (SEQ ID NO: 62), sFRP4 (SEQ ID NO: 63), sFRP5 (SEQ ID NO: 64), hRor1 (SEQ ID NO: 65), and hRor2 (SEQ ID NO: 66).

In still other embodiments, the nucleic acid encodes a Wnt antagonist comprising a Frz8-Fc (SEQ ID NO: 74), Frz5-Fc (SEQ ID NO: 75), Frz1-Fc (SEQ ID NO: 76), Frz2-Fc (SEQ ID NO: 77), Frz3-Fc (SEQ ID NO: 78), Frz4-Fc (SEQ ID NO: 79), Frz6-Fc (SEQ ID NO: 80), Frz7-Fc (SEQ ID NO: 81), Frz9-Fc (SEQ ID NO: 82), Frz10-Fc (SEQ ID NO: 83),

sFRP1-Fc (SEQ ID NO: 84), sFRP2 (SEQ ID NO: 85), sFRP3-Fc (SEQ ID NO: 86), sFRP4-Fc (SEQ ID NO: 87), or sFRP5-Fc (SEQ ID NO: 88).

In one particular embodiment, the nucleic acid encodes a Frz8-Fc and comprises the nucleic acid sequence shown in SEQ ID NO: 122 (Figure 5D). In another embodiment, the nucleic acid encodes a Frz5-Fc and comprises the nucleic acid sequence shown in SEQ ID NO: 119 (Figure 5C). In yet further embodiments, the nucleic acid encodes a Frz1-Fc, Frz2-Fc, Frz3-Fc, Frz4-Fc, Frz6-Fc, Frz7-Fc, Frz9-Fc, Frz10-Fc, sFRP1-Fc, sFRP2, sFRP3-Fc, sFRP4-Fc, or sFRP5-Fc and comprises a nucleic acid sequence shown in Figure5 (A-H). For example, the nucleic acid comprises a Frz1-Fc (SEQ ID NO: 115), Frz2-Fc (SEQ ID NO: 116), Frz3-Fc (SEQ ID NO: 117), Frz4-Fc (SEQ ID NO: 118), Frz5-Fc (SEQ ID NO: 119), Frz6-Fc (SEQ ID NO: 120), Frz7-Fc (SEQ ID NO: 121), Frz8-Fc (SEQ ID NO: 122), Frz9-Fc (SEQ ID NO: 123), Frz10-Fc (SEQ ID NO: 124), sFRP1-Fc (SEQ ID NO: 125), sFRP2-Fc (SEQ ID NO: 126), sFRP3-Fc (SEQ ID NO: 127), sFRP4-Fc (SEQ ID NO: 128), or sFRP5-Fc (SEQ ID NO:129).

Another aspect of the invention provides for nucleic acids that hybridize under high stringency conditions to the nucleic acids described above.

3. Wnt Antagonist Variants

In addition to the Wnt antagonist polypeptides described herein, it is contemplated that Wnt antagonist variants can be prepared. Such variants can be prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the encoding DNA, and/or by synthesis of the desired variant. Those skilled in the art will appreciate that amino acid changes may alter post-translational processes of the Wnt antagonist, such as changing the number or position of glycosylation sites or altering the membrane anchoring characteristics.

A Wnt antagonist variant includes, for example, a mutation or amino acid variant in an amino acid residue in one or more domains, while still retaining biological activity. A Wnt antagonist variant also includes Wnt antagonists having at least one amino acid deletion or addition, while still retaining biological activity. The addition or deletion of the amino acid residues can particularly occur in the region surrounding the amino acid sequence where the Frz domain component and Fc domain are connected, whether or not such region contains a linker. Wnt antagonist variants have at least 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% amino acid sequence identity with a reference Wnt antagonist polypeptide sequence. In general such variants exhibit substantially the same or greater binding affinity to a Wnt protein than the reference

sequence, *e.g.*, at least 0.75X, 0.8X, 0.9X, 1.0X, 1.25X or 1.5X, based on an art-accepted binding assay quantitation unit/metric.

In specific embodiments, the Wnt antagonist variant is a chimeric molecule comprising a Frz domain component having at least 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% amino acid sequence identity with the CRD (ECD)s of hFrz1 (SEQ ID NO: 18), hFrz2 (SEQ ID NO: 19), hFrz3 (SEQ ID NO: 20), hFrz4 (SEQ ID NO: 21), hFrz5 (SEQ ID NO: 22), hFrz6 (SEQ ID NO: 23), hFrz7 (SEQ ID NO: 24), hFrz8 (SEQ ID NO: 25), hFrz9 (SEQ ID NO: 26), hFrz10 (SEQ ID NO: 27), sFRP1 (SEQ ID NO: 28), sFRP2 (SEQ ID NO: 29), sFRP3 (SEQ ID NO: 30), sFRP4 (SEQ ID NO: 31), sFRP5 (SEQ ID NO: 32), hRor1 (SEQ ID NO: 33), or hRor2 (SEQ ID NO: 34).

In other embodiments, the Wnt antagonist variant is a chimeric molecule comprising a Frz domain component having at least 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% amino acid sequence identity with a pro-Frz or pro-sFrp proteins selected from among hFrz1 (SEQ ID NO: 35), hFrz2 (SEQ ID NO: 36), hFrz3 (SEQ ID NO: 37), hFrz4 (SEQ ID NO: 38), hFrz5 (SEQ ID NO: 39), hFrz6 (SEQ ID NO: 40), hFrz7 (SEQ ID NO: 41), hFrz8 (SEQ ID NO: 42), hFrz9 (SEQ ID NO: 43), hFrz10 (SEQ ID NO: 44), sFRP1 (SEQ ID NO: 45), sFRP2 (SEQ ID NO: 46), sFRP3 (SEQ ID NO: 47), sFRP4 (SEQ ID NO: 48), and sFRP5 (SEQ ID NO: 49).

In still other embodiments, the Wnt antagonist variant is a chimeric molecule comprising a Frz domain component having at least 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% amino acid sequence identity with mature Frz, sFRP or hRor proteins selected from among hFrz1 (SEQ ID NO: 50), hFrz2 (SEQ ID NO: 51), hFrz3 (SEQ ID NO: 52), hFrz4 (SEQ ID NO: 53), hFrz5 (SEQ ID NO: 54), hFrz6 (SEQ ID NO: 55), hFrz7 (SEQ ID NO: 56), hFrz8 (SEQ ID NO: 57), hFrz9 (SEQ ID NO: 58), hFrz10 (SEQ ID NO: 59), sFRP1 (SEQ ID NO: 60), sFRP2 (SEQ ID NO: 61), sFRP3 (SEQ ID NO: 62), sFRP4 (SEQ ID NO: 63), sFRP5 (SEQ ID NO: 64), hRor1 (SEQ ID NO: 65), and hRor2 (SEQ ID NO: 66).

In still other embodiments, the Wnt antagonist variant is a chimeric molecule comprising a Frz domain component having at least 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% amino acid sequence identity with Frz8-Fc (SEQ ID NO: 74), Frz5-Fc (SEQ ID NO: 75), Frz1-Fc (SEQ ID NO: 76), Frz2-Fc (SEQ ID NO: 77), Frz3-Fc (SEQ ID NO: 78), Frz4-Fc (SEQ ID NO: 79), Frz6-Fc (SEQ ID NO: 80), Frz7-Fc (SEQ ID NO: 81), Frz9-Fc (SEQ ID NO: 82), Frz10-Fc (SEQ

ID NO: 83), sFRP1-Fc (SEQ ID NO: 84), sFRP2 (SEQ ID NO: 85), sFRP3-Fc (SEQ ID NO: 86), sFRP4-Fc (SEQ ID NO: 87), and sFRP5-Fc (SEQ ID NO: 88).

"Percent (%) amino acid sequence identity" is defined as the percentage of amino acid residues that are identical with amino acid residues in a reference (parent) polypeptide sequence when the two sequences are aligned. To determine % amino acid identity, sequences are aligned and if necessary, gaps are introduced to achieve the maximum % sequence identity; conservative substitutions are not considered as part of the sequence identity. Amino acid sequence alignment procedures to determine percent identity are well known to those of skill in the art. Often publicly available computer software such as BLAST, BLAST2, ALIGN2 or Megalign (DNASTAR) software is used to align peptide sequences. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full length of the sequences being compared.

When amino acid sequences are aligned, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) can be calculated as:

% amino acid sequence identity = X/Y x 100

where

X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program's or algorithm's alignment of A and B

and

Y is the total number of amino acid residues in B.

If the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A.

An "isolated" or "purified" peptide, polypeptide, protein or biologically active fragment is separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components include materials that would typically interfere with diagnostic or therapeutic uses for the polypeptide, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or non-proteinaceous materials. Preparations having preferably less than 30%

by dry weight of non-desired contaminating material (contaminants), preferably less than 20%, 10%, and preferably less than 5% contaminants are considered to be substantially isolated. An isolated, recombinantly-produced peptide/polypeptide or biologically active portion thereof is preferably substantially free of culture medium, i.e., culture medium represents preferably less than 20%, preferably less than about 10%, and preferably less than about 5% of the volume of a peptide/polypeptide preparation. Examples of contaminants include cell debris, culture media, and substances used and produced during in vitro synthesis of the peptide/polypeptide.

Variations in the Wnt antagonist described herein, can be made, for example, using any of the techniques and guidelines for conservative and non-conservative mutations set forth, for instance, in U.S. Patent No. 5,364,934. Variations may be a substitution, deletion or insertion of one or more codons encoding the antibody or polypeptide that results in a change in the amino acid sequence as compared with the native sequence antibody or polypeptide. Optionally the variation is by substitution of at least one amino acid with any other amino acid in one or more of the domains *Wnt* antagonist. Guidance in determining which amino acid residue may be inserted, substituted or deleted without adversely affecting the desired activity may be found by comparing the sequence of the *Wnt* antagonist with that of homologous known protein molecules and minimizing the number of amino acid sequence changes made in regions of high homology. Amino acid substitutions can be the result of replacing one amino acid with another amino acid having similar structural and/or chemical properties, such as the replacement of a leucine with a serine, *i.e.*, conservative amino acid replacements. Insertions, deletions or substitutions may optionally be in the range of about 1 to 5 amino acids. The variation allowed may be determined by systematically making insertions, deletions or substitutions of amino acids in the sequence and testing the resulting variants for activity exhibited by the full-length or mature native sequence.

Wnt antagonists may be prepared by any of a number of conventional techniques. Desired peptide fragments may be chemically synthesized. An alternative approach involves generating antibody or polypeptide fragments by enzymatic digestion, *e.g.*, by treating the protein with an enzyme known to cleave proteins at sites defined by particular amino acid residues, or by digesting the DNA with suitable restriction enzymes and isolating the desired fragment. Yet another suitable technique involves isolating and amplifying a DNA fragment encoding a desired antibody or polypeptide fragment, by polymerase chain

reaction (PCR). Oligonucleotides that define the desired termini of the DNA fragment are employed at the 5' and 3' primers in the PCR.

In particular embodiments, conservative substitutions of interest are shown in Table A under the heading of preferred substitutions. If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated exemplary substitutions in Table A, or as further described below in reference to amino acid classes, are introduced and the products screened.

Table A

Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu
Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr; cys	cys
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	leu

Substantial modifications in function or immunological identity of the *Wnt* antagonist are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect

on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues are divided into groups based on common side-chain properties:

(1) hydrophobic: Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) neutral hydrophilic: Cys, Ser, Thr; Asn; Gln

(3) acidic: Asp, Glu;

(4) basic: His, Lys, Arg;

(5) residues that influence chain orientation: Gly, Pro; and

(6) aromatic: Trp, Tyr, Phe.

Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class. Such substituted residues also may be introduced into the conservative substitution sites or, more preferably, into the remaining (non-conserved) sites.

The variations can be made using methods known in the art such as oligonucleotide-mediated (site-directed) mutagenesis, alanine scanning, and PCR mutagenesis. Site-directed mutagenesis [Carter *et al.*, Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], cassette mutagenesis [Wells *et al.*, Gene, 34:315 (1985)], restriction selection mutagenesis [Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] or other known techniques can be performed on the cloned DNA to produce the *Wnt* antagonists of the invention.

Scanning amino acid analysis can also be employed to identify one or more amino acids along a contiguous sequence. Among the preferred scanning amino acids are relatively small, neutral amino acids. Such amino acids include alanine, glycine, serine, and cysteine. Alanine is typically a preferred scanning amino acid among this group because it eliminates the side-chain beyond the beta-carbon and is less likely to alter the main-chain conformation of the variant [Cunningham and Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)]. Alanine is also typically preferred because it is the most common amino acid. Further, it is frequently found in both buried and exposed positions [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]. If alanine substitution does not yield adequate amounts of variant, an isoteric amino acid can be used.

Any cysteine residue not involved in maintaining the proper conformation of the *Wnt* antagonist may also be substituted, generally with serine, to improve the oxidative stability of the molecule and prevent aberrant crosslinking. Conversely, cysteine bond(s) may be added to the *Wnt* antagonist to improve its stability (particularly where the antibody is an antibody fragment such as an Fv fragment).

A particularly preferred type of substitutional variant involves substituting one or more hypervariable region residues of a parent antibody (*e.g.*, a humanized or human antibody). Generally, the resulting variant(s) selected for further development will have improved biological properties relative to the parent antibody from which they are generated. A convenient way for generating such substitutional variants involves affinity maturation using phage display. Briefly, several hypervariable region sites (*e.g.*, 6-7 sites) are mutated to generate all possible amino substitutions at each site. The antibody variants thus generated are displayed in a monovalent fashion from filamentous phage particles as fusions to the gene III product of M13 packaged within each particle. The phage-displayed variants are then screened for their biological activity (*e.g.*, binding affinity) as herein disclosed. In order to identify candidate hypervariable region sites for modification, alanine scanning mutagenesis can be performed to identify hypervariable region residues contributing significantly to antigen binding. Alternatively, or additionally, it may be beneficial to analyze a crystal structure of the antigen-antibody complex to identify contact points between the Wnt antagonist and Wnt protein. Such contact residues and neighboring residues are candidates for substitution according to the techniques elaborated herein. Once such variants are generated, the panel of variants is subjected to screening as described herein and antibodies with superior properties in one or more relevant assays may be selected for further development.

Covalent modifications of Wnt antagonists are included within the scope of this invention. One type of covalent modification includes reacting targeted amino acid residues of a Wnt antagonist with an organic derivatizing agent that is capable of reacting with selected side chains or the N- or C- terminal residues of the Wnt antagonist. Derivatization with bifunctional agents is useful, for instance, for crosslinking the Wnt antagonist to a water-insoluble support matrix or surface for use in the method for purifying Wnt antagonists. Commonly used crosslinking agents include, *e.g.*, 1,1-bis(diazoacetyl)-2-phenylethane, glutaraldehyde, N-hydroxysuccinimide esters, for example, esters with 4-azidosalicylic acid, homobifunctional imidoesters, including disuccinimidyl esters such as

3,3'-dithiobis(succinimidylpropionate), bifunctional maleimides such as bis-N-maleimido-1,8-octane and agents such as methyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propioimidate.

Other modifications include deamidation of glutaminyl and asparaginyl residues to the corresponding glutamyl and aspartyl residues, respectively, hydroxylation of proline and lysine, phosphorylation of hydroxyl groups of seryl or threonyl residues, methylation of the α-amino groups of lysine, arginine, and histidine side chains [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], acetylation of the N-terminal amine, and amidation of any C-terminal carboxyl group.

Another type of covalent modification of the Wnt antagonist included within the scope of this invention comprises altering the native glycosylation pattern of the Frz, Wnt or sFRP polypeptide domains of the Wnt antagonist. "Altering the native glycosylation pattern" is defined as deleting one or more carbohydrate moieties found in native sequence of the component domains (either by removing the underlying glycosylation site or by deleting the glycosylation by chemical and/or enzymatic means), and/or adding one or more glycosylation sites that are not present in the native sequence component domain. In addition, the phrase includes qualitative changes in the glycosylation of the native proteins, involving a change in the nature and proportions of the various carbohydrate moieties present.

Glycosylation of antibodies and other polypeptides is typically either N-linked or O-linked. N-linked refers to the attachment of the carbohydrate moiety to the side chain of an asparagine residue. The tripeptide sequences asparagine-X-serine and asparagine-X-threonine, where X is any amino acid except proline, are the recognition sequences for enzymatic attachment of the carbohydrate moiety to the asparagine side chain. Thus, the presence of either of these tripeptide sequences in a polypeptide creates a potential glycosylation site. O-linked glycosylation refers to the attachment of one of the sugars N-aceylgalactosamine, galactose, or xylose to a hydroxyamino acid, most commonly serine or threonine, although 5-hydroxyproline or 5-hydroxylysine may also be used.

Addition of glycosylation sites to the *Wnt* antagonist is conveniently accomplished by altering the amino acid sequence such that it contains one or more of the above-described tripeptide sequences (for N-linked glycosylation sites). The alteration may also be made by the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine residues to the sequence of the sequence of the original (*i.e.*, pre-variant) Wnt antagonist. This sequence may optionally be altered through changes at the DNA level, particularly by mutating the DNA

encoding the sequence at preselected bases such that codons are generated that will translate into the desired amino acids.

Another means of increasing the number of carbohydrate moieties on the Wnt antagonist is by chemical or enzymatic coupling of glycosides to the polypeptide. Such methods are described in the art, *e.g.*, in WO 87/05330 published 11 September 1987, and in Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981).

Removal of carbohydrate moieties present on the Wnt antagonist may be accomplished chemically or enzymatically or by mutational substitution of codons encoding for amino acid residues that serve as targets for glycosylation. Chemical deglycosylation techniques are known in the art and described, for instance, by Hakimuddin, *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) and by Edge *et al.*, Anal. Biochem., 118:131 (1981). Enzymatic cleavage of carbohydrate moieties on polypeptides can be achieved by the use of a variety of endo- and exo-glycosidases as described by Thotakura *et al.*, Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

Another type of covalent modification of Wnt antagonist comprises linking the sequence to one of a variety of nonproteinaceous polymers, *e.g.*, polyethylene glycol (PEG), polypropylene glycol, or polyoxyalkylenes, in the manner set forth in U.S. Patent Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 or 4,179,337. The antibody or polypeptide also may be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization (for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacylate) microcapsules, respectively), in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules), or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, Gennaro, A., Ed., (2000).

The Wnt antagonists of the present invention may also be modified in a way to form molecules having additional chimeric nature, comprising a Wnt antagonist (i.e., Frz-, sFRP- or Ror-Fc chimera) fused to another, heterologous polypeptide or amino acid sequence.

In one embodiment, such a chimeric molecule comprises a fusion of the Wnt antagonist with a tag polypeptide which provides an epitope to which an anti-tag antibody can selectively bind. The epitope tag is generally placed at the amino- or carboxyl- terminus of the Wnt antagonist. The presence of such epitope-tagged forms of the Wnt antagonist can be detected using an antibody against the tag polypeptide. Also, provision of the epitope tag enables the Wnt antagonist to be readily purified by affinity purification using an anti-tag

antibody or another type of affinity matrix that binds to the epitope tag. Various tag polypeptides and their respective antibodies are well known in the art. Examples include poly-histidine (poly-his) or poly-histidine-glycine (poly-his-gly) tags; the flu HA tag polypeptide and its antibody 12CA5 [Field *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; the c-myc tag and the 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 and 9E10 antibodies thereto [Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; and the Herpes Simplex virus glycoprotein D (gD) tag and its antibody [Paborsky *et al.*, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]. Other tag polypeptides include the Flag-peptide [Hopp *et al.*, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; the KT3 epitope peptide [Martin *et al.*, Science, 255:192-194 (1992)]; an α-tubulin epitope peptide [Skinner *et al.*, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]; and the T7 gene 10 protein peptide tag [Lutz-Freyermuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)].

In alternative embodiments, the Wnt antagonists comprise a variant Fc component. For example, the Fc region may comprise a human Fc region sequence (e.g., a human IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4 Fc region) comprising an amino acid modification (e.g, a substitution) at one or more amino acid positions including that of a hinge cysteine. In one embodiment, such variants have at least 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% amino acid sequence identity with a reference Fc polypeptide sequence.

In one embodiment, the Fc region variant may display altered neonatal Fc receptor (FcRn) binding affinity. Such variant Fc regions may comprise an amino acid modification oat any one or more of amino acid positions 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439 or 447 of the Fc region, wherein the numbering of the residues in the Fc region is that of the EU index as in Kabat. Fc region variants with reduced binding to an FcRn may comprise an amino acid modification at any one or more of amino acid positions 252, 253, 254, 255, 288, 309, 386, 388, 400, 415, 433, 435, 436, 439 or 447 of Fc region (EU index/Kabat numbering). Alternatively, variants displaying increased binding to FcRn may comprise an amino acid modification at any one or more of amino acid positions 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 or 434 of the Fc region (EU index/Kabat numbering).

In another embodiment, the Fc region variant may display reduced binding to an FcγR, and comprises amino acid modifications at positions 238, 239, 248, 249, 252, 254,

265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 or 439 of the Fc region (EU index/Kabat numbering).

In yet another embodiment, the Fc region variant may display reduced binding to FcγRII and comprises amino acid modifications at any one or more of amino acid positions 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 or 439 of the Fc region (EU index/Kabat numbering).

In a further embodiment, the Fc region variant may display enhanced binding to FcγRII, and comprises an amino acid modification at any one or more of amino acid positions 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 or 439 of the Fc region (EU index/Kabat numbering).

In a still further embodiment, the Fc region variant of interest may display reduced binding to an FcgRIII, and comprises an amino acid modification at one or more amino acid positions 238, 239, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 or 437 of the Fc region (EU index/Kabat numbering).

In a still further embodiment, Fc region variants with altered (i.e, improved or diminished) C1q binding and/or complement dependent cytotoxicity (CDC) are described in WO99/51642. Such variants may comprise an amino acid substitution at one or more of amino acid positions 270, 322, 326, 327, 329, 331, 333 or 334 of the Fc region. See also, Duncan and Winter, Nature 322: 738-40 (1988); U.S.P. 5,648,260; U.S.P. 5,624,821 and WO94/29351 concerning Fc region variants.

B. Preparation of Wnt antagonists

The description below relates primarily to production of Wnt antagonist polypeptides by culturing cells transformed or transfected with a vector containing Wnt antagonist polypeptide-encoding nucleic acid. It is, of course, contemplated that alternative methods, which are well known in the art, may be employed to prepare such *Wnt* antagonists. For instance, the appropriate amino acid sequence, or portions thereof, may be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques [see, *e.g.*, Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)]. *In vitro* protein synthesis may be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis may be accomplished, for instance,

using an Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) using manufacturer's instructions. Various portions of the *Wnt* antagonist polypeptide may be chemically synthesized separately and combined using chemical or enzymatic methods to produce the desired sequence.

1. **Isolation of DNA Encoding Wnt Antagonist Polypeptide**

DNA encoding the sequence of the antagonists or any desired component domains of the Wnt antagonist, such as an Frz, or sFRP may be obtained from a cDNA library prepared from tissue believed to possess such sequence and to express it at a detectable level. Accordingly, a human Frz or sFRP sequence DNA can be conveniently obtained from a cDNA library prepared from human tissue. The desired DNA sequence gene may also be obtained from a genomic library or by known synthetic procedures (*e.g.*, automated nucleic acid synthesis).

Libraries can be screened with probes (such as oligonucleotides of at least about 20-80 bases) designed to identify the gene of interest or the protein encoded by it. Screening the cDNA or genomic library with the selected probe may be conducted using standard procedures, such as described in Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). An alternative means to isolate the gene encoding Wnt antagonist polypeptide and components thereof is to use PCR methodology [Sambrook *et al.*, supra; Dieffenbach *et al.*, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Techniques for screening a cDNA library are well known in the art. The oligonucleotide sequences selected as probes should be of sufficient length and sufficiently unambiguous that false positives are minimized. The oligonucleotide is preferably labeled such that it can be detected upon hybridization to DNA in the library being screened. Methods of labeling are well known in the art, and include the use of radiolabels like ^{32}P-labeled ATP, biotinylation or enzyme labeling. Hybridization conditions, including moderate stringency and high stringency, are provided in Sambrook *et al.*, supra.

Sequences identified in such library screening methods can be compared and aligned to other known sequences deposited and available in public databases such as GenBank or other private sequence databases. Sequence identity (at either the amino acid or nucleotide level) within defined regions of the molecule or across the full-length sequence can be determined using methods known in the art and as described herein.

DNA sequence encoding Fc immunoglobulin domains may be derived from hybridoma cells secreting mAbs of the desired Fc subtype.

Nucleic acid having protein coding sequence may be obtained by screening selected cDNA or genomic libraries using the deduced amino acid sequence disclosed herein for the first time, and, if necessary, using conventional primer extension procedures as described in Sambrook *et al.*, supra, to detect precursors and processing intermediates of mRNA that may not have been reverse-transcribed into cDNA.

2. Selection and Transformation of Host Cells

Host cells are transfected or transformed with expression or cloning vectors described herein for *Wnt* antagonist polypeptide production and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences. The culture conditions, such as media, temperature, pH and the like, can be selected by the skilled artisan without undue experimentation. In general, principles, protocols, and practical techniques for maximizing the productivity of cell cultures can be found in Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) and Sambrook *et al.*, supra.

Methods of eukaryotic cell transfection and prokaryotic cell transformation are known to the ordinarily skilled artisan, for example, $CaCl_2$, $CaPO_4$, liposome-mediated and electroporation. Depending on the host cell used, transformation is performed using standard techniques appropriate to such cells. The calcium treatment employing calcium chloride, as described in Sambrook *et al.*, supra, or electroporation is generally used for prokaryotes. Infection with *Agrobacterium tumefaciens* is used for transformation of certain plant cells, as described by Shaw *et al.*, Gene, 23:315 (1983) and WO 89/05859 published 29 June 1989. For mammalian cells without such cell walls, the calcium phosphate precipitation method of Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978) can be employed. General aspects of mammalian cell host system transfections have been described in U.S. Patent No. 4,399,216. Transformations into yeast are typically carried out according to the method of Van Solingen *et al.*, J. Bact., 130:946 (1977) and Hsiao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). However, other methods for introducing DNA into cells, such as by nuclear microinjection, electroporation, bacterial protoplast fusion with intact cells, or polycations, *e.g.*, polybrene, polyornithine, may also be used. For various techniques for transforming mammalian cells, see Keown *et al.*, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) and Mansour *et al.*, Nature, 336:348-352 (1988).

Suitable host cells for cloning or expressing the DNA in the vectors herein include prokaryote, yeast, or higher eukaryote cells. Suitable prokaryotes include but are not limited to eubacteria, such as Gram-negative or Gram-positive organisms, for example, Enterobacteriaceae such as *E. coli*. Various *E. coli* strains are publicly available, such as *E. coli* K12 strain MM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); *E. coli* strain W3110 (ATCC 27,325) and K5 772 (ATCC 53,635). Other suitable prokaryotic host cells include Enterobacteriaceae such as *Escherichia*, *e.g.*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *e.g.*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, *e.g.*, *Serratia marcescans*, and *Shigella*, as well as *Bacilli* such as *B. subtilis* and *B. licheniformis* (*e.g.*, *B. licheniformis* 41P disclosed in DD 266,710 published 12 April 1989), *Pseudomonas* such as *P. aeruginosa*, and *Streptomyces*. These examples are illustrative rather than limiting. Strain W3110 is one particularly preferred host or parent host because it is a common host strain for recombinant DNA product fermentations. Preferably, the host cell secretes minimal amounts of proteolytic enzymes. For example, strain W3110 may be modified to effect a genetic mutation in the genes encoding proteins endogenous to the host, with examples of such hosts including *E. coli* W3110 strain 1A2, which has the complete genotype *tonA* ; *E. coli* W3110 strain 9E4, which has the complete genotype *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 strain 27C7 (ATCC 55,244), which has the complete genotype *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan*^{r}; *E. coli* W3110 strain 37D6, which has the complete genotype *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan*^{r}; *E. coli* W3110 strain 40B4, which is strain 37D6 with a non-kanamycin resistant *degP* deletion mutation; and an *E. coli* strain having mutant periplasmic protease disclosed in U.S. Patent No. 4,946,783 issued 7 August 1990. Alternatively, *in vitro* methods of cloning, *e.g.*, PCR or other nucleic acid polymerase reactions, are suitable.

Full length antibody, antibody fragments, and antibody fusion proteins can be produced in bacteria, in particular when glycosylation and Fc effector function are not needed, such as when the therapeutic antibody is conjugated to a cytotoxic agent (*e.g.*, a toxin) and the immunoconjugate by itself shows effectiveness in tumor cell destruction. Full length antibodies have greater half life in circulation. Production in E. coli is faster and more cost efficient. For expression of antibody fragments and polypeptides in bacteria, see, *e.g.*, U.S. 5,648,237 (Carter et. al.), U.S. 5,789,199 (Joly *et al.*), and U.S. 5,840,523 (Simmons *et al.*) which describes translation initiation regio (TIR) and signal sequences for optimizing expression and secretion, these patents are incorporated herein by reference. After expression, the antibody is isolated from the E. coli cell paste in a soluble fraction and

can be purified through, *e.g.*, a protein A or G column depending on the isotype. Final purification can be carried out similar to the process for purifying antibody expressed e.g,, in CHO cells.

In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes such as filamentous fungi or yeast are suitable cloning or expression hosts for *Wnt* antagonist polypeptide-encoding vectors. *Saccharomyces cerevisiae* is a commonly used lower eukaryotic host microorganism. Others include *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139,383 published 2 May 1985); *Kluyveromyces* hosts (U.S. Patent No. 4,943,529; Fleer *et al.*, Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) such as, *e.g.*, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al.*, J. Bacteriol., 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickeramii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilarum* (ATCC 36,906; Van den Berg *et al.*, Bio/Technology, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans*, and *K. marxianus; yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070; Sreekrishna *et al.*, J. Basic Microbiol., 28:265-278 [1988]); *Candida; Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* such as *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394,538 published 31 October 1990); and filamentous fungi such as, *e.g.*, *Neurospora, Penicillium, Tolypocladium* (WO 91/00357 published 10 January 1991), and *Aspergillus* hosts such as *A. nidulans* (Ballance *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn *et al.*, Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) and *A. niger* (Kelly and Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Methylotropic yeasts are suitable herein and include, but are not limited to, yeast capable of growth on methanol selected from the genera consisting of *Hansenula, Candida, Kloeckera, Pichia, Saccharomyces, Torulopsis,* and *Rhodotorula*. A list of specific species that are exemplary of this class of yeasts may be found in C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982).

Suitable host cells for the expression of glycosylated *Wnt* antagonist polypeptide are derived from multicellular organisms. Examples of invertebrate cells include insect cells such as Drosophila S2 and Spodoptera Sf9, as well as plant cells, such as cell cultures of cotton, corn, potato, soybean, petunia, tomato, and tobacco. Numerous baculoviral strains and variants and corresponding permissive insect host cells from hosts such as *Spodoptera frugiperda* (caterpillar), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (fruitfly), and *Bombyx mori* have been identified. A variety of viral strains for transfection are publicly available, *e.g.*, the L-1 variant of *Autographa californica* NPV and

the Bm-5 strain of *Bombyx mori* NPV, and such viruses may be used as the virus herein according to the present invention, particularly for transfection of *Spodoptera frugiperda* cells.

However, interest has been greatest in vertebrate cells, and propagation of vertebrate cells in culture (tissue culture) has become a routine procedure. Examples of useful mammalian host cell lines are monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); human embryonic kidney line (293 or 293 cells subcloned for growth in suspension culture, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36:59 (1977)); baby hamster kidney cells (BHK, ATCC CCL 10); Chinese hamster ovary cells/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); mouse sertoli cells (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); monkey kidney cells (CV1 ATCC CCL 70); African green monkey kidney cells (VERO-76, ATCC CRL-1587); human cervical carcinoma cells (HELA, ATCC CCL 2); canine kidney cells (MDCK, ATCC CCL 34); buffalo rat liver cells (BRL 3A, ATCC CRL 1442); human lung cells (W138, ATCC CCL 75); human liver cells (Hep G2, HB 8065); mouse mammary tumor (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI cells (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); MRC 5 cells; FS4 cells; and a human hepatoma line (Hep G2).

Host cells are transformed with the above-described expression or cloning vectors for *Wnt* antagonist polypeptide production and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences.

3. Selection and Use of a Replicable Vector

One aspect of the invention provides for the nucleic acid (*e.g.*, cDNA or genomic DNA) encoding a Wnt antagonist polypeptide inserted into a replicable vector for cloning (amplification of the DNA) or for expression. Various vectors are publicly available. The vector may, for example, be in the form of a plasmid, cosmid, viral particle, or phage. The appropriate nucleic acid sequence may be inserted into the vector by a variety of procedures. In general, DNA is inserted into an appropriate restriction endonuclease site(s) using techniques known in the art. Vector components generally include, but are not limited to, one or more of a signal sequence, an origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter, and a transcription termination sequence. Construction of suitable vectors containing one or more of these components employs standard ligation techniques which are known to the skilled artisan.

The Wnt antagonist may be produced recombinantly not only directly, but also as a fusion polypeptide with a heterologous polypeptide, which may be a signal sequence or other polypeptide having a specific cleavage site at the N-terminus of the mature protein or polypeptide. In general, the signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of the Wnt antagonist polypeptide-encoding DNA that is inserted into the vector. The signal sequence may be a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, lpp, or heat-stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion the signal sequence may be, *e.g.*, the yeast invertase leader, alpha factor leader (including *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* α-factor leaders, the latter described in U.S. Patent No. 5,010,182), or acid phosphatase leader, the *C. albicans* glucoamylase leader (EP 362,179 published 4 April 1990), or the signal described in WO 90/13646 published 15 November 1990. In mammalian cell expression, mammalian signal sequences may be used to direct secretion of the protein, such as signal sequences from secreted polypeptides of the same or related species, as well as viral secretory leaders.

Both expression and cloning vectors contain a nucleic acid sequence that enables the vector to replicate in one or more selected host cells. Such sequences are well known for a variety of bacteria, yeast, and viruses. The origin of replication from the plasmid pBR322 is suitable for most Gram-negative bacteria, the 2μ plasmid origin is suitable for yeast, and various viral origins (SV40, polyoma, adenovirus, VSV or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells.

Expression and cloning vectors will typically contain a selection gene, also termed a selectable marker. Typical selection genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, *e.g.*, ampicillin, neomycin, methotrexate, or tetracycline, (b) complement auxotrophic deficiencies, or (c) supply critical nutrients not available from complex media, *e.g.*, the gene encoding D-alanine racemase for *Bacilli*.

An example of suitable selectable markers for mammalian cells are those that enable the identification of cells competent to take up the *Wnt* antagonist -encoding nucleic acid, such as DHFR or thymidine kinase. An appropriate host cell when wild-type DHFR is employed is the CHO cell line deficient in DHFR activity, prepared and propagated as described by Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). A suitable selection gene for use in yeast is the *trp*1 gene present in the yeast plasmid YRp7 [Stinchcomb *et al.*, Nature, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene, 10:157 (1980)]. The *trp*1 gene provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the

ability to grow in tryptophan, for example, ATCC No. 44076 or PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

Expression and cloning vectors usually contain a promoter operably linked to the *Wnt* antagonist -encoding nucleic acid sequence to direct mRNA synthesis. Promoters recognized by a variety of potential host cells are well known. Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the β-lactamase and lactose promoter systems [Chang *et al.*, Nature, 275:615 (1978); Goeddel *et al.*, Nature, 281:544 (1979)], alkaline phosphatase, a tryptophan (trp) promoter system [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776], and hybrid promoters such as the tac promoter [deBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]. Promoters for use in bacterial systems also will contain a Shine-Dalgarno (S.D.) sequence operably linked to the DNA encoding the *Wnt* antagonist polypeptide.

Examples of suitable promoting sequences for use with yeast hosts include the promoters for 3-phosphoglycerate kinase [Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] or other glycolytic enzymes [Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)], such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, and glucokinase.

Other yeast promoters, which are inducible promoters having the additional advantage of transcription controlled by growth conditions, are the promoter regions for alcohol dehydrogenase 2, isocytochrome C, acid phosphatase, degradative enzymes associated with nitrogen metabolism, metallothionein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and enzymes responsible for maltose and galactose utilization. Suitable vectors and promoters for use in yeast expression are further described in EP 73,657.

Wnt antagonist polypeptide transcription from vectors in mammalian host cells is controlled, for example, by promoters obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus (UK 2,211,504 published 5 July 1989), adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, a retrovirus, hepatitis-B virus and Simian Virus 40 (SV40), from heterologous mammalian promoters, *e.g.*, the actin promoter or an immunoglobulin promoter, and from heat-shock promoters, provided such promoters are compatible with the host cell systems.

Transcription of a DNA encoding the Wnt antagonist polypeptide by higher eukaryotes may be increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Enhancers

are cis-acting elements of DNA, usually about from 10 to 300 bp, that act on a promoter to increase its transcription. Many enhancer sequences are now known from mammalian genes (globin, elastase, albumin, α-fetoprotein, and insulin). Typically, however, one will use an enhancer from a eukaryotic cell virus. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the replication origin (bp 100-270), the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers. The enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to the *Wnt* antagonist polypeptide coding sequence, but is preferably located at a site 5' from the promoter.

Expression vectors used in eukaryotic host cells (yeast, fungi, insect, plant, animal, human, or nucleated cells from other multicellular organisms) will also contain sequences necessary for the termination of transcription and for stabilizing the mRNA. Such sequences are commonly available from the 5' and, occasionally 3', untranslated regions of eukaryotic or viral DNAs or cDNAs. These regions contain nucleotide segments transcribed as polyadenylated fragments in the untranslated portion of the mRNA encoding *Wnt* antagonist.

Still other methods, vectors, and host cells suitable for adaptation to the synthesis of *Wnt* antagonist polypeptide in recombinant vertebrate cell culture are described in Gething *et al.*, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, Nature, 281:40-46 (1979); EP 117,060; and EP 117,058.

4. Culturing the Host Cells

One aspect of the invention provides for a host cell comprising the nucleic acid encoding the *Wnt* antagonists. The host cells used to produce the *Wnt* antagonist polypeptide of this invention may be cultured in a variety of media. Commercially available media such as Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), and Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) are suitable for culturing the host cells. In addition, any of the media described in Ham *et al.*, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem.102:255 (1980), U.S. Pat. Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; or 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; or U.S. Patent Re. 30,985 may be used as culture media for the host cells. Any of these media may be supplemented as necessary with hormones and/or other growth factors (such as insulin, transferrin, or epidermal growth factor), salts (such as sodium chloride, calcium, magnesium, and phosphate), buffers (such as HEPES), nucleotides (such as adenosine and thymidine), antibiotics (such as GENTAMYCIN™ drug), trace elements (defined as inorganic compounds usually present at final concentrations in the micromolar range), and glucose or

an equivalent energy source. Any other necessary supplements may also be included at appropriate concentrations that would be known to those skilled in the art. The culture conditions, such as temperature, pH, and the like, are those previously used with the host cell selected for expression, and will be apparent to the ordinarily skilled artisan.

5. Detecting Gene Amplification/Expression

Gene amplification and/or expression may be measured in a sample directly, for example, by conventional Southern blotting, Northern blotting to quantitate the transcription of mRNA [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], dot blotting (DNA analysis), or *in situ* hybridization, using an appropriately labeled probe, based on the sequences provided herein. Alternatively, antibodies may be employed that can recognize specific duplexes, including DNA duplexes, RNA duplexes, and DNA-RNA hybrid duplexes or DNA-protein duplexes. The antibodies in turn may be labeled and the assay may be carried out where the duplex is bound to a surface, so that upon the formation of duplex on the surface, the presence of antibody bound to the duplex can be detected.

Gene expression, alternatively, may be measured by immunological methods, such as immunohistochemical staining of cells or tissue sections and assay of cell culture or body fluids, to quantitate directly the expression of gene product. Antibodies useful for immunohistochemical staining and/or assay of sample fluids may be either monoclonal or polyclonal, and may be prepared in any mammal. Conveniently, the antibodies may be prepared against a *Frz*, *sFRP* or *Ror* sequence identified herein or against a synthetic peptide based on the DNA sequences provided herein or against exogenous sequence fused to the *Wnt* antagonist and encoding a specific antibody epitope.

6. Purification of Wnt Antagonist

Forms of *Wnt* antagonist polypeptide may be recovered from culture medium or from host cell lysates. If membrane-bound, it can be released from the membrane using a suitable detergent solution (*e.g.* Triton-X 100) or by enzymatic cleavage. Cells employed in expression of Wnt antagonist polypeptide can be disrupted by various physical or chemical means, such as freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or cell lysing agents.

It may be desired to purify Wnt antagonist polypeptide from recombinant cell proteins or polypeptides. The following procedures are exemplary of suitable purification procedures: by fractionation on an ion-exchange column; ethanol precipitation; reverse phase HPLC; chromatography on silica or on a cation-exchange resin such as DEAE; chromatofocusing; SDS-PAGE; ammonium sulfate precipitation; gel filtration using, for

example, Sephadex G-75; protein A Sepharose columns to remove contaminants such as IgG; and metal chelating columns to bind epitope-tagged forms of the *Wnt* antagonist. Various methods of protein purification may be employed and such methods are known in the art and described for example in Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982). The purification step(s) selected will depend, for example, on the nature of the production process used and the particular *Wnt* antagonist polypeptide produced.

When using recombinant techniques, the Wnt antagonist polypeptide can be produced intracellularly, in the periplasmic space, or directly secreted into the medium. If the Wnt antagonist polypeptide is produced intracellularly, as a first step, the particulate debris, either host cells or lysed fragments, are removed, for example, by centrifugation or ultrafiltration. Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992) describe a procedure for isolating antibodies which are secreted to the periplasmic space of *E. coli*. Briefly, cell paste is thawed in the presence of sodium acetate (pH 3.5), EDTA, and phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) over about 30 min. Cell debris can be removed by centrifugation. Where the Wnt antagonist polypeptide is secreted into the medium, supernatants from such expression systems are generally first concentrated using a commercially available protein concentration filter, for example, an Amicon or Millipore Pellicon ultrafiltration unit. A protease inhibitor such as PMSF may be included in any of the foregoing steps to inhibit proteolysis and antibiotics may be included to prevent the growth of adventitious contaminants.

The Wnt antagonist polypeptide composition prepared from the cells can be purified using, for example, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, and affinity chromatography, with affinity chromatography being the preferred purification technique. The suitability of protein A as an affinity ligand depends on the species and isotype of any immunoglobulin Fc domain that is present in the antibody. Protein A can be used to purify antibodies that are based on human γ1, γ2 or γ4 heavy chains (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). Protein G is recommended for all mouse isotypes and for human γ3 (Guss *et al.*, EMBO J. 5:15671575 (1986)). The matrix to which the affinity ligand is attached is most often agarose, but other matrices are available. Mechanically stable matrices such as controlled pore glass or poly(styrenedivinyl)benzene allow for faster flow rates and shorter processing times than can be achieved with agarose. Where the Wnt antagonist polypeptide comprises a C_H3 domain, the Bakerbond ABX™resin (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) is useful for purification. Other techniques for protein

purification such as fractionation on an ion-exchange column, ethanol precipitation, Reverse Phase HPLC, chromatography on silica, chromatography on heparin SEPHAROSE™ chromatography on an anion or cation exchange resin (such as a polyaspartic acid column), chromatofocusing, SDS-PAGE, and ammonium sulfate precipitation are also available depending on the antibody to be recovered.

Following any preliminary purification step(s), the mixture comprising the antibody of interest and contaminants may be subjected to low pH hydrophobic interaction chromatography using an elution buffer at a pH between about 2.5-4.5, preferably performed at low salt concentrations (*e.g.*, from about 0-0.25M salt).

C. Pharmaceutical Formulations

One aspect of the invention provides for a composition comprising a Wnt antagonist and at least one pharmaceutically acceptable carrier or excipient. Therapeutic formulations of the Wnt antagonists used in accordance with the present invention are prepared for storage by mixing the Wnt antagonists having the desired degree of purity with optional pharmaceutically acceptable carriers, excipients or stabilizers (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, A. Gennaro, Ed. (2000)), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions. A "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with pharmaceutical administration. Additional examples of suitable carriers or diluents include, but are not limited to, water, saline, Finger's solutions, dextrose solution, and 5% human serum albumin. Liposomes and non-aqueous vehicles such as fixed oils may also be used. Except when a conventional media or agent is incompatible with an active compound, use of these compositions is contemplated. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as acetate, Tris, phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as

polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrins; chelating agents such as EDTA; tonicifiers such as trehalose and sodium chloride; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; surfactant such as polysorbate; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (*e.g.*, Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as TWEEN®, PLURONICS® or polyethylene glycol (PEG). The antibody preferably comprises the antibody at a concentration of between 5-200 mg/ml, preferably between 10-100 mg/ml.

The formulations herein may also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. For example, in addition to a particular *Wnt* antagonist, it may be desirable to include in the one formulation, an additional antibody, *e.g.*, which binds a different epitope on the *Wnt* protein, to a different *Wnt* protein entirely, or an antibody to some other target such as a growth factor that affects the growth of the *Wnt* mediated disorder. Alternatively, or additionally, the composition may further comprise a chemotherapeutic agent, cytotoxic agent, cytokine, growth inhibitory agent, anti-hormonal agent, and/or cardioprotectant. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

The active ingredients may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, A. Gennaro, Ed. (2000).

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

Therapeutic compositions herein generally are placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

The route of administration is in accord with known methods, e.g. injection or infusion by intravenous, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial or intralesional routes, topical administration, or by sustained release systems.

Dosages and desired drug concentrations of pharmaceutical compositions of the present invention may vary depending on the particular use envisioned. The determination of the appropriate dosage or route of administration is well within the skill of an ordinary physician. Animal experiments provide reliable guidance for the determination of effective doses for human therapy. Interspecies scaling of effective doses can be performed following the principles laid down by Mordenti, J. and Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics", In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi et al., Eds., Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-96.

When *in vivo* administration of a substance or molecule of the invention is employed, normal dosage amounts may vary from about 10 ng/kg to up to 100 mg/kg of mammal body weight or more per day, preferably about 1 μg/kg/day to 10 mg/kg/day, depending upon the route of administration. Guidance as to particular dosages and methods of delivery is provided in the literature; see, for example, U.S. Pat. Nos. 4,657,760; 5,206,344; or 5,225,212. It is anticipated that different formulations will be effective for different treatment compounds and different disorders, that administration targeting one organ or tissue, for example, may necessitate delivery in a manner different from that to another organ or tissue.

Where sustained-release administration of a substance or molecule is desired in a formulation with release characteristics suitable for the treatment of any disease or disorder requiring administration of the substance or molecule, microencapsulation of the substance or molecule is contemplated. Suitable examples of sustained-release preparations include semi-permeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, *e.g.*, films, or microcapsules. Microencapsulation of recombinant proteins for sustained release has been successfully performed with human growth hormone (rhGH), interferon-α,γ (rhIFN-α,–γ), interleukin-2, and MN rgp120. Johnson et al., Nat. Med., 2:795-799 (1996); Yasuda, *Biomed. Ther.*, 27:1221-1223 (1993); Hora et al., *Bio/Technology*, 8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems," in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds, (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; and U.S. Pat. No. 5,654,010.

The sustained-release formulations of these proteins may be developed using poly-lactic-coglycolic acid (PLGA) polymer due to its biocompatibility and wide range of

biodegradable properties. The degradation products of PLGA, lactic and glycolic acids, can be cleared quickly within the human body. Moreover, the degradability of this polymer can be adjusted from months to years depending on its molecular weight and composition. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer," in: M. Chasin and R. Langer (Eds.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1-41.

Additional examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and γ ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOT® (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid.

D. Methods of treating Wnt mediated disorder

The invention provides for methods of treating a Wnt-mediated disorder in a mammal suffering therefrom, comprising administering to the mammal a therapeutically effective amount of a Wnt antagonist. In one embodiment, the disorder is a cell proliferative disorder associated with aberrant, e.g., increased, expression of activity of Wnt signaling. In another embodiment, the disorder results from increased expression of a Wnt protein. In yet another embodiment, the cell proliferative disorder is cancer, such as for example, colon cancer, colorectal cancer, breast cancer, cancer associated with various disorders relating to HSC's, such as leukemias and various other blood related cancers, and cancer related to neuronal proliferative disorders, including brain tumors, such as gliomas, astrocytomas, meningiomas, Schwannomas, pituitary tumors, primitive neuroectodermal tumors (PNET), medulloblastomas, craniopharyngioma, and pineal region tumors.

Treatment of the cell proliferative disorder by administration of a Wnt antagonist results in an observable and/or measurable reduction in or absence of one or more of the following: reduction in the number of cancer cells or absence of the cancer cells; reduction in the tumor size; inhibition (i.e., slow to some extent and preferably stop) of cancer cell infiltration into peripheral organs including the spread of cancer into soft tissue and bone; inhibition (i.e., slow to some extent and preferably stop) of tumor metastasis; inhibition, to some extent, of tumor growth; and/or relief to some extent, one or more of the symptoms associated with the specific cancer; reduced morbidity and mortality, and improvement in quality of life issues. To the extent the Wnt antagonist may prevent growth and/or kill

existing cancer cells, it may be cytostatic and/or cytotoxic. Reduction of these signs or symptoms may also be felt by the patient.

The above parameters for assessing successful treatment and improvement in the disease are readily measurable by routine procedures familiar to a physician. For cancer therapy, efficacy can be measured, for example, by assessing the time to disease progression (TDP) and/or determining the response rate (RR). Metastasis can be determined by staging tests and by bone scan and tests for calcium level and other enzymes to determine spread to the bone. CT scans can also be done to look for spread to the pelvis and lymph nodes in the area. Chest X-rays and measurement of liver enzyme levels by known methods are used to look for metastasis to the lungs and liver, respectively. Other routine methods for monitoring the disease include transrectal ultrasonography (TRUS) and transrectal needle biopsy (TRNB).

In a specific embodiment, the administration of Wnt antagonist decreases tumor burden (e.g., reduces size or severity of the cancer). In yet another specific embodiment, the administration of Wnt antagonist kills the cancer.

E. Methods of inhibiting Wnt-signaling in a cell

The invention provides for a method of inhibiting Wnt-signaling in a cell comprising contacting the cell with an effective amount of a Wnt antagonist. In one embodiment, the cell is contained within a mammal, preferably a human, and the administered amount is a therapeutically effective amount. In yet another embodiment, the inhibition of Wnt signaling further results in the inhibition of the growth of the cell. In a further embodiment, the cell is a cancer cell.

Inhibition of cell proliferation is measured using methods known to those skilled in the art. For example, a convenient assay for measuring cell proliferation is the CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, which is commercially available from Promega (Madison, WI). That assay determines the number of viable cells in culture based on quantitation of ATP present, which is an indication of metabolically active cells. *See* Crouch et al (1993) *J. Immunol. Meth.* 160:81-88, US Pat. No. 6602677. The assay may be conducted in 96- or 384-well format, making it amenable to automated high-throughput screening (HTS). *See* Cree et al (1995) *AntiCancer Drugs* 6:398-404. The assay procedure involves adding a single reagent (CellTiter-Glo® Reagent) directly to cultured cells. This results in cell lysis and generation of a luminescent signal produced by a luciferase reaction. The luminescent signal is proportional to the amount of ATP present, which is directly

proportional to the number of viable cells present in culture. Data can be recorded by luminometer or CCD camera imaging device. The luminescence output is expressed as relative light units (RLU).

F. Methods of modulating the expression of a Wnt target gene

The invention provides for a method of modulating the expression of a Wnt target gene in a cell characterized by activated or excessive Wnt signaling, comprising contacting the cell with an effective amount of a Wnt antagonist. In one embodiment, the Wnt target gene is overexpressed as a result of the Wnt signaling, and the result of the contact with the Wnt antagonist reduces expression of the Wnt target gene. In another embodiment, the Wnt target gene is selected from the group consisting of: Axin2, APCDD1, Gad1, Sax1, c-myc, cyclin D1, PPARdelta, gastrin, clusterin, survivin, cyclooxygenase, fra-1, osteopontin, uPAR, claudin-1, CD44, MMP-7/9/11/14/26, IGFBP-4, Met, BMP4, sox-9, histone deacetylase 2, VEGF. In yet another embodiment, the Wnt target gene is underexpressed as a result of the Wnt signaling, and the result of contact with the Wnt antagonist restores expression of the Wnt target gene. In a further embodiment, the Wnt target gene is selected from the group consisting of: Lefty1, Lefty2, sFRP1, Fzd5, fas antigen, caspase 3, integrin β7, alpha e integrin, hath 1, fatty acid binding protein 2, muc-2, kruppel like factor-4, carbonic anhydrase-11, EphrinB1, EphB2R, EphB3R, muc-3, histocompatibility 2, Q region locus 1, β2-microglobulin.

Expression of the target genes is determined using methods known to those of skill in the art, including those described herein and set forth in the Examples below.

G. Methods of detecting the presence of a Wnt protein

The invention provides for a method of detecting the presence of a Wnt protein in a sample, comprising contacting the sample with a Wnt antagonist, wherein the presence of a complex or the level of binding between the Wnt antagonist and the Wnt protein is indicative of the presence of Wnt protein and/or Wnt signaling. In one embodiment, the method further comprises determining if the level of Wnt signaling is aberrant. In this embodiment, the level of Wnt protein binding in the sample is compared with the level in a second sample in which Wnt protein expression and/or Wnt signaling is known to be physiologically normal. The level of binding in the suspect sample compared to the second sample that is higher or lower than the physiologically normal sample is indicative of aberrant Wnt signaling. In another embodiment, the presence of Wnt signaling or aberrant Wnt signaling is indicative of the presence of a Wnt-mediated disorder, such as cancer.

H. The Wnt pathway and disorders associated therewith

1. The Wnt signaling pathway:

The Wnt signaling pathway is an unusually complex signaling process involving multiple proteins which exert varying levels of control in the pathway. This multi-level, tight regulation of the pathway is indicative of its importance in cellular biology. Despite the complicated regulatory mechanisms, the initial signal of the pathway is generated by the binding of a Wnt to the Frizzled (Frz) receptors. Effective signal further requires the presence of an additional single pass transmembrane molecule of the LRP (LDL receptor related protein) class, specifically LRP 5 and LRP 6. Wnt may further bind with LRP to form a trimeric complex with Frizzled. The cytoplasmic tail of LRP in turn interacts with Axin, another downstream component. Dishevelled, a cytoplasmic component that interacts directly with Frizzled, may also directly interact with Axin, thus forming a tetra-plex complex of Frizzled, LRP, Dsh and Axin. This interaction with Axin releases β-catenin from the "degradation complex" (discussed infra) for subsequent downstream activity in the Wnt signaling pathway.

Outside the cell, *Wnt* signaling is inhibited by various proteins that can bind to *Wnt* thereby sequestering it from its receptor. Included in this group are the secreted *Frizzled* related proteins (*sFRPs*, Jones *et al.*, *Bioessays* 2002; **24**: 811-820) and *Wnt inhibitory factor-1* (*WIF-1*, Hsieh, J.C. *et al.*, *Nature* 1999; **398**: 431-436). In humans, the *sFRP* family consists of five members (*e.g.*, *sFRP-1*, *sFRP-2* . . . *sFRP-5*), each containing a cysteine-rich domain (CRD) which shares 30-50% sequence homology with the CRD of *Frz* receptors. (Melkonyan, H.S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; **94**: 13636-13641). sFRPs are believed to form function-inhibiting complexes with *Frz* receptors, and therefore are natural antagonists, but the biology is complex, and in some cases, may even act to agonize *Wnt* activity. (Uren, A. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2000; **275**: 4374-4382).

Another class of extracellular Wnt inhibitor is Dickkopf (Dkk). [Brott, B.K. *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 2002; **22**: 6100-6110; Fedi, P. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1999; **274**: 19465-19472] The three members of the Dkk family (e.g., Dkk-1, Dkk-2 and Dkk-4) can antagonize Wnt signaling through inactivation of the cell surface receptor LRP-5 and LRP-6, essential components of the canonical pathway. [Mao, J.H. *et al.*, *Mol. Cell* 2001; 7: 801-809; Pinson, K.I. *et al.*, *Nature* 2000; **407**: 535-538]. Dkk forms a ternary complex with LRP5/6 and the single pass transmembrane receptors Kremen 1 (Krm-1) or Kremen 2 (Krm-2) [Mao *et al.*, *Gene* 2003; **302**: 179-183; Mao *et al.*, *Nature* 2002; **417**: 664-667; Mao *et al.*, *Nature* 2001;

411: 321-325]. This complex in turn undergoes endocytosis, thereby removing LRP5/6 receptors from the cell surface. As a result, Dkks can selectively antagonize canonical Wnt signaling, while not affecting non-canonical signaling.

The hallmark of canonical Wnt signaling activation is elevated levels of the protein β-catenin. β-catenin is constitutively produced and is present in the cytoplasm as pools of monomeric protein. [Papkoff, J. *et al., Mol. Cell Biol.* 1996; **16**: 2128-2134]. The primary mechanism for controlling cytoplasmic levels of β–*catenin* is through direct physical degradation upon recruitment into a large multi-protein complex ("degradation complex"). The central scaffolding of this complex is provided by Axin, as well as binding sites for β-catenin, adenomatous polyposis coli (APC), glycogen synthase kinase 3β (GSK3β), casein kinase Iα (CKIα) and protein phophatase 2A (PP2A) [Hinoi, T. et al., J. *Biol. Chem.* 2000; **275**: 34399-34406; Ikeda *et al., Oncogene* 2000; **19**: 537-545; Yamamoto *et al., J. Biol. Chem.* 1999; **274**: 10681-10684; Kishida *et al., J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 10823-10826; Ikeda *et al., EMBO J.* 1998; **17**: 1371-1384. After formation, the complex is stabilized by the *GSK3β*-mediated phosphorylation of Axin and APC, as well as PP2A. GSK3β- then phosphorylates β-catenin thereby allowing it be recognized by β-transducin repeat containing protein (β-TrCP), thereby targeting it for ubiquitination and proteosomic degradation. [Aberle *et al., EMBO J.* 1997; **16**: 3797-804; Latres *et al., Oncogene* 1999; **18**: 849-54; Liu *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; **96**: 6273-8].

Although complexation with Axin/APC/GSK3β is the primary mechanism for degradation of β–catenin, an alternative degradation pathway has been shown involving ubiquitination induced by complexation with Siah-1 and the C-terminus of APC. [Matsuzawa *et al., Mol. Cell* 2001; **7**: 915-926; Liu *et al., Mol. Cell* 2001; **7**: 927-936]. In addition to its role as a transcription factor, β-*catenin* further is involved in cellular adhesion. [Nelson *et al., Science* 2004; **303**: 1483-1487; Ilyas *et al., J. Pathol.* 1997; **182**: 128-137. β-catenin can be found at the cell surface sites of intercellular contact known as adherens junctions, where it is complexed with E-cadherin and α-catenin. Thus, any increase in E-cadherin expression will direct β-catenin to the cell membrane, thereby depleting cytoplasmic levels, and in turn inhibit Wnt signaling. Moreover, the breakdown of the E-cadherin-catenin complex can increase cytoplasmic levels of free β-catenin, thereby stimulating transcriptional activity. [Nelson *et al., supra.*]. Thus, activation of the cell surface receptors cRON, epidermal growth factor receptor (EGFR) and c-ErbB2, by liberating β-catenin, can also stimulate canonical Wnt signaling. Other signaling pathways

that can either activate or facilitate the effects of Wnt signaling. For example, integrin signaling can result in nuclear transportation of β-catenin [Eger *et al., Oncogene* 2004; **23**: 2672-2680], while signaling through insulin-like growth factor (IGF) can activate Wnt signaling by "soaking up" available GSK3β - thereby preventing formation of the "degradation complex."

In canonical signaling, an initial step involves the binding of Wnt to Frz in the presence of LRP5/6. [Mao *et al., Mol. Cell* 2001; **7**: 801-809; Pinson *et al., Nature* 2000; **407**: 535-538]. The formation of this trimeric complex has two downstream consequences. First is the recruitment of Dishevelled (Dsh) to the cell surface and its phosphorylation by casein kinase Iε (CIε) [Kishida *et al., J. Biol. Chem.* 2001; **276**: 33147-33155]. The phosphorylated Dsh can form a complex with Frat 1 and GSK3β, which in turn can inhibit the activity of GSK3β. Second, the Wnt/Frz/LRP5/6 tri-plex facilitates the LRP5/6 mediated degradation of Axin. The net effect of this is the destabilization of the degradation complex responsible for phosphorylating β-catenin. In the absence of phosphorylation, β-catenin is not ubiquinated, thereby escaping degradation, thus increasing intracellular levels and availability for translocation to the nucleus.

The manner in which β-catenin is transported to the nucleus is not entirely clear, but interaction with the nuclear transport proteins APC [Rosin-Arbesfeld *et al., Nature* 2000; **406**: 1009-1012; Neufeld *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; **97**: 12085-12090], as well as *pygopus* and *Bcl9/legless* have been implicated. [Townsley *et al., Nature Cell Biol.* 2004; **6**: 626-633].

Once in the nucleus, β-catenin displaces the transcriptional repressor Groucho for binding with T-cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor-1 (TCF/LEF) DNA binding proteins. In the absence of displacement by β-catenin, TCF/LEF complexes with Groucho to repress expression of the Wnt "target genes". The inhibitory effect of *Groucho* is further mediated by interactions with various histone deacetylases (HDAC), which are believed to make DNA refractive to transcriptional activation. [Cavallo *et al., Nature* 1998; **395**: 604-8; Chen *et al., Genes Dev.* 1999; **13**: 2218-30]. The conversion of the *TCF* transcriptional repressor complex into a transcriptional activation complex further involves recruitment of histone acetylases such as Creb binding protein (CBP)/p300 as well as other activating factors such as Brg-1. [Takemaru *et al., J. Cell Biol.* 2000; **149**: 249-54; Barker *et al., Cell* 2002; **109**: 47-60; Brantjes *et al., Biol. Chem.* 2002; **383**: 255-261; Roose *et al., Biochim. Biophys Acta - Rev. Cancer* 1999; **1424**: M23-M37].

The interactions between the β-*catenin-TCF* complex and chromatin also may be mediated by *Legless (Bcl9)* and *Pygopus*. Kramps *et al., Cell* 2002; **109**: 47-60; Thompson *et al., Nat. Cell Biol.* 2002; **4:** 367-73; Parker *et al., Development* 2002; **129**: 2565-76.

An abbreviated summary of the canonical *Wnt* signaling pathway both in the "off" or inactive state as well as the "on" or active state is depicted in Figure 1.

2. Disorders associated with *Wnt* signaling activity:

Deregulation of the Wnt signaling pathway may be caused by somatic mutations in genes encoding various Wnt signaling pathway components. For example, aberrant Wnt signaling activity has been associated with Wnt ligand overexpression in non small cell lung cancer (NSCLC) [You *et al., Oncogene* 2004; **23**: 6170-6174], chronic lymphocytic leukemia (CLL)[Lu *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; **101**: 3118-3123], gastric cancer [Kim *et al., Exp. Oncol.* 2003; **25**: 211-215; Saitoh *et al., Int. J. Mol. Med.* 2002; **9:** 515-519], head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) [Rhee *et al., Oncogene* 2002; **21**: 6598-6605], colorectal cancer [Holcombe *et al., J. Clin. Pathol - Mol. Pathol.* 2002; **55**: 220-226], ovarian cancer [Ricken et al., Endocrinology 2002; 143: 2741-2749], basal cell carcinoma (BCC) [Lo Muzio *et al., Anticancer Res.* 2002; **22**: 565-576] and breast cancer. Moreover, the reduction of various *Wnt* ligand regulatory molecules such as *sFRP* and *WIF-1* have been associated with breast cancer [Klopocki *et al., Int. J. Oncol.* 2004; **25**: 641-649; Ugolini *et al., Oncogene* 2001; **20**: 5810-5817; Wissmann *et al., J. Pathol.* 2003; **201**: 204-212], bladder cancer [Stoehr *et al., Lab Invest.* 2004; **84**: 465-478; Wissmann *et al., supra*], mesothelioma [Lee *et al., Oncogene* 2004; **23**: 6672-6676], colorectal cancer [Suzuki *et al., Nature Genet* 2004; **36**: 417-422; Kim *et al., Mol. Cancer Ther.* 2002; **1:** 1355-1359; Caldwell *et al., Cancer Res.* 2004; **64**: 883-888], prostate cancer [Wissman *et al., supra*], NSCLC [Mazieres *et al., Cancer Res.* 2004; **64**: 4717-4720], and lung cancer [Wissman *et al., supra*]. Antagonizing *Wnt* signaling with the *Wnt* antagonist molecules of the invention is expected to therapeutically treat these cancers.

Continuing, aberrant *Wnt* signaling resulting from overexpression of various components of the Frz-LRP receptor complex have also been associated with certain cancers. For example, LRP5 overexpression has been associated with osteosarcoma [Hoang *et al., Int. J. Cancer* 2004; **109**: 106-111], while *Frz* overexpression has been associated with cancers such as prostate [Wissmann *et al., supra*], HNSCC [Rhee *et al., Oncogene* 2002; **21**: 6598-6605], colorectal [Holcombe *et al., supra*], ovarian cancer [Wissman *et al, supra*], esophageal [Tanaka *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; **95**: 10164-10169] and gastric

[Kirikoshi *et al., Int. J. Oncol.* 2001; **19**: 111-115]. Additionally, overexpression of Wnt signaling pathway components such as *Dishevelled* have been associated with cancers such as prostate [Wissman *et al., supra*], breast [Nagahata *et al., Cancer Sci.* 2003; **94**: 515-518], mesothelioma [Uematsu *et al., Cancer Res.* 2003; **63**: 4547-4551] and cervical [Okino *et al., Oncol. Rep.* 2003; **10**: 1219-1223]. Frat-1 overexpression has been associated with cancers such as pancreatic, esophageal, cervical, breast and gastric. [Saitoh *et al., Int. J. Oncol.* 2002; **20**: 785-789; Saitoh *et al., Int.J. Oncol.* 2001; **19**: 311-315]. Axin loss of function (LOF) mutations have been associated with hepatocellular cancer [Satoh *et al., Nature Genet.* 2000; **24**: 245-250; Taniguchi *et al., Oncogene* 2002; **21**: 4863-4871] and medulloblastoma [Dahmen *et al., Cancer Res.* 2001; **61**: 7039-7043; Yokota *et al., Int. J. Cancer* 2002; **101**: 198-201]. The blocking of Wnt-Frz interactions with the Wnt antagonists of the present invention is expected to alleviate cancers associated with overexpression of Frz or LRPs.

Finally, a multitude of cancers has been associated with activating β-catenin through disruption of the "degradation complex" such as gain-of-function mutations in β–catenin or loss-of-function mutations in APC. A reduction in the degradation of β-catenin results in greater amounts of functional β-catenin in the cell, which then causes increased transcription of the target genes, resulting in aberrant cell proliferation. For example, mutations in the gene encoding β-catenin (*i.e.*, CTNNB1) have been associated with cancers such as gastric [Clements *et al., Cancer Res.* 2002; **62**: 3503-3506; Park *et al., Cancer Res.* 1999; **59**: 4257-4260], colorectal [Morin *et al., Science* 1997; **275**: 1787-1790; Ilyas *et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1997; **94**: 10330-10334], intestinal carcinoid [Fujimori *et al., Cancer Res.* 2001; **61**: 6656-6659], ovarian [Sunaga *et al., Genes Chrom. Cancer* 2001; **30**: 316-321], pulmonary adenocarcinoma [Sunaga *et al., supra*], endometrial [Fukuchi *et al., Cancer Res.* 1998; **58**: 3526-3528; Kobayashi *et al., Japan. J. Cancer Res.* 1999; **90**: 55-59; Mirabelli-Primdahl *et al., Cancer Res.* 1999; **59**: 3346-3351], hepatocellular [*Satoh et al., supra.*; Wong *et al., Cancer* 2001; **92**: 136-145], hepatoblastoma [Koch *et al., Cancer Res.* 1999; **59**: 269-273], medulloblastoma [Koch *et al., Int. J. Cancer* 2001; **93**: 445-449], pancreatic [Abraham *et al., Am. J. Pathol.* 2002; **160**: 1361-1369], thyroid [Garcia-Rostan *et al., Cancer Res.* 1999; **59**: 1811-1815; Garcia-Rostan *et al., Am. J. Pathol.* 2001; **158**: 987-996], prostate [Chesire *et al., Prostate* 2000; **45**: 323-334; Voeller *et al., Cancer Res.* 1998; **58**: 2520-2523], melanoma [Reifenberger *et al., Int. J. Cancer* 2002; **100**: 549-556], pilomatricoma [Chan *et al., Nature Genet.* 1999; **21**: 410-413], Wilms' tumor [Koesters *et al., J. Pathol.* 2003; **199**: 68-76], pancreatoblastomas [Abraham *et al., Am. J. Pathol.* 2001; **159**: 1619-1627], liposarcomas [Sakamoto *et al., Arch. Pathol. Lab Med.* 2002; **126**: 1071-

1078], juvenile nasopharyngeal angiofibromas [Abraham *et al., Am. J. Pathol.* 2001; **158**: 1073-1078], desmoid [Tejpar *et al., Oncogene* 1999; **18**: 6615-6620; Miyoshi *et al., Oncol. Res.* 1998; **10**: 591-594], synovial sarcoma [Saito *et al., J. Pathol.* 2000; **192**: 342-350]. While loss-of-function mutations have been associated with cancers such as colorectal [Fearon *et al., Cell* 1990; **61**: 759-767; Rowan *et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000; **97**: 3352-3357], melanoma [Reifenberger *et al., Int. J. Cancer* 2002; **100**: 549-556; Rubinfeld *et al., Science* 1997; **275**: 1790-1792], medulloblastoma [Koch *et al., Int. J. Cancer* 2001; **93**: 445-449; Huang *et al., Am. J. Pathol.* 2000; **156**: 433-437] and desmoids [Tejpar *et al., Oncogene* 1999; **18**: 6615-6620; Alman *et al., Am J. Pathol.* 1997; **151**: 329-334]. Cancers that result from aberrant activity of β-catenin thereby activating the Wnt pathway are suitable for treatment with the Wnt antagonists of the present invention.

3. Wnt signaling and carcinogenesis

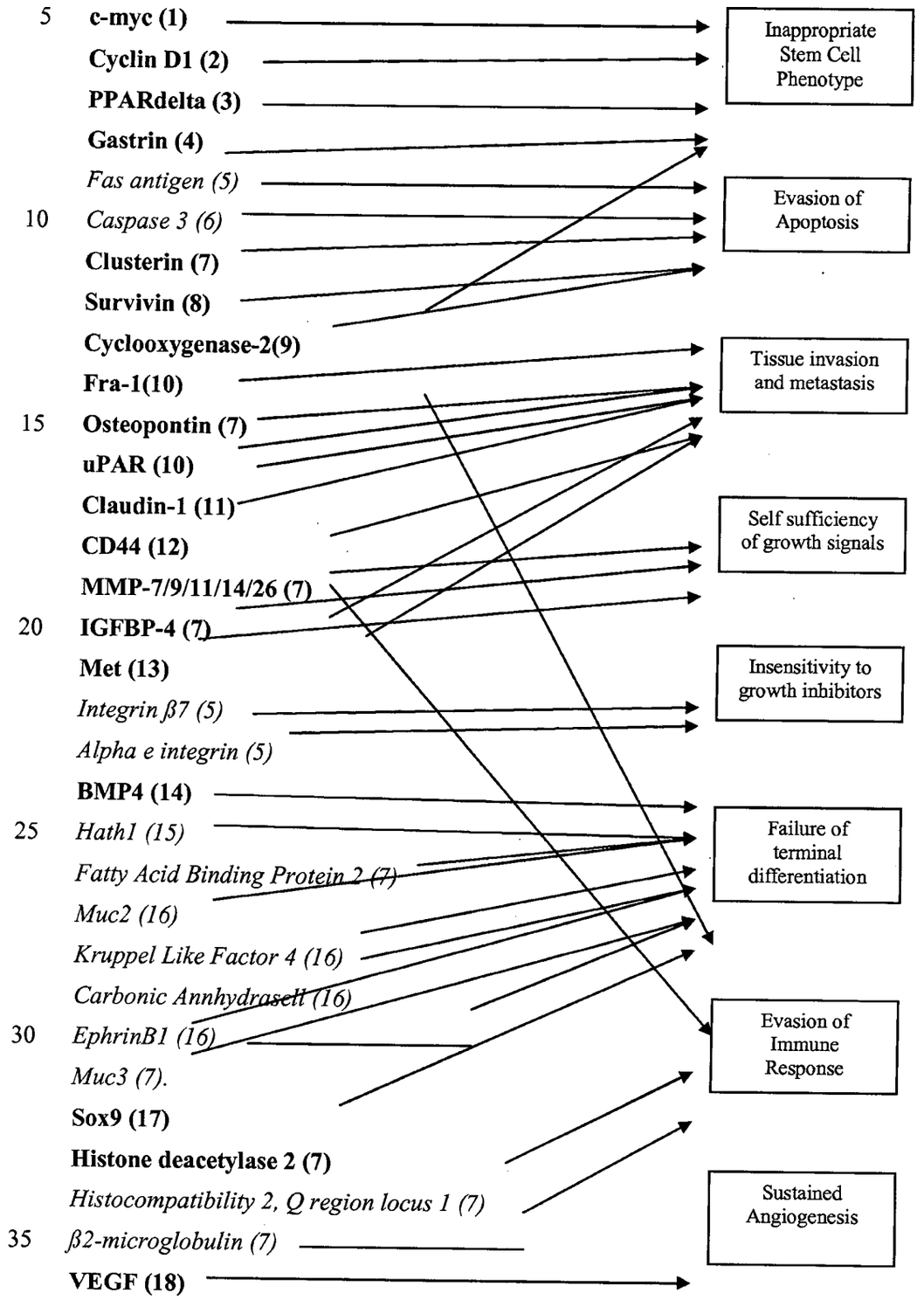
The Wnt pathway has many transcriptional endpoints or target genes. The majority of these are specific to certain types - which is not unusual in developmental signaling pathways. This is consistent with a fundamental mechanism of gene control by extracellular signals in which the cell rather than the signal determines the nature of the response. However, in addition to cell type specific genes, Wnt signaling also controls genes that are more widely induced, including components of the Wnt signaling pathway and genes that are most likely activated by the Wnt-β-catenin-TCF cascade.

The transition of normal cellular physiology into one characterized by neoplastic change has been the object of intense study in an effort to better understand the events underlying the development of cancer. The inappropriate activation of the target genes by β-*catenin* thus can result in a disease state in the organism even though there may not be any somatic mutation in the target genes themselves. Ilyas has generated a modification of the Hanahan and Weinberg list of phenotypes that are acquired by most malignancies; including "Inappropriate stem cell phenotype/limitless replicative potential", "evasion of apoptosis," "tissue invasion and metastasis," "self sufficiency of growth signals," "insensitivity to growth inhibitors," "failure of terminal differentiation," "evasion of immune response," and "sustained angiogenesis." Ilyas, *J. Pathol.* 2005; **205**: 130-144; Hanahan and Weinberg, *Cell* 2000; **100**: 57-70. Analysis of the genes modulated by *Wnt* signaling, including target genes of β-*catenin* or altered expression as shown by microarray analysis shows that the perturbations from aberrant *Wnt* signaling either directly or through the effect on target genes can impart nearly all of these "neoplastic phenotypes." Ilyas, M., *J. Pathol.* 2005;

205: 130-144. A list of example targets of *Wnt* signaling is given in Table 1. Gene targets that are upregulated appear in boldface, while those which are downregulated are italicized. Aberrant expression of such target genes due to the result of activated and/or excessive Wnt signaling may be remedies upon application of the *Wnt* antagonists of the invention.

Table 1

***Wnt* target genes and effects phenotypic effects**



Increasingly, cancer is being viewed as a "stem cell" disease (Taipale *et al., Nature* 2001; **411**: 349-54 - that is, an inappropriate activation and/or maintenance of stem cells. *Wnt* signaling has been shown to be essential for the maintenance of stem cells [He *et al., Nature Genet.* 2004; **36**: 1117-1121; Reya *et al., Nature* 2003; **423**: 409-414; Willert *et al., Nature* 2003; **423:** 448-452]. In the intestine, *TCF4* is the main nuclear binding factor for β-catenin and the failure of TCF4 knock out mice to develop stem cells in the small intestine further supports the role of canonical *Wnt* signaling in stem cell maintenance [Korinek *et al., Nat. Genet.* 1998; **19**: 379-83; Pinto *et al., Genes Dev.* 2003; **17**: 1709-13; Kuhnert *et al., Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 2004; **101**: 66-71].

The effect of Wnt signaling on multiple biological processes is illustrated by the matrix metalloproteinase genes (MMPs). MMP7, MMP14 and MMP26 have been shown to direct targets of β-*catenin* [Marchenko *et al., Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 36: 942-956; Takahashi *et al., Oncogene* 2002; 21: 5861-5867; Brabletz *et al., Am. J. Pathol.* 1999; **155**: 1033-1038], while other MMPs were found expressed directly by intestinal adenomas [Paoni *et al., Physiol. Genomics* 2003; **15**: 228-235]. The MMPs are proteolytic enzymes that breakdown stromal collagen thereby allowing tumor cells to acquire the phenotype "tissue invasion and metastasis." The enzymatic activity also allows the release of latent growth factors in the stroma, which together with other growth factors secreted by the tumor cells themselves will contribute to "self sufficiency of growth signals." [Coussens *et al., Science* 2002; **295**: 2387-2392; Egeblad *et al., Nature Rev. Cancer* 2002; **2:** 161-174]. MMPs can also act on osteopontin (a secondary Wnt-induced target [Paoni *et al., supra*], to release fragments which together with vascular endothelial growth factor (VEGF), a direct target of β-catenin, contributes to the feature of "sustained angiogenesis." [Zhang *et al., Cancer Res.* 2001; **61**: 6050-6054; Agnihotri *et al., J. Bio. Chem.* 2001; **276**: 28261-28267].

While the Wnt signaling pathway can be activated at levels downstream of the ligand receptor interaction, there is strong evidence to suggest inhibition of the extracellular ligand-receptor interaction component is effective in reducing the tumorigenicity, even though the event initiating the *Wnt* signaling may have occurred downstream. For example, Ilyas reports in a recent review that the inhibition of *Wnt* signals in several colorectal cancer cell lines results in reduced tumorigenicity. [Ilyas, *supra.*]. Moreover, the transfection of inoperative frizzled receptor (Frz7 ectodomain) into carcinoma cell line (SK-CO-1) restored a normal β-catenin phenotype. This cell line has active Wnt signaling due to a homozygous $APC^{-/-}$ mutation. Moreover, such cells also did not demonstrate tumor formation when transferred *in vivo*. Vincan *et al., Differentiation* 2005; **73**: 142-153. This demonstrates that

the inhibition of Wnt signaling at the extracellular level can downregulate Wnt signaling resulting from activation of a downstream intracellular Wnt signaling pathway component. This further suggests that inhibitors such as the Wnt antagonists of the present invention, which inhibit Wnt-Frz interactions, have therapeutic benefit for any Wnt-mediated disorder, regardless of the particular manner in which Wnt signaling has been activated.

4. Aberrant Wnt signaling in colon cancer:

Defects in the Wnt signaling component APC was originally discovered to be the key in the hereditary cancer syndrome familial adenomatous polyposis (FAP). FAP patients who inherit one defective APC allele develop large number of colon polyps, or adenomas, in the early years of their life. Such polyps develop as clonal outgrowths of epithelial cells in which the second APC allele is inactivated. The cumulative effect of these FAP adenomas inevitably results in the appearance of adenocarcinomas, evident as a more or less ordered accumulation of mutations in additional oncogenes or tumor suppressor genes, such as K-Ras, p53 and Smad4. Moreover, the loss of APC also occurs in most sporadic colorectal cancers. Kinzler *et al., Cell* 87: 159-170 (1996). The mutational inactivation of APC, by resulting in the stabilization of, and eventual nuclear transport of β-catenin, and Wnt signaling, thereby transforms epithelial cells. Interestingly, reporter plasmids containing concatemerized TCF binding sites such as the pTOPFLASH, normally transcribed only upon Wnt signaling, are inappropriately transcribed in APC mutant cancer cells through constitutive activation of β-catenin/TCF-4 transcription complexes. In other examples of colorectal cancer in which *APC* in not mutated, the scaffolding protein Axin-2 is mutated [Liu *et al., Nature Genet.* 26: 146-147 (2000) or β-catenin is mutated so as to remove the N-terminal Ser/Thr destruction motif. [Morin *et al., Science* 275: 1787-1790 (1997). Thus, colorectal cancer is linked not only to defects in *APC*, but to the inappropriate persistence of β-catenin/TCF-4 transcriptional activation. It has further been reported that *TCF*-4 mutations result in activation of the same target genes (as shown by microarray analysis) in colorectal cancers, as is observed through defective APC expression in crypt stem and progenitor cells. Van de Wetering *et al., Cell* 111: 241-250 (2002). Once the Wnt cascade is activated, the $APC^{-/-}$ adenoma cells maintain their progenitor status indefinitely. As a result, it is likely that the activation of Wnt signaling is a necessary precursor in the carcinogenesis of colorectal cancer, and the inhibition of Wnt signaling could be an effective means to treat and/or prevent the onset of this disorder.

5. Wnt signaling in hematopoietic stem cells

Hematopoietic stem cells give rise to the adult blood cells of the circulatory system in a process of lineage-committed progenitor cells from multipotential hematopoietic stem cells (HSC). It is also apparent that Wnt signaling contributes to the self-renewal and maintenance of HSC's, and that dysfunctional Wnt signaling is responsible for various disorders resulting from HSC's, such as leukemias and various other blood related cancers. Reya *et al., Nature* 434: 843-850 (2005); Baba *et al., Immunity* 23: 599-609 (2005); Jamieson *et al., N. Engl. J. Med.* 351(7): 657-667 (2004). *Wnt* signaling is normally reduced as stem cells convert to committed myeloid progenitor cells. Reya *et al., Nature* 423: 409-414 (2003).

Not only are Wnt ligands themselves produced by HSC's, but Wnt signaling is also active, thereby suggesting autocrine or paracrine regulation. Rattis *et al., Curr. Opin. Hematol.* 11: 88-94 (2004); Reya *et al., Nature* 423: 409-414 (2003). Additionally, both β-catenin and Wnt3a promote self renewal of murine HSCs and progenitor cells, while application of Wnt-5A to human hematopoietic progenitors promotes the expansion of undifferentiated progenitors *in vitro*. Reya *et al., supra.*; Willert *et al., Nature* 423: 448-452 (2003); Van Den Berg *et al., Blood* 92: 3189-3202 (1998).

In addition to HSC's, it is apparent that embryonic stem cells, epidermal stem cells and epithelial stem cells are responsive or dependent on *Wnt* signaling for maintenance in an undifferentiated, proliferating state. Willert *et al., supra*; Korinek *et al., Nat. Genet.* 19: 379-383 (1998); Sato *et al., Nat. Med.* 10: 55-63 (2004); Gat *et al., Cell* 95: 605-614 (1998); Zhu *et al., Development* 126: 2285-2298 (1999). Therefore the inhibition of Wnt signaling with the Wnt antagonists of the present invention may be a therapeutic in the treatment of disorders resulting from dysfunctional hematopoieses, such as leukemias and various blood related cancers, such as acute, chronic, lymphoid and myelogenous leukemias, myelodysplastic syndrome and myeloproliferative disorders. These include myeloma, lymphoma (e.g., Hodgkin's and non-Hodgkin's) chronic and nonprogressive anemia, progressive and symptomatic blood cell deficiencies, polycythemia vera, essential or primary thrombocythemia, idiopathic myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia (CMML), mantle cell lymphoma, cutaneous T-cell lymphoma, Waldenstrom macroglobinemia,

6. Wnt signaling in leukemia

Unregulated activation of the Wnt signaling pathway is a precursor to the development of leukemia. Reya *et al., supra.* Experimental evidence exists supporting the oncogenic growth of both myeloid and lymphoid lineages as dependent on Wnt signaling. Wnt signaling has been implicated in regulating both the chronic and acute forms of myeloid leukemia. Granulocyte-macrophage progenitors (GMPs) from chronic myelogenous leukemia patients and blast crisis cells from patients resistant to therapy display activated Wnt signaling. Jamieson, *et al., supra.* Moreover, inhibition of β-catenin through ectopic expression of Axin decreases the replating capacity of leukemic cells in vitro, suggesting that chronic myelogenous leukemia precursors are dependent on Wnt signaling for growth and renewal. Also, Wnt overexpression caused GMPs to acquire stem-cell-like properties of long-term self renewal. Jamieson *et al., supra.* This finding further support the hypothesis that Wnt signaling is necessary for the normal development of blood lineages, but that aberrant Wnt signaling results in the transformation of progenitor cells. The Wnt antagonists of the present invention would be useful to treat these types of leukemias.

Recent studies also suggest that lymphoid neoplasias may also be influenced by Wnt signaling. Wnt-16 is overexpressed in pre-B-cell leukemia cell lines carrying the E2A-PbX translocation, suggesting that autocrine Wnt activity may contribute to oncogenesis. McWhirter, *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11464-11469 (1999). The role of Wnt signaling in the growth and survival of normal B-cell progenitors further supports this notion. Reya *et al., Immunity* 13: 15-24 (2000); Ranheim *et al., Blood* 105: 2487-2494 (2005). Autocrine dependence on *Wnt* has also been proposed for regulating the growth of multiple myeloma, a cancer of terminally differentiated B-cells. Derksen *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 6122-6127 (2004). Primary myelomas and myeloma cell lines were also found to express stabilized (i.e., independent of degradation complex). Although no mutations in Wnt signaling components was present, the overexpression of several components, including Wnt-5A and Wnt-10B suggest that tumor dependency and cancer self-renewal is not necessarily dependent on mutations appearing in Wnt signaling pathway components, but rather only upon constitutive activation of the pathway itself. Reya *et al., supra.* Through binding overexpressed *Wnt*, the *Wnt* antagonists of the present invention would be an effective therapeutic in treating B-cell leukemias.

The transition of self-renewing, pluripotent stem cells to myeloid progenitors is accompanied by the downregulation of Wnt signaling. Reya *et al, Nature* 423: 409-414

(2003). Similarly, the stable expression of β-catenin in lymphoid progenitors restored multiple differentiation options, albeit such cells lacked markers typically associated with either cell type. Baba *et al., Immunity* 23: 599-609 (2005). Thus, it is strongly suggested that the inhibition of Wnt signaling by the Wnt antagonists of the invention could be an effective therapeutic in treating leukemia, such as myelolid and lymphoid leukemia, including acute and chronic myelogenous leukemia as well as acute and chronic lymphoid leukemias.

7. Aberrant Wnt signaling in neural disorders

It has also been observed that the activation of Wnt signaling through β-catenin can increase cycling and expansion of neural progenitors, and that loss of such signaling can result in a loss of progenitor compartment. Chenn *et al., Science* 297: 365-369 (2002); Zechner *et al., Dev. Biol.* 258: 406-418 (2003). Just as normal activation of *Wnt* signaling may promote self-renewal of neuronal stem cells, aberrant Wnt pathway activation may be tumorigenic in the nervous system. Experimental evidence supporting this conclusion is the discovery that medulloblastoma, a pediatric brain tumor of the cerebellum, contains mutations in both β-catenin and Axin - thereby suggesting that medulloblastomas arise from primitive progenitors that become transformed in response to uncontrolled Wnt signaling. Zurawel *et al., Cancer Res.* 58: 896-899 (1998); Dahmen *et al., Cancer Res.* 61: 7039-7043 (2001); Baeza *et al., Oncogene* 22: 632-636 (2003). Thus, it is strongly suggested that the inhibition of Wnt signaling by the Wnt antagonists of the invention may be an effective therapeutic in the treatment of various neuronal proliferative disorders, including brain tumors, such as gliomas, astrocytomas, meningiomas, Schwannomas, pituitary tumors, primitive neuroectodermal tumors (PNET), medulloblastomas, craniopharyngioma, pineal region tumors, and non cancerous neurofibromatoses.

8. Aberrant Wnt signaling in breast cancer.

In mammary tissues where stem cells have yet to be definitively isolated, a controlling role for Wnt in progenitor cell fate or maintenance is suggested by studies of Wnt transgenic mice develop mammary tumors. These tumors have an increased frequency of individual cells with stem and progenitor properties, in stark contrast to tumors from mice overexpressing other oncogenes. [Liu *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 4158-4163 (2004); Li *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 15853-15858 (2003)]. This suggests that the Wnt pathway may be unique in its ability to target stem and progenitor cells for transformation, and suggests a key role in the self-renewal of normal breast epithelium.

Thus the inhibition of Wnt signaling by the Wnt antagonists of the invention is likely an effective therapeutic in the treatment of breast cancer.

Figure 32 is an illustration of active Wnt signaling in human breast cancer. Figure 32A shows Wnt-1 expression (as shown by *in vitro* hybridization) in normal (A-1), low grade (A-2) and high grade (A-3) human breast tumor initially reported in Wong *et al., J. Pathol.* 196: 145 (2002). Figure 32B shows nuclear (B-1) and cytoplasmic (B-2) localization (as shown by IHC) of β-catenin in breast cancer patients. Also shown is a Kaplan-Meier survival plot (B-3) showing patient survival probability that correlates with the indicated β-catenin expression pattern. This data was initially reported in Lin *et al., P.N.A.S. (USA)* 97(8): 4262-66 (2000). Figure 32C is a microarray analysis of Wnt-1 expression in a normal breast from a patient without cancer in comparison with tissue isolated from a patient with infiltrating ductal carcinoma, her-2 negative.

9. Wnt signaling in aging

The Wnt signaling pathway may also play a critical role in aging and age-related disorders.

As reported in Brack AS, *et al., Science,* 317(5839):807-10 (2007), muscle stem cells from aged mice were observed to convert from a myogenic to a fibrogenic lineage as they begin to proliferate. This conversion is associated with an increase in canonical Wnt signaling pathway activity in aged myogenic progenitors and can be suppressed by Wnt inhibitors. Additionally, components of serum from aged mice bind to the Frizzled proteins and may account for the elevated Wnt signaling in aged cells. Injection of Wnt3A into young regenerating muscle reduced proliferation and increased deposition of connective tissue.

The Wnt signaling pathway has been further implicated in aging process in studies using the Klotho mouse model of accelerated aging in which it was determined that the Klotho protein physically interacted with and inhibited Wnt proteins. Liu H, et al., Science, 317(5839):803-6(2007). In a cell culture model, the Wnt-Klotho interaction resulted in the suppression of Wnt biological activity while tissues and organs from Klotho-deficient animals showed evidence of increased Wnt signaling.

Accordingly, Wnt antagonists could find use as therapeutics to reduce the effects of aging and to treat age-related diseases.

I. Modes of Administration Specific Formulations

1. General considerations

A pharmaceutical composition is formulated to be compatible with its intended route of administration, including intravenous, intradermal, subcutaneous, oral (*e.g.*, inhalation), transdermal (*i.e.*, topical), transmucosal, and rectal administration. Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, or subcutaneous application can include: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); buffers such as acetates, citrates or phosphates, and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. The pH can be adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.

2. Injectable formulations

Pharmaceutical compositions suitable for injection include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. For intravenous administration, suitable carriers include physiological saline, bacteriostatic water, CREMOPHOR EL (BASF, Parsippany, N.J.) or phosphate buffered saline (PBS). In all cases, the composition must be sterile and should be fluid so as to be administered using a syringe. Such compositions should be stable during manufacture and storage and must be preserved against contamination from microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (such as glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol), and suitable mixtures. Proper fluidity can be maintained, for example, by using a coating such as lecithin, by maintaining the required particle size in the case of dispersion and by using surfactants. Various antibacterial and antifungal agents; for example, parabens, chlorobutanol, phenol, ascorbic acid, and thimerosal, can contain microorganism contamination. Isotonic agents; for example, sugars, polyalcohols such as manitol, sorbitol, and sodium chloride can be included in the composition. Compositions that can delay absorption include agents such as aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound (*e.g.*, any modulator substance/molecule of the invention) in the required amount in an

appropriate solvent with one or a combination of ingredients as required, followed by sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle that contains a basic dispersion medium, and the other required ingredients. Sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, methods of preparation include vacuum drying and freeze-drying that yield a powder containing the active ingredient and any desired ingredient from a sterile solutions.

3. Systemic administration

Systemic administration can also be transmucosal or transdermal. For transmucosal or transdermal administration, penetrants that can permeate the target barrier(s) are selected. Transmucosal penetrants include, detergents, bile salts, and fusidic acid derivatives. Nasal sprays or suppositories can be used for transmucosal administration. For transdermal administration, the active compounds are formulated into ointments, salves, gels, or creams.

The compounds can also be prepared in the form of suppositories (*e.g.*, with bases such as cocoa butter and other glycerides) or retention enemas for rectal delivery.

4. Carriers

In one embodiment, the active compounds are prepared with carriers that protect the compound against rapid elimination from the body, such as a controlled release formulation, including implants and microencapsulated delivery systems. Biodegradable or biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Such materials can be obtained commercially from ALZA Corporation (Mountain View, CA) and NOVA Pharmaceuticals, Inc. (Lake Elsinore, CA), or prepared by one of skill in the art. Liposomal suspensions can also be used as pharmaceutically acceptable carriers. These can be prepared according to methods known to those skilled in the art, such as in (Eppstein et al., US Patent No. 4,522,811, 1985).

5. Unit dosage

Oral formulations or parenteral compositions in unit dosage form can be created to facilitate administration and dosage uniformity. Unit dosage form refers to physically discrete units suited as single dosages for the subject to be treated, containing a therapeutically effective quantity of active compound in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the unit dosage forms are dictated by, and

directly dependent on, the unique characteristics of the active compound and the particular desired therapeutic effect, and the inherent limitations of compounding the active compound.

6. Gene therapy compositions

The nucleic acid molecules can be inserted into vectors and used as gene therapy vectors. Gene therapy vectors can be delivered to a subject by, for example, intravenous injection, local administration (Nabel and Nabel, US Patent No. 5,328,470, 1994), or by stereotactic injection (Chen et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:3054-7 (1994)). The pharmaceutical preparation of a gene therapy vector can include an acceptable diluent, or can comprise a slow release matrix in which the gene delivery vehicle is imbedded. Alternatively, where the complete gene delivery vector can be produced intact from recombinant cells, *e.g.*, retroviral vectors, the pharmaceutical preparation can include one or more cells that produce the gene delivery system.

7. Dosage

The pharmaceutical composition and method may further comprise other therapeutically active compounds that are usually applied in the administration of the Wnt antagonists.

In the treatment or prevention of conditions which require administration of Wnt antagonists, an appropriate dosage level will generally be about 0.01 to 500 mg per kg patient body weight per day which can be administered in single or multiple doses. Preferably, the dosage level will be about 0.1 to about 250 mg/kg per day; more preferably about 0.5 to about 100 mg/kg per day. A suitable dosage level may be about 0.01 to 250 mg/kg per day, about 0.05 to 100 mg/kg per day, or about 0.1 to 50 mg/kg per day. Within this range the dosage may be 0.05 to 0.5, 0.5 to 5 or 5 to 50 mg/kg per day. For oral administration, the compositions are preferably provided in the form of tablets containing 1.0 to 1000 milligrams of the active ingredient, particularly 1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0, 150.0, 200.0, 250.0, 300.0, 400.0, 500.0, 600.0, 750.0, 800.0, 900.0, and 1000.0 milligrams of the active ingredient for the symptomatic adjustment of the dosage to the patient to be treated. The compounds may be administered on a regimen of 1 to 4 times per day, preferably once or twice per day.

However, the specific dose level and frequency of dosage for any particular patient may be varied and will depend upon a variety of factors including the activity of the specific compound employed, the metabolic stability and length of action of that compound, the age,

body weight, general health, sex, diet, mode and time of administration, rate of excretion, drug combination, the severity of the particular condition, and the host undergoing therapy.

8. Kits for compositions

The compositions (*e.g.*, pharmaceutical compositions) can be included in a kit, container, pack, or dispenser together with instructions for administration. When supplied as a kit, the different components of the composition may be packaged in separate containers and admixed immediately before use. Such packaging of the components separately may permit long-term storage without losing the active components' functions.

Kits may also include reagents in separate containers that facilitate the execution of a specific test, such as diagnostic tests or tissue typing.

(a) *Containers or vessels*

The reagents included in kits can be supplied in containers of any sort such that the life of the different components are preserved and are not adsorbed or altered by the materials of the container. For example, sealed glass ampules may contain lyophilized modulator substance/molecule and/or buffer that have been packaged under a neutral, non-reacting gas, such as nitrogen. Ampules may consist of any suitable material, such as glass, organic polymers, such as polycarbonate, polystyrene, *etc.*, ceramic, metal or any other material typically employed to hold reagents. Other examples of suitable containers include simple bottles that may be fabricated from similar substances as ampules, and envelopes, that may consist of foil-lined interiors, such as aluminum or an alloy. Other containers include test tubes, vials, flasks, bottles, syringes, or the like. Containers may have a sterile access port, such as a bottle having a stopper that can be pierced by a hypodermic injection needle. Other containers may have two compartments that are separated by a readily removable membrane that upon removal permits the components to mix. Removable membranes may be glass, plastic, rubber, *etc.*

(b) *Instructional materials*

Kits may also be supplied with instructional materials. Instructions may be printed on paper or other substrate, and/or may be supplied as an electronic-readable medium, such as a floppy disc, CD-ROM, DVD-ROM, Zip disc, videotape, laserdisc, audio tape, *etc.* Detailed instructions may not be physically associated with the kit; instead, a user may be directed to an internet web site specified by the manufacturer or distributor of the kit, or supplied as electronic mail.

9. Combination therapy

In certain embodiments, a pharmaceutical formulation comprising a Wnt antagonist is administered in combination with at least one additional therapeutic agent and/or adjuvant. In certain embodiments, the additional therapeutic agent is a chemotherapeutic agent, growth inhibitory agent, or cytotoxic agent like a toxin, such as a maytansinoid, calicheamicin, antibiotic, radioactive isotope, nucleolytic enzyme or the like.

Such combination therapies noted above encompass combined administration (where two or more therapeutic agents are included in the same or separate formulations), and separate administration, in which case, administration of a Wnt antagonist can occur prior to, simultaneously, and/or following, administration of the additional therapeutic agent and/or adjuvant. A Wnt antagonist can also be used in combination with radiation therapy.

10. Medicaments

The invention provides a Wnt antagonist for a use in the preparation of a medicament useful for treating a Wnt-mediated disorder. In a specific aspect, the Wnt-mediated disorder is cancer.

The following examples are included to demonstrate preferred embodiments of the present invention. It should be appreciated by those of skill in the art that the techniques disclosed in the examples that follow represent techniques discovered by the inventors to function well in the practice of the invention, and thus can be considered to constitute preferred modes for its practice. However, those of skill in the art should, in light of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific embodiments that are disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention. All references cited throughout the specification are expressly incorporated by reference in their entirety herein.

Example 1

General Protocols

Mammalian Cell Culture.

Human kidney epithelial (HEK) 293 cells (ATCC # CRL-1573), human ovarian PA1 cells (ATCC # CRL-1572) were grown in 50/50 Dulbecco modified Eagle high glucose medium, Ham's F12 which has been supplemented with 10% fetal bovine serum. Human

teratoma derived NTer2 (ATCC #CRL-1973) and Tera2 (ATCC#HTB-106) cells were maintained in McCoy's medium supplemented with 15% fetal bovine serum and NCCIT cells (ATCC # CRL-2073) were maintained in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum. All cell lines were further supplemented with 2 mM glutamine, and 1% penicillin-streptomycin at 37°C in 5% CO_2.

Transfection and luciferase assays

In preparation for transfection, (1) 500,000 HEK293 and (2) 100,000 PA1 cells (ATCC # CRL-1572), NCCIT, NTera2 or Tera2 cells were plated into each well of a 12-well dish (Nuc) 24 hours before transfections. Cells were transfected with 0.375 μg TOPglow (Upstate, Cat # 21-204), 0.05 mg LEF1, 0.01 mg SV40 RL with Fugene (Roche) and at 24 hours post transfection. Media was changed and cells were untreated or treated with *Wnt3a* alone, *Wnt-5a* alone, or with serum samples for an additional 20-24 hours before harvesting. All dilutions were made in complete media for the indicated cell lines. Cells were harvested in 50-100 μl of 1XSJC lysis buffer (20 mM Tris pH 8.0, 137 mM NaCl, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 10% Glycerol, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 50 mM NaF, 1 mM $NaVO_4$ and protease inhibitors) and duplicate 10 μl were assayed using Dual-Glo™ luciferase assay kit (Promega, Part # TM058) and detected in an Envision Luminometer (Perkin Elmer). Luciferase activity was normalized against *Renilla* activity.

Example 2

Construction of Frz-Fc chimeric molecules

Cloning and expression

Frz8(173)-Fc and Frz8(156)-Fc

Figures 4A and B show the sequences of the Frz8 (156)-Fc and Frz8 (173)-Fc chimeric constructs. Figure 4A shows the longer Frz8(173) sequence. Shown in gray (*i.e.*, first 24 N-terminal amino acid residues) is the leader signal sequence. Shown in underline (*i.e.*, residues 25-27) are alanine residues that may be present or absent in the mature protein. Shown in boxed text (*i.e.*, residues 157-173) are the additional sequences of the Frz8 receptors that distinguish the longer Frz8 (173) from the shorter Frz8(156) chimeric constructs. Shown in bold (*i.e.*, residues 174-182) is the linker sequence, while the sequence in italics (*i.e.*, residues 183-409) is the Fc region. Figure 4B shows the shorter Frz (156) minimal CRD (ECD) domain sequence. In gray (*i.e.*, first 24 N-terminal amino acid

residues) is the leader signal sequence. Shown in underline (*i.e.*, residues 25-27) are alanine residues that may be present or absent in the mature protein. Shown in bold (*i.e.*, residues 157-164) is the linker sequence, while the sequence in italics (*i.e.*, residues 165-391) is the Fc region.

The Frz8(156)-Fc construct was constructed as follows. cDNA encoding Frizzled 8 residues 1-156 were sub-cloned into the EcoR1 and XhoI sites of a pRK-derived plasmid. While native human cDNA is preferred, alternative sequence encoding identical protein sequence (e.g., murine) may also be used. In this cloning procedure, the carboxyl terminus of the Frz8 was fused to the amino terminus of a human IgG effector domain (Fc) via a short linker region (*e.g.*, residues LESGGGGVT)(SEQ ID NO: 70), to create an Frz8-Fc fusion. A final construct encodes 156 residues of Frz8. The cloning was performed using standard molecular biology techniques (Ausubel *et al.* (eds.), 2003, *Current Protocols in Molecular Biology*, 4 Vols., John Wiley & Sons). Protein was expressed in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells.

Alternatively, the cDNA encoding a length of Frz8 of a length different than described previously (*e.g.*, 1-173) may be used. In addition, an alternative linker sequence (*e.g.*, ESGGGGVT)(SEQ ID NO: 69) may also be used.

Frz-Fc and sFrp-Fc constructs

The constructs for the Wnt antagonists with a Frizzled domain component comprising Frz1, Frz2, Frz3, Frz4, Frz5, Frz6, Frz7, Frz9, Frz10, sFRP1, sFRP2, sFRP3, sFRP4, or sFRP5 were constructed in a manner similar to the procedure described for Frz8. Frz2, Frz3, Frz4, Frz5, and sFRP3 were subcloned into a pRK-derived plasmid using XhoI and AscI. Frz1, Frz6, Frz7, Frz9, Frz10, and sFRP4 were subcloned into a pRK-derived plasmid using ClaI and XhoI and sFrp1, sFrp2, and sFRP5 were subcloned into a pRK-derived plasmid using ClaI and AscI. As with the Frz8 constructs, the carboxyl terminus of the Frz domains were fused to the amino terminus of a human IgG effector domain (Fc) via a short linker region to create the chimeric Wnt antagonists. Figure 7 (A, B, and C) shows exemplary amino acid sequences for these constructs. The leader signal sequence is shown in bold with italics indicating a non-native leader sequence. The linker is underlined and the Fc component is shown in italics.

Figure 5 (A-H) (SEQ ID NOs: 115-129) provides exemplary nucleic acid sequences for these Wnt antagonist constructs.

Alternative constructs can be made to optimize *in vivo* activity or stability or to provide other beneficial characteristics, such as, for example, increased solubility, improved binding characteristics. These constructs may include linkers that are different than the linkers of the above-described Wnt antagonists. For example, an alternative construct of the Frz3-Fc chimeric protein (SEQ ID NO: 114) has been made by subcloning a Frz3 domain into a pRK-derived plasmid using BstXI and XhoI and using the LESGGGGVT (SEQ ID NO: 70) peptide linker to fuse the Frz3 domain to the Fc domain.

Protein Isolation

The Wnt antagonist chimeric proteins were isolated to > 90% purity by affinity capture using a PROSEP® (Millipore) protein-A conjugated resin. Higher order aggregates were separated from dimers by passage over a Superdex 200® (GE-Healthcare) gel-filtration column. Protein identity and processing of the amino terminus to remove the signal sequence were confirmed by Edmund degradation. Purity of the final protein is estimated to be greater than 98% (Figure 10). Endotoxin levels of the material after purification is complete and less than 1.0 EU/mg.

Example 3

Serum Stability of Frz8-Fc chimeric molecules

Initial studies of the serum stability of the Frz8(173)-Fc chimeric constructs indicated that the construct had a limited *in vivo* half-life. The *in vivo* instability was likely due to the presence of protease cleavage sites in the EC domain (ECD) of the *Frizzled* receptor component. The Frz8(156)-Fc construct described in Example 2 exhibited increased serum stability over the Frz8(173)-Fc. Athymic nude mice were injected i.v. with 10 mg/kg of either Frz8(173)-Fc or Frz8(156)-Fc. Serum was collected at specified time points and analyzed for total and active protein. Figure 11A shows an immunoblot for human Fc used to detect the protein present in 1 μL of serum and compared with 25 μg of the respective purified protein (*P*). Frz8(156)-Fc was detectable in serum 72 h after administration, whereas Frz8(173)-Fc was not detectable beyond 30 minutes.

The activity of Frz8(156)-Fc and Frz8(173)-Fc in the collected serum was assayed by measuring the inhibition of Wnt3a-dependent TOPglow reporter activity in HEK293 cells. Although comparable *in vitro* potency was observed on treatment with purified Frz8(156)-Fc and Frz8(173)-Fc at 2.5 μg/mL, only partial inhibitory activity was recovered from the

serum of Frz8(173)-Fc-treated mice collected 30 minutes after protein administration. In contrast, more potent inhibitory activity could be recovered from the serum of Frz8(156)-Fc treated mice for up to 24 hours after administration, with detectable levels of inhibition for at least 72 hours (Figure 11B). These studies demonstrate that the Frz8(156) molecule is more stable *in vivo* than the molecule based on Frz8(173).

Additionally, the Frz8(173)-FC had suboptimal efficacy and acted only to reduce the rate of increase in tumor volume, as opposed to shrinking starting tumor volume. This suboptimal efficacy is illustrated in Figure 12, showing a graph of tumor volume over time resulting from treatment with various Wnt signaling component-Fc chimeric antagonists, including the Frz8(173)-FC molecule. In this assay, the MMTV-WNT-1 tumors were transplanted into the mammary fat pad of athymic nude mice, and drug was administered IV at the time points indicated by the arrows on the X-axis.

Example 4

***In vivo* pharmacokinetics of Frz8(156)-FC**

The *in vivo* pharmacokinetics of Frz8(156)-FC were tested by administration of a single dose of this protein at 1, 5, or 20 mg/kg i.v. or at 20 mg/kg i.p. into nude mice. As reported in Figure 13 and discussed further in this Example below, the Frz8-Fc reagent displayed biphasic elimination in nude mice at all doses. After a single IV or IP dose, Frz8-Fc displays: (1) dose proportional increase in exposure; (2) rapid absorption after IP dosing; (3) clearance of about 25-30 ml/day; and (4) a half life of about 4 days. Bioavailability coefficient, AUC_{IP}/AUC_{IV} = 92%.

Animal protocol

Female athymic nude mice are separated into 4 groups of 12, on the basis of quantity of drug administered and manner of administration. Group 1: Frz8-Fc 1 mg/kg, intravenous (IV); Group 2: Frz8-Fc, 5 mg/kg, IV; Group 3: Frz8-Fc 20 mg/kg, IV; and Group 4: Frz8-Fc, 20 mg/kg, interperitoneal (IP). Each animal received an IV or IP bolus dose of Frz8-Fc according to the group designation. The dose volume administered (5-10 mL/kg) varies depending upon the concentration of the dosing solution and the weight of each animal. IV dosing is administered via the tail vein.

About 125 µl of blood is collected from each animal according to the following procedure. Serum is stored at -70°C until assayed by ELISA. Sample are drawn such that

n=3 animals/timepoint. Extra animals are used for predose sample collection and/or collection of blank mouse serum. Blood is collected with a retroorbital bleed for the first two timepoints for each animal, using alternative eyes. For the final timepoint, blood is collected via a cardiac stick and about 1 ml is aliquoted into 2 tubes. One sample will be used to determine Frz8-Fc concentration and the other will be reserved for research use. Each animal receives an IP bolus of 10 ml saline as fluid replacement after each blood collection timepoint. Retroorbital bleeds are performed under isoflorane anesthesia and terminal bleeds occur under a ketamine/xylazine cocktail. Animals are euthanized via cervical dislocation under anesthesia after the final blood draw.

Results

Figure 13A is an immunoblot of a neat serum from mice treated with Frz8-Fc showing detection in serum at 7 days and beyond from both 20 or 5 mg/kg I.V. or 20 mg/kg I.P. Samples were taken from individual mice at 4, 7, 10 or 14 days. For controls, serum samples were taken from untreated mice, Frz8-Fc protein was added to 20 μg/ml and the samples incubated for 2 hours at 37°C and the sample was then treated with SDS loading buffer (labeled as 2h); neat serum from untreated mice was also run as a negative control (labeled as S).

Figures 13B and 13C are a graphical summary of Frz8-Fc serum levels as determined from the pharmacokinetic study. Specific periods of time include evaluation over 16 days (Figure 13B) and 2 days (Figure 13C). Frz8-Fc displayed biphasic elimination administration in nude mice at all doses. Curves represent the predicted concentrations, while individual data points represent the average serum levels of Frz8-Fc protein from individual mice as determined by ELISA. Figure 13D is a summary of the parameters for a biphasic model of Frz8-Fc pharmacokinetics. When dosed at 20 mg/kg by either the i.p. or i.v. route, comparable serum levels of protein were achieved within a day of injection and the protein was detectable in serum up to 7 days. After i.p. dosing at 20 mg/kg, protein was rapidly absorbed with a T_{max} of ~8 h and bioavailability (AUC_{IP}/AUC_{IV}) of 92%. The clearance of the protein was ~25 to 30 mL/d/kg with a half-life of about 4 days

Example 5

Binding affinity of Frz-FC molecules

The addition of the FC domain to the Frz8(156) domains results in an increase in binding affinity for Wnt3a of over two magnitudes. Figure 14 demonstrates the enhanced ability of Frz8-ECD to block Wnt3a signaling when linked to a dimeric Fc domain. Figure 14A is an IC_{50} graph of a Wnt3a inhibition assay of two different preparations of Frz8(156)-FC. Figure 14B is a gel confirming the purity of the isolated Frz8(156) CRD (ECD). Shown are: (a) non-reduced Frz8(156) ECD (Lane 1); (b) molecular weight markers (Lane 2); and reduced Frz8 ECD (156) (Lane 3). This gel indicates that the Frz8 ECD used in the binding assay is intact and runs at approximately the expected molecular weight.

Example 6

Binding activity of Frz-FC chimeras

ELISA

For PK evaluation of the Wnt antagonist, the wells of a 384-well ELISA micro titer plate (Nunc Maxisorp, Rochester, NY) were coated with the rabbit anti-human Fc (Jackson Immuno Research, Westgrove, PA) at a concentration of 1 μg/ml in PBS (25 μg/well). After an overnight incubation at 4°C, the rabbit anti-human Fc solution was decanted, and the plates were blocked with 40 μl/well of block buffer (PBS containing 0.5% BSA and 10 ppm proclin). After a 60 minute incubation at room temperature with gentle agitation, the rabbit anti-human Fc coated plates were washed three times with wash buffer (PBS 0.05% Tween 20® and 10 ppm proclin). The Frizzled-Fc standards (a dilution series with a concentration range of 0.78 - 100 ng/ml), and the samples diluted into assay range in assay buffer (PBS containing 0.5% BSA, 0.05% Tween 20® and 10 ppm proclin) were added to the assay plate (25 μl/well). After a 120 minute incubation at room temperature with gentle agitation, the assay plates were washed six times with wash buffer. The remaining bound Frz-Fc was detected using a horse radish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-human IgG-Fc (Jackson Immuno Research) diluted into assay diluent (25 μl/well). After appropriate color development (10-25 minutes) the enzymatic reaction was stopped with 1M phosphoric acid (25 μl/well). The assay plates were read at a wavelength of 450 nm with a reference wavelength of 630 nm. Sample concentrations were determined by comparing the sample OD against the standard curve fit using a 4-parameter algorithm.

BIAcore

Figure 15 demonstrates direct binding by Wnt3a to the Frz8(1–156)-Fc chimera. This chimera protein was amine coupled to a Biocore™ (BIAcore, Inc. Piscataway, N.J.) CM5 sensor chip at approximately 1700 response units as described generally in Chen, Y. *et al., J. Mol. Biol.* 293: 865-881 (1999). Briefly, carboxymethylated dextran biosensor chips (CM5, BIAcore™ Inc.) were activated with *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) according to the supplier's instructions. An injection of 1M ethanolamine was done to block unreacted groups. *Wnt3a* was then injected at an estimated concentration of 0.5 μg/ml and binding was assessed by the change in response units as a function of time. Wnt3a was found to bind Frz8-Fc. As shown in Figure 15, the association of Wnt3a and Frz-Fc results in a highly significant increase of 1000 response units over control protein (E. coli expressed non-native Wnt3a.)

OCTET

The ability of the Wnt antagonists to interact with the Wnt ligands Wnt3a and Wnt5a was measured using the OCTET ™–QK system. (FortéBio, Inc., Menlo Park, CA). This system allows for the measurement of protein binding at a biosensor surface. The assays were conducted by first incubating one of the Wnt antagonist molecules (20 ug/mL) with anti-human IgG Fc-specific biosensors for 10 minutes in phosphate buffered saline (PBS) with 0.5% CHAPS. The unbound Wnt antagonist was removed by washing for 1.5 minutes in PBS 0.5% CHAPS. Either Wnt3a or Wnt5a (5.0ug/mL) was then added to the assay and incubated with the Wnt antagonist molecules bound to the biosensor surface for 5 minutes in PBS with 0.5% CHAPS. The interaction between the Wnt antagonist molecules and Wnt ligand was monitored in the same buffer. All assay steps were performed at room temperature in a volume of 150 uL. Figure 16 shows the result of this binding assay with Figure 16A showing data from the binding of Wnt3a to the Frz1-Frz10-Fc chimeras, Figure 16B showing data from the binding of Wnt3a to sFRP-Fc chimeras, and Figure 16C showing data from the binding of Wnt5a to the Frz1-Frz10-Fc chimeras and sFRP-Fc chimeras.

The OCTET ™ assay indicates that both Wnt3a and Wnt-5a bind Fz8-Fc, Fz5-Fc, and Fz4-Fc the fastest, relative to the other Frz proteins, with Wnt3a binding Fz1-Fc, Fz2-Fc, and Fz7-Fc at a slower rate. The amplitude and linear nature of Wnt-5a binding curves suggest a lower binding affinity relative to Wnt3a binding, as determined by this binding assay. The amplitude of the OCTET ™ binding data suggest that the sFRP-Fc proteins have

an affinity for Wnt3a similar that observed for Frz1, Frz2, and Frz7, and somewhat lower that observed for Frz5 and Frz8.

Example 7

Inhibition of Wnt Signaling by the Wnt Antagonists – cellular assays

Cellular assays were performed using 293 (human kidney) cells transfected with the TOPglow reporter plasmid. In preparation for transfection approximately 500,000 HEK293 were plated into a well of a 12-well dish (Nuc) 24 hours before transfections. Cells were transfected with 0.375 μg TOPglow (Upstate, Cat # 21-204), 0.05 mg LEF1, 0.01 mg SV40 RL with Fugene (Roche) and at 24 hours post transfection. Media was changed and cells were untreated or treated with Wnt3a alone, Wnt-5a alone, or with a Wnt antagonist for an additional 20-24 hours before harvesting. All dilutions were made in complete media for the indicated cell lines. Cells were harvested in 50-100 μl of 1XSJC lysis buffer (20 mM Tris pH 8.0, 137 mM NaCl, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 10% Glycerol, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 50 mM NaF, 1 mM $NaVO_4$ and protease inhibitors) and duplicate 10 μl were assayed using Dual-Glo™ luciferase assay kit (Promega, Part # TM058) and detected in an Envision Luminometer (Perkin Elmer). Luciferase activity was normalized against *Renilla* activity.

Cells to be treated with Wnt5a were transfected with Frz4 and Lrp5 in addition to the reporter. The presence of these additional components allows Wnt pathway activation by Wnt5a to proceed as per the canonical pathway. Mikels AJ, and Nusse R., *PLOS Biol.* 4:e115 (2006). Wnt3a activated cells were treated with 100ng/ml Wnt3a and Wnt5a activated cells were treated with 1ug/ml Wnt5a.

As shown in Figure 17A and B, the Frz-Fc antagonist inhibited Wnt signaling to varying degrees. Both Frz5-Fc and Frz8-Fc showed complete inhibition of the Wnt3a signal and significantly inhibited the Wnt5a signal. Frz4-Fc, Frz2-Fc, and Frz7-Fc showed significant inhibition of the Wnt3a signal.

Example 8

Relative IC50s of the Wnt Antagonists

The relative IC50s of the Wnt antagonists were determined by measuring inhibition of Wnt signaling by the Wnt antagonists in U2OS (human osteosarcoma) cells stably transfected with TOPglow luciferase TCF reporter plasmid as described in Example 7. Initial Wnt signaling in cells was obtained with Wnt3a activation. A 3-fold dilution series of Frz-Fcs was applied to cells overnight. (Figure 18). As determined by this assay, Wnt3a binds to Frz8-Fc, Frz5-Fc, and Frz4-Fc with sub-nanomolar IC50 (with Frz8-Fc having an IC50 of 0.04nM, Frz-5Fc having an IC50 of 0.20nM, and Frz-4 having an IC50 of 0.48 nM) and to Frz2-Fc and Frz7 –Fc with nanomolar IC50 (with Frz2-Fc having an IC50 of 1.2 nM and Frz2-Fc having an IC50 of 1.4 nM.

Example 9

Wnt target genes as pharmacodynamic markers of drug response.

As an alternative to immunohistochemical analysis of ß-catenin, transcriptional targets of Wnt were used to monitor inhibition of Wnt signaling activity. The cell lines that had autocrine Wnt signaling showed increased expression of known Wnt target genes and this expression was regulated by *in vitro* treatment with Wnt3a as well as by Frz8-Fc. RNA analysis of NTera-2 cells indicated that Frz8-Fc treatment affects expression of the Wnt target genes tested. Thus, the expression of these genes can be followed as an indicator of treatment efficacy. As an extension of these observations, expression of these Wnt target genes can be used as a diagnostic tool to identify cancers that are driven by Wnt signaling and are likely candidates for anti-Wnt therapeutic agents.

In vitro

In vitro comparative gene expression analysis on PA-1 cells treated with purified Wnt3a, Fz8 CRD-Fc, or a control protein was performed to determine the suitability of Wnt target genes to indicate *in vivo* inhibition of Wnt signaling in teratoma cells. RNA isolated from PA-1 cells that were treated with Wnt3a, Frz8-Fc, or control Fc protein was subject to microarray analysis and the change in expression levels of the indicated genes in response to exogenously added Wnt3a, Frz8-Fc, and control Fc protein was determined. For microarray analysis, cells were treated with the indicated proteins in triplicate and total RNA was isolated using the RNAeasy kit (Qiagen). Array analysis was done on the Affymetrix

Human Genome U133 Gene Chip set (Rubinfeld B, *et al.*, *Nat Biotechnol* 2006; 24:205–9). The specific probes and primer sets are shown in Figure 20.

The expression levels of previously identified targets of Wnt signaling such as Axin2, APCDD1, and Gad1 were up-regulated by Wnt3a treatment or down-regulated by Frz8-Fc treatment (Figure 19A). Moreover, some genes such as Lefty2 (A), Lefty1 (B), sFRP1, and Fzd5 were down-regulated by Wnt3a and up-regulated by inhibition of Wnt signaling with Frz8-Fc (Figure 19A). Subsequent gene expression analysis by qRT-PCR showed that these transcripts were similarly regulated by Wnt3a andFz8 CRD-Fc in NTera-2, Tera-2, and NCCIT cells as well.

In vivo

APCDD1, Gad1, and Fzd5 were among the most consistently modulated genes in above described *in vitro* analyses and were therefore selected as potential markers of Wnt responsiveness for *in vivo* tumor xenograft studies.

Tumor tissue RNA was purified from xenograft specimens collected at the end of the efficacy study and quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) analysis of Wnt-responsive transcripts carried out as previously described Rubinfeld B, *et al.*, *Nat Biotechnol* 2006; 24:205–9). Fold induction for each gene was determined using the ΔΔCt method and the result presented relative to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. The specific probes and primer sets are shown in Figure 20. All reactions were done in duplicate and the average of at least two assays ± SEM was plotted.

Similar to the effects seen *in vitro*, treatment with therapeutic doses of Frz8-Fc reduced the expression of genes for APCDD1 and Gad1 and increased the expression of Fzd5 in tumors from the NTera-2 xenografts (Figure 19B). Although there is a general nonspecific down-regulation of all genes following CD4hFc treatment, these changes were not statistically significant compared with those seen in Frz8-Fc -treated tumors. These observations show that the antitumorigenic effects of Frz8-Fc *in vivo* are on target genes and that the expression levels of these genes can be used to monitor the efficacy of potential anti-Wnt therapeutic agents.

Example 10

Inhibitory effect of Wnt antagonists on growth of tumors in mice with allografts and human xenografts

The studies set forth in this Example indicate that the Wnt antagonists are useful in treating Wnt expressing tumors. The largely complete tumor regression in the case of Wnt-1-MMTV model illustrate the effect of the Wnt antagonists on tumors that are strongly Wnt driven. However, the significant effect of the Wnt antagonist on the PA-1 and NTer2 tumors also reflects the strong therapeutic potential to treat tumors that may not be entirely Wnt driven.

Animals

Female C57Bl6 mice (The Jackson Laboratory) were used for the passaging of MMTV-Wnt1 tumors. Maintenance of mice and in vivo procedures were carried out using Institutional Animal Care and Use Committee–approved protocols.

MMTV-Wnt model -allografts

Figure 21 is a linear schematic describing the vector construct used in the transfection to create the Wnt animal model. This construct mimics the constitutive Wnt signaling activation observed with MMTA viral insertion, as described in Tsujomoto *et al., Cell* 55: 619-625 (1988) and Li *et al., Oncogene* 19: 1002-1009 (2000).

Passaging of MMTV-Wnt1 transgenic tumors in mice.

The tumors from MMTV-Wnt1 transgenic mice were serially passaged in C57Bl6 mice for 6 to 10 passages by surgical implantation in the mammary fat pad. Tumor tissue was aseptically collected from the transgenic mouse, rinsed in HBSS and cut into small pieces. The recipient mice were anaesthetized with a mixture of ketamine (75–80 mg/kg) and xylazine (7.5–15 mg/kg), the tumor fragment inserted under the skin rostral to the third mammary fat pad, and the skin closed using wound clips. Tumors were passaged for a maximum of 10 passages, and after the first two passages, tumor tissue was examined histologically to confirm that it was of mammary origin and continues to express Wnt. Mammary adenocarcinomas develop in 6-12 months in the mice. Tumors isolated from these mice were used to create the transplant models described below.

In vivo studies.

For *in vivo* studies testing the efficacy of Wnt antagonists in the MMTV-Wnt model, the tumor cells were introduced by subcutaneous injection of cells obtained from macerated tumors tissue. Tumor tissue was aseptically collected from mice transplanted with tumors from *Wnt* transgenic mice (described above), rinsed in PBS or HBSS, cut into smaller pieces and macerated into HBSS using a cell dissociation kit (Sigma). The cells were washed twice in sterile HBSS and suspended in a 50% matrigel solution in HBSS. The cell suspension was inoculated subcutaneously into the mammary fat pad of athymic nude mice, with a volume not exceeding 150 µl/mouse.

For *in vivo* studies using the NTera2 or PA-1 animals models, cells were grown as described and harvested when growth is in the logarithmic phase. The cells were suspended in a 50% matrigel solution in HBSS and inoculated subsutaneously into athymic nude mice at a concentration of either 8 million cells/mouse (NTera2) or 10 million cells/mouse (PA-1).

Tumors were monitored daily and measured after 7-12 days of inoculation. Animals were separated into groups with identical mean tumor volumes in the range of 150-250 mm^3. Treatment with the Wnt antagonist started 1-2 days after grouping and the mice were dosed intraperitoneally (IP) or intravenously (IV) with 100-200 µl of Wnt antagonist, negative control protein CD4-Fc, or PBS negative control once daily. Subsequent drug treatments were repeated 2-3 times weekly and continued for 3-4 weeks. Tumor volume was measured twice weekly the animals were sacrificed when the tumor volume reached 2500 mm^3. Blood was collected during the study by an orbital vein bleed and the serum assayed for levels of therapeutic agent by SDS-PAGE followed by immunoblot and detection using HRP or fluorescent conjugated anti-human Fc, and for activity of the therapeutic agent by its ability to inhibit Wnt3a activation of TOPglow activity as described in Example 7.

Allograft Tumors

Inhibitory effect of Wnt antagonists on growth of tumor allografts

Treatment with Frz8-Fc by either the i.p. or i.v. routed resulted in rapid tumor regression with sustained inhibition during the course of treatment, whereas the negative control protein CD4-Fc had no effect relative to the PBS treatment. The treated mice were monitored for three weeks after termination of treatment and regrowth of tumors was eventually observed.

Figure 22 illustrates the efficacy of Frz8-Fc against MMTV-*Wnt* tumor transplants in athymic nude mice by intraperitoneal (IP) dosing. Figure 22A is a graph showing that nude mice hosting MMTV-Wnt-1 tumor transplants were administered PBS, CD4-Fc (10 mg/kg/day) or Frz8-Fc (10 mg/kg/day) by intraperitoneal injection twice weekly. Each group had 11 mice and the average tumor volume for the group was 226 mm^3 before the start of treatments. Mean tumor volume is plotted over time and the treatment days are indicated by arrows on the X-axis. On day 25, the control groups were sacrificed and the drug administration to the treatment group stopped. Figure 22B is tabular summary of mean tumor volume and mean % change in tumor volume over time in the four treatment groups. Note that in Figure 22B, the mean tumor volume after treatment with Frz8-Fc antagonist results in a reduction in tumor volume from 226mm to about 219 mm^3 on the fifth day after start of treatment, and about 67 mm^3 on the 18th day. This represents a 4% and 70%, respectively, reduction in tumor size. In this study, tumors administered the Frz-Fc antagonist showed regression in tumor size compared with control animals. This demonstrates that Frz-Fc antagonists of the invention are tumoricidal as a single agent and are useful as anti-cancer therapeutics.

Figure 23 illustrates the efficacy of Frz8-Fc against MMTV-Wnt tumor transplant in athymic nude mice by intravenous (IV) dosing. Figure 23A is a graph showing that nude mice hosting MMTV-Wnt-1 tumor transplants were administered PBS, CD4-Fc (10 mg/kg/day) or Frz8-Fc (10 mg/kg/day) by intravenous injection three times weekly. Each group had 11 mice and the average tumor volume for the group was 226 mm^3 before the start of treatments. The fourth group (high bar) in this study included 10 mice with a mean tumor volume of 375 mm^3 at the start of the study that were treated with Frz8-Fc (10 mg/kg/day) by intravenous injection three times weekly. Mean tumor volume is plotted over time and the treatment days are indicated by arrows on the X-axis. On day 25, the control group animals were sacrificed and drug administration to the treatment group stopped. Figure 23B is a tabular summary of mean tumor volume and mean % change in tumor volume over time in the four treatment groups. Note that in all mice treated with Frz-Fc that the tumor burden was reduced from an average of 226 mm^3 to an average volume of 179 mm^3 on the 4th day after start of treatment, and to 73 mm^3 after the 18th day. This represents a 21% amd 67% reduction, respectively, in tumor volume. For the high bar group, tumor volume was reduced from an average of 376 mm^3 to 225 mm^3 on the 4th day of treatment, and to 53 mm^3 on the 18th day. This represents a 39% and 86% reduction, respectively, in tumor volume.

Inhibitory effect of serum obtained from treated mice on Wnt signaling

Inhibition of Wnt signaling from serum isolated from the treated mice is reported in Figure 24, with Figure 24A showing the results of serum isolated from IP treated mice, while the IV treated ones appear in Figure 24B. The data is presented as a bar graph showing the *Wnt* signaling antagonist activity in the TOPglow assay (as described in Example 7). The samples appear in groups according to treatment, mouse study number and dilution. The relative luciferase activity in the TOPglow gene reporter assay is shown on the Y-axis. All samples are treated with ~ 40 ng/ml purified *Wnt3a* except for NA (control). All other protein controls are present in the medium at 5 μg/ml.

Human xenograft tumors

Inhibition of naturally derived human tumor models by the Wnt antagonists would serve as a further indicator of their usefulness in treating human cancer. Human tumor–derived cell lines were tested for evidence of autocrine wnt signaling, similar to that seen in the PA-1 teratoma cell line, as an indication of usefulness in testing Wnt antagonist activity. The teratoma-derived NTera-2, Tera-2, and NCCIT cell lines exhibited basal Wnt signaling that could be inhibited by Frz8-Fc, in contrast with 293 cells that exhibited low basal signaling that was not inhibited by Frz8-Fc (Figure 25A). Nevertheless, all four teratoma cell lines seemed to express Wnt receptors, as signaling was further stimulated by Wnt3a treatment, which could be blocked by Frz8-Fc (Figure 25B). These results indicate that the teratoma cell lines express Wnt(s), which might contribute to their tumorigenicity. These lines were therefore evaluated for tumor formation in athymic nude mice and based on consistency of tumor formation, NTera-2 and PA-1 were selected for in vivo efficacy studies.

Inhibitory effect of Wnt antagonists on growth of NTera2 tumor xenografts

Treatment of mice exhibiting NTera2 tumor xenografts with the Wnt antagonist Frz8-Fc resulted in a reduction of tumor volume by approximately 50% and reduction tumor mass by approximately 70%, relative to the control mice.

Figure 26 shows the anti-tumor efficacy of Frz8-Fc treatment on the growth of NTera2 tumor xenografts in athymic nude mice. Athymic nude mice bearing NTera2 tumor xenografts were administered an initial dose of PBS, CD4-Fc and Frz8-Fc at 15 mg/kg/day, followed by subsequent doses of 10 mg/kg/day by intraperitoneal injection three times weekly. Each group had 20 mice and the average tumor volume for the group was 200 mm^3 before the start of treatments. The fourth group of the study included 10 mice with a mean tumor volume of 336 mm^3 at the start of the study that were treated with Frz8-Fc (10

mg/kg/day) by intraperitoneal injection three times weekly. Figure 26A is an exemplary procedural flow chart, while Figure 26B is a graph plotting mean tumor volume over time, wherein the treatment days are indicated by arrows on the X-axis. Figure 26C is a bar graph plotting the mean tumor weights at sacrifice of all animals in the group at day 20 of the study. Figures 26D and 26E are tabular summaries of mean tumor volume and mean % change in tumor volume, respectively.

Inhibitory effect of serum obtained from mice with NTera2 tumor xenografts on Wnt signaling

Figure 27 is a bar graph showing Wnt signaling antagonist activity in the TOPglow assay of the Frz8-Fc Wnt antagonist of serum isolated from various animals in the NTera2 tumor study. Relative luciferase activity (Y-axis) as measured from TOPglow assay from the controls and Frz8-Fc Wnt antagonist. No additional purified Wnt or Wnt conditioned media was added to the cells. These results demonstrate that reduced Wnt signaling is associated with reduction in tumor size in these mice treated with Frz8-Fc Wnt antagonist.

Inhibitory effect of Wnt antagonists on growth of PA-1 tumor xenografts

Treatment of mice exhibiting PA-1 tumor xenografts with the Wnt antagonist Frz8-Fc resulted in a significant reduction in tumor growth within 12 days of treatment. In this model, the tumors were approximately 50% smaller, with significantly smaller mass than tumors in the control mice at the end of the treatment period.

Figure 28 demonstrates the anti-tumor efficacy of Frz8-Fc treatment on the growth of PA-1 tumor xenografts in athymic nude mice. Athymic nude mice bearing PA-1 tumors xenografts were administered PBS, CD4-Fc or Frz-Fc at 15 mg/kg/day, followed by subsequent doses of 10 mg/kg/day by intraperitoneal injection three times weekly. Each group had 13 mice and the average tumor volume for the group was 168 mm^3 before the start of treatments. Figure 28A is an exemplary procedural flow chart, while Figure 28B is a graph plotting mean tumor volume over time, wherein the treatment days are indicated by arrows on the X-axis. Figure 28C is a graph of mean tumor weight at sacrifice. The mice were sacrificed on day 58 after cell inoculation (day 32 after start of treatments) and tumors were excised and weighed. The mean tumor weight ± SEM is plotted as a function of the group. Figures 28D and 28E are tabular summaries of mean tumor volume and mean % change in tumor volume, respectively.

Example 11

Wnt signaling in mice transplanted with MMTV tumors and treated with Frz8-Fc and Frz5-Fc *Wnt* antagonists

Effect of Frz8-Fc and Frz5-Fc Wnt antagonists on Wnt signaling

Frz5-Fz inhibits Wnt3a induced signaling as effectively as Frz8-Fc.

Athymic nude mice with MMTV tumors (approximately 400-800 cubic millimeters in size) were treated with Frz8-Fc, Frz5-Fz, or CD4-Fc, as a negative control, at 10mg/kg. Five hours after treatment, serum was collected by cardiac puncture from the mice and analyzed for Wnt inhibiting effect on 293 cells activated with Wnt3a and transfected with TOPglow as described in Example 7. All samples are treated with ~ 40 ng/ml purified Wnt3a except for NA (control). All other protein controls are present in the medium at 5 μg/ml. Figure 29 shows the level of inhibition in mice treated with Frz8-Fc or Frz5-Fz. Treatment with Frz8-Fc or Frz5-Fz resulted in similar levels of inhibition of Wnt 3a induced signaling.

Effect of Frz8-Fc and Frz5-Fc *Wnt* antagonists on Axin2 expression

Frz8-Fc and Frz5-Fz compounds inhibit *in vivo* Wnt signaling as determined by modulation of the Wnt target gene Axin2.

Athymic nude mice with MMTV tumors (approximately 400-800 cubic millimeters in size) were treated with Frz8-Fc, Frz5-Fz, or CD4-Fc, as a negative control, at 10mg/kg. Five hours after treatment, serum was collected by cardiac puncture from the mice. RNA was extracted from the tumor cells using the QIAGEN RNAEASY kit (Qiagen, Valencia, CA) and analyzed for expression of Axin2 as described in Example 9. Reduced levels of Axin2 was observed in samples obtained from mice treated with Frz8-Fc or Frz5-Fz indicating that these compounds are able to inhibit *in vivo* Wnt signaling. Figure 30 shows the reduced Axin2 expression in Frz8-Fc and Frz5-Fz treated tumor with Figure 30A showing expression normalized to expression of GAPDH and Figure 30B showing expression normalized to expression of rpl19.

Example 12

Regenerative Tissue treated with Wnt antagonist

Wnt signaling plays a critical role in self-renewal of regenerating tissue such as skin, intestine, and hematopoietic cells, and inhibition of Wnt signaling by Dkk1 can adversely affect the architecture of these tissues in adult mice. The following Example examines whether exposure to Frz8-Fc under the same conditions used to obtain antitumor efficacy had any effect on intestine and skin in the mice. Tissues were collected from mice that were treated in the MMTV-Wnt1 tumor model (described in Example 10) after 14 treatments, thrice a week, and sections were stained for ß-catenin protein by immunohistochemistry. Analysis of skin and various intestinal compartments revealed that the architecture of these tissues appeared morphologically normal in treated mice of all groups, with typical patterns of cytoplasmic and nuclear ß-catenin staining in intestinal Paneth cells (Figure 31A) and skin hair follicles (Figure 31B). Furthermore, histologic and immunohistochemical analysis of skin and intestine collected from animals using the NTera-2 model, after nine treatments, thrice a week also revealed no differences between control and treated groups. This suggests that treatment with Frz8-Fc with the therapeutic regimen that can inhibit tumor growth does not have adverse effects on tissue renewal of skin and intestine.

Example 13

This Example describes various methods of producing the Wnt antagonists.

Expression of Wnt Antagonist in *E. coli*

This example illustrates preparation of an unglycosylated form of Wnt antagonist by recombinant expression in *E. coli*.

The DNA sequence encoding Wnt antagonist is initially amplified using selected PCR primers. The primers should contain restriction enzyme sites which correspond to the restriction enzyme sites on the selected expression vector. A variety of expression vectors may be employed. An example of a suitable vector is pBR322 (derived from *E. coli*; see Bolivar *et al.*, Gene, 2:95 (1977)) which contains genes for ampicillin and tetracycline resistance. The vector is digested with restriction enzyme and dephosphorylated. The PCR amplified sequences are then ligated into the vector. The vector will preferably include sequences which encode for an antibiotic resistance gene, a trp promoter, a polyhis leader

(including the first six STII codons, polyhis sequence, and enterokinase cleavage site), the *Wnt* antagonist coding region, lambda transcriptional terminator, and an argU gene.

The ligation mixture is then used to transform a selected *E. coli* strain using the methods described in Sambrook *et al.*, supra. Transformants are identified by their ability to grow on LB plates and antibiotic resistant colonies are then selected. Plasmid DNA can be isolated and confirmed by restriction analysis and DNA sequencing.

Selected clones can be grown overnight in liquid culture medium such as LB broth supplemented with antibiotics. The overnight culture may subsequently be used to inoculate a larger scale culture. The cells are then grown to a desired optical density, during which the expression promoter is turned on.

After culturing the cells for several more hours, the cells can be harvested by centrifugation. The cell pellet obtained by the centrifugation can be solubilized using various agents known in the art, and the solubilized Wnt antagonist protein can then be purified using a metal chelating column under conditions that allow tight binding of the protein.

Wnt antagonist may be expressed in E. coli in a poly-His tagged form, using the following procedure. The DNA encoding Wnt antagonist is initially amplified using selected PCR primers. The primers will contain restriction enzyme sites which correspond to the restriction enzyme sites on the selected expression vector, and other useful sequences providing for efficient and reliable translation initiation, rapid purification on a metal chelation column, and proteolytic removal with enterokinase. The PCR-amplified, poly-His tagged sequences are then ligated into an expression vector, which is used to transform an *E. coli* host based on strain 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq). Transformants are first grown in LB containing 50 mg/ml carbenicillin at 30°C with shaking until an O.D.600 of 3-5 is reached. Cultures are then diluted 50-100 fold into CRAP media (prepared by mixing 3.57 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.71 g sodium citrate•2H2O, 1.07 g KCl, 5.36 g Difco yeast extract, 5.36 g Sheffield hycase SF in 500 mL water, as well as 110 mM MPOS, pH 7.3, 0.55% (w/v) glucose and 7 mM $MgSO_4$) and grown for approximately 20-30 hours at 30°C with shaking. Samples are removed to verify expression by SDS-PAGE analysis, and the bulk culture is centrifuged to pellet the cells. Cell pellets are frozen until purification and refolding.

E. coli paste from 0.5 to 1 L fermentations (6-10 g pellets) is resuspended in 10 volumes (w/v) in 7 M guanidine, 20 mM Tris, pH 8 buffer. Solid sodium sulfite and sodium

tetrathionate is added to make final concentrations of 0.1M and 0.02 M, respectively, and the solution is stirred overnight at 4°C. This step results in a denatured protein with all cysteine residues blocked by sulfitolization. The solution is centrifuged at 40,000 rpm in a Beckman Ultracentifuge for 30 min. The supernatant is diluted with 3-5 volumes of metal chelate column buffer (6 M guanidine, 20 mM Tris, pH 7.4) and filtered through 0.22 micron filters to clarify. The clarified extract is loaded onto a 5 ml Qiagen Ni-NTA metal chelate column equilibrated in the metal chelate column buffer. The column is washed with additional buffer containing 50 mM imidazole (Calbiochem, Utrol grade), pH 7.4. The protein is eluted with buffer containing 250 mM imidazole. Fractions containing the desired protein are pooled and stored at 4°C. Protein concentration is estimated by its absorbance at 280 nm using the calculated extinction coefficient based on its amino acid sequence.

The proteins are refolded by diluting the sample slowly into freshly prepared refolding buffer consisting of: 20 mM Tris, pH 8.6, 0.3 M NaCl, 2.5 M urea, 5 mM cysteine, 20 mM glycine and 1 mM EDTA. Refolding volumes are chosen so that the final protein concentration is between 50 to 100 micrograms/ml. The refolding solution is stirred gently at 4°C for 12-36 hours. The refolding reaction is quenched by the addition of TFA to a final concentration of 0.4% (pH of approximately 3). Before further purification of the protein, the solution is filtered through a 0.22 micron filter and acetonitrile is added to 2-10% final concentration. The refolded protein is chromatographed on a Poros R1/H reversed phase column using a mobile buffer of 0.1% TFA with elution with a gradient of acetonitrile from 10 to 80%. Aliquots of fractions with A280 absorbance are analyzed on SDS polyacrylamide gels and fractions containing homogeneous refolded protein are pooled. Generally, the properly refolded species of most proteins are eluted at the lowest concentrations of acetonitrile since those species are the most compact with their hydrophobic interiors shielded from interaction with the reversed phase resin. Aggregated species are usually eluted at higher acetonitrile concentrations. In addition to resolving misfolded forms of proteins from the desired form, the reversed phase step also removes endotoxin from the samples.

Fractions containing the desired folded *Wnt* antagonist polypeptide are pooled and the acetonitrile removed using a gentle stream of nitrogen directed at the solution. Proteins are formulated into 20 mM Hepes, pH 6.8 with 0.14 M sodium chloride and 4% mannitol by dialysis or by gel filtration using G25 Superfine (Pharmacia) resins equilibrated in the formulation buffer and sterile filtered.

Expression of Wnt Antagonist in mammalian cells

This example illustrates preparation of a potentially glycosylated form of *Wnt* antagonist by recombinant expression in mammalian cells.

The vector, pRK5 (see EP 307,247, published March 15, 1989), is employed as the expression vector. Optionally, the *Wnt* antagonist DNA is ligated into pRK5 with selected restriction enzymes to allow insertion of the *Wnt* antagonist DNA using ligation methods such as described in Sambrook *et al.*, supra. For purposes of this example, the resulting vector is referred to as pRK5-WA.

In one embodiment, the selected host cells may be 293 cells. Human 293 cells (ATCC CCL 1573) are grown to confluence in tissue culture plates in medium such as DMEM supplemented with fetal calf serum and optionally, nutrient components and/or antibiotics. About 10 μg pRK5-WA DNA is mixed with about 1 μg DNA encoding the VA RNA gene [Thimmappaya *et al.*, Cell, 31:543 (1982)] and dissolved in 500 μl of 1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.227 M $CaCl_2$. To this mixture is added, dropwise, 500 μl of 50 mM HEPES (pH 7.35), 280 mM NaCl, 1.5 mM $NaPO_4$, and a precipitate is allowed to form for 10 minutes at 25°C. The precipitate is suspended and added to the 293 cells and allowed to settle for about four hours at 37°C. The culture medium is aspirated off and 2 ml of 20% glycerol in PBS is added for 30 seconds. The 293 cells are then washed with serum free medium, fresh medium is added and the cells are incubated for about 5 days.

Approximately 24 hours after the transfections, the culture medium is removed and replaced with culture medium (alone) or culture medium containing 200 μCi/ml ^{35}S-cysteine and 200 μCi/ml ^{35}S-methionine. After a 12 hour incubation, the conditioned medium is collected, concentrated on a spin filter, and loaded onto a 15% SDS gel. The processed gel may be dried and exposed to film for a selected period of time to reveal the presence of *Wnt* antagonist polypeptide. The cultures containing transfected cells may undergo further incubation (in serum free medium) and the medium is tested in selected bioassays.

In an alternative technique, *Wnt* antagonist may be introduced into 293 cells transiently using the dextran sulfate method described by Somparyrac *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981). 293 cells are grown to maximal density in a spinner flask and 700 μg pRK5-WA DNA is added. The cells are first concentrated from the spinner flask by centrifugation and washed with PBS. The DNA-dextran precipitate is incubated on the cell pellet for four hours. The cells are treated with 20% glycerol for 90 seconds, washed with tissue culture medium, and re-introduced into the spinner flask containing tissue culture

medium, 5 μg/ml bovine insulin and 0.1 μg/ml bovine transferrin. After about four days, the conditioned media is centrifuged and filtered to remove cells and debris. The sample containing expressed *Wnt* antagonist can then be concentrated and purified by any selected method, such as dialysis and/or column chromatography.

In another embodiment, *Wnt* antagonist can be expressed in CHO cells. The pRK5-WA can be transfected into CHO cells using known reagents such as $CaPO_4$ or DEAE-dextran. As described above, the cell cultures can be incubated, and the medium replaced with culture medium (alone) or medium containing a radiolabel such as ^{35}S-methionine. After determining the presence of *Wnt* antagonist polypeptide, the culture medium may be replaced with serum free medium. Preferably, the cultures are incubated for about 6 days, and then the conditioned medium is harvested. The medium containing the expressed *Wnt* antagonist can then be concentrated and purified by any selected method.

Epitope-tagged *Wnt* antagonist may also be expressed in host CHO cells. The *Wnt* antagonist may be subcloned out of the pRK5 vector. The subclone insert can undergo PCR to fuse in frame with a selected epitope tag such as a poly-his tag into a Baculovirus expression vector. The poly-his tagged *Wnt* antagonist insert can then be subcloned into a SV40 driven vector containing a selection marker such as DHFR for selection of stable clones. Finally, the CHO cells can be transfected (as described above) with the SV40 driven vector. Labeling may be performed, as described above, to verify expression. The culture medium containing the expressed poly-His tagged *Wnt* antagonist can then be concentrated and purified by any selected method, such as by Ni^{2+}-chelate affinity chromatography.

Wnt antagonist may also be expressed in CHO and/or COS cells by a transient expression procedure or in CHO cells by another stable expression procedure.

Stable expression in CHO cells is performed using the following procedure. The proteins are expressed as an IgG construct (immunoadhesin), in which the coding sequences for the soluble forms (*e.g.* extracellular domains) of the respective proteins are fused to an IgG1 constant region sequence containing the hinge, CH2 and CH2 domains and/or is a poly-His tagged form.

Following PCR amplification, the respective DNAs are subcloned in a CHO expression vector using standard techniques as described in Ausubel *et al.*, Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997). CHO expression vectors are constructed to have compatible restriction sites 5' and 3' of the DNA of interest to allow the convenient shuttling of cDNA's. The vector used expression in CHO cells is as described in

Lucas *et al.*, Nucl. Acids Res. 24:9 (1774-1779 (1996), and uses the SV40 early promoter/enhancer to drive expression of the cDNA of interest and dihydrofolate reductase (DHFR). DHFR expression permits selection for stable maintenance of the plasmid following transfection.

Twelve micrograms of the desired plasmid DNA is introduced into approximately 10 million CHO cells using commercially available transfection reagents SUPERFECTt® (Quiagen), DOSPER® or FUGENE® (Boehringer Mannheim). The cells are grown as described in Lucas *et al.*, supra. Approximately 3 x 10^7 cells are frozen in an ampule for further growth and production as described below.

The ampules containing the plasmid DNA are thawed by placement into water bath and mixed by vortexing. The contents are pipetted into a centrifuge tube containing 10 mLs of media and centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes. The supernatant is aspirated and the cells are resuspended in 10 mL of selective media (0.2 μm filtered PS20 with 5% 0.2 μm diafiltered fetal bovine serum). The cells are then aliquoted into a 100 mL spinner containing 90 mL of selective media. After 1-2 days, the cells are transferred into a 250 mL spinner filled with 150 mL selective growth medium and incubated at 37°C. After another 2-3 days, 250 mL, 500 mL and 2000 mL spinners are seeded with 3 x 10^5 cells/mL. The cell media is exchanged with fresh media by centrifugation and resuspension in production medium. Although any suitable CHO media may be employed, a production medium described in U.S. Patent No. 5,122,469, issued June 16, 1992 may actually be used. A 3L production spinner is seeded at 1.2 x 10^6 cells/mL. On day 0, the cell number pH is determined. On day 1, the spinner is sampled and sparging with filtered air is commenced. On day 2, the spinner is sampled, the temperature shifted to 33°C, and 30 mL of 500 g/L glucose and 0.6 mL of 10% antifoam (*e.g.*, 35% polydimethylsiloxane emulsion, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion) taken. Throughout the production, the pH is adjusted as necessary to keep it at around 7.2. After 10 days, or until the viability dropped below 70%, the cell culture is harvested by centrifugation and filtering through a 0.22 μm filter. The filtrate was either stored at 4°C or immediately loaded onto columns for purification.

For the poly-His tagged constructs, the proteins are purified using a Ni-NTA column (Qiagen). Before purification, imidazole is added to the conditioned media to a concentration of 5 mM. The conditioned media is pumped onto a 6 ml Ni-NTA column equilibrated in 20 mM Hepes, pH 7.4, buffer containing 0.3 M NaCl and 5 mM imidazole at

a flow rate of 4-5 ml/min. at 4°C. After loading, the column is washed with additional equilibration buffer and the protein eluted with equilibration buffer containing 0.25 M imidazole. The highly purified protein is subsequently desalted into a storage buffer containing 10 mM Hepes, 0.14 M NaCl and 4% mannitol, pH 6.8, with a 25 ml G25 Superfine (Pharmacia) column and stored at -80°C.

Immunoadhesin (Fc-containing) constructs are purified from the conditioned media as follows. The conditioned medium is pumped onto a 5 ml Protein A column (Pharmacia) which had been equilibrated in 20 mM Na phosphate buffer, pH 6.8. After loading, the column is washed extensively with equilibration buffer before elution with 100 mM citric acid, pH 3.5. The eluted protein is immediately neutralized by collecting 1 ml fractions into tubes containing 275 μL of 1 M Tris buffer, pH 9. The highly purified protein is subsequently desalted into storage buffer as described above for the poly-His tagged proteins. The homogeneity is assessed by SDS polyacrylamide gels and by N-terminal amino acid sequencing by Edman degradation.

Expression of Wnt Antagonist in Yeast

The following method describes recombinant expression of *Wnt* antagonist in yeast.

First, yeast expression vectors are constructed for intracellular production or secretion of *Wnt* antagonist from the ADH2/GAPDH promoter. DNA encoding *Wnt* antagonist and the promoter is inserted into suitable restriction enzyme sites in the selected plasmid to direct intracellular expression of *Wnt* antagonist. For secretion, DNA encoding *Wnt* antagonist can be cloned into the selected plasmid, together with DNA encoding the ADH2/GAPDH promoter, a native *Wnt* antagonist signal peptide or other mammalian signal peptide, or, for example, a yeast alpha-factor or invertase secretory signal/leader sequence, and linker sequences (if needed) for expression of *Wnt* antagonist.

Yeast cells, such as yeast strain AB110, can then be transformed with the expression plasmids described above and cultured in selected fermentation media. The transformed yeast supernatants can be analyzed by precipitation with 10% trichloroacetic acid and separation by SDS-PAGE, followed by staining of the gels with Coomassie Blue stain.

Recombinant *Wnt* antagonist can subsequently be isolated and purified by removing the yeast cells from the fermentation medium by centrifugation and then concentrating the medium using selected cartridge filters. The concentrate containing *Wnt* antagonist may further be purified using selected column chromatography resins.

Expression of Wnt Antagonist in Baculovirus-Infected Insect Cells

The following method describes recombinant expression of *Wnt* antagonist in Baculovirus-infected insect cells.

The sequence coding for *Wnt* antagonist is fused upstream of an epitope tag contained within a baculovirus expression vector. Such epitope tags include poly-his tags and immunoglobulin tags (like Fc regions of IgG). A variety of plasmids may be employed, including plasmids derived from commercially available plasmids such as pVL1393 (Novagen). Briefly, the sequence encoding *Wnt* antagonist or the desired portion of the coding sequence of *Wnt* antagonist such as the sequence encoding an extracellular domain of a transmembrane protein or the sequence encoding the mature protein if the protein is extracellular is amplified by PCR with primers complementary to the 5' and 3' regions. The 5' primer may incorporate flanking (selected) restriction enzyme sites. The product is then digested with those selected restriction enzymes and subcloned into the expression vector.

Recombinant baculovirus is generated by co-transfecting the above plasmid and BACULOGOLD™ virus DNA (Pharmingen) into *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") cells (ATCC CRL 1711) using lipofectin (commercially available from GIBCO-BRL). After 4 - 5 days of incubation at 28°C, the released viruses are harvested and used for further amplifications. Viral infection and protein expression are performed as described by O'Reilley *et al.*, Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

Expressed poly-his tagged *Wnt* antagonist can then be purified, for example, by Ni^{2+}-chelate affinity chromatography as follows. Extracts are prepared from recombinant virus-infected Sf9 cells as described by Rupert *et al.*, Nature, 362:175-179 (1993). Briefly, Sf9 cells are washed, resuspended in sonication buffer (25 mL Hepes, pH 7.9; 12.5 mM $MgCl_2$; 0.1 mM EDTA; 10% glycerol; 0.1% NP-40; 0.4 M KCl), and sonicated twice for 20 seconds on ice. The sonicates are cleared by centrifugation, and the supernatant is diluted 50-fold in loading buffer (50 mM phosphate, 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH 7.8) and filtered through a 0.45 μm filter. A Ni^{2+}-NTA agarose column (commercially available from Qiagen) is prepared with a bed volume of 5 mL, washed with 25 mL of water and equilibrated with 25 mL of loading buffer. The filtered cell extract is loaded onto the column at 0.5 mL per minute. The column is washed to baseline A_{280} with loading buffer, at which point fraction collection is started. Next, the column is washed with a secondary wash buffer (50 mM phosphate; 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH 6.0), which elutes

nonspecifically bound protein. After reaching A_{280} baseline again, the column is developed with a 0 to 500 mM Imidazole gradient in the secondary wash buffer. One mL fractions are collected and analyzed by SDS-PAGE and silver staining or Western blot with Ni^{2+}-NTA-conjugated to alkaline phosphatase (Qiagen). Fractions containing the eluted His_{10}-tagged *Wnt* antagonist are pooled and dialyzed against loading buffer.

Alternatively, purification of the IgG tagged (or Fc tagged) Wnt antagonist can be performed using known chromatography techniques, including for instance, Protein A or protein G column chromatography.

Purification of Wnt Antagonist Polypeptides Using Affinity Chromatography

Native or recombinant Wnt Antagonist polypeptides may be purified by a variety of standard techniques in the art of protein purification. For example, pro-, mature, or pre-Wnt antagonist polypeptide is purified by immunoaffinity chromatography using antibodies specific for the Wnt antagonist polypeptide of interest. In general, an immunoaffinity column is constructed by covalently coupling the Wnt antagonist polypeptide to an activated chromatographic resin. Alternatively, Wnt antagonist which contain an Fc domain may be purified directly from media using a immobilized protein A resin such as ProSepA (Millipore).

Polyclonal immunoglobulins are prepared from immune sera either by precipitation with ammonium sulfate or by purification on immobilized Protein A (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Likewise, monoclonal antibodies are prepared from mouse ascites fluid by ammonium sulfate precipitation or chromatography on immobilized Protein A. Partially purified immunoglobulin is covalently attached to a chromatographic resin such as CnBr-activated SEPHAROSE™ (Pharmacia LKB Biotechnology). The antibody is coupled to the resin, the resin is blocked, and the derivative resin is washed according to the manufacturer's instructions.

Such an immunoaffinity column may be utilized in the purification of Wnt antagonist polypeptide by preparing a fraction from cells containing Wnt antagonist in a soluble form. This preparation is derived by solubilization of the whole cell or of a subcellular fraction obtained via differential centrifugation by the addition of detergent or by other methods well known in the art. Alternatively, soluble Wnt antagonist polypeptide containing a signal sequence may be secreted in useful quantity into the medium in which the cells are grown.

A soluble Wnt antagonist polypeptide-containing preparation is passed over the immunoaffinity column, and the column is washed under conditions that allow the preferential absorbance of Wnt antagonist polypeptide (e.g., high ionic strength buffers in the presence of detergent). Then, the column is eluted under conditions that disrupt antibody/Wnt antagonist binding (e.g., a low pH buffer such as approximately pH 2-3, or a high concentration of a chaotrope such as urea or thiocyanate ion), and Wnt antagonist polypeptide is collected.

Bibliography

1. He TC, Sparks AB, Rago C, *et al.* Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; **281**: 1509-1512.

2. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; **398**: 422-426

3. He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW. PPAR delta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Cell 1999; **99**: 335-345.

4. Koh TJ, Bulitta CJ, Fleming JV, Dockray GJ, Varro A, Wang TC. Gastrin is a target of the beta-catenin/TCF-4 growth-signaling pathway in a model of intestinal polyposis. *J Clin Invest* 2000; **106**: 533-539.

5. Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, *et al.* Loss of Apc *in vivo* immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* 2004; **18**: 1385-1390.

6. Chen TA, Yang I, Irby R, *et al.* Regulation of caspase expression and apoptosis by adenomatous polyposis coli. *Cancer Res* 2003; **63**: 4368-4374.

7. Paoni NF, Feldman MW, Gutierrez LS, Ploplis VA, Castellino FJ. Transcriptional profiling of the transition from normal intestinal epithelia to adenomas and carcinomas in the APC(Min/+) mouse. *Physiol Genomics* 2003; **15**: 228-235.

8. Zhang T, Otevrel T, Gao ZQ, *et al.* Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res* 2001; **61**: 8664-8667.

9. Howe LR, Subbaramaiah K, Chung WJ, Dannenberg AJ, Brown AMC. Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in Wnt-1-transformed mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1999; **59**: 1572-1577.

10. Mann B, Gelos M, Siedow A, *et al.* Target genes of beta-catenin-T cell-factor lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 1603-1608

11. Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y, Furukawa Y. Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol Res* 2001; **12**: 469-476.

12. Wielenga VJM, Smits R, Korinek V, *et al.* Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol* 1999; **154**: 515-523

13. Boon EMJ, van der Neut R, van de Wetering M, Clevers H, Pals ST. Wnt signaling regulates expression of the receptor tyrosine kinase Met in colorectal cancer. *Cancer Res* 2002; **62**: 5126-5128.

14. Kim JS, Crooks H, Dracheva T, *et al.* Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells. *Cancer Res* 2002; **62**: 2744-2748.

15. Leow CC, Romero MS, Ross S, Polakis P, Gao WQ. Hath1, down-regulated in colon adenocarcinomas, inhibits proliferation and tumorigenesis of colon cancer cells. *Cancer Res* 2004; **64**: 6050-6057.

16. Batlle E, Henderson JT, Beghtel H, *et al.* Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/EphrinB. *Cell* 2002; **111**: 251-263.

17. Blache P, van de Wetering M, Duluc I, *et al.* SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J Cell Biol* 2004; **166**: 37-47.

18. Zhang XB, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res* 2001; **61**: 6050-6054.

19. DeAlmeida, VL., Miao L, Ernst JA, Koeppen H., Polakis P., Rubinfeld, B, The soluble Wnt receptor Frizzled8CRD-hFc inhibits the growth of teratocarcinomas in vivo, *Cancer Res* 2007; **67**: 5371-5379.

CLAIMS

1. A Wnt antagonist comprising:

(a) a Frizzled domain component, and

(b) a Fc domain,

wherein the Frizzled domain component comprises a polypeptide derived from a protein selected from the group consisting of (i) a Frizzled (Frz) protein, (ii) a secreted Frizzled Related Protein (sFRP) protein, and (iii) a Ror protein, and

further wherein the Wnt antagonist is active *in vivo* for at least 1 hour.

2. The Wnt antagonist of Claim 1, wherein the Wnt antagonist is active *in vivo* for at least 5 hours.

3. A Wnt antagonist comprising:

(a) a Frizzled domain component, and

(b) a Fc domain,

wherein the Frizzled domain component comprises a polypeptide derived from a protein selected from the group consisting of (i) a Frizzled (Frz) protein, (ii) a secreted Frizzled Related Protein (sFRP) protein, and (iii) a Ror protein, and

further wherein the Wnt antagonist has an *in vivo* half-life of at least 1 day.

4. The Wnt antagonist of Claim 3, wherein the Wnt antagonist has an *in vivo* half-life of at least 2 days.

5. The Wnt antagonist of any of Claims 1-4, wherein the Frizzled domain component comprises a minimal CRD (ECD) domain from a Frz polypeptide selected from the group consisting of hFrz1 (SEQ ID NO: 18), hFrz2 (SEQ ID NO: 19), hFrz3 (SEQ ID NO: 20), hFrz4 (SEQ ID NO: 21), hFrz5 (SEQ ID NO: 22), hFrz6 (SEQ ID NO: 23), hFrz7 (SEQ ID NO: 24), hFrz8 (SEQ ID NO: 25), hFrz9 (SEQ ID NO: 26), and hFrz10 (SEQ ID NO: 27), and active variants thereof.

6. The Wnt antagonist of any of Claims 1-4, wherein the Frizzled domain component comprises a minimal CRD (ECD) domain from a sFRP polypeptide selected from the group

consisting of sFRP1 (SEQ ID NO: 28), sFRP2 (SEQ ID NO: 29), sFRP3 (SEQ ID NO: 30), sFRP4 (SEQ ID NO: 31), and sFRP5 (SEQ ID NO: 32), and active variants thereof.

7. The Wnt antagonist of any of Claims 1-4, wherein the Frizzled domain component comprises a minimal CRD (ECD) domain from a Ror polypeptide selected from the group consisting of hRor1 (SEQ ID NO: 33), and hRor2 (SEQ ID NO: 34), and active variants thereof.

8. The Wnt antagonist of any of Claims 1-4, wherein the Frizzled domain component comprises a mature Frz polypeptide selected from the group consisting of hFrz1 (SEQ ID NO: 50), hFrz2 (SEQ ID NO: 51), hFrz3 (SEQ ID NO: 52), hFrz4 (SEQ ID NO: 53), hFrz5 (SEQ ID NO: 54), hFrz6 (SEQ ID NO: 55), hFrz7 (SEQ ID NO: 56), hFrz8 (SEQ ID NO: 57), hFrz9 (SEQ ID NO: 58), and hFrz10 (SEQ ID NO: 59), and active variants thereof.

9. The Wnt antagonist of any of Claims 1-4, wherein the Frizzled domain component comprises a mature sFrp polypeptide selected from the group consisting of sFRP1 (SEQ ID NO: 60), sFRP2 (SEQ ID NO: 61), sFRP3 (SEQ ID NO: 62), sFRP4 (SEQ ID NO: 63), and sFRP5 (SEQ ID NO: 64), and active variants thereof.

10. The Wnt antagonist of any of Claims 1-4, wherein the Frizzled domain component comprises a mature Ror polypeptide selected from the group consisting of hRor1 (SEQ ID NO: 65), and hRor2 (SEQ ID NO: 66), and active variants thereof.

11. The Wnt antagonist of any of Claims 1-4, wherein the Frizzled domain component comprises a pro-Frz polypeptide selected from the group consisting of hFrz1 (SEQ ID NO: 35), hFrz2 (SEQ ID NO: 36), hFrz3 (SEQ ID NO: 37), hFrz4 (SEQ ID NO: 38), hFrz5 (SEQ ID NO: 39), hFrz6 (SEQ ID NO: 40), hFrz7 (SEQ ID NO: 41), hFrz8 (SEQ ID NO: 42), hFrz9 (SEQ ID NO: 43), and hFrz10 (SEQ ID NO: 44), and active variants thereof.

12. The Wnt antagonist of any of Claims 1-4, wherein the Frizzled domain component comprises a pro-sFrp polypeptide selected from the group consisting of sFRP1 (SEQ ID NO: 45), sFRP2 (SEQ ID NO: 46), sFRP3 (SEQ ID NO: 47), sFRP4 (SEQ ID NO: 48), and sFRP5 (SEQ ID NO: 49), and active variants thereof.

13. The Wnt antagonist of any of Claims 1-12, wherein the Fc component is derived from an immunoglobulin selected from the group consisting of IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4.

14. The Wnt antagonist of Claim 13, wherein the Fc is derived from an IgG1 immunoglobulin.

15. The Wnt antagonist of Claim 14, wherein the Fc comprises the Fc sequence shown in SEQ ID NO: 67 or SEQ ID NO: 68.

16. The Wnt antagonist of any of Claims 1-15, further comprising a linker connecting the Frizzled domain component to the Fc domain.

17. The Wnt antagonist of Claim 16, wherein the linker comprises a peptide selected from the group consisting of ESGGGGVT (SEQ ID NO: 69), LESGGGGVT (SEQ ID NO: 70), GRAQVT (SEQ ID NO: 71), WRAQVT (SEQ ID NO: 72), and ARGRAQVT (SEQ ID NO: 73).

18. A Wnt antagonist comprising a polypeptide selected from the group consisting of Frz8-Fc (SEQ ID NO: 74), Frz5-Fc (SEQ ID NO: 75), Frz1-Fc (SEQ ID NO: 76), Frz2-Fc (SEQ ID NO: 77), Frz3-Fc (SEQ ID NO: 78), Frz4-Fc (SEQ ID NO: 79), Frz6-Fc (SEQ ID NO: 80), Frz7-Fc (SEQ ID NO: 81), Frz9-Fc (SEQ ID NO: 82), Frz10-Fc (SEQ ID NO: 83), sFRP1-Fc (SEQ ID NO: 84), sFRP2 (SEQ ID NO: 85), sFRP3-Fc (SEQ ID NO: 86), sFRP4-Fc (SEQ ID NO: 87), and sFRP5-Fc (SEQ ID NO: 88).

19. A composition comprising at least one pharmaceutically acceptable carrier or excipient and any of the Wnt antagonists of Claims 1-18.

20. A nucleic acid sequence encoding any of the Wnt antagonists of Claims 1-18.

21. The nucleic acid of Claim 20 further comprising a vector containing control sequences to which the nucleic acid is operably linked.

22. The vector of Claim 21 further comprising a host cell.

23. The host cell of Claim 22 which is selected from the group consisting of a mammalian, insect, *E. coli* and yeast cell.

24. An article of manufacture comprising the composition of Claim 19 and a container, wherein the Wnt antagonist is contained within the container and the container further comprises (a) a label affixed to the container, or (b) a package insert inside the container referring to the use of the Wnt antagonist indicating use of the composition for the therapeutic treatment or diagnostic detection of a Wnt-mediated disorder.

25. A method of inhibiting Wnt signaling in a cell comprising contacting the cell with an effective amount of the any of the Wnt antagonists of Claims 1-18.

26. The method of Claim 25, wherein the cell is contained within a mammal and the amount administered is a therapeutically effective amount.

27. The method of Claim 25, wherein the Wnt signaling results from activation of a Wnt signaling component through somatic mutation.

28. The method of Claim 25, wherein the inhibition of Wnt signaling results in the inhibition of growth of the cell.

29. The method of Claim 28, wherein the cell is a cancer cell.

30. A method of treating a Wnt-mediated disorder in a mammal suffering therefrom, comprising administering to the mammal a therapeutically effective amount of a Wnt antagonist according to any of Claims 1-18.

31. The method of Claim 30, wherein the disorder is a cell proliferative disorder associated with aberrant Wnt signaling activity.

32. The method of Claim 31, wherein the aberrant Wnt signaling activity results from increased expression of a Wnt protein.

33. The method of Claim 31, wherein the cell proliferative disorder is cancer.

34. The method of Claim 33, wherein the cancer is selected from the group consisting of colon cancer, colorectal cancer, breast cancer, leukemia, gliomas, and medulloblastomas.

35. A method for detecting the presence of a Wnt protein, comprising contacting the sample with a Wnt antagonist according to any of Claims 1-18, wherein (a) the presence of a complex, or (b) the binding level between the Fz/Fc antagonist and Wnt protein is indicative of the presence of a Wnt protein and/or signaling.

36. The method of Claim 35, wherein the method further comprises determining if the level of Wnt signaling is aberrant, the method further comprising comparing the level of binding in the sample to the level in a second sample known to have physiologically normal *Wnt* signaling, wherein a level of binding in the sample that is higher or lower than that of the second sample is indicative of aberrant *Wnt* signaling.

37. The method of Claim 36, wherein the aberrant Wnt signaling is further indicative of the presence of a Wnt-mediated disorder.

38. The method of Claim 37, wherein the Wnt-mediated disorder is cancer.

39. A method of modulating the expression of a Wnt target gene in a cell characterized by activated or excessive Wnt signaling, comprising contact the cell with an effective amount of a Wnt antagonist of any of Claims 1-18.

40. A method of therapeutically treating a Wnt-mediated cancer, comprising administering a therapeutically effective amount of a Wnt antagonist of any of Claims 1-18, wherein the administration of the antagonist arrests any subsequent increase in size or advancement in severity of the cancer.

41. The method of Claim 40, wherein the administration of the Wnt antagonist results in the reduction in size or severity of the cancer.

42. The method of Claim 40, wherein the administration of the Wnt antagonist reduces the tumor burden of the cancer.

43. The method of Claim 40, wherein the administration of the Wnt antagonist kills the cancer.

44. Use of a Wnt antagonist in the manufacture of a medicament for the treatment of a cell proliferative disorder, the Wnt antagonist comprising:

(a) a Frizzled domain component, and

(b) a Fc domain,

wherein the Frizzled domain component comprises a polypeptide derived from a protein selected from the group consisting of (i) a Frizzled (Frz) protein, (ii) a secreted Frizzled Related Protein (sFRP) protein, and (iii) a Ror protein, and

further wherein the Wnt antagonist is active *in vivo* for at least 1 hour.

45. The use of Claim 44, wherein the Wnt antagonist is active *in vivo* for at least 5 hours.

46. Use of a Wnt antagonist in the manufacture of a medicament for the treatment of a cell proliferative disorder, the Wnt antagonist comprising:

(a) a Frizzled domain component, and

(b) a Fc domain,

wherein the Frizzled domain component comprises a polypeptide derived from a protein selected from the group consisting of (i) a Frizzled (Frz) protein, (ii) a secreted Frizzled Related Protein (sFRP) protein, and (iii) a Ror protein, and

further wherein the Wnt antagonist has an *in vivo* half-life of at least 1 day.

47. The use of Claim 46, wherein the Wnt antagonist has an *in vivo* half-life of at least 2 days.

48. The use of any of Claims 44-47 further comprising a linker connecting the Frizzled domain component to the Fc domain.

49. The use of Claim 48, wherein the linker is peptide selected from the group consisting of ESGGGGVT (SEQ ID NO: 69), LESGGGGVT (SEQ ID NO: 70), GRAQVT (SEQ ID NO: 71), WRAQVT (SEQ ID NO: 72), and ARGRAQVT (SEQ ID NO: 73).

50. The use of any of Claims 44-49, wherein the cell proliferative disorder is cancer.

51. The use of Claim 50, wherein the cancer is selected from the group consisting of colon cancer, colorectal cancer, breast cancer, leukemia, gliomas, and medulloblastomas.

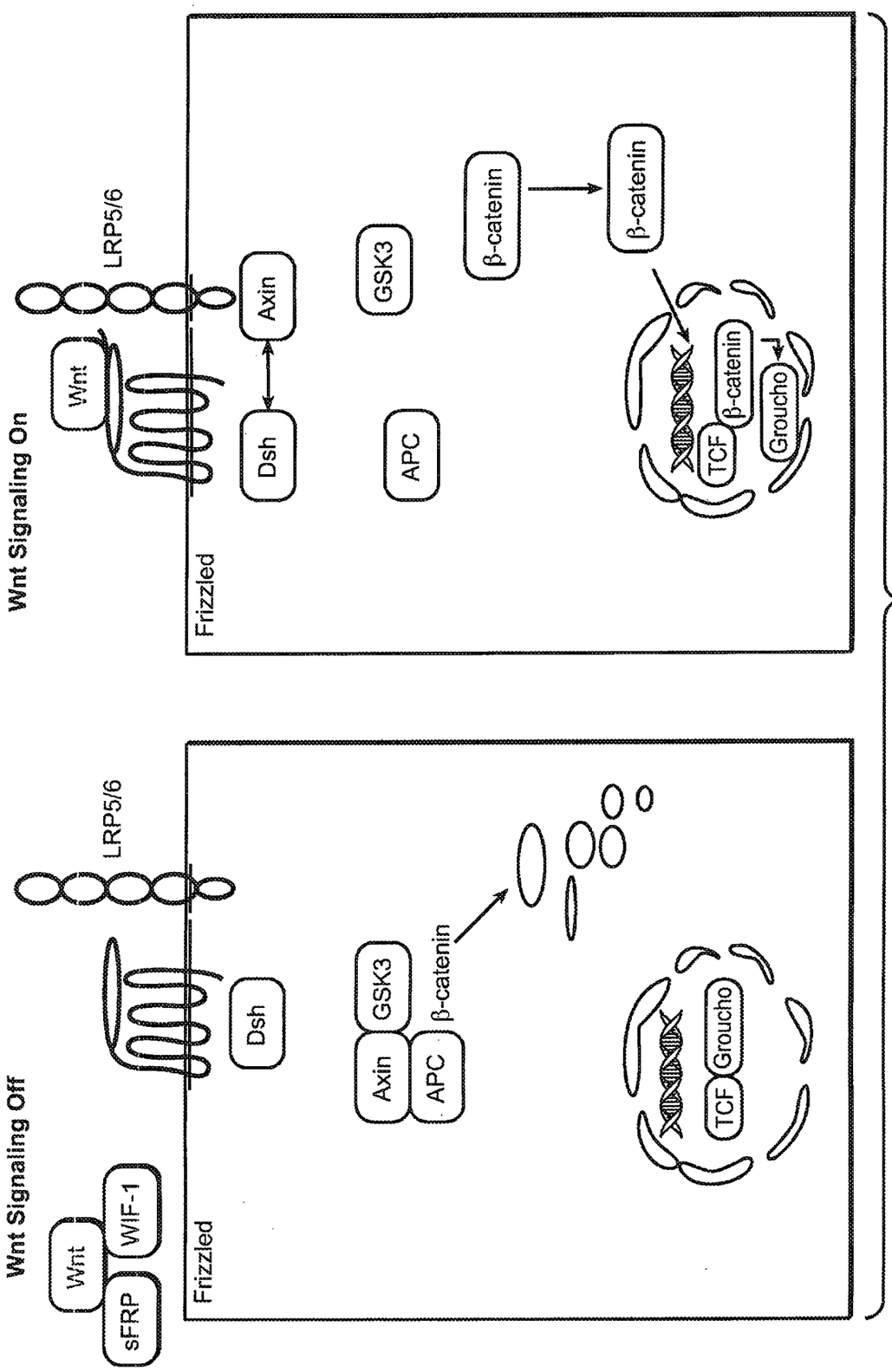

Wnt Signaling Off
Wnt
WIF-1
sFRP
LRP5/6
Frizzled
Dsh
Axin
GSK3
APC
β-catenin
TCF
Groucho
Wnt Signaling On
Wnt
LRP5/6
Frizzled
Dsh
Axin
GSK3
APC
β-catenin
β-catenin
TCF
β-catenin
Groucho

FIG. 1

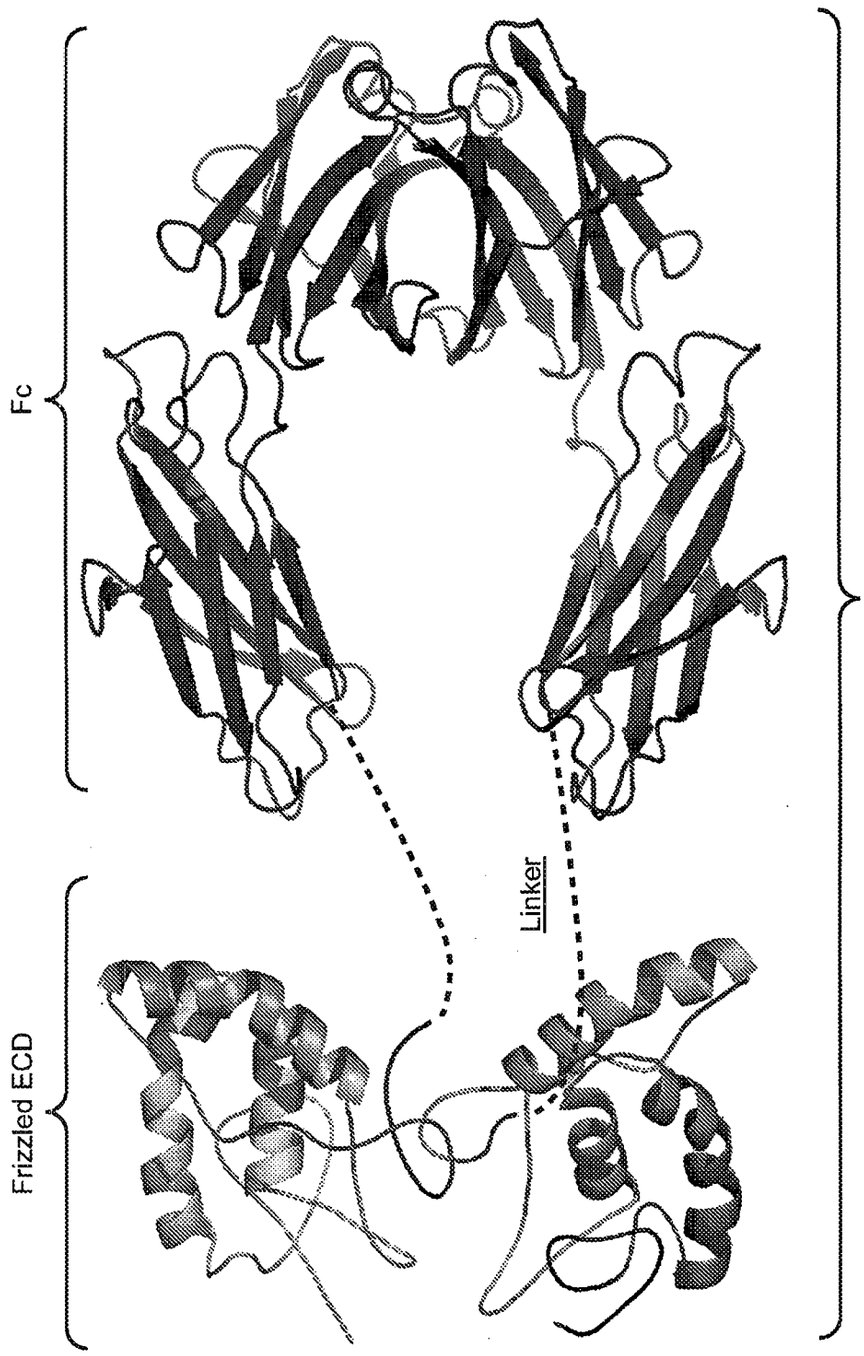


FIG. 2

FIG. 3A-1

FIG. 3A-2

FIG. 3A

FIG. 3A-1

Alignment of Pro-Frz Extracellular Domains

```
hFrz1    1 MAEEEAPKKSRAAGGGASWELCAGALSARLAEEGSGDAGGRRRPPVDPRRLARQLLLLLWLLEAPLLLGV 70
hFrz2    1 ------------------------------------------------MRPRSALPRLLLPLLLLPA------ 19
hFrz3    1 ----------------------------------------------------MAMTWIVFSLWPLTV------ 15
hFrz4    1 ----------------------------------------MAWRGAGPSVPGAPGGVGLSLGLLLQ------ 26
hFrz5    1 ------------------------------------------------MARPDPSAPPSLLLLLAQ------ 19
hFrz6    1 ------------------------------------------------------MEMFTFLLTCI------ 11
hFrz7    1 ----------------------------------------MRDPGAAAPLSSLGLCALVLALLGALS----- 27
hFrz8    1 ------------------------------------------------MEWGYLLEVTSLLAALALLQR------ 21
hFrz9    1 ----------------------------------------MAVAPLRGALLLWQLLAAGGAAL------ 23
hFrz10   1 ------------------------------------------------MQRPGPRLWLVLQVMGSCA------ 19
hsFrp1   1 ----------------------------------------MGIGRSEGGRRGAALGVLLALGAALLAVG---- 29
hsFrp2   1 ------------------------------------------------MLQGPGSLLLLFLASHCCLG---- 20
hsFrp3   1 ----------------------------------------MVCGSPGGMLLLRAGLLALAA------ 21
hsFrp4   1 ------------------------------------------------------MFLSILVALC------ 10
hsFrp5   1 ----------------------------------------MRAAAAAGGVRTAALALLLG--ALHWAPA---- 27

hFrz1   71 RAQAAGQGPGQGPGPGQQPPPPPQQQQSGQQYNGERGISVP----------DHG---YGQPIS--IPLGT 125
hFrz2   20 ------------------AGP--------AQFHGEKGISIP----------DHG---FGQPIS--IPLGT 48
hFrz3   16 ----------------------------FMGHIGGH----------SLF---SGEPIT--LRMGQ 37
hFrz4   27 ----------------------------LLLLLGPARGF----------GDEEERRGDPIR--ISMGQ 54
hFrz5   20 ----------------------------LVGRAAAAS----------KAP---VGQEIT--VPMGR 42
hFrz6   12 ----------------------------FLPLLRGH----------SLF---TGEPIT--VPRGM 33
hFrz7   28 ------------------AGAG------AQPYHGEKGISVP----------DHG---FGQPIS--IPLGT 58
hFrz8   22 ----------------------------SSGAAAASA----------KEL---ACQEIT--VPLGK 44
hFrz9   24 ----------------------------EIGRFDPERGR----------GAA---PGQAVE--IPMGR 48
hFrz10  20 ----------------------------AISSMDMER-P----------GDG---KGQPIE--IPMGK 43
hsFrp1  30 ------------------S---------ASEYDYYSFQSDIGPYQSGRFYTKPP---QGVDIPADLRLGH 69
hsFrp2  21 ------------------S---------ARGLFLFGQPDFS----------YKRS---NGKPIPANLQLGH 51
hsFrp3  22 ----------------------------LGLLRVPGA----------RAA---AGEPVR--IPLGK 44
hsFrp4  11 ----------------------------LWLHLALGV----------RGA---PGEAVR--IPMGR 33
hsFrp5  28 ------------------R---------GEEYDYYGWQAEP---LHGRSYSKPP---QGLDIPADLPLGH 64
                                                                    *           *
```

FIG

FIG. 3A-2

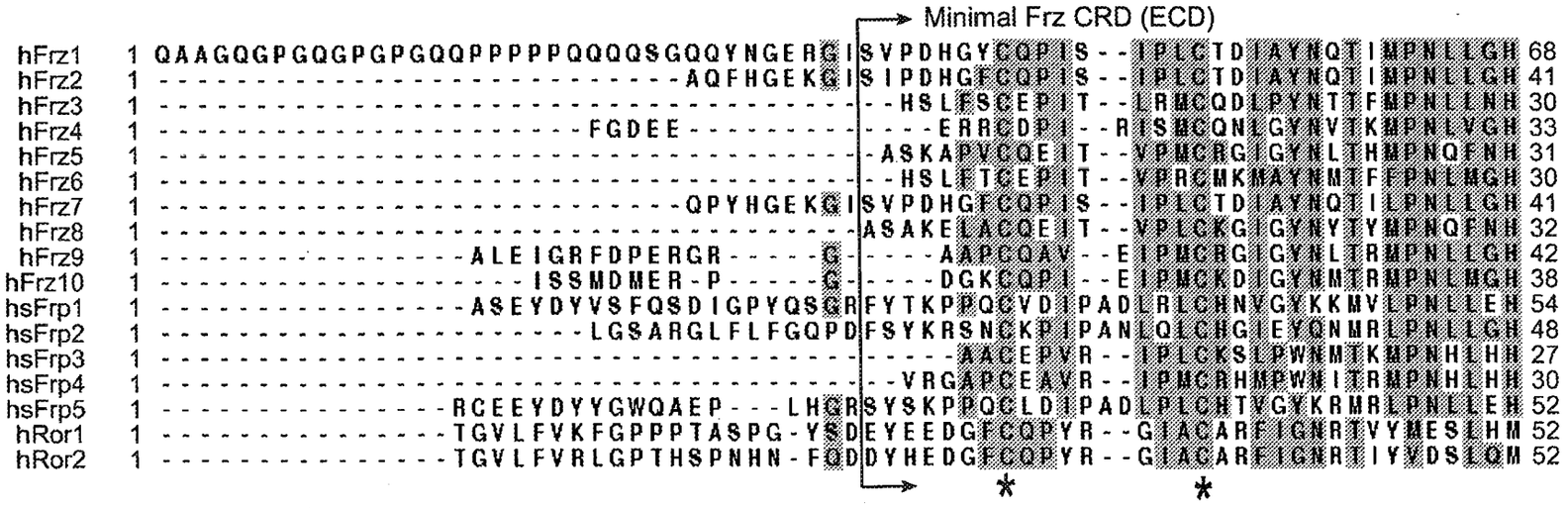
FIG. 3B-1

FIG. 3B-2

FIG. 3B

FIG. 3B-1

Alignment of Mature Frz Extracellular Domains



hFrz1 69 TNQED - - - AGLEVHQFYPLVKVQCSAELKFFLCSMYAPVCT - - - VLEQALPPCRSLCERAR - QGCE - - - 127
hFrz2 42 TNQED - - - AGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYAPVCT - - - VLEQAIPPCRSICESAR - QGCE - - - 100
hFrz3 31 YDQQT - - - AALAMEPFHMVNLDCSRDFRPFLCALYAPICM - - - EYGRVTLPCARLCQRAY - SECS - - - 89
hFrz4 34 ELQTD - - - AELQLTTFTPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTE - - KINIPIGPCGGMGLSTR - RRCE - - - 93
hFrz5 32 DTQDE - - - AGLEVHQFWPLVEIQCSPDLRFFLCTMYTPICLP - - DYHKPLPPCRSVCERAK - AGCS - - - 91
hFrz6 31 YDQSI - - - AAVEMEHFLPLANLECSPNIETFLCKAFVPTCI - - - EQIHYVPPCRKLCEKYY - SDCK - - - 89
hFrz7 42 TNQED - - - AGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYAPVCT - - - VLDQAIPPCRSLCERAR - QGCE - - - 100
hFrz8 33 DTQDE - - - AGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSMYTPICLE - - DYKKPLPPCRSVCERAK - AGCA - - - 92
hFrz9 43 TSQGE - - - AAAELAEFAPLVQYGCHSHLRFFLCSLYAPMCTD - - QYSTPIPACRPMCEQAR - LRCA - - - 102
hFrz10 39 ENQRE - - - AAIQLHEFAPLVEYGCHGHLRFFLCSLFAPVCLD - - RP - - - IYPCRWLCEAVR - DSGE - - - 98
hsFrp1 55 ETMAE - - - VKQQASSWVPLLNKNCHAGTQVFLCSLFAPVCLD - - RP - - - IYPCRWLCEAVR - DSGE - - - 111
hsFrp2 49 ETMKE - - - VLEQAGAWIPLVMKQCHPDTKKFLCSLFAPVCLD - - DLDETIQPCHSLCVQVK - DRCA - - - 108
hsFrp3 28 STQAN - - - AILAIEQFEGLLGTHCSPDLLFFLCAMYAPICTID - FQHEPIKPCKSVCERAR - QGCE - - - 88
hsFrp4 31 STQEN - - - AILAIEQYEELVDVNCSAVLRFFCAMYAPICTLE - FLHDPIKPCKSVCQRAR - DDCE - - - 91
hsFrp5 53 ESLAE - - - VKQQASSWLPLLAKRCHSDTQVFLCSLFAPVCLD - - RP - - - IYPCRSLCEAVR - AGCA - - - 109
hRor1 53 QGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSSYPKPRDLCRDECEILENVLCQTEY 122
hRor2 53 QGEIENRITAAFTMIGTSTHLSDQCSQFAIPSFCHFVFPLCDARSRTPKPRELCRDEGEVLESDLCRQEY 122
hFrz1 128 - - ALMNKFGFQWPDTLKCEKFPVHQ - - A - GELCVGQNTSDK 163
hFrz2 101 - - ALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHQ - - A - EQICVGQNHSED 136
hFrz3 90 - - KLMEMFGVPWPEDMECSRFP - - - - - - - - DCDEPVPRLV 119
hFrz4 94 - - PVLKEFGFAWPESLNCSKFPPQN - - DHNHMCMEGPGDEE 130
hFrz5 92 - - PLMRQYGFAWPERMSCDRLPVLGRDA - EVLCMDYNRSEA 129
hFrz6 90 - - KLIDTFGIRWPEELECDRLQ - - - - - - - - - - YCDETVPVTF 119
hFrz7 101 - - ALMNKFGFQWPERLRCENFPVHQ - - A - GELCVGQNTSDG 136
hFrz8 93 - - PLMRQYGFAWPDRMRCDRLPEQG - NP - DTLCMDYNRTDL 129
hFrz9 103 - - PIMEQFNFGWPDSLDCARLPTRN - - DPHALCMEAPENAT 139
hFrz10 99 - - PIMEQFNFKWPDSLDCRKLPNKN - - DPNYLCMEAPNNGS 135
hsFrp1 112 - - PVMQFFGFYWPEMLKCDKFPEG - - - D - - - VCIAMTPPNA 144
hsFrp2 109 - - PVMSAFGFPWPDMIECDRFPQDN - - - D - - - LCIPIASSDH 142
hsFrp3 89 - - PILIKYRHSWPENLACEELPVYD - - - - RGVCISPEAIVT 123
hsFrp4 92 - - PLMKMYNHSWPESLACDELPVYD - - - - RGVCISPEAIVT 126
hsFrp5 110 - - PLMEAYGFPWPEMLHCHKFPLDN - - D - - - LCIAVQFGHL 143
hRor1 123 IFARSNPMILMRLKLPNCEDLPQPE - SPEAANCIRIGIPMA 162
hRor2 123 TIARSNPLILMRLQLPKCEALPMPE - SPDAANCMRIGIPAE 162

FIG. 3B-2

Frz (173)-Fc Construct

MEWGYLLEVTSLLAALAVLQRSSGAAAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPN
QFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSV
CERAKAGCAPLMRQYGFAWPDRMRCDRLPEQGNPDTLCMDYNRTDLTTAAPSPPR
RLPPPPPPLESGGGGVT*DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE*
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 4A

Frz (156)-Fc Construct

MEWGYLLEVTSLLAALAVLQRSSGAAAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPN
QFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSV
CERAKAGCAPLMRQYGFAWPDRMRCDRLPEQGNPDTLCMDYNRTDLESGGGGVT*D*
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

FIG. 4B

Frz1-Fc (SEQ ID NO: 115)

ATGGGGGGGACTGCCGCCAGGTTGGGGGCCGTGATTTTGTTTGTCGTCATAGTGGGCCTCCATGGGGTCCGCGGCAAAATCGATGAGGAGGGCAGCGGGGACGCCGG
TGGCCGCCGCCGCCCGCCAGTTGACCCCCGGCGATTGGCGCGCCAGCTGCTGCTGCTGCTTTGGCTGCTGGAGGCTCCGCTGCTGCTGGGGGTCCGGGCCCAGGCGG
CGGGCCAGGGGCCAGGCCAGGGGCCCGGGCCGGGGCAGCAACCGCCGCCGCCGCCTCAGCAGCAACAGAGCGGGCAGCAGTACAACGGCGAGCGGGGCATCTCCGTC
CCGGACCACGGCTATTGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTGTGCACGGACATCGCGTACAACCAGACCATCATGCCCAACCTGCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGC
GGGCCTGGAGGTGCACCAGTTCTACCCTCTAGTGAAAGTGCAGTGTTCCGCTGAGCTCAAGTTCTTCCTGTGCTCCATGTACGCGCCCGTGTGCACCGTGCTAGAGC
AGGCGCTGCCGCCCTGCCGCTCCCTGTGCGAGCGCGCGCGCCAGGGCTGCGAGGCGCTCATGAACAAGTTCGGCTTCCAGTGGCCAGACACGCTCAAGTGTGAGAAG
TTCCCGGTGCACGGCGCCGGCGAGCTGTGCGTGGGCCAGAACACGTCCGACAAGGCTCGAGGGCGCGCCCAGGTCACCGACAAAGCTGCGCGCTCTACTCTGTGCCC
ACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG
TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC
ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA
AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT
CTCCCTGTCTCCGGGTAAA

Frz2-Fc (SEQ ID NO: 116)

ATGGGGGGGACTGCCGCCAGGTTGGGGGCCGTGATTTTGTTTGTCGTCATAGTGGGCCTCCATGGGGTCCGCGGCAAAATCGATGCTCGAGGGGCCCAGTTCCACGG
GGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTGTGCACGGACATCGCCTACAACCAGACCATCATGCCCAACCTTCTGGGCC
ACACGAACCAGGAGGACGCAGGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTGTGCTCCATGTACGCACCC
GTGTGCACCGTGCTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAGCGCGCGCGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTCAGTGGCCCGA
GCGCCTGCGCTGCGAGCACTTCCCGCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGGCGCGCCCAGGTCACCGACAAAGCTGCGCGCT
CTACTCTGTGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG
GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA
GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG
CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA
CGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA
CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

FIG. 5A

Frz3-Fc (SEQ ID NO: 117)

ATGGGGGGGACTGCCGCCAGGTTGGGGGCCGTGATTTTGTTTGTCGTCATAGTGGGCCTCCATGGGGTCCGCGGCAAAATCGATGCTCGAGGCCACTCCCTGTTCAG
CTGTGAGCCAATCACCCTTCGAATGTGTCAGGATCTGCCTTACAATACCACCTTCATGCCTAATCTGCTCAATCACTACGACCAGCAAACTGCTGCCTTGGCAATGG
AGCCCTTCCACCCTATGGTCAACCTGGACTGTAGCAGGGACTTCCGTCCATTTTTGTGTGCCTTGTATGCACCTATCTGTATGGAGTACGGCCGCGTGACATTGCCT
TGTAGGAGGCTGTGTCAGCGAGCTTACAGTGAGTGCAGCAAACTTATGGAAATGTTTGGCGTCCCCTGGCCAGAAGATATGGAGTGCAGTCGGTTCCCAGACTGTGA
CGAGCCATACCCTAGACTGGTTGATCTCCTCGAGTCAGGAGGAGGAGGAGTCACCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGGAC
CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC
AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG
AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG
GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

Frz4-Fc (SEQ ID NO: 118)

ATGGGGGGGACTGCCGCCAGGTTGGGGGCCGTGATTTTGTTTGTCGTCATAGTGGGCCTCCATGGGGTCCGCGGCAAAATCGATGCTCGAGGGTTCGGGGACGAGGA
AGAGCGGCGCTGCGACCCCATCCGCATCTCCATGTGCCAGAACCTCGGCTACAACGTGACCAAGATGCCCAACCTGGTTGGGCACGAGCTGCAGACGGACGCCGAGC
TGCAGCTGACAACTTTCACACCGCTCATCCAGTACGGCTGCTCCAGCCAGCTGCAGTTCTTCCTTTGTTCTGTTTATGTGCCAATGTGCACAGAGAAGATCAACATC
CCCATTGGCCCATGCGGCGGCATGTGTCTTTCAGTCAAGAGACGCTGTGAACCCGTCCTGAAGGAATTTGGATTTGCCTGGCCAGAGAGTCTGAACTGCAGCAAATT
CCCACCACAGAACGACCACAACCACATGTGCATGGAAGGGCCAGGTGATGAAGAGGGGCGCGCCCAGGTCACCGACAAAGCTGCGCGCTCTACTCTGTGCCCACCGT
GCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG
GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA
CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA
TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTA
CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGTAAA

FIG. 5B

Frz5-Fc (SEQ ID NO: 119)

ATGGGGGGGACTGCCGCCAGGTTGGGGGCCGTGATTTTGTTTGTCGTCATAGTGGGCCTCCATGGGGTCCGCGGCAAAATCGATGCTCGAGGGGCGTCCAAGGCCCC
GGTGTGCCAGGAAATCACGGTGCCCATGTGCCGCGGCATCGGCTACAACCTGACGCACATGCCCAACCAGTTCAACCACGACACGCAGGACGAGGCGGGCCTGGAGG
TGCACCAGTTCTGGCCGCTGGTGGAGATCCAATGCTCGCCGGACCTGCGCTTCTTCCTATGCTCTATGTACACGCCCATCTGTCTGCCCGACTACCACAAGCCGCTG
CCGCCCTGCCGCTCGGTGTGCGAGCGCGCCAAGGCCGGCTGCTCGCCGCTGATGCGCCAGTACGGCTTCGCCTGGCCCGAGCGCATGAGCTGCGACCGCCTCCCGGT
GCTGGGCCGCGACGCCGAGGTCCTCTGCATGGATTACAACCGCAGCGAGGCCGGGCGCGCCCAGGTCACCGACAAAGCTGCGCGCTCTACTCTGTGCCCACCGTGCC
CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC
GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG
TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT
CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG
CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAAA

Frz6-Fc (SEQ ID NO: 120)

ATGGAAATGTTTACATTTTTGTTGACGTGTATTTTTCTACCCCTCCTAAGAGGGCACAGTCTCTTCACCTGTGAACCAATTACTGTTCCCAGATGTATGAAAATGGC
CTACAACATGACGTTTTTCCCTAATCTGATGGGTCATTATGACCAGAGTATTGCCGCGGTGGAAATGGAGCATTTTCTTCCTCTCGCAAATCTGGAATGTTCACCAA
ACATTGAAACTTTCCTCTGCAAAGCATTTGTACCAACCTGCATAGAACAAATTCATGTGGTTCCACCTTGTCGTAAACTTTGTGAGAAAGTATATTCTGATTGCAAA
AAATTAATTGACACTTTTGGGATCCGATGGCCTGAGGAGCTTGAATGTGACAGATTACAATACTGTGATGAGACTGTTCCTGTAACTTTTCTCGAGTCAGGAGGAGG
AGGAGTCACCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGA
TCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCA
AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCT
CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

FIG. 5C

Frz7-Fc (SEQ ID NO: 121)

ATGCGGGACCCCGGCGCGGCCGCTCCGCTTTCGTCCCTGGGCCTCTGTGCCCTGGTGCTGGCGCTGCTGGGCGCACTGTCCGCGGGCGCCGGGGCGCAGCCGTACCA
CGGAGAGAAGGGCATCTCCGTGCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTGTGCACGGACATCGCCTACAACCAGACCATCCTGCCCAACCTGCTGG
GCCACACGAACCAAGAGGACGCGGGCCTCGAGGTGCACCAGTTCTACCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGTTCTCCCGAACTCCGCTTTTTCTTATGCTCCATGTATGCG
CCCGTGTGCACCGTGCTCGATCAGGCCATCCCGCCGTGTCGTTCTCTGTGCGAGCGCGCCCGCCAGGGCTGCGAGGCGCTCATGAACAAGTTCGGCTTCCAGTGGCC
CGAGCGGCTGCGCTGCGAGAACTTCCCGGTGCACGGTGCGGGCGAGATCTGCGTGGGCCAGAACACGTCGGACGGCCTCGAGTCAGGAGGAGGAGGAGTCACCGACA
AAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA
GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC
CAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT
ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

Frz8-Fc (SEQ ID NO: 122)

ATGGAGTGGGGTTACCTGTTGGAAGTGACCTCGCTCCTAGCCGCCTTGGCGGTGCTACAGCGCTCTAGCGGCGCTGCCGCGGCTTCGGCCAAGGAGCTGGCGTGCCA
AGAGATCACGGTGCCGTTGTGCAAAGGCATCGGTTACAACTACACTTACATGCCCAACCAGTTCAACCACGACACGCAAGATGAGGCGGGCCTAGAGGTGCACCAGT
TTTGGCCGCTGGTGGAGATACAGTGCTCCCCGGACCTCAAGTTCTTTCTGTGTAGCATGTACACGCCCATCTGCCTGGAGGACTACAAGAAGCCTCTGCCGCCTTGT
CGCTCTGTGTGTGAACGCGCCAAGGCCGGCTGCGCGCCGCTCATGCGCCAGTACGGCTTTGCTTGGCCTGACCGCATGCGCTGCGATCGGTTGCCGGAGCAGGGCAA
CCCGGACACTCTGTGCATGGACTACAACCGCACCGACCTCGAGTCAGGAGGAGGAGGAGTCACCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCC
TGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT
CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC
AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA
CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

FIG. 5D

Frz9-Fc (SEQ ID NO: 123)

ATGGCCGTGGCGCCTCTGCGGGGGGCGCTGCTGCTGTGGCAGCTGCTGGCGGCGGGCGGCGCGGCACTGGAGATCGGCCGCTTCGACCCGGAGCGCGGGCGCGGGGC
TGCGCCGTGCCAGGCGGTGGAGATCCCCATGTGCCGCGGCATCGGCTACAACCTGACCCGCATGCCCAACCTGCTGGGCCACACGTCGCAGGGCGAGGCGGCTGCCG
AGCTAGCGGAGTTCGCGCCGCTGGTGCAGTACGGCTGCCACAGCCACCTGCGCTTCTTCCTGTGCTCGCTCTACGCGCCCATGTGCACCGACCAGGTCTCGACGCCC
ATTCCCGCCTGCCGGCCCATGTGCGAGCAGGCGCGCCTGCGCTGCGCGCCCATCATGGAGCAGTTCAACTTCGGCTGGCCGGACTCGCTCGACTGCGCCCGGCTGCC
CACGCGCAACGACCCGCACGCGCTGTGCATGGAGGCGCCCGAGAACGCCACGCTCGAGTCAGGAGGAGGAGGAGTCACCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCC
CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC
GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG
TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT
CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG
CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAAA

Frz10-Fc (SEQ ID NO: 124)

ATGCAGCGCCCGGGCCCCCGCCTGTGGCTGGTCCTGCAGGTGATGGGCTCGTGCGCCGCCATCAGCTCCATGGACATGGAGCGCCCGGGCGACGGCAAATGCCAGCC
CATCGAGATCCCGATGTGCAAGGACATCGGCTACAACATGACTCGTATGCCCAACCTGATGGGCCACGAGAACCAGCGCGAGGCAGCCATCCAGTTGCACGAGTTCG
CGCCGCTGGTGGAGTACGGCTGCCACGGCCACCTCCGCTTCTTCCTGTGCTCGCTGTACGCGCCGATGTGCACCGAGCAGGTCTCTACCCCCATCCCCGCCTGCCGG
GTCATGTGCGAGCAGGCCCGGCTCAAGTGCTCCCCGATTATGGAGCAGTTCAACTTCAAGTGGCCCGACTCCCTGGACTGCCGGAAACTCCCCAACAAGAACGACCC
CAACTACCTGTGCATGGAGGCGCCCAACAACGGCTCGCTCGAGTCAGGAGGAGGAGGAGTCACCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCC
TGGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT
CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC
AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA
CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

FIG. 5E

sFRP1-Fc (SEQ ID NO: 125)

ATGGGCATCGGGCGCAGCGAGGGGGGCCGCCGCGGGGCAGCCCTGGGCGTGCTGCTGGCGCTGGGCGCGGCGCTTCTGGCCGTGGGCTCGGCCAGCGAGTACGACTA
CGTGAGCTTCCAGTCGGACATCGGCCCGTACCAGAGCGGGCGCTTCTACACCAAGCCACCTCAGTGCGTGGACATCCCCGCGGACCTGCGGCTGTGCCACAACGTGG
GCTACAAGAAGATGGTGCTGCCCAACCTGCTGGAGCACGAGACCATGGCGGAGGTGAAGCAGCAGGCCAGCAGCTGGGTGCCCCTGCTCAACAAGAACTGCCACGCC
GGCACCCAGGTCTTCCTCTGCTCGCTCTTCGCGCCCGTCTGCCTGGACCGGCCCATCTACCCGTGTCGCTGGCTCTGCGAGGCCGTGCGCGACTCGTGCGAGCCGGT
CATGCAGTTCTTCGGCTTCTACTGGCCCGAGATGCTTAAGTGTGACAAGTTCCCCGAGGGGGACGTCTGCATCGCCATGACGCCGCCCAATGCCTGGCGCGCCCAGG
TCACCGACAAAGCTGCGCGCTCTACTCTGTGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC
GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

sFRP2-Fc (SEQ ID NO: 126)

ATGCTGCAGGGCCCTGGCTCGCTGCTGCTGCTCTTCCTCGCCTCGCACTGCTGCCTGGGCTCGGCGCGCGGGCTCTTCCTCTTTGGCCAGCCCGACTTCTCCTACAA
GCGCAGCAATTGCAAGCCCATCCCTGCCAACCTGCAGCTGTGCCACGGCATCGAATACCAGAACATGCGGCTGCCCAACCTGCTGGGCCACGAGACCATGAAGGAGG
TGCTGGAGCAGGCCGGCGCTTGGATCCCGCTGGTCATGAAGCAGTGCCACCCGGACACCAAGAAGTTCCTGTGCTCGCTCTTCGCCCCCGTCTGCCTCGATGACCTA
GACGAGACCATCCAGCCATGCCACTCGCTCTGCGTGCAGGTGAAGGACCGCTGCGCCCCGGTCATGTCCGCCTTCGGCTTCCCCTGGCCCGACATGCTTGAGTGCGA
CCGTTTCCCCCAGGACAACGACCTTTGCATCCCCCTCGCTAGCAGCGACCACTGGCGCGCCCAGGTCACCGACAAAGCTGCGCGCTCTACTCTGTGCCCACCGTGCC
CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC
GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG
TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT
CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG
CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAAA

FIG. 5F

sFRP3-Fc (SEQ ID NO: 127)

ATGGGGGGGACTGCCGCCAGGTTGGGGGCCGTGATTTTGTTTGTCGTCATAGTGGGCCTCCATGGGGTCCGCGGCAAAATCGATGCTCGAGGGGCAGCCTGTGAGCC
CGTCCGCATCCCCCTGTGCAAGTCCCTGCCCTGGAACATGACTAAGATGCCCAACCACCTGCACCACAGCACTCAGGCCAACGCCATCCTGGCCATCGAGCAGTTCG
AAGGTCTGCTGGGCACCCACTGCAGCCCCGATCTGCTCTTCTTCCTCTGTGCCATGTACGCGCCCATCTGCACCATTGACTTCCAGCACGAGCCCATCAAGCCCTGT
AAGTCTGTGTGCGAGCGGGCCCGGCAGGGCTGTGAGCCCATACTCATCAAGTACCGCCACTCGTGGCCGGAGAACCTGGCCTGCGAGGAGCTGCCAGTGTACGACAG
GGGCGTGTGCATCTCTCCCGAGGCCATCGTTACTGGGCGCGCCCAGGTCACCGACAAAGCTGCGCGCTCTACTCTGTGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGG
GGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC
CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC
CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

sFRP4-Fc (SEQ ID NO: 128)

ATGTTCCTCTCCATCCTAGTGGCGCTGTGCCTGTGGCTGCACCTGGCGCTGGGCGTGCGCGGCGCGCCCTGCGAGGCGGTGCGCATCCCTATGTGCCGGCACATGCC
CTGGAACATCACGCGGATGCCCAACCACCTGCACCACAGCACGCAGGAGAACGCCATCCTGGCCATCGAGCAGTACGAGGAGCTGGTGGACGTGAACTGCAGCGCCG
TGCTGCGCTTCTTCTTCTGTGCCATGTACGCGCCCATTTGCACCCTGGAGTTCCTGCACGACCCTATCAAGCCGTGCAAGTCGGTGTGCCAACGCGCGCGCGACGAC
TGCGAGCCCCTCATGAAGATGTACAACCACAGCTGGCCCGAAAGCCTGGCCTGCGACGAGCTGCCTGTCTATGACCGTGGCGTGTGCATTTCGCCTGAAGCCATCGT
CACGCTCGAGTCAGGAGGAGGAGGAGTCACCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAA
AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC
CATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

FIG. 5G

sFRP5-Fc (SEQ ID NO: 129)

ATGCGGGCGGCGGCGGCGGCGGGGGGGCGTGCGGACGGCCGCGCTGGCGCTGCTGCTGGGGGCGCTGCACTGGGCGCCGGCGCGCTGCGAGGAGTACGACTACTATGG
CTGGCAGGCCGAGCCGCTGCACGGCCGCTCCTACTCCAAGCCGCCGCAGTGCCTTGACATCCCTGCCGACCTGCCGCTCTGCCACACGGTGGGCTACAAGCGCATGC
GGCTGCCCAACCTGCTGGAGCACGAGAGCCTGGCCGAAGTGAAGCAGCAGGCGAGCAGCTGGCTGCCGCTGCTGGCCAAGCGCTGCCACTCGGATACGCAGGTCTTC
CTGTGCTCGCTCTTTGCGCCCGTCTGTCTCGACCGGCCCATCTACCCGTGCCGCTCGCTGTGCGAGGCCGTGCGCGCCGGCTGCGCGCCGCTCATGGAGGCCTACGG
CTTCCCCTGGCCTGAGATGCTGCACTGCCACAAGTTCCCCCTGGACAACGACCTCTGCATCGCCGTGCAGTTCGGGCACCTGTGGCGCGCCCAGGTCACCGACAAAG
CTGCGCGCTCTACTCTGTGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG
CCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAG
GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT
GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

FIG. 5H

Frizzled 1 (NP_003496) (SEQ ID NO: 1)

MAEEEAPKKSRAAGGGASWELCAGALSARLAEEGSGDAGGRRRPPVDPRRLARQLLLLLWLLEAPLLLGVRAQAAGQGPGQGPGPGQQPPPPPQQQQSGQQYNGERG
ISVPDHGYCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSAELKFFLCSMYAPVCTVLEQALPPCRSLCERARQGCEALMNKFGFQWPDTLK
CEKFPVHGAGELCVGQNTSDKGTPTPSLLPEFWTSNPQHGGGGHRGGFPGGAGASERGKFSCPRALKVPSYLNYHFLGEKDCGAPCEPTKVYGLMYFGPEELRFSRT
WIGIWSVLCCASTLFTVLTYLVDMRRFSYPERPIIFLSGCYTAVAVAYIAGFLLEDRVVCNDKFAEDGARTVAQGTKKEGCTILFMMLYFFSMASSIWWVILSLTWF
LAAGMKWGHEAIEANSQYFHLAAWAVPAIKTITILALGQVDGDVLSGVCFVGLNNVDALRGFVLAPLFVYLFIGTSFLLAGFVSLFRIRTIMKHDGTKTEKLEKLMV
RIGVFSVLYTVPATIVIACYFYEQAFRDQWERSWVAQSCKSYAIPCPHLQAGGGAPPHPPMSPDFTVFMIKYLMTLIVGITSGFWIWSGKTLNSWRKFYTRLTNSKQ
GETT

Frizzled 2 (NP_001457) (SEQ ID NO: 2)

MRPRSALPRLLLPLLLLPAAGPAQFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYAPVCTVLEQAI
PPCRSICESARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEDGAPALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPPRYATLEHPFHCPRVLKVPSYLSYK
FLGERDCAAPCEPARPDGSMFFSQEETRFARLWILTWSVLCCASTFFTVTTYLVDMQRFRYPERPIIFLSGCYTMVSVAYIAGFVLQERVVCNERFSEDGYRTVVQG
TKKEGCTILFMMLYFFSMASSIWWVILSLTWFLAAGMKWGHEAIEANSQYFHLAAWAVPAVKTITILAMGQIDGDLLSGVCFVGLNSLDPLRGFVLAPLFVYLFIGT
SFLLAGFVSLFRIRTIMKHDGTKTEKLERLMVRIGVFSVLYTVPATIVIACYFYEQAFREHWERSWVSQHCKSLAIPCPAHYTPRMSPDFTVYMIKYLMTLIVGITS
GFWIWSGKTLHSWRKFYTRLTNSRHGETTV

Frizzled 3 (NP_059108) (SEQ ID NO: 3)

MAMTWIVFSLWPLTVFMGHIGGHSLFSCEPITLRMCQDLPYNTTFMPNLLNHYDQQTAALAMEPFHPMVNLDCSRDFRPFLCALYAPICMEYGRVTLPCRRLCQRAY
SECSKLMEMFGVPWPEDMECSRFPDCDEPYPRLVDLNLAGEPTEGAPVAVQRDYGFWCPRELKIDPDLGYSFLHVRDCSPPCPNMYFRREELSFARYFIGLISIICL
SATLFTFLTFLIDVTRFRYPERPIIFYAVCYMMVSLIFFIGFLLEDRVACNASIPAQYKASTVTQGSHNKACTMLFMILYFFTMAGSVWWVILTITWFLAAVPKWGS
EAIEKKALLFHASAWGIPGTLTIILLAMNKIEGDNISGVCFVGLYDVDALRYFVLAPLCLYVVVGVSLLLAGIISLNRVRIEIPLEKENQDKLVKFMIRIGVFSILY
LVPLLVVIGCYFYEQAYRGIWETTWIQERCREYHIPCPYQVTQMSRPDLILFLMKYLMALIVGIPSVFWVGSKKTCFEWASFFHGRRKKEIVNESRQVLQEPDFAQS
LLRDPNTPIIRKSRGTSTQGTSTHASSTQLAMVDDQRSKAGSIHSKVSSYHGSLHRSRDGRYTPCSYRGMEERLPHGSMSRLTDHSRHSSSHRLNEQSRHSSIRDLS
NNPMTHITHGTSMNRVIEEDGTSA

Frizzled 4 (NP_036325) (SEQ ID NO: 4)

MAWRGAGPSVPGAPGGVGLSLGLLLQLLLLLGPARGFGDEEERRCDPIRISMCQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDAELQLTTFTPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCT
EKINIPIGPCGGMCLSVKRRCEPVLKEFGFAWPESLNCSKFPPQNDHNHMCMEGPGDEEVPLPHKTPIQPGEECHSVGTNSDQYIWVKRSLNCVLKCGYDAGLYSRS
AKEFTDIWMAVWASLCFISTAFTVLTFLIDSSRFSYPERPIIFLSMCYNIYSIAYIVRLTVGRERISCDFEEAAEPVLIQEGLKNTGCAIIFLLMYFFGMASSIWWV
ILTLTWFLAAGLKWGHEAIEMHSSYFHIAAWAIPAVKTIVILIMRLVDADELTGLCYVGNQNLDALTGFVVAPLFTYLVIGTLFIAAGLVALFKIRSNLQKDGTKTD
KLERLMVKIGVFSVLYTVPATCVIACYFYEISNWALFRYSADDSNMAVEMLKIFMSLLVGITSGMWIWSAKTLHTWQKCSNRLVNSGKVKREKRGNGWVKPGKGSET
VV

FIG. 6A

Frizzled 5 (NP_003459) (SEQ ID NO: 5)

MARPDPSAPPSLLLLLLAQLVGRAAAASKAPVCQEITVPMCRGIGYNLTHMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLRFFLCSMYTPICLPDYHKPLPPCRS
VCERAKAGCSPLMRQYGFAWPERMSCDRLPVLGRDAEVLCMDYNRSEATTAPPRPFPAKPTLPGPPGAPASGGECPAGGPFVCKCREPFVPILKESHPLYNKVRTGQ
VPNCAVPCYQPSFSADERTFATFWIGLWSVLCFISTSTTVATFLIDMERFRYPERPIIFLSACYLCVSLGFLVRLVVGHASVACSREHNHIHYETTGPALCTIVFLL
VYFFGMASSIWWVILSLTWFLAAGMKWGNEAIAGYAQYFHLAAWLIPSVKSITALALSSVDGDPVAGICYVGNQNLNSLRGFVLGPLVLYLLVGTLFLLAGFVSLFR
IRSVIKQGGTKTDKLEKLMIRIGIFTLLYTVPASIVVACYLYEQHYRESWEAALTCACPGHDTGQPRAKPEYWVLMLKYFMCLVVGITSGVWIWSGKTVESWRRFTS
RCCCRPRRGHKSGGAMAAGDYPEASAALTGRTGPPGPAATYHKQVSLSHV

Frizzled 6 (NP_003497) (SEQ ID NO: 6)

MEMFTFLLTCIFLPLLRGHSLFTCEPITVPRCMKMAYNMTFFPNLMGHYDQSIAAVEMEHFLPLANLECSPNIETFLCKAFVPTCIEQIHVVPPCRKLCEKVYSDCK
KLIDTFGIRWPEELECDRLQYCDETVPVTFDPHTEFLGPQKKTEQVQRDIGFWCPRHLKTSGGQGYKFLGIDQCAPPCPNMYFKSDELEFAKSFIGTVSIFCLCATL
FTFLTFLIDVRRFRYPERPIIYYSVCYSIVSLMYFIGFLLGDSTACNKADEKLELGDTVVLGSQNKACTVLFMLLYFFTMAGTVWWVILTITWFLAAGRKWSCEAIE
QKAVWFHAVAWGTPGFLTVMLLAMNKVEGDNISGVCFVGLYDLDASRYFVLLPLCLCVFVGLSLLLAGIISLNHVRQVIQHDGRNQEKLKKFMIRIGVFSGLYLVPL
VTLLGCYVYEQVNRITWEITWVSDHCRQYHIPCPYQAKAKARPELALFMIKYLMTLIVGISAVFWVGSKKTCTEWAGFFKRNRKRDPISESRRVLQESCEFFLKHNS
KVKHKKKHYKPSSHKLKVISKSMGTSTGATANHGTSAVAITSHDYLGQETLTEIQTSPETSMREVKADGASTPRLREQDCGEPASPAASISRLSGEQVDGKGQAGSV
SESARSEGRISPKSDITDTGLAQSNNLQVPSSSEPSSLKGSTSLLVHPVSGVRKEQGGGCHSDT

Frizzled 7 (NP_003498) (SEQ ID NO: 7)

MRDPGAAAPLSSLGLCALVLALLGALSAGAGAQPYHGEKGISVPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTILPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYA
PVCTVLDQAIPPCRSLCERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCENFPVHGAGEICVGQNTSDGSGGPGGGPTAYPTAPYLPDLPFTALPPGASDGRGRPAFPFSCPRQL
KVPPYLGYRFLGERDCGAPCEPGRANGLMYFKEEERRFARLWVGVWSVLCCASTLFTVLTYLVDMRRFSYPERPIIFLSGCYFMVAVAHVAGFLLEDRAVCVERFSD
DGYRTVAQGTKKEGCTILFMVLYFFGMASSIWWVILSLTWFLAAGMKWGHEAIEANSQYFHLAAWAVPAVKTITILAMGQVDGDLLSGVCYVGLSSVDALRGFVLAP
LFVYLFIGTSFLLAGFVSLFRIRTIMKHDGTKTEKLEKLMVRIGVFSVLYTVPATIVLACYFYEQAFREHWERTWLLQTCKSYAVPCPPGHFPPMSPDFTVFMIKYL
MTMIVGITTGFWIWSGKTLQSWRRFYHRLSHSSKGETAV

Frizzled 8 (NP_114072) (SEQ ID NO: 8)

MEWGYLLEVTSLLAALALLQRSSGAAAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPC
RSVCERAKAGCAPLMRQYGFAWPDRMRCDRLPEQGNPDTLCMDYNRTDLTTAAPSPPRRLPPPPPGEQPPSGSGHGRPPGARPPHRGGGRGGGGGDAAAPPARGGGG
GGKARPPGGGAAPCEPGCQCRAPMVSVSSERHPLYNRVKTGQIANCALPCHNPFFSQDERAFTVFWIGLWSVLCFVSTFATVSTFLIDMERFKYPERPIIFLSACYL
FVSVGYLVRLVAGHEKVACSGGAPGAGGAGGAGGAAAGAGAAGAGAGGPGGRGEYEELGAVEQHVRYETTGPALCTVVFLLVYFFGMASSIWWVILSLTWFLAAGMK
WGNEAIAGYSQYFHLAAWLVPSVKSIAVLALSSVDGDPVAGICYVGNQSLDNLRGFVLAPLVIYLFIGTMFLLAGFVSLFRIRSVIKQQDGPTKTHKLEKLMIRLGL
FTVLYTVPAAVVVACLFYEQHNRPRWEATHNCPCLRDLQPDQARRPDYAVFMLKYFMCLVVGITSGVWVWSGKTLESWRSLCTRCCWASKGAAVGGGAGATAAGGGG
GPGGGGGGGPGGGGGPGGGGGSLYSDVSTGLTWRSGTASSVSYPKQMPLSQV

FIG. 6B

Frizzled 9 (NP_003499) (SEQ ID NO: 9)

MAVAPLRGALLLWQLLAAGGAALEIGRFDPERGRGAAPCQAVEIPMCRGIGYNLTRMPNLLGHTSQGEAAAELAEFAPLVQYGCHSHLRFFLCSLYAPMCTDQVSTP
IPACRPMCEQARLRCAPIMEQFNFGWPDSLDCARLPTRNDPHALCMEAPENATAGPAEPHKGLGMLPVAPRPARPPGDLGPGAGGSGTCENPEKFQYVEKSRSCAPR
CGPGVEVFWSRRDKDFALVWMAVWSALCFFSTAFTVLTFLLEPHRFQYPERPIIFLSMCYNVYSLAFLIRAVAGAQSVACDQEAGALYVIQEGLENTGCTLVFLLLY
YFGMASSLWWVVLTLTWFLAAGKKWGHEAIEAHGSYFHMAAWGLPALKTIVILTLRKVAGDELTGLCYVASTDAAALTGFVLVPLSGYLVLGSSFLLTGFVALFHIR
KIMKTGGTNTEKLEKLMVKIGVFSILYTVPATCVIVCYVYERLNMDFWRLRATEQPCAAAAGPGGRRDCSLPGGSVPTVAVFMLKIFMSLVVGITSGVWVWSSKTFQ
TWQSLCYRKIAAGRARAKACRAPGSYGRGTHCHYKAPTVVLHMTKTDPSLENPTHL

Frizzled 10 (NP_009128) (SEQ ID NO: 10)

MQRPGPRLWLVLQVMGSCAAISSMDMERPGDGKCQPIEIPMCKDIGYNMTRMPNLMGHENQREAAIQLHEFAPLVEYGCHGHLRFFLCSLYAPMCTEQVSTPIPACR
VMCEQARLKCSPIMEQFNFKWPDSLDCRKLPNKNDPNYLCMEAPNNGSDEPTRGSGLFPPLFRPQRPHSAQEHPLKDGGPGRGGCDNPGKFHHVEKSASCAPLCTPG
VDVYWSREDKRFAVVWLAIWAVLCFFSSAFTVLTFLIDPARFRYPERPIIFLSMCYCVYSVGYLIRLFAGAESIACDRDSGQLYVIQEGLESTGCTLVFLVLYYFGM
ASSLWWVVLTLTWFLAAGKKWGHEAIEANSSYFHLAAWAIPAVKTILILVMRRVAGDELTGVCYVGSMDVNALTGFVLIPLACYLVIGTSFILSGFVALFHIRRVMK
TGGENTDKLEKLMVRIGLFSVLYTVPATCVIACYFYERLNMDYWKILAAQHKCKMNNQTKTLDCLMAASIPAVEIFMVKIFMLLVVGITSGMWIWTSKTLQSWQQVC
SRRLKKKSRRKPASVITSGGIYKKAQHPQKTHHGKYEIPAQSPTCV

sFrp1 (NP_003003) (SEQ ID NO: 11)

MGIGRSEGGRRGAALGVLLALGAALLAVGSASEYDYVSFQSDIGPYQSGRFYTKPPQCVDIPADLRLCHNVGYKKMVLPNLLEHETMAEVKQQASSWVPLLNKNCHA
GTQVFLCSLFAPVCLDRPIYPCRWLCEAVRDSCEPVMQFFGFYWPEMLKCDKFPEGDVCIAMTPPNATEASKPQGTTVCPPCDNELKSEAIIEHLCASEFALRMKIK
EVKKENGDKKIVPKKKKPLKLGPIKKKDLKKLVLYLKNGADCPCHQLDNLSHHFLIMGRKVKSQYLLTAIHKWDKKNKEFKNFMKKMKNHECPTFQSVFK

sFrp2 (NP_003004) (SEQ ID NO: 12)

MLQGPGSLLLLFLASHCCLGSARGLFLFGQPDFSYKRSNCKPIPANLQLCHGIEYQNMRLPNLLGHETMKEVLEQAGAWIPLVMKQCHPDTKKFLCSLFAPVCLDDL
DETIQPCHSLCVQVKDRCAPVMSAFGFPWPDMLECDRFPQDNDLCIPLASSDHLLPATEEAPKVCEACKNKNDDDNDIMETLCKNDFALKIKVKEITYINRDTKIIL
ETKSKTIYKLNGVSERDLKKSVLWLKDSLQCTCEEMNDINAPYLVMGQKQGGELVITSVKRWQKGQREFKRISRSIRKLQC

FIG. 6C

sFrp3 (FRZB) (NP_001454) (SEQ ID NO: 13)

MVCGSPGGMLLLRAGLLALAALCLLRVPGARAAACEPVRIPLCKSLPWNMTKMPNHLHHSTQANAILAIEQFEGLLGTHCSPDLLFFLCAMYAPICTIDFQHEPIKP
CKSVCERARQGCEPILIKYRHSWPENLACEELPVYDRGVCISPEAIVTADGADFPMDSSNGNCRGASSERCKCKPIRATQKTYFRNNYNYVIRAKVKEIKTKCHDVT
AVVEVKEILKSSLVNIPRDTVNLYTSSGCLCPPLNVNEEYIIMGYEDEERSRLLLVEGSIAEKWKDRLGKKVKRWDMKLRHLGLSKSDSSNSDSTQSQKSGRNSNPR
QARN

sFrp4 (NP_003005) (SEQ ID NO: 14)

MFLSILVALCLWLHLALGVRGAPCEAVRIPMCRHMPWNITRMPNHLHHSTQENAILAIEQYEELVDVNCSAVLRFFFCAMYAPICTLEFLHDPIKPCKSVCQRARDD
CEPLMKMYNHSWPESLACDELPVYDRGVCISPEAIVTDLPEDVKWIDITPDMMVQERPLDVDCKRLSPDRCKCKKVKPTLATYLSKNYSYVIHAKIKAVQRSGCNEV
TTVVDVKEIFKSSSPIPRTQVPLITNSSCQCPHILPHQDVLIMCYEWRSRMMLLENCLVEKWRDQLSKRSIQWEERLQEQRRTVQDKKKTAGRTSRSNPPKPKGKPP
APKPASPKKNIKTRSAQKRTNPKRV

sFrp5 (NP_003006) (SEQ ID NO: 15)

MRAAAAAGGVRTAALALLLGALHWAPARCEEYDYYGWQAEPLHGRSYSKPPQCLDIPADLPLCHTVGYKRMRLPNLLEHESLAEVKQQASSWLPLLAKRCHSDTQVF
LCSLFAPVCLDRPIYPCRSLCEAVRAGCAPLMEAYGFPWPEMLHCHKFPLDNDLCIAVQFGHLPATAPPVTKICAQCEMEHSADGLMEQMCSSDFVVKMRIKEIKIE
NGDRKLIGAQKKKKLLKPGPLKRKDTKRLVLHMKNGAGCPCPQLDSLAGSFLVMGRKVDGQLLLMAVYRWDKKNKEMKFAVKFMFSYPCSLYYPFFYGAAEPH

Ror1 (NP_005003) (SEQ ID NO: 16)

MHRPRRRGTRPPLLALLAALLLAARGAAAQETELSVSAELVPTSSWNISSELNKDSYLTLDEPMNNITTSLGQTAELHCKVSGNPPPTIRWFKNDAPVVQEPRRLSF
RSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQCVATNGKEVVSSTGVLFVKFGPPPTASPGYSDEYEEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVYMESLHMQGEIENQITAAFTMIGTSSH
LSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDLCRDECEILENVLCQTEYIFARSNPMILMRLKLPNCEDLPQPESPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYNSTGVDY
RGTVSVTKSGRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPELNGGHSYCRNPGNQKEAPWCFTLDENFKSDLCDIPACDSKDSKEKNKMEILYILVPSVAIPLAIALLFFFICVC
RNNQKSSSAPVQRQPKHVRGQNVEMSMLNAYKPKSKAKELPLSAVRFMEELGECAFGKIYKGHLYLPGMDHAQLVAIKTLKDYNNPQQWMEFQQEASLMAELHHPNI
VCLLGAVTQEQPVCMLFEYINQGDLHEFLIMRSPHSDVGCSSDEDGTVKSSLDHGDFLHIAIQIAAGMEYLSSHFFVHKDLAARNILIGEQLHVKISDLGLSREIYS
ADYYRVQSKSLLPIRWMPPEAIMYGKFSSDSDIWSFGVVLWEIFSFGLQPYYGFSNQEVIEMVRKRQLLPCSEDCPPRMYSLMTECWNEIPSRRPRFKDIHVRLRSW
EGLSSHTSSTTPSGGNATTQTTSLSASPVSNLSNPRYPNYMFPSQGITPQGQIAGFIGPPIPQNQRFIPINGYPIPPGYAAFPAAHYQPTGPPRVIQHCPPPKSRSP
SSASGSTSTGHVTSLPSSGSNQEANIPLLPHMSIPNHPGGMGITVFGNKSQKPYKIDSKQASLLGDANIHGHTESMISAEL

FIG. 6D

151

Ror2 (NP_004551) (SEQ ID NO: 17)

MARGSALPRRPLLCIPAVWAAAALLLSVSRTSGEVEVLDPNDPLGPLDGQDGPIPTLKGYFLNFLEPVNNITIVQGQTAILHCKVAGNPPPNVRWLKNDAPVVQEPR
RIIIRKTEYGSRLRIQDLDTTDTGYYQCVATNGMKTITATGVLFVRLGPTHSPNHNFQDDYHEDGFCQPYRGIACARFIGNRTIYVDSLQMQGEIENRITAAFTMIG
TSTHLSDQCSQFAIPSFCHFVFPLCDARSRTPKPRELCRDECEVLESDLCRQEYTIARSNPLILMRLQLPKCEALPMPESPDAANCMRIGIPAERLGRYHQCYNGSG
MDYRGTASTTKSGHQCQPWALQHPHSHHLSSTDFPELGGGHAYCRNPGGQMEGPWCFTQNKNVRMELCDVPSCSPRDSSKMGILYILVPSIAIPLVIACLFFLVCMC
RNKQKASASTPQRRQLMASPSQDMEMPLINQHKQAKLKEISLSAVRFMEELGEDRFGKVYKGHLFGPAPGEQTQAVAIKTLKDKAEGPLREEFRHEAMLRARLQHPN
VVCLLGVVTKDQPLSMIFSYCSHGDLHEFLVMRSPHSDVGSTDDDRTVKSALEPPDFVHLVAQIAAGMEYLSSHHVVHKDLATRNVLVYDKLNVKISDLGLFREVYA
ADYYKLLGNSLLPIRWMAPEAIMYGKFSIDSDIWSYGVVLWEVFSYGLQPYCGYSNQDVVEMIRNRQVLPCPDDCPAWVYALMIECWNEFPSRRPRFKDIHSRLRAW
GNLSNYNSSAQTSGASNTTQTSSLSTSPVSNVSNARYVGPKQKAPPFPQPQFIPMKGQIRPMVPPPQLYVPVNGYQPVPAYGAYLPNFYPVQIPMQMAPQQVPPQMV
PKPSSHHSGSGSTSTGYVTTAPSNTSMADRAALLSEGADDTQNAPEDGAQSTVQEAEEEEEGSVPETELLGDCDTLQVDEAQVQLEA

FIG. 6E

Frz1-Fc (SEQ ID NO: 76)

MGGTAARLGAVILFVVIVGLHGVRGKIDEEGSGDAGGRRRPPVDPRRLARQLLLLLWLLEAPLLLGVRAQAAGQGPGQGPGPGQQPPPPPQQQQSGQQYNGERGISV
PDHGYCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSAELKFFLCSMYAPVCTVLEQALPPCRSLCERARQGCEALMNKFGFQWPDTLKCEK
FPVHGAGELCVGQNTSDKARGRAQVT*DKAARSTLCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS*
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Frz2-Fc (SEQ ID NO: 77)

MGGTAARLGAVILFVVIVGLHGVRGKIDARGAQFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYAP
VCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEDGRAQVT*DKAARSTLCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE*
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Frz3-Fc (SEQ ID NO: 78)

MGGTAARLGAVILFVVIVGLHGVRGKIDARGHSLFSCEPITLRMCQDLPYNTTFMPNLLNHYDQQTAALAMEPFHPMVNLDCSRDFRPFLCALYAPICMEYGRVTLP
CRRLCQRAYSECSKLMEMFGVPWPEDMECSRFPDCDEPYPRLVDLGRAQVT*DKAARSTLCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV*
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Frz4-Fc (SEQ ID NO: 79)

MGGTAARLGAVILFVVIVGLHGVRGKIDARGFGDEEERRCDPIRISMCQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDAELQLTTFTPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKINI
PIGPCGGMCLSVKRRCEPVLKEFGFAWPESLNCSKFPPQNDHNHMCMEGPGDEEGRAQVT*DKAARSTLCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV*
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Frz5-Fc (SEQ ID NO: 75)

MGGTAARLGAVILFVVIVGLHGVRGKIDARGASKAPVCQEITVPMCRGIGYNLTHMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLRFFLCSMYTPICLPDYHKPL
PPCRSVCERAKAGCSPLMRQYGFAWPERMSCDRLPVLGRDAEVLCMDYNRSEAGRAQVT*DKAARSTLCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD*
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 7A

Frz6-Fc (SEQ ID NO: 80)

MEMFTFLLTCIFLPLLRGHSLFTCEPITVPRCMKMAYNMTFFPNLMGHYDQSIAAVEMEHFLPLANLECSPNIETFLCKAFVPTCIEQIHVVPPCRKLCEKVYSDCK
KLIDTFGIRWPEELECDRLQYCDETVPVTFLESGGGGVTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Frz7-Fc (SEQ ID NO: 81)

MRDPGAAAPLSSLGLCALVLALLGALSAGAGAQPYHGEKGISVPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTILPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYA
PVCTVLDQAIPPCRSLCERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCENFPVHGAGEICVGQNTSDGLESGGGGVTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Frz8-Fc (SEQ ID NO: 74)

MEWGYLLEVTSLLAALAVLQRSSGAAAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPC
RSVCERAKAGCAPLMRQYGFAWPDRMRCDRLPEQGNPDTLCMDYNRTDLESGGGGVTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Frz9-Fc (SEQ ID NO: 82)

MAVAPLRGALLLWQLLAAGGAALEIGRFDPERGRGAAPCQAVEIPMCRGIGYNLTRMPNLLGHTSQEAAAELAEFAPLVQYGCHSHLRFFLCSLYAPMCTDQVSTP
IPACRPMCEQARLRCAPIMEQFNFGWPDSLDCARLPTRNDPHALCMEAPENATLESGGGGVTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Frz10-Fc (SEQ ID NO: 83)

MQRPGPRLWLVLQVMGSCAAISSMDMERPGDGKCQPIEIPMCKDIGYNMTRMPNLMGHENQREAAIQLHEFAPLVEYGCHGHLRFFLCSLYAPMCTEQVSTPIPACR
VMCEQARLKCSPIMEQFNFKWPDSLDCRKLPNKNDPNYLCMEAPNNGSLESGGGGVTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 7B

154

sFRP1-Fc (SEQ ID NO: 84)

MGIGRSEGGRRGAALGVLLALGAALLAVGSASEYDYVSFQSDIGPYQSGRFYTKPPQCVDIPADLRLCHNVGYKKMVLPNLLEHETMAEVKQQASSWVPLLNKNCHA
GTQVFLCSLFAPVCLDRPIYPCRWLCEAVRDSCEPVMQFFGFYWPEMLKCDKFPEGDVCIAMTPPNA*WRAQVT*DKAARSTLCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

sFRP2-Fc (SEQ ID NO: 85)

MLQGPGSLLLLFLASHCCLGSARGLFLFGQPDFSYKRSNCKPIPANLQLCHGIEYQNMRLPNLLGHETMKEVLEQAGAWIPLVMKQCHPDTKKFLCSLFAPVCLDDL
DETIQPCHSLCVQVKDRCAPVMSAFGFPWPDMLECDRFPQDNDLCIPLASSDH*WRAQVT*DKAARSTLCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

sFRP3-Fc (SEQ ID NO: 86)

MGGTAARLGAVILFVVIVGLHGVRGKIDARGAACEPVRIPLCKSLPWNMTKMPNHLHHSTQANAILAIEQFEGLLGTHCSPDLLFFLCAMYAPICTIDFQHEPIKPC
KSVCERARQGCEPILIKYRHSWPENLACEELPVYDRGVCISPEAIVT*GRAQVT*DKAARSTLCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

sFRP4-Fc (SEQ ID NO: 87)

MFLSILVALCLWLHLALGVRGAPCEAVRIPMCRHMPWNITRMPNHLHHSTQENAILAIEQYEELVDVNCSAVLRFFFCAMYAPICTLEFLHDPIKPCKSVCQRARDD
CEPLMKMYNHSWPESLACDELPVYDRGVCISPEAIVT*LESGGGGVT*DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

sFRP5-Fc (SEQ ID NO: 88)

MRAAAAAGGVRTAALALLLGALHWAPARCEEYDYYGWQAEPLHGRSYSKPPQCLDIPADLPLCHTVGYKRMRLPNLLEHESLAEVKQQASSWLPLLAKRCHSDTQVF
LCSLFAPVCLDRPIYPCRSLCEAVRAGCAPLMEAYGFPWPEMLHCHKFPLDNDLCIAVQFGHL*WRAQVT*DKAARSTLCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 7C

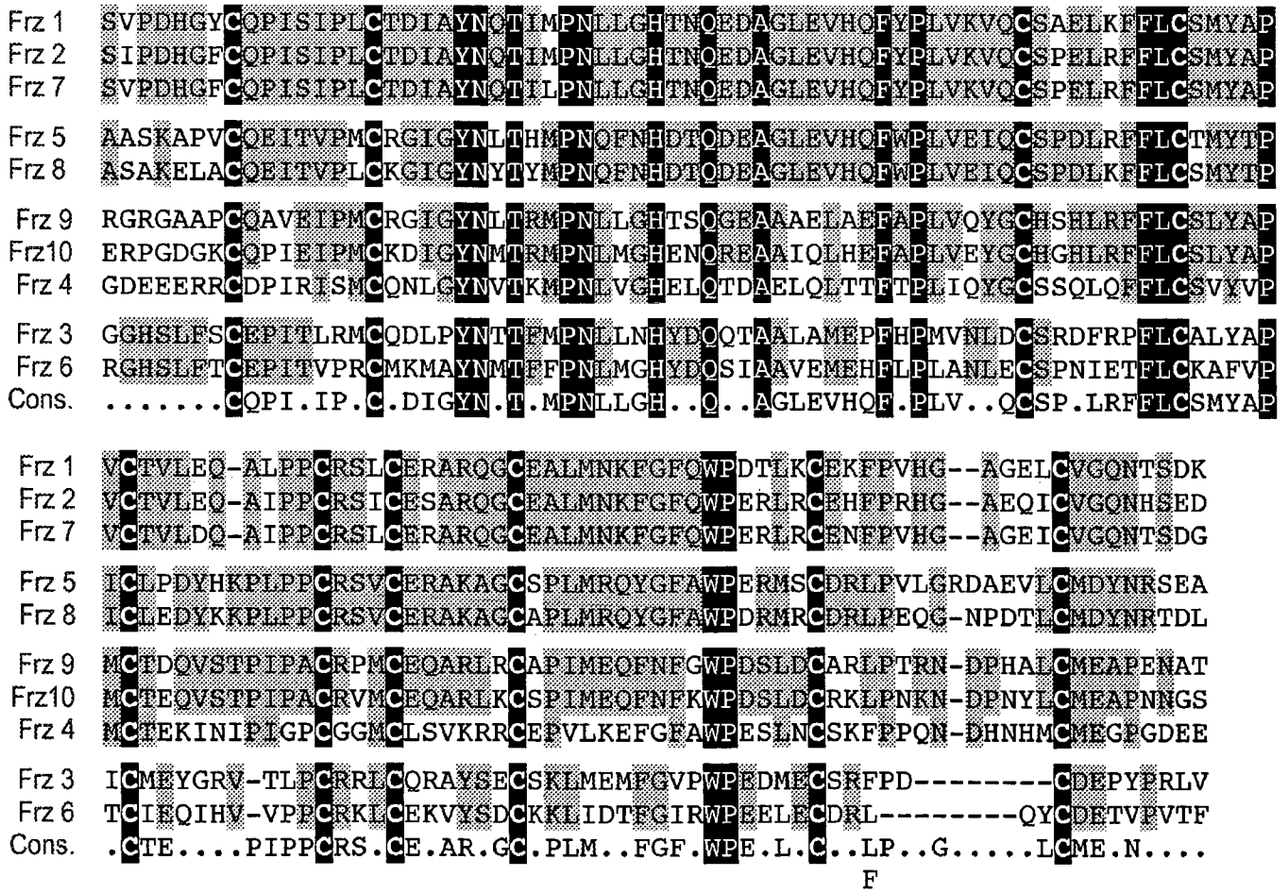

Frz 1 SVPDHGYCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSAELKFFLCSMYAP
Frz 2 SIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYAP
Frz 7 SVPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTILPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYAP
Frz 5 AASKAPVCQEITVPMCRGIGYNLTHMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLRFFLCTMYTP
Frz 8 ASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSMYTP
Frz 9 RGRGAAPCQAVEIPMCRGIGYNLTRMPNLLGHTSQGEAAAELAEFAPLVQYGCHSHLRFFLCSLYAP
Frz10 ERPGDGKCQPIEIPMCKDIGYNMTRMPNLMGHENQREAAIQLHEFAPLVEYGCHGHLRFFLCSLYAP
Frz 4 GDEEERRCDPIRISMCQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDAELQLTTFTPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVP
Frz 3 GGHSLFSCEPITLRMCQDLPYNTTFMPNLLNHYDQQTAAALAMEPFHPMVNLDCSRDFRPFLCALYAP
Frz 6 RGHSLFTCEPITVPRCMKMAYNMTFFPNLMGHYDQSIAAVEMEHFLPLANLECSPNIETFLCKAFVP
Cons. .......CQPI.IP.C.DIGYN.T.MPNLLGH..Q..AGLEVHQF.PLV..QCSP.LRFFLCSMYAP
Frz 1 VCTVLEQ-ALPPCRSLCERARQGCEALMNKFGFQWPDTLKCEKFPVHG--AGELCVGQNTSDK
Frz 2 VCTVLEQ-AIPPCRSICESARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHG--AEQICVGQNHSED
Frz 7 VCTVLDQ-AIPPCRSLCERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCENFPVHG--AGEICVGQNTSDG
Frz 5 ICLPDYHKPLPPCRSVCERAKAGCSPLMRQYGFAWPERMSCDRLPVLGRDAEVLCMDYNRSEA
Frz 8 ICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAWPDRMRCDRLPEQG-NPDTLCMDYNRTDL
Frz 9 MCTDQVSTPIPACRPMCEQARLRCAPIMEQFNFGWPDSLDCARLPTRN-DPHALCMEAPENAT
Frz10 MCTEQVSTPIPACRVMCEQARLKCSPIMEQFNFKWPDSLDCRKLPNKN-DPNYLCMEAPNNGS
Frz 4 MCTEKINIPIGPCGGMCLSVKRRCEPVLKEFGFAWPESLNCSKFPPQN-DHNHMCMEGPGDEE
Frz 3 ICMEYGRV-TLPCRRLCQRAYSECSKLMEMFGVPWPEDMECSRFPD--------CDEPYPRLV
Frz 6 TCIEQIHV-VPPCRKLCEKVYSDCKKLIDTFGIRWPEELECDRL--------QYCDETVPVTF
Cons. .CTE....PIPPCRS.CE.AR.GC.PLM..FGF.WPE.L.C..LP..G.....LCME.N....
F

FIG. 8

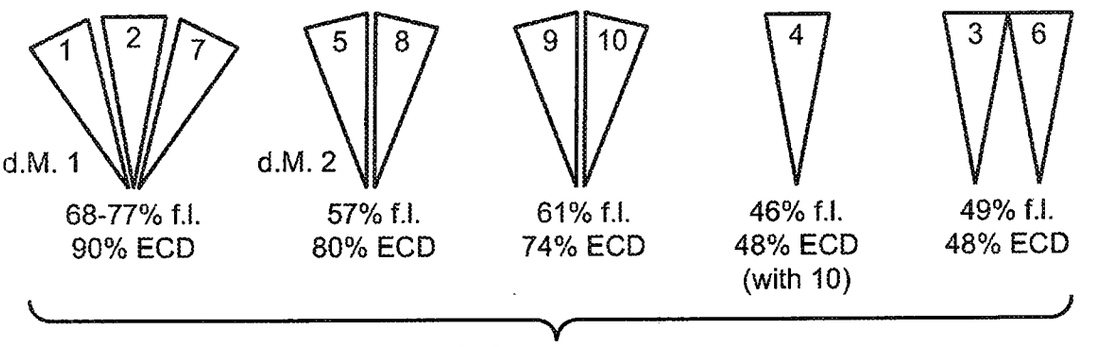


FIG. 9

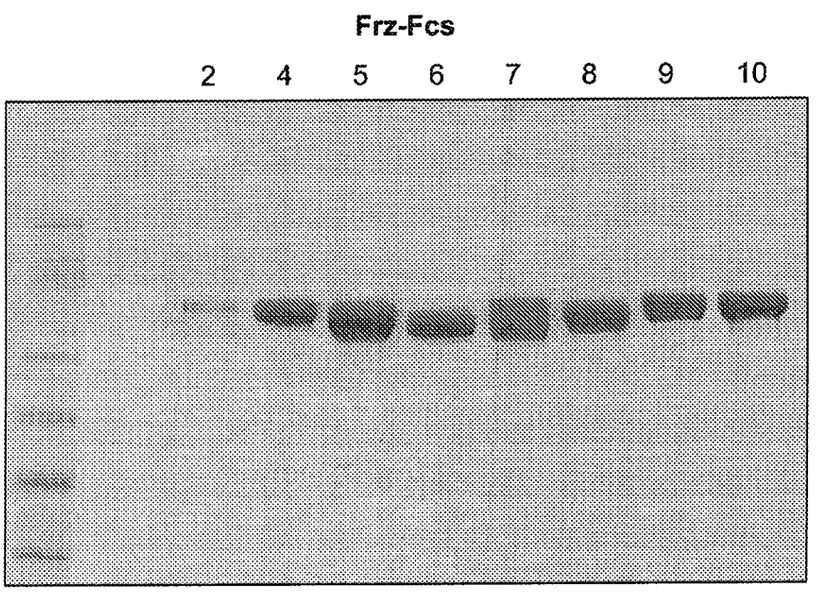


FIG. 10

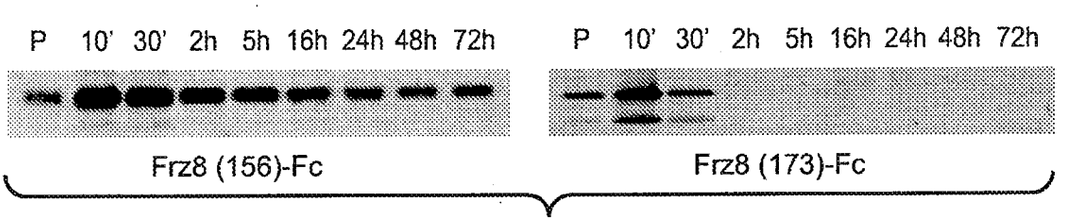


FIG. 11A

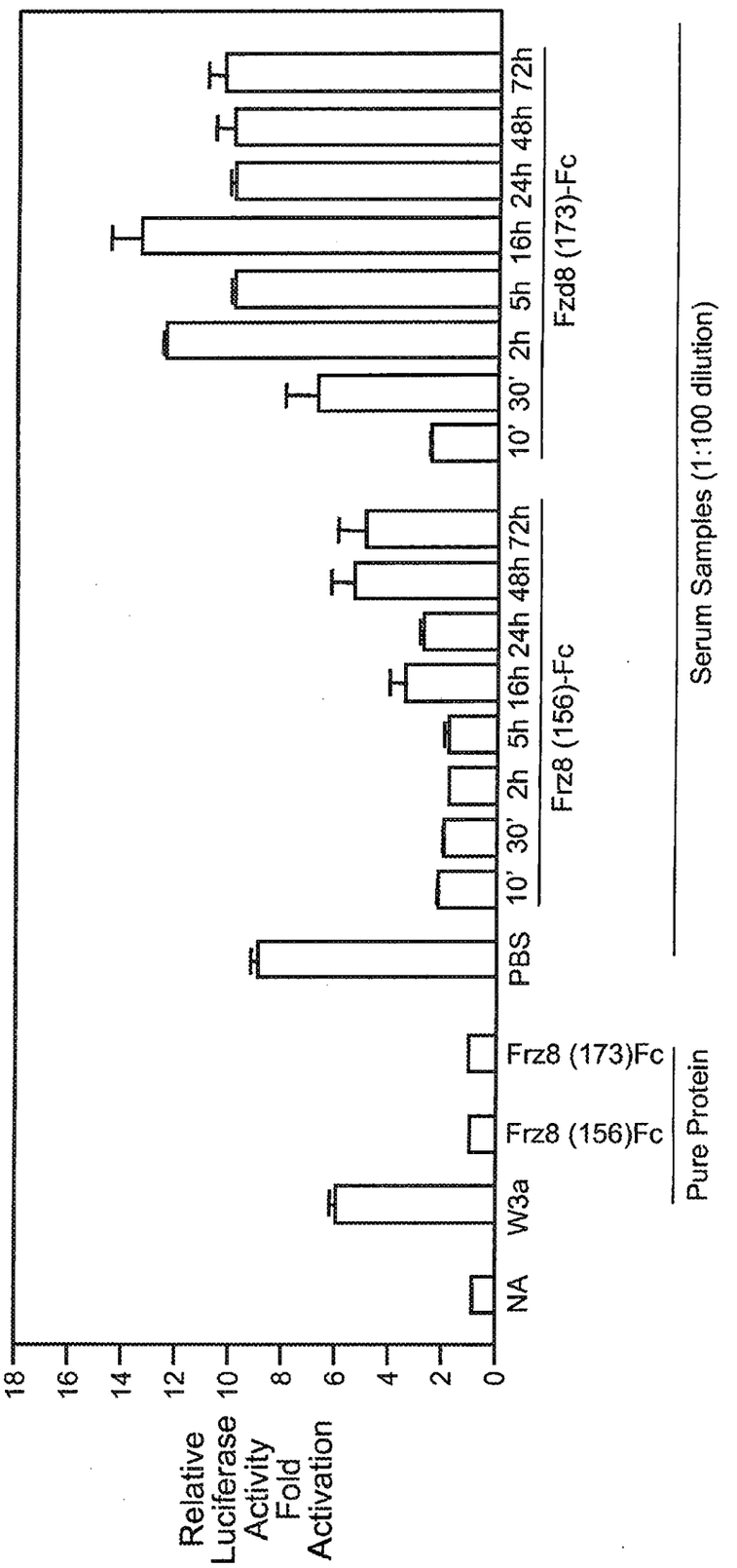

Relative Luciferase Activity Fold Activation
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
NA
W3a
Frz8 (156)Fc
Frz8 (173)Fc
PBS
10' 30' 2h 5h 16h 24h 48h 72h
Frz8 (156)-Fc
10' 30' 2h 5h 16h 24h 48h 72h
Fzd8 (173)-Fc
Pure Protein
Serum Samples (1:100 dilution)

FIG. 11B

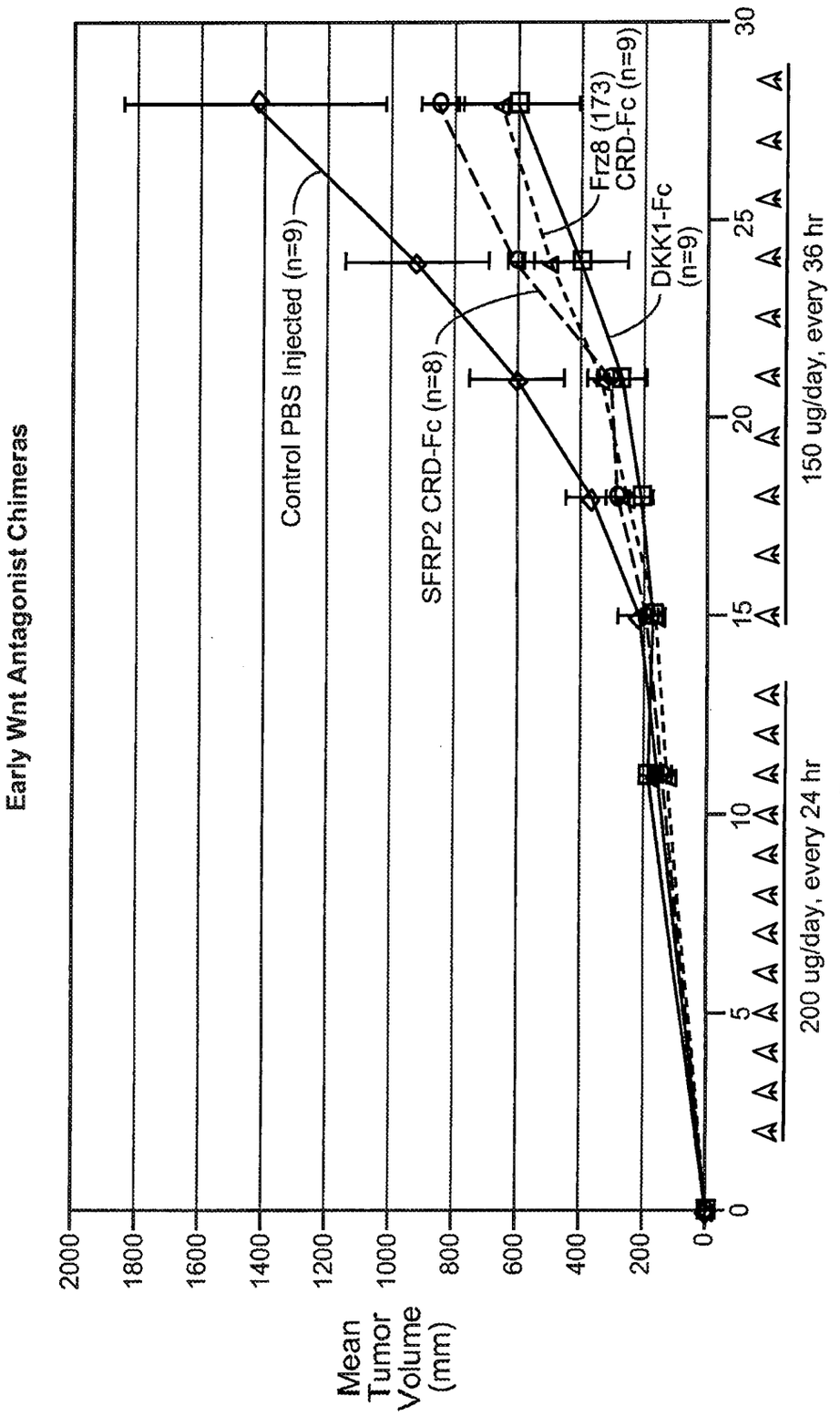

Early Wnt Antagonist Chimeras
Mean Tumor Volume (mm)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Control PBS Injected (n=9)
SFRP2 CRD-Fc (n=8)
Frz8 (173) CRD-Fc (n=9)
DKK1-Fc (n=9)
0
5
10
15
20
25
30
Day Post Transplantation
200 ug/day, every 24 hr
150 ug/day, every 36 hr

FIG. 12

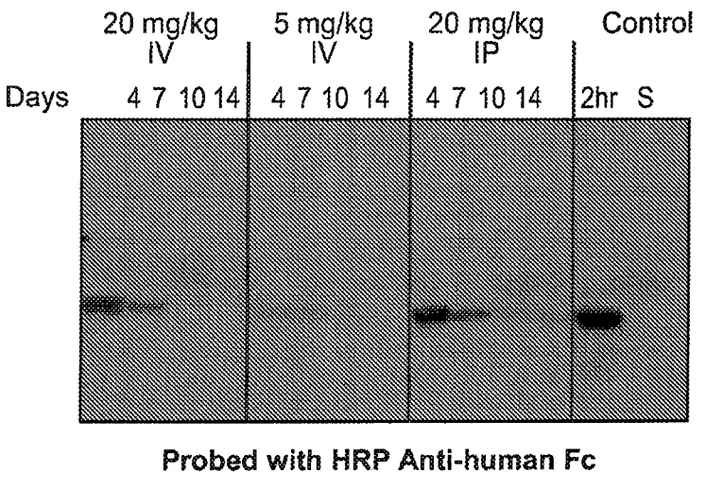


FIG. 13A

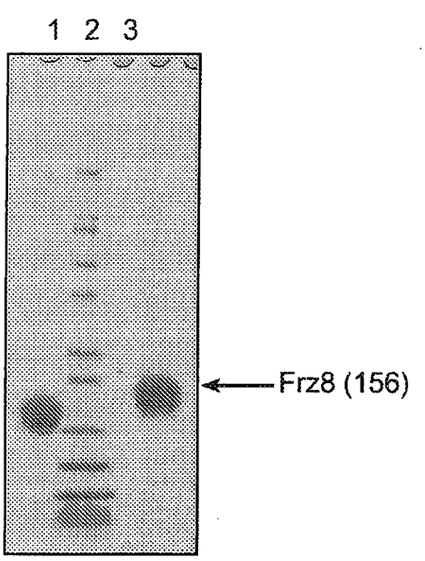


FIG. 14B

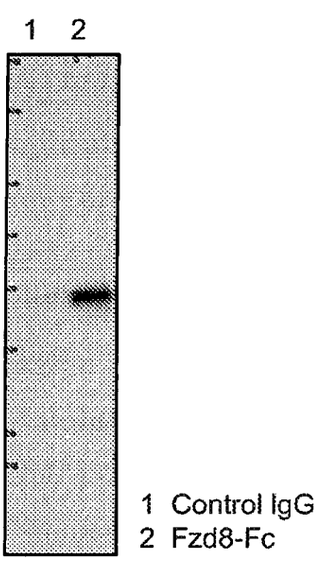


FIG. 15B

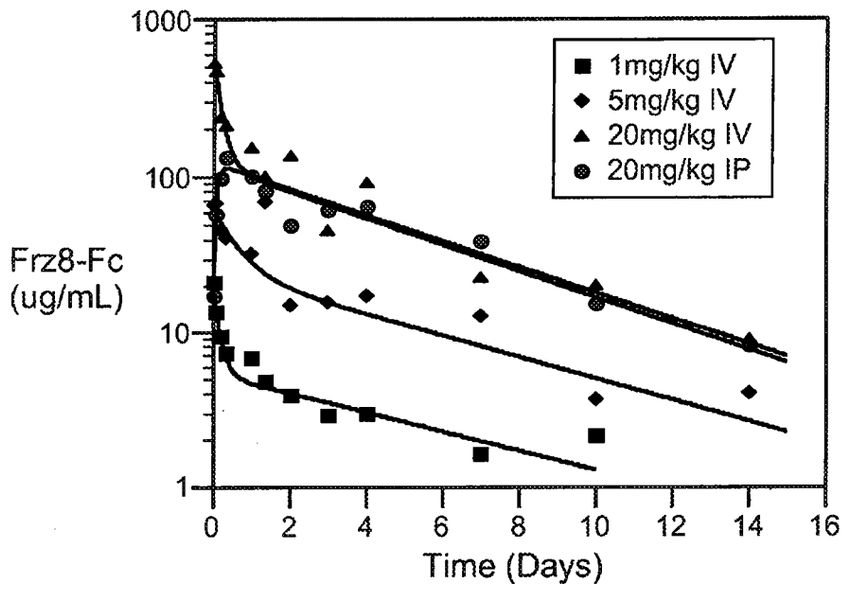


FIG. 13B

Symbols = Observed
Lines = Predicted

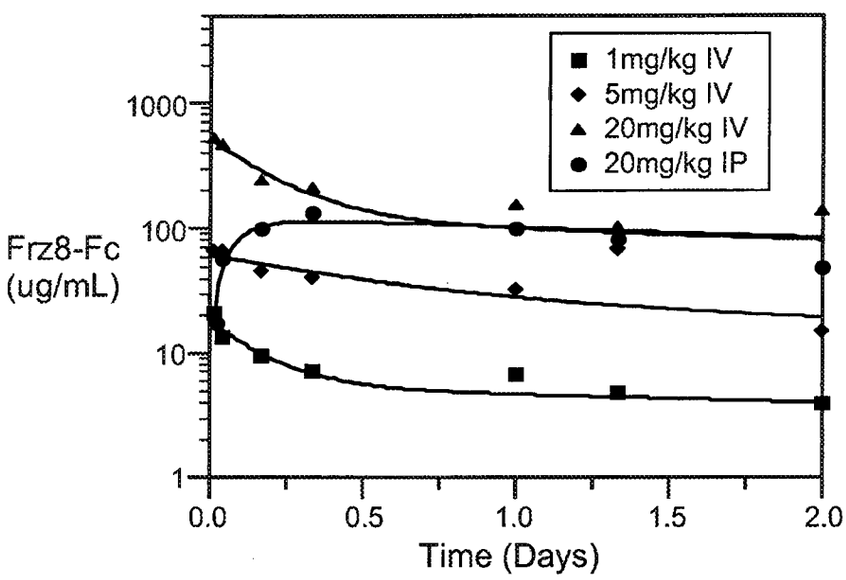


FIG. 13C

Symbols = Observed
Lines = Predicted

	Frz8-Fc 1mg/kg IV	Frz8-Fc 5mg/kg IV	Frz8-Fc 20mg/kg IV	Frz8-Fc 20mg/kg IP
AUC (day*ug/mL)	39.7	179	687	633
CL or CL/F (mL/day/kg)	25.2	28.0	29.1	31.6
Alpha HL (Hours)	2.76	10.0	3.29	
T1/2 (Days)	4.86	4.32	3.52	3.62
Tmax (Hours)				8.38
Cmax (ug/mL)	18.3	62.4	515	113
V1 (ml/kg)	54.6	80.1	38.8	
Vss or V/F (ml/kg)	167	154	133	165

FIG. 13D

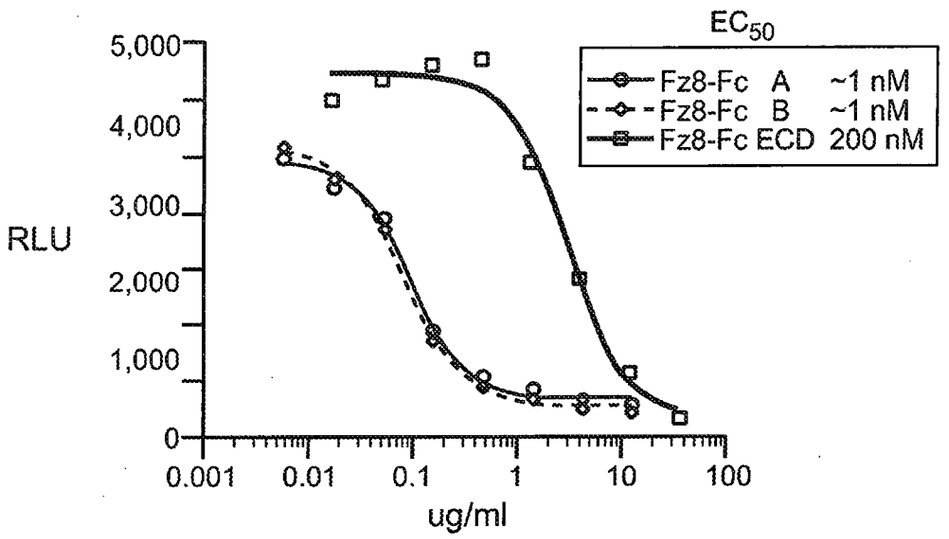


FIG. 14A

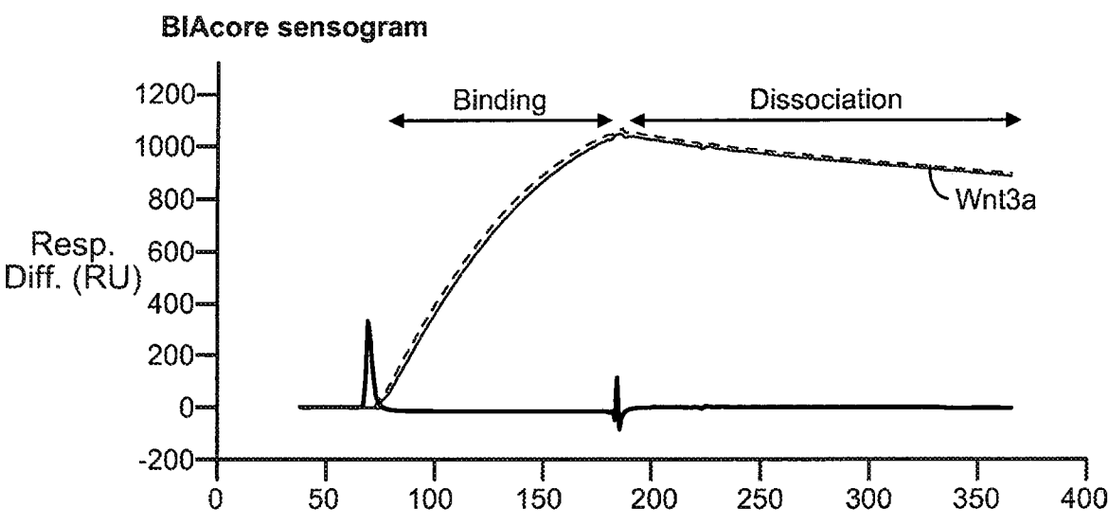


FIG. 15A

FIG. 16A

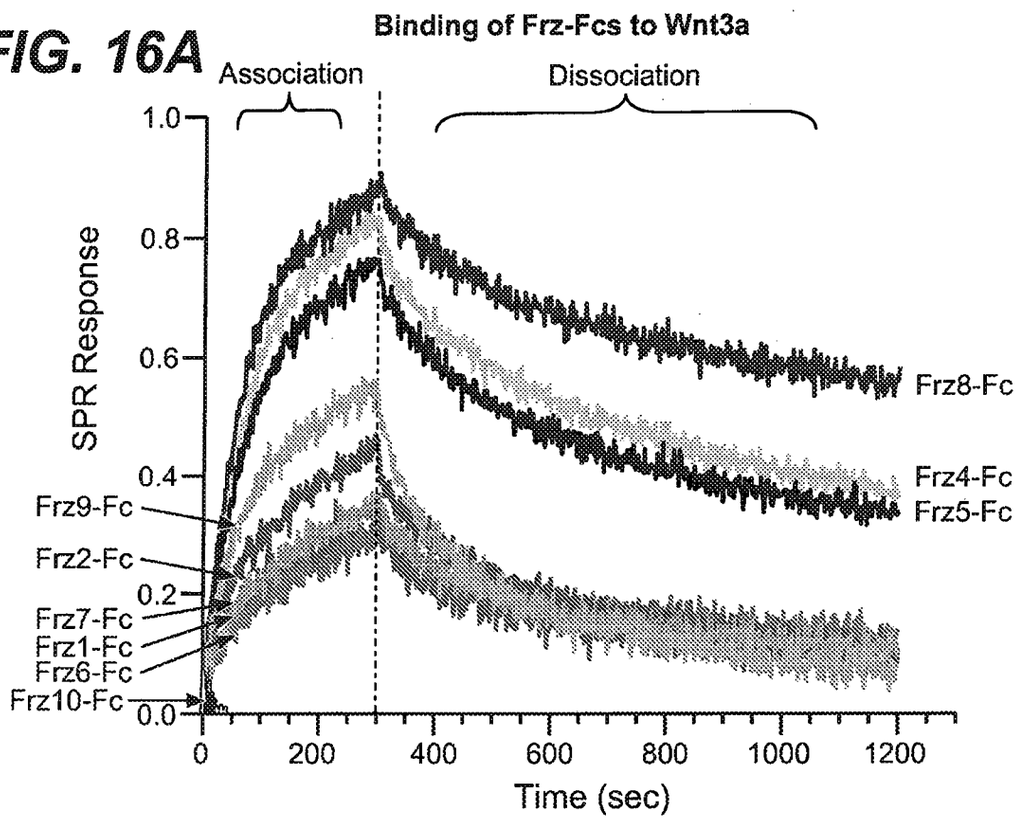
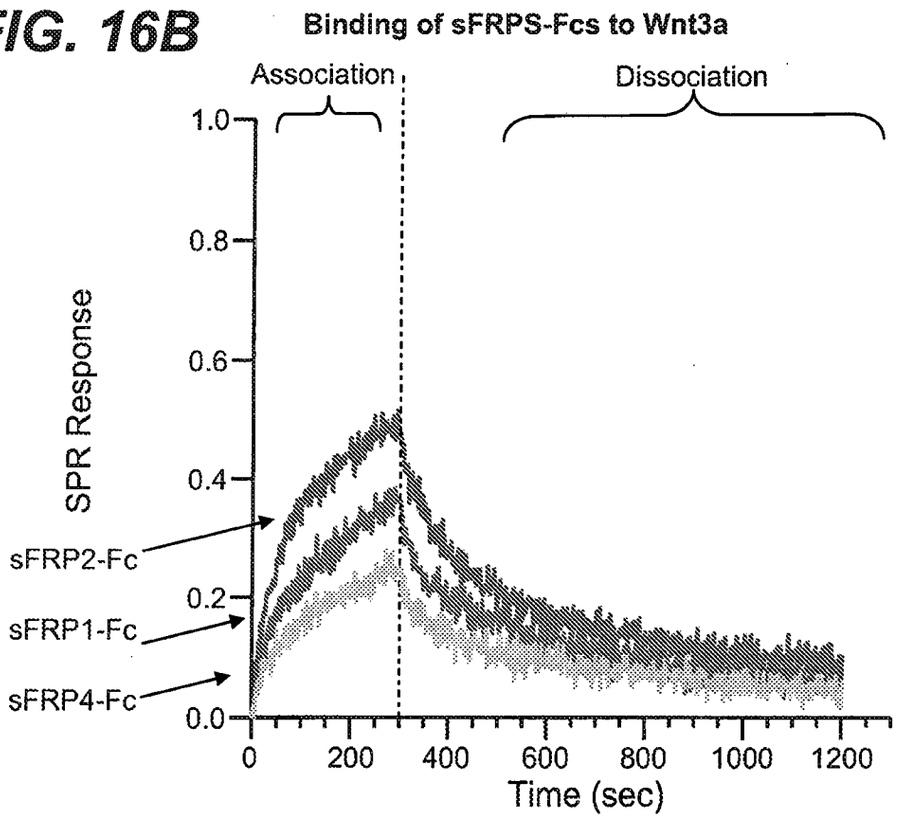


FIG. 16B



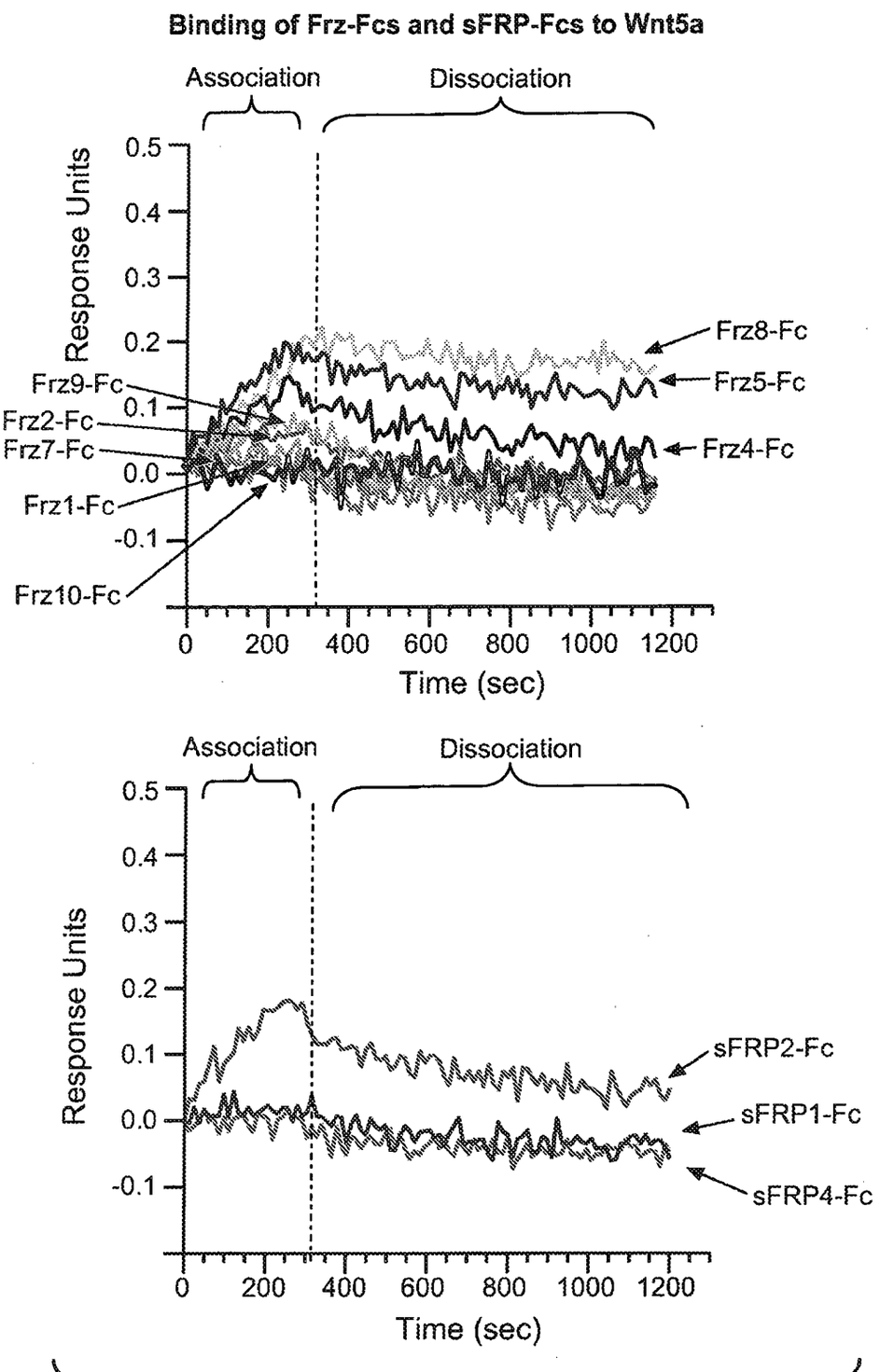

Binding of Frz-Fcs and sFRP-Fcs to Wnt5a
Association
Dissociation
Response Units
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
Frz8-Fc
Frz5-Fc
Frz4-Fc
Frz9-Fc
Frz2-Fc
Frz7-Fc
Frz1-Fc
Frz10-Fc
0
200
400
600
800
1000
1200
Time (sec)
Association
Dissociation
Response Units
sFRP2-Fc
sFRP1-Fc
sFRP4-Fc
Time (sec)

FIG. 16C

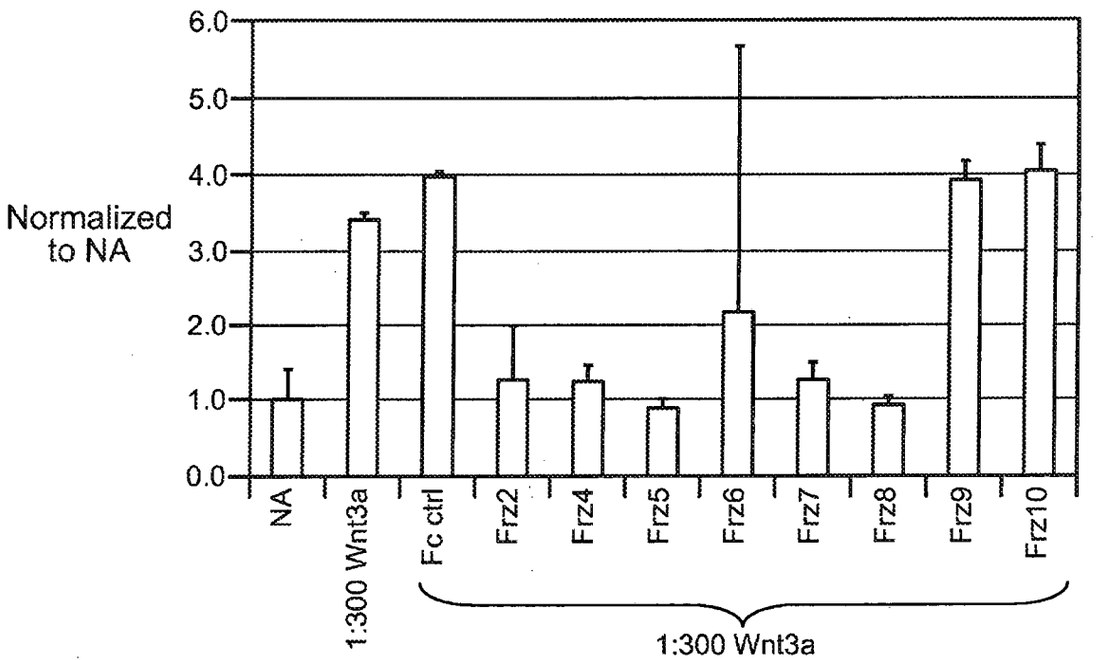


FIG. 17A

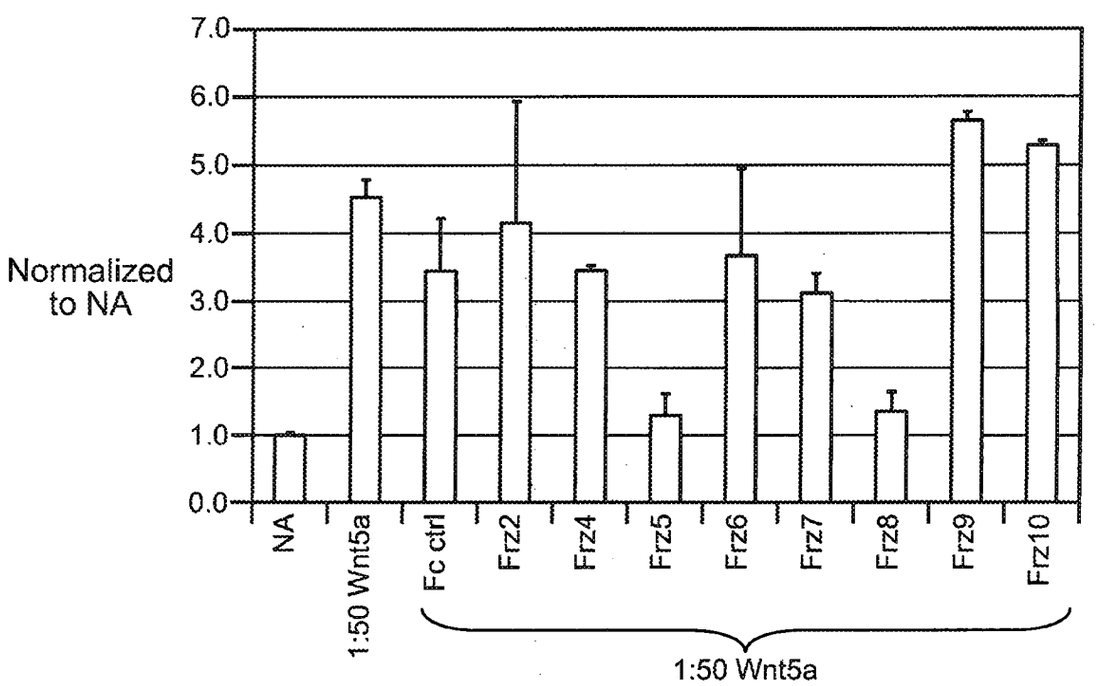


FIG. 17B

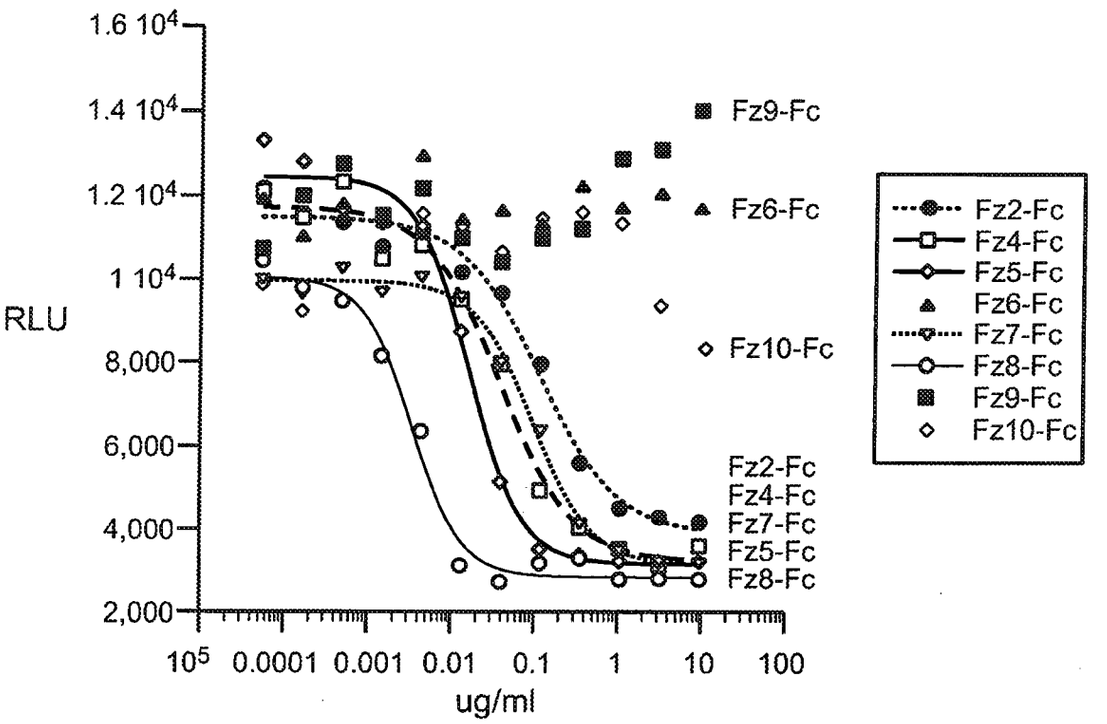

1.6 10^4
1.4 10^4
1.2 10^4
1 10^4
8,000
6,000
4,000
2,000
RLU
10^5 0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
ug/ml
Fz9-Fc
Fz6-Fc
Fz10-Fc
Fz2-Fc
Fz4-Fc
Fz7-Fc
Fz5-Fc
Fz8-Fc
Fz2-Fc
Fz4-Fc
Fz5-Fc
Fz6-Fc
Fz7-Fc
Fz8-Fc
Fz9-Fc
Fz10-Fc

FIG. 18

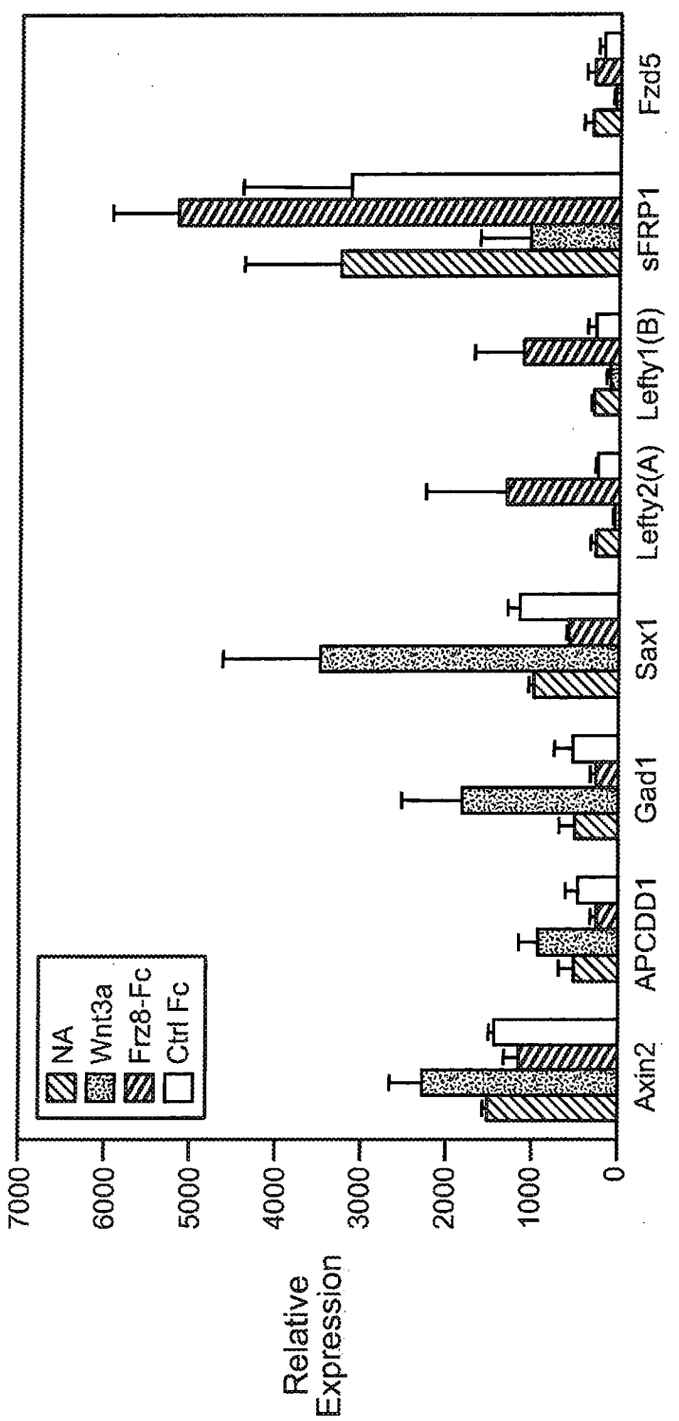

NA
Wnt3a
Frz8-Fc
Ctrl Fc
Relative Expression
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Axin2
APCDD1
Gad1
Sax1
Lefty2(A)
Lefty1(B)
sFRP1
Fzd5
Target Gene

FIG. 19A

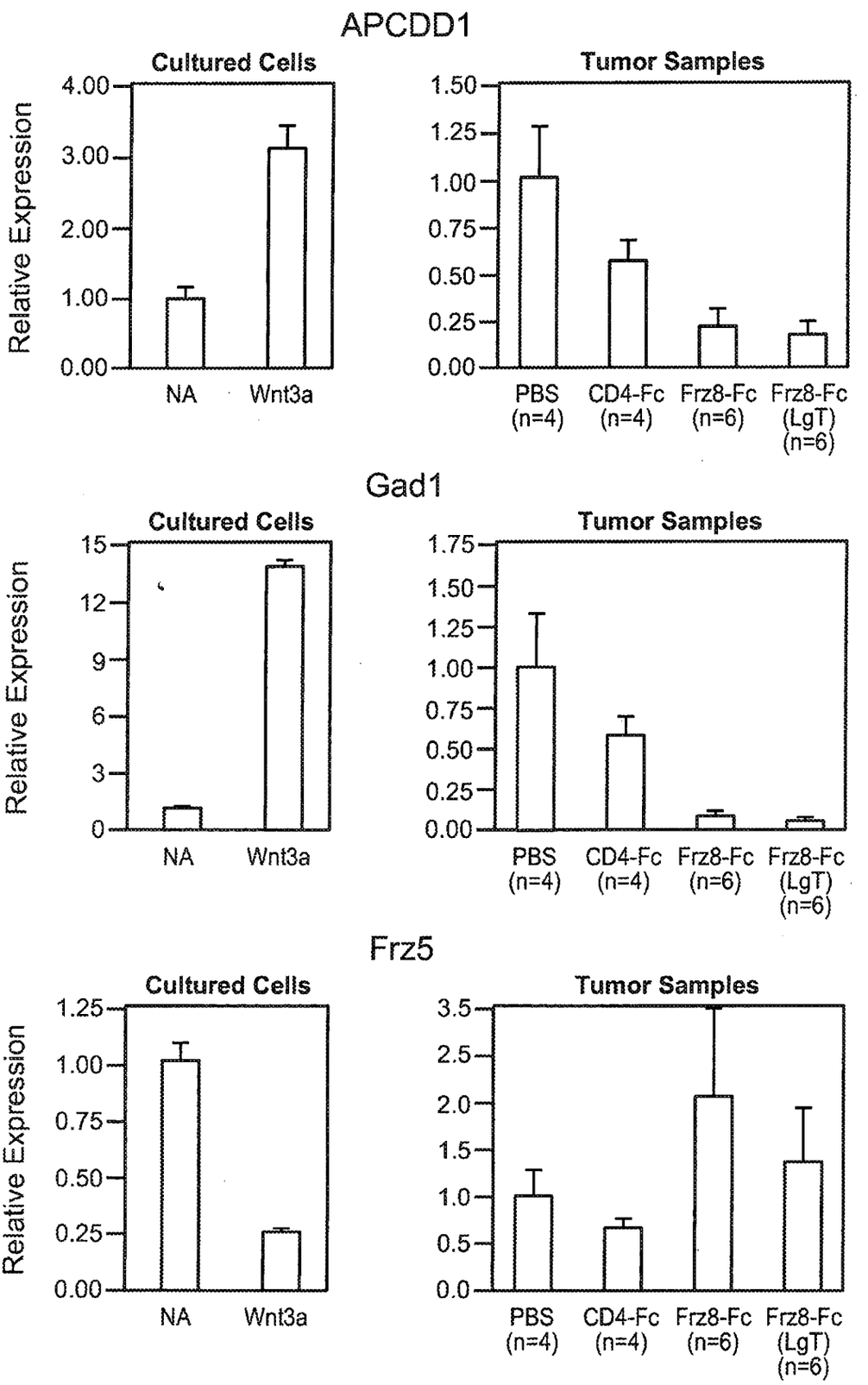

APCDD1
Cultured Cells
Tumor Samples
Relative Expression
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
NA
Wnt3a
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
PBS (n=4)
CD4-Fc (n=4)
Frz8-Fc (n=6)
Frz8-Fc (LgT) (n=6)
Gad1
Cultured Cells
Tumor Samples
Relative Expression
15
12
9
6
3
0
NA
Wnt3a
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
PBS (n=4)
CD4-Fc (n=4)
Frz8-Fc (n=6)
Frz8-Fc (LgT) (n=6)
Frz5
Cultured Cells
Tumor Samples
Relative Expression
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
NA
Wnt3a
3.5
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
PBS (n=4)
CD4-Fc (n=4)
Frz8-Fc (n=6)
Frz8-Fc (LgT) (n=6)

FIG. 19B

Gene Name	Accession No.	Forward Primer	Reverse Primer	Probe Sequence
Lefty1 (B)	NM_020997	CTAAGCACTTACATGTGGAGATACTG (SEQ ID NO: 89)	ACAGGACAAGTAAACAATGACACA (SEQ ID NO: 90)	AACCTGAGGGCAGAAAGCCCAA (SEQ ID NO: 91)
Lefty2 (A)	NM_003240	TTCCCACACTGTCTTAGAGAACTT (SEQ ID NO:92)	TTCTGAGTATCTACATTCAATTGCTTT (SEQ ID NO: 93)	AAACATGCAAATACATGTGGTTTCTGGTGAC (SEQ ID NO: 94)
Gad1	NM_000817	TGACTCGCTTAGCTGAAACCT (SEQ ID NO: 95)	TGAGCCTGGTCACTTTATCTGA (SEQ ID NO: 96)	TCAGAAGGTCTTCGGAAATGTTGCCT (SEQ ID NO: 97)
APCDD1	NM_153000	TGTGGTTGCAGCCTGTCT (SEQ ID NO: 98)	AACCAACTCTGCATTGGATTC (SEQ ID NO: 99)	CCTTTGAAATTGTTTTACTCTCTGAGTTTTATATGCTG (SEQ ID NO: 100)
Axin2	NM_004655	CTCCGTGTGTCGCCTAT (SEQ ID NO: 101)	CATGACAAAAGTCATTGAGTACAAGA (SEQ ID NO: 102)	TTGAGGGCTCAAGCTTTCCCTTGT (SEQ ID NO: 103)
Sax1	XM_372331	GAACCTCGCGCTGTCTCT (SEQ ID NO: 104)	ACTTGGTCCTGCGATTCTG (SEQ ID NO: 105)	AGCCTCACCGAGACGCAGGTC (SEQ ID NO: 106)
Fzd5	NM_003468	GGCAACAATTTACCTTTGCTT (SEQ ID NO: 107)	GAACCAAGTGGAACTTCATTACA (SEQ ID NO: 108)	CGCCAACCTTAGGATTGTAAAGCCC (SEQ ID NO: 109)
sFRP1	NM_003012	CAGATACACAGGACATGGATGA (SEQ ID NO: 110)	CAAAGCTTTTGTAAGAGACTTAGGAT (SEQ ID NO: 111)	CCGTTTCCTCTAGTTTCTTCCTGTAGTACTCCTCT (SEQ ID NO: 112)

FIG. 20

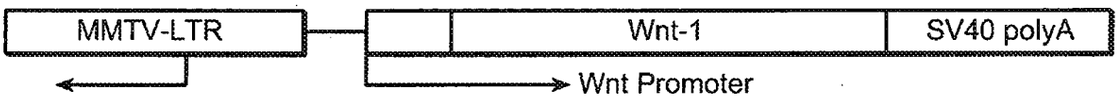


FIG. 21

Mean Tumor Volumes

	PBS ip		CD4 ip		Frz ip	
Day	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
0	225.93	9.61	226.89	9.64	226.91	10.43
4	204.15	14.75	175.55	16.55	219.03	15.48
7	277.53	43.16	259.37	25.02	191.11	29.50
11	457.82	122.93	429.21	85.56	140.81	11.93
14	1031.84	333.62	1112.39	238.44	113.56	12.62
18	1767.01	513.69	1935.97	404.77	67.31	7.48

Mean % Change in Tumor Volume

	PBS ip		CD4 ip		Frz ip	
Day	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
4	-8.07	7.36	-22.91	5.76	-3.66	4.79
7	28.57	23.12	14.51	10.51	-16.76	11.34
11	116.03	61.46	90.58	41.23	-37.28	5.31
14	396.12	165.30	388.61	105.48	-49.84	5.25
18	736.95	252.59	766.50	189.04	-69.67	3.51

FIG. 22B

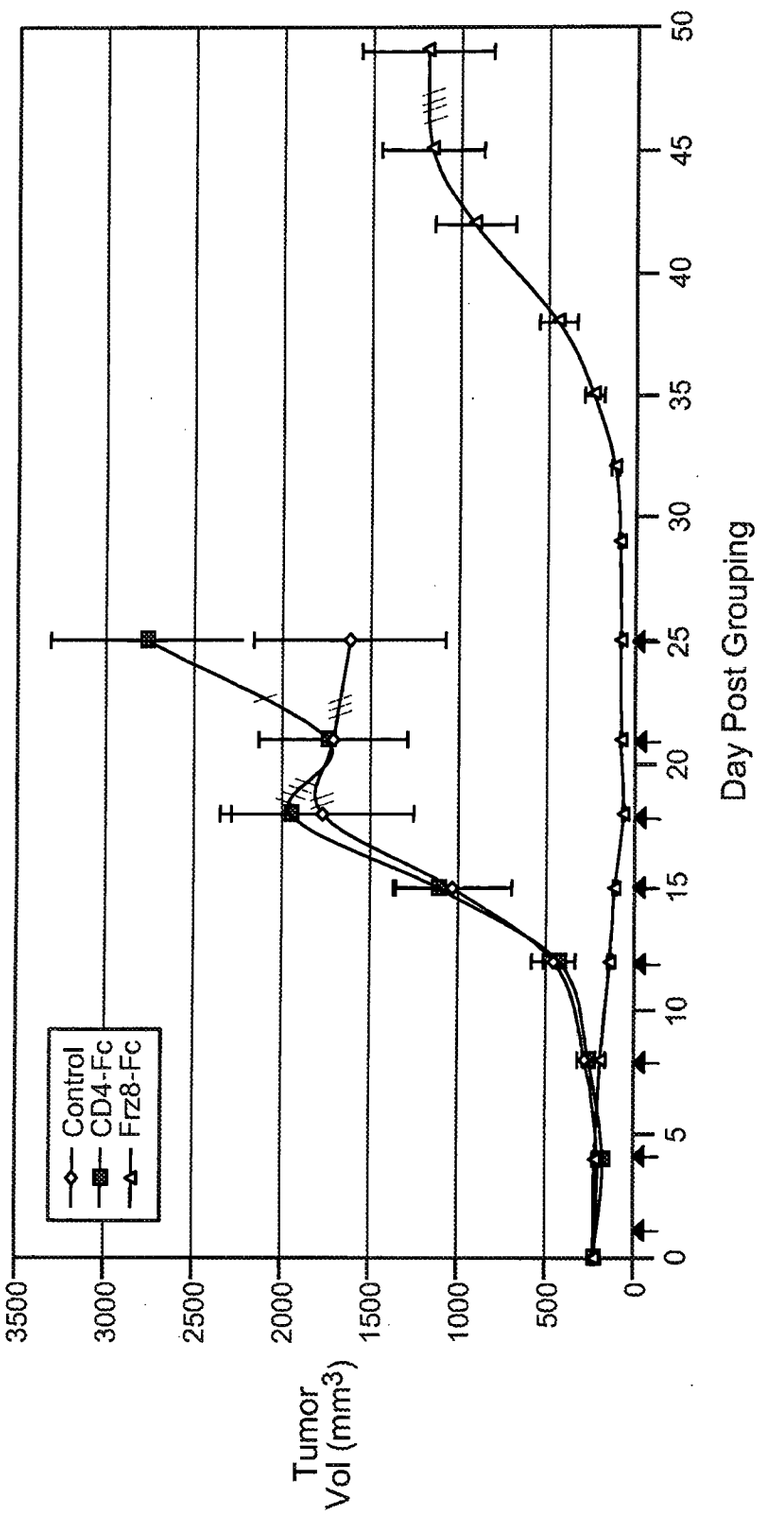

Tumor Vol (mm^3)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Day Post Grouping
Control
CD4-Fc
Frz8-Fc

FIG. 22A

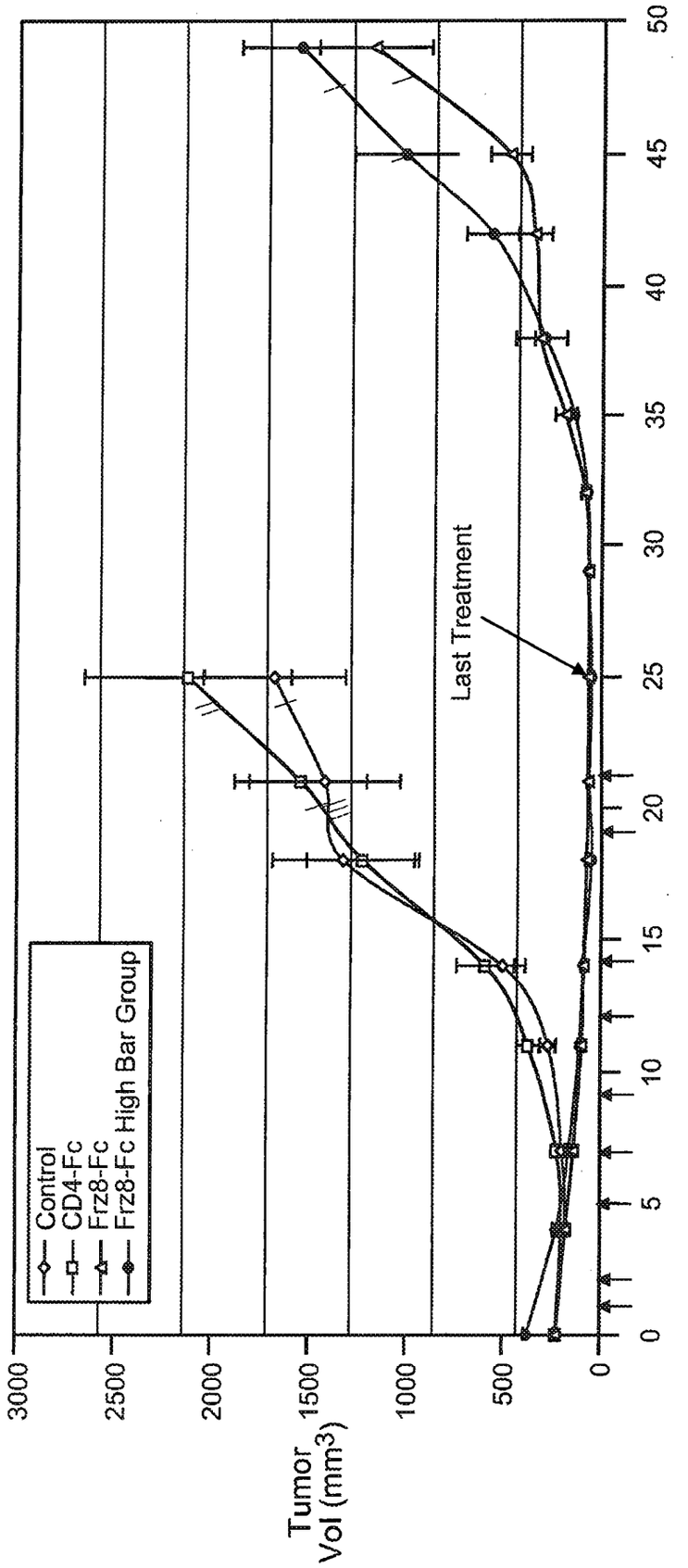

Tumor Vol (mm3)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Day Post Grouping
Last Treatment
Control
CD4-Fc
Frz8-Fc
Frz8-Fc High Bar Group

FIG. 23A

Mean Tumor Volumes

	PBS iv		CD4 iv		Frz iv		Frz iv High Group	
Day	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
0	225.77	10.49	225.61	10.09	225.95	9.97	376.03	13.90
4	181.27	12.97	202.13	13.68	178.60	10.86	225.50	16.47
7	196.93	16.02	224.70	18.96	137.38	7.15	161.01	10.29
11	268.38	41.88	371.32	62.94	97.76	11.03	107.32	7.90
14	504.20	122.01	592.14	161.73	89.54	10.45	88.39	8.27
18	1324.53	381.24	1224.00	315.88	73.27	7.01	52.66	7.52

Mean % Change in Tumor Volume

	PBS iv		CD4 iv		Frz iv		Frz iv High Group	
Day	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
4	-19.75	4.49	-9.94	5.18	-20.97	3.31	-39.19	5.19
7	-12.72	6.13	3.06	11.85	-38.25	3.92	-56.90	2.88
11	16.07	15.71	71.13	30.63	-57.08	4.51	-71.22	2.23
14	110.70	45.68	177.25	75.09	-60.25	4.63	-76.15	2.15
18	440.18	143.18	477.62	150.60	-67.10	3.14	-85.64	2.17

FIG. 23B

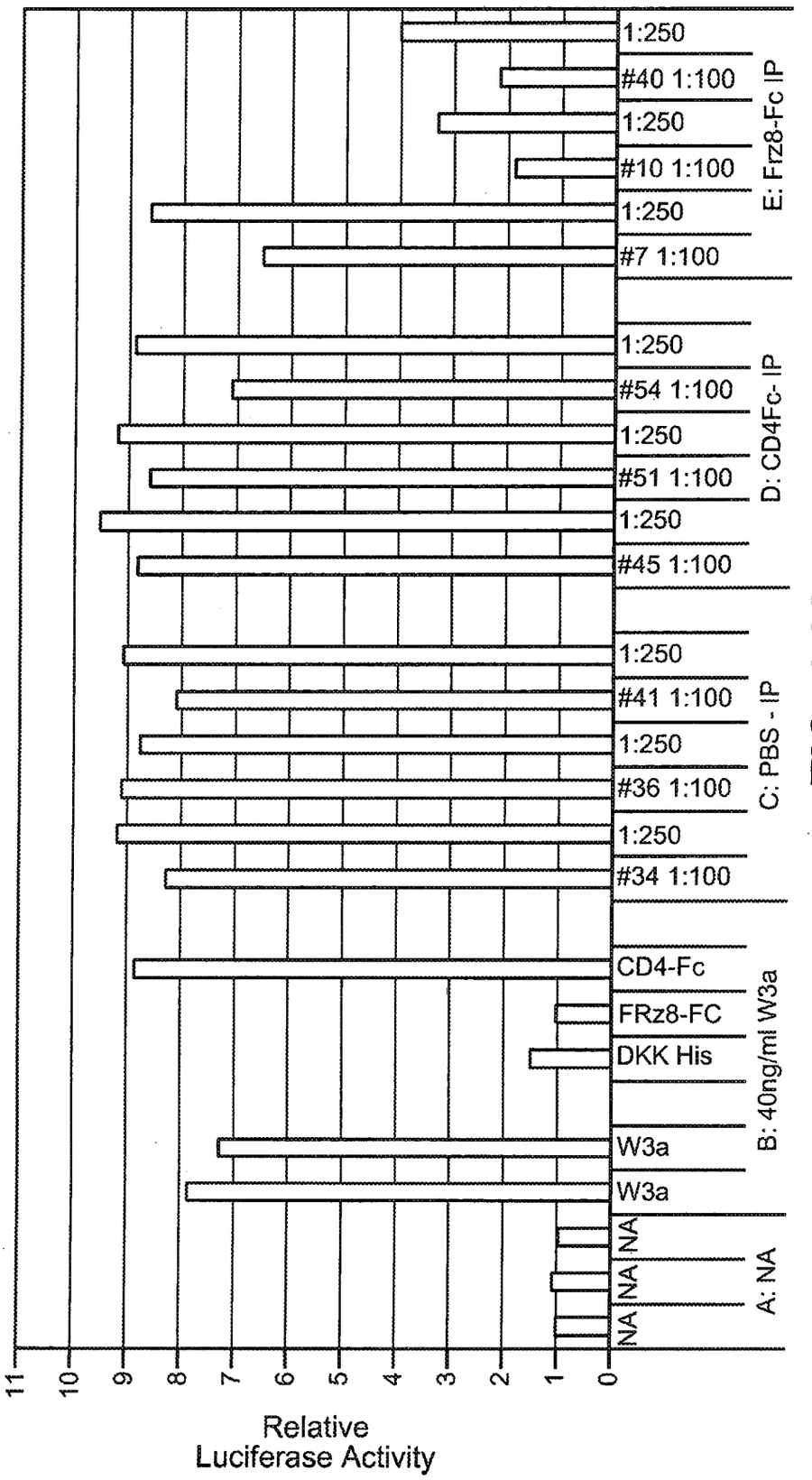

1:250
#40 1:100
1:250
#10 1:100
1:250
#7 1:100
E: Frz8-Fc IP
1:250
#54 1:100
1:250
#51 1:100
1:250
#45 1:100
D: CD4Fc- IP
1:250
#41 1:100
1:250
#36 1:100
1:250
#34 1:100
C: PBS - IP
CD4-Fc
FRz8-FC
DKK His
W3a
W3a
B: 40ng/ml W3a
NA
NA
NA
A: NA
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Relative
Luciferase Activity

FIG. 24A

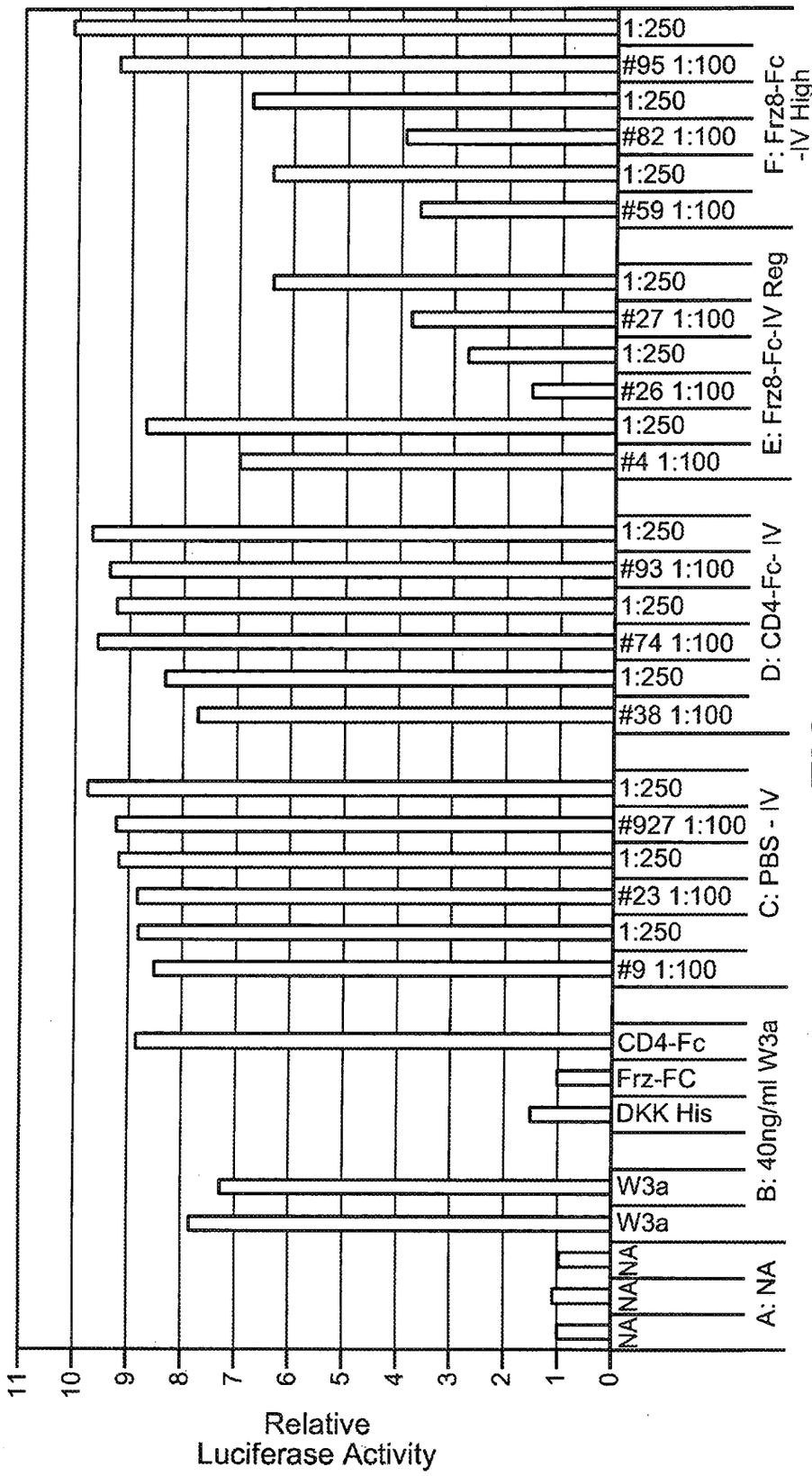

1:250
#95 1:100
1:250
#82 1:100
1:250
#59 1:100
F: Frz8-Fc -IV High
1:250
#27 1:100
1:250
#26 1:100
1:250
#4 1:100
E: Frz8-Fc-IV Reg
1:250
#93 1:100
1:250
#74 1:100
1:250
#38 1:100
D: CD4-Fc- IV
1:250
#927 1:100
1:250
#23 1:100
1:250
#9 1:100
C: PBS - IV
CD4-Fc
Frz-FC
DKK His
W3a
W3a
B: 40ng/ml W3a
NA
NA
NA
A: NA
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Relative
Luciferase Activity

FIG. 24B

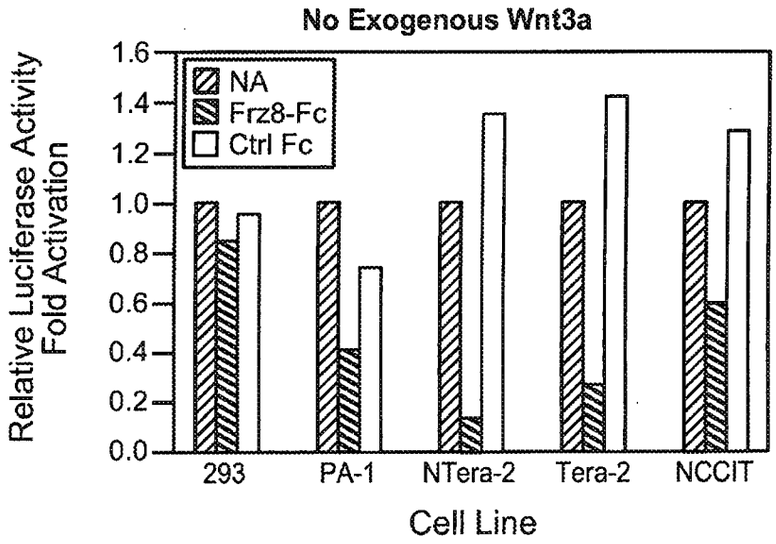


FIG. 25A

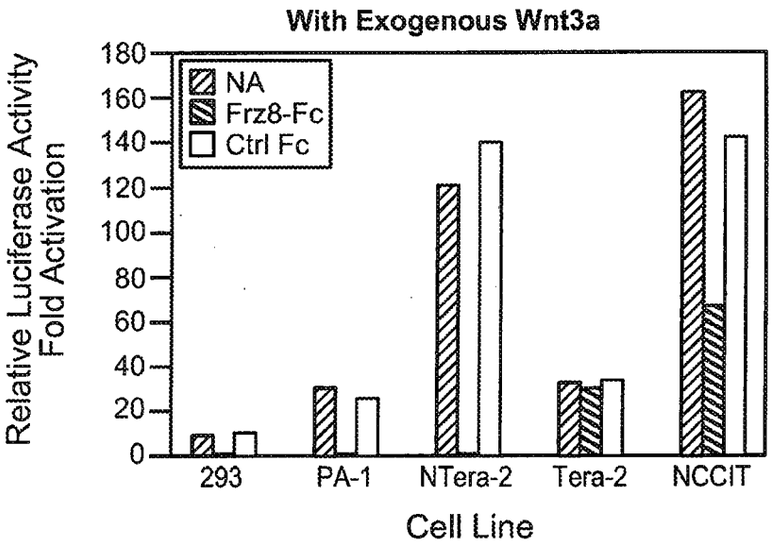


FIG. 25B

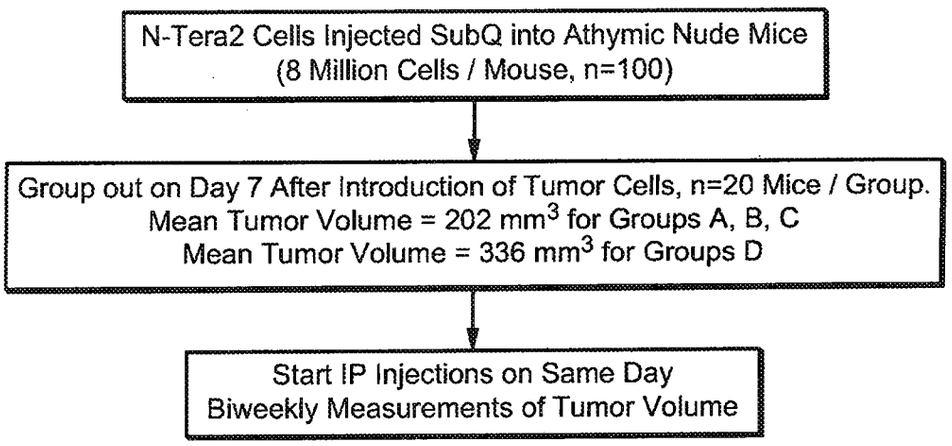


FIG. 26A

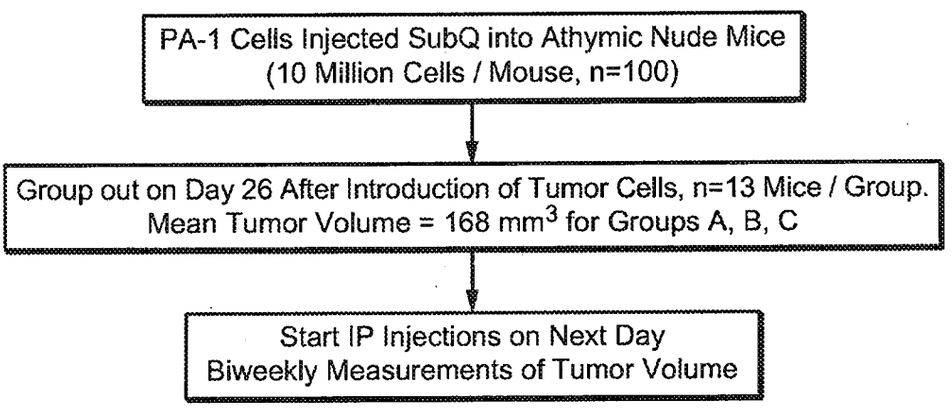


FIG. 28A

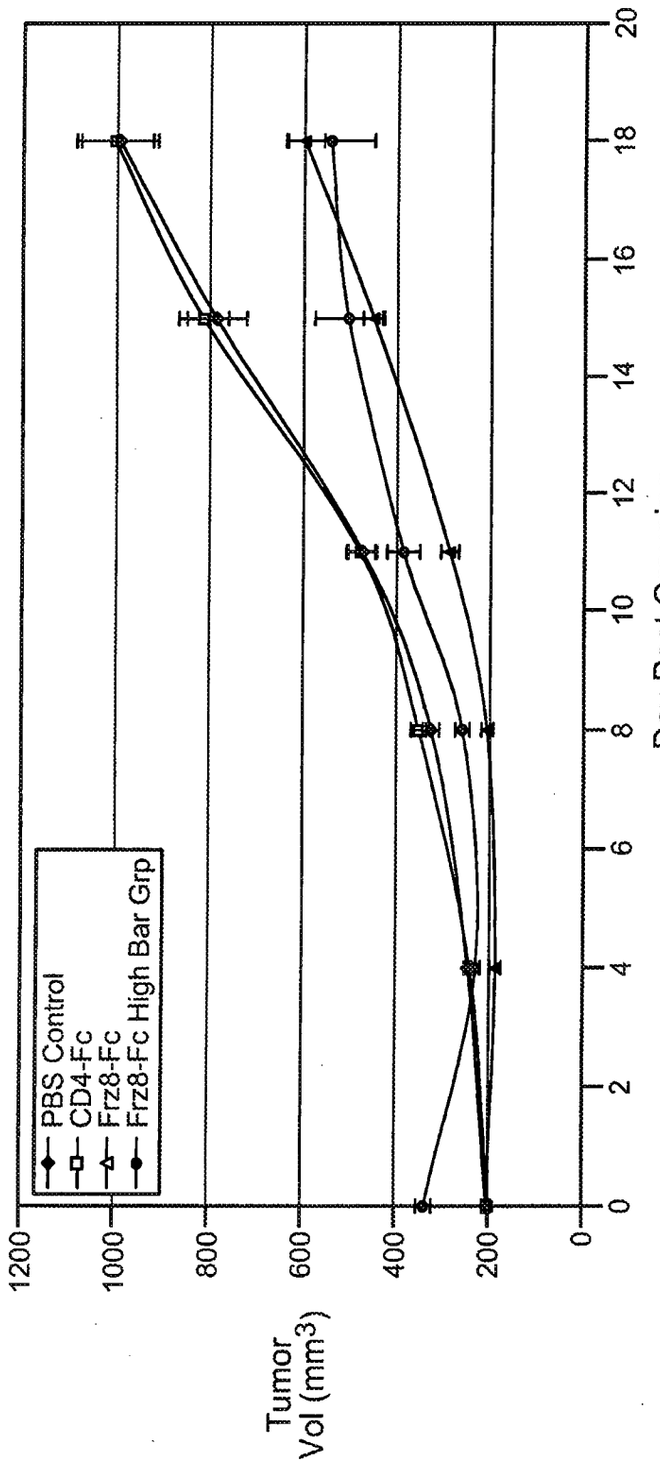

PBS Control
CD4-Fc
Frz8-Fc
Frz8-Fc High Bar Grp
Tumor Vol (mm3)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Day Post Grouping

FIG. 26B

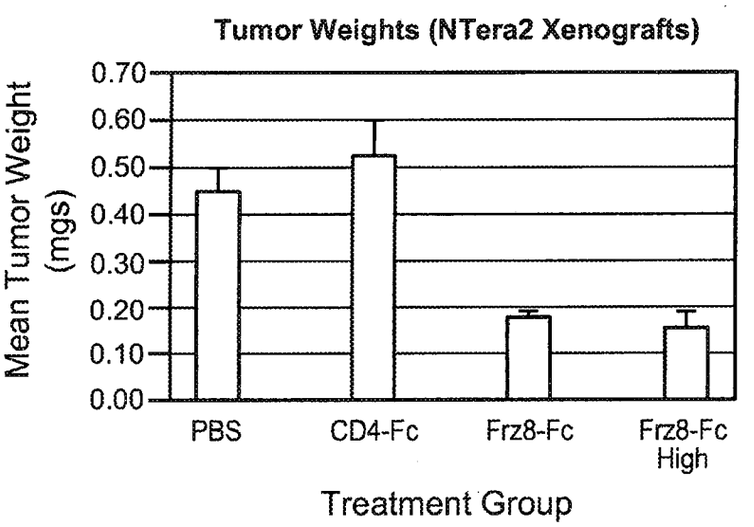

Tumor Weights (NTera2 Xenografts)
Mean Tumor Weight (mgs)
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
PBS
CD4-Fc
Frz8-Fc
Frz8-Fc High
Treatment Group

FIG. 26C

Mean Tumor Volume

	A-PBS		B-CD4		C-Frzd8		D-Frzd8 Hi	
Day	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
0	201.87	4.77	201.47	4.71	201.25	4.55	336.13	16.41
4	244.09	8.03	240.31	11.73	193.57	7.70	228.07	9.67
8	324.51	17.62	340.32	17.84	220.08	11.21	258.18	15.24
11	472.56	30.40	460.39	32.42	278.11	16.03	384.99	35.34
15	785.50	64.09	785.44	55.64	439.92	19.18	503.53	72.39
18	993.47	81.81	968.94	82.53	591.65	29.83	541.90	92.76

FIG. 26D

Mean % Change in Tumor Volume

	A-PBS		B-CD4		C-Frzd8		D-Frzd8 Hi	
Day	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
4	21.73	4.17	20.27	6.24	-3.01	4.42	-30.82	4.37
8	62.19	9.63	71.92	10.91	9.84	5.71	-21.16	6.81
11	136.08	16.35	131.68	17.58	38.88	8.53	14.16	8.50
15	293.50	34.54	295.91	30.72	119.74	10.17	48.53	18.47
18	398.22	46.14	387.96	44.41	195.07	40.24	58.76	25.38

FIG. 26E

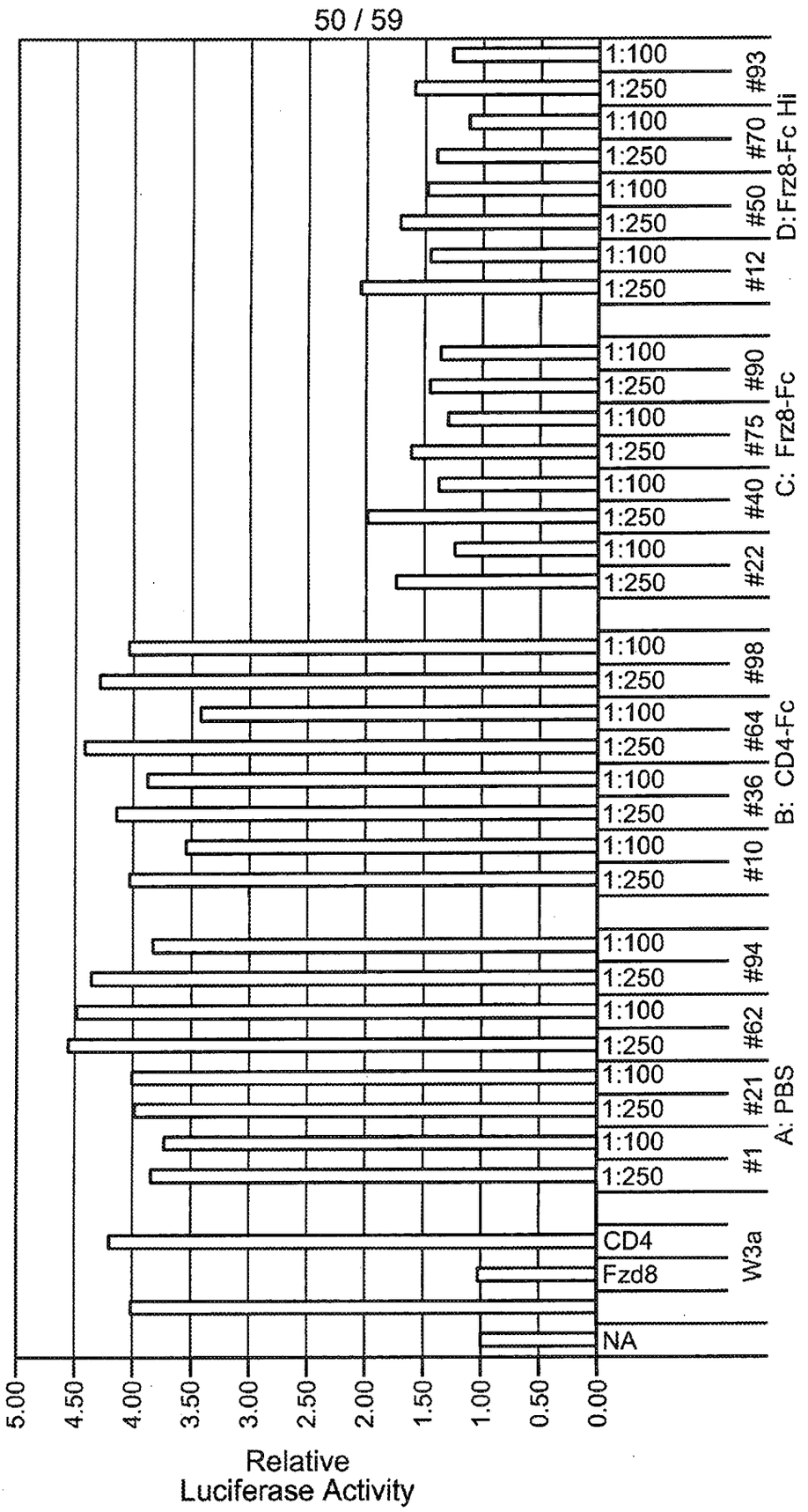

1:100
1:250
#93
#70
#50
#12
D:Frz8-Fc Hi
#90
#75
#40
#22
C: Frz8-Fc
#98
#64
#36
#10
B: CD4-Fc
#94
#62
#21
#1
A: PBS
CD4
Fzd8
W3a
NA
5.00
4.50
4.00
3.50
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
Relative
Luciferase Activity

FIG. 27

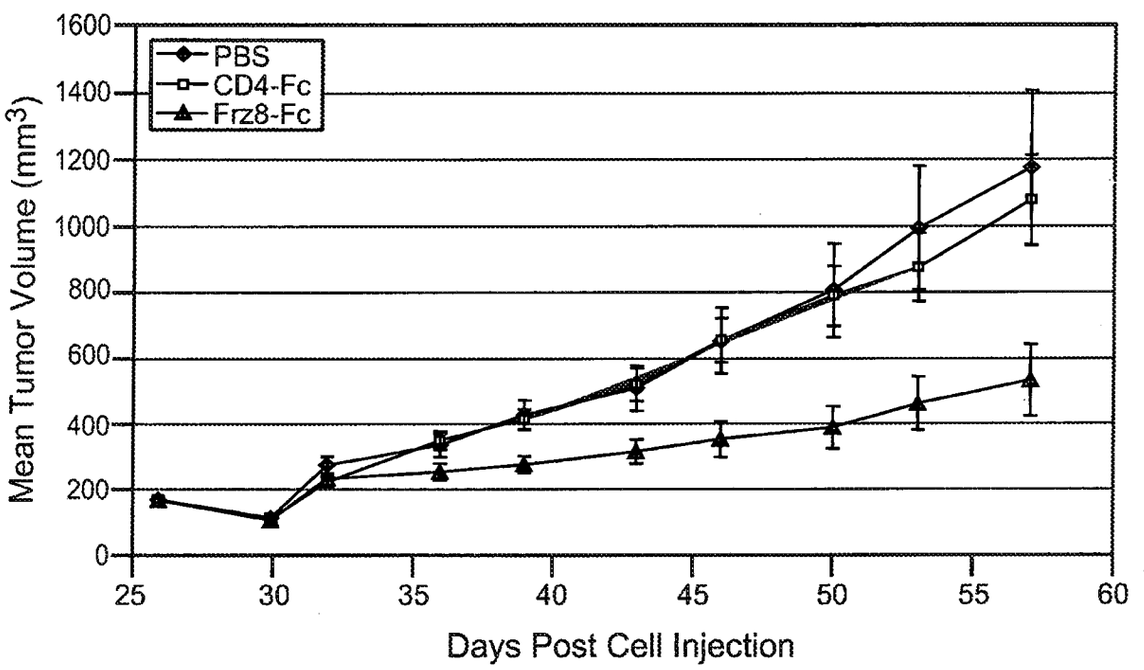


FIG. 28B

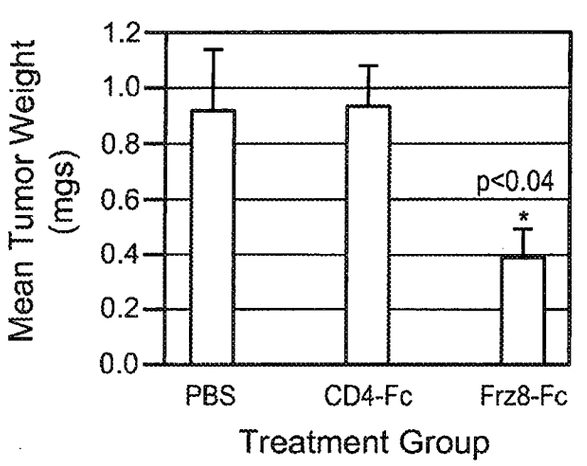


FIG. 28C

Mean Tumor Volume

	A-PBS		B-CD4		C-Frz8-Fc	
Day	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
26	167.5	9.6	167.8	9.6	167.2	9.1
30	113.4	12.0	110.6	8.9	106.5	10.5
32	273.5	26.5	221.8	16.4	232.5	18.4
36	334.4	35.0	349.4	27.5	253.4	25.9
39	426.1	46.0	413.0	30.5	275.3	26.5
43	508.3	68.3	520.2	50.6	314.4	37.0
46	652.4	98.9	653.8	65.9	352.7	54.5
50	803.5	140.7	786.3	90.3	387.2	64.7
53	989.8	184.9	872.4	102.9	460.9	81.8
57	1170.0	232.2	1074.1	134.0	531.8	109.1

FIG. 28D

Mean % Change in Tumor Volume

	A-PBS		B-CD4		C-Frz8-Fc	
Day	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
30	-33.5	5.3	-34.3	3.6	-37.4	3.5
32	61.5	11.6	32.6	7.7	38.7	6.3
36	96.8	16.2	108.8	12.6	49.1	9.5
39	152.5	22.6	155.4	18.4	62.7	10.0
43	197.7	35.1	223.2	32.2	84.9	14.4
46	279.9	50.8	304.0	38.7	104.6	22.2
50	363.8	68.8	385.7	52.6	123.2	28.7
53	476.1	96.8	443.3	61.1	164.8	35.5
57	579.2	121.2	562.7	72.6	203.1	49.2

FIG. 28E

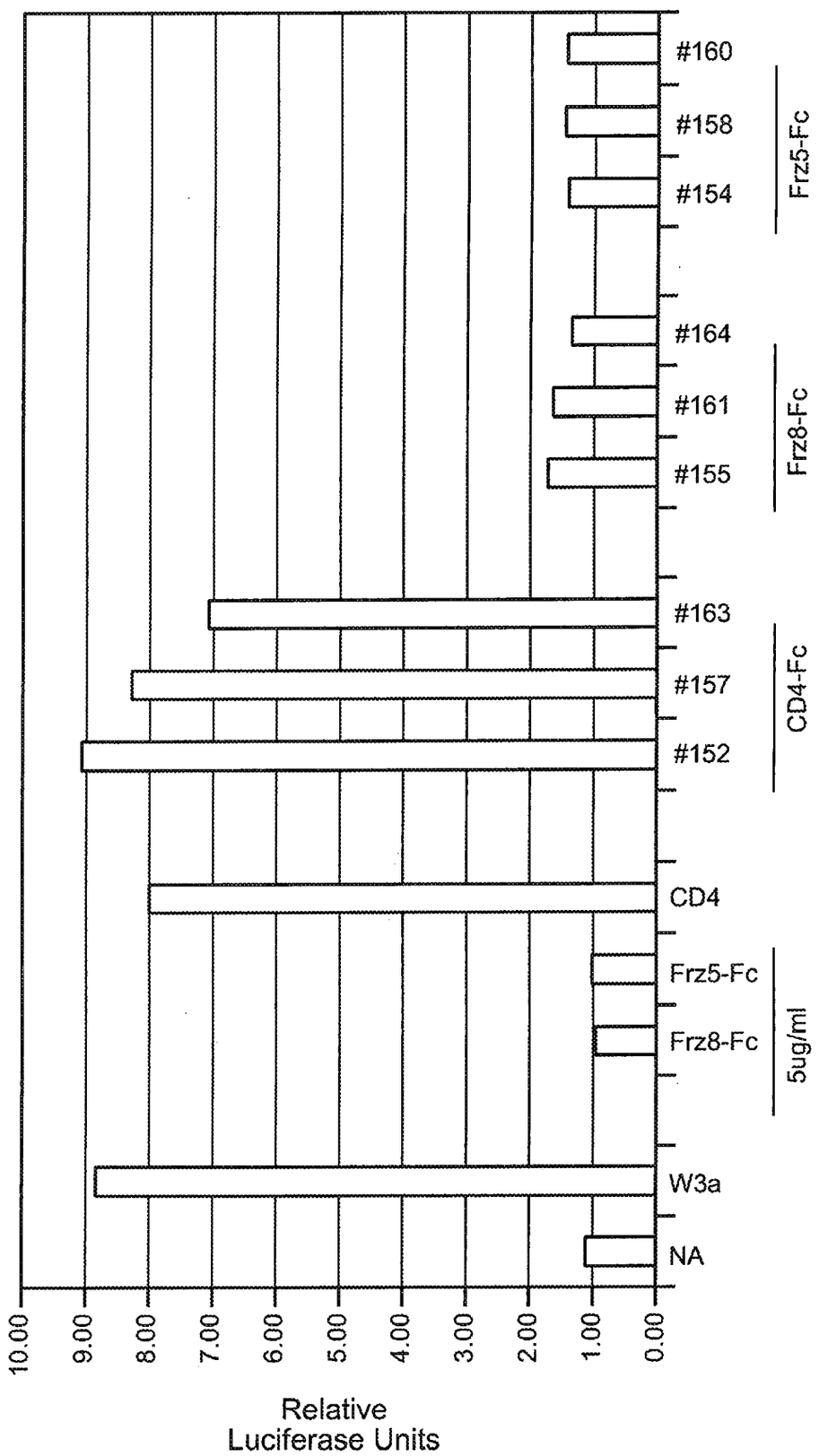

#160
#158
#154
Frz5-Fc
#164
#161
#155
Frz8-Fc
#163
#157
#152
CD4-Fc
CD4
Frz5-Fc
Frz8-Fc
5ug/ml
W3a
NA
10.00
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
Relative
Luciferase Units

FIG. 29

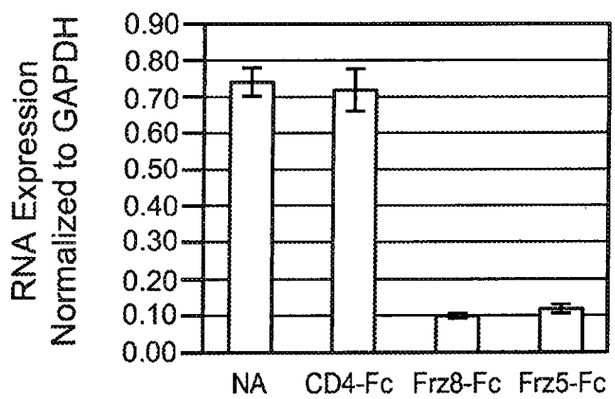


FIG. 30A

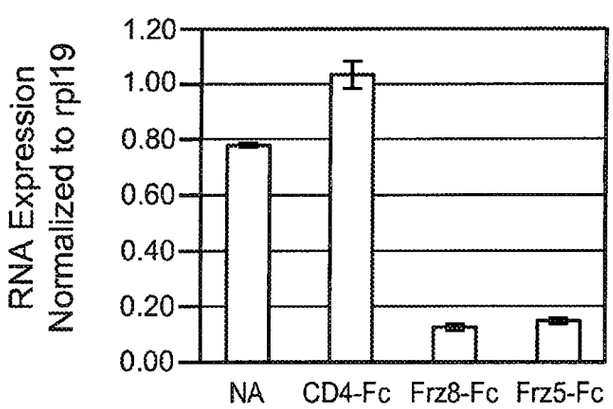


FIG. 30B

FIG. 31A-1

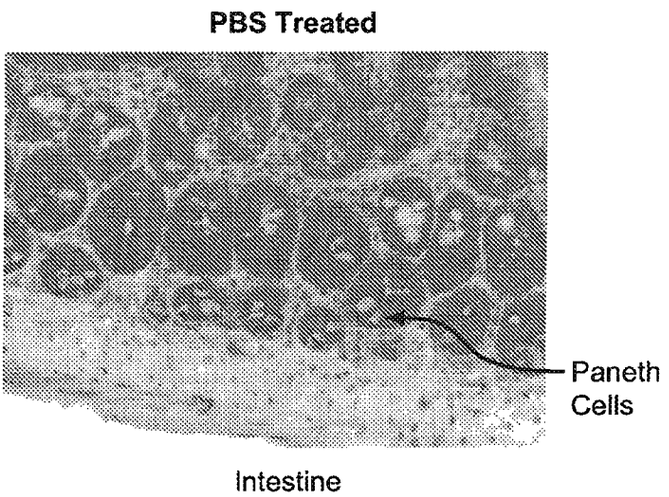


FIG. 31A-2

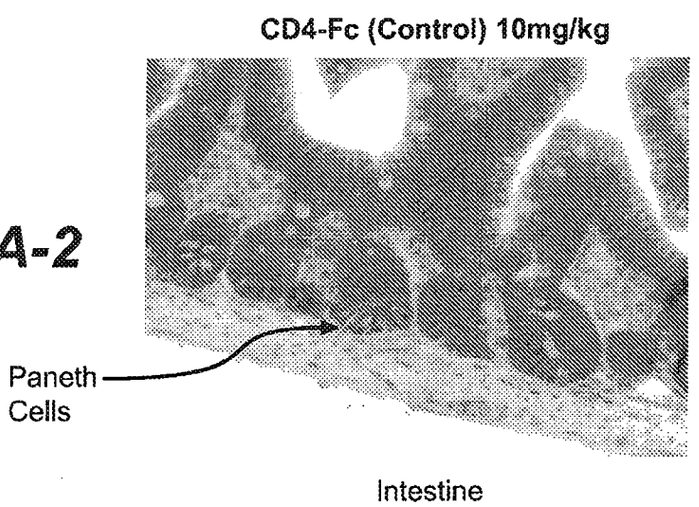


FIG. 31A-3

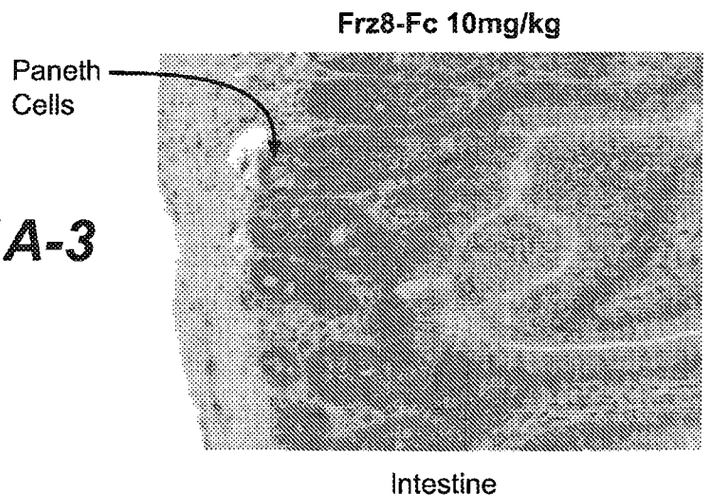
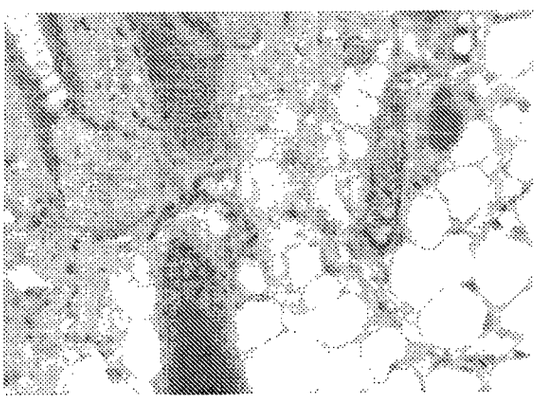


FIG. 31B-1

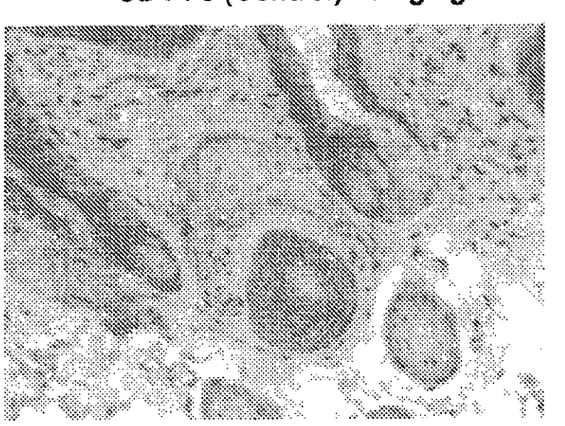
PBS Treated



Skin

FIG. 31B-2

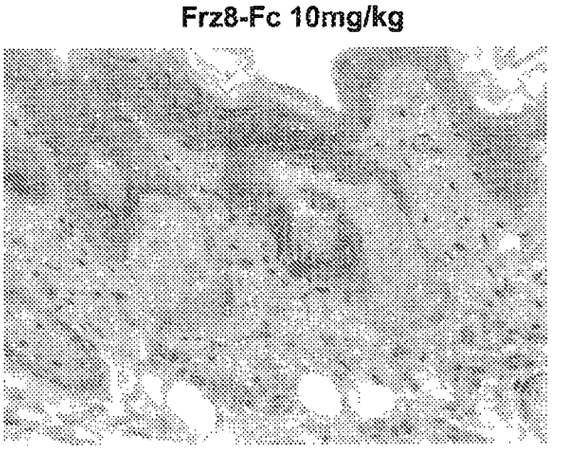
CD4-Fc (Control) 10mg/kg



Skin

FIG. 31B-3

Frz8-Fc 10mg/kg



Skin

Wnt-1 Expression in Human Tumors
Normal



FIG. 32A-1

Wnt-1 Expression in Human Tumors
Low Grade

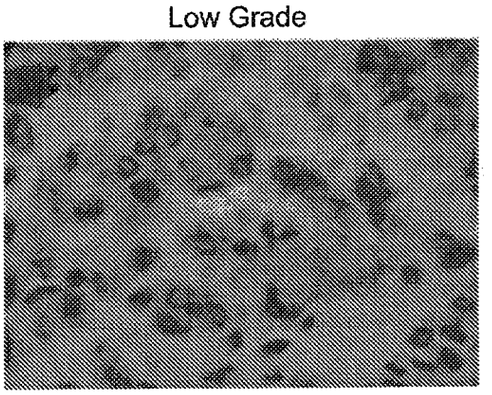


FIG. 32A-2

Wnt-1 Expression in Human Tumors
High Grade

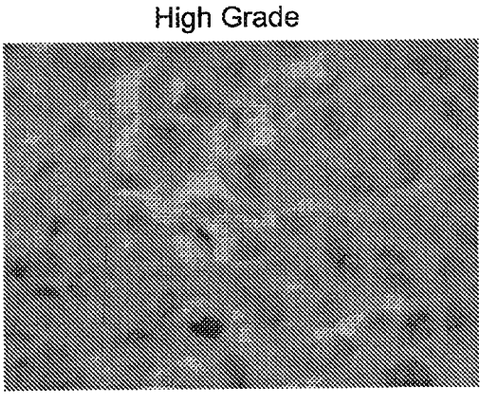
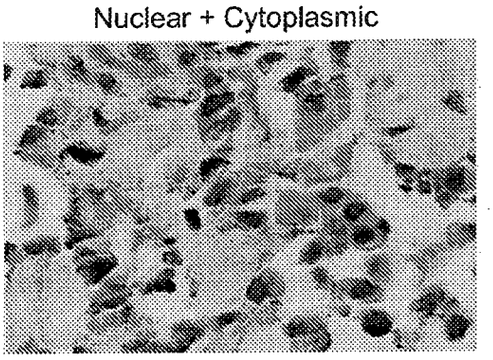


FIG. 32A-3

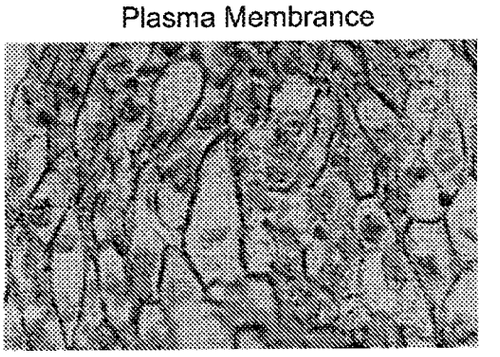
Nuclear and Cytoplasmic Localization of β-catenin in Breast Cancer Patients
Nuclear + Cytoplasmic



β-catenin IHC

FIG. 32B-1

Nuclear and Cytoplasmic Localization of β-catenin in Breast Cancer Patients
Plasma Membrance



β-catenin IHC

FIG. 32B-2

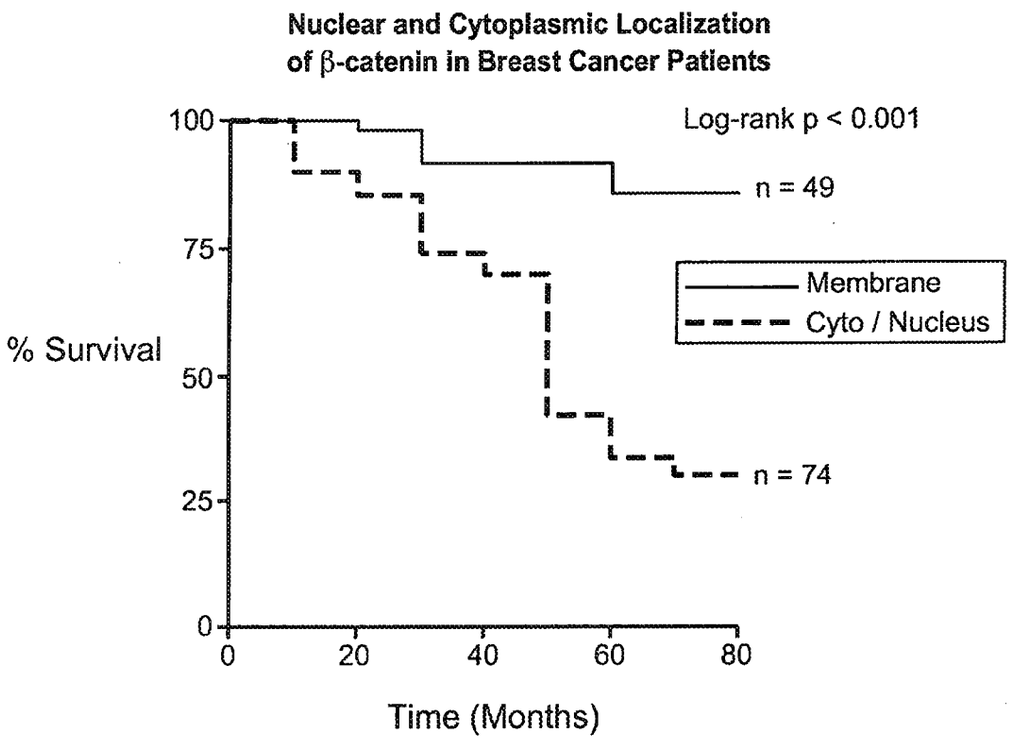

Nuclear and Cytoplasmic Localization
of β-catenin in Breast Cancer Patients
Log-rank p < 0.001
n = 49
n = 74
Membrane
Cyto / Nucleus
% Survival
100
75
50
25
0
0
20
40
60
80
Time (Months)

FIG. 32B-3

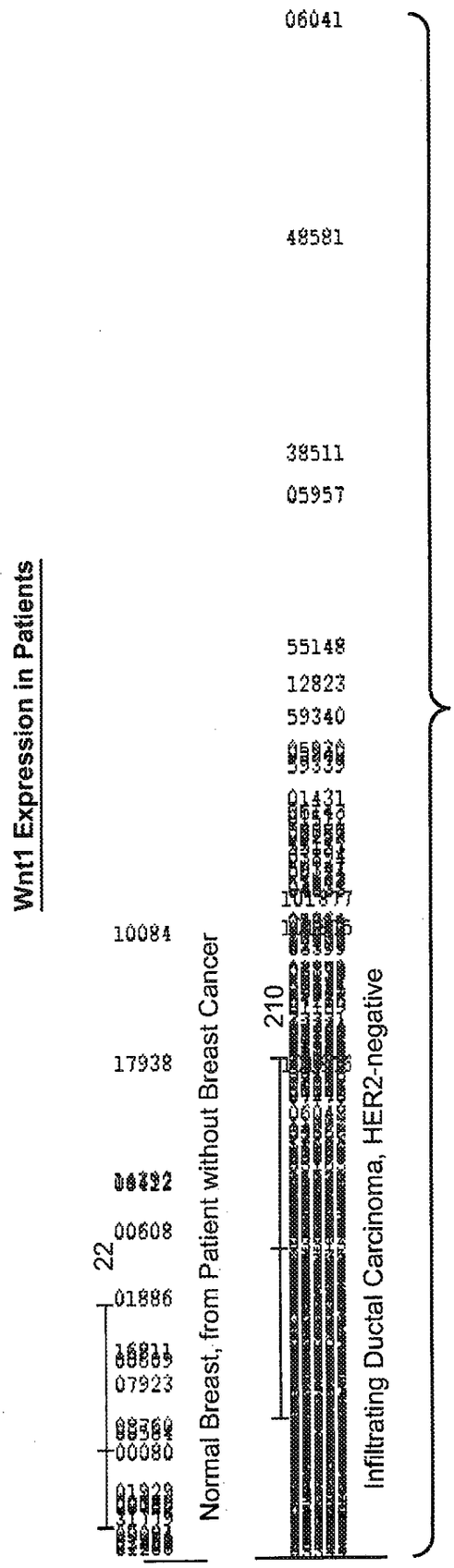

Wnt1 Expression in Patients
06041
48581
38511
05957
55148
12823
59340
01431
10084
17938
00608
01886
07923
00080
22
210
Normal Breast, from Patient without Breast Cancer
Infiltrating Ductal Carcinoma, HER2-negative

FIG. 32C

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional
13 de marzo de 2008 (13.03.2008)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2008/031009 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 38/17 (2006.01) ***C12N 15/62*** (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) ***G01N 33/50*** (2006.01)

(21) No. Solicitud Internacional:
PCT/US2007/077845

(22) Fecha de Presentación Internacional:
07 de septiembre de 2007 (07.09.2007)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:
60/825,063 09 de septiembre de 2006 (08.09.2006) EU
60/951,175 20 de julio de 2006 (20.07.200) EU

(71) Solicitante *(para todos los países destinatarios con excepción de EU)*: **GENENTECH, INC.** [EU/EU]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (EU).

(72) Inventores, e
(75) Inventores/Solicitantes *(para US únicamente)*: **ERNST, James, A.** [EU/EU]; 758 Clayton Street, San Francisco, CA 94117 (EU). **POLAKIS, Paul** [EU/EU]; 265 West Blithedale Avenue, Mill Valley, CA 94941 (EU). **RUBINFELD, Bonnee** [EU/EU]; 4186 Quail Run Drive, Danville, CA 94506 (EU). **DE ALMEIDA, Venita, I.** [EU/EU]; 965 Buckland Avenue, San Carlos, CA 94070 (EU).

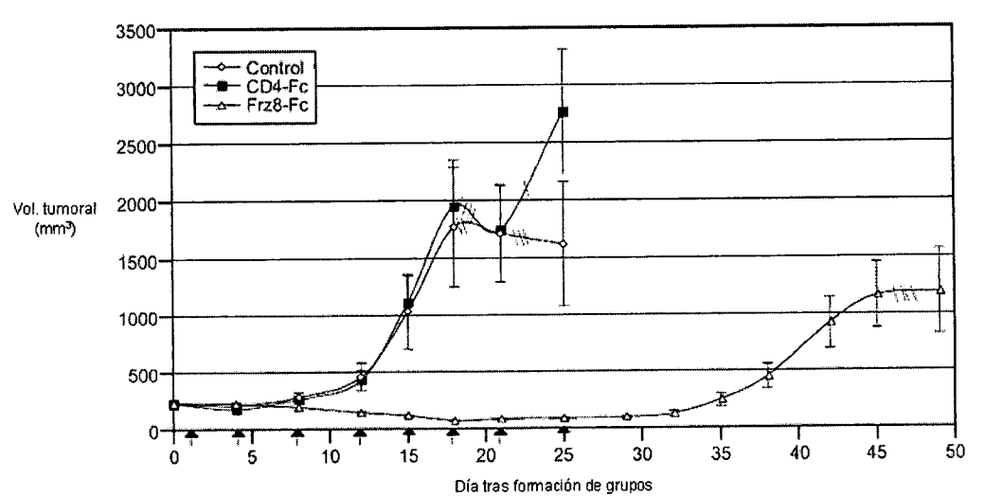
(74) Agente: ROPP, Traci; Genentech, Inc., 1 DNA Way, MS-49, South San Francisco, California 94080 (EU).

(81) Países designados *(a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Países designados *(a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:
— *sin el informe internacional de búsqueda y para ser nuevamente publicado al recibir dicho reporte.*

(54) Título: ANTAGONISTAS DE WNT Y SU USO EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE TRASTORNOS MEDIADOS POR WNT



(57) Extracto: La presente invención proporciona antagonistas de Wnt quiméricos que comprenden un componente del dominio Frz derivado de una proteína Frizzled, de una proteína relacionada con Frizzled secretada o de la proteína Ror, y un componente Fc de inmunoglobulina, y su uso en el tratamiento y detección diagnóstica de la señalización celular de Wnt y trastornos mediados por Wnt, incluyendo el cáncer.

ANTAGONISTAS DE WNT Y SU USO EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE TRASTORNOS MEDIADOS POR WNT

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la solicitud provisional de los Estados Unidos Serie No. 60/825,063, presentada el 8 de septiembre de 2006, y de la solicitud provisional de los Estados Unidos Serie No. 60/951,175, solicitada el 20 de julio de 2007, las cuales son incorporadas mediante referencia en su totalidad en la presente especificación.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere generalmente a la regulación del crecimiento celular. Más específicamente, la presente invención se refiere a inhibidores de la vía de Wnt, así como a su uso en el diagnóstico y tratamiento de trastornos caracterizados por la activación de la vía de señalización de Wnt, así como a la modulación de los eventos celulares mediados por la vía de señalización de Wnt.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La asociación de la vía de señalización de Wnt con la carcinogénesis comenzó, como resultado de las primeras observaciones y experimentos en algunos tumores mamarios murinos. El proto-oncogén Wnt-1 (Int-1) fue originalmente identificado a partir de los tumores mamarios inducidos por el virus del tumor mamario del ratón (MMTV) debido a una inserción de una secuencia de ADN viral. Nusse *y otros.*, *Cell* 1982; **31**: 99-109. El resultado de tal integración viral fue la expresión no regulada de Int.-1, resultando en la formación de tumores. Vanooyen, A. y otros., *Cell* 1984; **39**: 233-240; Nusse, R. y otros., *Nature* 1984; **307**: 131-136; Tsukamoto y otros., *Cell* 1988; **55**: 619-625. El análisis de secuencia posterior demostró que el Int.-1 era un homólogo en mamíferos del gen Wingless de Drosophila (Wg), que estaba implicado en el desarrollo, y los términos se combinaron entonces para crear "Wnt" para identificar a esta familia de proteínas.

La familia de los genes Wnt humanos de los ligandos secretados ha crecido ahora hasta al menos 19 miembros (por ejemplo, Wnt-1 (RefSec.: NM_005430), Wnt-2 (RefSec.: NM_003391), Wnt-2B (Wnt-13) (RefSec. : NM_004185), Wnt-3 (RefSec.: NM_030753), Wnt3a (RefSec.: NM_033131), Wnt-4 (RefSec.: NM_030761), Wnt-5A (RefSec.: NM_003392), Wnt-5B

(RefSec.: NM_032642), Wnt-6 (RefSec.: NM_006522), Wnt-7A (RefSec.: NM_004625), Wnt-7B (RefSec.: NM_058238), Wnt-8A (RefSec.: NM_058244), Wnt-8B (RefSec.: NM_003393), Wnt-9A (Wnt-14) (RefSec.: NM_003395), Wnt-9B (Wnt-15) (RefSec.: NM_003396), Wnt-10A (RefSec.: NM_025216), Wnt-10B (RefSec.: NM_003394), Wnt-11 (RefSec.: NM_004626), Wnt-16 (RefSec.: NM_016087)). Cada miembro tiene diferentes grados de identidad de secuencia, pero todos contienen los residuos de cisteína conservados 23-24, los cuales muestran espaciamiento altamente conservadas. McMahon, AP *y otros. Trends Genet.* 1992, **8**: 236-242; Miller, JR. *Genome Biol.* 2002, **3 (1)**: 3001.1-3001.15. La proteínas Wnt son pequeñas (es decir, de 39-46 kD) glicoproteínas aciladas secretadas, que desempeñan un papel clave tanto en la embriogénesis como en los tejidos maduros. Durante el desarrollo embriológico, la expresión de las proteínas Wnt es importante en el sistema de patrón a través del control de la proliferación celular y la determinación del destino de las células madre. Las moléculas Wnt son también palmitoiladas, y por lo tanto son más hidrófobas de lo que pudiera predecirse mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos solamente. Willert, K. y otros., *Nature* 2003; **423**: 448-52. El sitio o los sitios de palmitoilación también se cree que son esenciales para la función.

Las proteínas Wnt actúan como ligandos para activar la familia Frizzled (Frz) de receptores de siete pasos transmembrana. Ingham, P.W. *Trends Genet.* 1996; **12**: 382-384; Yang Snyder, J. y otros., Curr. Biol. 1996, 6: 1302-1306; Bhanot, P. y otros., *Nature* 1996; **382**: 225-230. Existen diez miembros de la conocida familia Frz (por ejemplo, Frz1, Frz2, Frz3....Frz10), cada uno caracterizado por la presencia de un dominio rico en cisteína (CRD, siglas en inglés). Huang *y otros. Genome Biol.* 2004; **5**: 234.1-234.8. Hay un alto grado de promiscuidad entre las varias interacciones Wnt-Frizzled, pero la unión Wnt-Frz tiene que incorporar también las proteínas relacionadas con el receptor LDL (LRP5 o LRP6) y la membrana y la proteína citoplásmica Dishvelled (Dsh) para formar un complejo de señalización activo.

La unión de Wnt a Frizzled puede activar la señalización a través de la vía de señalización de Wnt canónica, lo que resulta en la estabilización y la actividad transcripcional incrementada de la β-catenina [Peifer, M. y otros., *Development* 1994; **120**: 369-380; Papkoff, J. y otros., *Mol. Cell Biol.* 1996; **16**: 2128-2134] o la señalización no canónica, tal como a través de

Wnt/polaridad celular planar (Wnt/PCP) o de la vía Wnt-calcio (Wnt/Ca^{2+}). Veeman, M.T. y otros. *Dev. Cell* 2003, **5**: 367-377.

La vía de señalización de Wnt canónica es la más relevante de las vías de señalización de Wnt en el desarrollo del cáncer. Ilyas, M. *J. Pathol.* 2005; **205**: 130-144. La activación normal de esta vía inicia una serie de los eventos corriente abajo que culminaron en la estabilización y el aumento de los niveles de la proteína β-catenina. Esta proteína es normalmente una proteína citoplásmica inactiva, y se encuentra en la membrana celular unida a proteínas incluyendo la e-catenina. En ausencia del ligando Wnt, la β-catenina citoplásmica fosforilada es normalmente rápidamente degradada. Tras la activación de la vía canónica, la β-catenina no fosforilada es transportada al núcleo, donde además resulta en la activación transcripcional de varios genes diana. La posterior regulación positiva en la transcripción de estos genes diana conduce a cambios en la célula, y a la expresión continua, no regulada de tales genes diana, lo que resulta en el desarrollo tumoral. Puesto que la señalización de Wnt aberrante parece ser una condición necesaria en la carcinogénesis, los inhibidores efectivos de la señalización de Wnt son de gran interés como terapéuticos contra el cáncer.

El uso de receptores solubles como antagonistas para las interacciones ligando-receptor es conocido en el arte. Dichas moléculas pueden ser antagonistas terapéuticos efectivos si ellos se unen al ligando libre de manera tal que se evite el paso de la activación del receptor inicial de la vía de señalización. Se han identificado fragmentos del dominio extracelular mínimo soluble (ECD), del dominio rico en cisteína (CRD) de un receptor Frizzled, los cuales exhiben unión a Wnt, sobre la base de datos de cristalografía. Dann *y otros., Nature* **412**: 86-90 (2001). Sin embargo, mientras que tales fragmentos de Frizzled exhibieron unión al ligando Wnt, tales fragmentos no fueron apropiados como terapéuticos debido a su rápida degradación *in vivo*.

El uso de un dominio Frizzled soluble acoplado a un Fc de inmunoglobulina como un antagonista potencial de Wnt ha sido propuesto. Therapeutic Opportunities of the Wnt Signaling Pathway in Cancer, New York Academy of Sciences, Oct. 25, 2005; Hsieh, J-C. y otros., *PNAS*, **96**: 3546-3551 (1999). Sin embargo, antes de la presente invención, los intentos de creación de un terapéutico de fusión soluble receptor Frizzled-Fc no tuvieron éxito. Por ejemplo, una de tales quimeras basada en los residuos 1-173 del Frz8 CRD (Frz (173)-Fc, ID SEC NO: 113) tuvo niveles subóptimos de eficacia (Figura

12), y fue inestable *in vivo* (Figura 11). Más aún, la Frz quimera (173)-Fc sólo redujo la proporción del incremento en el volumen tumoral (en contraposición a la reducción del volumen tumoral inicial). Adicionalmente, mientras que la creación de fusiones de Fc es generalmente conocida como una técnica para mejorar la estabilidad *in vivo* de la construcción resultante, la creación de construcciones de Fc terapéuticas efectivas puede ser difícil debido a una serie de problemas, incluyendo el plegamiento proteico inapropiado de la nueva construcción proteica y el impedimento estérico de la construcción de fusión para la diana.

Por lo tanto, existe una necesidad para un antagonista de Wnt terapéutico con estabilidad *in vivo* mejorada que actúa para inhibir la señalización celular inducida por el ligando Wnt.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona composiciones y su uso en métodos de diagnóstico y tratamiento de trastornos mediados por Wnt, como el cáncer, y en la inhibición de la señalización celular de Wnt. Específicamente, la invención proporciona antagonistas de Wnt que son moléculas quiméricas que comprende un componente del dominio Frizzled, tal como un polipéptido derivado a partir de una proteína Frizzled (Frz), una proteína relacionada con Frizzled (FRPs, siglas en inglés) u otra proteína (por ejemplo, Ror-1,-2, etc.), y un dominio Fc de la inmunoglobulina, y su uso en métodos de diagnóstico y tratamiento de trastornos mediados por Wnt y en la inhibición de la señalización celular de Wnt.

Un aspecto de la invención se proporciona un antagonista de Wnt que comprende un componente del dominio Frizzled y un dominio Fc. El componente del dominio Frizzled del antagonista de Wnt comprende un polipéptido derivado a partir de una proteína Frz, una proteína FRP, o una proteína Ror. En una realización, el antagonista de Wnt es activo *in vivo* por al menos 1 hora. En otra realización, el antagonista de Wnt es activo *in vivo* por al menos 5 horas. En otra realización, el antagonista de Wnt tiene una vida media *in vivo* de al menos 1 día. En otra realización, el antagonista de Wnt tiene una vida media *in vivo* de al menos 2 días. En una realización adicional, el componente del dominio Frizzled comprende un dominio mínimo CRD (ECD) proveniente de un polipéptido Frz seleccionado a partir del grupo que consiste de Frz1h (ID SEC NO: 18), Frz2h (ID SEC NO: 19), Frz3h (ID SEC NO: 20), Frz4h (ID SEC NO: 21),

Frz5h (ID SEC NO: 22), Frz6h (ID SEC NO: 23), Frz7h (ID SEC NO: 24), Frz8h (ID SEC NO: 25), Frz9h (ID SEC NO: 26), y Frz10h (ID SEC NO: 27), y variantes activas del mismo. En una realización adicional, el componente del dominio Frizzled comprende un dominio mínimo CRD (ECD) proveniente de un polipéptido FRPs seleccionado a partir del grupo que consiste de FRP1s (ID SEC NO: 28), FRP2s (ID SEC NO: 29), FRP3s (ID SEC NO: 30), FRP4s (ID SEC NO: 31), y FRP5s (ID SEC NO: 32), y variantes activas del mismo. En una realización adicional, el componente del dominio Frizzled comprende un dominio mínimo CRD (ECD) proveniente de un polipéptido Ror seleccionado a partir del grupo que consiste de Ror1h (ID SEC NO: 33), y Ror2h (ID SEC NO: 34), y variantes activas del mismo.

En una realización adicional, el componente del dominio Frizzled comprende un polipéptido Frz maduro seleccionado a partir del grupo que consiste de Frz1h (ID SEC NO: 50), Frz2h (ID SEC NO: 51), Frz3h (ID SEC NO: 52), Frz4h (ID SEC NO: 53), Frz5h (ID SEC NO: 54), Frz6h (ID SEC NO: 55), Frz7h (ID SEC NO: 56), Frz8h (ID SEC NO: 57), Frz9h (ID SEC NO: 58), y Frz10h (ID SEC NO: 59), y variantes activas del mismo, o un polipéptido FRPs maduro seleccionado a partir del grupo que consiste de FRP1s (ID SEC NO: 60), FRP2s (ID SEC NO: 61), FRP3s (ID SEC NO: 62), FRP4s (ID SEC NO: 63), y FRP5s (ID SEC NO: 64), y variantes activas del mismo, o un polipéptido Ror maduro seleccionado a partir del grupo que consiste de Ror1h (ID SEC NO: 65), y Ror2h (ID SEC NO: 66), y variantes activas del mismo.

En una realización adicional, el componente del dominio Frizzled comprende un pro-polipéptido Frz seleccionado a partir del grupo que consiste de Frz1h (ID SEC NO: 35), Frz2h (ID SEC NO: 36), Frz3h (ID SEC NO: 37), Frz4h (ID SEC NO: 38), Frz5h (ID SEC NO: 39), Frz6h (ID SEC NO: 40), Frz7h (ID SEC NO: 41), Frz8h (ID SEC NO: 42), Frz9h (ID SEC NO: 43), y Frz10h (ID SEC NO: 44), y variantes activas del mismo, o un pro-polipéptido FRPs seleccionado a partir del grupo que consiste de FRP1s (ID SEC NO: 45), FRP2s (ID SEC NO: 46), FRP3s (ID SEC NO: 47), FRP4s (ID SEC NO: 48), y FRP5s (ID SEC NO: 49), y variantes activas del mismo.

En una realización, el antagonista de Wnt comprende un componente Fc derivado a partir de una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En otra realización, el Fc es derivado a partir de una inmunoglobulina IgG1. En otra realización la secuencia del Fc comprende la secuencia mostrada en la ID SEC NO: 67 o ID SEC NO: 68.

En una realización, el antagonista de Wnt comprende además un enlazador que conecta el componente del dominio Frizzled al dominio Fc. En una de tales realizaciones, el enlazador es un péptido enlazador tal como ESGGGGVT (ID SEC NO: 69), LESGGGGVT (ID SEC NO: 70), GRAQVT (ID SEC NO: 71), WRAQVT (ID SEC NO: 72), y ARGRAQVT (ID SEC NO: 73).

En realizaciones particulares, el antagonista de Wnt comprende un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de Frz8-Fc (ID SEC NO: 74), Frz5-Fc (ID SEC NO: 75), Frz1-Fc (ID SEC NO: 76), Frz2-Fc (ID SEC NO: 77), Frz3-Fc (ID SEC NO: 78), Frz4-Fc (ID SEC NO: 79), Frz6-Fc (ID SEC NO: 80), Frz7-Fc (ID SEC NO: 81), Frz9-Fc (ID SEC NO: 82), Frz10-Fc (ID SEC NO: 83), FRP1s-Fc (ID SEC NO: 84), FRP2s (ID SEC NO: 85), FRP3s-Fc (ID SEC NO: 86), FRP4s-Fc (ID SEC NO: 87), y FRP5s-Fc (ID SEC NO: 88).

Otro aspecto de la invención se proporciona una composición que comprende al menos un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable y un antagonista de Wnt según se ha descrito anteriormente.

En otro aspecto la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica cualquiera de los antagonistas de Wnt descritos anteriormente. En una realización, el ácido nucleico que codifica un antagonista de Wnt comprende además un vector que contiene secuencias de control a las cuales el ácido nucleico está operativamente conectado. En otra realización, el vector está contenido en células hospederas, tales como una célula de mamífero, de insecto, de *E. coli* o de levadura.

Otro aspecto de la invención se proporciona un artículo de fabricación que comprende una composición que comprende al menos un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable y un antagonista de Wnt según lo descrito anteriormente y un recipiente, donde el antagonista de Wnt está contenido dentro del recipiente y el recipiente además comprende (a) una etiqueta pegada al recipiente, o (b) un prospecto colocado en el interior del recipiente que se refiere al uso del antagonista de Wnt, indicando el uso de la composición para el tratamiento terapéutico o la detección diagnóstica de un trastorno mediado por Wnt.

Otro aspecto de la invención se proporciona un método de inhibir la señalización de Wnt en una célula que comprende contactar la célula con una cantidad efectiva de un antagonista de Wnt que comprende un componente del dominio Frizzled y un dominio Fc. El componente del dominio Frizzled del antagonista de Wnt comprende un polipéptido derivado de una proteína Frz, una proteína FRP, o una

proteína Ror. En una realización, el antagonista de Wnt es activo *in vivo* por al menos 1 hora. En otra realización, el antagonista de Wnt es activo *in vivo* por al menos 5 horas. En otra realización, el antagonista de Wnt tiene una vida media *in vivo* de al menos 1 día. En otra realización, el antagonista de Wnt tiene una vida media *in vivo* de al menos 2 días.

En una realización adicional de este aspecto, el componente del dominio Frizzled comprende un dominio mínimo CRD (ECD) proveniente de un polipéptido Frz seleccionado a partir del grupo que consiste de Frz1h (ID SEC NO: 18), Frz2h (ID SEC NO: 19), Frz3h (ID SEC NO: 20), Frz4h (ID SEC NO: 21), Frz5h (ID SEC NO: 22), Frz6h (ID SEC NO: 23), Frz7h (ID SEC NO: 24), Frz8h (ID SEC NO: 25), Frz9h (ID SEC NO: 26), y Frz10h (ID SEC NO: 27), y variantes activas del mismo. En una realización adicional, el componente del dominio Frizzled comprende un dominio mínimo CRD (ECD) proveniente de un polipéptido FRPs seleccionado a partir del grupo que consiste de FRP1s (ID SEC NO: 28), FRP2s (ID SEC NO: 29), FRP3s (ID SEC NO: 30), FRP4s (ID SEC NO: 31), y FRP5s (ID SEC NO: 32), y variantes activas del mismo. En una realización adicional, el componente del dominio Frizzled comprende un dominio mínimo CRD (ECD) proveniente de un polipéptido Ror seleccionado a partir del grupo que consiste de Ror1h (ID SEC NO: 33), y Ror2h (ID SEC NO: 34), y variantes activas del mismo.

En una realización adicional, el componente del dominio Frizzled comprende un polipéptido Frz maduro seleccionado a partir del grupo que consiste de: (ID SEC NO: 50), Frz2h (ID SEC NO: 51), Frz3h (ID SEC NO: 52), Frz4h (ID SEC NO: 53), Frz5h (ID SEC NO: 54), Frz6h (ID SEC NO: 55), Frz7h (ID SEC NO: 56), Frz8h (ID SEC NO: 57), Frz9h (ID SEC NO: 58), y Frz10h (ID SEC NO: 59), y variantes activas del mismo, o un polipéptido FRPs maduro seleccionado a partir del grupo que consiste de FRP1s (ID SEC NO: 60), FRP2s (ID SEC NO: 61), FRP3s (ID SEC NO: 62), FRP4s (ID SEC NO: 63), y FRP5s (ID SEC NO: 64), y variantes activas del mismo, o un polipéptido Ror maduro seleccionado a partir del grupo que consiste de Ror1h (ID SEC NO: 65), y Ror2h (ID SEC NO: 66), y variantes activas del mismo.

En una realización adicional, el componente del dominio Frizzled comprende un pro-polipéptido Frz seleccionado a partir del grupo que consiste de Frz1h (ID SEC NO: 35), Frz2h (ID SEC NO: 36), Frz3h (ID SEC NO: 37), Frz4h (ID SEC NO: 38), Frz5h (ID SEC NO: 39), Frz6h (ID SEC NO: 40), Frz7h (ID SEC NO: 41), Frz8h (ID SEC NO: 42), Frz9h (ID SEC NO: 43), y Frz10h (ID SEC NO: 44), y variantes activas del mismo, o un pro-polipéptido FRPs seleccionado a partir del grupo que consiste de FRP1s (ID SEC NO: 45),

FRP2s (ID SEC NO: 46), FRP3s (ID SEC NO: 47), FRP4s (ID SEC NO: 48), y FRP5s (ID SEC NO: 49), y variantes activas del mismo.

En una realización, el antagonista de Wnt comprende un componente Fc derivado a partir de una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En otra realización, el Fc es derivado a partir de una inmunoglobulina IgG1. En otra realización la secuencia del Fc es mostrada en la ID SEC NO: 67 o ID SEC NO: 68.

En una realización, el antagonista de Wnt comprende además un enlazador que conecta el componente del dominio Frizzled al dominio Fc. En una realización, el enlazador es un péptido enlazador tal como ESGGGGVT (ID SEC NO: 69), LESGGGGVT (ID SEC NO: 70), GRAQVT (ID SEC NO: 71), WRAQVT (ID SEC NO: 72), y ARGRAQVT (ID SEC NO: 73).

En realizaciones particulares, el antagonista de Wnt comprende un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de Frz8-Fc (ID SEC NO: 74), Frz5-Fc (ID SEC NO: 75), Frz1-Fc (ID SEC NO: 76), Frz2-Fc (ID SEC NO: 77), Frz3-Fc (ID SEC NO: 78), Frz4-Fc (ID SEC NO: 79), Frz6-Fc (ID SEC NO: 80), Frz7-Fc (ID SEC NO: 81), Frz9-Fc (ID SEC NO: 82), Frz10-Fc (ID SEC NO: 83), FRP1s-Fc (ID SEC NO: 84), FRP2s (ID SEC NO: 85), FRP3s-Fc (ID SEC NO: 86), FRP4s-Fc (ID SEC NO: 87), y FRP5s-Fc (ID SEC NO: 88).

En una realización de este método, la célula está contenida dentro de un mamífero y la cantidad administrada es una cantidad terapéuticamente efectiva. En otra realización, la señalización de Wnt resulta de la activación de un componente de señalización de Wnt a través de mutación somática. En otra realización, la inhibición de la señalización de Wnt resulta en la inhibición del crecimiento de la célula. En otra realización, la célula es una célula cancerosa.

Otro aspecto de la invención se proporciona un método de tratar un trastorno mediado por Wnt en un mamífero que padece del mismo, que comprende administrar al mamífero a una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista de Wnt que comprende un componente del dominio Frizzled y un dominio Fc. El componente del dominio Frizzled del antagonista de Wnt comprende un polipéptido derivado de una proteína Frz, una proteína FRP, o una proteína Ror. En una realización, el antagonista de Wnt es activo *in vivo* por al menos 1 hora. En otra realización, el antagonista de Wnt es activo *in vivo* por al menos 5 horas. En otra realización, el antagonista de Wnt tiene

una vida media *in vivo* de al menos 1 día. En otra realización, el antagonista de Wnt tiene una vida media *in vivo* de al menos 2 días.

En una realización adicional de este aspecto, el componente del dominio Frizzled comprende un dominio mínimo CRD (ECD) proveniente de un polipéptido Frz seleccionado a partir del grupo que consiste de Frz1h (ID SEC NO: 18), Frz2h (ID SEC NO: 19), Frz3h (ID SEC NO: 20), Frz4h (ID SEC NO: 21), Frz5h (ID SEC NO: 22), Frz6h (ID SEC NO: 23), Frz7h (ID SEC NO: 24), Frz8h (ID SEC NO: 25), Frz9h (ID SEC NO: 26), y Frz10h (ID SEC NO: 27), y variantes activas del mismo. En una realización adicional, el componente del dominio Frizzled comprende un dominio mínimo CRD (ECD) proveniente de un polipéptido FRPs seleccionado a partir del grupo que consiste de FRP1s (ID SEC NO: 28), FRP2s (ID SEC NO: 29), FRP3s (ID SEC NO: 30), FRP4s (ID SEC NO: 31), y FRP5s (ID SEC NO: 32), y variantes activas del mismo. En una realización adicional, el componente del dominio Frizzled comprende un dominio mínimo CRD (ECD) proveniente de un polipéptido Ror seleccionado a partir del grupo que consiste de Ror1h (ID SEC NO: 33), y Ror2h (ID SEC NO: 34), y variantes activas del mismo.

En una realización adicional, el componente del dominio Frizzled comprende un polipéptido Frz maduro seleccionado a partir del grupo que consiste de: (ID SEC NO: 50), Frz2h (ID SEC NO: 51), Frz3h (ID SEC NO: 52), Frz4h (ID SEC NO: 53), Frz5h (ID SEC NO: 54), Frz6h (ID SEC NO: 55), Frz7h (ID SEC NO: 56), Frz8h (ID SEC NO: 57), Frz9h (ID SEC NO: 58), y Frz10h (ID SEC NO: 59), y variantes activas del mismo, o un polipéptido FRPs maduro seleccionado a partir del grupo que consiste de FRP1s (ID SEC NO: 60), FRP2s (ID SEC NO: 61), FRP3s (ID SEC NO: 62), FRP4s (ID SEC NO: 63), y FRP5s (ID SEC NO: 64), y variantes activas del mismo, o un polipéptido Ror maduro seleccionado a partir del grupo que consiste de Ror1h (ID SEC NO: 65), y Ror2h (ID SEC NO: 66), y variantes activas del mismo.

En una realización adicional, el componente del dominio Frizzled comprende un pro-polipéptido Frz seleccionado a partir del grupo que consiste de Frz1h (ID SEC NO: 35), Frz2h (ID SEC NO: 36), Frz3h (ID SEC NO: 37), Frz4h (ID SEC NO: 38), Frz5h (ID SEC NO: 39), Frz6h (ID SEC NO: 40), Frz7h (ID SEC NO: 41), Frz8h (ID SEC NO: 42), Frz9h (ID SEC NO: 43), y Frz10h (ID SEC NO: 44), y variantes activas del mismo, o un pro-polipéptido FRPs seleccionado a partir del grupo que consiste de FRP1s (ID SEC NO: 45), FRP2s (ID SEC NO: 46), FRP3s (ID SEC NO: 47), FRP4s (ID SEC NO: 48), y FRP5s (ID SEC NO: 49), y variantes activas del mismo.

En una realización, el antagonista de Wnt comprende un componente Fc derivado a partir de una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En otra realización, el Fc es derivado a partir de una inmunoglobulina IgG1. En otra realización la secuencia del Fc es mostrada en la ID SEC NO: 67 o ID SEC NO: 68.

En una realización, el antagonista de Wnt comprende además un enlazador que conecta el componente del dominio Frizzled al dominio Fc. En una realización, el enlazador es un péptido enlazador tal como ESGGGGVT (ID SEC NO: 69), LESGGGGVT (ID SEC NO: 70), GRAQVT (ID SEC NO: 71), WRAQVT (ID SEC NO: 72), y ARGRAQ VT (ID SEC NO: 73).

En realizaciones particulares, el antagonista de Wnt comprende un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de Frz8-Fc (ID SEC NO: 74), Frz5-Fc (ID SEC NO: 75), Frz1-Fc (ID SEC NO: 76), Frz2-Fc (ID SEC NO: 77), Frz3-Fc (ID SEC NO: 78), Frz4-Fc (ID SEC NO: 79), Frz6-Fc (ID SEC NO: 80), Frz7-Fc (ID SEC NO: 81), Frz9-Fc (ID SEC NO: 82), Frz10-Fc (ID SEC NO: 83), FRP1s-Fc (ID SEC NO: 84), FRP2s (ID SEC NO: 85), FRP3s-Fc (ID SEC NO: 86), FRP4s-Fc (ID SEC NO: 87), y FRP5s-Fc (ID SEC NO: 88).

En una realización de este método, el trastorno es un trastorno proliferativo celular asociado con la actividad de señalización de Wnt aberrante. En otra realización, la actividad de señalización de Wnt aberrante resulta de la expresión incrementada de una proteína Wnt. En otra realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer, como cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de mama, leucemia, gliomas, o meduloblastomas.

En otro aspecto de la invención se proporciona un método para detectar la presencia de una proteína Wnt, que comprende contactar la muestra con un antagonista de Wnt según lo descrito anteriormente, donde la presencia de un complejo, o el nivel de unión entre el antagonista de Wnt y proteínas Wnt es indicativo de la presencia de una proteína Wnt y/o de señalización de Wnt. En una realización, el método comprende además determinar si el nivel de señalización de Wnt es aberrante, el método comprende además comparar el nivel de unión en la muestra con respecto al nivel en una segunda muestra, que se conoce que tiene señalización de Wnt fisiológicamente normal. Un nivel de unión en la muestra que es más alto o más bajo que el de la segunda muestra es indicativo de señalización de Wnt aberrante. En otra

realización, la señalización de Wnt aberrante es además indicativa de la presencia de un trastorno mediado por Wnt, tal como el cáncer.

Otro aspecto de la invención proporciona un método de modular la expresión de un gen Wnt diana en una célula caracterizada por la señalización de Wnt activada o excesiva, el cual comprende contactar la célula con una cantidad efectiva de un antagonista de Wnt descrito anteriormente.

Otro aspecto de la invención proporciona un método de tratar terapéuticamente un cáncer mediada por Wnt, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista de Wnt que comprende un componente del dominio Frizzled y un dominio Fc. El componente del dominio Frizzled del antagonista de Wnt comprende un polipéptido derivado de una proteína Frz, una proteína FRP, o una proteína Ror. En una realización, el antagonista de Wnt es activo *in vivo* por al menos 1 hora. En otra realización, el antagonista de Wnt es activo *in vivo* por al menos 5 horas. En otra realización, el antagonista de Wnt tiene una vida media *in vivo* de al menos 1 día. En otra realización, el antagonista de Wnt tiene una vida media *in vivo* de al menos 2 días.

En una realización adicional de este aspecto, el componente del dominio Frizzled comprende un dominio mínimo CRD (ECD) proveniente de un polipéptido Frz seleccionado a partir del grupo que consiste de Frz1h (ID SEC NO: 18), Frz2h (ID SEC NO: 19), Frz3h (ID SEC NO: 20), Frz4h (ID SEC NO: 21), Frz5h (ID SEC NO: 22), Frz6h (ID SEC NO: 23), Frz7h (ID SEC NO: 24), Frz8h (ID SEC NO: 25), Frz9h (ID SEC NO: 26), y Frz10h (ID SEC NO: 27), y variantes activas del mismo. En una realización adicional, el componente del dominio Frizzled comprende un dominio mínimo CRD (ECD) proveniente de un polipéptido FRPs seleccionado a partir del grupo que consiste de FRP1s (ID SEC NO: 28), FRP2s (ID SEC NO: 29), FRP3s (ID SEC NO: 30), FRP4s (ID SEC NO: 31), y FRP5s (ID SEC NO: 32), y variantes activas del mismo. En una realización adicional, el componente del dominio Frizzled comprende un dominio mínimo CRD (ECD) proveniente de un polipéptido Ror seleccionado a partir del grupo que consiste de Ror1h (ID SEC NO: 33), y Ror2h (ID SEC NO: 34), y variantes activas del mismo.

En una realización adicional, el componente del dominio Frizzled comprende un polipéptido Frz maduro seleccionado a partir del grupo que consiste de: (ID SEC NO: 50), Frz2h (ID SEC NO: 51), Frz3h (ID SEC NO: 52), Frz4h (ID SEC NO: 53), Frz5h (ID SEC NO: 54), Frz6h (ID SEC NO: 55), Frz7h (ID

SEC NO: 56), Frz8h (ID SEC NO: 57), Frz9h (ID SEC NO: 58), y Frz10h (ID SEC NO: 59), y variantes activas del mismo, o un polipéptido FRPs maduro seleccionado a partir del grupo que consiste de FRP1s (ID SEC NO: 60), FRP2s (ID SEC NO: 61), FRP3s (ID SEC NO: 62), FRP4s (ID SEC NO: 63), y FRP5s (ID SEC NO: 64), y variantes activas del mismo, o un polipéptido Ror maduro seleccionado a partir del grupo que consiste de Ror1h (ID SEC NO: 65), y Ror2h (ID SEC NO: 66), y variantes activas del mismo.

En una realización adicional, el componente del dominio Frizzled comprende un pro-polipéptido Frz seleccionado a partir del grupo que consiste de Frz1h (ID SEC NO: 35), Frz2h (ID SEC NO: 36), Frz3h (ID SEC NO: 37), Frz4h (ID SEC NO: 38), Frz5h (ID SEC NO: 39), Frz6h (ID SEC NO: 40), Frz7h (ID SEC NO: 41), Frz8h (ID SEC NO: 42), Frz9h (ID SEC NO: 43), y Frz10h (ID SEC NO: 44), y variantes activas del mismo, o un pro-polipéptido FRPs seleccionado a partir del grupo que consiste de FRP1s (ID SEC NO: 45), FRP2s (ID SEC NO: 46), FRP3s (ID SEC NO: 47), FRP4s (ID SEC NO: 48), y FRP5s (ID SEC NO: 49), y variantes activas del mismo.

En una realización, el antagonista de Wnt comprende un componente Fc derivado a partir de una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En otra realización, el Fc es derivado a partir de una inmunoglobulina IgG1. En otra realización la secuencia del Fc es mostrada en la ID SEC NO: 67 o ID SEC NO: 68.

En una realización, el antagonista de Wnt comprende además un enlazador que conecta el componente del dominio Frizzled al dominio Fc. En una realización, el enlazador es un péptido enlazador tal como ESGGGGVT (ID SEC NO: 69), LESGGGGVT (ID SEC NO: 70), GRAQVT (ID SEC NO: 71), WRAQVT (ID SEC NO: 72), y ARGRAQVT (ID SEC NO: 73).

En realizaciones particulares, el antagonista de Wnt comprende un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de Frz8-Fc (ID SEC NO: 74), Frz5-Fc (ID SEC NO: 75), Frz1-Fc (ID SEC NO: 76), Frz2-Fc (ID SEC NO: 77), Frz3-Fc (ID SEC NO: 78), Frz4-Fc (ID SEC NO: 79), Frz6-Fc (ID SEC NO: 80), Frz7-Fc (ID SEC NO: 81), Frz9-Fc (ID SEC NO: 82), Frz10-Fc (ID SEC NO: 83), FRP1s-Fc (ID SEC NO: 84), FRP2s (ID SEC NO: 85), FRP3s-Fc (ID SEC NO: 86), FRP4s-Fc (ID SEC NO: 87), y FRP5s-Fc (ID SEC NO: 88).

La administración del antagonista detiene cualquier incremento posterior en el tamaño o el avance en la gravedad del cáncer. En una realización, la

administración del antagonista de Wnt resulta en la reducción en el tamaño o la gravedad del cáncer. En otra realización, la administración del antagonista de Wnt reduce la carga tumoral del cáncer. En otra realización, la administración del antagonista de Wnt mata el cáncer.

Otro aspecto de la invención proporciona el uso de un antagonista de Wnt en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular. El antagonista de Wnt comprende un componente del dominio Frizzled y un dominio Fc. El componente del dominio Frizzled del antagonista de Wnt comprende un polipéptido derivado de una proteína Frz, una proteína FRP, o una proteína Ror. En una realización, el antagonista de Wnt es activo *in vivo* por al menos 1 hora. En otra realización, el antagonista de Wnt es activo *in vivo* por al menos 5 horas. En otra realización, el antagonista de Wnt tiene una vida media *in vivo* de al menos 1 día. En otra realización, el antagonista de Wnt tiene una vida media *in vivo* de al menos 2 días.

En una realización adicional de este aspecto, el componente del dominio Frizzled comprende un dominio mínimo CRD (ECD) proveniente de un polipéptido Frz seleccionado a partir del grupo que consiste de Frz1h (ID SEC NO: 18), Frz2h (ID SEC NO: 19), Frz3h (ID SEC NO: 20), Frz4h (ID SEC NO: 21), Frz5h (ID SEC NO: 22), Frz6h (ID SEC NO: 23), Frz7h (ID SEC NO: 24), Frz8h (ID SEC NO: 25), Frz9h (ID SEC NO: 26), y Frz10h (ID SEC NO: 27), y variantes activas del mismo. En una realización adicional, el componente del dominio Frizzled comprende un dominio mínimo CRD (ECD) proveniente de un polipéptido FRPs seleccionado a partir del grupo que consiste de FRP1s (ID SEC NO: 28), FRP2s (ID SEC NO: 29), FRP3s (ID SEC NO: 30), FRP4s (ID SEC NO: 31), y FRP5s (ID SEC NO: 32), y variantes activas del mismo. En una realización adicional, el componente del dominio Frizzled comprende un dominio mínimo CRD (ECD) proveniente de un polipéptido Ror seleccionado a partir del grupo que consiste de Ror1h (ID SEC NO: 33), y Ror2h (ID SEC NO: 34), y variantes activas del mismo.

En una realización adicional, el componente del dominio Frizzled comprende un polipéptido Frz maduro seleccionado a partir del grupo que consiste de: (ID SEC NO: 50), Frz2h (ID SEC NO: 51), Frz3h (ID SEC NO: 52), Frz4h (ID SEC NO: 53), Frz5h (ID SEC NO: 54), Frz6h (ID SEC NO: 55), Frz7h (ID SEC NO: 56), Frz8h (ID SEC NO: 57), Frz9h (ID SEC NO: 58), y Frz10h (ID SEC NO: 59), y variantes activas del mismo, o un polipéptido FRPs maduro seleccionado a partir del grupo que consiste de FRP1s (ID SEC NO: 60),

FRP2s (ID SEC NO: 61), FRP3s (ID SEC NO: 62), FRP4s (ID SEC NO: 63), y FRP5s (ID SEC NO: 64), y variantes activas del mismo, o un polipéptido Ror maduro seleccionado a partir del grupo que consiste de Ror1h (ID SEC NO: 65), y Ror2h (ID SEC NO: 66), y variantes activas del mismo.

En una realización adicional, el componente del dominio Frizzled comprende un pro-polipéptido Frz seleccionado a partir del grupo que consiste de Frz1h (ID SEC NO: 35), Frz2h (ID SEC NO: 36), Frz3h (ID SEC NO: 37), Frz4h (ID SEC NO: 38), Frz5h (ID SEC NO: 39), Frz6h (ID SEC NO: 40), Frz7h (ID SEC NO: 41), Frz8h (ID SEC NO: 42), Frz9h (ID SEC NO: 43), y Frz10h (ID SEC NO: 44), y variantes activas del mismo, o un pro-polipéptido FRPs seleccionado a partir del grupo que consiste de FRP1s (ID SEC NO: 45), FRP2s (ID SEC NO: 46), FRP3s (ID SEC NO: 47), FRP4s (ID SEC NO: 48), y FRP5s (ID SEC NO: 49), y variantes activas del mismo.

En una realización, el antagonista de Wnt comprende un componente Fc derivado a partir de una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En otra realización, el Fc es derivado a partir de una inmunoglobulina IgG1. En otra realización la secuencia del Fc es mostrada en la ID SEC NO: 67 o ID SEC NO: 68.

En una realización, el antagonista de Wnt comprende además un enlazador que conecta el componente del dominio Frizzled al dominio Fc. En una realización, el enlazador es un péptido enlazador tal como ESGGGGVT (ID SEC NO: 69), LESGGGGVT (ID SEC NO: 70), GRAQVT (ID SEC NO: 71), WRAQVT (ID SEC NO: 72), y ARGRAQVT (ID SEC NO: 73).

En realizaciones particulares, el antagonista de Wnt comprende un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de Frz8-Fc (ID SEC NO: 74), Frz5-Fc (ID SEC NO: 75), Frz1-Fc (ID SEC NO: 76), Frz2-Fc (ID SEC NO: 77), Frz3-Fc (ID SEC NO: 78), Frz4-Fc (ID SEC NO: 79), Frz6-Fc (ID SEC NO: 80), Frz7-Fc (ID SEC NO: 81), Frz9-Fc (ID SEC NO: 82), Frz10-Fc (ID SEC NO: 83), FRP1s-Fc (ID SEC NO: 84), FRP2s-Fc (ID SEC NO: 85), FRP3s-Fc (ID SEC NO: 86), FRP4s-Fc (ID SEC NO: 87), y FRP5s-Fc (ID SEC NO: 88).

En una realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer, tal como cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de mama, leucemia, gliomas, o meduloblastomas.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** es un resumen abreviado de la vía de señalización de Wnt canónica, tanto en el estado inactivo o "apagado" o, así como en el estado activo o "encendido".

La **Figura 2** es un diagrama esquemático que representa un dominio extracelular Frizzled ligado a la región Fc de un dominio de inmunoglobulina humana.

La **Figura 3** es un alineamiento de los 17 dominios extracelulares conocidos de la proteína Frizzled. La **Figura 3A** muestra un alineamiento de los dominios extracelulares de las 10 proteínas pro-Frizzled (ID SEC NO: 35-44) y las 5 proteínas pro-FRPs (ID SEC NO: 45-49), mientras que la **Figura 3B** muestra un alineamiento de los dominios extracelulares de las 10 proteínas Frizzled maduras, (ID SEC NO: 50-59), y las 5 proteínas FRPs maduras (ID SEC NO: 60-64), así como los dominios extracelulares de las proteínas Ror maduras (ID SEC NO: 65-66). Residuos similares son encasillados en gris, residuos idénticos se indican mediante asteriscos. Residuos similares se agrupan como ácidos, básicos, polares y no polares. En la **Figura 3B**, los dominios mínimos CRD (ECD) se indican entre dos líneas señaladas con flechas encasilladas (ID SEC NO: 18-34).

La **Figura 4** muestra las secuencias de las construcciones quiméricas Frz (156)-Fc y Frz (173)-Fc. La Figura 4A muestra la secuencia Frz (173)-Fc más larga (ID SEC NO: 113). Mostrada en negrita (es decir, los primeros 24 residuos de aminoácidos N-terminales) está la secuencia señal líder. Los residuos 25-27 son residuos de alanina que pueden estar presentes o ausentes en la proteína madura. Mostradas en una caja de texto (es decir, los residuos 157-173) están las secuencias adicionales de los receptores Frz8 que distinguen las construcciones quiméricas más larga (Frz173) de la más corta (Frz156). La secuencia enlazadora (es decir, los residuos 174-182) está subrayada, mientras que la secuencia del dominio Fc se muestra en cursiva (es decir, los residuos 183-409). La **Figura 4B** muestra la secuencia Frz (156)-Fc más corta (ID SEC NO: 74). En negrita (es decir, los primeros 24 residuos de aminoácidos N-terminales) está la secuencia señal líder. Los residuos 25-27 son residuos de alanina que pueden estar presentes o ausentes en la proteína madura. La secuencia enlazadora (es decir, los residuos 157-164) está subrayada, mientras que la secuencia del dominio Fc se muestra en cursiva (es decir, los residuos 165-391).

La **Figura 5A-5H** muestra las secuencias de ácido nucleico que codifican varias construcciones quiméricas del antagonista de Wnt (Frz1-Fc (ID SEC NO: 115), Frz2-Fc (ID SEC NO: 116), Frz3-Fc (ID SEC NO: 117), Frz4-Fc (ID SEC NO: 118), Frz5-Fc (ID SEC NO: 119), Frz6-Fc (ID SEC NO: 120), Frz7-Fc (ID SEC NO: 121), Frz8-Fc (ID SEC NO: 122), Frz9-Fc (ID SEC NO: 123), Frz10-Fc (ID SEC NO: 124), FRP1s-Fc (ID SEC NO: 125), FRP2s-Fc (ID SEC NO: 126), FRP3s- Fc (ID SEC NO: 127), FRP4s-Fc (ID SEC NO: 128), y FRP5s-Fc (ID SEC NO: 129)).

La **Figura 6A-6E** muestra las secuencias de aminoácidos de longitud completa de las proteínas humanas Frz, FRPs, y Ror.

La **Figura 7** (**A**, **B** y **C**) muestra las secuencias de aminoácidos de varias construcciones quiméricas de antagonistas de Wnt (Frz1-Fc (ID SEC NO: 76), Frz2-Fc (ID SEC NO: 77), Frz3-Fc (ID SEC NO: 78), Frz4-Fc (ID SEC NO: 79), Frz5-Fc (ID SEC NO: 75), Frz6-Fc (ID SEC NO: 80), Frz7-Fc (ID SEC NO: 81), Frz8-Fc (ID SEC NO: 74), Frz9-Fc (ID SEC NO: 82), Frz10-Fc (ID SEC NO: 83), FRP1s-Fc (ID SEC NO: 84), FRP2s-Fc (ID SEC NO: 85), FRP3s-Fc (ID SEC NO: 86), FRP4s-Fc (ID SEC NO: 87), y FRP5s-Fc (ID SEC NO: 88)). El texto en negrita para Frz1-Fc (primeros 28 residuos de aminoácidos N-terminales), Frz2-Fc (primeros 31 residuos de aminoácidos N-terminales), Frz3-Fc (primeros 31 residuos de aminoácidos N-terminales), Frz4-Fc (primeros 31 residuos de aminoácidos N-terminales) Frz5-Fc (primeros 31 residuos de aminoácidos N-terminales), y FRP3s-Fc (primeros 31 residuos de aminoácidos N-terminales) indica una secuencia líder no nativa. El enlazador es subrayado y el dominio Fc, siguiendo al enlazador, se muestra en cursiva.

La **Figura 8** muestra un alineamiento de los dominios extracelulares Frizzled, donde en negro se muestran los residuos conservados a través de todos los receptores y en gris se representan los residuos conservados a través de los grupos de homólogos.

La **Figura 9** muestra las proteínas Frizzleds agrupadas en familias sobre la base de las identidades de las secuencias de los dominios extracelulares y de longitud completa.

La **Figura 10** representa las muestras de las proteínas de fusión Frizzled-Fc expresadas y purificadas a partir de células CHO. Las muestras fueron separadas sobre geles de SDS-PAGE no reductores y reveladas mediante tinción de Coomassie.

La **Figura 11** muestra una comparación de la estabilidad en el suero de las dos quimeras Frz8-Fc diferentes, Frz8 (173)-Fc y Frz (156)-Fc. La **Figura 11A** es una inmunoelectrotransferencia para el Fc humano usado para detectar las proteínas quiméricas presentes en puntos de tiempo en incremento en el suero de ratones desnudos atímicos inyectados con las quimeras. La **Figura 11B** muestra la actividad inhibitoria de Wnt de las proteínas quiméricas ensayadas mediante la medición de la actividad TOPglow mostrada en el eje Y como la actividad luciferasa relativa.

La **Figura 12** es un gráfico del volumen tumoral en el tiempo como consecuencia del tratamiento con la quimera Frz8 (173)-Fc.

La **Figura 13** muestra los datos farmacocinéticos (PK) para Frz8-Fc luego de la administración de una dosis única de la proteína. La **Figura 13A** es una inmunoelectrotransferencia de un suero natural proveniente de ratones tratados con Frz8-Fc, mostrando la detección en el suero a los 7 días y por encima a partir de ambos 20 o 5 mg/kg I.V. ó 20 mg/kg I.P. Las **Figuras 13B y 13C**, las cifras son un resumen gráfico de los niveles séricos de Frz8-Fc según lo determinado a partir del estudio farmacocinético. La **Figura 13D** es un resumen de los parámetros para un modelo bifásico de las farmacocinéticas de Frz8-Fc.

La **Figura 14** demuestran la capacidad incrementada de Frz8-ECD para bloquear la señalización de Wnt3a, cuando está ligado a un domino Fc dimérico. La **Figura 14A** es un gráfico de la IC_{50} de un ensayo de inhibición de Wnt3a, de dos preparaciones diferentes de Frz8 (156)-FC. La **Figura 14B** es un gel que confirma la pureza del Frz8 (156) CRD (ECD) aislado. Lo que se muestra es: (a) Frz8 ECD no reducido (Carril 1), (b) marcadores de peso molecular (Carril 2); y Frz8 ECD reducido (Carril 3).

La **Figura 15** muestra la unión directa de Wnt3a a la quimera Frz8-Fc. La **Figura 15 A** es un sensograma Biacore que demuestra la unión de Wnt3a soluble purificado a Frz8-Fc inmovilizado. La **Figura 15B** es una inmunoprecipitación de un Wnt3a soluble purificado mediante Frz8-Fc inmovilizado.

La **Figura 16** demuestra la unión directa de varios quimeras Frz-Fc a ligandos Wnt según lo medido usando el sistema OCTET™. La **Figura 16A** muestra los datos de la unión de Wnt3a a las quimeras Frz1-Frz10-Fc, La **Figura 16B** muestra los datos de la unión de Wnt3a a las quimeras FRPs-Fc.

La **Figura 16 C** muestra los datos de la unión de Wnt5a a las quimeras Frz1-Fc-Frz10 y a las quimeras FRPs-Fc.

La **Figura 17** muestra el efecto de los antagonistas de Wnt sobre las células estimuladas con Wnt transitoriamente transfectadas con el plásmido indicador TOPglow luciferasa TCF. La **Figura 17A** muestra las células estimuladas con Wnt3a y la **Figura 17B** muestra las células estimuladas con Wnt-5a. Las células a ser tratadas con Wnt5a fueron transfectadas con Frz4 y Lrp5 además del indicador. Las células 293 (de riñón humano), fueron activadas con 100ng/ml de Wnt3a o 1ug/ml de Wnt5a. Las células entonces se dejan sin tratar, se tratan con el control Fc, o son tratadas con la proteína Frz-Fc purificada en PBS y se ensayan para la respuesta de la luciferasa.

La **Figura 18** muestra la inhibición de la señalización de Wnt por antagonistas de Wnt en células U2OS (de osteosarcoma humano) establemente transfectadas con un plásmido indicador de luciferasa TCF. La señalización de Wnt inicial en las células fue obtenida con la activación de Wnt3a.

La **Figura 19** muestra el efecto de Frz8-Fc sobre la expresión de los genes diana Wnt en las células de teratoma cultivadas y xenotrasplantes de tumores. La **Figura 19A** muestra la expresión de genes diana Wnt en líneas celulares PA-1 tratadas con Wnt3a y Frz8-Fc. El ARN aislado a partir de las células PA-1 que fueron tratados con Wnt3a, Frz8-Fc, O la proteína control Fc, fue sometido a análisis de microarreglo y el cambio en los niveles de expresión de los genes indicados en respuesta a Wnt3a, Frz8-Fc, y la proteína control Fc exógenamente añadidos fue representado. Las columnas, significan el nivel de expresión a partir de tres pocillos, las barras, el error estándar (S). La Figura **19B** muestra la expresión relativa de los genes diana Wnt, APCDD1, Gad-1, y Fzd5, en tumores NTera-2 provenientes de ratones a los que se les dió PBS, CD4-Fc, o Frz8-Fc, con respecto al control de PBS. Los datos representan el nivel de expresión promedio a partir del número indicado de tumores y son representativos de al menos dos experimentos independientes qRT-PCR realizados por duplicado. También se presenta la regulación de la expresión de cada gen mediante la adición de Wnt3a purificado a las correspondientes células cultivadas.

La **Figura 20** muestra el número de acceso y secuencia de los cebadores y las sondas utilizadas para el análisis de la Reacción en Cadena de la

Polimerasa (PCR, siglas en inglés) cuantitativa en tiempo real, de la expresión génica mostrada en la Figura 19 (Ejemplo 9).

La **Figura 21** es un esquema lineal que describe la construcción del vector usado en la transfección para crear el modelo animal de Wnt.

La **Figura 22** ilustra la eficacia de Frz8-Fc contra trasplantes de tumores de MMTV-Wnt en ratones desnudos atímicos intraperitoneal, mediante administración (IP) de la dosis. La **Figura 22A** es un gráfico que muestra los datos provenientes de ratones desnudos que presentan trasplantes de tumores MMTV-Wnt, a los que se les administró PBS, CD4-Fc (10 mg/kg/día) o Frz8-Fc (10 mg/kg/día) mediante inyección intraperitoneal dos veces por semana. El volumen tumoral promedio fue representado en el tiempo y los días de tratamiento se indican mediante flechas en el eje X. La **Figura 22B** resume en forma de tabla el volumen tumoral promedio y el promedio en % de la variación del volumen tumoral en el tiempo en los cuatro grupos de tratamiento.

La **Figura 23** ilustra la eficacia de Frz8-Fc contra el trasplante tumoral de MMTV-Wnt en ratones desnudos atímicos, mediante dosificación vía intravenosa (IV). La Figura **23A** es un gráfico que muestra los datos provenientes de ratones desnudos que presentan trasplantes de tumores MMTV-Wnt, a los que se les administró PBS, CD4-Fc (10 mg/kg/día) o Frz8-Fc (10 mg/kg/día) mediante inyección intravenosa tres veces por semana. El volumen tumoral promedio fue representado en el tiempo y los días de tratamiento se indican mediante flechas en el eje X. La **Figura 23B** resume en forma de tabla el volumen tumoral promedio y el promedio en % de la variación del volumen tumoral en el tiempo en los cuatro grupos de tratamiento.

La **Figura 24** es un gráfico de barras que muestra la actividad antagonista de la señalización de Wnt en el ensayo TOPglow, de varios antagonistas de Wnt en el suero aislado a partir del tumor MMTV Wnt de estudio. Las muestras del eje X aparecen en los grupos A-E (**Figura 24A**) o A-F (**Figura 24B**), de acuerdo al tratamiento, el número de ratones en estudio y la dilución. La actividad luciferasa relativa en el ensayo del gen indicador TOPGLOW se muestra en el eje Y. Todas las muestras fueron tratadas con ~ 40 ng/ml de Wnt3a purificada a excepción de NA (control). Todos las otras proteínas controles están presentes en el medio a 5 μg/ml. La Figura **24A** muestra los

resultados de los análisis del suero aislado a partir de los ratones tratados por vía IP, mientras que los tratados por vía IV aparecen en la Figura **24B**.

La **Figura 25** muestra actividad antagonista de la señalización de Wnt en el ensayo de TOPglow de varios antagonistas de Wnt en las líneas celulares de teratocarcinoma indicadas en ausencia (**Figura 25A**) o presencia (**Figura 25B**), de Wnt3a añadido de forma exógena. Para cada línea celular, la actividad se expresó en relación a la observada en ausencia de cualquier tratamiento (NA); representativa de al menos dos experimentos independientes. La actividad luciferasa relativa (eje Y) fue determinada a partir de los ensayos de TOPglow en varias líneas celulares de cáncer en presencia o ausencia de inhibidores de Wnt.

La **Figura 26** demuestra la eficacia antitumoral del tratamiento con Frz8 (156)-Fc sobre el crecimiento de xenotrasplantes tumorales NTera2 en ratones desnudos atímicos. La **Figura 26A** es el diagrama de flujo del procedimiento, mientras que la **Figura 26B** es un gráfico representativo del volumen tumoral promedio en el tiempo, mientras que los días de tratamiento son indicados mediante flechas en el eje X. La **Figura 26C** es un gráfico de barras que representa el peso de los tumores promedio de todos los animales en el grupo al momento del sacrificio, el día 20 del estudio. Las Figuras **26D** y **26E** resumen en forma de tabla el volumen tumoral promedio y el promedio en % de la variación del volumen tumoral, respectivamente.

La **Figura 27** es un gráfico de barras que muestra la actividad antagonista de señalización de Wnt del suero aislado a partir de varios animales en el estudio del tumor NTera2 según lo determinado por el ensayo de TOPglow. El eje Y muestra la actividad luciferasa relativa (eje Y) a partir del ensayo de TOPglow para los controles y el antagonista de Wnt Frz8-Fc. Ningún Wnt purificado ni medio acondicionado con Wnt adicionales se les añadió a las células.

La **Figura 28** muestra la eficacia antitumoral del tratamiento con Frz8 (156)-Fc en el crecimiento de xenotrasplantes tumorales de PA-1 en ratones desnudos atímicos. La **Figura 28A** es el diagrama de flujo del procedimiento, mientras que la **Figura 28B** es un gráfico representativo del volumen tumoral promedio en el tiempo. La **Figura 28C** es un gráfico de barras que representa el peso de los tumores promedio de todos los animales en el grupo al momento del sacrificio, el día 20 del estudio. Las Figuras **28D** y **28E**

resumen en forma de tabla el volumen tumoral promedio y el promedio en % de la variación del volumen tumoral, respectivamente.

La **Figura 29** muestra la inhibición de la señalización de Wnt en ratones tratados con Frz8-Fc o Frz5-Fc según lo determinado mediante el ensayo de TOPglow. El eje Y muestra la actividad luciferasa relativa (eje Y) a partir del ensayo de TOPglow, para los controles y para los antagonistas de Wnt, Frz8-Fc y Frz5-Fc.

La **Figura 30** muestra la expresión reducida de Axin2 en tumores tratados con Frz8-Fc y Frz5-Fc, con la **Figura 30A** que muestra la expresión normalizada para la expresión de GAPDH y la **Figura 30B** que muestra expresión normalizada para la expresión de rpl19.

La **Figura 31** muestra las fotomicrografías por inmunohistoquímica (IHC, siglas en inglés) para la tinción IHC de la β-catenina y demuestra que el tratamiento con Frz8-Fc sobre los tejidos regenerativos tales como el intestino y la piel parecen normales. La Figura **31A** muestra la IHC para la β-catenina en el intestino delgado de los ratones tratados con PBS (A-1), con la proteína control (A-2) y con Frz8-Fc (A-3). La **Figura 31B** muestra la IHC para la β-catenina en la piel de los ratones tratados con PBS (B-1), con la proteína control (B-2) y con Frz8-Fc (B-3).

La **Figura 32** es una ilustración de la señalización de Wnt activa en el cáncer de mama humano. La **Figura 32A** muestra la expresión de Wnt-1 (tal como se muestra por hibridación in vitro) en condiciones normales (A-1), de bajo grado (A-2) y de alto grado (A-3) de un tumor de mama humano reportado en Wong y otros., J. Pathol. **196**: 145 (2002). La **Figura 32B** muestra la localización nuclear (B-1) y citoplasmática (B-2) de la β-catenina en pacientes de cáncer de mama (como se muestra por IHC). También se muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (B-3) que muestra la probabilidad de supervivencia de los pacientes que se correlaciona patrón de expresión de β-catenina. Estos datos fueron inicialmente reportados en Lin y otros. P.N.A.S. (USA) **97** (8): 4262-66 (2000). La **Figura 32C** es un análisis por microarreglo de la expresión de Wnt-1 en una mama normal proveniente de un paciente sin cáncer en comparación con el tejido aislado de un paciente con carcinoma ductal infiltrante, her-2 negativo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

I. DEFINICIONES

Una "proteína Wnt" es un ligando del componente de la vía de señalización de Wnt que se une a un receptor Frizzled de manera que activa la señalización de Wnt. Ejemplos específicos de proteínas Wnt incluyen al menos 19 miembros, entre las cuales se encuentran: Wnt-1 (RefSec.: NM_005430), Wnt-2 (RefSec.: NM_003391), Wnt-2B (Wnt-13) (RefSec.: NM_004185), Wnt-3 (RefSec.: NM_030753), Wnt3a (RefSec.: NM_033131), Wnt-4 (RefSec.: NM_030761), Wnt-5A (RefSec.: NM_003392), Wnt-5B (RefSec.: NM_032642), Wnt-6 (RefSec.: NM_006522), Wnt-7A (RefSec.: NM_004625), Wnt-7B (RefSec.: NM_058238), Wnt-8A (RefSec.: NM_058244), Wnt-8B (RefSec.: NM_003393), Wnt-9A (Wnt-14) (RefSec.: NM_003395), Wnt-9B (Wnt-15) (RefSec.: NM_003396), Wnt-10A (RefSec.: NM_025216), Wnt-10B (RefSec.: NM_003394), Wnt-11 (RefSec.: NM_004626), Wnt-16 (RefSec.: NM_016087)). Si bien cada miembro tiene distintos grados de identidad de secuencia, cada uno contiene los residuos de cisteína 23-24, los cuales muestran espaciamiento altamente conservado. McMahon, AP y otros. *Trends Genet.* **8**: 236-242 (1992), Miller, JR., *Genoma Biol.* **3** (1): 3001.1-3001.15 (2002). Para los efectos de la presente invención, una proteína Wnt y sus variantes activas es una proteína que se une a un Frizzled ECD o al componente CRD de tal Frz ECD.

Una proteína "Frizzled" (Frz) es un componente de la vía de señalización de Wnt es un receptor de siete pasos transmembrana que se une a una proteína Wnt, y además forma complejos con otros componentes de señalización de Wnt asociados a la membrana, de manera tal que transmiten la señalización de Wnt componentes intracelulares corriente abajo. Las proteínas Frz incluyen Frz1, Frz2, Frz3, Frz4, Frz5, Frz6, Frz7, Frz8, Frz9, y Frz10. Ejemplos de proteínas Frz de longitud completa son Frz1h (NP_003496) (ID SEC NO: 1), Frz2h (NP_001457) (ID SEC NO: 2), Frz3h (NP_059108) (ID SEC NO: 3), Frz4h (NP_036325) (ID SEC NO: 4), Frz5h (NP_003459) (ID SEC NO: 5), Frz6h (NP_003497) (ID SEC NO: 6), Frz7h (NP_003498) (ID SEC NO: 7), Frz8h (NP_114072) (ID SEC NO: 8), Frz9h (NP_003499) (ID SEC NO: 9), y Frz10h (NP_009128) (ID SEC NO: 10) (Figuras 6A-6C).

Un "proteína relacionada con Frizzled secretada" (FRPs) es un componente de la vía de señalización de Wnt que es un polipéptido extracelular secretado

que se une a una proteína Wnt. Las proteínas FRPs incluyen FRP1s, FRP2s, FRP3s, FRP4s, y FRP5s. Ejemplos de proteínas FRPs de longitud completa son FRP1s (NP_003003) (ID SEC NO: 11), FRP2s (NP_003004) (ID SEC NO: 12), FRP3s (NP_001454) (ID SEC NO: 13), FRP4s (NP_003005) (ID SEC NO: 14), y FRP5s (NP_003006) (ID SEC NO: 15) (Figuras 6D-6C).

La proteína "Ror", incluye las homólogas de mamífero, Ror1 y Ror2, que se caracterizan por dominios ricos en cisteína (CRD) similares a Frizzled extracelulares, así como por dominios kringle proximales a la membrana. Las proteínas Ror desempeñan funciones cruciales en la morfogénesis del desarrollo y están asociadas con diferentes componentes del citoesqueleto. Ror1 se co-localiza con la F-actina a lo largo de las fibras de estrés, mientras que Ror2 se co-localiza parcialmente con los microtúbulos. Ror1 y Ror2 comparten aproximadamente el 58% de identidad de secuencia total. Ror2 se asocia con la proteína Dlxin-1 de la familia de antígenos asociados a melanoma (MAGE) y regula su distribución intracelular. Las proteínas Ror incluyen Ror1 y Ror2. Ejemplos de proteínas Ror de longitud completa son Ror1h (NP_005003) (ID SEC NO: 16), y Ror2h (NP_004551) (ID SEC NO: 17) (Figuras 6D-6E).

Un "componente del dominio Frz" es un polipéptido derivado de una proteína Frz, una proteína FRPs, una proteína Ror, u otra proteína, que es capaz de unirse con una proteína Wnt. Un polipéptido "derivado de" una proteína significa un polipéptido que posee una secuencia de aminoácidos que se encuentran dentro de la secuencia de la proteína de referencia o dentro de la secuencia de las variantes activas de la proteína. Ejemplos de un componente del dominio Frz incluyen un dominio rico en cisteína mínimo (CRD) de un dominio extracelular "CRD (ECD)" de una proteína Frz, una proteína FRPs, o una proteína Ror, tal como el CRD (ECD) de Frz1, Frz2, Frz3, Frz4, Frz5, Frz6, Frz7, Frz8, Frz9, Frz10. FRP1s, FRP2s, FRP3s, FRP4s, FRP5s, Ror1, o Ror2, y variantes activas de las mismas. El DRC (DCE) es un motivo estructural conservado de 100 a 250 aminoácidos y se define por 10 cisteínas altamente conservadas. Ejemplos particulares de CRD (ECD)s humanos se muestran en la caja de texto en la Figura 3B y son presentados como ID SEC NO: Frz1h (ID SEC NO: 18), Frz2h (ID SEC NO: 19), Frz3h (ID SEC NO: 20), Frz4h (ID SEC NO: 21), Frz5h (ID SEC NO: 22), Frz6h (ID SEC NO: 23), Frz7h (ID SEC NO: 24), Frz8h (ID SEC NO: 25), Frz9h (ID SEC NO: 26), Frz10h (ID SEC NO: 27), FRP1s (ID SEC NO: 28),

FRP2s (ID SEC NO: 29), FRP3s (ID SEC NO: 30), FRP4s (ID SEC NO: 31), FRP5s (ID SEC NO: 32), Ror1h (ID SEC NO: 33), y Ror2h (ID SEC NO: 34).

Ejemplos adicionales de un componente del dominio Frz incluyen un dominio pro-Frz derivado de una proteína pro-Frz o pro-FRPs tal como Frz1, Frz2, Frz3, Frz4, Frz5, Frz6, Frz7, Frz8, Frz9, Frz10. FRP1s, FRP2s, FRP3s, FRP4s, o FRP5s, y variantes activas de las mismas. Ejemplos particulares de dominios pro-Frz humanos se muestra en la Figura 3A y son presentados como ID SEC NOs: Frz1h (ID SEC NO: 35), Frz2h (ID SEC NO: 36), Frz3h (ID SEC NO: 37), Frz4h (ID SEC NO: 38), Frz5h (ID SEC NO: 39), Frz6h (ID SEC NO: 40), Frz7h (ID SEC NO: 41), Frz8h (ID SEC NO: 42), Frz9h (ID SEC NO: 43), Frz10h (ID SEC NO: 44), FRP1s (ID SEC NO: 45), FRP2s (ID SEC NO: 46), FRP3s (ID SEC NO: 47), FRP4s (ID SEC NO: 48), y FRP5s (ID SEC NO: 49).

Ejemplos adicionales de un componente del dominio Frz incluyen un dominio Frz maduro derivado de una proteína Frz, FRPs, o Ror madura, tal como Frz1, Frz2, Frz3, Frz4, Frz5, Frz6, Frz7, Frz8, Frz9, Frz10. FRP1s, FRP2s, FRP3s, FRP4s, FRP5s, Ror1, o Ror2 y variantes activas de las mismas. Ejemplos particulares de dominios Frz maduros humanos se muestran en la Figura 3B y son presentados como ID SEC NO: Frz1h (ID SEC NO: 50), Frz2h (ID SEC NO: 51), Frz3h (ID SEC NO: 52), Frz4h (ID SEC NO: 53), Frz5h (ID SEC NO: 54), Frz6h (ID SEC NO: 55), Frz7h (ID SEC NO: 56), Frz8h (ID SEC NO: 57), Frz9h (ID SEC NO: 58), Frz10h (ID SEC NO: 59), FRP1s (ID SEC NO: 60), FRP2s (ID SEC NO: 61), FRP3s (ID SEC NO: 62), FRP4s (ID SEC NO: 63), FRP5s (ID SEC NO: 64), Ror1h (ID SEC NO: 65), y Ror2h (ID SEC NO: 66).

Un "antagonista de Wnt" es un polipéptido quimérico que comprende un componente del dominio Frz y un dominio Fc de inmunoglobulina que se une a una proteína Wnt y se activa mediante la atenuación de la señalización celular de Wnt, o un síntoma fisiológico resultante de la misma.

En ciertas realizaciones, el dominio Fc es un dominio Fc de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana. En una realización, el dominio Fc es un dominio Fc de la IgG1 humana. Ejemplos específicos de los dominios Fc se muestran en las figuras 4, 5, y las Figuras 7 y en las ID SEC NO: 67 y ID SEC NO: 68.

En algunas realizaciones, el componente del dominio Frz y el dominio Fc son fusionados mediante un enlazador. El término "enlazador" se refiere a un componente que mantiene unido el componente del dominio Frz al

componente del dominio Fc. Loa enlazadores que son apropiados para usar en la invención muestran una mínima o ninguna interferencia en la expresión, secreción y plegamiento de los dominios proteicos de las moléculas antagonistas de Wnt y proporciona una mínima o ninguna interferencia en la función efectora del dominio Fc o en la función de interacción con las proteínas Wnt del dominio Frz (por ejemplo, la unión a una proteína Wnt) ya sea por medio estérico o de otro tipo. En realizaciones particulares, el enlazador es una secuencia peptídica corta. Una secuencia enlazadora también puede incluir otros residuos de aminoácidos provenientes ya sea del componente del dominio Frz o del dominio Fc fuera de los residuos mínimos necesarios para la actividad. Enlazadores preferidos también proporcionarán una buena estabilidad en el suero y son resistentes a la degradación por proteasas. Ejemplos específicos de enlazadores útiles aparecen en las Figuras 4, 5 y 7, los cuales incluyen las secuencias ESGGGGVT (ID SEC NO: 69), LESGGGGVT (ID SEC NO: 70), GRAQVT (ID SEC NO: 71), WRAQVT (ID SEC NO: 72), y ARGRAQVT (ID SEC NO: 73). Como se señaló anteriormente, estos enlazadores pueden incluir residuos de aminoácidos adicionales, provenientes ya se del componente del dominio Frz o del dominio Fc, fuera de los residuos mínimos necesarios para la actividad. Estos enlazadores también pueden comprender residuos de aminoácidos adicionales diferentes de los que provienen del componente del dominio Frz o del componente del dominio Fc.

Un "componente de la vía de señalización de Wnt" es un componente que transduce una señal procedente de una interacción entre una proteína Wnt y un receptor Frz. Dado que la vía de señalización de Wnt es compleja, e involucra una regulación por retroalimentación extensa, existen numerosos y probablemente miembros aún no descubiertos de la vía de señalización de Wnt. Ejemplos de componentes de la vía de señalización de Wnt incluyen las proteínas asociadas a la membrana LRP5 y LRP6, Axina y Dishevelled, las proteínas interactivas con Wnt extracelulares FRPs, WIF-1, las proteínas que inactivan LRP, D-kk y Krn, la proteína citoplásmica β-catenina, los miembros del "complejo de degradación" de β-catenina, APC, GSK3β, CKIα y PP2A, las proteínas de transporte nuclear APC, pygopus y bcl9/legless, y los factores de transcripción TCF/LEF, Groucho y varias histonas acetilasas tales como CBP/p300 y BRG-1.

Un "trastornos mediado por Wnt" es un trastorno, condición o enfermedad caracterizada por la señalización de Wnt aberrante. En un aspecto

específico, la señalización de Wnt aberrante es un nivel de señalización de Wnt en una célula o tejido sospechoso de estar enfermo que excede el nivel de señalización de Wnt en una célula o tejido similar no enfermo. En un aspecto específico, el trastorno mediado por Wnt incluye el cáncer.

El término "cáncer" se refiere a la condición fisiológica en los mamíferos que se caracteriza típicamente por el crecimiento/proliferación celular no regulados. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no están limitados a: carcinoma, linfoma, blastoma, y leucemia. Ejemplos más particulares de tipos de cáncer incluyen, pero no están limitados a: leucemia linfocítica crónica (LLC), cáncer de pulmón, incluidos los de células no pequeñas (CPNM), cáncer de mama, de ovario, del cuello del útero, del endometrio, de la próstata, cáncer colorrectal, carcinoide intestinal, de vejiga, de estómago, de páncreas, hepático (hepatocelular), hepatoblastoma, de esófago, adenocarcinoma pulmonar, mesotelioma, sarcoma sinovial, osteosarcoma, de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas, angiofibroma nasofaríngeo juvenil, liposarcoma, de la tiroides, melanoma, carcinoma de células basales (BCC, siglas en inglés), meduloblastoma y desmoide. El término "secuencias de control" se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia que codifica operativamente conectada en un organismo hospedero particular. Las secuencias de control que son apropiadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Se conoce que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

El ácido nucleico está "operativamente conectado" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está operativamente conectado a un ADN para un polipéptido si éste es expresado como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido, un promotor o potenciador está operativamente conectado a una secuencia que codifica si éste afecta la transcripción de la secuencia, o un sitio de unión al ribosoma está operativamente conectado a una secuencia que codifica si éste está posicionado de manera tal que facilita la traducción. Generalmente, "operativamente conectado" significa que las secuencias de ADN que son conectadas son contiguas, y, en el caso de una secuencia líder secretora, contigua y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La conexión se realiza por ligamiento en los sitios de

restricción convenientes. Si esos sitios no existen, se utilizan adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Un polipéptido, variante del polipéptido, o fragmentos de éste "activos", retienen una actividad biológica del componente nativo o natural del polipéptido activo. La actividad biológica se refiere a una función mediada por la contraparte nativa o natural del polipéptido activo. Por ejemplo, la unión a o una interacción proteína-proteína constituye una actividad biológica. En un sentido específico, un componente de la vía de señalización de Wnt activo es aquel que puede transducir efectivamente una señal a través de la interacción con otros componentes de la vía de señalización de Wnt. En otro sentido específico, un antagonista de Wnt activo es uno el cual atenúa detectablemente la señalización de Wnt o una condición fisiológica resultante de la misma, en relación al nivel previo a la administración del antagonistas de Wnt.

El "rigor" de las reacciones de hibridación es fácilmente determinable por una persona con conocimientos en el arte y, generalmente es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, la temperatura del lavado, y la concentración de sal. Generalmente, las sondas mayores requieren temperaturas más altas para el apareamiento, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación generalmente depende de la capacidad del ADN desnaturalizado para re-aparearse cuando las cadenas complementarias están presentes en un ambiente por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado deseado de homología entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede ser usada. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas más altas tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que temperaturas más bajas, lo harían menos. Para obtener más detalles y explicaciones sobre el rigor de las reacciones de hibridación, véase Ausubel y otros. Current Protocols Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Condiciones de alto rigor", tal como se define en la presente especificación, pueden ser identificadas por aquellas que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo cloruro de sodio 0.015 M/citrato de sodio 0.0015 M/0.1% de dodecil sulfato de sodio a 50°C, (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, 50% (v/v) de formamida con 0.1% de albúmina sérica bovina/0.1%

de Ficol/0.1% de polivinilpirrolidona/solución tamponada fosfato sódico 50mM a pH 6.5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C, o (3) hibridación durante la noche en una solución que emplea 50% de formamida, SSC 5 x (NaCl0.75 M, citrato de sodio0.075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6.8), 0.1% de pirofosfato de sodio, solución de Denhardt 5 x, ADN de esperma de salmón sonicado (50 μg/ml), 0.1% de SDS, y 10% de sulfato de dextrano a 42°C, con 10 minutos de lavado a 42°C en SSC 0.2 x (cloruro de sodio/citrato de sodio), seguido de lavado de alto rigor durante 10 minutos que consiste de SSC 0.1 x que contiene EDTA a 55°C.

"Condiciones moderadamente rigurosas" pueden ser identificadas según lo descrito por Sambrook y cols., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las descritos anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es la incubación durante la noche a 37°C en una solución que comprende: 20% de formamida, SSC 5 x (NaCl150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7.6), solución de Denhardt 5 x, 10% de sulfato de dextrano, y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón esquilado desnaturalizado, seguido por el lavado de los filtros en SSC 1 x a aproximadamente de 37-50ºC. El experto en el arte reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc, según sea necesario para acomodar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

El término "epítopo etiquetado" se refiere a un polipéptido que se fusiona a una "polipéptido etiqueta". El polipéptido etiqueta tiene suficientes residuos para proporcionar un epítopo contra el cual se puede obtener un anticuerpo, pero es lo suficientemente corto como para que no interfiera con la actividad del polipéptido al cual se fusiona. El polipéptido etiqueta preferiblemente también es bastante singular de manera que el anticuerpo no desarrolla sustancialmente una reacción cruzada con otros epítopos. Polipéptidos etiquetas apropiados tienen generalmente al menos seis residuos de aminoácidos y, usualmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferiblemente, entre 10 y 20 residuos de aminoácidos). Ejemplo de secuencias etiquetas de epítopos incluyen HA, GD, c-myc, poli-his y FLAG.

"Tratar" o "tratamiento" o "alivio" se refiere tanto al tratamiento profiláctico como terapéutico o a las medidas preventivas, donde el objeto es evitar o

disminuir (reducir) la enfermedad o afección o trastorno patológico identificado. Aquellos en necesidad del tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno, así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en los que el trastorno se quiere evitar (profilaxis). Cuando el trastorno mediado por Wnt es el cáncer, un sujeto o mamífero es exitosamente "tratado" o muestra una reducción de la carga tumoral, si, después de recibir una cantidad terapéutica de un antagonista de Wnt de acuerdo con los métodos de la presente invención, el paciente muestra reducción o ausencia observable y/o mensurable de uno o más de los siguientes aspectos: reducción del número de células cancerosas o ausencia de células cancerosas, reducción en el tamaño del tumor, inhibición (es decir, enlentecimiento en cierta medida y, preferiblemente detención) de la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos, incluyendo la propagación del cáncer en los tejidos blandos y los huesos, la inhibición (es decir, enlentecimiento en cierta medida y, preferiblemente detención) de las metástasis tumorales, la inhibición, en cierta medida, del crecimiento tumoral, y/o atenuación en cierta medida, de uno o más de los síntomas específicos asociados con el cáncer, morbilidad y mortalidad reducidas, y mejoramiento en la calidad de vida. En la medida que el antagonista de Wnt puede impedir el crecimiento y/o matar las células cancerosas, éste puede ser citostático y/o citotóxico. La reducción de estos signos o síntomas pueden también ser percibidos por el paciente.

Los parámetros anteriores para evaluar el éxito del tratamiento y el mejoramiento del trastorno son fácilmente medibles por procedimientos de rutina familiares para un médico. Para la terapia del cáncer, la eficacia se puede medir, por ejemplo, mediante la evaluación del tiempo para la progresión de la enfermedad (TDP, siglas en inglés) y/o la determinación de la velocidad de respuesta (RR). La metástasis se puede determinar mediante la ejecución de pruebas y por gammagrafía ósea y las pruebas de detección de calcio y otras enzimas para determinar la propagación a los huesos. Las exploraciones de CT (tomografía computarizada, siglas en inglés) también se pueden hacer para buscar la propagación a la pelvis y ganglios linfáticos en el área. Las radiografías de tórax y la medición de los niveles de enzimas hepáticas mediante métodos conocidos, se utilizan para buscar metástasis a los pulmones y al hígado, respectivamente. Otros de métodos de rutina para monitorear la enfermedad incluyen la ultrasonografía transrectal (TRUS, siglas en inglés) y la biopsia de aguja transrectal (TRNB).

La administración "crónica" se refiere a la administración del agente(s) en un modo continuo a diferencia de un modo agudo, de manera que se mantenga el efecto terapéutico inicial (actividad) por un período de tiempo prolongado. La administración "intermitente" es el tratamiento que es cíclico, o sujeto a interrupciones periódicas, a diferencia de los continuos o consecutivos.

"Mamíferos" se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluidos los seres humanos, los animales de granja y domésticos, y los animales de zoológico, deporte, o de compañía (mascotas), tales como perros, gatos, bovinos, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, *etc.* Preferiblemente, el mamífero es un humano.

La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente), y consecutiva en cualquier orden.

"Portadores", tal como se utiliza en la presente especificación, son portadores, excipientes, o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, que son no tóxicos para la célula o el mamífero que está siendo expuesto a ellos en las dosis y concentraciones empleadas. Frecuentemente, el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado. Ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen soluciones tamponadas tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como la albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA, alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol, contraiones formadores de sales tales como el sodio, y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEEN®, polietilenglicol (PEG), y PLURONICS®.

Una "cantidad efectiva" de un antagonista de Wnt es una cantidad suficiente para llevar a cabo un propósito específico. Una "cantidad efectiva" podrá determinarse empíricamente y de manera rutinaria, en relación con el propósito indicado.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de un antagonista de *Wnt* efectiva para tratar un trastorno mediado por Wnt en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente

efectiva del fármaco puede reducir el número de células cancerosas, reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, enlentecer en cierta medida y, preferiblemente detener), la infiltración de las células de cáncer en los órganos periféricos; inhibir (es decir, enlentecer en cierta medida y, preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierta medida, el crecimiento tumoral, y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Véase la definición de "tratar" en la presente especificación. En la medida que el fármaco puede impedir el crecimiento y/o matar las células cancerosas, éste puede ser citostático y/o citotóxico.

Una "cantidad inhibidora del crecimiento" de un antagonista de Wnt es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, especialmente tumoral, por ejemplo, una célula cancerosa, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una "cantidad inhibidora del crecimiento" de un antagonista de *Wnt,* a los efectos de la inhibición del crecimiento de las células neoplásicas, puede determinarse empíricamente y de manera rutinaria.

Una "cantidad citotóxica" de un antagonista de Wnt es una cantidad capaz de causar la destrucción de una célula, especialmente tumoral, por ejemplo, una célula cancerosa, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una "cantidad citotóxica" de un antagonista de *Wnt* a, los efectos de la inhibición del crecimiento de las células neoplásicas, puede determinarse empíricamente y de manera rutinaria.

Los términos "anticuerpos" e "inmunoglobulina" se usan de forma intercambiable, y, en el sentido más amplio, e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales intactos o de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos que muestran la actividad biológica deseada) y puede también incluir ciertos fragmentos de anticuerpos, tales como los que se describen en mayor detalle en la presente especificación. Puede ser un anticuerpo quimérico, humano, humanizado o de afinidad madura.

La cadena ligera proveniente de cualquier especie de vertebrado puede ser asignada a uno de los dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ) sobre la base de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), las inmunoglobulinas pueden ser asignadas a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de

inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM y, teniendo cadenas pesadas designadas como α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Las clases γ y α se dividen en subclases sobre la base de diferencias relativamente pequeñas en la secuencia C_H y en la función, por ejemplo, los humanos expresan las siguientes subclases IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2. Las estructuras y configuraciones tridimensionales de las subunidades de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas y son descritas generalmente en, por ejemplo, Abbas y otros., Cellular and Molecular Biology, 4ª Fd. (2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión mayor, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más proteínas o péptidos.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región variable o de unión al antígeno del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos son los fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales (U.S.P. 5,641,870); Zapata y otros., *Protein Eng.* **8** (10): 1057-1062 (1995), moléculas de anticuerpos de cadena simple y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión de los anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión al antígeno, llamados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste de una cadena de ligera entera, junto con el dominio de la región variable de la cadena pesada (V_H), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_H1). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión al antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión al antígeno. El tratamiento con pepsina produce un único fragmento largo $F(ab')_2$ el cual corresponde más o menos a dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro que tiene actividad divalente de unión al antígeno y aún es capaz de entrecruzarse con el antígenos. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en que tienen unos pocos residuos adicionales en el carboxilo terminal del dominio C_H1, incluyendo una o más cisteínas proveniente de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente especificación para un Fab' en el cual el residuo(s) de cisteína(s) de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos $F(ab')_2$ fueron producidos originalmente como pares de fragmentos Fab' los cuales tienen cisteínas de la bisagra entre

ellos. Otros acoplamientos químicos de los fragmentos de anticuerpos son también conocidos.

El fragmento Fc comprende las porciones carboxilo terminales de ambas cadenas pesadas, que se mantienen unidas por puentes disulfuro. Las funciones efectoras de los anticuerpos son determinadas por las secuencias en la región Fc, cuya región es también la parte reconocida por receptores de Fc (FcR) que se encuentra en ciertos tipos de células.

"Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio de unión y reconocimiento completo para el antígeno. Este fragmento consiste de un dímero del dominio de la región variable de una cadena pesada y de una cadena ligera en estrecha asociación no covalente.

El término "anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza en la presente especificación, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos a excepción de las posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y se dirigen contra un único antígeno. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno.

El término anticuerpo "quimérico", específicamente incluido dentro de la definición de anticuerpo monoclonal, significa anticuerpos en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica o correspondiente a las secuencias homólogas en anticuerpos derivados de una especie particularmente o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la cadena(s) es idéntico o correspondiente a las secuencias homólogas derivadas de otra especie o perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de estos anticuerpos, siempre y cuando ellos exhiban la actividad biológica deseada U.S.P. 4,816,567; Morrison *y otros. P.N.A.S. USA*. **81**: 6851-6855 (1984).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedores), son anticuerpos quiméricos, los cuales contienen secuencias mínimas derivadas del anticuerpo no humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo

receptor), en las cuales los residuos provenientes de una región hipervariable del receptor son reemplazados por los residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primates no humanos, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad del anticuerpo deseadas,. En algunos casos, los residuos de la región del marco (FR) de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los residuos correspondientes no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar aún más el rendimiento de anticuerpos. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los dominios variables, o al menos uno, y típicamente dos, en los cuales todos, o sustancialmente todos, los lazos hipervariables correspondan a los de una inmunoglobulina no humana y todos, o sustancialmente todos, los FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente humana. Para obtener más detalles, véase Jones y cols., Nature, 321:522-525 (1986), Riechmann *y cols., Nature*, **332**:323-329 (1988) y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.,* **2**:593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos y las referencias citadas en éstos: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* **1**:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Trans.* **23**:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, *Curr. Op. Biotech.* **5**:428-433 (1994).

"Polinucleótido" o "ácido nucleico" se utilizan de forma intercambiable en la presente especificación, y se refieren a los polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, que incluyen, pero no se limitan a ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificadas, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que puede ser incorporado en un polímero por una polimerasa de ADN o ARN, o mediante una reacción de síntesis. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación a la estructura del nucleótido puede importarse antes o después del ensamble del polímero. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede ser modificado adicionalmente después de la síntesis, tal como mediante conjugación con una etiqueta. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "casquetes", la sustitución de uno o más de los

nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo: ligamientos sin carga (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.); ligamientos con carga (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc); fracciones colgantes, como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señales, poli-L-lisina, etc); intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc); quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc), alquilantes, ligamientos modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). Adicionalmente, cualquiera de los grupos hidroxilos normalmente presentes en el azúcar pueden ser reemplazados, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores estándares, o activados para preparar ligamientos adicionales o nucleótidos adicionales, o pueden ser conjugados a soportes sólidos o semi-sólidos. Los OH 5' y 3' terminales pueden ser sustituidos o fosforilados con aminas orgánicas o con grupos funcionales orgánicos en casquete (capping) de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden ser derivatizados a grupos protectores estándares. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de los azúcares ribosa o desoxirribosa que son generalmente conocidas en el arte; incluyendo por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares α-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosa o lixosa, azúcares piranosas, azúcares furanosas, sedoheptulosaa, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metil ribosida. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden ser sustituidos por otros grupos enlazadores alternativos. Estos grupos enlazadores alternativos luyen, pero están limitados, a realizaciones donde el fosfato es sustituido por P(O)-S- (tioato), P(S)-S- (ditioato), (O)NR_2 (amidato), P(O)R, P(O)OR', CO o CH_2-(formacetal), en los cuales cada R o R' es independientemente H o alquilo de 1 a 20 átomos de carbono sustituido o no sustituido, que contiene opcionalmente un enlace éter, arilo, alquenilo, cicloalquenilo o aralquilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos mencionados en la presente especificación, incluyendo ARN y ADN.

El término "péptido" se refiere generalmente a una secuencia relativamente corta de aminoácidos contiguos unidos por enlaces peptídicos. Típicamente, pero no necesariamente, un péptido tiene una longitud de aproximadamente

2 a 50 aminoácidos, 4-40 aminoácidos ó 10-30 aminoácidos. Aunque el término "proteína" se refiere generalmente a formas más largas de un "polipéptido", los dos términos pueden ser y de hecho se utilizan de forma intercambiable en algunos contextos en la presente especificación, y se refieren a las secuencias de aminoácidos que son generalmente más largas y quizás más complejas (por ejemplo, secuencia múltiple, estructura secundaria y superior).

Una "región" de un polipéptido es una secuencia contigua de 2 o más residuos de aminoácidos. En realizaciones alternativas, una región es al menos de aproximadamente 3, 5, 10, 15 o más residuos de aminoácidos contiguos.

"Región C-terminal", "secuencia C-terminal" y variaciones de las mismas, tal como se utilizan en la presente especificación, se refieren a una secuencia de aminoácidos que se encuentra en o cerca del extremo C-terminal (generalmente 3'). Generalmente, la secuencia incluye un aminoácido que tiene un grupo carboxilo libre. En una realización, una región o secuencia C-terminal se refiere a una región de un polipéptido que incluye aproximadamente los residuos 1-15 situados más cerca del C-terminal.

"Región N-terminal", "secuencia N-terminal" y variaciones de las mismas, tal como se utilizan en la presente especificación, se refieren a una secuencia de aminoácidos que se encuentra en o cerca del extremo N-terminal (generalmente 5'). Generalmente, la secuencia incluye un aminoácido que tiene un grupo amino libre. En una realización, una región o secuencia C-terminal se refiere a una región de un polipéptido que incluye aproximadamente los residuos 1-15 situados más cerca del N-terminal del péptido.

"Región interna" o "secuencia interna", variaciones de las mismas, se refieren a una secuencia de aminoácidos que se encuentra dentro de un polipéptido y está flanqueada en sus N- y C-terminales por uno o más aminoácidos que no son parte de la secuencia. Generalmente, la secuencia no incluye un aminoácido ya sea con un grupo amino o carboxilo libre.

Un "ligando" se refiere a una molécula natural o sintética o fracción que es capaz de una interacción de unión con un sitio específico sobre una proteína u otra molécula, tal como un receptor. Un ligando Wnt es una molécula que interacciona específicamente con un receptor *Frizzled*. Un "receptor" está

frecuentemente, pero no necesariamente ubicado en la superficie o membrana celular.

Una "proteína de fusión" se refiere a un polipéptido que tiene dos porciones unidas que enlazan covalentemente, donde cada una de las porciones se deriva de diferentes proteínas. Las dos porciones se pueden enlazar directamente por un enlace peptídico simple, o través de un péptido enlazador que contiene uno o más residuos de aminoácidos. Generalmente, las dos porciones y el enlazador estarán en el marco de lectura unos con otros, y son producidos utilizando técnicas de recombinación. Un antagonista de Wnt que "inhibe el crecimiento de células tumorales" o un antagonista de Wnt "inhibidor del crecimiento", es uno que da como resultado la inhibición del crecimiento mensurable de las células tumorales que tienen actividad de señalización de Wnt aberrante. Los antagonistas de Wnt inhibidores del crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de las células tumorales que tienen actividad de señalización de Wnt aberrante mayor del 20%, preferiblemente desde aproximadamente el 20% a aproximadamente el 50%, y aún más preferiblemente, mayor del 50% (por ejemplo, desde aproximadamente el 50% a aproximadamente el 100%) en comparación con el control apropiado, siendo típicamente el control las células de cáncer no tratadas con la molécula antagonista de Wnt que es ensayada. En una realización, la inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración del antagonista de Wnt de aproximadamente 0.1 a 30 μg/ml o aproximadamente 0.5 nM a 200 nM en el cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento se determina de 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al antagonista de Wnt. La inhibición del crecimiento de células tumorales *in vivo* se puede determinar de diversas maneras, tales como las que se describen en los Ejemplos Experimentales de la sección a continuación. El antagonista de Wnt es inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del antagonista de Wnt a aproximadamente 1 μg/kg hasta aproximadamente 100 μg/kg de peso corporal, resulta en la reducción del tamaño del tumor o de la proliferación celular dentro de aproximadamente los 5 días a 3 meses posteriores a la primera administración del anticuerpo, preferiblemente dentro de aproximadamente los 5 a 30 días. En un aspecto específico, el tamaño del tumor se reduce en relación a su tamaño al inicio de la terapia.

Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a los trastornos que están asociados con algún grado de

proliferación celular anormal. En una realización, el trastorno proliferativo celular es el cáncer.

"Tumor", tal como se utiliza en la presente especificación, se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásicos, ya sea maligno o benigno, y a todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos.

Una molécula antagonista de Wnt que "induce la muerte celular" es aquella que causa que una célula viable se convierta en no viable. La célula es una que tiene actividad de señalización de Wnt aberrante en comparación con una célula normal del mismo tipo de tejido. Preferiblemente, la célula es una célula cancerosa, tal como se define en la presente especificación. La muerte celular *in vitro* puede ser determinada en ausencia del complemento y de células efectoras inmunes para distinguir la muerte celular inducida por citotoxicidad mediada por células (celular) dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Así, el ensayo para la muerte celular se puede realizar usando un suero inactivado por calor (es decir, en ausencia de complemento), y en ausencia de células efectoras inmunes. Para determinar si el antagonista de Wnt es capaz de inducir la muerte celular, la pérdida de la integridad de la membrana según se evaluó por la incorporación de yoduro de propidio (PI, siglas en inglés), azul tripán (véase Moore y otros. *Cytotechnology* **17**:1-11 (1995)) o se puede evaluar la 7AAD (7-Amino-Actinomicina D) en relación con las células no tratadas.

Anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas inductoras de la muerte celular preferidas son aquellas que inducen la incorporación de PI en el ensayo de incorporación de PI en células BT474.

La palabra "etiqueta" cuando se utiliza en la presente especificación, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica de manera que se genera un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica "etiquetados". La etiqueta puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, etiquetas de radioisótopos o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteraciónquímica de un compuesto o composición sustrato los cuales son detectables.

El término "agente citotóxico", según se utiliza en la presente especificación, se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o causa la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, e

isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo los fragmentos y/o variantes de las mismas, y varios agentes antitumorales o contra el cáncer divulgados más adelante. Otros agentes citotóxicos se describen más adelante. Un agente tumoricida causa la destrucción de las células tumorales.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como la tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como la benzodopa, carbocuona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninos (especialmente, bullatacín y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); la beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico, una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adocelesina, carcelesina y bicelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposida; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafacina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida y uramustina; nitrosoureas tales como la carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enedina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma 1I y omega I1 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., **33**: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enedina relacionados con cromoproteína, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-

norleucina, doxorrubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y deoxidoxorrubicina), epirrubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina y zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, teropterina y trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina y tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina y floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiiostano, testolactona, antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano y trilostano; un reabastecedor del ácido fólico tal como ácido folínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidracida; procarbazina; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triacicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurín A, roridín A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbacina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), formulación de nanopartículas de paclitaxel mediante ingeniería de albúmina libre de Cremofor ABRAXANE™ (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois) y docetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos del platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorrelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor RFS 2000 de la topoisomerasa; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como el ácido

retinoico; capecitabina (XELODA®); las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores, así como las combinaciones de una o más de las sustancias anteriores como CHOP, una abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, la abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.

También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que regulan, reducen, bloquean o inhiben los efectos de las hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer, y están frecuentemente en la forma de un tratamiento sistémico o que afecta a todo el cuerpo. Estos agentes pueden ser hormonas ellos mismos. Los ejemplos incluyen los antiestrógenos y los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs), incluyendo, por ejemplo, el tamoxifeno (que incluye tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno EVISTA®, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON®; antiprogesteronas; reguladores negativos de los receptores de estrógenos (ERD); agentes que oprimen o cierran los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) tales como acetato de leuprolida LUPRON® y ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida e inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, la cual regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestania, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®. Además, esta definición de los agentes quimioterapéuticos incluye los bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronat DIDROCAL®, NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato ZOMETA®, el alendronato FOSAMAX®, pamidronato AREDIA®, tiludronato SKELID® o risedronato ACTONEL®; así como troxacitabina (un análogo de citosina nucleósido 1,3-dioxolano); oligonucleítidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión génica en las vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas para terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de la topoisomerasa 1, LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®); ditosilato de

lapatinib (un doble inhibidor de molécula pequeña de las tirosina quinasas ErbB-2 y EGFR, también conocido como GW572016) y las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores.

"Agente inhibidor del crecimiento", cuando se utiliza en la presente especificación, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula de cáncer que tiene actividad de señalización de Wnt, tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de tales células en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen los agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar diferente de la fase S), tales como los agentes que inducen la detención en las fases G1 y M. Entre los bloqueadores clásicos de la fase M se incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II, tales como la doxorrubicina, epirrubicina, daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen las células en la fase G1 también extienden la detención a la fase S, por ejemplo, los agentes alquilantes del ADN como tamoxifeno, prednisona, dacarbacina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse más información al respecto en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami y cols., (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel)son fármacos antineoplásicos derivados ambos del árbol del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de los microtúbulos a partir de los dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos al evitar la despolimerización, lo cual resulta en la inhibición de la mitosis en las células.

La "doxorrubicina" es un antibiótico de las antraciclinas. El nombre químico completo de la es doxorrubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxi-α-L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenediona.

El término "prospecto" se utiliza para referirse a las instrucciones que habitualmente son incluidas en los paquetes comerciales de los productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso,

dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias relativas a la utilización de dichos productos terapéuticos.

II. DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES ESPECÍFICAS

Los antagonistas de Wnt aquí descritos son capaces de unirse a ligandos Wnt *in vitro* y son capaces de inhibir o suprimir la señalización celular de estimulada por Wnt. Adicionalmente, los antagonistas de Wnt tienen una larga vida media *in vivo* y exhiben actividad antitumoral *in vivo*, inhibiendo el crecimiento tumoral conducido por *Wnt-1* en un modelo de tumor de mama MMTV de ratón. Los antagonistas de Wnt también son capaces de inhibir el crecimiento en ratones de xenotrasplantes tumorales provenientes de líneas celulares de teratoma humano. Los tejidos regenerativos extraídos de los ratones que fueron tratados con un antagonista de Wnt parecen estar dentro de las normas fisiológicas. Los antagonistas de Wnt también son capaces de inhibir la señalización de Wnt autocrina en líneas celulares tumorales humanas *in vitro*.

Las proteínas receptoras de Frizzled pueden agruparse en familias tanto sobre la base de la identidad de secuencia de su longitud completa como de la identidad de secuencia de su dominio extracelular. Este agrupamiento se ilustra en los alineamientos mostrados en las figuras 8 y 9. Los residuos subrayados en esta figura son conservados a través de todos los receptores de Frz y residuos sombreados son conservados a través de los agrupamientos homólogos. Las proteínas Frz pueden ser agrupadas en las siguientes familias 1) Frz1, Frz2, y Frz7 que tienen una homología compartida del 68-77% para la secuencia de la longitud completa y del 90% para el ECD; 2) Frz5 y Frz8 que tienen una homología compartida del 57 % para la secuencia de la longitud completa y del 80% para el ECD; 3) Frz9 y Frz10 que tienen una homología compartida del 61% para la secuencia de la longitud completa y del 74% para el ECD; 4) Frz3 y Frz6 que tienen una homología compartida del 49% para la secuencia de la longitud completa y del 50% para el ECD, y 5) Frz4 (que tienen una homología compartida del 46% para la secuencia de la longitud completa y del 48% para el ECD con Frz10). La familia de Frz1, Frz2, y Frz7 tiene también homología significativa para el Frz1 de Drosophila y la familia de Frz5 y Frz8 tiene homología significativa para el Frz2 de Drosophila, y mostraron ser responsables de la polaridad celular planar y de la señalización de Wnt, respectivamente.

El comportamiento de la unión del ligando Wnt-Frizzled parece agruparse dentro de las familias Frizzled. Tanto Wnt3a como Wnt5a se unen a Frz5, Frz8, y Frz4 más rápido en relación con los demás proteínas Frz, mientras que Wnt3a se une a Frz1, Frz 2, y Frz7 a una velocidad más lenta. La amplitud y naturaleza lineal del comportamiento de la unión de Wnt5a es indicativo de una afinidad de unión menor, en relación con la unión de Wnt3a, según fue determinado por el ensayo de unión OCTET™. La presencia tanto de receptores de alta afinidad como de baja afinidad, puede conferir la capacidad para la señalización aguda y a largo plazo.

La capacidad de los antagonistas de Wnt para inhibir la señalización inducida por el ligando Wnt también parece agruparse dentro de las familias Frizzled. Tanto Frz5 como Frz8 muestran la inhibición completa de la señal de Wnt3a y la inhibición significativa de la señal de Wnt5a en un ensayo basado en células (Ejemplo 7). Frz4, Frz2, y Frz7 muestran inhibición significativa de la señal de Wnt3a. Este resultado refleja la observación en Drosophila de que Frz2d (con homología para Frz 5 y Frz 8) activa fuertemente y Frz1d (con homología para Frz1, Frz2, y Frz7) puede activar débilmente la vía de Wnt.

Sin unirse a una teoría particular de acción, los datos presentados en la presente especificación, indican que los datos de la inhibición de la señalización de Wnt basados en las células, generados usando los antagonistas de Wnt, se correlacionan con los datos obtenidos por medición directa de la unión de ligandos Wnt a los antagonistas de Wnt, lo que indica que los antagonista de Wnts se unen directamente a los ligandos Wnt, bloqueando así la unión de éstos a los receptores Frizzled en la célula. Los datos presentados en la presente especificación, además, proporciona la validación de que la actividad *in vitro* pueden ser utilizada para predecir *in vivo* la actividad de bloqueadora de la señalización de Wnt de los antagonistas de Wnt.

Como se indica en los estudios con FZ8-Fc enunciados en los Ejemplos, los antagonistas de Wnt que comprende tanto un dominio Frizzled y un dominio Fc de inmunoglobulina, muestran sorprendentemente afinidad de unión incrementada para el ligando Wnt con respecto al dominio Frizzled solamente. Por ejemplo, la Figura 14 muestra que la afinidad de unión se incrementó en más de dos órdenes de magnitud cuando el dominio Fz ECD se convirtió en la construcción Fz (156)-Fc. El hallazgo de la construcción Fz (156)-Fc como un inhibidor de la señalización de Wnt altamente efectiva y estable, en el cual la conjugación de Fc resultó en un incremento en la

magnitud de dos órdenes en la afinidad de unión, fue extremadamente inesperado y no evidente.

A. Composiciones y métodos de la invención

1. Polipéptidos

La presente invención está dirigida a composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos mediados por Wnt, incluyendo el cáncer, y para la inhibición de la señalización celular de Wnt. Uno de los aspectos de la invención proporciona antagonistas de Wnt que son moléculas quiméricas que comprenden un componente del dominio Frz (Frz) y un dominio Fc de inmunoglobulina. En realizaciones particulares de este aspecto, el componente del dominio Frz y el dominio Fc se fusionan a través de un enlazador. Otro aspecto proporciona el uso de estos antagonistas de Wnt para inhibir la señalización celular de Wnt y para el tratamiento de trastornos mediados por Wnt, tal como el cáncer.

En un aspecto, la invención proporciona antagonistas de Wnt que son moléculas quiméricas que comprenden un componente del dominio Frz que comprende un domino rico en cisteína mínimo (CRD) de un dominio extracelular "CRD (ECD)". El DRC (DCE) es un motivo estructural conservado de 100 a 250 aminoácidos y está definido por 10 cisteínas altamente conservadas. Esta de dominio de proteína aparece en las dos clases de la familia de señalización de Wnt – las proteínas receptoras de Wnt de membrana integral conocidas como Frizzled, y las proteínas extracelulares secretadas conocidas como proteínas relacionadas con Frizzled (FRPs).

En un aspecto, la invención proporciona antagonistas de Wnt que son moléculas quiméricas que comprenden un componente del dominio Frz que comprende un CRD (ECD) de una proteína Frizzled tal como Frz1, Frz2, Frz3, Frz4, Frz5, Frz6, Frz7, Frz8, Frz9, o Frz10. Ejemplos de tales CRD (ECD)s se proporcionan en la Figura 3B. En realizaciones específicas, el componente del dominio Frz se selecciona del grupo que consiste de CRD (ECD)s de Frz1h (ID SEC NO: 18), Frz2h (ID SEC NO: 19), Frz3h (ID SEC NO: 20), Frz4h (ID SEC NO: 21), Frz5h (ID SEC NO: 22), Frz6h (ID SEC NO: 23), Frz7h (ID SEC NO: 24), Frz8h (ID SEC NO: 25), Frz9h (ID SEC NO: 26), y Frz10h (ID SEC NO: 27), y variantes activas de las mismas.

Alternativamente, el componente del dominio Frz comprende, por ejemplo, un CRD (ECD) de una proteína relacionada con Frizzled secretada (FRPs) tales

como FRP1s, FRP2s, FRP3s, FRP4s, o FRP5s. Ejemplos de tales CRD (ECD)s se presentan en la Figura 3B. En realizaciones específicas, el componente del dominio Frz se selecciona del grupo consistente de CRD (ECD)s de FRP1s (ID SEC NO: 28), FRP2s (ID SEC NO: 29), FRP3s (ID SEC NO: 30), FRP4s (ID SEC NO: 31), FRP5s (ID SEC NO: 32), y variantes activas de los mismos.

Alternativamente, el componente del dominio Frz comprende, por ejemplo, un CRD (DCE) de las tirosina quinasas receptoras Ror1 y Ror2. Ejemplos de tales CRD (ECD)s se presentan en la Figura 3B. En realizaciones específicas, el componente del dominio Frz se selecciona del grupo que consiste de CRD (ECD)s de Ror1h (ID SEC NO: 33), y Ror2h (ID SEC NO: 34), y variantes activas de los mismos.

En otro aspecto, el componente del dominio Frz es una secuencia pro-Frz o pro-FRPs, cuyos ejemplos que se muestran en la Figura 3A. En realizaciones específicas, el componente del dominio Frz se selecciona del grupo que consiste de Frz1h (ID SEC NO: 35), Frz2h (ID SEC NO: 36), Frz3h (ID SEC NO: 37), Frz4h (ID SEC NO: 38), Frz5h (ID SEC NO: 39), Frz6h (ID SEC NO: 40), Frz7h (ID SEC NO: 41), Frz8h (ID SEC NO: 42), Frz9h (ID SEC NO: 43), Frz10h (ID SEC NO: 44), FRP1s (ID SEC NO: 45), FRP2s (ID SEC NO: 46), FRP3s (ID SEC NO: 47), FRP4s (ID SEC NO: 48), y FRP5s (ID SEC NO: 49), y variantes activas de los mismos.

En otro aspecto, el componente del dominio Frz se deriva de una secuencia Frz, FRPs o Rorh madura, cuyos ejemplos que se muestran en la Figura 3B. En realizaciones específicas, el componente del dominio Frz se selecciona del grupo que consiste de Frz1h (ID SEC NO: 50), Frz2h (ID SEC NO: 51), Frz3h (ID SEC NO: 52), Frz4h (ID SEC NO: 53), Frz5h (ID SEC NO: 54), Frz6h (ID SEC NO: 55), Frz7h (ID SEC NO: 56), Frz8h (ID SEC NO: 57), Frz9h (ID SEC NO: 58), Frz10h (ID SEC NO: 59), FRP1s (ID SEC NO: 60), FRP2s (ID SEC NO: 61), FRP3s (ID SEC NO: 62), FRP4s (ID SEC NO: 63), FRP5s (ID SEC NO: 64), Ror1h (ID SEC NO: 65), y Ror2h (ID SEC NO: 66), y variantes activas de los mismos.

En realizaciones particulares, el componente del dominio Frz y el dominio Fc de la inmunoglobulina de las moléculas antagonistas de Wnt quiméricas, se fusionan a través de un enlazador. En una realización, el enlazador es un péptido enlazador. En otra realización, el enlazador se selecciona del grupo que consiste de ESGGGGVT (ID SEC NO: 69), LESGGGGVT (ID SEC NO:

70), GRAQVT (ID SEC NO: 71), WRAQVT (ID SEC NO: 72), y ARGRAQVT (ID SEC NO: 73). Opcionalmente, los enlazadores pueden incluir residuos de aminoácidos adicionales provenientes de cualquiera de los componentes del dominio Frz o del dominio Fc fuera de los residuos mínimos necesarios para la actividad. Estos enlaces pueden también comprender residuos de aminoácidos adicionales distintos de los del componente del dominio Frz o del componente de dominio Fc.

En una realización, el antagonista de Wnt es la quimera Frz8-Fc que comprende un Frz8 CRD (ECD) y un dominio Fc. En algunas realizaciones, la quimera Frz8-Fc además comprende un enlazador, tal como un péptido enlazador. En una realización adicional, la Frz8-Fc además comprende una secuencia líder. En una realización, el componente del dominio Frz comprende los aminoácidos 1-156 de la proteína Frz8 (ID SEC NO: 8). En otra realización, el componente Fc es un Fc humano. En una realización adicional, el componente Fc es un Fc de IgG humana. En una realización adicional, la Frz8-Fc tiene un componente del dominio Frz que comprende los aminoácidos 1-156 de la proteína Frz8 fusionados con un enlazador a un Fc de IgG humana. En una realización adicional, la Frz8-Fc es una quimera con la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 4B (ID SEC NO: 74). Tal como se utiliza en los Ejemplos y las Figuras que se acompañan, a menos que se indique otra cosa, "Frz8-Fc" se refiere a la quimera mostrada en la Figura 4B (ID SEC NO: 74).

En una realización adicional, el antagonista de Wnt es la quimera Frz5-Fc que comprende un Frz5 CRD (ECD) y un dominio Fc. En algunas realizaciones, la quimera Frz5-Fc además comprende un enlazador, tal como un péptido enlazador. En una realización adicional, la Frz5-Fc además comprende una secuencia líder. En una realización, el componente del dominio Frz comprende los aminoácidos 27-155 de la proteína Frz5 (ID SEC NO: 5). En otra realización, el componente Fc es un Fc. En una realización adicional, el componente Fc es un Fc de IgG humana. En una realización adicional, la Frz5-Fc tiene una secuencia líder y el componente del dominio Frz comprende los aminoácidos 27-155 de una proteína Frz5 madura fusionados con un enlazador a un Fc de IgG humana. En una realización adicional, la Frz5-Fc es una quimera con la secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 7A (ID SEC NO: 75). Tal como se utiliza en los Ejemplos y las Figuras que se acompañan, a menos que se indique otra

cosa, "Frz5-Fc" se refiere a la quimera mostrada en la Figura 7A (ID SEC NO: 75).

Similarmente, realizaciones adicionales incluyen las quimeras Frz1-Fc, Frz2-Fc, Frz3-Fc, Frz4-Fc, Frz6-Fc, Frz7-Fc, Frz9-Fc, Frz-10-Fc, FRP1s-Fc, FRP2s-Fc, FRP3s-Fc, FRP4s-Fc y FRP5s-Fc, que comprenden un componente del dominio Frz que comprende un Frz CRD (ECD) proveniente cada uno de las proteínas Frz o FRPs respectivas, y un componente Fc. En algunas realizaciones, la quimera Frz-Fc además comprende un enlazador, tal como un péptido enlazador. En realizaciones adicionales, estas quimeras comprenden una secuencia líder. En algunas realizaciones, el componente Fc es un Fc humano. En realizaciones adicionales, el Fc es un componente Fc de IgG humana. En otras realizaciones adicionales, estas quimeras tienen una secuencia un líder y un Frz CRD (ECD) fusionado con un enlazador a un Fc de IgG humana. En una realización adicional, estas quimeras tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las Figuras 7A, 7B y 7C (ID SEC NO: 76- 88 Tal como se utiliza en los Ejemplos y las Figuras que se acompañan, a menos que se indique otra cosa, "Frz1-Fc, Frz2-Fc, Frz3-Fc, Frz4-Fc, Frz6-Fc, Frz7-Fc, Frz9-Fc, Frz-10-Fc, FRP1s- Fc, FRP2s-Fc y Fc-FRP4s" se refiere a las quimeras respectivas mostradas en las Figura 7A, 7B y 7C (ID SEC NO: 76- 85 y 87).

Los antagonistas de Wnt son estables *in vivo*. Las construcciones previas que utilizaban un dominio Frizzled conectado a un componente Fc, se degradaban rápidamente *in vivo*, lo que los hacía inapropiados para su uso como compuestos terapéuticos (Hsieh, JC. y otros., PNAS, **96**: 3546-3551 (1999)). Los antagonistas de Wnt descritos en la presente especificación, se mantienen estables *in vivo* por un período de tiempo sustancialmente más largo que las construcciones anteriores. Como se muestra en el Ejemplo 4 (Figura 13), el antagonista de Wnt Frz8-Fc *in vivo* muestra una vida media de aproximadamente 4 días. En consecuencia, la invención proporciona antagonistas de Wnt que tienen una vida media *in vivo* de al menos 1 día, 2 días, 3 días, o 4 días después de ser administrados a un mamífero.

Además, como se muestra en el ejemplo 3 (Figura 11), los antagonistas de Wnt mantienen la actividad *in vivo* por un período de tiempo sustancialmente más largo que las construcciones anteriores. En una realización, el antagonista de Wnt es activo durante al menos 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 40 horas,

44 horas, 48 horas, 52 horas, 56 horas, 60 horas, 64 horas, 68 horas, 72 horas, 80 horas, 90 horas, ó 100 horas después de ser administrado a un mamífero. La actividad se mide, por ejemplo, mediante el ensayo del suero del mamífero al que se le administró el antagonista de Wnt, para la capacidad de inhibir la señalización de Wnt como se establece en los Ejemplos 3 y 11, o utilizando otros métodos conocidos en el arte.

2. Ácidos nucleicos

Uno de los aspectos de la invención proporciona un ácido nucleico que codifica los antagonistas de Wnt descritos en la presente especificación. En realizaciones específicas, el ácido nucleico codifica un antagonista de Wnt que comprende un CRD (ECD)s de Frz1h (ID SEC NO: 18), Frz2h (ID SEC NO: 19), Frz3h (ID SEC NO: 20), Frz4h (ID SEC NO: 21), Frz5h (ID SEC NO: 22), Frz6h (ID SEC NO: 23), Frz7h (ID SEC NO: 24), Frz8h (ID SEC NO: 25), Frz9h (ID SEC NO: 26), Frz10h (ID SEC NO: 27), FRP1s (ID SEC NO: 28), FRP2s (ID SEC NO: 29), FRP3s (ID SEC NO: 30), FRP4s (ID SEC NO: 31), FRP5s (ID SEC NO: 32), Ror1h (ID SEC NO: 33), o Ror2h (ID SEC NO: 34).

En realizaciones adicionales, el ácido nucleico codifica un antagonista de Wnt que comprende proteínas pro-Frz o pro-FRPs seleccionadas a partir de Frz1h (ID SEC NO: 35), Frz2h (ID SEC NO: 36), Frz3h (ID SEC NO: 37), Frz4h (ID SEC NO: 38), Frz5h (ID SEC NO: 39), Frz6h (ID SEC NO: 40), Frz7h (ID SEC NO: 41), Frz8h (ID SEC NO: 42), Frz9h (ID SEC NO: 43), Frz10h (ID SEC NO: 44), FRP1s (ID SEC NO: 45), FRP2s (ID SEC NO: 46), FRP3s (ID SEC NO: 47), FRP4s (ID SEC NO: 48), y FRP5s (ID SEC NO: 49).

En realizaciones adicionales, el ácido nucleico codifica un compuesto antagonista de Wnt que comprende una proteína Frz, FRPs o Rorh madura seleccionada a partir de Frz1h (ID SEC NO: 50), Frz2h (ID SEC NO: 51), Frz3h (ID SEC NO: 52), Frz4h (ID SEC NO: 53), Frz5h (ID SEC NO: 54), Frz6h (ID SEC NO: 55), Frz7h (ID SEC NO: 56), Frz8h (ID SEC NO: 57), Frz9h (ID SEC NO: 58), Frz10h (ID SEC NO: 59), FRP1s (ID SEC NO: 60), FRP2s (ID SEC NO: 61), FRP3s (ID SEC NO: 62), FRP4s (ID SEC NO: 63), FRP5s (ID SEC NO: 64), Ror1h (ID SEC NO: 65), y Ror2h (ID SEC NO: 66).

En realizaciones adicionales, el ácido nucleico codifica un antagonista de Wnt que comprende Frz8-Fc (ID SEC NO: 74), Frz5-Fc (ID SEC NO: 75), Frz1-Fc (ID SEC NO: 76), Frz2-Fc (ID SEC NO: 77), Frz3-Fc (ID SEC NO: 78), Frz4-Fc (ID SEC NO: 79), Frz6-Fc (ID SEC NO: 80), Frz7-Fc (ID SEC

NO: 81), Frz9-Fc (ID SEC NO: 82), Frz10-Fc (ID SEC NO: 83), FRP1s-Fc (ID SEC NO: 84), FRP2s (ID SEC NO: 85), FRP3s-Fc (ID SEC NO: 86), FRP4s-Fc (ID SEC NO: 87), o FRP5s-Fc (ID SEC NO: 88).

En una realización particular, el ácido nucleico codifica una Frz8-Fc y comprende la secuencia de ácido nucleico mostrada en la ID SEC NO: 122 (Figura 5D). En otra realización, el ácido nucleico codifica una Frz5-Fc y comprende la secuencia de ácido nucleico mostrada en la ID SEC NO: 119 (Figura 5C). En una realización adicional, el ácido nucleico codifica una Frz1-Fc, Frz2-Fc, Frz3-Fc, Frz4-Fc, Frz6-Fc, Frz7-Fc, Frz9-Fc, Frz10-Fc, FRP1s-Fc, FRP2s, FRP3s- Fc, FRP4s-Fc, o FRP5s Fc-y comprende una secuencia de ácido nucleico mostrada en la figura 5 (AH). Por ejemplo, el ácido nucleico comprende una Frz1-Fc (ID SEC NO: 115), Frz2-Fc (ID SEC NO: 116), Frz3-Fc (ID SEC NO: 117), Frz4-Fc (ID SEC NO: 118), Frz5-Fc (ID SEC NO: 119), Frz6-Fc (ID SEC NO: 120), Frz7-Fc (ID SEC NO: 121), Frz8-Fc (ID SEC NO: 122), Frz9-Fc (ID SEC NO: 123), Frz10-Fc (ID SEC NO: 124), FRP1s-Fc (ID SEC NO: 125), FRP2s-Fc (ID SEC NO: 126), FRP3s-Fc (ID SEC NO: 127), FRP4s-Fc (ID SEC NO: 128), o FRP5s-Fc (ID SEC NO: 129).

Otro aspecto de la invención proporciona ácidos nucleicos que hibridan bajo condiciones de alto rigor con los ácidos nucleicos descritos anteriormente.

3. Variantes de antagonistas de Wnt

Además de los polipéptidos antagonistas de Wnt descritos en la presente especificación, se contempla que se pueden preparar variantes de los antagonistas de Wnt. Tales variantes pueden ser preparadas mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en el ADN que codifica, y/o por síntesis de la variante deseada. Los expertos en el arte apreciarán fácilmente que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos post-traduccionales del antagonista de Wnt, tales como el cambio del número o posición de los sitios de glicosilación o la alteración de las características de anclaje a la membrana.

Una variante de antagonista de Wnt incluye, por ejemplo, una mutación o una variante de aminoácido en un residuo de aminoácido en uno o varios dominios, mientras que se mantiene la actividad biológica. Una variante de antagonista de Wnt también incluye los antagonistas de Wnt que tienen al menos una delección o adición de aminoácido, mientras que se mantiene la actividad biológica. La adición o delección de los residuos de aminoácidos puede ocurrir particularmente en la región en torno a la secuencia de

aminoácidos donde el componente del dominio Frz y el dominio Fc se conectan, ya sea que dicha región contenga o no un enlazador . Las variantes de antagonistas de Wnt tienen al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, el 97%, 98% o el 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con una secuencia de polipéptido antagonista de Wnt de referencia. En general, tales variantes exhiben, sustancialmente, la misma o mayor afinidad para una proteína Wnt que la secuencia de referencia, por ejemplo, al menos, 0.75X, 0.8X, 0.9X, 1.0X, 1.25X ó 1.5X, sobre la base de la cuantificación en unidades/métrica de un ensayo de unión aceptado en el arte.

En realizaciones específicas, la variante del antagonista de Wnt es una molécula quimérica que comprende un componente del dominio Frz que tiene al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con el CRD (ECD)s de Frz1h (ID SEC NO: 18), Frz2h (ID SEC NO: 19), Frz3h (ID SEC NO: 20), Frz4h (ID SEC NO: 21), Frz5h (ID SEC NO: 22), Frz6h (ID SEC NO: 23), Frz7h (ID SEC NO: 24), Frz8h (ID SEC NO: 25), Frz9h (ID SEC NO: 26), Frz10h (ID SEC NO: 27), FRP1s (ID SEC NO: 28), FRP2s (ID SEC NO: 29), FRP3s (ID SEC NO: 30), FRP4s (ID SEC NO: 31), FRP5s (ID SEC NO: 32), Ror1h (ID SEC NO: 33), o Ror2h (ID SEC NO: 34).

En otras realizaciones, la variante del antagonista de Wnt es una molécula quimérica que comprende un componente del dominio Frz que tiene al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con proteínas pro-Frz o pro-Frps seleccionadas a partir de Frz1h (ID SEC NO: 35), Frz2h (ID SEC NO: 36), Frz3h (ID SEC NO: 37), Frz4h (ID SEC NO: 38), Frz5h (ID SEC NO: 39), Frz6h (ID SEC NO: 40), Frz7h (ID SEC NO: 41), Frz8h (ID SEC NO: 42), Frz9h (ID SEC NO: 43), Frz10h (ID SEC NO: 44), FRP1s (ID SEC NO: 45), FRP2s (ID SEC NO: 46), FRP3s (ID SEC NO: 47), FRP4s (ID SEC NO: 48), y FRP5s (ID SEC NO: 49).

En otras realizaciones, la variante del antagonista de Wnt es una molécula quimérica que comprende un componente del dominio Frz que tiene al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con proteínas Frz, FRPs o Rorh maduras seleccionadas a partir

de Frz1h (ID SEC NO: 50), Frz2h (ID SEC NO: 51), Frz3h (ID SEC NO: 52), Frz4h (ID SEC NO: 53), Frz5h (ID SEC NO: 54), Frz6h (ID SEC NO: 55), Frz7h (ID SEC NO: 56), Frz8h (ID SEC NO: 57), Frz9h (ID SEC NO: 58), Frz10h (ID SEC NO: 59), FRP1s (ID SEC NO: 60), FRP2s (ID SEC NO: 61), FRP3s (ID SEC NO: 62), FRP4s (ID SEC NO: 63), FRP5s (ID SEC NO: 64), Ror1h (ID SEC NO: 65), y Ror2h (ID SEC NO: 66).

En otras realizaciones, la variante del antagonista de Wnt es una molécula quimérica que comprende un componente del dominio Frz que tiene al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con Frz8-Fc (ID SEC NO: 74), Frz5-Fc (ID SEC NO: 75), Frz1-Fc (ID SEC NO: 76), Frz2-Fc (ID SEC NO: 77), Frz3-Fc (ID SEC NO: 78), Frz4-Fc (ID SEC NO: 79), Frz6-Fc (ID SEC NO: 80), Frz7-Fc (ID SEC NO: 81), Frz9-Fc (ID SEC NO: 82), Frz10-Fc (ID SEC NO: 83), FRP1s-Fc (ID SEC NO: 84), FRP2s (ID SEC NO: 85), FRP3s-Fc (ID SEC NO: 86), FRP4s-Fc (ID SEC NO: 87), y FRP5s-Fc (ID SEC NO: 88).

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos que son idénticos a los residuos de aminoácidos en una secuencia polipeptídica de referencia (parental) cuando las dos secuencias son alineadas. Para determinar el % de identidad de aminoácidos, las secuencias son alineadas y, en caso de ser necesario, se introducen huecos para lograr el % máximo de identidad de secuencia; las sustituciones conservativas no se consideran como parte de la identidad de secuencia. Los procedimientos de alineamiento de secuencias de aminoácidos para determinar el porcentaje de identidad son bien conocidos para aquellos expertos en la materia. Muchas veces se utilizan programas informáticos disponibles públicamente tales como BLAST, BLAST2, ALIGN2 o Megalign (DNASTAR) para alinear las secuencias peptídicas. Los expertos en el arte pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquiera de los algoritmos necesarios para lograr el máxima alineamiento sobre toda la longitud de las secuencias que se comparan.

Cuando las secuencias de aminoácidos están alineadas, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de una determinada secuencia de aminoácidos A, para, con, o contra de una secuencia de aminoácidos B dada (la cual puede alternativamente ser expresada como una secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia

de aminoácidos, a, con, o contra de una secuencia de aminoácidos dada B) puede calcularse como:

% de identidad de secuencia de aminoácidos = X/Y x 100

donde

X es el número de residuos de aminoácidos establecidos como coincidencias idénticas mediante el alineamiento de A y B arrojado por el programa o algoritmo de alineamiento de secuencias.

y

Y es el número total de residuos de aminoácidos en B.

Si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A para B no será igual al porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de B para A.

Un péptido, polipéptido, proteína o fragmento biológicamente activo "aislado" o "purificado", está separado y/o es recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes incluyen materiales que normalmente interferirían con los usos terapéuticos o de diagnóstico para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros materiales proteicos o no proteicos. Las preparaciones que tienen preferiblemente menos del 30% en peso seco del material contaminante no deseado (contaminantes), preferiblemente menos del 20%, 10% y, preferiblemente, menos del 5% de contaminantes, se consideran como sustancialmente aislados. Una porción biológicamente activa, o péptido/polipéptido producida por vía recombinante aislado, por lo tanto, está preferiblemente libre de forma sustancial de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa, preferiblemente menos del 20%, preferiblemente menos de aproximadamente el 10% y, preferiblemente, menos de aproximadamente el 5% del volumen de una preparación del péptido/polipéptido. Ejemplos de contaminantes incluyen los desechos celulares, medios de cultivo, y sustancias utilizadas y producidas durante la síntesis *in vitro* del péptido/polipéptido.

Se pueden hacer variaciones en los antagonistas de Wnt descritos en la presente especificación, por ejemplo, utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para las mutaciones conservativas y no conservativas establecidas, por ejemplo, en la patente No. US 5,364,934. Las variaciones pueden ser una sustitución, delección o inserción de uno o más codones que codifican el anticuerpo o polipéptido, lo que resulta en un cambio en la

secuencia de aminoácidos en comparación con el anticuerpo o polipéptido de secuencia nativa. Opcionalmente la variación es por sustitución de al menos un aminoácido con cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del antagonista de *Wnt*. La orientación en la determinación de los residuos de aminoácidos que pueden ser insertados, sustituidos o eliminados sin afectar negativamente la actividad deseada, se puede encontrar mediante la comparación de la secuencia del antagonista de *Wnt* con la de las moléculas de proteínas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos hechos en las regiones de alta homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de reemplazar un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como la sustitución de una leucina con una serina, es decir, sustituciones conservativas de aminoácidos. Las inserciones, delecciones o sustituciones opcionalmente pueden estar en el rango de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede ser determinada sistemáticamente haciendo inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y probando las variantes resultantes para comprobar la actividad exhibida por la secuencia nativa madura o de longitud completa.

Los antagonistas de Wnt pueden ser preparados por cualquiera de una serie de técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados pueden ser sintetizados químicamente. Un enfoque alternativo consiste en la generación de anticuerpos o fragmentos de polipéptidos por digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida por romper las proteínas en sitios definidos por residuos de aminoácidos particulares, o mediante la digestión del ADN con enzimas de restricción apropiadas y el aislamiento de los fragmentos deseados. Sin embargo, otra técnica apropiada consiste en aislar y amplificar un fragmento de ADN que codifica un fragmento del polipéptido o anticuerpo deseado, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los límites deseados del fragmento de ADN se emplean en los cebadores 5 'y 3' en la PCR.

En realizaciones particulares, las sustituciones conservativas de interés se muestran en la Tabla A bajo el encabezamiento de sustituciones preferidas. Si tales sustituciones resultan en un cambio en la actividad biológica y, entonces cambios más sustanciales, denominados sustituciones ejemplares

en la Tabla A, o como se describe más adelante en referencia a las clases de aminoácidos, se introducen y los productos son cribados.

Tabla A

Residuo Original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr; cys	cys
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Las modificaciones sustanciales en la función o la identidad inmunológica del antagonista de *Wnt* se logra mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación helicoidal o de hoja, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o de destino, o (c) la

voluminosidad de la cadena lateral. Los residuos de origen natural se dividen en grupos basados en las propiedades comunes de las cadenas laterales:

(1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro y

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no-conservativas conllevan al intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Tales residuos sustituidos también se pueden introducir en los sitios de sustituciones conservativas o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

Las variaciones se pueden hacer mediante métodos conocidos en el arte como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (sitio-dirigida), exploración de alanina y mutagénesis por PCR. Para producir los antagonistas de Wnt de la invención se puede realizar sobre el ADN clonado mutagénesis sitio-dirigida *[*Carter *y otros.,* Nucl. Acids Res., **13**:4331 (1986); Zoller *y otros.,* Nucl. Acids Res., **10**:6487 (1987)], mutagénesis por inserción de un casete *[*Wells *y otros.,* Gene, 34:315 (1985)], mutagénesis por selección de fragmentos de restricción *[*Wells *y otros.,* Philos. Trans. R. Soc. London SerA, **317**:415 (1986)] u otras técnicas conocidas.

El análisis de exploración de aminoácidos puede ser empleado para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos preferidos para la exploración están los aminoácidos relativamente pequeños, los neutrales. Tales aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. En este grupo, la alanina suele ser generalmente el aminoácido preferido para el exploración de aminoácidos, ya que se elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que se modifique la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham and Wells, Science, **244**:1081-1085 (1989)]. La alanina es también generalmente preferida porque es el más común de los aminoácidos. Además, frecuentemente se encuentra tanto en posición enterrada como expuesta [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., **150:**1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no produce las

cantidades adecuadas de la variante, se puede utilizar un aminoácido isotérico.

Cualquier residuo de cisteína que no está involucrado en la conformación de correcta del antagonista de Wnt también puede ser sustituido, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante. Por el contrario, se pueden añadir enlaces de cisteína al antagonista de Wnt para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo de variante sustitutiva preferida involucra la sustitución de uno o más residuos en la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humano o humanizado). Generalmente, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para el desarrollo ulterior tendrán mejores propiedades biológicas en relación con el anticuerpo parental a partir del cual se generaron. Una manera conveniente para la generación de tales variantes sustitutivas implica la maduración de afinidad utilizando la presentación en fagos. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, los sitios de 6-7) se someten a mutaciones para generar todas las sustituciones de aminoácidos posibles en cada sitio. Las variantes del anticuerpo que se generan de este modo se presentan de una manera monovalente en las partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetadas dentro de cada partícula. Las variantes de fagos presentadas se seleccionan entonces por su actividad biológica (por ejemplo, la afinidad de unión) tal como se divulga en la presente especificación. Con el fin de identificar los sitios de la región hipervariable para la modificación, se puede realizar mutagénesis de exploración de alanina que permite identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión con el antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, podría ser beneficioso analizar la estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre los antagonistas de Wnt y las proteínas Wnt. Tales residuos de contacto y residuos de la vecindad son candidatos para la sustitución, de acuerdo con las técnicas elaboradas en la presente especificación. Una vez que tales variantes se han generado, el panel de variantes se somete a un cribado como se describe en la presente especificación, y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes se puedan seleccionar para su desarrollo ulterior.

Las modificaciones covalentes de los antagonistas de Wnt se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Un tipo de modificación covalente

incluye la reacción de residuos de aminoácidos seleccionados específicamente de un antagonista de Wnt con un agente derivatizador orgánico que es capaz de reaccionar con las cadenas laterales seleccionadas o con los residuos N- o C- terminales de los antagonistas de Wnt. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para el entrecruzamiento de los antagonista de Wnt con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su utilización en el método de purificación de los antagonistas de Wnt. Los agentes para el entrecruzamiento comúnmente utilizados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis (diazoacetil)-2-fenil etano, glutaraldehido, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres de ácido 4-azidosalicílico, imido ésteres homobifuncionales, que incluyen ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis (succinimidilpropionato), maleimidos bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-[(p-azidofenilo)ditio] propioimidato.

Otras modificaciones incluyen la deamidación de los residuos glutaminilo y asparaginilo en los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo, respectivamente, hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de los grupos hidroxilo en los residuos serilo o treonilo, metilación de los grupos α-amino de lisina, arginina, histidina de cadenas laterales [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, p. 79-86 (1983)], acetilación del grupo amina N-terminal, y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente de los antagonistas de Wnt incluidos en el alcance de la presente invención comprende la alteración de los patrones nativos de glicosilación en los dominios polipeptídicos Frz, Wnt o FRPs del antagonista de Wnt. La "alteración del patrón de glicosilación nativo" es definida como la delección de una o varias fracciones de los carbohidratos que se encuentran en la secuencia nativa de los componentes del dominio (ya sea mediante la eliminación de los sitios de glicosilación o mediante la eliminación de la glicosilación por métodos químicos y/o enzimáticos), y/o la adición uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia nativa de los componentes del dominio. Además, la frase incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, que involucran un cambio en la naturaleza y las proporciones de las diferentes fracciones de carbohidratos presentes.

Generalmente la glicosilación de anticuerpos y otros polipéptidos es por enlaces N- o enlaces O. El enlace N- se refiere a la fijación de la fracción de

carbohidrato a la cadena lateral de un residuo asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la fijación enzimática de la fracción de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación por enlace O- se refiere a la fijación de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un ácido hidroxiamino, más comúnmente serina o treonina, aunque también se pueden utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al antagonista de Wnt se realiza convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de manera tal que contenga una o más de las anteriormente descritas secuencias tripeptídicas (para los sitios de N- glicosilación). La alteración también podrá ser efectuada por la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del antagonista de Wnt (es decir, en la pre-variante) original. Esta secuencia puede ser alterada, opcionalmente, a través de cambios a nivel del ADN, particularmente mediante mutación de la secuencia de ADN que codifica en bases preseleccionadas, de tal manera que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio de aumentar el número de fracciones de carbohidratos en el antagonista de Wnt es por acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Tales métodos se describen en el arte, por ejemplo, WO 87/05330 publicada en 11 de septiembre de 1987, y en *Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem.*, p. 259-306 (1981).

La eliminación de fracciones de carbohidratos presentes en el antagonista de Wnt puede realizarse química o enzimáticamente o por sustitución mutacional de codones que codifican para los residuos de aminoácidos que sirven como dianas para la glicosilación. Las técnicas de deglicosilación química son conocidas en el arte y descritas, por ejemplo, por Hakimuddin, *y otros., Arch. Biochem. Biophys.*, **259**:52 (1987) y por Edge *y otros., Anal. Biochem.*, **118**:*131 (1981)*. La escisión enzimática de las fracciones de carbohidratos en los polipéptidos se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo- y exo-glicosidasas tal como lo describen Thotakura *y otros., Meth. Enzymol.*, **138**:350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente del antagonista de Wnt comprende enlazar la secuencia a uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, o polioxialquilenos, en la forma establecida en las patentes Nos. US 4,640.835; US 4,496,689; US 4,301,144; US 4,670.417; US 4,791,192 o US 4,179,337. El anticuerpo o polipéptido también puede ser atrapado en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o de polimerización en la interfase (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente), en sistemas coloidales de distribución de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas se divulgan en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy,* 20th edition, Gennaro, A., Ed., (2000).

Los antagonistas de Wnt de la presente invención también se pueden modificar formando moléculas que adicionalmente tienen carácter quimérico, y que comprenden un antagonista de Wnt (es decir, las quimeras Frz-, o FRPs- o Ror-Fc) fusionadas a otra secuencia de aminoácidos o polipéptido heterólogo.

En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión del antagonista de Wnt con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítopo al cual se puede unir de manera selectiva un anticuerpo anti-etiqueta. El epítopo etiqueta se ubica generalmente en los extremos amino o carboxilo terminales del antagonista de Wnt. La presencia de tales formas del epítopo etiquetado en el antagonista de Wnt, puede ser detectada mediante un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la existencia del epítopo etiqueta permite purificar fácilmente al antagonista de Wnt mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se una al epítopo etiqueta. Varios polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos son bien conocidos en el arte. Los ejemplos incluyen las etiquetas poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta flu HA y su anticuerpo 12CA5 [Field *y otros.*, *Mol. Cell. Biol.,* **8**:2159-2165 (1988)], la etiqueta c-myc y los anticuerpos de la misma 8F9, 3C7, 6E10. G4, B7 y 9E10 [Evan y otros., *Molecular and Cellular Biology,* **5**:3610-3616 (1985)], y la etiqueta de la glicoproteína D (gD) del virus Herpes Simplex y su anticuerpo [Paborsky *y otros.*, *Protein Engineering,* **3**(6):547-553 (1990)]. Otros polipéptidos etiqueta incluyen la etiqueta del péptido Flag [Hopp *y otros.*, *BioTechnology,* **6**:1204-1210 (1988)], el péptido

con epítopo KT3 [Martin *y otros.*, *Science,* **255**:192-194 (1992)]; un péptido con epítopo α-tubulina [Skinner *y otros.*, *J. Biol. Chem.,* **266**:15163-15166 (1991)]; y el péptido etiqueta del gen 10 de la proteína T7 [Lutz-Freyermuth *y otros.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**:6393-6397 (1990)].

En realizaciones alternativas, los antagonistas de Wnt comprenden una variante del componente Fc. Por ejemplo, la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, la región Fc de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas), que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos, incluyendo la de una cisteína de la bisagra. En una forma de realización, tales variantes tienen al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia polipeptídica del Fc de referencia.

En una forma de realización, la variante de la región Fc puede mostrar una afinidad de unión al receptor Fc neonatal (FcRn) alterada. Tal variante de la región Fc puede comprender una modificación de aminoácido en cualquiera de uno o más aminoácidos de las posiciones 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340. 356, 360. 362, 376, 378, 380. 382, 386, 388, 400. 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439 ó 447 de la región Fc, donde la numeración de los residuos en la región Fc es la del índice de EU como en Kabat. Las variantes de la región Fc con la unión a un FcRn reducida pueden comprender una modificación en cualquiera de uno o más aminoácidos de las posiciones 252, 253, 254, 255, 288, 309, 386, 388, 400, 415, 433, 435, 436, 439 ó 447 de la región Fc (índice de EU/numeración de Kabat). Alternativamente, las variantes que muestran un aumento de la unión a FcRn pueden comprender una modificación en cualquiera de uno o más aminoácidos de las posiciones 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340. 356, 360, 362, 376, 378, 380. 382, 413, 424 ó 434 de la región Fc (índice de EU/numeración de Kabat).

En otra realización, la variante de la región Fc puede mostrar una reducción de la unión a FcγR, y comprende modificaciones de aminoácidos en las posiciones 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270. 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 ó 439 de la región Fc (índice de EU/numeración de Kabat).

En otra realización adicional, la variante de la región Fc puede mostrar reducción de la unión a FcγRII y comprende las modificaciones en cualquiera de uno o más aminoácidos de las posiciones 238, 265, 269, 270. 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 ó 439 de la región Fc (índice de EU/numeración de Kabat).

En otra forma realización, la variante de la región Fc puede mostrar incremento de la unión a FcγRII y comprende las modificaciones en cualquiera de uno o más aminoácidos de las posiciones 238, 265, 269, 270. 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 ó 439 de la región Fc (índice de EU/numeración de Kabat).

En forma de realización adicional, la variante de la región Fc puede mostrar reducción de la unión a FcgRIII y comprende las modificaciones en cualquiera de uno o más aminoácidos de las posiciones 238, 239, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270. 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 ó 437 de la región Fc (índice de EU/numeración de Kabat).

En aún otra realización adicional, las variantes de la región Fc con unión a C1q alterada (es decir, mejorada o disminuida) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) se describen en WO 99/51642. Esas variantes pueden comprender la sustitución de un aminoácido en una o más de las posiciones de aminoácidos 270, 322, 326, 327, 329, 331, 333 ó 334 de la región Fc. Véase también, Duncan and Winter, Nature **322**: 738-40 (1988); U.S.P. 5,648,260; U.S.P. 5,624,821 y WO 94/29351 relativas a las variantes de la región Fc.

B. Preparación de los antagonistas de Wnt

La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de polipéptidos antagonistas de Wnt mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene el ácido nucleico que codifica el polipéptido antagonista de Wnt. Por supuesto, que se contempla que los métodos alternativos, que son bien conocidos en el arte, pueden ser empleados para preparar tales antagonistas de Wnt. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos apropiadas, o partes de ellas, pueden producirse de forma directa por síntesis de péptidos utilizando técnicas en fase sólida [véase, por ejemplo, Stewart *y otros., Solid-Phase Péptido Synthesis,* W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.,* 85:2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteínas *in vitro* se puede

realizar usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada puede lograrse, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Varias porciones del polipéptido antagonista de Wnt pueden ser sintetizadas químicamente por separado y combinadas utilizando métodos químicos o enzimáticos para producir la secuencia deseada.

1. Aislamiento del ADN que codifica para el polipéptido antagonista de Wnt

El ADN que codifica la secuencia de los antagonistas o cualquiera de los dominios componentes deseados del antagonista de Wnt, tales como Frz, o FRPs, se pueden obtener a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir del tejido que se cree que posee tal secuencia y expresarla en un nivel detectable. En consecuencia, una secuencia de ADN de Frz o FRPs humanos se puede obtener de manera conveniente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano. La secuencia de ADN de los genes deseados también puede obtenerse a partir de una biblioteca genómica o mediante procedimientos de síntesis conocidos (por ejemplo, la síntesis automatizada de ácidos nucleicos).

Las bibliotecas pueden ser cribadas con sondas (tales como oligonucleótidos de aproximadamente 20-80 bases) diseñados para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El cribado de la biblioteca genómica o ADNc con la sonda seleccionada puede llevarse a cabo utilizando procedimientos estándares, tales como los descritos en Sambrook *y otros.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica el polipéptido antagonista de Wnt y sus componentes es utilizar la metodología de PCR *[Sambrook y otros.,* supra; Dieffenbach *y otros.*, *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Las técnicas para el cribado de una biblioteca de ADNc son bien conocidas en el arte. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deben ser suficientemente inequívocas y de longitud suficiente para que se reduzcan al mínimo los falsos positivos. Preferiblemente, el oligonucleótido es marcado de manera que pueda ser detectado cuando se realiza la hibridación de ADN en la biblioteca que es sometida a cribado. Los métodos de marcaje son bien conocidos en el arte, e incluyen el uso de marcadores radioactivos tales como ^{32}P-ATP marcado, biotinilación o marcaje enzimático.

Las condiciones de hibridación, incluidas las de moderado y alto rigor, se proporcionan en Sambrook *y otros.,* supra.

Las secuencias identificadas en tales métodos de cribado de la biblioteca, se pueden comparar y alinear con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas, tales como GenBank u otras bases de datos privadas. La identidad de secuencia (ya sea a nivel de aminoácidos o de nucleótidos) dentro de regiones definidas de la molécula o a lo largo de toda la secuencia, se puede determinar utilizando métodos conocidos en el arte y como se describen en la presente especificación.

La secuencia de ADN que codifica el dominio Fc de la inmunoglobulina se puede derivar a partir de las células de los hibridoma secretores de AcMs con el subtipo de Fc deseado.

El ácido nucleico que codifica la secuencia que tiene la proteína se puede obtener mediante el cribado de bibliotecas genómicas o de ADNc seleccionadas utilizando la secuencia de aminoácidos deducida y por primera vez revelada en la presente especificación, y, si fuera necesario, utilizando los procedimientos convencionales de extensión con cebador tal como se describe en Sambrook *y otros.,* supra, para detectar los precursores y procesar los productos intermedios del ARNm que tal vez no han sido transcritos a la inversa en el ADNc.

2. Selección y transformación de las células hospederas

Las células hospederas son transfectadas o transformadas con vectores de expresión o clonación descritos en la presente especificación, para la producción de los polipéptidos antagonistas de Wnt, y son cultivadas en medios de nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir a los promotores, seleccionar los transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como los medios, la temperatura, el pH y similares, pueden ser seleccionadas por el artesano experto sin experimentación innecesaria. Generalmente, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares se encuentran en *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) and Sambrook *y otros.*, supra.

Los métodos de transfección de las células eucariotas y de transformación de células procariotas son generalmente conocidos por el artesano experto, por ejemplo, electroporación y con el empleo de liposomas, utilizando $CaCl_2$ y

$CaPO_4$. Dependiendo de la célula hospedera utilizada, la transformación se realiza utilizando las técnicas estándares apropiadas a dichas células. El tratamiento con calcio, que emplea cloruro de calcio, como se describe en Sambrook *y otros.,* supra, o la electroporación, se utilizan generalmente para los procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células de plantas, según lo descrito por Shaw *y otros.,* Gene, **23**:315 (1983) y WO 89/05859 publicada 29 Junio 1989. Para las células de mamífero que no tienen paredes celulares, se puede emplear el método de precipitación de fosfato de calcio de Graham y van der Eb, *Virology,* **52**:*456*-457 (1978). En la patente No. US 4,399,216 se han descrito aspectos generales de sistemas de transfección en células hospederas de mamíferos. Las transformaciones en levaduras se llevan a cabo típicamente de acuerdo con el método de Van Solingen *y otros., J. Bact.,* **130**:946 (1977) y Hsiao *y otros., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA),* **76**:*3829 (1979*). Sin embargo, también se pueden utilizar otros métodos para la introducción de ADN en las células, tales como, microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policationes, por ejemplo, polibreno, poliornitina también pueden ser usados. En los documentos Keown *y otros.*, Methods in Enzymology, **185**:527-537 (1990) y Mansour *y otros., Nature,* **336**:348-352 (1988) se pueden encontrar varias de las técnicas usadas para la transformación de células de mamíferos.

Entre las células hospederas apropiadas para clonar o expresar el ADN de los vectores descritos en la presente especificación, se incluyen procariotas, levaduras o células eucariotas superiores. Entre las células procariotas apropiadas se incluyen, entre otras, las eubacterias, tales como los organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, enterobacterias tales como *E. coli.* Diversas cepas de *E. coli* están a disposición del público, como la *E. coli* K12 cepa MM294 (ATCC 31446); *E. coli* X1776 (ATCC 31537); las cepas de *E. coli* W3110 (ATCC 27325) y la K5 772 (ATCC 53635). Otras células hospederas procariotas apropiadas incluyen Enterobacterias tales como *Escherichia, por ejemplo, E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella,* por ejemplo, *Salmonella typhimurium, Serratia,* por ejemplo, *Serratia marcescans,* y *Shigella,* así como, *bacilos* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P divulgado en DD 266,710 publicado 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa,* y *Streptomyces.* Estos ejemplos son ilustrativos y no restrictivos. La cepa W3110 es particularmente preferida

como hospedera u hospedera parental, ya que es una cepa hospedera común para la fermentación de los productos de ADN recombinado. Preferiblemente, la célula hospedera segrega cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede ser modificada para producir una mutación genética en los genes que codifican las proteínas endógenas del hospedero, los ejemplos de este tipo de hospederos incluyen la *E. coli* W3110 cepa 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA*; *E. coli* W3110 cepa 9E4, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 cepa 27C7 (ATCC 55,244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan*^{r}; *E. coli* W3110 cepa 37D6, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan*^{r}; *E. coli* W3110 cepa 40B4, que es la cepa 37D6 con una mutación por delección de degP que no es resistente a la kanamicina y una cepa de *E. coli* mutada para la proteasa periplásmica divulgada en la patente No. US 4,946,783 concedida el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son apropiados los métodos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de polimerización del ácido nucléico.

Los anticuerpos completos, los fragmentos de anticuerpos y las proteínas de fusión con anticuerpos se pueden producir en bacterias, particularmente cuando la glicosilación y las funciones efectoras de Fc no son necesarias, como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el inmunoconjugado muestra por sí mismo efectividad en la destrucción de las células tumorales. Los anticuerpos completos tienen una mayor vida media en circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más rentable. Para la expresión en bacterias de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos, véase, por ejemplo, US. 5,648,237 (Carter *y otros),* US 5,789,199 (Joly *y otros.*), y US 5,840,523 (Simmons *y otros.*), que describen la región iniciación de traducción (TIR, siglas en inglés) y secuencias señales para la optimización de la expresión y la secreción, estas patentes son incorporadas en la presente especificación a modo de referencia. Después de la expresión, el anticuerpo es aislado de la pasta celular de *E. coli* en una fracción soluble y puede ser purificado mediante, por ejemplo, una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final puede llevarse a cabo de manera similar al proceso de purificación de los anticuerpos expresados, por ejemplo, en células CHO.

Además de los procarióticos, los microbios eucarióticos tales como hongos filamentosos o levaduras son hospederos apropiados para la clonación o

expresión de los vectores que codifican el polipéptido antagonista de Wnt. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los microorganismos eucarióticos inferiores de uso común como hospedero. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, *Nature,* **290**: 140 [1981]; EP 139,383 publicado 2 Mayo 1985); la hospedera *Kluyveromyces* (patente US No. 4,943,529; Fleer *y otros., Bio/Technology,* **9**:968-975 (1991)) como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *y otros., J. Bacteriol.,* **154**(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickeramii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilarum* (ATCC 36,906; Van den Berg *y otros., Bio/Technology,* **8**:135 (1990)), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus; yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070; Sreekrishna *y otros., J. Basic Microbiol.,* **28**:265-278 [1988]); *Candida; Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Case *y otros., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **76**:5259-5263 [1979 *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394,538 publicado 31 Octubre 1990); y hongos filamentosos, como, por ejemplo, *Neurospora, Penicillium, Tolypocladium* (WO 91/00357 publicada 10 de enero de 1991), y el hospedero Aspergillus tal como A. nidulans (Ballance *y otros., Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **112**:284-289 [1983]; Tilburn *y otros., Gene,* **26**:205-221 [1983]; Yelton *y otros., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **81**: 1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly and Hynes, *EMBO J.,* **4**:475-479 [1985]). Las levaduras metilotróficas son apropiadas y se incluyen en la presente especificación, pero no se limitan a, las levaduras capaces de crecer en metanol seleccionadas de los géneros que consisten de *Hansenula, Candida, Kloeckera, Pichia, Saccharomyces, Torulopsis, y Rhodotorula*. Una lista de especies que son representativas de esta clase de levaduras se puede encontrar en C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs,* 269 (1982).

Las células hospederas apropiadas para la expresión del polipéptido antagonista de Wnt glicosilado son derivadas de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen las células de insectos tales como la mosca Drosophila S2 y Spodoptera Sf9, así como células vegetales, tales como cultivos celulares de algodón, maíz, papa, soja, petunia, tomate y tabaco. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus y variantes y las correspondientes células hospederas permisivas de insectos correspondientes, a partir de hospederos tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila*

melanogaster (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas virales para la transfección están a disposición del público, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* PNV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* PNV, y estos virus pueden ser utilizados como el virus de la presente especificación y según la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Sin embargo, el interés por las células de vertebrados ha sido mayor, y la propagación de las células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos útiles de líneas celulares hospederas de mamíferos son la línea CV1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón de embriones humanos (293 o las células 293 subclonadas para el crecimiento del cultivo en suspensión, Graham *y otros.*, *J. Gen Virol.* **36**:59 (1977)); las células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub *y otros., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:4216 (1980)); las células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* **23**:243-251 (1980)); las células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); las células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); las células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); las células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); las células del hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); las células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); las células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); las células TRI (Mather *y otros.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* **383**:44-68 (1982)); las células MRC5; las células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospederas se transforman con los vectores de expresión o clonación antes descritos para la producción del polipéptido antagonista de Wnt y se cultivan en los medios nutrientes convencionales modificados, según sea apropiado, para inducir a los promotores, seleccionar los transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

3. Selección y uso de un vector replicable

Uno de los aspectos de la invención proporciona el ácido nucleico (por ejemplo, el ADN genómico o ADNc) que codifica un polipéptido antagonista de Wnt insertado en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o la expresión. Diversos vectores están a disposición del público. El

vector, por ejemplo, puede ser en forma de un plásmido, de un cósmido, de partículas virales, o fagos. Existen diversos procedimientos para insertar en el vector la secuencia apropiada de ácido nucleico. Generalmente, el ADN se inserta en un sitio(s) de restricción de una endonucleasa apropiado(s) usando técnicas conocidas en el arte. Los componentes del vector generalmente incluyen, entre otros, a una o más secuencias señales, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores apropiados que contengan uno o más de estos componentes, emplea técnicas de ligazón estándares que son conocidas por el artesano experto.

El antagonista de Wnt puede producirse por técnicas recombinantes ya sea directamente, o también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido con un sitio específico de escisión en el extremo N-terminal de la proteína o el polipéptido maduro. Generalmente, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el polipéptido antagonista de Wnt que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de los líderes de la fosfatasa alcalina, penicilinasa, lpp, o la enterotoxina II estable al calor. Para la secreción en levadura, las secuencias señales pueden ser, por ejemplo, el líder de la invertasa de levadura, el líder del factor alfa (que incluye los líderes *del* factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, el segundo se describe en la patente US No. 5,010,182), o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans* (EP 362,179 publicada el 4 de abril de 1990), o la señal descrita en WO 90/13646 publicada el 15 de noviembre de 1990. Para la expresión en células de mamíferos, se puede utilizar una secuencia señal de mamíferos para dirigir la secreción de la proteína, como las secuencias señales de polipéptidos secretados de la misma o de especies afines, así como líderes secretores virales.

Tanto los vectores de clonación como los de expresión contienen una secuencia de ácido nucleico que permite reproducir el vector en una o más células hospederas. Son bien conocidas dichas secuencias para una variedad de bacterias, levaduras y viruses. El origen de replicación del plásmido pBR322 es apropiado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido de 2μ es apropiado para levaduras, y varios

orígenes virales (SV40. polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para los vectores de clonación en células de mamíferos.

Los vectores de clonación y expresión generalmente contienen un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos son aquellos que codifican las proteínas que (a) confieren resistencia a los antibióticos u otras sustancias tóxicas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) deficiencias auxotróficas que se complementan, o (c) el suministro de nutrientes críticos no disponibles en medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la racemasa D-alanina para *bacilos.*

Un ejemplo de un marcador seleccionable apropiado para las células de mamíferos son los que permiten la identificación de las células competentes que incorporan el ácido nucleico que codifica el antagonista de Wnt, tales como DHFR o timidinaquinasa. La línea celular CHO deficiente en la actividad DHFR es una célula hospedera apropiada cuando se emplea DHFR natural, preparado y propagado tal como se describe por Urlaub *y otros.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **77**:4216 (1980). Un gen de selección apropiado para su uso en levadura es el gen de levadura *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 [Stinchcomb *y otros.*, *Nature,* **282**:39 (1979); Kingsman *y otros.*, *Gene,* **7**:141 (1979); Tschemper *y otros.*, *Gene,* **10**:157 (1980)]. El gen trp1 proporciona un marcador seleccionable para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1 [Jones, *Genetics,* **85**:12 (1977)].

Los vectores de expresión y clonación suelen contener un promotor operacionalmente conectado a la secuencia de ácido nucleico que codifica el antagonista de Wnt, para dirigir la síntesis del ARNm. Los promotores reconocidos por una variedad de células hospederas potenciales son bien conocidos. Los promotores apropiados para su uso con hospederos procariotas incluyen los sistemas promotores de la β-lactamasa y de la lactosa [Chang *y otros.*, *Nature,* 275:615 (1978); Goeddel *y otros.*, *Nature,* **281**:544 (1979)], de la fosfatasa alcalina, un sistema promotor del triptófano (trp) [Goeddel, *Nucleic Acids Res.,* **8**:4057 (1980); EP 36,776], y promotores híbridos, tales como el promotor tac [deBoer *y otros.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **80**:21-25 (1983)]. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) operacionalmente conectada a la secuencia de ADN que codifica el polipéptido antagonista de Wnt.

Los ejemplos de las secuencias promotoras apropiadas para su uso con levaduras como hospederos incluyen los promotores para la fosfoglicerato 3-quinasa [Hitzeman *y otros.*, *J. Biol. Chem.*, **255**:2073 (1980)] o de otras enzimas glicolíticas [Hess *y otros.*, J. *Adv. Enzyme Reg.*, **7**:149 (1968); Holland, *Biochemistry,* **17**:4900 (1978)], tales como la enolasa, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3 fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles y tienen la ventaja adicional de que la transcripción es controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras de la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocroma C, fosfatasa ácida, enzimas degradadadoras asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de la maltosa y galactosa. Vectores y promotores apropiados para su uso en la expresión en levaduras se describen con más detalle en el documento EP 73,657.

La transcripción del polipéptido antagonista de Wnt a partir de vectores en las células hospederas de mamífero es controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de viruses como el virus de polioma, el virus fowlpox (UK 2,211,504 publicada 5 de julio de 1989), adenovirus (tales como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y el virus de simio 40 (SV40), por promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y los promotores de golpes de calor (heat shock), siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas celulares hospederos.

La transcripción de un ADN que codifica el polipéptido antagonista de Wnt por eucarióticas superiores puede incrementarse mediante la inserción en el vector de la secuencia de un potenciador. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, generalmente de aproximadamente 10 a 300 pb, y actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Actualmente se conocen muchas secuencias de genes potenciadores de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α-fetoproteína, e insulina). Sin embargo, típicamente, se utiliza un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador del SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador

del polioma en el lado tardío del origen de replicación, y el potenciador del adenovirus. El potenciador puede ser empalmado en el vector en una posición 5 'o 3' a la secuencia que codifica el polipéptido antagonista de Wnt, pero está localizado preferiblemente en el sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión utilizados en las células hospederas eucariotas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o las células nucleadas provenientes de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están comúnmente disponibles a partir de la posición 5 ' y, ocasionalmente 3', de las regiones no traducidas de los ADNs o ADNc virales o eucarióticos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos que se transcriben como fragmentos poliadenilados en las porciones no traducidas del ARNm que codifica el antagonista de Wnt.

Además de esto, se describen en Gething *y otros.*, *Nature,* **293**:620-625 (1981); Mantei *y otros.*, *Nature,* **281**:40-46 (1979); EP 117,060; y EP 117,058, otros métodos, vectores, y células hospederas apropiados para la adaptación de la síntesis del polipéptido antagonista de Wnt en cultivos celulares recombinantes de vertebrados

4. Cultivo de las células hospederas

En uno de los aspectos la invención proporciona una célula hospedera que comprenden el ácido nucleico que codifica los antagonistas de Wnt. Las células hospederas utilizadas para producir el polipéptido antagonista de Wnt de la presente invención, pueden ser cultivadas en una variedad de medios. Los medios disponibles comercialmente, tales como Ham's F10 (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* ((DMEM), Sigma) son apropiados para el cultivo de las células hospederas. Además, cualquiera de los medios que se describen en Ham *y otros.*, *Meth. Enz.* **58**:44 (1979), Barnes *y otros., Anal. Biochem.***102**:255 (1980), Pat. Nos US 4,767,704; US 4,657,866; US 4,927,762; US 4,560.655; o US 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; o Patente US Re 30,985, pueden utilizarse como medios de cultivo para las células hospederas. Cualquiera de estos medios puede ser suplementado cuando sea necesario, con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), soluciones tamponadas

(tal como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMICINA™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos generalmente presentes a concentraciones finales en el rango micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario puede también ser incluido a las concentraciones adecuadas que serán conocidas por aquellos expertos en el arte. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, etc, son las utilizadas anteriormente con la célula hospedera seleccionada para la expresión, y serán aparentes para el artesano experto.

5. Detección de la amplificación/expresión génica

La amplificación y/o expresión génica puede ser medida directamente en una muestra, por ejemplo, mediante por ejemplo, transferencia de tipo Southern, transferencia de tipo Northern, para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **77**:5201-5205 (1980)], transferencia puntual (análisis de ADN) o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada apropiadamente, sobre la base de las secuencias proporcionadas en la presente especificación. Alternativamente, se pueden emplear anticuerpos que pueden reconocer moléculas bicatenarias específicas, incluidos el ADN bicatenario, el ARN bicatenario, e híbridos bicatenarios de ADN y ARN o bicatenarios de ADN y proteínas. Los anticuerpos, a su vez, pueden estar marcados y el ensayo puede llevarse a cabo cuando la molécula bicatenaria está fijada a una superficie, de modo que el anticuerpo se enlace a dicha molécula sobre la superficie, y se pueda detectar.

La expresión de genes, alternativamente, puede ser medida por métodos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejidos y el ensayo del cultivo celular o de los fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto del gen. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o análisis de las muestras de los fluidos pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden ser preparados en cualquier mamífero. Según convenga, los anticuerpos pueden ser preparados contra las secuencias de Frz, *FRPs* o *Ror* identificadas en la presente especificación o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente especificación o contra la secuencia exógena fusionada al antagonista Wnt y que codifica un epítopo específico para un anticuerpo.

Purificación del antagonista de Wnt

El polipéptido antagonista de Wnt puede recuperarse a partir de un medio de cultivo o de lisados de la célula hospedera. Si está unido a la membrana, puede ser liberado de la membrana usando una solución detergente apropiada (por ejemplo, Triton X-100) o por escisión enzimática. Las células empleadas en la expresión del polipéptido antagonista de Wnt se pueden romper por diversos medios físicos o químicos, tales como mediante ciclos de congelación y descongelación, sonicación, ruptura mecánica, o agentes de lisis celular.

Puede que se desee purificar el polipéptido antagonista de Wnt para aislarlo de las proteínas o polipéptidos de las células recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procesos de purificación apropiados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol; HPLC en fase reversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico, como DEAE; cromatofocalización, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; una columna de proteína A Sefarosa para eliminar los contaminantes, tales como IgG, y las columnas de metal quelante para unir formas etiquetadas del epítopo de los antagonistas de *Wnt*. Diversos métodos de purificación de proteínas se pueden emplear y dichos métodos se conocen y se describen en el arte, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology,* **182** (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice,* Springer-Verlag, New York (1982). Los pasos de purificación seleccionado(s) dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y el polipéptido antagonista de Wnt específicamente producido.

Al utilizar las técnicas recombinantes, el polipéptido antagonista de Wnt puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o puede ser directamente secretado al medio. Si el polipéptido antagonista de Wnt se produce intracelularmente, en el primer paso, se eliminan las partículas de desechos, ya sean las células hospederas o fragmentos de lisis, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter *y otros.*, *Bio/Technology* **10**:163-167 (1992) describe un procedimiento para aislar los anticuerpos que son secretados al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, la pasta celular es descongelada en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA, y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. Los desechos celulares pueden ser eliminados por centrifugación. En caso de

que el polipéptido antagonista de Wnt sea secretado en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión, son generalmente primeramente concentrados utilizando un filtro para la concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, un Amicon o una unidad de ultrafiltración Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa tal como PMSF puede incluirse en cualquiera de los anteriores pasos para inhibir la proteólisis y también se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición del polipéptido antagonista de Wnt preparada a partir de las células, puede ser purificada mediante, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A se puede usar para purificar los anticuerpos que se basan en cadenas pesadas humanas γ1, γ2 o γ4 (Lindmark *y otros.*, *J. Immunol. Meth.* **62**:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y humano γ3 (Guss *y otros.*, *EMBO J.* **5**:15671575 (1986)). La matriz a la cual se une el ligando de afinidad en la mayoría de los casos es agarosa, pero existen otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables, como las matrices de vidrio de poro controlado o poli (estirenedivinilo) benceno permiten un flujo más rápido y tiempos de procesamiento más cortos que los que se logran con agarosa. En caso de que el polipéptido antagonista de Wnt comprenda un dominio C_H3, la resina Bakerbond ABX$_J$ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas de purificación de proteínas tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía de sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio anión o catiónico (por ejemplo, una columna de ácido poliaspártico), cromatofocalización, SDS-PAGE, y la precipitación con sulfato de amonio también están disponibles en función de los anticuerpos que serán recuperados.

Tras los primeros pasos de purificación, la mezcla de los anticuerpos de interés y los contaminantes pueden ser sometidos a cromatografía de interacción hidrofóbica a bajo pH utilizando una solución tamponada de

elución a un pH entre 2.5-4.5, preferiblemente realizada a bajas concentraciones de sal (por ejemplo, de aproximadamente a 0-0.25M de sal).

C. Formulaciones farmacéuticas

Uno de los aspectos de la invención proporciona una composición que comprende un antagonista de Wnt y al menos un portador o un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones terapéuticas de los antagonistas de Wnt utilizada de conformidad con la presente invención se preparan para el almacenamiento mezclando los antagonistas de Wnt que tienen el grado de pureza deseado con, opcionalmente, portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, *(Remington: The Science and Practice of Pharmacy,* 20m edition, A. Gennaro, Ed. (2000)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Un "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, los medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Otros ejemplos de portadores y diluyentes apropiados incluyen, entre otros, agua, solución salina, solución de Finger, solución de dextrosa y albúmina sérica humana al 5%. También se pueden usar liposomas y vehículos no acuosos, tales como aceites fijos. Estas composiciones solamente se usan cuando un medio convencional o un agente es incompatible con un compuesto activo. Compuestos activos complementarios también pueden ser incorporados en las composiciones.

Los portadores, excipientes, o estabilizadores aceptables, no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen soluciones tamponadas tales como acetato, Tris, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluidos el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (tales como el cloruro de amonio octadecildimetilbencilo, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butilo o alcohol bencílico; alquil parabenos tales como metil o propilparabeno; catecol, resorcinol; ciclohexanol; 3-Pentanol, y m-cresol), polipéptidos, de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos), proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como la glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina o, monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrina; agentes quelantes, tales como EDTA; tonificadores como trehalosa y cloruro

de sodio, azúcares tales como sacarosa, manitol, sorbitol o trehalosa; tensoactivos tales como polisorbato; contraiones formadores de sales tales como el sodio; complejos con metales (por ejemplo, complejos Zn-proteínas), y/o tensoactivos no iónicos como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG). El anticuerpo preferiblemente comprende al anticuerpo en una concentración de entre 5-200 mg/ml, preferiblemente entre 10-100 mg/ml.

Las formulaciones de la presente especificación también pueden contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que está siendo tratada, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no afectan negativamente a los demás. Por ejemplo, además de un antagonista de Wnt, puede ser conveniente incluir en una formulación, un anticuerpo, por ejemplo, que se une a un epítopo diferente de la proteína Wnt, a una proteína Wnt totalmente diferente, o un anticuerpo contra alguna otra diana, tal como un factor de crecimiento que afecta el crecimiento del trastorno mediado por Wnt r. Como alternativa, o adicionalmente, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, citoquinas, agente inhibidor del crecimiento, agente anti-hormonal, y/o un cardioprotector. Dichas moléculas están presentes apropiadamente en la combinación en cantidades que sean efectivas para los fines previstos.

Los ingredientes activos también pueden ser atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización en la interfase por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en los sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nano ápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy,* 20th edition, A. Gennaro, Ed. (2000).

Las fórmulas que se utilizarán para la administración *in vivo* tienen que ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Las composiciones terapéuticas de la presente especificación generalmente se colocan en un recipiente estéril con un puerto de acceso, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que se puede perforar por una aguja de inyección hipodérmica.

La vía de administración es de acuerdo con los métodos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesionales, administración tópica, o mediante sistemas de liberación sostenida.

Las dosis y las concentraciones deseadas de los fármacos de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar en función del uso previsto. La determinación de la dosis o vía de administración apropiadas se basa en la habilidad de un médico. Los experimentos en animales proporcionan una orientación fiable para la determinación de la dosis terapéutica efectiva en humanos. El escalado entre especies de la dosis efectiva se puede realizar siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. and Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics", In Toxicokinetics y New Drug Development, Yacobi y otros., Eds., Pergamon Press, New York 1989, p. 42-96.

Cuando se emplea la administración *in vivo* de una sustancia o molécula de la invención, las cantidades de la dosis normal pueden variar desde aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal del mamífero o más por día, preferiblemente aproximadamente de 1 μg/kg/día hasta 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración. La orientación sobre las dosis y métodos de administración se proporcionan en la literatura, véase, por ejemplo, las patententes Nos.US 4,657,760; US 5,206,344; ó 5,225,212. Se anticipa que formulaciones diferentes, serán efectivas para diferentes compuestos y diferentes trastornos, y que la administración dirigida selectivamente a un órgano o tejido, por ejemplo, puede requerir la administración de una manera diferente a la que requiere otro órgano o tejido.

En el caso en que se desee que la administración de una formulación sea por liberación sostenida de una sustancia o molécula con características adecuadas para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que requiere de la administración de dicha sustancia o molécula, se contempla la microencapsulación de la sustancia o molécula. Ejemplos de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semi-permeables de polímeros sólidos hidrofóbicos que contienen los anticuerpos, estas matrices son en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. La microencapsulación de proteínas recombinantes para la liberación sostenida se ha realizado exitosamente con la hormona de crecimiento humana (rhGH), interferón-α,γ (rhIFN-α,–γ), interleuquina-2, y MN rgp120. Johnson y *otros.*,

Nat. Med., **2**:795-799 (1996); Yasuda, *Biomed. Ther.*, **27**:1221-1223 (1993); Hora *y otros.*, *Bio/Technology*, **8**:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems," in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell and Newman, eds, (Plenum Press: New York, 1995), p. 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; y la patente No. US 5,654,010.

Las formulaciones de liberación sostenida de estas proteínas se puede desarrollar usando polímero de ácido poli-láctico- coglicólico (PLGA) debido a su biocompatibilidad y una amplia gama de propiedades biodegradables. Los productos de degradación de PLGA, los ácidos láctico y glicólico, se pueden eliminar rápidamente del cuerpo humano. Por otra parte, la degradabilidad de éste polímero se puede ajustar desde meses a años, dependiendo de su peso molecular y la composición. *Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer," in: M. Chasin and R. Langer (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), p. 1-41.*

Otros ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico)), polilácticos (Patente No. US 3,773,919), copolímeros del ácido L- glutámico y y etilo-L-glutamato, acetato de etilen-vinilo no degradable, copolímeros degradables del ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT® (microesferas inyectables, compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y de acetato de leuprolido), y poli-D-(-)-- 3- ácido hidroxibutírico.

D. Métodos de tratamiento del trastorno mediado por Wnt

La invención proporciona métodos para el tratamiento de un trastorno mediado por Wnt en un mamífero que padece de ese trastorno, que comprende la administración a los mamíferos de una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista de Wnt. En una forma de realización, es un trastorno de la proliferación celular asociado con, por ejemplo, la expresión incrementada de la actividad de señalización de Wnt aberrante. En otra forma realización, el trastorno es consecuencia de la expresión incrementada de una proteína Wnt.

En otra forma de realización el trastorno proliferativo celular es cáncer, tal como por ejemplo, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de mama,

cáncer asociado con diversos trastornos relacionados con la HSC, tales como leucemias y otros cánceres relacionados con la sangre, y cáncer relacionado con trastornos proliferativos neuronales, incluidos los tumores cerebrales, como los gliomas, astrocitomas, meningiomas, Schwannomas, tumores de la hipófisis, tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET), meduloblastomas, craniofaringioma, y tumores de la región pineal.

reducción o ausencia observable y/o mensurable de uno o más de los siguientes aspectos: reducción del número de células cancerosas o ausencia de células cancerosas, reducción en el tamaño del tumor, inhibición (es decir, enlentecimiento en cierta medida y, preferiblemente detención) de la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos, incluyendo la propagación del cáncer en los tejidos blandos y los huesos, la inhibición (es decir, enlentecimiento en cierta medida y, preferiblemente detención) de las metástasis tumorales, la inhibición, en cierta medida, del crecimiento tumoral, y/o atenuación en cierta medida, de uno o más de los síntomas específicos asociados con el cáncer, morbilidad y mortalidad reducidas, y mejoramiento en la calidad de vida. En la medida que el antagonista de Wnt puede impedir el crecimiento y/o matar las células cancerosas, éste puede ser citostático y/o citotóxico. La reducción de estos signos o síntomas pueden también ser percibidos por el paciente.

Los parámetros anteriores para evaluar el éxito del tratamiento y el mejoramiento del trastorno son fácilmente medibles por procedimientos de rutina familiares para un médico. Para la terapia del cáncer, la eficacia se puede medir, por ejemplo, mediante la evaluación del tiempo para la progresión de la enfermedad (TDP, siglas en inglés) y/o la determinación de la velocidad de respuesta (RR). La metástasis se puede determinar mediante la ejecución de pruebas y por gammagrafía ósea y las pruebas de detección de calcio y otras enzimas para determinar la propagación a los huesos. Las exploraciones de CT (tomografía computarizada, siglas en inglés) también se pueden hacer para buscar la propagación a la pelvis y ganglios linfáticos en el área. Las radiografías de tórax y la medición de los niveles de enzimas hepáticas mediante métodos conocidos, se utilizan para buscar metástasis a los pulmones y al hígado, respectivamente. Otros de métodos de rutina para monitorear la enfermedad incluyen la ultrasonografía transrectal (TRUS, siglas en inglés) y la biopsia de aguja transrectal (TRNB).

En una forma de realización específica, la administración de antagonistas de Wnt reduce la carga tumoral (por ejemplo, reduce el tamaño o gravedad del

cáncer). En otra forma de realización específica, la administración del antagonistas de Wnt mata el cáncer.

E. Métodos de inhibir la señalización de Wnt en una célula

La invención proporciona un método de inhibir la señalización de Wnt en una célula, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad efectiva de un antagonista de Wnt. En una forma de realización, la célula está contenida dentro de un mamífero, preferiblemente un humano, y la cantidad administrada es una cantidad terapéuticamente efectiva. En otra forma de realización, la inhibición de la señalización de Wnt resulta además en la inhibición del crecimiento de la célula. En una forma de realización, la célula es una célula cancerosa.

La inhibición de la proliferación celular se mide utilizando los métodos conocidos por los expertos en el arte. Por ejemplo, una prueba para medir la proliferación celular es el ensayo de determinación de la viabilidad celular empleando CellTiter-luminiscente Glo™, que está comercialmente disponible por Promega (Madison, WI). Ese ensayo determina el número de células viables en el cultivo sobre la base de la cuantificación de ATP, lo que es una indicación de las células metabólicamente activas. Ver Crouch *y otros*, (1993) *J. Immunol. Meth.* **160**:81-88, patente No. US 6,602,677. El ensayo podrá realizarse en placas con el formato de 96 o de 384 pocillos, lo que facilita la automatización del cribado de alto rendimiento (HTS). Ver *See* Cree *y otros* (1995) *AntiCancer Drugs* **6**:398-404. El procedimiento de ensayo incluye la adición de un solo reactivo (CellTiter-Glo® Reagent) directamente al cultivo celular. Esto resulta en la lisis celular y la generación de una señal luminiscente producida por la reacción de una luciferasa. La señal luminiscente es proporcional a la cantidad de ATP presente, lo que es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo. Los datos pueden ser registrados por un luminómetro o dispositivo de imagen CCD de la cámara. La luminiscencia de salida se expresa en unidades de luz relativa (RLU).

F. Métodos de modulación de la expresión de un gen Wnt diana***

La invención proporciona un método de modulación de la expresión de un gen Wnt diana en una célula caracterizada por una señalización activada o excesiva de Wnt, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad efectiva de un antagonista de Wnt. En una forma de realización, el gen diana Wnt es sobreexpresado como resultado de la señalización de Wnt,

y el resultado del contacto con el antagonista de Wnt reduce la expresión del gen diana Wnt. En otra forma de realización, el gen diana Wnt es seleccionado del grupo consistente en: Axina 2, APCDD1, Gad1, Sax1, c-myc, ciclina D1, PPARdelta, gastrina, clusterina, Survivina, la ciclooxigenasa, fra-1, osteopontina, uPAR, claudin-1, CD44, MMP-7/9/11/14/26, IGFBP-4, Met, BMP4, sox-9, la histona deacetilasa 2, VEGF. En otra forma de realización, el gen Wnt diana es sub-expresado como resultado de la señalización de Wnt, y como resultado del contacto con el antagonista de Wnt se restaura la expresión del gen Wnt diana. En una nueva forma de realización, el gen Wnt diana es seleccionado del grupo consistente en: Lefty1, Lefty2, FRPs1, Fzd5, antígeno fas, caspasa 3, integrina β7, alfa e integrina, hath 1, la proteína de unión de ácidos grasos 2, muc-2, factor similar a kruppel-4, anhidrasa carbonica-11, EphrinB1, EphB2R, EphB3R, muc-3, histocompatibilidad 2, región Q locus 1, β2-microglobulin.

La expresión de los genes diana se determina utilizando los métodos conocidos por los expertos en el arte, incluidos los aquí descritos y enunciados en los siguientes ejemplos.

G. Métodos de detección de la presencia de una proteína Wnt

La invención proporciona un método para detectar la presencia de una proteína Wnt en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con un antagonista de Wnt, en el que la presencia de un complejo o el nivel de unión entre el antagonista de Wnt y la proteína Wnt es indicativo de la presencia de proteínas Wnt y/o de la señalización de Wnt. En una forma de realización, el método comprende además la determinación de si el nivel de señalización de Wnt es aberrante. En esta forma de realización, el nivel de unión a proteínas Wnt en la muestra se compara con el nivel en una segunda muestra en la que la expresión de la proteína Wnt y/o la señalización de Wnt se conoce que es fisiológicamente normal. El nivel de unión en la muestra sospechosa en comparación con la segunda muestra que es superior o inferior a la muestra fisiológicamente normal es indicativo de que la señalización de Wnt es aberrante. En otra realización, la presencia de señalización de Wnt o señalización de Wnt aberrante es indicativa de la presencia de un trastorno mediado por Wnt, tal como el cáncer.

H. La vía Wnt y trastornos asociados a los mismos

1. La vía de señalización de Wnt:

La vía de señalización de Wnt es un proceso extraordinariamente complejo de señalización en el que participan múltiples proteínas que ejercen distintos niveles de control en la vía. Este multi-nivel, que es una rigurosa regulación de la vía es indicativo de su importancia en la biología celular. A pesar de los complicados mecanismos de regulación, la primera señal de la vía se genera por la unión de un Wnt a los receptores Frizzled (Frz). Una señal efectiva requiere además de la presencia de un solo paso de la molécula transmembranaria de la clase LRP (la proteína relacionada con el receptor de LDL), concretamente LRP 5 y LRP 6. Además, Wnt se puede unir a LRP para formar un complejo trimérico con Frizzled. La cola citoplasmática de LRP, a su vez, interactúa con Axina, otro componente que está corriente abajo. Dishevelled, es un componente citoplasmático que interactúa directamente con Frizzled, y puede también interactuar directamente con Axina, formando así un complejo cuaternario de Frizzled, LRP, Dsh y Axina. Esta interacción con Axina libera β-catenina del "complejo de degradación" (que se discute más abajo) para su posterior actividad corriente abajo en la vía de señalización de Wnt.

Fuera de la célula, la señalización de Wnt es inhibida por diversas proteínas que se pueden unir a Wnt y de esta manera lo separan de su receptor. Incluido en este grupo están las proteínas relacionadas con las Frizzled secretadas (*FRPss*, Jones *y otros.*, *Bioessays* 2002; **24**: 811-820) y el factor inhibidor Wnt-1 (*WIF-1*, Hsieh, J.C. y otros., *Nature* 1999; **398**: 431-436).En humanos, la familia FRPs consta de cinco miembros (por ejemplo, FRPs-1, FRPs-2.. FRPs-5), cada uno con un dominio rico en cisteína (CRD), que comparte el 30-50% de homología de secuencia con la de CRD del receptor Frz. (Melkonyan, H.S. y otros., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; **94**: 13636-13641). Las FRPss se cree que forman complejos inhibidores de la función con los receptores Frz y, por tanto, son los antagonistas naturales, pero la biología es compleja, y en algunos casos, incluso pueden actuar como agonistas de la actividad Wnt. (Uren, A. *y otros., J. Biol. Chem.* 2000; **275**: 4374-4382).

Otra clase de inhibidor extracelular Wnt es Dickkopf (Dkk). [Brott, B.K. y otros., *Mol. Cell Biol.* 2002; **22**: 6100-6110; Fedi, P. y otros., *J. Biol. Chem.*

1999; **274**: 19465-19472]. Los tres miembros de la familia Dkk (por ejemplo, Dkk-1, Dkk-2 y Dkk-4) pueden antagonizar la señalización de Wnt a través de la inactivación de del receptor de la superficie de la célula LRP-5 y LRP-6, componentes esenciales de la vía canónica. [Mao, J.H. y otros., *Mol. Cell* 2001; **7**: 801-809; Pinson, K.I. y otros., *Nature* 2000; **407**: 535-538]. El Dkk forma un complejo ternario con LRP5/6 y el receptor transmembranario de paso simple Kremen 1 (Krm-1) o Kremen 2 (Krm-2) [Mao *y otros., Gene* 2003; **302**: 179-183; Mao *y otros., Nature* 2002; **417**: 664-667; Mao *y otros., Nature* 2001; **411**: 321-325].Este complejo a su vez sufre endocitosis, eliminando así LRP5/6 de los receptores de la superficie de la célula. Como resultado de ello, los Dkks pueden antagonizar selectivamente la señalización de Wnt canónica, si bien no afectan la señalización no canónica.

La característica distintiva de la señalización de Wnt canónica es la activación de niveles elevados de la proteína β-catenina. La β-catenina se produce constitutivamente y está presente en el citoplasma como piscinas de proteínas monoméricas. [Papkoff, J. y otros., *Mol. Cell Biol.* 1996; **16**: 2128-2134]. El principal mecanismo de control de los niveles citoplasmáticos de β-catenina es a través de la degradación física directa después del reclutamiento en un gran complejo multi proteico ("complejo de degradación"). El andamiaje central de este complejo es proporcionado por Axina, así como los sitios de unión para, la β-catenina, la poliposis adenomatosa coli (APC), la glucógeno sintasa quinasa 3β (GSK3β), la caseína quinasa Iα (CKIα) y la proteína fofatasa 2A (PP2A) [Hinoi, T. y otros., J. *Biol. Chem.* 2000; **275**: 34399-34406; Ikeda *y otros., Oncogene* 2000; **19**: 537-545; Yamamoto *y otros., J. Biol. Chem.* 1999; **274**: 10681-10684; Kishida *y otros., J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 10823-10826; Ikeda *y otros., EMBO J.* 1998; **17**: 1371-1384. Después de la formación del complejo, este se estabiliza por la fosforilación de Axina y APC mediada por GSK3β, así como PP2A. Entonces la GSK3β fosforila a la β-catenina y consecuentemente es lo que le permite ser reconocida por las proteínas que contienen repeticiones de β-transducina (β TrCP), en consecuencia dirige selectivamente la ubiquitinación y la degradación proteosómica [Aberle *y otros., EMBO J.* 1997; **16**: 3797-804; Latres *y otros., Oncogene* 1999; **18**: 849-54; Liu *y otros., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; **96**: 6273-8].

Aunque la formación del complejo Axina/APC/GSK3β es el principal mecanismo de degradación de la β catenina, se ha demostrado que una vía

alternativa de degradación involucra la participación de la ubiquitinación inducida por la formación del complejo con Siah-1 y el extremo C-terminal de APC. [Matsuzawa *y otros., Mol. Cell* 2001; **7**: 915-926; Liu *y otros., Mol. Cell* 2001; **7**: 927-936]. Además de su papel como factor de transcripción, la β-catenina está implicada en la adhesión celular. [Nelson *y otros., Science* 2004; **303**: 1483-1487; Ilyas *y otros., J. Pathol.* 1997; **182**: 128-137. La β-catenina se puede encontrar en la superficie de la célula en los sitios de contacto intercelular conocidos como junturas de adherencia, donde se forma el complejo con la E-catenina y. la α-catenina. Por lo tanto, cualquier aumento de la expresión de la E-catenina dirigirá la β-catenina a la membrana celular, y como consecuencia se agotan los niveles citoplasmáticos, y, a su vez, se inhibe la señalización de Wnt. Por otra parte, la ruptura del complejo de la E-catenina-catenina puede incrementar los niveles citoplasmáticos la β-catenina libre, estimulando así la actividad transcripcional. [Nelson *y otros., supra.*]. Por lo tanto, la activación de los receptores de superficie celular cRON, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y c-ErbB2, también pueden estimular la señalización canónica de Wnt mediante la liberación de la β.-catenina, Otras vías de señalización pueden activar o facilitar los efectos de la señalización de Wnt. Por ejemplo, la señalización de la integrina puede resultar en el transporte nuclear de β-catenina [Eger *y otros., Oncogene* 2004; **23**: 2672-2680], mientras que la señalización a través del factor de crecimiento insulínico (IGF) puede activar la señalización de Wnt "absorbiendo" el GSK3β disponible lo que impide la formación del "complejo de degradación".

Un paso inicial de la señalización canónica, involucra la unión de Wnt a Frz en presencia de LRP5/6. [Mao *y otros., Mol. Cell* 2001; **7**: 801-809; Pinson *y otros., Nature* 2000; **407**: 535-538].La formación de este complejo ternario tiene dos consecuencias corriente abajo. La primera es el reclutamiento de Dishevelled (Dsh) a la superficie de la célula y su fosforilación por la caseína quinasa Iε (IC ε) [Kishida *y otros., J. Biol. Chem.* 2001; **276**: 33147-33155]. La Dsh fosforilada puede formar un complejo con Frat 1y con GSK3β que, a su vez puede inhibir la actividad de GSK3β. En segundo lugar, el complejo ternario Wnt/Frz/LRP5/ 6 facilita la degradación de Axina mediada por la LRP5/6. El efecto neto de esto es la desestabilización del complejo de degradación responsable de la fosforilación de la β-catenina. En ausencia de fosforilación la β-catenina no es ubiquinada, con lo que escapa de la

degradación, aumentando así los niveles intracelulares y la disponibilidad para la translocación al núcleo.

La manera en que la β-catenina es transportada al núcleo no está del todo clara, pero la interacción con el transporte nuclear de proteínas APC [Rosin-Arbesfeld *y otros., Nature* 2000; **406**: 1009-1012; Neufeld *y otros., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; **97**: 12085-12090], así como el *pygopus* y *Bcl9/legless* han estado involucrados. [Townsley *y otros., Nature Cell Biol.* 2004; **6**: 626-633].

Una vez en el núcleo, la β-catenina desplaza al represor de la transcripción Groucho para unirse con el factor de transcripción especifico de las células T / factor-1 linfoide enlazador del potenciador linfoide (TCF/LEF) proteínas de unión a ADN. En ausencia del desplazamiento por β-catenina, los TCF /.LEF forman un complejo con Groucho para reprimir la expresión de "genes diana" de Wnt. El efecto inhibitorio de Groucho es además mediado, por la interacción con diversas histonas deacetilasas (HDAC), que se cree que hacen el ADN refractario a la activación de la transcripción. [Cavallo *y otros., Nature* 1998; 395: 604-8; Chen *y otros., Genes Dev.* 1999; 13: 2218-30]. La conversión del complejo represor de la transcripción TCF en un complejo de activación de la transcripción además implica el reclutamiento de las histonas acetilasas tales como la proteína de unión CREB (CBP)/P300. así como otros factores de activación tales como la de Brg-1. [Takemaru *y otros., J. Cell Biol.* 2000; **149**: 249-54; Barker *y otros., Cell* 2002; **109**: 47-60; Brantjes *y otros., Biol. Chem.* 2002; **383**: 255-261; Roose *y otros., Biochim. Biophys Acta- Rev. Cancer* 1999; **1424**: M23-M37]. Las interacciones entre los complejos β-catenina-TCF y la cromatina también pueden ser mediadas por *Legless (Bcl9)* y *Pygopus*. Kramps *y otros., Cell* 2002; **109**: 47-60; Thompson *y otros., Nat. Cell Biol.* 2002; **4:** 367-73; Parker *y otros., Development* 2002; **129**: 2565-76.

En la Figura 1 se muestra un resumen abreviado de la vía de señalización canónica de Wnt, tanto en "apagado" o estado inactivo, así como en " encendido" o estado activo.

2. Trastornos relacionados con la actividad de la señalización de Wnt:

La desregulación de la vía de señalización de Wnt puede ser causada por mutaciones somáticas en genes que codifican diversos componentes de la vía de señalización de Wnt. Por ejemplo, la actividad aberrante de la

señalización de Wnt se ha asociado con la sobreexpresión del ligando Wnt en células no pequeñas de cáncer de pulmón (NSCLC) [You *y otros., Oncogene* 2004; **23**: 6170-6174], leucemia linfocítica crónica (CLL) [Lu *y otros., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; **101**: 3118-3123], cáncer gástrico [Kim *y otros., Exp. Oncols.* 2003; **25**: 211-215; Saitoh *y otros., Int. J. Mol. Med.* 2002; **9:** 515-519], carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) [Rhee *y otros., Oncogene* 2002; **21**: 6598-6605], el cáncer colorrectal [Holcombe *y otros., J. Clin. Pathol- Mol. Pathol.* 2002; **55**: 220-226], cáncer de ovario [Ricken y otros., Endocrinology 2002; 143: 2741-2749], el carcinoma basocelular (BCC) [Lo Muzio *y otros., Anticancer Res.* 2002; **22**: 565-576] y el cáncer de mama. Además, la reducción de diversas moléculas reguladoras de ligandos Wnt como FRPs y WIF-1 se han asociado con el cáncer de mama [Klopocki *y otros., Int. J. Oncols.* 2004; **25**: 641-649; Ugolini *y otros., Oncogene* 2001; **20**: 5810-5817; Wissmann *y otros., J. Pathol.* 2003; **201**: 204-212], cáncer de vejiga [Stoehr *y otros., Lab Invest.* 2004; **84**: 465-478; Wissmann *y otros., supra*], mesotelioma [Lee *y otros., Oncogene* 2004; **23**: 6672-6676], el cáncer colorrectal [Suzuki *y otros., Nature Genet* 2004; **36**: 417-422; Kim *y otros., Mol. Cancer Ther.* 2002; **1:** 1355-1359; Caldwell *y otros., Cancer Res.* 2004; **64**: 883-888], cáncer de próstata [Wissman *y otros., supra*], NSCLC [Mazieres *y otros., Cancer Res.* 2004; **64**: 4717-4720], y el cáncer de pulmón [Wissman *y otros., supra*]. Se proporciona que para el tratamiento terapéutico del cáncer se pueda usar la interferencia de la señalización de Wnt usando las moléculas antagonistas de Wnt de la presente invención.

A continuación, la señalización de Wnt aberrante que resulta de la sobreexpresión de varios componentes del complejo del receptor Frz-LRP también se ha asociado con ciertos tipos de cáncer. Por ejemplo, la sobreexpresión de LRP5 se ha asociado con el osteosarcoma [Hoang *y otros., Int. J. Cancer* 2004; **109**: 106-111], mientras que la sobreexpresión de Frz se ha asociado con cánceres tales como el cáncer de próstata [Wissmann *y otros., supra* HNSCC [Rhee *y otros., Oncogene* 2002; **21**: 6598-6605], colorrectal [Holcombe *y otros., supra*], cáncer de ovario [Wissman *et al, supra*], esófago [[Tanaka *y otros., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; **95**: 10164-10169] y gástrico [Kirikoshi *y otros., Int. J. Oncols.* 2001; **19**: 111-115] Además, la sobreexpresión de los componentes de la vía de señalización de Wnt como *Dishevelled* se han asociado con el cáncer, tales como el cáncer de próstata [Wissman *y otros., supra*], de mama [[Nagahata *y otros., Cancer*

Sci. 2003; **94**: 515-518], mesotelioma [Uematsu *y otros., Cancer Res.* 2003; **63**: 4547-4551] y de cuello uterino [Okino *y otros., Oncols. Rep.* 2003; **10**: 1219-1223]. La sobreexpresión de Frat-1 se ha asociado con el cáncer, tales como el de páncreas, esófago, cuello uterino, mama y estómago. [Saitoh *y otros., Int. J. Oncols.* 2002; **20**: 785-789; Saitoh *y otros., Int.J. Oncols.* 2001; **19**: 311-315]. Las mutaciones de Axina en las que ocurre pérdida de la función (LOF)se han asociado con el cáncer hepatocelular [Satoh *y otros., Nature Genet.* 2000; **24**: 245-250; Taniguchi *y otros., Oncogene* 2002; **21**: 4863-4871] y meduloblastomas [Dahmen *y otros., Cancer Res.* 2001; **61**: 7039-7043; Yokota *y otros., Int. J. Cancer* 2002; **101**: 198-201]. Se proporciona que el bloqueo de las interacciones de Wnt-Frz con los antagonistas de Wnt de la presente invención se usen para aliviar los cánceres asociados con sobreexpresión de Frz o LRP.

Por último, una gran cantidad de tipos de cáncer se han asociado con la activación de la β-catenina a través de la ruptura del "complejo de degradación", tales como las mutaciones en la β-catenina de ganancia de la función o de las mutaciones en APC de pérdida de la función. Una reducción de la degradación de β-catenina se traduce en una mayor cantidad de β-catenina funcional en la célula, que a la vez ocasiona un incremento de la transcripción de los genes diana, lo que resulta en la proliferación celular aberrante. Por ejemplo, mutaciones en el gen que codifica β-catenina (es decir, CTNNB1)se han asociado con el cáncer, tales como el cáncer gástrico [Clements *y otros., Cancer Res.* 2002; **62**: 3503-3506; Park *y otros., Cancer Res.* 1999; **59**: 4257-4260], colorrectal [Morin *y otros., Science* 1997; **275**: 1787-1790; Ilyas *y otros., Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1997; **94**: 10330-10334], carcinoides intestinales [Fujimori *y otros., Cancer Res.* 2001; **61**: 6656-6659], de ovario [Sunaga *y otros., Genes Chrom. Cancer* 2001; **30**: 316-321], adenocarcinoma pulmonar [Sunaga *y otros., supra*], de endometrio [Fukuchi *y otros., Cancer Res.* 1998; **58**: 3526-3528; Kobayashi *y otros., Japan. J. Cancer Res.* 1999; **90**: 55-59; Mirabelli-Primdahl *y otros., Cancer Res.* 1999; **59**: 3346-3351], hepatocelular [*Satoh y otros., supra.*; Wong *y otros., Cancer* 2001; **92**: 136-145], hepatoblastoma [Koch *y otros., Cancer Res.* 1999; **59**: 269-273],meduloblastoma [Koch *y otros., Int. J. Cancer* 2001; **93**: 445-449], de páncreas [Abraham *y otros., Am. J. Pathol.* 2002; **160**: 1361-1369], tiroides [Garcia-Rostan *y otros., Cancer Res.* 1999; **59**: 1811-1815; Garcia-Rostan *y otros., Am. J. Pathol.* 2001; **158**: 987-996], próstata [Chesire *y otros., Prostate* 2000; **45**: 323-334; Voeller *y otros., Cancer Res.* 1998; **58**:

2520-2523], melanoma [Reifenberger *y otros., Int. J. Cancer* 2002; **100**: 549-556], pilomatricoma [Chan *y otros., Nature Genet.* 1999; **21**: 410-413], tumor de Wilms [Koesters *y otros., J. Pathol.* 2003; **199**: 68-76], pancreatoblastomas [Abraham *y otros., Am. J. Pathol.* 2001; **159**: 1619-1627], liposarcomas [Sakamoto *y otros., Arch. Pathol. Lab Med.* 2002; **126**: 1071-1078], angiofibromas nasofaríngeo juvenil [Abraham *y otros., Am. J. Pathol.* 2001; **158**: 1073-1078], desmoides [Tejpar *y otros., Oncogene* 1999; **18**: 6615-6620; Miyoshi *y otros., Oncols. Res.* 1998; **10**: 591-594], el sarcoma sinovial [Saito *y otros., J. Pathol.* 2000; **192**: 342-350]. Entre tanto las mutaciones de pérdida de la función se han asociado con el cáncer, tales como colorrectal, como [Fearon *y otros., Cell* 1990; **61**: 759-767; Rowan *y otros., Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000; **97**: 3352-3357], el melanoma [[Reifenberger *y otros., Int. J. Cancer* 2002; **100**: 549-556; Rubinfeld *y otros., Science* 1997; **275**: 1790-1792], meduloblastoma [Koch *y otros., Int. J. Cancer* 2001; **93**: 445-449; Huang *y otros., Am. J. Pathol.* 2000; **156**: 433-437] y desmoides [Tejpar *y otros., Oncogene* 1999; **18**: 6615-6620; Alman *y otros., Am J. Pathol.* 1997; **151**: 329-334].Los cánceres que se derivan de la actividad aberrante de la β-catenina y consecuentemente activan la vía Wnt son apropiados para ser tratados con los antagonistas de Wnt de la presente invención.

3. Señalización de Wnt y la carcinogénesis

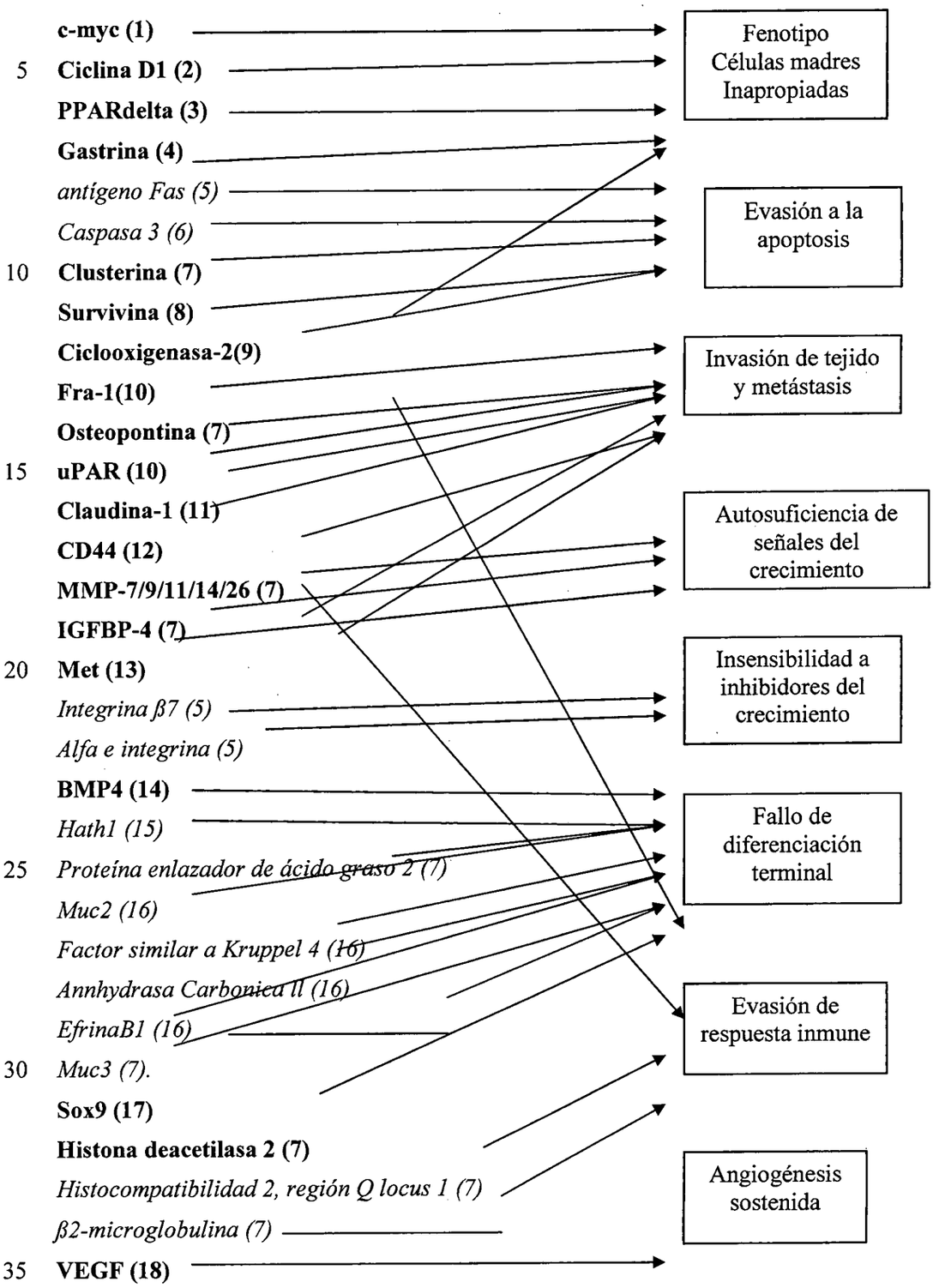
La vía Wnt tiene muchas variables de transcripción o genes diana. La mayoría de estos son específicos para ciertos tipos – lo cual no es infrecuente en vías de señalización en desarrollo. Esto es consistente con un mecanismo básico de control de los genes por las señales extracelulares en los cuales la célula más que la señal determina la naturaleza de la respuesta. Sin embargo, además de los genes específicos del tipo celular, la señalización de Wnt también controla los genes que son más ampliamente inducidos, incluidos los componentes de la vía de señalización de Wnt y genes que son probablemente más activado por la cascada TCF β-catenina de Wnt.

La transición de la fisiología celular normal en otra caracterizada por un cambio neoplásico ha sido el objeto de intenso estudio en un esfuerzo por comprender mejor los hechos subyacentes al desarrollo del cáncer. La activación inapropiada de los genes diana por la β-catenina puede resultar en una enfermedad del organismo, aunque puede que no haya ninguna mutación somática en los genes diana en sí mismos. Ilyas ha generado una

modificación de la lista de Hanahan y Weinberg de los fenotipos que adquieren la mayoría de las neoplasias malignas, que incluye "inapropiado fenotipo de células madre/ potencial replicativo ilimitado", "evasión de la apoptosis", "tejido de invasión y metástasis", "autosuficiencia de señales crecimiento", "falta de sensibilidad a los inhibidores de crecimiento"," fallo de la diferenciación terminal "," evasión de la respuesta inmune" y " angiogénesis sostenida". Ilyas, *J. Pathol.* 2005; **205**: 130-144; Hanahan and Weinberg, *Cell* 2000; **100**: 57-70. El análisis de los genes que son modulados por la señalización de Wnt, incluidos los genes diana de β-catenina o la expresión alterada como lo demuestra el análisis de micro arreglos que muestra que las perturbaciones de la señalización de Wnt aberrante, ya sea directamente o a través del efecto sobre los genes diana puede dar casi todos estos "fenotipos neoplásicos". Ilyas, M., *J. Pathol.* 2005; **205**: 130-144. Una lista de ejemplo de las dianas de la señalización de Wnt se da en la Tabla 1. Los genes diana que se regulan hacia arriba aparecen en negrita, mientras que los que se regulan hacia abajo están en cursiva. La expresión aberrante de esos genes diana, debido al resultado de la activada y/o excesiva señalización de Wnt puede disponer de cura por la aplicación de los antagonistas de Wnt de la invención.

Tabla 1

***Los Genes Diana Wnt* y los efectos sobre el fenotipo**



Cada vez más, el cáncer se está viendo como una enfermedad de la "célula madre" (Taipale *y otros., Nature* 2001; **411**: 349-54- es decir, una activación inapropiada y/o mantenimiento de las células madre. La señalización de Wnt ha demostrado ser esencial para el mantenimiento de las células madre [He

y otros., Nature Genet. 2004; **36**: 1117-1121; Reya *y otros., Nature* 2003; **423**: 409-414; Willert *y otros., Nature* 2003; **423:** 448-452]. En el intestino, el TCF4 es el principal factor nuclear de unión de β-catenina y el fracaso de los ratones deficientes de TCF4 para desarrollar las células madre en el intestino delgado también apoya el papel de la señalización canónica de Wnt en el mantenimiento de células madre [Korinek *y otros., Nat. Genet.* 1998; **19**: 379-83; Pinto *y otros., Genes Dev.* 2003; **17**: 1709-13; Kuhnert *y otros., Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 2004; **101**: 66-71].

El efecto de la señalización de Wnt en múltiples procesos biológicos es ilustrada por la matriz de los genes metaloproteinasas (MMPs). MMP7, MMP14 y MMP26 se han demostrado los blancos directos de β-catenina [Marchenko *y otros., Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 36: 942-956; Takahashi *y otros., Oncogene* 2002; 21: 5861-5867; Brabletz *y otros., Am. J. Pathol.* 1999; **155**: 1033-1038], mientras que otros MMPs se encontraron que son expresados directamente por los adenomas intestinales Paoni *y otros., Physiol. Genomics* 2003; **15**: 228-235]. Los MMPs son enzimas proteolíticas que rompen el colágeno del estroma permitiendo así que las células tumorales puedan adquirir el fenotipo de "invasión y metástasis en el tejido." La actividad enzimática también permite la liberación de factores de crecimiento latentes en el estroma, que junto con otros factores de crecimiento secretados por las células tumorales contribuirán a la "autosuficiencia de señales de crecimiento". [Coussens *y otros., Science* 2002; **295**: 2387-2392; Egeblad *y otros., Nature Rev. Cancer* 2002; **2:** 161-174]. Los MMPs pueden actuar sobre osteopontina (una diana secundaria inducida por Wnt [Paoni *y otros., supra*], para liberar fragmentos que, junto con el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), una diana directa de la β-catenina, contribuyen a la función de "angiogénesis sostenida ". [Zhang *y otros., Cancer Res.* 2001; **61**: 6050-6054; Agnihotri *y otros., J. Bio. Chem.* 2001; **276**: 28261-28267].

Si bien la vía de señalización de Wnt puede ser activada en los niveles corriente abajo de la interacción del ligando con el receptor, existe una fuerte evidencia que sugiere que la inhibición de la interacción del ligando extracelular con el receptor es efectiva en la reducción de la tumorigenicidad, a pesar de que el evento de iniciación de la señalización de Wnt puede haber ocurrido corriente abajo. Por ejemplo, Ilyas describe en un reseña reciente que la inhibición de las señales Wnt en varias líneas celulares de cáncer colorrectal tiene como resultado la reducción de la tumorigenicidad. [Ilyas,

supra.]. Por otra parte, la transfección de un receptor frizzled que no funciona (el dominio externo de Frz7), en la línea celular de carcinoma (SK-CO-1) restauró el fenotipo normal para la β-catenina. Esta línea celular tiene activada la señalización de Wnt, debido a una mutación homocigótica en APC-/-. Además, estas células tampoco provocan la formación de tumores cuando se transfieren *in vivo*. Vincan *y otros., Differentiation* 2005; **73**: 142-153. Esto demuestra que la inhibición de la señalización de Wnt a nivel extracelular puede regular hacia abajo la señalización de Wnt como consecuencia de la activación de un componente corriente abajo en la vía de señalización de Wnt intracelular. Esto además sugiere que los inhibidores, tales como los antagonistas de Wnt de la presente invención, que inhiben las interacciones Wnt-Frz, tienen un beneficio terapéutico para cualquier trastorno mediado por Wnt, independientemente de la manera particular en que la señalización de Wnt sea activada.

4. La señalización aberrante de Wnt en el cáncer de colon:

Originalmente había sido descubierto que los defectos en el componente APC de la señalización de Wnt eran la clave en el cáncer hereditario, síndrome de poliposis adenomatosa familiar (FAP). Pacientes con FAP que han heredado un alelo defectuoso de APC desarrollan gran número de pólipos de colon, o de adenomas, en los primeros años de su vida. Tales pólipos se desarrollan como extensiones clonales de las células epiteliales en el que el segundo alelo APC es inactivado. El efecto acumulativo de estos adenomas FAP inevitablemente se traduce en la aparición de los adenocarcinomas, que se hace evidente como una forma más o menos ordenada de la acumulación de mutaciones adicionales en oncogenes o genes supresores de tumor, tales como K-Ras, p53 y Smad4. Por otra parte, la pérdida de APC también se produce en la mayoría de los cánceres colorrectales esporádicos. Kinzler *y otros., Cell* 87: 159-170 (1996). La inactivación mutacional de APC, que tiene como resultado la estabilización y eventual transporte nuclear de la β-catenina, y la señalización de Wnt, transforma las células epiteliales. Curiosamente, plásmidos indicadores que contienen sitios de unión a TCF concatemerizado como la pTOPFLASH, normalmente transcritas sólo en la señalización de Wnt, se transcriben en forma inapropiada en mutantes APC de células de cáncer a través de la activación constitutiva de los complejos de transcripción β-catenin/TCF-4. En otros ejemplos de cáncer colorrectal en los que APC no está mutado, es el andamiaje de la proteína Axina-2 el que está mutado [[Liu *y otros., Nature*

Genet. 26: 146-147 (2000) o la β-catenina la que está mutada con el fin de suprimir la Ser / THR N-terminal causante de la destrucción. [Morin *y otros., Science* 275: 1787-1790 (1997). Por lo tanto, el cáncer colorrectal está vinculado no sólo a los defectos en APC, sino también a la inadecuada persistencia de la activación transcripcional de β-catenin/TCF-4. Además, se ha informado de que en cáncer colorrectal las mutaciones de TCF-4 resultan en la activación de los mismos genes diana (como lo demuestra el análisis por micro arreglo), como se observa a través de la expresión defectuosa de APC en las células madres y progenitoras de la cripta. Van de Wetering *y otros., Cell* 111: 241-250 (2002). Una vez que la cascada Wnt está activada, las células de adenoma APC-/- son capaces de mantener su estado de progenitoras en forma indefinida. Como resultado, es probable que la activación de la señalización de Wnt sea una condición necesaria para la carcinogénesis en el cáncer colorrectal, y la inhibición de la señalización de Wnt puede ser un medio efectiva para tratar y/o evitar la aparición de este trastorno.

5. Señalización de Wnt en las células madre hematopoyéticas

Las células madre hematopoyéticas dan lugar a las células de la sangre del sistema circulatorio de adultos en un proceso de células progenitoras comprometidas con un linaje a partir de las células madre hematopoyéticas multipotentiales (HSC). También es evidente que la señalización de Wnt contribuye a la auto-renovación y el mantenimiento de las HSC, y que la señalización de Wnt disfuncional es responsable de diversos trastornos derivados de las HSC tales como leucemias y otros cánceres relacionados con la sangre. Reya *y otros., Nature* 434: 843-850 (2005); Baba *y otros., Immunity* 23: 599-609 (2005); Jamieson *y otros., N. Engl. J. Med.* 351(7): 657-667 (2004). La señalización de Wnt se reduce normalmente a como las células madre se convierten en las células progenitoras mieloides comprometidas Reya *y otros., Nature* 423: 409-414 (2003).

No sólo son los propios ligandos Wnt producidos por HSC, sino la señalización de Wnt también se activa, lo que indica una regulación autocrina o paracrina. Rattis *y otros., Curr. Opin. Hematol.* 11: 88-94 (2004); Reya *y otros., Nature* 423: 409-414 (2003). Además, tanto la β-catenina como la Wnt3a promueven la auto renovación de las HSCs murinas y de las células progenitoras, mientras que la aplicación de Wnt-5A a las progenitoras hematopoyéticas humanas promueve la expansión de los progenitores

indiferenciados *in vitro*. Reya *y otros., supra.*; Willert *y otros., Nature* 423: 448-452 (2003); Van Den Berg *y otros., Blood* 92: 3189-3202 (1998).

Además de la HSC, es evidente que las células madre embrionarias, las células madre epidérmicas y las células madres epiteliales son sensibles o dependientes de la señalización de Wnt en el mantenimiento de un estado de proliferación indiferenciado. Willert *y otros., supra*; Korinek *y otros., Nat. Genet.* 19: 379-383 (1998); Sato *y otros., Nat. Med.* 10: 55-63 (2004); Gat *y otros., Cell* 95: 605-614 (1998); Zhu *y otros., Development* 126: 2285-2298 (1999). Por lo tanto, la inhibición de la señalización de Wnt con los antagonistas de Wnt de la presente invención puede ser terapéutico en el tratamiento de los trastornos derivados de hematopoyesis disfuncional, tales como leucemias y diversos tipos de cáncer relacionados con la sangre, como leucemias aguda, crónica, linfoides y mieloides, síndrome mielodisplásico y trastornos mieloproliferativos. Estos incluyen el mieloma, el linfoma (por ejemplo, el de Hodgkin y no Hodgkin), anemia crónica y no progresiva, deficiencias progresiva y sintomática de las células sanguíneas, policitemia vera, trombocitemia esencial o primaria, mielofibrosis idiopática, leucemia mielomonocítica crónica (CMML), linfoma de células del manto, linfoma cutáneo de células T, macroglobinemia de Waldenström,

6. La señalización de Wnt en la leucemia

La activación no regulada de la vía de señalización de Wnt es un precursor para el desarrollo de leucemia. Reya *y otros., supra*. Existen evidencias experimentales que sustentan que el crecimiento oncogénico de los linajes mieloide y linfoide es dependiente de la señalización de Wnt. La señalización de Wnt se ha relacionado con la regulación de las formas crónica y aguda de la leucemia mieloide. Los progenitores de granulocitos macrófagos (GMPs) de pacientes con leucemia mieloide crónica y las células de estallido de crisis de los pacientes resistentes a la terapia muestran una activa señalización de Wnt. Jamieson, *y otros., supra*. Además, la inhibición de la β-catenina a través de la expresión ectópica de Axina disminuye la capacidad de recubrimiento de las células leucémicas *in vitro*, lo que sugiere que los precursores de la leucemia mieloide crónica dependen de la señalización de Wnt para el crecimiento y la renovación. Además, la sobreexpresión de Wnt fue la causa de que los GMPs adquirieran las propiedades de auto renovación a largo plazo similares a las de células madre. Jamieson *y otros., supra*. Este hallazgo además apoya la hipótesis de que la señalización de Wnt es necesaria para el normal desarrollo de los linajes de la sangre, pero

que los resultados de la señalización de Wnt aberrante tienen como resultado la transformación de células progenitoras. Los antagonistas de Wnt de la presente invención podrían ser útiles para el tratamiento de estos tipos de leucemias.

Estudios recientes también indican que la señalización de Wnt también podría influir sobre las neoplasias linfoides. El Wnt-16 está sobreexpresado en las líneas celulares de leucemia de células pre-B que portan la translocación E2A-PBX, lo que indica que la actividad Wnt autocrina puede contribuir a la oncogénesis. McWhirter, *y otros., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11464-11469 (1999). La función de señalización de Wnt en el crecimiento y la supervivencia de las progenitoras de las células B normales también apoya esta idea. Reya *y otros., Immunity* 13: 15-24 (2000); Ranheim *y otros., Blood* 105: 2487-2494 (2005). También se ha propuesto que la dependencia autocrina de Wnt regula el crecimiento del mieloma múltiple, un cáncer terminal de células B diferenciadas. Derksen *y otros., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 6122-6127 (2004). Los mielomas primarios y las líneas celulares de mieloma también se encontró que presentan una expresión estabilizada (es decir, independiente de la degradación del complejo). Aunque no habían mutaciones en los componentes de señalización de Wnt, la sobreexpresión de varios componentes, entre ellos Wnt-5A y Wnt-10B sugieren que la dependencia del tumor y la auto-renovación del cáncer no es necesariamente dependiente de mutaciones que aparecen en los componentes de la vía de señalización de Wnt, sino únicamente a activación constitutiva de la propia vía. Reya *y otros., supra.* . Mediante la unión del Wnt, sobreexpresado, los antagonista de Wnts de la presente invención serían una terapia efectiva en el tratamiento de las leucemias de células B.

La transición de auto-renovación, de las células madre pluripotentes a progenitores mieloides va acompañada de la regulación hacia abajo de la señalización de Wnt. Reya *et al, Nature* 423: 409-414 (2003). Del mismo modo, la expresión estable de β-catenina en progenitores linfoides restauró múltiples opciones de diferenciación, a pesar de que tales células carecen de los marcadores que normalmente se asocian con cualquier tipo de células. Baba *y otros., Immunity* 23: 599-609 (2005). Por lo tanto, se sugiere fuertemente que la inhibición de la señalización de Wnt por los antagonista de Wnts de la presente invención podrían ser una terapia efectiva en el tratamiento de la leucemia, tales como la leucemia linfoide y mieloide, que incluyen la leucemia mieloide aguda y crónica y leucemia linfoide crónica.

7. La señalización de Wnt aberrante en trastornos nerviosos

También se ha observado que la activación de la señalización de Wnt a través de la β-catenina puede aumentar los ciclos y la expansión de los progenitores neuronales, y que la pérdida de tales señales puede resultar en una pérdida de compartimiento progenitor. Chenn *y otros., Science* 297: 365-369 (2002); Zechner *y otros., Dev. Biol.* 258: 406-418 (2003). Así como la activación normal de la señalización de Wnt puede promover auto-renovación de las células madre neuronales, la activación de la vía Wnt aberrante puede ser tumorigénica para el sistema nervioso. Una evidencia experimental que soporta esta conclusión es el descubrimiento de que el meduloblastoma, un tumor pediátrico del cerebelo contiene mutaciones tanto en la β-catenina como en la Axina lo que, sugiere que los meduloblastomas se derivan de progenitores primitivos que se transforman en respuesta a la señalización de Wnt no controlada. Zurawel *y otros., Cancer Res.* 58: 896-899 (1998); Dahmen *y otros., Cancer Res.* 61: 7039-7043 (2001); Baeza *y otros., Oncogene* 22: 632-636 (2003). Por lo tanto, se sugiere fuertemente que la inhibición de la señalización de Wnt por los antagonistas de Wnts de la presente invención pueden ser una terapia efectiva en el tratamiento de diversos trastornos neuronales de la proliferación, que incluyen tumores cerebrales, como los gliomas, astrocitomas, meningiomas, schwannomas, tumores de la hipófisis, tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET), meduloblastomas, craniofaringioma, tumores de la región pineal, neurofibromatosis cancerosa y no cancerosa.

8. La señalización de Wnt aberrante en el cáncer de mama.

Los estudios sobre el desarrollo de tumores mamarios en ratones transgénicos Wnt. sugieren un papel controlador para Wnt en el destino o el mantenimiento de células progenitoras en los tejidos mamarios en que las células madre aún no se han aislado definitivamente. Estos tumores tienen una mayor frecuencia de células individuales con propiedades de las madres y de los progenitores, en marcado contraste con los tumores de ratones que sobreexpresan otros oncogenes. [[Liu *y otros., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 4158-4163 (2004); Li *y otros., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 15853-15858 (2003)]. Esto sugiere que la vía Wnt puede ser única en su habilidad de dirigir selectivamente la capacidad de las células progenitoras para la transformación, y sugiere un papel clave en la auto-renovación del epitelio normal de la mama. Por lo tanto, la inhibición de la señalización de Wnt por

los antagonistas de Wnt de la presente invención es probablemente una terapia efectiva en el tratamiento del cáncer de mama.

Figura 32 es una ilustración de la señalización de Wnt activa en el cáncer de mama humano. Figura 32A muestra la expresión de Wnt-1 (tal como se muestra por hibridación *in vitro*) en condiciones normales (A-1), de bajo grado (A-2) y de alto grado (A-3) en un tumor de mama humano reportado inicialmente en Wong *y otros., J. Pathol.* 196: 145 (2002). Figura 32B muestra la localización nuclear (B-1) y citoplasmática (B-2) (como se muestra por IHC) β-catenina en pacientes con cáncer de mama. También se muestra un ploteo de supervivencia de Kaplan-Meier (B-3) que muestra la probabilidad de la supervivencia de los pacientes que se correlaciona con el patrón de expresión de β-catenina. Estos datos se informaron inicialmente en Lin *y otros., P.N.A.S. (USA)* 97(8): 4262-66 (2000). La Figura 32C es un análisis por micro arreglo de la expresión de Wnt-1 en una mama normal de un paciente sin cáncer en comparación con el tejido aislado de un paciente con carcinoma ductal infiltrante, negativo para her-2.

9. La señalización de Wnt en el envejecimiento

La vía de señalización de Wnt también puede desempeñar un papel fundamental en el envejecimiento y los trastornos relacionados con la edad.

Como se informó en Brack AS, *y otros.*, *Science,* 317(5839):807-10 (2007), las células madre de músculos de de ratones envejecidos se observaron que convierten a partir de un linaje miogénico a uno fibrogénico cuando empiezan a proliferar. Esta conversión se asocia con un aumento en la actividad de la vía de señalización de Wnt canónica en progenitores miogénicos envejecidos y puede ser reprimida por los inhibidores de Wnt. Además, los componentes del suero de ratones envejecidos se unen a las proteínas y *Frizzled* pueden ser responsables de la elevación de la señalización de Wnt en células envejecidas. La inyección de Wnt3A en músculos jóvenes en regeneración redujeron la proliferación e incrementaron la deposición de tejido conjuntivo.

La vía de señalización de Wnt se ha visto implicada en proceso de envejecimiento en los estudios que utilizan Klotho, el modelo de ratón de envejecimiento acelerado, en el que se determinó que la proteína Klotho interactúa físicamente e inhibe las proteínas Wnt. Liu H, y otros., Science, 317(5839):803-6(2007). En un modelo de cultivo celular, la interacción Wnt-Klotho dio lugar a la delección de la actividad biológica de Wnt, mientras que

tejidos y órganos de los animales con déficit de Klotho mostraron evidencias de aumento de señalización de Wnt.

En consecuencia, los antagonistas de Wnt pueden encontrar uso como terapia para reducir los efectos del envejecimiento y para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la edad.

I. Modos de Administración de formulaciones específicas

1. Consideraciones generales

Una composición farmacéutica está formulada para ser compatible con la vía de administración que se pretende usar, incluida la vía intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (es decir, de tópica), transmucosa, administración rectal. Soluciones o suspensiones utilizadas para las aplicaciones parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir: un diluyente estéril como el agua para inyección, solución salina, aceites fijados, polietilenglicol, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; los agentes antibacterianos, como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); soluciones tamponadas como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad, como el cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede ser incluida en ámpulas, jeringas o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico.

2. Formulaciones inyectables

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la inyección estéril incluyen soluciones acuosas (cuando sea soluble en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o de dispersión. Para la administración intravenosa, los portadores apropiados incluyen suero fisiológico, agua bacteriostática, CREMOPHOR EL (BASF, Parsippany, NJ) o solución tamponada fosfato salino (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida, para ser administrada con una jeringa. Tales composiciones deben ser estables durante la fabricación y el almacenamiento y deben estar preservadas contra la contaminación de microorganismos, como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio que contiene la dispersión, por ejemplo, agua, etanol, poliol (como el glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido), y las mezclas adecuadas. La adecuada fluidez se puede mantener, por

ejemplo, utilizando una capa como la lecitina, manteniendo el tamaño requerido de las partículas en el caso de dispersión y el uso de los tensoactivos. Varios agentes antibacterianos y anti fúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, y timerosal, pueden contener contaminación con microorganismos. Los agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio se pueden incluir en la composición. Composiciones que pueden retrasar la absorción incluyen agentes tales como la gelatina y monoestearato de aluminio.

Las soluciones estériles inyectables pueden prepararse mediante la incorporación del compuesto activo (por ejemplo, cualquier sustancia moduladora o molécula de la invención) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado, con una o un ingrediente o una combinación de los mismos, según sea necesario, seguido por la esterilización. Generalmente, las dispersiones son preparadas mediante la incorporación de los compuestos activos en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico, y los demás ingredientes necesarios. Los métodos de preparación de polvo estéril para la preparación de soluciones inyectables estériles, son de secado al vacío y el secado por congelación que producen un polvo que contiene el ingrediente activo y cualquier ingrediente de una solución estéril.

3. La administración sistémica

La administración sistémica puede ser también transmucosa o transdérmica. Para administración transmucosa o por vía transdérmica, se seleccionan sustancias que pueden penetrar la(s) barrera(s) de destino. Los penetrantes transmucosa incluyen, detergentes, sales biliares, y derivados del ácido fusídico. Los espray nasales o los supositorios pueden ser utilizados para la administración transmucosa. Para administración por vía transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, bálsamos, geles o cremas.

Los compuestos también pueden ser preparados en forma de supositorios (por ejemplo, con bases como la manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la entrega en el recto.

4. Portadores

En una realización, los compuestos activos son preparados con los portadores que protegen el compuesto contra la rápida eliminación del cuerpo, tales como las formulaciones de liberación controlada, incluidos los

implantes y los sistemas de micro encapsulados. Los polímeros biodegradables o biocompatibles pueden ser utilizados, tales como el etileno y el acetato de vinilo, los polianhidridos, el ácido poliglicólico, el colágeno, los poliortoesteres, y el ácido poliláctico. Ese material se puede obtener comercialmente de ALZA Corporation (Mountain View, CA) y NOVA Pharmaceuticals, Inc. (Lake Elsinore, CA), o preparados por alguien con habilidad en el arte. Las sU.S.P.ensiones liposómicas también se pueden utilizar como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden ser preparados de acuerdo a los métodos conocidos por los experto en el arte, como en (Eppstein y otros., US Patent No. 4,522,811, 1985).

5. Unidad de dosificación

Las formulaciones orales o las composiciones parenterales en forma de dosis unitaria se pueden crear para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de dosificación unitaria se refiere a las unidades discretas físicas que concuerda con la dosis única para el tema a ser tratado, que contiene una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto activo, en asociación con el portador farmacéutico requerido. El pliego de condiciones de la forma de dosis unitaria es dictado por, y depende directamente de, las características únicas de los compuestos activos y el efecto terapéutico deseado, y las limitaciones inherentes a la composición del compuesto activo.

6. Composiciones de terapia génica

La moléculas de ácido nucleico pueden ser insertadas en vectores y se utilizan como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica se pueden administrar a un sujeto, por ejemplo, por inyección intravenosa, por administración local (Nabel and Nabel, US Patent No. 5, 328,470. 1994), o por inyección estereotáxica (Chen y otros., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:3054-7 (1994)). El preparado farmacéutico de un vector para la terapia génica puede incluir un diluyente aceptable, o pueden incluir una matriz de liberación lenta en la que el gen es administrado incrustado en la matriz. Alternativamente, el gen completo del vector de distribución puede ser producido intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de entrega de los genes.

7. Dosificación

La composición farmacéutica y método pueden comprender además otros compuestos terapéuticamente activos que generalmente se aplican en la administración de los antagonistas de Wnt.

En el tratamiento o la prevención de las condiciones que requieren la administración de antagonistas de Wnt, un nivel de dosis adecuada por lo general será, aproximadamente 0.01 a 500 mg por kg de peso corporal del paciente por día que puede ser administrado en dosis únicas o múltiples. Preferiblemente, la dosis será de unos 0.1 hasta aproximadamente 250 mg/kg por día, más preferiblemente de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 100 mg/kg por día. Una dosis adecuada puede ser aproximadamente de 0.01 a 250 mg/kg por día, aproximadamente de 0.05 a 100 mg/kg por día, o aproximadamente de 0.1 a 50 mg/kg por día. Dentro de esta gama, la dosis puede ser de 0.05 a 0.5, de 0.5 a 5 o 5 a 50 mg/kg por día. Para la administración oral, las composiciones son preferiblemente en forma de comprimidos que contienen 1,0 a 1000 miligramos de sustancia activa, particularmente, 1,0. 5,0. 10.0. 15,0. 20.0. 25,0. 50.0. 75,0. 100.0. 150.0. 200.0. 250.0. 300.0. 400.0. 500.0. 600.0. 750.0. 800.0. 900.0 y 1000.0 mg del ingrediente activo para el tratamiento sintomático de ajuste de la dosis al paciente a ser tratado. Los compuestos pueden ser administrados en un régimen de 1 a 4 veces al día, preferiblemente una o dos veces por día.

Sin embargo, la dosis y la frecuencia de la dosis para un paciente puede ser variada y dependerá de diversos factores, como la actividad de los compuestos empleados, la estabilidad metabólica y la duración de acción de este compuesto, la edad, peso corporal, estado general de salud, sexo, dieta, el modo y el momento de la administración, la tasa de excreción, la combinación de drogas, la gravedad de la situación particular, y el hospedero sujeto a terapia.

8. Kits para composiciones

Las composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) pueden ser incluidos en un kit, recipiente, envase, o dispensador junto con instrucciones para su administración. Cuando se suministra como un equipo, los diferentes componentes de la composición pueden ser envasados en recipientes separados y mezclados inmediatamente antes de su uso. El embalaje de los componentes por separado podrá permitir el almacenamiento de larga duración sin perder las funciones de los componentes activos.

Los kits también pueden incluir reactivos en recipientes separados que faciliten la ejecución de una prueba específica, como las pruebas de diagnóstico o tipificación de tejidos.

(a) Los recipientes o buques

Los reactivos incluidos en los kits pueden ser suministrados en recipientes de cualquier tipo de manera que la validez de los diferentes componentes se conserva y no se adsorbe o alteran por los materiales del recipiente. Por ejemplo, las ámpulas de vidrio selladas pueden contener una sustancia / molécula moduladora liofilizada y/o una solución tamponada que se ha envasado en una atmosfera de gas neutral no reactivo, como el nitrógeno. Las ámpulas pueden estar constituidas de cualquier material apropiado, como el vidrio, polímeros orgánicos, como el policarbonato, poliestireno, etc, de cerámica, metal o cualquier otro material que suele emplearse para guardar los reactivos. Otros ejemplos de recipientes apropiados incluyen simples botellas que pueden ser fabricadas a partir de sustancias similares como ámpulas, y sobres, que pueden estar constituidos por interiores forrados de láminas, tales como aluminio o una aleación. Otros recipientes son tubos de ensayo, viales, frascos, botellas, jeringas, o similares. Los recipientes pueden tener un puerto de acceso estéril, como una botella con un tapón que puede ser atravesado por una aguja para inyección hipodérmica. Otros recipientes pueden tener dos compartimientos que están separadas por una membrana que pueda extraerse fácilmente de manera que permite mezclar los componentes una vez que se retira dicha membrana. Las membranas extraíbles pueden ser de vidrio, plástico, caucho, etc.

(b) Los materiales de instrucción

Los kits también pueden suministrarse con los materiales de instrucción. Las instrucciones se pueden imprimir en papel u otro soporte, y/o pueden ser suministradas como un medio electrónico de lectura, tales como un disquete, CD-ROM, DVD-ROM, disco zip, cinta de vídeo, disco laser, cinta de audio, etc. Las instrucciones detalladas pueden no estar físicamente asociadas con el kit, sino que, un usuario puede ser dirigido por el fabricante o distribuidor del equipo a un sitio web especificado, o se suministra como un correo electrónico.

9. La terapia de combinación

En determinadas formas de realización, una fórmula farmacéutica que comprende un antagonista de Wnt se administra en combinación con al menos un agente terapéutico y/o adyuvante adicional. En determinadas formas de realización, el nuevo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, o un agente citotóxico tal como una toxina, como un maitansinoide, caliqueamicina, antibióticos, isótopos radiactivos, enzimas nucleolíticas o similares.

Según se ha señalado previamente, tal combinación de terapias abarca la administración combinada (cuando dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma o distintas fórmulas), y la administración separada, en cuyo caso, la administración de un antagonista de Wnt puede ocurrir antes de que, simultáneamente, y/o después de, la administración de los nuevos agentes terapéuticos y/o adyuvantes. Un antagonista Wnt también puede utilizarse en combinación con la terapia de radiación.

10. Medicamentos

La invención proporciona un antagonista Wnt para un uso en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de un trastorno mediado por Wnt. En un aspecto específico, la enfermedad mediada por Wnt es el cáncer.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar formas preferidas de realización de la presente invención. Debe ser apreciada por los de expertos en el arte que la divulgación de las técnicas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por los inventores que funcionan bien en la práctica de la invención, y por tanto, puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en el arte, a la ligera de la presente divulgación, deben estar conscientes de que se pueden hacer muchos cambios en las formas de realizaciones que se y aún obtener un resultado igual o similar sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención. Todas las referencias citadas a lo largo de la especificación son expresamente incorporadas en su totalidad mediante referencia en la misma.

Ejemplo 1

Protocolos generales

Cultivos de células mamarias

Las 293 células epiteliales de riñón humano (HEK, por sus siglas en inglés) (ATCC # CRL-1573), las células de ovario humano PA1 (ATCC # CRL-1572) fueron cultivadas 50/50 en medio Eagle modificado por Dulbecco de alta glucosa, Ham's F12 el cual ha sido suplementado con 10% de suero fetal bovino. Las células Tera2 (ATCC # HTB-106) y NTer2 (ATCC # CRL-1973) derivadas de teratoma humano fueron mantenidas en el medio de McCoy suplementado con 15% de suero fetal bovino y las células NCCIT (ATCC # CRL-2073) fueron mantenidas en RPMI suplementado con un 10% de suero fetal bovino. Todas las líneas celulares fueron además suplementadas con 2 mM de glutamina, y 1% de penicilina-estreptomicina a 37°C en 5% de CO_2.

Ensayos de Transfección y Luciferasa

En preparación para la transfección, (1) 500.000 células HEK293 y (2) 100.000 células PA1 (ATCC # CRL-1572), las células NCCIT, NTera2 o Tera2 fueron colocadas en placas dentro de cada pocillo de una placa con 12 pocillos (Nuc), 24 horas antes de las transfecciones. Las células fueron transfectadas con 0.375 µg de TOPglow (Upstate, Cat # 21-204), 0.05 mg de LEF1, 0.01 de SV40 RL mg con Fugene (Roche) y a 24 horas de pos-transfección. El medio fue cambiado y las células fueron tratadas o no tratadas con Wnt3a aislado, Wnt-5a aislado, o con muestras de suero por un período adicional de 20-24 horas antes de la cosecha. Todas las diluciones fueron hechas en medios completos para las líneas celulares indicadas. Las células fueron cosechadas en 50-100 µl de 1XSJC de solución tamponada de lisis (20 mM Tris pH 8.0. 137 mM NaCl, 1 mM de EGTA, 1% de Triton X-100. 10% de Glicerol, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 50 mM NaF, 1 mM $NaVO_4$ e inhibidores de proteasa) y duplicado 10 µl dónde fueron ensayados utilizando el kit de ensayo luciferasa Dual-Glo™ (Promega, Parte # TM058) y detectados en un Luminómetro Envision (Perkin Elmer). La actividad luciferasa fue normalizada contra la actividad *Renilla*.

Ejemplo 2

Construcción de moléculas quiméricas Frz-Fc

Clonación y expresión

Frz8(173)-Fc y Frz8(156)-Fc

Las Figuras 4A y B muestran las secuencias de los constructos quiméricos Frz8(156)-Fc y Frz8(173)-Fc. La figura 4A muestra la secuencia Frz8(173) más larga. Mostrado en gris (es decir, los primeros 24 residuos de aminoácidos N-terminal) está la secuencia líder de señales. Mostrado en subrayado (es decir, los residuos 25-27) están los residuos de alanina que pueden estar ausentes o presentes en la proteína madura. Mostrado en la caja de texto (es decir, los residuos 157-173) están las secuencias adicionales de los receptores Frz8 que distinguen el más largo constructo quimérico Frz8(173) del más corto Frz8(156). Mostrado en negrito (es decir, los residuos 174-182) está la secuencia conectora, mientras que la secuencia en cursiva (es decir, los residuos 183-409) está la región de Fc. Figura 4B muestra la más corta secuencia mínima de dominio CDR (ECD) de Frz(156). Mostrado en gris (es decir, los primeros 24 residuos de aminoácidos N-terminal) está la secuencia líder de señales. Mostrado en subrayado (es decir, los residuos 25-27) están los residuos de alanina que pueden estar ausentes o presentes en la proteína madura. Mostrado en negrito (es decir, los residuos 157-164) está la secuencia enlazadora, mientras que la secuencia en cursiva (es decir, los residuos 165-391) está la región de Fc.

El constructo Frz8(156)-Fc fue construido de la siguiente manera: los ADNc que codifican los residuos 1-156 de Frizzled 8 fueron sub-clonados en los sitios de EcoR1 y XhoI de un plásmido derivado de pRK. Aunque se prefiere el ADNc humano nativo, la secuencia alternativa que codifica la secuencia de proteínas idénticas (por ejemplo, murino) también puede ser utilizada. En este procedimiento de clonación, el carboxilo terminal de Frz8 fue fusionado con el amino terminal de un dominio efector (Fc) de IgG humano a través de una región enlazadora corta (por ejemplo, residuos LESGGGGVT) (SEQ ID NO: 70), para crear una fusión Frz8-Fc. Un constructo final codifica 156 residuos de Frz8. La clonación fue realizada utilizando técnicas de biología molecular estándares (Ausubel *et al.* (eds.), 2003, *Current Protocols in Molecular Biology*, 4 Vols., John Wiley & Sons). La proteína fue expresada en las células de ovario de Hámster Chino (CHO, por sus siglas en inglés).

Alternativamente, el ADNc que codifica una longitud de Frz8 de una longitud diferente a la descrita anteriormente (por ejemplo, 1-173) puede ser utilizado. Además, una secuencia enlazadora alternativa (por ejemplo, ESGGGGVT) (SEQ ID NO: 69) también puede ser utilizada.

Constructos Frz-Fc y FRPs-Fc

Los constructos para los antagonistas de Wnt con un componente del dominio Frizzled que comprende Frz1, Frz2, Frz3, Frz4, Frz5, Frz6, Frz7, Frz9, Frz10. FRPs1, FRPs2, FRPs3, FRPs4, o FRPs5 fueron construidos de manera similar al procedimiento descrito para Frz8. Frz2, Frz3, Frz4, Frz5 y FRPs3 fueron sub-clonados en un pRK plásmido derivado utilizando XhoI y AscI. Frz1, Frz6, Frz7, Frz9, Frz10 y FRPs4 fueron sub-clonados en un plásmido pRK derivado utilizando ClaI y XhoI, y FRPs1, FRPs2 y FRPs5 fueron sub-clonados en un plásmido pRK derivado utilizando ClaI y AscI. Al igual que los constructos Frz8, el carboxilo terminal de los dominios Frz fueron fusionados con el amino terminal de un dominio efector (Fc) de IgG humano a través de una región enlazadora corta para crear los antagonistas quiméricos de Wnt. La Figura 7 (A, B y C) muestra las secuencias de aminoácidos ejemplares para estos constructos. La secuencia líder de señales es mostrada en negrita con las cursivas indicando una secuencia líder no nativa. El enlazador está subrayado y el componente de Fc es mostrado en cursiva.

La Figura 5 (AH) (SEQ ID NOs: 115-129) proporciona secuencias de ácido nucleico ejemplares para estos constructos de antagonistas de Wnt.

Constructos alternativos pueden ser hechos para optimizar la estabilidad o la actividad *in vivo* o para proporcionar otras características beneficiosas, tales como, por ejemplo, el incremento de la solubilidad, la mejora de las características de unión. Estos constructos pueden incluir enlazadores que son diferentes a los enlazadores de los antagonistas de Wnt descritos anteriormente. Por ejemplo, un constructo alternativo de la proteína quimérica Frz3-Fc (SEQ ID NO: 114) ha sido hecho mediante la sub-clonación de un dominio Frz3 en un pRK plásmido derivado utilizando BstXI y XhoI y utilizando el péptido enlazador LESGGGGVT (SEQ ID NO: 70) para fusionar el dominio Frz3 al dominio de Fc.

Aislamiento de proteínas

Las proteínas del antagonista quimérico de Wnt fueron aisladas a > 90% de pureza por afinidad de captura utilizando una resina conjugada con proteína

A PROSEP® (Millipore). Agregados de orden superior fueron separados de los dímeros mediante el paso a través de una columna de filtración de gel Superdex 200® (GE-Healthcare). La identidad de la proteína y el procesamiento del amino terminal para remover la secuencia señal fueron confirmadas por la degradación de Edmund. La pureza de la proteína final es estimada ser superior a 98% (Figura 10). Los niveles de endotoxina del material después de la purificación es completo y inferior a 1.0 EU/mg.

Ejemplo 3

Estabilidad serológica de las moléculas quiméricas de Frz8-Fc

Los estudios iniciales de la estabilidad serológica los constructos quiméricos de Frz8(173)-Fc indicaron que el constructo tuvo una vida media *in vivo* limitada. La inestabilidad *in vivo* fue probablemente debido a la presencia de sitios de segmentación de proteasa en el dominio EC (ECD) del componente del receptor Frizzled. El constructo Frz8(156)-Fc descrito en el Ejemplo 2 exhibe una mayor estabilidad serológica sobre el Frz8(173)-Fc. Ratones desnudos atímicos fueron inyectados con IV a 10 mg/kg de Frz8(173)-Fc o de Frz8(156)-Fc. El suero fue recolectado en puntos específicos de tiempo concreto y analizado para la proteína activa y total. La Figura 11 muestra la inmunotransferencia de Fc humano utilizado para detectar la proteína presente en 1 µL de suero y comparado con 25 µg de la proteína purificada respectiva (*P*). El Frz8(156)-Fc fue detectable en el suero 72 horas después de la administración, mientras que el Frz8(173)-Fc no fue detectable más allá de los 30 minutos.

La actividad de Frz8(156)-Fc y Frz8(173)-Fc en el suero recolectado fue ensayada mediante la medición de la inhibición de la actividad reportera TOPglow dependiente de Wnt3a en las células HEK293. Aunque la potencia comparable *in vitro* fue observada en el tratamiento con Frz8(156)-Fc y Frz8(173)-Fc purificados a 2.5 µg/mL, sólo una actividad inhibitoria parcial fue recuperada del suero de ratones tratados con Frz8(173)-Fc recolectado 30 minutos después de la administración de proteína. En cambio, una actividad inhibitoria más potente pudo ser recuperada del suero de ratones tratados con Frz8(156)-Fc por hasta 24 horas después de la administración, con niveles detectables de inhibición de por al menos 72 horas (Figura 11B). Estos estudios demuestran que la molécula de Frz8(156) es más estable *in vivo* que la molécula basada en Frz8(173).

Además, el Frz8(173)-Fc tuvo una eficacia sub-óptima y actuó solamente para reducir la tasa de crecimiento del volumen tumoral, en contraposición a la disminución del volumen tumoral inicial. Esta eficacia sub-óptima es ilustrada en la Figura 12, mostrando un gráfico del volumen tumoral en el tiempo como resultado del tratamiento con diversos antagonistas quiméricos de componentes Fc de señalización Wnt, incluyendo la molécula Frz8(173)-Fc. En este ensayo, los tumores MMTV-WNT-1 fueron trasplantados al panículo adiposo mamario de ratones desnudos atímicos, y fue administrado un fármaco IV en los puntos de tiempo indicados por las flechas en el eje X.

Ejemplo 4

Farmacocinéticos *in vivo* de Frz8(156)-Fc

Los farmacocinéticos *in vivo* de Frz8(156)-Fc fueron ensayados por medio de la administración de una dosis única de esta proteína a 1, 5 o 20 mg/kg IV o a 20 mg/kg IP en ratones desnudos. Como presentado en la Figura 13 y discutido además en este ejemplo a continuación, el reactivo de Frz8-Fc exhibió eliminación bifásica en ratones desnudos en todas las dosis. Después de una dosis única IV o IP, la Frz8-Fc muestra: (1) aumento proporcional de la dosis en la exposición; (2) rápida absorción después de la dosificación de IP; (3) depuración de aproximadamente de 25-30 ml/día; y (4) una vida media de aproximadamente de 4 días. Coeficiente de biodisponibilidad, AUC_{IP}/AUC_{IV} = 92%.

Protocolo Animal

Los ratones desnudos atímicos hembras están separados en 4 grupos de 12, en base de la cantidad de fármaco administrado y el modo de administración. Grupo 1: Frz8-Fc, 1 mg/kg, por vía intravenosa (IV); Grupo 2: Frz8-FC, 5 mg / kg, IV; Grupo 3: Frz8-Fc, 20 mg/kg, IV; y Grupo 4: Frz8-FC, 20 mg/kg, vía interperitoneal (IP). Cada animal recibió una dosis bolus de IV o IP de Frz8-Fc de acuerdo con la designación de grupo. El volumen de la dosis administrada (5-10 mL/kg) varía dependiendo de la concentración de la solución de dosificación y del peso de cada animal. La dosificación IV es administrada a través de la vena caudal.

Aproximadamente de 125 µl de sangre es recolectada de cada animal de acuerdo con el siguiente procedimiento. El suero es almacenado a -70 °C hasta ser analizado por ELISA. Las muestras fueron extraídas de tal manera que n = 3 animales/punto de tiempo. Animales extras fueron utilizados para recolección de muestras de pre-dosis y/o recolección de suero de ratón

virgen. La sangre es recolectada con un desangramiento retro-orbital durante los dos primeros dos puntos de tiempo para cada animal, utilizando ojos alternativos. Para el punto de tiempo final, la sangre es recolectada a través de una punción cardíaca y aproximadamente de 1 ml es alicuotado en 2 tubos. Una muestra será utilizada para determinar la concentración de Frz8-Fc y la otra será reservada para uso de investigación. Cada animal recibe un bolus de IP de 10 ml de solución salina como líquido de sustitución después de cada punto de recolección de sangre. Los desangramientos retro-orbitales son realizados bajo anestesia con isoflorane y el desangramiento terminal ocurre bajo un cóctel de ketamina-xilazina. Los animales son sacrificados a través de dislocación cervical bajo anestesia después de la extracción final de sangre.

Resultados

La Figura 13 es la inmunotransferencia de un suero puro de ratones tratados con Frz8-Fc mostrando la detección en suero a 7 días y más allá de ambos IV de 20 o 5 mg/kg o IP de 20 mg/kg. Fueron tomadas muestras de los ratones individuales a los 4, 7, 10 o 14 días. Para los controles, las muestras de suero fueron tomadas de ratones no tratados, la proteína de Frz8-Fc fue añadida a 20 μg/ml y las muestras incubadas por 2 horas a 37 °C y la muestra fue entonces tratada con solución tamponada de carga SDS (etiquetado como 2h); el suero puro de los ratones no tratados también funcionaron como un control negativo (etiquetados como S).

Las Figuras 13B y 13C, son un resumen gráfico de los niveles séricos de Frz8-Fc como determinado por el estudio farmacocinético. Períodos específicos de tiempo incluyen la evaluación sobre 16 días (Figura 13B) y 2 días (Figura 13C). La Frz8-Fc exhibió una administración de eliminación bifásica en ratones desnudos en todas las dosis. Las curvas representan las concentraciones previstas, mientras que los puntos de datos individuales representan la media de los niveles séricos de la proteína de Frz8-Fc de ratones individuales como determinado por ELISA. La Figura 13D es un resumen de los parámetros para un modelo bifásico de farmacocinéticos de Frz8-Fc. Cuando dosificado a 20 mg/kg, sea por una ruta i.p. o i.v., los niveles séricos comparables de proteína fueron alcanzados dentro de un día de inyección y la proteína fue detectable en el suero hasta los 7 días. Después de la dosificación de i.p. a 20 mg/kg, la proteína fue rápidamente absorbida con un $T_{máx}$ de ~8h y una biodisponibilidad (AUC_{IP}/AUC_{IV}) del 92%.

La depuración de la proteína fue de ~25 a 30 mL/d/kg con una vida media de aproximadamente de 4 días.

Ejemplo 5

Afinidad de unión de las moléculas de Frz-Fc

La adición del dominio de FC a los dominios de Frz8(156) resulta en un aumento en la afinidad unión para Wnt3a de más de dos magnitudes. La Figura 14 muestra la habilidad mejorada de Frz8-ECD para bloquear las señales de Wnt3a cuando enlazado a un dominio de Fc dimérico. La figura 14A es un gráfico de IC_{50} de un ensayo de inhibición de Wnt3a de dos diferentes preparaciones de Frz8(156)-Fc. La figura 14B es un gel que confirma la pureza del Frz8(156) CRD (ECD) aislado. Son mostrados: (a) el Frz8(156) DCE (Lane 1) no reducido; (b) los marcadores de peso molecular (Lane 2); y el Frz8 ECD (156) (Lane 3) reducido. Este gel indica que el Frz8 ECD utilizado en el ensayo de unión está intacto y funciona aproximadamente en el peso molecular esperado.

Ejemplo 6

Actividad de unión de las quimeras de Frz-Fc

ELISA

Para la evaluación PK de los antagonistas de Wnt, los pocillos de una placa microtiter ELISA con 384 pocillos (Nunc Maxisorp, Rochester, NY) fueron impregnadas con el Fc anti-humano de conejo (Jackson Immuno Research, Westgrove, PA) a una concentración de 1μg/ml en PBS (25 μg/pocillo). Después de una incubación durante toda la noche a 4 °C, la solución de Fc anti-humano de conejo fue decantada y las placas fueron bloqueadas con 40 μl/pocillo de solución tamponada de bloqueo (PBS conteniendo BSA al 0.5% y 10 ppm de proclin). Después de una incubación de 60 minutos a una temperatura ambiente con agitación suave, las placas impregnadas con Fc anti-humano de conejo fueron lavadas tres veces con solución tamponada de lavado (Tween 20® de PBS al 0.05% y 10 ppm de proclin). Los estándares de Fc-Frizzled (una serie de dilución con un alcance de concentración de 0.78 - 100 ng/ml), y las muestras diluidas en el alcance de ensayos en la solución tamponada de ensayos (PBS conteniendo BSA al 0.5%, Tween 20® al 0.05% y 10 ppm de proclin) fueron añadido a la placa de ensayo (25 μl/pocillo). Después de 120 minutos de incubación a temperatura ambiente con agitación suave, las placas de ensayo fueron lavadas seis veces con solución

tamponada de lavado. El vínculo de Frz-Fc restante fue detectado utilizando IgG-Fc anti-humano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson Immuno Research) diluido en un diluyente del ensayo (25 µl/ pocillo). Después de un apropiado desarrollo de color (10-25 minutos) la reacción enzimática fue detenida con 1M de ácido fosfórico (25 µl/pocillo). Las placas de ensayo fueron leídas a una longitud de onda de 450 nm con una longitud de onda de referencia de 630 nm. Concentraciones de muestras fueron determinadas mediante la comparación de la muestra OD contra el ajuste estándar de curva utilizando un algoritmo de parámetro 4.

BIAcore

La Figura 15 muestra la unión directa mediante Wnt3a a la quimera de Frz8(1-156)-Fc. Esta proteína quimera fue un amino acoplado a un chip de sensor CM5 Biocore™ (BIAcore, Inc. Piscataway, NJ) a aproximadamente 1700 unidades de respuesta, tal como se describe en términos generales en Chen, Y. *et al., J. Mol. Biol.* 293: 865-881 (1999). Concretamente, chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore™ Inc.) fueron activados con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y la *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Una inyección de 1M de etanolamina fue efectuada para bloquear los grupos no reaccionados. La Wnt3a fue entonces inyectada a una concentración estimada de 0.5 µg/ml y la unión fue evaluada por el cambio en unidades de respuesta como una función del tiempo. Se ha detectado que Wnt3a une el Frz8-Fc. Como se muestra en la Figura 15, la asociación de Wnt3a y Frz-Fc resulta en un aumento sumamente significativo de 1000 unidades de respuesta sobre el control de las proteínas (Wnt3a no nativas expresadas en *E. coli*).

OCTET

La capacidad de los antagonistas de Wnt para interactuar con los ligandos Wnt, Wnt3a y Wnt5a fue medida utilizando el sistema OCTET™-QK. (FortéBio, Inc., Menlo Park, CA). Este sistema permite la medición de la unión a proteínas en la superficie de biosensor. Los ensayos fueron conducidos mediante la primera incubación de una de las moléculas antagonistas de Wnt (20 ug/ml) con biosensores específicos de IgG-Fc anti-humano durante 10 minutos en solución tamponada fosfato salino (PBS), con CHAPS al 0.5%. El antagonista independiente de Wnt fue removido mediante el lavado por 1.5 minutos en PBS con CHAPS al 0.5%. La Wnt3a o la Wnt5a

(5.0 ug/mL) fue entonces añadida al ensayo y incubada con las moléculas antagonistas de Wnt vinculado a la superficie del biosensor por 5 minutos en PBS con CHAPS al 0.5%. La interacción entre las moléculas antagonistas de Wnt y el ligando Wnt fue monitoreada en la misma solución tamponada. Todos los pasos del ensayo fueron efectuados a la temperatura ambiente en un volumen de 150 uL. La Figura 16 muestra el resultado de este ensayo de unión con la Figura 16A mostrando los datos de la unión de la Wnt3a a las quimeras de Frz1-Frz10-Fc, la Figura 16B mostrando los datos de la unión de la Wnt3a a las quimeras FRPs-Fc, y la Figura 16C mostrando los datos de la unión de la Wnt5a a las quimeras de Frz1-Frz10-Fc y las quimeras de FRPs-Fc.

El ensayo OCTET™ indica que tanto Wnt3a y Wnt-5ª unen Fz8-Fc, Fz5-Fc y Fz4-Fc lo más rápido, en relación con las demás proteínas Frz, con Wnt3a uniendo Fz1-Fc, Fz2-Fc y Fz7-Fc a un ritmo más lento. La amplitud y la naturaleza lineal de las curvas de unión de Wnt-5a sugieren una menor afinidad de unión en relación con la unión de Wnt3a, según lo determinado por este ensayo de unión. La amplitud de los datos de unión del OCTET™ sugiere que las proteínas FRPs-Fc tienen una afinidad por Wnt3a similar a la observada por Frz1, Frz2 y Frz7, y algo menor que la observada por Frz5 y Frz8.

Ejemplo 7

Inhibición de la señalización de Wnt mediante los antagonistas de Wnt - ensayos celulares

Los ensayos celular fueron realizados utilizando las 293 células (riñón humano) transfectadas con el plásmido reportero TOPglow. En la preparación para la transfección aproximadamente 500.000 HEK293 fueron colocadas en un pocillo de una placa con 12 pocillos (Nuc), 24 horas antes de las transfecciones. Las células fueron transfectadas con 0.375 μg de TOPglow (Upstate, Cat # 21-204), 0.05 mg de LEF1, 0.01 de SV40 RL mg con Fugene (Roche) y a 24 horas de pos-transfección. El medio fue cambiado y las células fueron tratadas o no tratadas con Wnt3a aislado, Wnt-5a aislado, o con un antagonista de Wnt por un período adicional de 20-24 horas antes de la cosecha. Todas las diluciones fueron hechas en medios completos para las líneas celulares indicadas. Las células fueron cosechadas en 50-100 μl de 1XSJC de solución tamponada de lisis (20 mM Tris pH 8.0. 137 mM NaCl, 1 mM de EGTA, 1% de Triton X-100. 10% de

Glicerol, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 50 mM NaF, 1 mM $NaVO_4$ e inhibidores de proteasa) y duplicado 10 µl dónde fueron ensayados utilizando el kit de ensayo luciferasa Dual-Glo™ (Promega, Parte # TM058) y detectados en un Luminómetro Envision (Perkin Elmer). La actividad luciferasa fue normalizada contra la actividad *Renilla*.

Las células a ser tratadas con Wnt5a fueron transfectadas con Frz4 y Lrp5 además de la reportera. La presencia de estos componentes adicionales permite la activación de la vía Wnt mediante Wnt5a para proceder conforme la vía canónica. Mikels AJ, and Nusse R., *PLOS Biol.* 4: e115 (2006). Las células Wnt3a activadas fueron tratadas con 100 ng/ml de Wnt3a y las células Wnt5a activadas fueron tratadas con 1ug/ml de Wnt5a.

Como se muestra en la Figura 17A y B, el antagonista de Frz-Fc inhibió la señalización de Wnt a diversos grados. Ambos Frz5-Fc y Frz8-Fc mostraron una inhibición completa de la señal de Wnt3a e inhibieron significativamente la señal de Wnt5a. Frz4-Fc, Frz2-Fc y Frz7-Fc mostraron una inhibición significativa de la señal de Wnt3a.

Ejemplo 8

IC50s relativas de los antagonistas de Wnt

Las IC50s relativas de los antagonistas de Wnt fueron determinadas mediante la medición de la inhibición de la señalización de Wnt por los antagonistas de Wnt en las células U2OS (osteosarcoma humano) transfectadas establemente con plásmido reportero TOPglow con TCF luciferasa, tal como se describe en el Ejemplo 7. La señalización de Wnt inicial en las células fue obtenida con la activación de Wnt3a. Una serie de 3 diluciones de Frz-Fcs fueron aplicadas a células durante toda la noche (Figura 18). Como determinado por este ensayo, el Wnt3a se une al Frz8-Fc, Frz5-Fc y Frz4-Fc con una IC50 sub-nanomolar (con Frz8-Fc teniendo una IC50 de 0.04 nM, Frz-5-Fc teniendo una IC50 de 0.20 nM, y Frz-4 teniendo una IC50 de 0.48 nM) y al Frz2-Fc y Frz7-Fc con una IC50 nanomolar (con Frz2-Fc teniendo un IC50 de 1.2 nM y Frz2-Fc teniendo un IC50 de 1.4 nM).

Ejemplo 9

Genes diana de Wnt como marcadores farmacodinámicos de respuesta a los fármacos

Como alternativa al análisis inmunohistoquímico de ß-catenina, los genes diana transcripcionales de Wnt fueron utilizados para monitorear la inhibición

de la actividad de señalización de Wnt. Las líneas celulares que tienen una señalización de Wnt autocrina mostraron una mayor expresión de los genes diana de Wnt conocidos y esta expresión fue controlada mediante el tratamiento *in vitro* con Wnt3a así como por Frz8-Fc. El análisis de RNA-2 de las células de NTera-2 indicó que el tratamiento de Frz8-Fc afecta la expresión de los genes diana de Wnt ensayados. Por lo tanto, la expresión de estos genes puede ser entendida como un indicador de la eficacia del tratamiento. Como una extensión de estas observaciones, la expresión de estos genes diana de Wnt puede ser utilizada como una herramienta de diagnóstico para identificar cánceres que son impulsados por la señalización de Wnt y son posibles candidatos para los agentes terapéuticos anti-Wnt.

In vitro

El análisis comparativo de las expresiones génicas in vitro en células PA-1 tratadas con Wnt3a purificado, Fz8-Fc CRD-Fc, o con una proteína de control fue realizado para determinar la idoneidad de los genes diana de Wnt para indicar la inhibición *in vivo* de la señalización de Wnt en células de teratoma. El RNA aislado de las células PA-1 que fueron tratadas con Wnt3a, Frz8-Fc, o con la proteína de control de Fc, fue sometido al análisis de microarreglos y el cambio en los niveles de expresión de los genes indicados en respuesta al Wnt3a, Frz8-Fc, y la proteína de control de Fc exógenamente añadidos, fue determinado. Para el análisis de microarreglos, las células fueron tratadas con las proteínas indicadas por triplicado, y el RNA total fue aislado utilizando el kit RNAeasy (Qiagen). El análisis de arrays fue realizado por el sistema GeneChip de Genoma Humano U133 de Affymetrix (Rubinfeld B, *et al., Nat. Biotechnol* 2006; 24:205-9). Los sondeos específicos y los sets de cebadores son mostrados en la Figura 20.

Los niveles de expresión de las dianas previamente identificadas de la señalización de Wnt, tales como Axin2, APCDD1, y Gad1 fueron reguladas en ascenso mediante tratamiento de Wnt3a o reguladas en descenso mediante tratamiento de Frz8-Fc (Figura 19A). Además, algunos genes como Lefty2 (A), Lefty1 (B), FRPs1, y Fzd5 fueron regulados en descenso mediante Wnt3a y regulados en ascenso mediante la inhibición de la señalización de Wnt con Frz8-Fc (Figura 19A). El análisis subsecuente de la expresión génica mediante qRT-PCR mostró que estas transcripciones fueron igualmente reguladas mediante Wnt3a y Fz8 CRD-Fc en NTera-2, Tera-2, y también por células NCCIT.

In vivo

El APCDD1, el Gad1, y el Fzd5 se encuentran entre los más consistentes genes modulados en los análisis *in vitro* descritos anteriormente y fueron, por consiguiente, seleccionados como marcadores potenciales de reacción de Wnt para los estudios xenotransplantes de tumor *in vivo*.

El RNA de tejido tumoral fue purificado de especímenes de xenotransplantes recolectadas al final del estudio de eficacia y del análisis cuantitativo de transcripción inversa de PCR (qRT-PCR) de las transcripción de reacción de Wnt realizadas como describió anteriormente Rubinfeld B, *et al., Nat. Biotechnol* 2006; 24:205-9). La inducción de plegamiento para cada gen fue determinada utilizando el método $\Delta\Delta$Ct y el resultado presentado en relación a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Los sondeos específicos y los sets de cebadores son mostrados en la Figura 20. Todas las reacciones se realizaron por duplicado y la media de al menos dos ensayos ± SEM fue trazada.

Similar a los efectos observados *in vitro*, el tratamiento con dosis terapéuticas de Frz8-Fc redujo la expresión de genes para APCDD1 y Gad1 y aumentó la expresión de Fzd5 en tumores de los xenotransplantes de NTera-2 (Figura 19B). Aunque existe una regulación en descenso general no especificada de todos los genes que siguieron el tratamiento de CD4hFc, estos cambios no fueron estadísticamente significativos en comparación con aquellos observados en los tumores tratados con Frz8-Fc. Estas observaciones muestran que los efectos antitumorigénicos de Frz8-Fc *in vivo* están en los genes diana y que los niveles de expresión de estos genes pueden ser utilizados para monitorear la eficacia de potenciales agentes terapéuticos anti-Wnt.

Ejemplo 10

Efecto inhibitorio de los antagonistas de Wnt en el cultivo de tumores en ratones con alotransplantes y xenotransplantes humanos

Los estudios expuestos en este Ejemplo indican que los antagonistas de Wnt son útiles en el tratamiento de tumores que expresan Wnt. La más larga regresión completa del tumor en el caso del modelo Wnt-1-MMTV ilustra el efecto de los antagonistas de Wnt en los tumores que son fuertemente impulsados por Wnt. Sin embargo, el efecto significativo de los antagonistas de Wnt en los tumores de PA-1 y NTer2 también refleja el fuerte potencial

terapéutico para el tratamiento de tumores que pueden no ser totalmente impulsados por Wnt.

Animales

Los ratones hembras C57Bl6 (The Jackson Laboratory) fueron utilizados para el pasaje de tumores MMTV-Wnt1. El mantenimiento de ratones y los procedimientos *in vivo* fueron llevados a cabo utilizando protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales.

Modelo de alotransplantes de MMTV-Wnt

La Figura 21 es un esquema lineal que describe el vector del constructo utilizado en la transfección para crear el modelo animal de Wnt. Este constructo imita la activación constitutiva de señalización de Wnt observado con la inserción viral de MMTA, como se describe en Tsujomoto *et al., Cell* 55: 619-625 (1988) y Li *et al. Oncogene* 19: 1002-1009 (2000).

Pasaje de tumores transgénicos de MMTV-Wnt1 en ratones

Los tumores de ratones transgénicos de MMTV-Wnt1 fueron serialmente pasados a ratones C57Bl6 por 6 a 10 pasajes mediante implante quirúrgico en el panículo adiposo mamario. El tejido tumoral fue recolectado de manera aséptica del ratón transgénico, enjuagado en HBSS y cortado en trozos pequeños. Los ratones receptores fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (75-80 mg/kg) y xilacina (7.5-15 mg/kg), el fragmento del tumor insertado bajo la piel rostral al tercer panículo adiposo mamario y la piel cerrada utilizando grapas de sutura. Los tumores fueron pasados por un máximo de 10 pasajes, y después de los dos primeros pasajes, el tejido tumoral fue histológicamente examinado para confirmar que era de origen mamario y que continúa expresando Wnt. Los adenocarcinomas mamarios se desarrollan en 6-12 meses en los ratones. Los tumores aislados de estos ratones fueron utilizados para crear los modelos de trasplante descritos a continuación.

Estudios *in vivo*

Para los estudios *in vivo* que prueban la eficacia de los antagonistas de Wnt en el modelo MMTV-Wnt, las células tumorales fueron introducidas mediante inyección subcutánea de células obtenidas de tejidos tumorales macerados. El tejido tumoral fue asépticamente recolectado de los ratones trasplantados con tumores de ratones transgénicos de Wnt (descrito anteriormente), enjuagados en PBS o HBSS, cortado en trozos más pequeños y macerados

en HBSS utilizando un kit de disociación celular (Sigma). Las células fueron lavadas dos veces en HBSS estéril y sU.S.P.endida en una solución con 50% de matrigel en HBSS. La suspensión celular fue inoculada subcutáneamente en el panículo adiposo mamario de ratones desnudos atímicos, con un volumen no superior a 150 µl/ratón.

Para los estudios *in vivo* que utilizan los modelos animales de NTera2 o PA-1, las células fueron cultivadas tal como se describe y recolectadas cuando el cultivo está en la fase logarítmica. Las células fueron sU.S.P.endidas en una solución con 50% de matrigel en HBSS e inoculadas subcutáneamente en ratones desnudos atímicos a una concentración de 8 millones de células/ratón (NTera2) o 10 millones de células/ratón (PA-1).

Los tumores fueron monitoreados diariamente y medidos después de 7-12 días de inoculación. Los animales fueron separados en grupos con idénticos volúmenes promedios de tumor en el rango de 150-250 mm^3. El tratamiento con el antagonista de Wnt comenzó 1-2 días después de la agrupación y los ratones fueron dosificados por vía intraperitoneal (IP) o vía intravenosa (IV) con 100-200 µl de antagonista de Wnt, proteína de control negativo CD4-Fc, o control de PBS negativo una vez al día. Los tratamientos farmacológicos subsecuentes fueron repetidos 2-3 veces por semana y continuados por 3-4 semanas. El volumen tumoral fue medido dos veces a la semana, los animales fueron sacrificados cuando el volumen tumoral alcanzó 2500 mm^3. La sangre fue recolectada durante el estudio mediante un desangramiento de la vena orbital y el suero ensayado para niveles de agente terapéutico mediante SDS-PAGE seguido por inmunoblot y detección utilizando HRP o conjugados fluorescentes de Fc anti-humano, y para la actividad del agente terapéutico mediante su capacidad para inhibir la activación de Wnt3a de la actividad TOPglow como se describe en el Ejemplo 7.

Tumores de Alotransplante

Efecto inhibitorio de los antagonistas de Wnt en el crecimiento de alotransplante tumoral

El tratamiento con Frz8-Fc ya sea por la vía IP o IV resultó en una rápida regresión del tumor inhibición sostenida durante el curso del tratamiento, mientras que la proteína de control negativo CD4-Fc no tuvo ningún efecto en relación con el tratamiento de PBS. Los ratones tratados fueron monitoreados durante tres semanas después de la terminación del tratamiento y el crecimiento de los tumores fue observado nuevamente.

La Figura 22 ilustra la eficacia de Frz8-Fc contra los transplantes de tumores MMTV-Wnt en ratones desnudos atímicos mediante dosificación intraperitoneal (IP). La Figura 22A es un gráfico que muestra que los ratones desnudos que hospedaban los transplantes de tumores MMTV-Wnt-1 fueron administrados con PBS, CD4-Fc (10 mg/kg/día) o con Frz8-Fc (10 mg/kg/día) mediante inyección intraperitoneal dos veces a la semana. Cada grupo contenía 11 ratones y el volumen tumoral promedio para el grupo era de 226 mm^3 antes del inicio de los tratamientos. El volumen tumoral promedio es trazado sobre el tiempo y los días de tratamiento son indicados por flechas en el eje X. En el día 25, los grupos de control fueron sacrificados y se detuvo la administración de fármacos para el grupo de tratamiento. La Figura 22B es un resumen tabular del volumen tumoral promedio y del porcentaje de cambio promedio en el volumen tumoral sobre el tiempo en los cuatro grupos de tratamiento. Note que en la Figura 22B, el volumen tumoral promedio tras el tratamiento con antagonistas de Frz8-Fc resulta en una reducción del volumen tumoral de 226 mm a aproximadamente 219 mm^3 en el quinto día después del inicio del tratamiento, y cerca de 67 mm^3 en el décimo octavo día. Esto representa un 4% y 70% de reducción, respectivamente, en el tamaño del tumor. En este estudio, los tumores administrados con antagonista de Frz-Fc mostraron una regresión en el tamaño del tumor en comparación con los animales de control. Esto demuestra que los antagonistas de Frz-Fc de la invención son uxoricidas como un agente único y son útiles como terapias contra el cáncer.

Figura 23 ilustra la eficacia de Frz8-Fc contra los transplantes de tumores MMTV-Wnt en ratones desnudos atímicos mediante dosificación intravenosa (IV). La Figura 23A es un gráfico que muestra que los ratones desnudos que hospedaban los transplantes de tumores MMTV-Wnt-1 fueron administrados con PBS, CD4-Fc (10 mg/kg/día) o con Frz8-Fc (10 mg/kg/día) mediante inyección intravenosa tres veces a la semana. Cada grupo contenía 11 ratones y el volumen tumoral promedio para el grupo era de 226 mm^3 antes del inicio de los tratamientos. El cuarto grupo (barra alta) en este estudio incluía 10 ratones con un volumen tumoral promedio de 375 mm^3 al inicio del estudio que fueron tratados con Frz8-Fc (10 mg/kg/día) mediante inyección intravenosa tres veces a la semana. El volumen tumoral promedio es trazado sobre el tiempo y los días de tratamiento son indicados por flechas en el eje X. En el día 25, los animales del grupo de control fueron sacrificados y se detuvo la administración de fármacos para el grupo de tratamiento. La Figura

23B es un resumen tabular del volumen tumoral promedio y del porcentaje de cambio promedio en el volumen tumoral sobre el tiempo en los cuatro grupos de tratamiento. Note que en todos los ratones tratados con Frz-Fc la carga tumoral se redujo de un promedio de 226 mm^3 a un volumen promedio de 179 mm^3 en el cuarto día después de comenzado el tratamiento, y a 73 mm^3 y después del décimo octavo día. Esto representa un 21% y un 67% de reducción, respectivamente, en el volumen tumoral. Para el grupo de la barra alta, el volumen tumoral se redujo de un promedio de 376 mm^3 a 225 mm^3 en el cuarto día de tratamiento, y a 53 mm^3 en el décimo octavo día. Esto representa un 39% y un 86% de reducción, respectivamente, en el volumen tumoral.

Efecto inhibitorio de los sueros obtenidos de ratones tratados en la señalización de Wnt

La inhibición de la señalización de Wnt a partir de los sueros aislados de los ratones tratados es indicada en la Figura 24, con la Figura 24A mostrando los resultados de los sueros aislados a partir de los ratones tratados vía IP, mientras que los tratados vía IV aparecen en la Figura 24B. Los datos son presentados como un gráfico de barras mostrando la actividad antagonista de la señalización de Wnt en el ensayo TOPglow (como se describe en el Ejemplo 7). Las muestras aparecen en grupos de acuerdo con el tratamiento, número de estudio con el ratón y dilución. La actividad luciferasa relativa en el ensayo TOPglow del gen reportero es mostrado en el eje Y. Todas las muestras son tratadas con ~ 40 ng/ml purificado de Wnt3a excepto para NA (control). Todos los demás controles de proteínas están presentes en el medio a 5 μg/ml.

Tumores de Xenotranplante humano

La inhibición de modelos tumorales humanos derivados naturalmente mediante los antagonistas de Wnt podría servir como un indicador adicional de su beneficio en el tratamiento del cáncer humano. Las líneas celulares derivadas de tumores humanos fueron analizadas para pruebas de señalización de Wnt autocrina, similar a la observada en la línea celular de teratoma PA-1, como una indicación del beneficio en el ensayo de la actividad antagonista de Wnt. Las líneas celulares de NTera-2, Tera-2 y NCCIT derivados de teratoma exhibieron señalización de Wnt basal que podría ser inhibido por Frz8-Fc, en contraste con las 293 células que exhibieron baja señalización basal que no fue inhibida por Frz8-Fc (Figura

25A). No obstante, las cuatro líneas celulares de teratoma parecieron expresar receptores de Wnt, ya que la señalización fue además estimulada mediante el tratamiento de Wnt3a, la cual podría ser bloqueada mediante la Frz8-Fc (Figura 25B). Estos resultados indican que las líneas celulares de teratoma expresan Wnt(s), lo que podría contribuir para su tumorigenicidad. Estas líneas fueron, por lo tanto, evaluadas para la formación tumoral en ratones desnudos atímicos y basadas en la consistencia de la formación tumoral, NTera-2 y PA-1 fueron seleccionados para estudios de eficacia *in vivo*.

Efecto inhibitorio de los antagonistas de Wnt en el cultivo de xenotransplantes tumorales de NTera2

El tratamiento de ratones que exhiben xenotransplantes tumorales de NTera2 con el antagonista Frz8-Fc de Wnt resultó en una reducción del volumen tumoral en aproximadamente 50% y la reducción de masa tumoral en aproximadamente 70%, en relación con los ratones de control.

La Figura 26 muestra la eficacia antitumoral del tratamiento con Frz8-Fc en el cultivo de los xenotransplantes tumorales de NTera2 en ratones desnudos atímicos. Los ratones desnudos atímicos que portan xenotransplantes tumorales de NTera2 fueron administrados con una dosis inicial de PBS, CD4-Fc y Frz8-Fc a 15 mg/kg/día, seguido por dosis subsecuentes de 10 mg/kg/día mediante inyección intraperitoneal tres veces por semana. Cada grupo contenía 20 ratones y el volumen tumoral promedio para el grupo era de 200 mm^3 antes del inicio de los tratamientos. El cuarto grupo de estudio incluyó 10 ratones con un volumen tumoral promedio de 336 mm^3 al inicio del estudio que fueron tratados con Frz8-Fc (10 mg/kg/día) mediante inyección intraperitoneal tres veces por semana. La Figura 26A es un ejemplo gráfico de flujo de procedimiento ejemplar, mientras que la figura 26B es un gráfico que traza el volumen tumoral promedio sobre el tiempo, dónde los días de tratamiento son indicados por flechas en el eje X. La Figura 26C es un gráfico de barras que traza los pesos tumorales promedios en el sacrificio de todos los animales en el grupo al día 20 del estudio. Las Figuras 26D y 26E son resúmenes tabulares del volumen tumoral promedio y del porcentaje de cambio promedio en el volumen tumoral, respectivamente.

Efecto inhibitorio de los sueros obtenidos de ratones con xenotransplantes tumorales de NTera2 en la señalización de Wnt

La Figura 27 es un gráfico de barras que muestra actividad antagonista de la señalización de Wnt en el ensayo TOPglow del antagonista Frz8-Fc de Wnt del suero aislado de varios animales en el estudio tumoral de NTera2. La actividad relativa de luciferasa (eje Y) como medida del ensayo TOPglow de los controles y antagonista Frz8-Fc de Wnt. Ningún Wnt purificado adicional o medio condicionado de Wnt fue añadido a las células. Estos resultados demuestran que la señalización de Wnt reducida está asociada con reducción en el tamaño del tumor en estos ratones tratados con el antagonista Frz8-Fc de Wnt.

Efecto inhibitorio de los antagonistas de Wnt en el cultivo de xenotransplantes tumorales de PA-1

El tratamiento de ratones que exhiben xenotransplantes tumorales de PA-1 con el antagonista Frz8-Fc de Wnt resultó en una reducción significativa en el crecimiento tumoral dentro de los 12 días de tratamiento. En este modelo, los tumores eran aproximadamente 50% más pequeños, con masa significativamente menor que los tumores en los ratones de control al final del periodo de tratamiento.

La Figura 28 demuestra la eficacia antitumoral del tratamiento con Frz8-Fc en el cultivo de xenotransplantes tumorales de PA-1 en ratones desnudos atímicos. Los ratones desnudos atímicos que portan los xenotransplantes tumorales de PA-1 fueron administrados con PBS, CD4-Fc o Frz-Fc a 15 mg/kg/día, seguido por dosis subsecuentes de 10 mg/kg/día mediante inyección intraperitoneal tres veces por semana. Cada grupo contenía 13 ratones y el volumen tumoral promedio para el grupo era de 168 mm^3 antes del inicio de los tratamientos. Figura 28A un ejemplo gráfico de flujo de procedimiento ejemplar, mientras que la figura 28B es un gráfico que traza el volumen tumoral promedio sobre el tiempo, dónde los días de tratamiento son indicados por flechas en el eje X. La Figura 28C es un gráfico del peso tumoral promedio en el sacrificio. Los ratones fueron sacrificados en el día 58 después de la inoculación celular (día 32 después del inicio de los tratamientos) y los tumores fueron extirpados y pesados. El peso tumoral promedio ± SEM está trazado como una función del grupo. Las Figuras 28D

y 28E son resúmenes tabulares del volumen tumoral promedio y del porcentaje de cambio promedio en el volumen tumoral, respectivamente.

Ejemplo 11

Señalización de Wnt en ratones trasplantados con tumores MMTV y tratados con antagonistas Frz8-Fc y Frz5-Fc de Wnt

Efecto de los antagonistas Frz8-Fc y Frz5-Fc de Wnt en la señalización de Wnt

La Frz5-Fc inhibe la señalización inducida de Wnt3a tan efectivamente como Frz8-Fc.

Los ratones desnudos atímicos con tumores MMTV (aproximadamente 400-800 milímetros cúbicos en tamaño) fueron tratados con Frz8-Fc, Frz5-Fc o CD4-Fc, como un control negativo, a 10 mg/kg. Cinco horas después del tratamiento, el suero fue recolectado de los ratones mediante punción cardíaca y analizado para el efecto inhibidor de Wnt en 293 células activadas con Wnt3a y transfectadas con TOPglow como se describe en el Ejemplo 7. Todas las muestras son tratadas con ~ 40 ng/ml de Wnt3a purificado excepto para NA (control). Todos los demás controles de proteínas están presentes en el medio a 5 μg/ml. La Figura 29 muestra el nivel de la inhibición en ratones tratados con Frz8-Fc o Frz5-Fc. El tratamiento con Frz8-Fc o Frz5-Fc resultó en niveles similares de inhibición de la señalización de Wnt 3a inducida.

El efecto de los antagonistas Frz8-Fc y Frz5-Fc de Wnt en la expresión de Axin2

Los compuestos Frz8-Fc y Frz5-Fc inhiben la señalización de Wnt *in vivo* como determinado por la modulación del Axin2 de los genes diana de Wnt.

Los ratones desnudos atímicos con tumores MMTV (aproximadamente 400-800 milímetros cúbicos en tamaño) fueron tratados con Frz8-Fc, Frz5-Fc o CD4-Fc, como un control negativo, a 10 mg/kg. Cinco horas después del tratamiento, el suero fue recolectado de los ratones mediante punción cardíaca. El RNA fue extraído de las células tumorales usando el kit de QIAGEN RNAEASY (Qiagen, Valencia, CA) y analizado para la expresión de Axin2 como se describe en el Ejemplo 9. Niveles reducidos de Axin2 fueron observados en las muestras obtenidas de los ratones tratados con Frz8-Fc o Frz5-Fc indicando que estos compuestos son capaces de inhibir la señalización de Wnt *in vivo*. La Figura 30 muestra la expresión reducida de

Axin2 en tumor tratado con Frz8-Fc y Frz5-Fc, con la Figura 30A mostrando la expresión normalizada para la expresión de GAPDH y la Figura 30B mostrando la expresión normalizada para la expresión de rpl19.

Ejemplo 12

Tejido regenerativo tratado con antagonista de Wnt

La señalización de Wnt juega un papel fundamental en la auto-renovación de la regeneración de tejidos tales como piel, intestino y células hematopoyéticas, y la inhibición de la señalización de Wnt mediante Dkk1 puede afectar negativamente a la arquitectura de estos tejidos en ratones adultos. El ejemplo siguiente examina si la exposición a Frz8-Fc bajo las mismas condiciones utilizadas para la obtención de la eficacia antitumoral tiene algún efecto en el intestino y en la piel en los ratones. Los tejidos fueron recolectados de ratones que fueron tratados en el modelo tumoral de MMTV-Wnt1 (que se describe en el Ejemplo 10) después de 14 tratamientos, tres veces a la semana, y las secciones fueron teñidas para proteína ß-catenina mediante inmunohistoquímica. El análisis de la piel y de diversos compartimentos intestinales reveló que la arquitectura de estos tejidos pareció morfológicamente normal en los ratones tratados de todos los grupos, con los patrones típicos de citoplásmico y mancha nuclear de ß-catenina en las células de Paneth en el intestino (Figura 31A) y en los folículos de los pelos de la piel (Figura 31B). Además, el análisis histológico e inmunohistoquímico de la piel y del intestino recolectados de animales que utilizan el modelo de NTera-2, después de nueve tratamientos, tres veces a la semana también revelaron que no hay diferencias entre los grupos de control y de tratamiento. Esto sugiere que el tratamiento con Frz8-Fc con el régimen terapéutico que puede inhibir el crecimiento tumoral no tiene efectos adversos en la renovación del tejido de la piel y del intestino.

Ejemplo 13

Este ejemplo se describe diversos métodos de producción de los antagonistas de Wnt.

Expresión del antagonista de Wnt en *E. coli*

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada del antagonista de Wnt mediante la expresión recombinante en la *E. coli.*

La secuencia de DNA que codifica al antagonista de Wnt es amplificada inicialmente utilizando cebadores PCR seleccionados. Los cebadores deben

contener sitios de enzima de restricción los cuales corresponden a los sitios de enzima de restricción en el vector de expresión seleccionado. Una variedad de vectores de expresión pueden ser empleados. Un ejemplo de un vector adecuado es el pBR322 (derivado de *E. coli*; ver Bolívar *et al.*, Gene, 2:95 (1977)), el cual contiene genes de resistencia a la tetraciclina y ampicilina. El vector es digerido con la enzima de restricción y desfosforilada. Las secuencias amplificadas de PCR en entonces ligadas en el vector. El vector irá preferiblemente incluir secuencias que codifican para un gen de resistencia a los antibióticos, un promotor trp, un líder poli-his (incluyendo los seis primeros codones STII, secuencias de poli-his, sitio de escisión enteroquinasa, la región de codificación del antagonista de Wnt, terminador transcripcional lambda y un gen argU.

La mezcla de ligadura es luego utilizada para transformar una cepa seleccionada de *E. coli* utilizando los métodos descritos en Sambrook *et al.*, supra. Los transformantes son identificados por su capacidad para crecer en las placas de LB y las colonias resistentes a los antibióticos son luego seleccionadas. El DNA plasmídico puede ser aislado y confirmado mediante análisis de restricción y la secuenciación del DNA.

Los clones seleccionados pueden ser crecidos durante la noche en un medio de cultivo líquido tal como un caldo LB suplementado con antibióticos. El cultivo durante la noche puede ser subsecuentemente utilizado para inocular un cultivo de escala más larga. Las células son luego crecidas a una densidad óptica deseada, durante la cual el promotor de expresión está encendido.

Después de cultivar las células durante varias horas más, las células pueden ser recolectadas por centrifugación. El pellet celular obtenido mediante la centrifugación puede ser disuelto utilizando diversos agentes conocidos en el arte, y la proteína disuelta del antagonista de Wnt puede luego ser purificada utilizando una columna de metal quelante bajo condiciones que permiten una firme unión de la proteína.

El antagonista de Wnt puede ser expresado en *E. coli* en una forma etiquetada con poli-his, utilizando el siguiente procedimiento. El antagonista de Wnt de codificación del DNA es inicialmente amplificado utilizando cebadores PCR seleccionados. Los cebadores contendrán sitios de enzimas de restricción que corresponden a los sitios de enzima de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles proporcionando

una iniciación de traducción eficiente y confiable, depuración rápida en una columna de quelación metálica, y eliminación proteolítica con enteroquinasa. Las secuencias etiquetadas de poli-his, PCR-amplificado, son luego ligadas a un vector de expresión, el cual es utilizado para transformar un hospedero de *E. coli* basado en la cepa 52 (W3110 fuhA (tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(laclq). Los transformantes son cultivados primero en LB conteniendo 50 mg/ml de carbenicilina a 30°C con agitación hasta que una O.D.600 de 3-5 es alcanzada. Los cultivos son luego diluidos en 50-100 plegamientos en el medio CRAP (elaborado mediante la mezcla de 3.57 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.71 g de citrato de sodio • 2H2O, 1.07 g de KCl, 5.36 g de extracto de levadura Difco, 5.36 g de Sheffield hycase SF en 500 mL de agua, así como 110 mM de MPOS, pH 7.3, 0.55% (w/v) de glucosa y 7 mM de $MgSO_4$) y crecido por aproximadamente 20-30 horas a 30°C con agitación. Las muestras fueron removidas para comprobar la expresión mediante el análisis de SDS-PAGE, y el bulto del cultivo es centrifugado para el pellet de las células. Los pellets de células están congelados hasta la purificación y renaturalización.

La pasta *E. coli* de 0.5 para 1 L de fermentaciones (6-10 g de pellets) es resU.S.P.endida en 10 volúmenes (w/v) en 7 M de guanidina, 20 mM Tris, solución tamponada de pH 8. El sulfito de sodio sólido y el tetrationato de sodio son añadidos para hacer concentraciones finales de 0.1 M y 0.02 M, respectivamente, y la solución es agitada durante toda la noche a 4°C. Este paso resulta en una proteína desnaturalizada con todos los residuos de cisteína bloqueados mediante sulfitolización. La solución es centrifugada a 40.000 rpm en una Ultracentrifugadora Beckman durante 30 minutos. El sobrenadante es diluído con 3-5 volúmenes de la solución tamponada de la columna de metal quelante (6 M de guanidina, 20 mM Tris, pH 7.4) y filtrado a través de 0.22 filtros de micrones para depurar. El extracto depurado es cargado sobre un 5 ml de una columna de metal quelante Qiagen Ni-NTA equilibrado en una solución tamponada de la columna de metal quelante. La columna es lavada con una solución tamponada adicional conteniendo 50 mM de imidazol (Calbiochem, Utrol grade), pH 7.4. La proteína es eluída con solución tamponada conteniendo 250 mM de imidazol. Las fracciones que contienen la proteína deseada son agrupadas y almacenadas a 4°C. La concentración de proteína es estimada mediante su absorbencia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción calculado con base en su secuencia de aminoácidos.

Las proteínas son replegadas mediante la dilución lenta de la muestra en una solución tamponada de renaturalización recientemente preparado compuesto de: 20 mM Tris, pH 8.6, 0.3 M NaCl, 2.5 M de urea, 5 mM de cisteína, 20 mM de glicina y 1 mM de EDTA. Los volúmenes de renaturalización son elegidos de forma que la concentración final de proteína está entre 50 a 100 microgramos/ml. La solución de renaturalización es agitada suavemente a 4°C por 12-36 horas. La reacción del renaturalización es aplacada mediante la adición de TFA a una concentración final al 0.4% (pH de aproximadamente 3). Antes de una purificación adicional de la proteína, la solución es filtrada a través de un filtro de micrón de 0.22 y el acetonitrilo es añadido al 2-10% de la concentración final. La proteína replegada es cromatografiada una columna de fase reversa Poros R1/H utilizando una solución tamponada móvil al 0.1% de TFA con elución con un gradiente de acetonitrilo del 10 al 80%. Las alícuotas de las fracciones con absorbencia A_{280} son alalizadas en geles de poliacrilamida SDS y fracciones conteniendo proteína replegada homogénea son agrupadas. Generalmente, las especies apropiadamente replegadas de la mayoría de las proteínas son eluídas a menores concentraciones de acetonitrilo ya que estas especies son las más compactas con sus interiores hidrofóbicos protegidos de la interacción con la resina de fase reversa. Las especies agregadas son generalmente eluídas a concentraciones superiores de acetonitrilo. Además de resolver las formas desplegadas de las proteínas de la forma deseada, el paso de la fase reversa también elimina la endotoxina de las muestras.

Las fracciones que contienen el polipéptido plegamiento del antagonista de Wnt son agrupadas y el acetonitrilo eliminado utilizando una corriente suave de nitrógeno direccionada a la solución. Las proteínas que son formuladas en 20 mM de HEPES, pH 6.8 con 0.14 M de cloruro de sodio y manitol al 4% mediante diálisis o por filtración en gel utilizando resinas G25 Superfine (Farmacia) equilibradas en la formulación de la solución tamponada y filtrado estéril.

Expresión del antagonista de Wnt en células de mamíferos

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glicosilada del antagonista de Wnt mediante la expresión recombinante en células de mamíferos.

El vector, pRK5 (véase PE 307.247, publicado el 15 de marzo de 1989), es empleado como el vector de expresión. Opcionalmente, el DNA antagonista

de Wnt es ligado en pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del DNA antagonista de Wnt utilizando métodos de ligadura tales como se describen en Sambrook *et al.*, supra. Para efectos de este ejemplo, el vector resultante es denominado como pRK5-WA.

En una realización, las células hospederas seleccionadas pueden ser las 293 células. Las 293 células humanas (ATCC CCL 1573)son cultivadas para confluir en las placas de cultivo de tejidos en un medio tal como el DMEM suplementado con suero fetal de ternero y, opcionalmente, con componentes nutritivos y/o antibióticos. Aproximadamente 10 μg de DNA de pRK5-WA es mezclado con aproximadamente 1 μg de DNA que codifica el gen VA RNA [Thimmappaya *et al.*, Cell, 31:543 (1982)] y disuelto en 500 μl de 1 mM Tris-HCl, 0.1 mM de EDTA, 0.227 M de $CaCl_2$. A esta mezcla se añade, gota a gota, 500 μl de 50 mM de HEPES (pH 7.35), 280 mM NaCl, 1.5 mM $NaPO_4$, y un sedimiento es permitido para formar durante 10 minutos a 25°C. El sedimiento es sU.S.P.endido y añadido a las 293 células y permitido que se asiente por cerca de cuatro horas a 37°C. El medio de cultivo es aspirado y 2 ml de glicerol al 20% en PBS es añadido por 30 segundos. Las 293 células son luego lavadas con un medio libre de suero, un medio nuevo es añadido y las células son incubadas por cerca de unos 5 días.

Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo es removido y reemplazado por un medio de cultivo (solo) o un medio de cultivo conteniendo 200 μCi/ml de S-cisteína y 200 μCi/ml de ^{35}S-metionina. Después de una incubación de 12 horas, el medio condicionado es recolectado, concentrado en un filtro de espín y cargado sobre un de gel de SDS al 15%. El gel procesado puede ser secado y expuesto a una película por un periodo de tiempo seleccionado para revelar la presencia del polipéptido antagonista de Wnt. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden someterse además a una incubación (en medio libre de suero) y el medio es ensayado en bioensayos seleccionados.

En una técnica alternativa, el antagonista de Wnt puede ser introducido en las 293 células temporalmente utilizando el método de sulfato de dextrano descrito por Somparyrac *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981). Las 293 células son crecidas a la densidad máxima en un frasco de agitación y 700 μg de DNA de pRK5-WA es añadido. Las células son primero concentradas del frasco de agitación mediante centrifugación y lavadas con PBS. El precipitado de DNA con dextrano es incubado en el pellet celular por

cuatro horas. Las células son tratadas con glicerol al 20% por 90 segundos, son lavadas con medio de cultivo de tejidos, y reintroducidas al frasco de agitación conteniendo un medio de cultivo de tejido, 5 μg/ml de insulina bovina y 0.1 μg/ml de transferrina bovina. Después de aproximadamente cuatro días, el medio condicionado es centrifugado y filtrado para remover las células y los desechos. La muestra conteniendo el antagonista de Wnt expresado puede luego ser concentrada y purificada mediante cualquier método seleccionado, tal como por ejemplo la diálisis y/o cromatografía en columna.

En otra realización, el antagonista de Wnt puede ser expresado en células CHO. El pRK5-WA puede ser transfectado en células CHO utilizando reactivos conocidos tales como $CaPO_4$ o DEAE-dextrano. Como se ha descrito anteriormente, los cultivos de células pueden ser incubados, y el medio reemplazado por un medio de cultivo (solo) o un medio conteniendo un marcador radiactivo tal como ^{35}S-metionina. Después de determinar la presencia del polipéptido antagonista de Wnt, el medio de cultivo podrá ser reemplazado por un medio libre de suero. Preferiblemente, las culturas son incubadas por cerca de 6 días, y luego el medio condicionado es recolectado. El medio conteniendo el antagonista de Wnt expresado puede luego ser concentrado y purificado mediante cualquier método seleccionado.

La etiqueta epítope del antagonista de Wnt también puede ser expresada en células CHO hospederas. El antagonista de Wnt puede ser sub-clonado a partir del vector pRK5. El inserto del sub-clone puede sufrir PCR para fusionar en un marco con una etiqueta epítope tal como una etiqueta de poli-his en un vector de expresión del Baculovirus. El inserto de la etiqueta de poli-his del antagonista de Wnt puede luego ser sub-clonado en un vector impulsado por SV40 conteniendo un marcador de selección tal como el DHFR para la selección de clones estable. Finalmente, las células CHO pueden ser transfectadas (según se describe más arriba) con el vector impulsado por SV40. El etiquetado puede ser realizado, según lo descrito anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo conteniendo el antagonista de Wnt expresado etiquetado con poli-his puede ser concentrado y purificado mediante cualquier método seleccionado, tal como por cromatografía de afinidad de Ni^{2+}-quelato.

El antagonista de Wnt también puede ser expresado en CHO y/o células COS mediante un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO mediante otro procedimiento de expresión estable.

La expresión estable en células CHO es realizada utilizando el siguiente procedimiento. Las proteínas son expresadas como un constructo de IgG (immunoadhesina), en el cual las secuencias codificadoras para las formas solubles (por ejemplo, los dominios extracelulares) de las proteínas respectivas son fusionadas a una secuencia IgG1 de región constante conteniendo la bisagra CH2 y dominios de CH2 y/o es una forma etiquetada con poli-his.

Tras la amplificación de PCR, los DNAs respectivos son sub-clonados en un vector de expresión CHO utilizando técnicas estándar tal como se describe en Ausubel *et al.*, Current Protocols of Molecular Biology, Unidad 3.16, John Wiley e Hijos (1997). Los vectores de expresión CHO son construidos para tener sitios de restricción 5' y 3' compatibles del DNA de interés para permitir el transbordo de ADNc's. El vector de expresión utilizado en las células CHO es como se describe en Lucas *et al.*, Nucl. Acids Res. 24:9 (1774-1779 (1996)), y utiliza el promotor/ potenciador tempranos de SV40 para conducir la expresión del ADNc de interés y de la dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido seguido de la transfección.

Doce microgramos del DNA plásmido deseado es introducido en aproximadamente 10 millones de células CHO utilizando reactivos de transfección SUPERFECTt ® disponibles comercialmente (Quiagen), DOSPER® o FUGENE® (Boehringer Mannheim). Las células son cultivadas como se describe en Lucas *et al.*, supra. Aproximadamente células de 3 x 10^7 son congeladas en una ampolla para un crecimiento y producción adicionales, tal como se describe a continuación.

Las ampollas que contienen el DNA plásmido se descongelan mediante colocación en un baño de agua y mezcladas por agitación (vortexing). Los contenidos son pipeteados en un tubo de centrifugadora conteniendo 10 mLs de medio y centrifugado a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante es aspirado y las células son sU.S.P.endidas nuevamente en 10 mL de medio selectivo (0.2 μm de PS20 filtrado con 0.2 μm de suero bovino fetal diafiltrado). Las células son luego alicuotadas en una centrifugadora de 100 mL conteniendo 90 mL de medio selectivo. Después de 1-2 días, las células son transferidas a una centrifugadora de 250 mL llenada con 150 mL de medio de cultivo selectivo y son incubadas a 37°C. Después de otros 2-3 días, centrifugadoras de 250 mL, 500 mL y 2000 mL son sembradas con 3 x 10^5 células/mL. El medio celular es intercambiado con medios nuevos

mediante centrifugación y re-suspensión en el medio de producción. Aunque cualquier medio de CHO adecuado puede ser empleado, un medio de producción descrito en la patente U.S. No. 5,122,469, publicada el 16 de junio de 1992 puede realmente ser utilizado. Una centrifugadora de producción de 3L es sembrada a 1.2 x 10^6 células/mL. En el día 0. el número de células pH es determinado. El día 1, la centrifugadora es muestreada y el rociado con aire filtrado es comenzado. El día 2, la centrifugadora es muestreada, la temperatura cambiada a 33°C, y 30 mL de 500 g/l de glucosa y 0.6 mL de antiespumante al 10% (por ejemplo, emulsión de polidimetilsiloxano emulsión al 35%, Emulsión de Grado Médico 365 de Dow Corning) tomadas. A lo largo de la producción, el pH es ajustado según sea necesario para mantenerla al rededor de 7.2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad se reduzca por debajo del 70%, el cultivo celular es recolectado mediante centrifugación y filtración a través de un filtro de 22 μm. El filtrado fue almacenado a 4°C o inmediatamente cargado en las columnas para purificación.

Para los constructos etiquetados con poli-his, las proteínas son purificadas utilizando una columna de Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, el imidazol es añadido al medio condicionado a una concentración de 5 mM. El medio condicionado es bombeado en una columna de Ni-NTA de 6 ml equilibrada en 20 mM de HEPES, pH 7.4, solución tamponada conteniendo 0.3 M de NaCl y 5 mM de imidazol a una tasa de flujo de 4-5 ml/min a 4°C. Después de la carga, la columna es lavada con una solución tamponada adicional de equilibrio y la proteína eluída con solución tamponada de equilibrado conteniendo 0.25 M de imidazol. La proteína altamente purificada es subsecuentemente desalada en una solución tamponada de almacenamiento conteniendo 10 mM de HEPES, 0.14 M de NaCl y manitol al 4%, pH 6.8, con una columna de 25 mL de Superfine G25 (Farmacia) y almacenada a -80°C.

Los constructos de inmunoadhesina (conteniendo FC)son purificados del medio condicionado de la siguiente manera. El medio condicionado es bombeado en una columna de 5 ml de Proteína A (Farmacia), la cual había sido equilibrada en 20 mM de solución tamponada de fosfato de Na, pH 6.8. Después de la carga, la columna es lavada exhaustivamente con una solución tamponada de equilibrio antes de la elución con 100 mM de ácido cítrico, pH 3.5. La proteína eluída es inmediatamente neutralizada mediante la recolección de fracciones de 1 ml en tubos conteniendo 275 μL de 1 M de

solución tamponada de Tris, pH 9. La proteína altamente purificada es subsecuentemente desalada en una solución tamponada de almacenamiento, tal como se describe anteriormente, para las proteínas etiquetadas con poli-his. La homogeneidad es evaluada mediante geles de poliacrilamida SDS y por la secuenciación de amino ácidos de la terminal-N mediante la degradación de Edman.

Expresión del antagonista de Wnt en Levaduras

El siguiente método siguiente describe la expresión recombinante del antagonista de Wnt en la levadura.

En primer lugar, los vectores de expresión de la levadura son construidos para la producción intracelular o para la secreción del antagonista de Wnt del promotor de ADH2/GAPDH. El DNA que codifica el antagonista de Wnt y el promotor son insertados en sitios de enzima de restricción adecuada en el plásmido seleccionado para direccionar la expresión intracelular del antagonista de Wnt. Para la secreción, el DNA que codifica el antagonista de Wnt puede ser clonado en el plásmido seleccionado, junto con el DNA que codifica el promotor de ADH2/GAPDH, un péptido señal nativo del antagonista de Wnt u otro péptido señal de mamífero, o, por ejemplo, un factor alfa de la levadura o secuencia señal/líder de invertasa secretora, y secuencias enlazadoras (si necesario) para la expresión del antagonista de Wnt.

Las células de levadura, tal como la cepa de levadura AB110. pueden luego ser transformadas con los plásmidos de expresión descritos anteriormente y cultivadas en medios de fermentación seleccionados. Los sobrenadantes transformados de la levadura pueden ser analizados mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10% y separación mediante SDS-PAGE, seguido por la tinción de los geles con tinción azul Coomassie.

El antagonista recombinante de Wnt puede subsecuentemente ser aislado y purificado mediante la remoción de las células de levadura del medio de fermentación mediante centrifugación y luego concentrar el medio utilizando filtros de cartucho seleccionados. El concentrado conteniendo el antagonista de Wnt puede ser además, purificado utilizando resinas de cromatografía de columna seleccionadas.

Expresión de antagonista de Wnt en células de insectos infectadas con Baculovirus

El siguiente método siguiente describe la expresión recombinante del antagonista de Wnt en células de insectos infectadas con Baculovirus.

La secuencia que codifica el antagonista de Wnt es fusionada en flujo ascendente de una etiqueta epítope contenido dentro de un vector de expresión de baculovirus. Tales etiquetas epítopes incluyen etiquetas de poli-his y etiquetas de inmunoglobulina (como las regiones Fc de IgG). Una variedad de plásmidos pueden ser empleados, incluyendo los plásmidos derivados de plásmidos comercialmente disponibles, tales como el pVL1393 (Novagen). En resumen, la secuencia que codifica el antagonista de Wnt antagonista o la parte deseada de la secuencia que codifica el antagonista de Wnt tal como la secuencia que codifica un dominio extracelular de una proteína transmembrana o la secuencia que codifica la proteína madura, si la proteína es extracelular es amplificada mediante PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios de enzima de restricción flanqueados (seleccionados). El producto es luego asimilado con aquellas enzimas de restricción seleccionadas y sub-clonadas en el vector de expresión.

El Baculovirus recombinante es generado mediante la co-transfección del plásmido anterior y del virus de DNA BACULOGOLD™ (Pharmingen) en células *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) utilizando lipofectin (comercialmente disponible de GIBCO-BRL). Después de 4-5 días de incubación a 28°C, los virus liberados son recolectados y utilizados para amplificaciones adicionales. La infección viral y la expresión de la proteína son realizadas según lo descrito por O'Reilley *et al.* Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

El antagonista de Wnt expresado etiquetado con poli-his puede ser luego purificado, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad Ni^{2+}-quelato de la siguiente manera. Los extractos son preparados a partir de las células Sf9 recombinantes infectadas con el virus según lo descrito por Rupert *et al.*, Nature, 362:175-179 (1993). En resumen, las células Sf9 son lavadas, re-sU.S.P.endidas en solución tamponada de sonicación (25 mL de HEPES, pH 7.9; 12.5 mM de $MgCl_2$; 0.1 mM de EDTA; glicerol al 10%, NP-40 al 0.1%, 0.4 M de KCl) y sometido a ultrasonido dos veces durante 20 segundos en el

hielo. Las exposiciones a ultrasonidos son aclaradas mediante centrifugación y el sobrenadante es diluído en 50 pliegues en una solución tamponada de carga (50 mM de fosfato, 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 7.8) y filtrado a través de un filtro de 0.45 μm. Una columna agarosa de Ni^{2+}-NTA (comercialmente disponible de Qiagen) es preparada con un volumen de depósito de 5 mL, lavado con 25 mL de agua y equilibrado con 25 mL de solución tamponada de carga. El extracto filtrado de la célula es cargada a la columna a 0.5 ml por minuto. La columna es lavada para directrices de A_{280} con solución tamponada de carga, al momento en que la recolección de la fracción se inicia. A continuación, la columna es lavada con una solución tamponada de lavado secundario (50 mM de fosfato, 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 6.0), la cual eluye las proteína vinculadas no específicas. Después de alcanzar de nuevo una directriz A_{280}. la columna es desarrollada con un 0 a 500 mM de imidazol gradiente en la solución tamponada de lavado secundario. Un ml de fracciones es recolectado y analizado mediante SDS-PAGE y tinción de plata o mancha de Western con Ni^{2+}-NTA-conjugada para fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen el antagonista de Wnt eluído con His_{10}-etiquetado son agrupados y dializados en contra de la solución tamponada de carga.

Alternativamente, la purificación del antagonista de Wnt de etiquetado con IgG (o etiquetado con Fc) puede ser realizado utilizando técnicas de cromatografía conocida, incluyendo, por ejemplo, cromatografía de columna de proteína A o proteína G.

Purificación de los polipéptidos del antagonista de Wnt utilizando la cromatografía de afinidad

Los polipéptidos nativos o recombinantes del antagonista de Wnt pueden ser purificados mediante una variedad de técnicas estándar en el arte de la purificación de proteínas. Por ejemplo, pro-, maduro, o pre-polipéptido del antagonista de Wnt es purificado mediante cromatografía de inmunoafinidad utilizando anticuerpos específicos para el polipéptido del antagonista de Wnt de interés. Generalmente, una columna de inmunoafinidad es construida mediante el acoplamiento covalentemente del polipéptido del antagonista de Wnt a una resina cromatográfica activada. Alternativamente, el antagonista de Wnt el cual contiene un dominio Fc puede ser purificado directamente a partir del medio utilizando una resina inmovilizada de proteína A tal como la ProSepA (Millipore).

Las inmunoglobulinas policlonales son preparadas a partir de suero inmune, ya sea por la precipitación con sulfato de amonio o por la purificación de Proteínas A inmovilizadas (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Del mismo modo, los anticuerpos monoclonales son preparados a partir del líquido de ascitis de ratón mediante la precipitación de sulfato de amonio o la cromatografía de proteínas A inmovilizadas. La inmunoglobulina parcialmente purificada es covalentemente adjuntada a una resina cromatográfica tal como el CnBr-activado de SEPHAROSE™ (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo es unido a la resina, la resina es bloqueada, y la resina derivada es lavada de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Tal columna de inmunoafinidad puede ser utilizada en la purificación del polipéptido del antagonista de Wnt mediante la preparación de una fracción a partir de células que contienen antagonistas de Wnt en una forma soluble. Esta preparación es derivada mediante la solubilización de la célula entera o de una fracción subcelular obtenida a través de la centrifugación diferencial mediante la adición de detergente o por otros métodos bien conocidos en el arte. Alternativamente, el polipéptido del antagonista de Wnt soluble que contiene una secuencia señal puede ser secretada en una cantidad útil en el medio en el cual las células son cultivadas.

Una preparación conteniendo el polipéptido del antagonista de Wnt soluble es pasado a través de una columna de inmunoafinidad, y la columna es lavada bajo condiciones que permiten la absorción preferencial del polipéptido antagonista de Wnt (por ejemplo, soluciones tamponadas de alta fuerza iónica en presencia del detergente). Luego, la columna es eluída bajo condiciones que perturban la unión del anticuerpo/antagonista de Wnt (por ejemplo, una solución tamponada de pH bajo, tal como el pH de aproximadamente 2-3, o una alta concentración de un caotropo tal como la urea o iones de tiocianato), y el polipéptido del antagonista de Wnt es recolectado.

Bibliografía

1. He TC, Sparks AB, Rago C, *y otros.* Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; **281**: 1509-1512.

2. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; **398**: 422-426

3. He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW. PPAR delta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Cell 1999; **99**: 335-345.

4. Koh TJ, Bulitta CJ, Fleming JV, Dockray GJ, Varro A, Wang TC. Gastrin is a target of the beta-catenin/TCF-4 growth-signaling pathway in a model of intestinal polyposis. *J Clin Invest* 2000; **106**: 533-539.

5. Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, *y otros.* Loss of Apc *in vivo* immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* 2004; **18**: 1385-1390.

6. Chen TA, Yang I, Irby R, *y otros.* Regulation of caspase expression and apoptosis by adenomatous polyposis coli. *Cancer Res* 2003; **63**: 4368-4374.

7. Paoni NF, Feldman MW, Gutierrez LS, Ploplis VA, Castellino FJ. Transcriptional profiling of the transition from normal intestinal epithelia to adenomas and carcinomas in the APC(Min/+) mouse. *Physiol Genomics* 2003; **15**: 228-235.

8. Zhang T, Otevrel T, Gao ZQ, *y otros.* Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res* 2001; **61**: 8664-8667.

9. Howe LR, Subbaramaiah K, Chung WJ, Dannenberg AJ, Brown AMC. Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in Wnt-1-transformed mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1999; **59**: 1572-1577.

10. Mann B, Gelos M, Siedow A, *y otros.* Target genes of beta-catenin-T cell-factor lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 1603-1608

11. Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y, Furukawa Y. Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol Res* 2001; **12**: 469-476.

12. Wielenga VJM, Smits R, Korinek V, *y otros.* Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol* 1999; **154**: 515-523

13. Boon EMJ, van der Neut R, van de Wetering M, Clevers H, Pals ST. Wnt signaling regulates expression of the receptor tyrosine kinase Met in colorectal cancer. *Cancer Res* 2002; **62**: 5126-5128.

14. Kim JS, Crooks H, Dracheva T, *y otros.* Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells. *Cancer Res* 2002; **62**: 2744-2748.

15. Leow CC, Romero MS, Ross S, Polakis P, Gao WQ. Hath1, down-regulated in colon adenocarcinomas, inhibits proliferation and tumorigenesis of colon cancer cells. *Cancer Res* 2004; **64**: 6050-6057.

16. Batlle E, Henderson JT, Beghtel H, *y otros.* Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/EphrinB. *Cell* 2002; **111**: 251-263.

17. Blache P, van de Wetering M, Duluc I, *y otros.* SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J Cell Biol* 2004; **166**: 37-47.

18. Zhang XB, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res* 2001; **61**: 6050-6054.

19. DeAlmeida, VL., Miao L, Ernst JA, Koeppen H., Polakis P., Rubinfeld, B, The soluble Wnt receptor Frizzled8CRD-hFc inhibits the growth of teratocarcinomas in vivo, *Cancer Res* 2007; **67:** 5371-5379.

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de Wnt, que incluye lo siguiente:

(a) un componente del dominio Frizzled, y

(b) un dominio Fc,

donde el componente del dominio Frizzled comprende un polipéptido derivado de una proteína seleccionada del grupo que consiste de (i) una proteína Frizzled (Frz), (ii) una Proteína Relacionada con Frizzled secretada (FRPs), y (iii) una proteína Ror, y

además dónde el antagonista de Wnt es activo *in vivo por al menos* 1 hora.

2. El antagonista de Wnt de la reivindicación 1, dónde el antagonista de Wnt es activo *in vivo por al menos* 5 horas.

3. Un antagonista de Wnt, que incluye:

(a) un componente del dominio Frizzled, y

(b) un dominio Fc,

donde el componente del dominio Frizzled comprende un polipéptido derivado de una proteína seleccionada del grupo que consiste de (i) una proteína Frizzled (Frz), (ii) una proteína Relacionada con Frizzled secretada (FRPs), y (iii) una proteína Ror, y

además dónde el antagonista de Wnt tiene una vida media *in vivo* de al menos 1 día.

4. El antagonista de Wnt de la reivindicación 3, dónde el antagonista de Wnt tiene una vida media *in vivo* de al menos 2 días.

5. El antagonista de Wnt de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el componente del dominio Frizzled comprende un dominio CRD mínimo (ECD) proveniente de un polipéptido Frz seleccionado a partir del grupo que consiste de: Frz1h (ID. SEC. NO: 18), Frz2h (ID. SEC.NO: 19), Frz3h (ID. SEC.NO: 20), Frz4h (ID. SEC.NO: 21), Frz5h (ID. SEC.NO: 22), Frz6h (ID. SEC.NO: 23), Frz7h (ID. SEC.NO: 24), Frz8h (ID. SEC.NO: 25), Frz9h (ID. SEC.NO: 26), y Frz10h (ID. SEC.NO: 27), y variantes activas del mismo.

6. El antagonista de Wnt de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el componente del dominio Frizzled comprende un dominio mínimo CRD (ECD) de un polipéptido FRPs seleccionado a partir del grupo que consiste de FRP1s (ID

SEC NO: 28), FRP2s (ID. SEC. NO: 29), FRP3s (ID SEC NO: 30), FRP4s (ID. SEC.NO: 31), y FRP5s (ID. SEC. NO: 32), y variantes activas del mismo.

7. El antagonista de Wnt de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el componente del dominio Frizzled comprende un dominio CRD (ECD) mínimo de un polipéptido Ror seleccionado a partir del grupo que consiste de Ror1h (ID. SEC. NO: 33), y Ror2h (ID. SEC. NO: 34), y variantes activas del mismo.

8. El antagonista de Wnt de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el componente del dominio Frizzled comprende un polipéptido Frz maduro seleccionado a partir del grupo que consiste de Frz1h (ID. SEC. NO: 50), Frz2h (ID. SEC.NO: 51), Frz3h (ID. SEC. NO: 52), Frz4h (ID. SEC. NO: 53), Frz5h (ID. SEC.NO: 54), Frz6h (ID. SEC.NO: 55), Frz7h (ID. SEC.NO: 56), Frz8h (ID. SEC.NO: 57), Frz9h (ID. SEC.NO: 58), y Frz10h (ID. SEC.NO: 59), y variantes activas del mismo.

9. El antagonista de Wnt de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el componente del dominio Frizzled comprende un polipéptido FRPs maduro seleccionado a partir del grupo que consiste de FRP1s (ID. SEC.NO: 60), FRP2s (ID. SEC.NO: 61), FRP3s (ID. SEC.NO: 62), FRP4s (ID. SEC.NO: 63), y FRP5s (ID. SEC.NO: 64), y variantes activas del mismo.

10. El antagonista de Wnt de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el componente del dominio Frizzled comprende un polipéptido Ror maduro seleccionado a partir del grupo que consiste de Ror1h (ID. SEC. NO: 65), y Ror2h (ID. SEC. NO: 66), y variantes activas del mismo.

11. El antagonista de Wnt de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el componente del dominio Frizzled comprende un polipéptido pro-Frz seleccionado a partir del grupo que consiste de Frz1h (ID. SEC.NO: 35), Frz2h (ID. SEC.NO: 36), Frz3h (ID. SEC.NO: 37), Frz4h (ID. SEC.NO: 38), Frz5h (ID. SEC.NO: 39), Frz6h (ID. SEC.NO: 40), Frz7h (ID. SEC.NO: 41), Frz8h (ID. SEC.NO: 42), Frz9h (ID. SEC.NO: 43), y Frz10h (ID. SEC.NO: 44), y variantes activas del mismo.

12. El antagonista de Wnt de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el componente del dominio Frizzled comprende un polipéptido pro-FRPs seleccionado a partir del grupo que consiste de FRP1s (ID. SEC.NO: 45), FRP2s (ID. SEC.NO: 46), FRP3s (ID. SEC.NO: 47), FRP4s (ID. SEC.NO: 48), y FRP5s (ID. SEC.NO: 49), y variantes activas del mismo.

13. El antagonista de Wnt de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el componente Fc es derivado a partir de una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

14. El antagonista de Wnt de la reivindicación 13, donde el Fc es derivado a partir de una inmunoglobulina IgG1.

15. El antagonista de Wnt reivindicación 14, donde el Fc comprende la secuencia Fc mostrada en la ID. SEC. No: 67 o ID. SEC.NO 68.

16. El antagonista de Wnt de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende además un enlazador que conecta el componente del dominio Frizzled al dominio Fc.

17. El antagonista de Wnt de la reivindicación 16, donde el enlazador comprende un péptido seleccionado a partir del grupo que consiste de ESGGGGVT (ID. SEC.NO: 69), LESGGGGVT (ID. SEC.NO: 70), GRAQVT (ID. SEC. NO: 71), WRAQVT (ID. SEC. NO: 72), y ARGRAQVT (ID. SEC.NO: 73).

18. Un antagonista de Wnt que comprende un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de: Frz8-Fc (ID. SEC.NO: 74), Frz5-Fc (ID. SEC.NO: 75), Frz1-Fc (ID. SEC.NO: 76), Frz2-Fc (ID. SEC.NO: 77), Frz3-Fc (ID. SEC.NO: 78), Frz4-Fc (ID. SEC.NO: 79), Frz6-Fc (ID. SEC.NO: 80), Frz7-Fc (ID. SEC.NO: 81), Frz9-Fc (ID. SEC.NO: 82), Frz10-Fc (ID. SEC.NO: 83), FRP1s-Fc (ID. SEC.NO: 84), FRP2s (ID. SEC.NO: 85), FRP3s-Fc (ID. SEC.NO: 86), FRP4s-Fc (ID. SEC.NO: 87), y FRP5s-Fc (ID. SEC.NO: 88).

19. Una composición que comprende al menos un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable y cualquiera de los antagonistas de Wnt de las reivindicaciones 1-18.

20. Una secuencia de ácido nucléico que codifica cualquiera de los antagonistas de Wnt de las reivindicaciones 1-18.

21. El ácido nucleico de la reivindicación 20 que comprende además un vector que contiene secuencias controles a las cuales el ácido nucleico está operativamente conectado.

22. El vector de la reivindicación 21 que comprendido además en una célula hospedera.

23. La célula hospedera de la reivindicación 22, que se selecciona del grupo que consiste de una célula de mamífero, de insecto, de *E. coli* y de levadura.

24. Un artículo de fabricación que comprende la composición de la reivindicación 19 y un recipiente dónde el antagonista de Wnt está contenido dentro del recipiente y el recipiente comprende además (a) una etiqueta pegada al recipiente, o (b) un prospecto colocado en el interior del recipiente que se refiere al uso del

antagonista de Wnt, indicando el uso de la composición para el tratamiento terapéutico o la detección diagnóstica de un trastorno mediado por Wnt.

25. Un método para inhibir la señalización de Wnt en una célula, que comprende contactar la célula con una cantidad efectiva de cualquiera de los antagonistas de Wnt de las reivindicaciones 1-18.

26. El método de la reivindicación 25, donde la célula está contenida dentro de un mamífero y la cantidad administrada es una cantidad terapéuticamente efectiva.

27. El método de la reivindicación 25, donde la señalización de Wnt resulta de la activación de un componente de señalización de Wnt a través de mutación somática.

28. El método de la reivindicación 25, donde la inhibición de la señalización de Wnt resulta en la inhibición del crecimiento de la célula.

29. El método de la reivindicación 28, donde la célula es una célula cancerosa.

30. Un método de tratar un trastorno mediado por Wnt en un mamífero que padece del mismo, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista de Wnt de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-18.

31. El método de la reivindicación 30. donde la enfermedad es un trastorno proliferativo celular asociado con la actividad de señalización de Wnt aberrante.

32. El método de la reivindicación 31, donde la actividad de señalización de Wnt aberrante resulta del aumento de la expresión de una proteína Wnt.

33. El método de la reivindicación 31, donde el trastorno proliferativo celular es cáncer.

34. El método de la reivindicación 33, donde el cáncer es seleccionado a partir del grupo que consiste de cáncer de colon, cáncer colorrectal, el cáncer de mama, leucemia, gliomas y meduloblastomas.

35. Un método para detectar la presencia de una proteína Wnt, que comprende contactar la muestra con un antagonista de Wnt según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde (a) la presencia de un complejo, o (b) el nivel de unión entre el antagonista Fz/Fc y la proteína Wnt es indicativo de la presencia de una proteína Wnt y/o de señalización de Wnt.

36. El método de la reivindicación 35, donde el método comprende además determinar si el nivel de señalización de Wnt es aberrante, el método comprende además comparar el nivel de unión en la muestra con el nivel en una segunda

muestra, que se conoce que tiene señalización de *Wnt* fisiológicamente normal, donde un nivel de unión en la muestra que es más alto o más bajo que el de la segunda muestra, es indicativo de señalización de *Wnt* aberrante.

37. El método de la reivindicación 36, donde la señalización de Wnt aberrante es además indicativa de la presencia de un trastorno mediado por Wnt.

38. El método de la reivindicación 37, donde el trastorno mediado por Wnt es cáncer.

39. Un método de modular la expresión de un gen diana Wnt en una célula caracterizado por la señalización de Wnt excesiva o activada, que comprende contactar la célula con una cantidad efectiva de un antagonista de Wnt de cualquiera de las reivindicaciones 1-18.

40. Un método de tratar terapéuticamente un cáncer mediado por Wnt, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista de Wnt de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde la administración del antagonista detiene cualquier incremento posterior en el tamaño o el avance en la gravedad del cáncer.

41. El método de la reivindicación 40. donde la administración del antagonista de Wnt resulta en la reducción en el tamaño o la gravedad del cáncer.

42. El método de la reivindicación 40. donde la administración del antagonista de Wnt reduce la carga tumoral del cáncer.

43. El método de la reivindicación 40. donde la administración del antagonista de Wnt mata al cáncer.

44. El uso de un antagonista de Wnt en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular, el antagonista de Wnt, que comprende:

(a) un componente del dominio Frizzled, y

(b) un dominio Fc,

donde el componente del dominio Frizzled comprende un polipéptido derivado de una proteína seleccionada del grupo que consiste de (i) una proteína Frizzled (FRZ), (ii) una Proteína Relacionada con Frizzled secretada (FRPs), y (iii) una proteína Ror, y

además dónde el antagonista de Wnt es activo *in vivo por al menos* 1 hora.

45. El uso de la reivindicación 44, dónde el antagonista de Wnt es activo *in vivo por al menos* 5 horas.

46. El uso de un antagonista de Wnt en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular, el antagonista de Wnt, incluye:

(a) un componente del dominio Frizzled, y

(b) un dominio Fc,

donde el componente del dominio Frizzled comprende un polipéptido derivado de una proteína seleccionada del grupo que consiste de (i) una proteína Frizzled (Frz), (ii) una Proteína Relacionada con Frizzled secretada (FRPs), y (iii) una proteína Ror, y

además dónde el antagonista de Wnt es activo *in vivo por al menos* 1 hora.

47. El uso de la reivindicación 46, dónde el antagonista de Wnt tiene una vida media *in vivo* de al menos 2 días.

48. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 44-47 que comprende además un enlazador que conecta el componente del dominio Frizzled al dominio Fc.

49. El uso de la reivindicación 48, donde el enlazador es un péptido seleccionado a partir del grupo que consiste de ESGGGGVT (ID. SEC.NO: 69), LESGGGGVT (ID. SEC.NO: 70), GRAQVT (ID. SEC.NO: 71), WRAQVT (ID. SEC.NO: 72), y ARGRAQVT (ID. SEC.NO: 73).

50. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 44-49, donde el trastorno proliferativo celular es cáncer.

51. El uso de la reivindicación 50. donde el cáncer es seleccionado a partir del grupo que consiste de cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de mama, leucemia, gliomas y meduloblastomas.

RESUMEN

La presente invención proporciona antagonistas de Wnt quiméricos que comprenden un componente del dominio Frz derivado de una proteína Frizzled, de una proteína relacionada con Frizzled secretada o de la proteína Ror, y un componente Fc de inmunoglobulina, y su uso en el tratamiento y detección diagnóstica de la señalización celular de Wnt y trastornos mediados por Wnt, incluyendo el cáncer.

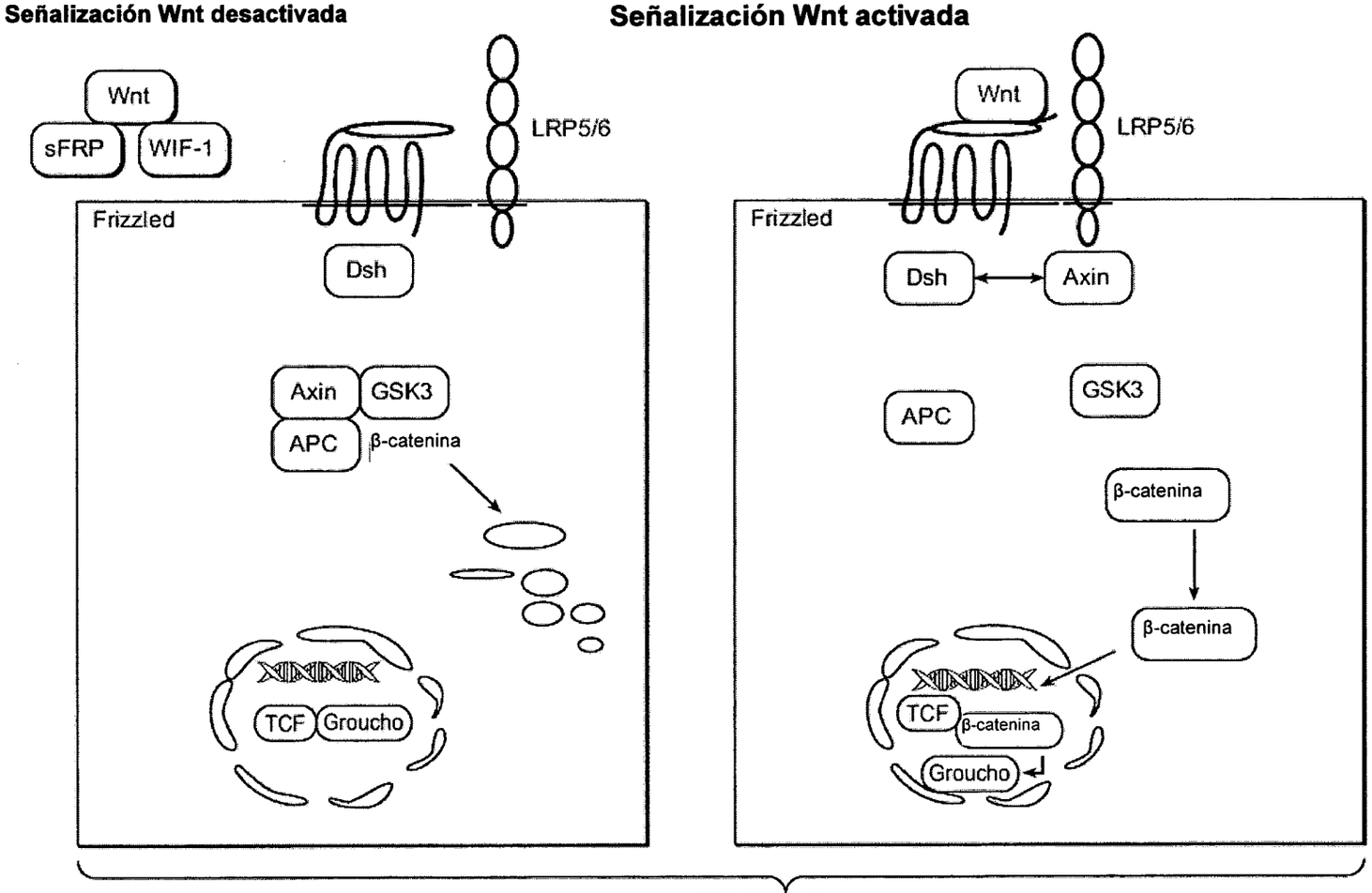

Señalización Wnt desactivada
Señalización Wnt activada
Wnt
sFRP
WIF-1
LRP5/6
Frizzled
Dsh
Axin
GSK3
APC
β-catenina
TCF
Groucho

FIG. 1

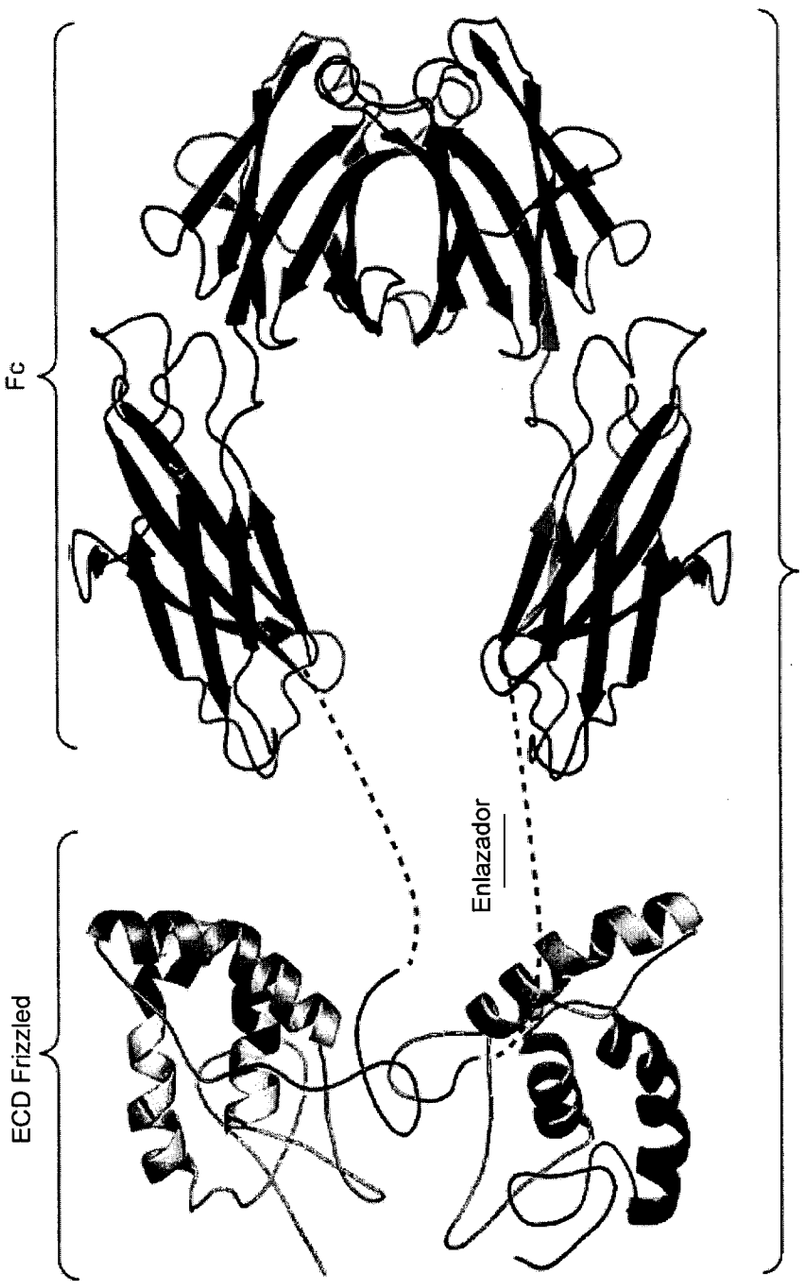


FIG. 2

FIG. 3A-1

FIG. 3A-2

FIG. 3A

FIG. 3A-1

Alineación de los dominios extracelulares de Pro-Frz



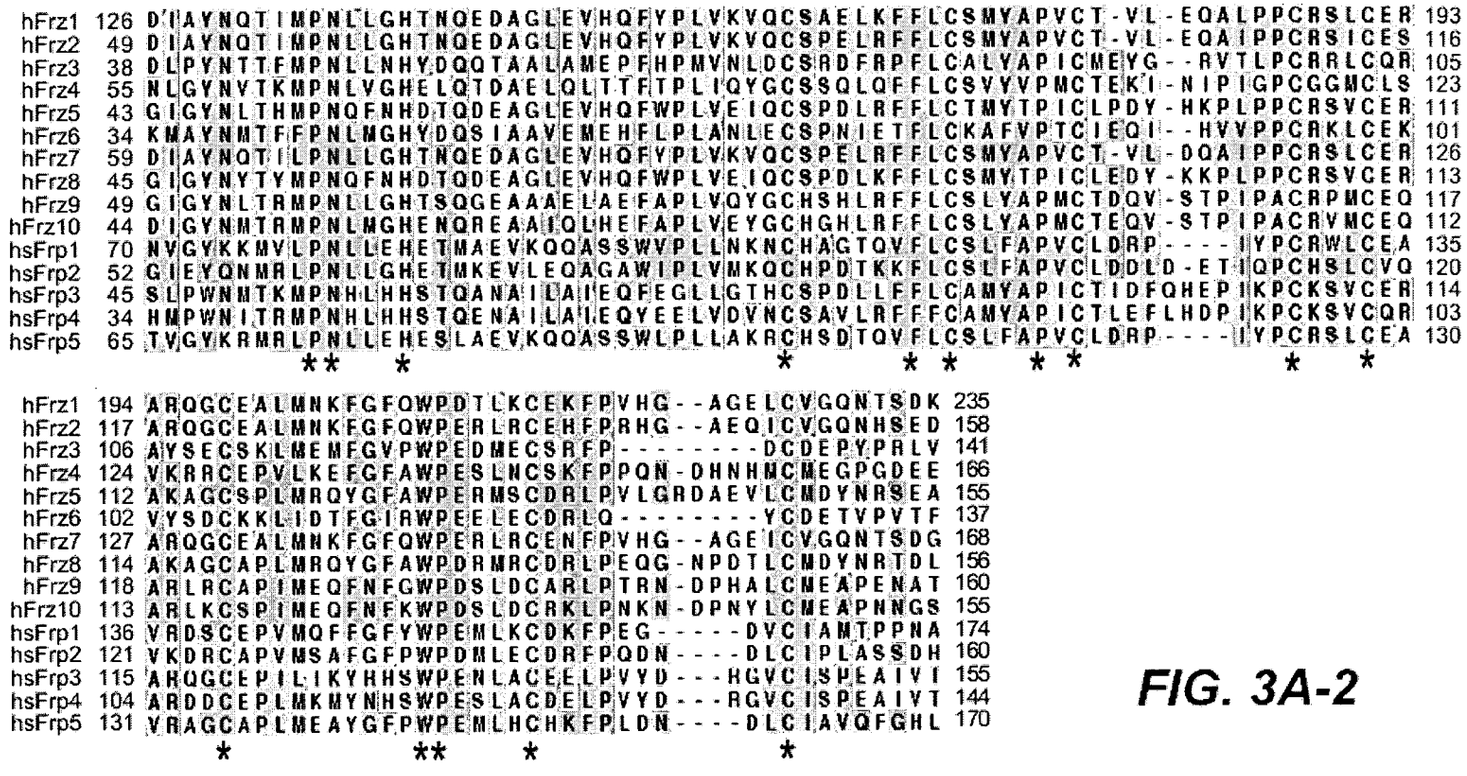


FIG. 3A-2

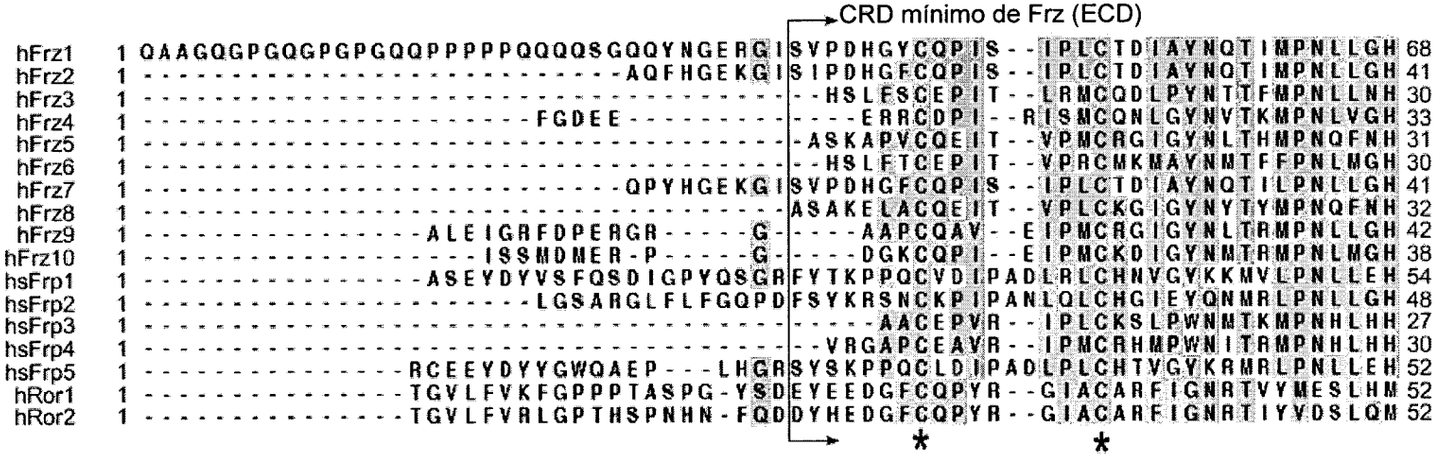
FIG. 3B-1

FIG. 3B-2

FIG. 3B

FIG. 3B-1

Alineación de los dominios extracelulares de Frz madura



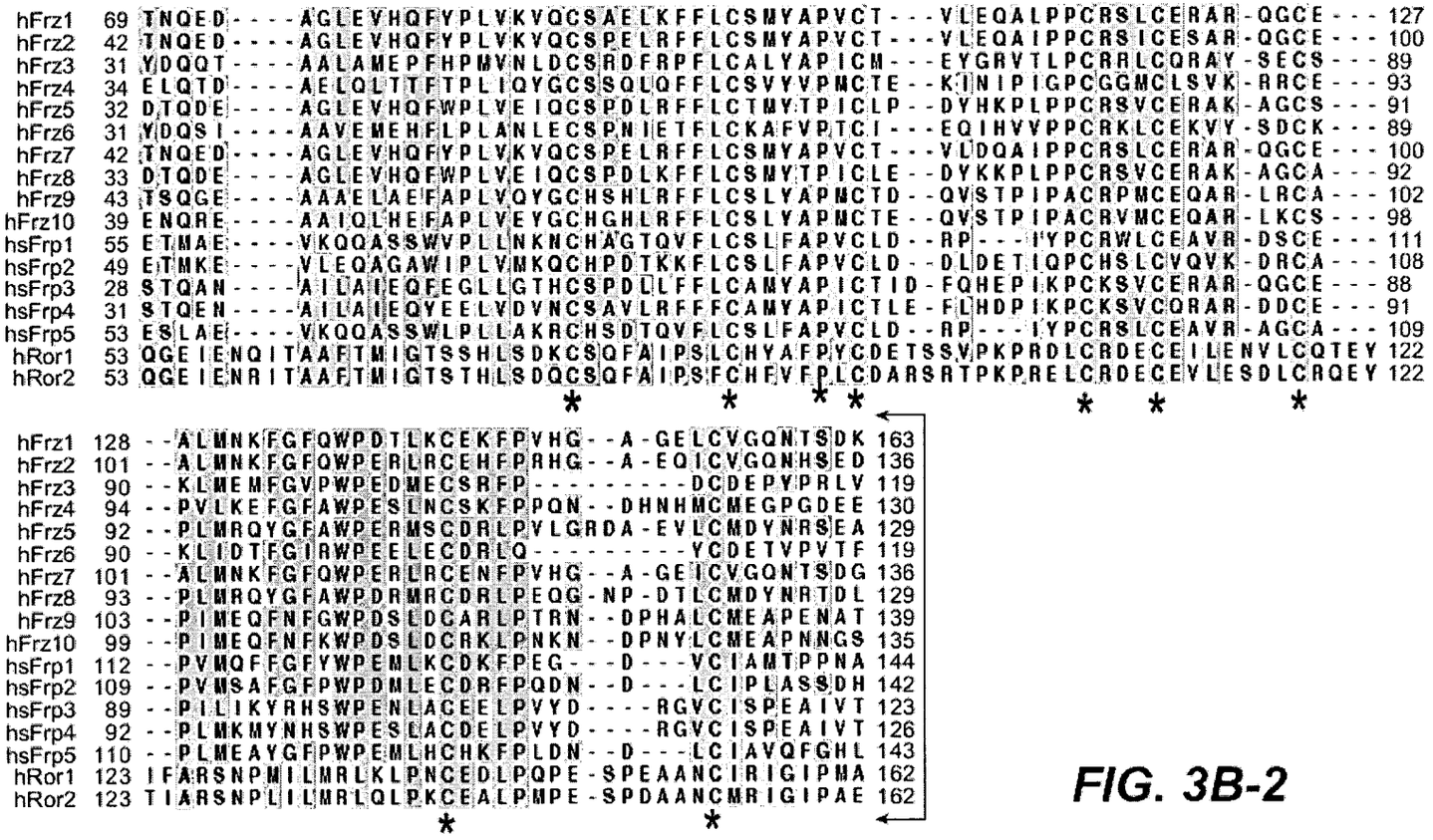

hFrz1 69 TNQED----AGLEVHQFYPLVKVQCSAELKFFLCSMYAPVCT---VLEQALPPCRSLCERAR-QGCE--- 127
hFrz2 42 TNQED----AGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYAPVCT---VLEQAIPPCRSICESAR-QGCE--- 100
hFrz3 31 YDQQT----AALAMEPFHPMVNLDCSRDFRPFLCALYAPICM---EYGRVTLPCRRLCQRAY-SECS--- 89
hFrz4 34 ELQTD----AELQLTTFTPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTE--KINIPIGPCGGMCLSVK-RRCE--- 93
hFrz5 32 DTQDE----AGLEVHQFWPLVEIQCSPDLRFFLCTMYTPICLP--DYHKPLPPCRSVCERAK-AGCS--- 91
hFrz6 31 YDQSI----AAVEMEHFLPLANLECSPNIETFLCKAFVPTCI---EQIHVVPPCRKLCEKVY-SDCK--- 89
hFrz7 42 TNQED----AGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYAPVCT---VLDQAIPPCRSLCERAR-QGCE--- 100
hFrz8 33 DTQDE----AGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSMYTPICLE--DYKKPLPPCRSVCERAK-AGCA--- 92
hFrz9 43 TSQGE----AAAELAEFAPLVQYGCHSHLRFFLCSLYAPMCTD--QVSTPIPACRPMCEQAR-LRCA--- 102
hFrz10 39 ENQRE----AAIQLHEFAPLVEYGCHGHLRFFLCSLYAPMCTE--QVSTPIPACRVMCEQAR-LKCS--- 98
hsFrp1 55 ETMAE----VKQQASSWVPLLNKNCHAGTQVFLCSLFAPVCLD--RP---IYPCRWLCEAVR-DSCE--- 111
hsFrp2 49 ETMKE----VLEQAGAWIPLVMKQCHPDTKKFLCSLFAPVCLD--DLDETIQPCHSLCVQVK-DRCA--- 108
hsFrp3 28 STQAN----AILAIEQFEGLLGTHCSPDLLFFLCAMYAPICTID-FQHEPIKPCKSVCERAR-QGCE--- 88
hsFrp4 31 STQEN----AILAIEQYEELVDVNCSAVLRFFFCAMYAPICTLE-FLHDPIKPCKSVCQRAR-DDCE--- 91
hsFrp5 53 ESLAE----VKQQASSWLPLLAKRCHSDTQVFLCSLFAPVCLD--RP---IYPCRSLCEAVR-AGCA--- 109
hRor1 53 QGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDLCRDECEILENVLCQTEY 122
hRor2 53 QGEIENRITAAFTMIGTSTHLSDQCSQFAIPSFCHFVFPLCDARSRTPKPRELCRDECEVLESDLCRQEY 122
hFrz1 128 --ALMNKFGFQWPDTLKCEKFPVHG--A-GELCVGQNTSDK 163
hFrz2 101 --ALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHG--A-EQICVGQNHSED 136
hFrz3 90 --KLMEMFGVPWPEDMECSRFP----------DCDEPYPRLV 119
hFrz4 94 --PVLKEFGFAWPESLNCSKFPPQN--DHNHMCMEGPGDEE 130
hFrz5 92 --PLMRQYGFAWPERMSCDRLPVLGRDA-EVLCMDYNRSEA 129
hFrz6 90 --KLIDTFGIRWPEELECDRLQ----------YCDETVPVTF 119
hFrz7 101 --ALMNKFGFQWPERLRCENFPVHG--A-GEICVGQNTSDG 136
hFrz8 93 --PLMRQYGFAWPDRMRCDRLPEQG-NP-DTLCMDYNRTDL 129
hFrz9 103 --PIMEQFNFGWPDSLDCARLPTRN--DPHALCMEAPENAT 139
hFrz10 99 --PIMEQFNFKWPDSLDCRKLPNKN--DPNYLCMEAPNNGS 135
hsFrp1 112 --PVMQFFGFYWPEMLKCDKFPEG---D---VCIAMTPPNA 144
hsFrp2 109 --PVMSAFGFPWPDMLECDRFPQDN--D---LCIPLASSDH 142
hsFrp3 89 --PILIKYRHSWPENLACEELPVYD----RGVCISPEAIVT 123
hsFrp4 92 --PLMKMYNHSWPESLACDELPVYD----RGVCISPEAIVT 126
hsFrp5 110 --PLMEAYGFPWPEMLHCHKFPLDN--D---LCIAVQFGHL 143
hRor1 123 IFARSNPMILMRLKLPNCEDLPQPE-SPEAANCIRIGIPMA 162
hRor2 123 TIARSNPLILMRLQLPKCEALPMPE-SPDAANCMRIGIPAE 162

FIG. 3B-2

Constructo Frz (173)-Fc

MEWGYLLEVTSLLAALAVLQRSSGAAAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPN
QFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSV
CERAKAGCAPLMRQYGFAWPDRMRCDRLPEQGNPDTLCMDYNRTDLTTAAPSPPR
RLPPPPPPLESGGGGVT*DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE*
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 4A

Constructo Frz (156)-Fc

MEWGYLLEVTSLLAALAVLQRSSGAAAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPN
QFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSV
CERAKAGCAPLMRQYGFAWPDRMRCDRLPEQGNPDTLCMDYNRTDLESGGGGVT*D*
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

FIG. 4B

Frz1-Fc (identificador de secuencia n.º: 115)

ATGGGGGGGACTGCCGCCAGGTTGGGGGCCGTGATTTTGTTTGTCGTCATAGTGGGCCTCCATGGGGTCCGCGGCAAAATCGATGAGGAGGGCAGCGGGGACGCCGG
TGGCCGCCGCCGCCCGCCAGTTGACCCCCGGCGATTGGCGCGCCAGCTGCTGCTGCTGCTTTGGCTGCTGGAGGCTCCGCTGCTGCTGGGGGTCCGGGCCCAGGCGG
CGGGCCAGGGGCCAGGCCAGGGGCCCGGGCCGGGGCAGCAACCGCCGCCGCCGCCTCAGCAGCAACAGAGCGGGCAGCAGTACAACGGCGAGCGGGGCATCTCCGTC
CCGGACCACGGCTATTGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTGTGCACGGACATCGCGTACAACCAGACCATCATGCCCAACCTGCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGC
GGGCCTGGAGGTGCACCAGTTCTACCCTCTAGTGAAAGTGCAGTGTTCCGCTGAGCTCAAGTTCTTCCTGTGCTCCATGTACGCGCCCGTGTGCACCGTGCTAGAGC
AGGCGCTGCCGCCCTGCCGCTCCCTGTGCGAGCGCGCGCGCCAGGGCTGCGAGGCGCTCATGAACAAGTTCGGCTTCCAGTGGCCAGACACGCTCAAGTGTGAGAAG
TTCCCGGTGCACGGCGCCGGCGAGCTGTGCGTGGGCCAGAACACGTCCGACAAGGCTCGAGGGCGCGCCCAGGTCACCGACAAAGCTGCGCGCTCTACTCTGTGCCC
ACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG
TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC
ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA
AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT
CTCCCTGTCTCCGGGTAAA

Frz2-Fc (identificador de secuencia n.º: 116)

ATGGGGGGGACTGCCGCCAGGTTGGGGGCCGTGATTTTGTTTGTCGTCATAGTGGGCCTCCATGGGGTCCGCGGCAAAATCGATGCTCGAGGGGCCCAGTTCCACGG
GGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTGTGCACGGACATCGCCTACAACCAGACCATCATGCCCAACCTTCTGGGCC
ACACGAACCAGGAGGACGCAGGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTGTGCTCCATGTACGCACCC
GTGTGCACCGTGCTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAGCGCGCGCGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTCAGTGGCCCGA
GCGCCTGCGCTGCGAGCACTTCCCGCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGGCGCGCCCAGGTCACCGACAAAGCTGCGCGCT
CTACTCTGTGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG
GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA
GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG
CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA
CGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA
CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

FIG. 5A

Frz3-Fc (identificador de secuencia n.º: 117)

ATGGGGGGGACTGCCGCCAGGTTGGGGGCCGTGATTTTGTTTGTCGTCATAGTGGGCCTCCATGGGGTCCGCGGCAAAATCGATGCTCGAGGCCACTCCCTGTTCAG
CTGTGAGCCAATCACCCTTCGAATGTGTCAGGATCTGCCTTACAATACCACCTTCATGCCTAATCTGCTCAATCACTACGACCAGCAAACTGCTGCCTTGGCAATGG
AGCCCTTCCACCCTATGGTCAACCTGGACTGTAGCAGGGACTTCCGTCCATTTTTGTGTGCCTTGTATGCACCTATCTGTATGGAGTACGGCCGCGTGACATTGCCT
TGTAGGAGGCTGTGTCAGCGAGCTTACAGTGAGTGCAGCAAACTTATGGAAATGTTTGGCGTCCCCTGGCCAGAAGATATGGAGTGCAGTCGGTTCCCAGACTGTGA
CGAGCCATACCCTAGACTGGTTGATCTCCTCGAGTCAGGAGGAGGAGGAGTCACCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGAC
CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC
AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG
AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG
GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

Frz4-Fc (identificador de secuencia n.º: 118)

ATGGGGGGGACTGCCGCCAGGTTGGGGGCCGTGATTTTGTTTGTCGTCATAGTGGGCCTCCATGGGGTCCGCGGCAAAATCGATGCTCGAGGGTTCGGGGACGAGGA
AGAGCGGCGCTGCGACCCCATCCGCATCTCCATGTGCCAGAACCTCGGCTACAACGTGACCAAGATGCCCAACCTGGTTGGGCACGAGCTGCAGACGGACGCCGAGC
TGCAGCTGACAACTTTCACACCGCTCATCCAGTACGGCTGCTCCAGCCAGCTGCAGTTCTTCCTTTGTTCTGTTTATGTGCCAATGTGCACAGAGAAGATCAACATC
CCCATTGGCCCATGCGGCGGCATGTGTCTTTCAGTCAAGAGACGCTGTGAACCCGTCCTGAAGGAATTTGGATTTGCCTGGCCAGAGAGTCTGAACTGCAGCAAATT
CCCACCACAGAACGACCACAACCACATGTGCATGGAAGGGCCAGGTGATGAAGAGGGGCGCGCCCAGGTCACCGACAAAGCTGCGCGCTCTACTCTGTGCCCACCGT
GCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG
GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA
CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA
TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTA
CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGTAAA

FIG. 5B

Frz5-Fc (identificador de secuencia n.º: 119)

ATGGGGGGGACTGCCGCCAGGTTGGGGGCCGTGATTTTGTTTGTCGTCATAGTGGGCCTCCATGGGGTCCGCGGCAAAATCGATGCTCGAGGGGCGTCCAAGGCCCC
GGTGTGCCAGGAAATCACGGTGCCCATGTGCCGCGGCATCGGCTACAACCTGACGCACATGCCCAACCAGTTCAACCACGACACGCAGGACGAGGCGGGCCTGGAGG
TGCACCAGTTCTGGCCGCTGGTGGAGATCCAATGCTCGCCGGACCTGCGCTTCTTCCTATGCTCTATGTACACGCCCATCTGTCTGCCCGACTACCACAAGCCGCTG
CCGCCCTGCCGCTCGGTGTGCGAGCGCGCCAAGGCCGGCTGCTCGCCGCTGATGCGCCAGTACGGCTTCGCCTGGCCCGAGCGCATGAGCTGCGACCGCCTCCCGGT
GCTGGGCCGCGACGCCGAGGTCCTCTGCATGGATTACAACCGCAGCGAGGCCGGGCGCGCCCAGGTCACCGACAAAGCTGCGCGCTCTACTCTGTGCCCACCGTGCC
CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC
GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG
TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT
CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG
CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAAA

Frz6-Fc (identificador de secuencia n.º: 120)

ATGGAAATGTTTACATTTTTGTTGACGTGTATTTTTCTACCCCTCCTAAGAGGGCACAGTCTCTTCACCTGTGAACCAATTACTGTTCCCAGATGTATGAAAATGGC
CTACAACATGACGTTTTTCCCTAATCTGATGGGTCATTATGACCAGAGTATTGCCGCGGTGGAAATGGAGCATTTTCTTCCTCTCGCAAATCTGGAATGTTCACCAA
ACATTGAAACTTTCCTCTGCAAAGCATTTGTACCAACCTGCATAGAACAAATTCATGTGGTTCCACCTTGTCGTAAACTTTGTGAGAAAGTATATTCTGATTGCAAA
AAATTAATTGACACTTTTGGGATCCGATGGCCTGAGGAGCTTGAATGTGACAGATTACAATACTGTGATGAGACTGTTCCTGTAACTTTTCTCGAGTCAGGAGGAGG
AGGAGTCACCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGA
TCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCA
AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCT
CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

FIG. 5C

Frz7-Fc (identificador de secuencia n.º: 121)

ATGCGGGACCCCGGCGCGGCCGCTCCGCTTTCGTCCCTGGGCCTCTGTGCCCTGGTGCTGGCGCTGCTGGGCGCACTGTCCGCGGGCGCCGGGGCGCAGCCGTACCA
CGGAGAGAAGGGCATCTCCGTGCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTGTGCACGGACATCGCCTACAACCAGACCATCCTGCCCAACCTGCTGG
GCCACACGAACCAAGAGGACGCGGGCCTCGAGGTGCACCAGTTCTACCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGTTCTCCCGAACTCCGCTTTTTCTTATGCTCCATGTATGCG
CCCGTGTGCACCGTGCTCGATCAGGCCATCCCGCCGTGTCGTTCTCTGTGCGAGCGCGCCCGCCAGGGCTGCGAGGCGCTCATGAACAAGTTCGGCTTCCAGTGGCC
CGAGCGGCTGCGCTGCGAGAACTTCCCGGTGCACGGTGCGGGCGAGATCTGCGTGGGCCAGAACACGTCGGACGGCCTCGAGTCAGGAGGAGGAGGAGTCACCGACA
AAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA
GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC
CAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT
ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

Frz8-Fc (identificador de secuencia n.º: 122)

ATGGAGTGGGGTTACCTGTTGGAAGTGACCTCGCTCCTAGCCGCCTTGGCGGTGCTACAGCGCTCTAGCGGCGCTGCCGCGGCTTCGGCCAAGGAGCTGGCGTGCCA
AGAGATCACGGTGCCGTTGTGCAAAGGCATCGGTTACAACTACACTTACATGCCCAACCAGTTCAACCACGACACGCAAGATGAGGCGGGCCTAGAGGTGCACCAGT
TTTGGCCGCTGGTGGAGATACAGTGCTCCCCGGACCTCAAGTTCTTTCTGTGTAGCATGTACACGCCCATCTGCCTGGAGGACTACAAGAAGCCTCTGCCGCCTTGT
CGCTCTGTGTGTGAACGCGCCAAGGCCGGCTGCGCGCCGCTCATGCGCCAGTACGGCTTTGCTTGGCCTGACCGCATGCGCTGCGATCGGTTGCCGGAGCAGGGCAA
CCCGGACACTCTGTGCATGGACTACAACCGCACCGACCTCGAGTCAGGAGGAGGAGGAGTCACCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCC
TGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT
CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC
AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA
CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

FIG. 5D

Frz9-Fc (identificador de secuencia n.º: 123)

ATGGCCGTGGCGCCTCTGCGGGGGGCGCTGCTGCTGTGGCAGCTGCTGGCGGCGGGCGGCGCGGCACTGGAGATCGGCCGCTTCGACCCGGAGCGCGGGCGCGGGGC
TGCGCCGTGCCAGGCGGTGGAGATCCCCATGTGCCGCGGCATCGGCTACAACCTGACCCGCATGCCCAACCTGCTGGGCCACACGTCGCAGGGCGAGGCGGCTGCCG
AGCTAGCGGAGTTCGCGCCGCTGGTGCAGTACGGCTGCCACAGCCACCTGCGCTTCTTCCTGTGCTCGCTCTACGCGCCCATGTGCACCGACCAGGTCTCGACGCCC
ATTCCCGCCTGCCGGCCCATGTGCGAGCAGGCGCGCCTGCGCTGCGCGCCCATCATGGAGCAGTTCAACTTCGGCTGGCCGGACTCGCTCGACTGCGCCCGGCTGCC
CACGCGCAACGACCCGCACGCGCTGTGCATGGAGGCGCCCGAGAACGCCACGCTCGAGTCAGGAGGAGGAGGAGTCACCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCC
CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC
GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG
TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT
CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG
CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAAA

Frz10-Fc (identificador de secuencia n.º: 124)

ATGCAGCGCCCGGGCCCCCGCCTGTGGCTGGTCCTGCAGGTGATGGGCTCGTGCGCCGCCATCAGCTCCATGGACATGGAGCGCCCGGGCGACGGCAAATGCCAGCC
CATCGAGATCCCGATGTGCAAGGACATCGGCTACAACATGACTCGTATGCCCAACCTGATGGGCCACGAGAACCAGCGCGAGGCAGCCATCCAGTTGCACGAGTTCG
CGCCGCTGGTGGAGTACGGCTGCCACGGCCACCTCCGCTTCTTCCTGTGCTCGCTGTACGCGCCGATGTGCACCGAGCAGGTCTCTACCCCCATCCCCGCCTGCCGG
GTCATGTGCGAGCAGGCCCGGCTCAAGTGCTCCCCGATTATGGAGCAGTTCAACTTCAAGTGGCCCGACTCCCTGGACTGCCGGAAACTCCCCAACAAGAACGACCC
CAACTACCTGTGCATGGAGGCGCCCAACAACGGCTCGCTCGAGTCAGGAGGAGGAGGAGTCACCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCC
TGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT
CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC
AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA
CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

FIG. 5E

sFRP1-Fc (identificador de secuencia n.º: 125)

ATGGGCATCGGGCGCAGCGAGGGGGGCCGCCGCGGGGCAGCCCTGGGCGTGCTGCTGGCGCTGGGCGCGGCGCTTCTGGCCGTGGGCTCGGCCAGCGAGTACGACTA
CGTGAGCTTCCAGTCGGACATCGGCCCGTACCAGAGCGGGCGCTTCTACACCAAGCCACCTCAGTGCGTGGACATCCCCGCGGACCTGCGGCTGTGCCACAACGTGG
GCTACAAGAAGATGGTGCTGCCCAACCTGCTGGAGCACGAGACCATGGCGGAGGTGAAGCAGCAGGCCAGCAGCTGGGTGCCCCTGCTCAACAAGAACTGCCACGCC
GGCACCCAGGTCTTCCTCTGCTCGCTCTTCGCGCCCGTCTGCCTGGACCGGCCCATCTACCCGTGTCGCTGGCTCTGCGAGGCCGTGCGCGACTCGTGCGAGCCGGT
CATGCAGTTCTTCGGCTTCTACTGGCCCGAGATGCTTAAGTGTGACAAGTTCCCCGAGGGGGACGTCTGCATCGCCATGACGCCGCCCAATGCCTGGCGCGCCCAGG
TCACCGACAAAGCTGCGCGCTCTACTCTGTGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC
GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

sFRP2-Fc (identificador de secuencia n.º: 126)

ATGCTGCAGGGCCCTGGCTCGCTGCTGCTGCTCTTCCTCGCCTCGCACTGCTGCCTGGGCTCGGCGCGCGGGCTCTTCCTCTTTGGCCAGCCCGACTTCTCCTACAA
GCGCAGCAATTGCAAGCCCATCCCTGCCAACCTGCAGCTGTGCCACGGCATCGAATACCAGAACATGCGGCTGCCCAACCTGCTGGGCCACGAGACCATGAAGGAGG
TGCTGGAGCAGGCCGGCGCTTGGATCCCGCTGGTCATGAAGCAGTGCCACCCGGACACCAAGAAGTTCCTGTGCTCGCTCTTCGCCCCCGTCTGCCTCGATGACCTA
GACGAGACCATCCAGCCATGCCACTCGCTCTGCGTGCAGGTGAAGGACCGCTGCGCCCCCGGTCATGTCCGCCTTCGGCTTCCCCTGGCCCGACATGCTTGAGTGCGA
CCGTTTCCCCCAGGACAACGACCTTTGCATCCCCCTCGCTAGCAGCGACCACTGGCGCGCCCAGGTCACCGACAAAGCTGCGCGCTCTACTCTGTGCCCACCGTGCC
CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC
GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG
TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT
CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG
CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAAA

FIG. 5F

sFRP3-Fc (identificador de secuencia n.º: 127)

ATGGGGGGGACTGCCGCCAGGTTGGGGGCCGTGATTTTGTTTGTCGTCATAGTGGGCCTCCATGGGGTCCGCGGCAAAATCGATGCTCGAGGGGCAGCCTGTGAGCC
CGTCCGCATCCCCCTGTGCAAGTCCCTGCCCTGGAACATGACTAAGATGCCCAACCACCTGCACCACAGCACTCAGGCCAACGCCATCCTGGCCATCGAGCAGTTCG
AAGGTCTGCTGGGCACCCACTGCAGCCCCGATCTGCTCTTCTTCCTCTGTGCCATGTACGCGCCCATCTGCACCATTGACTTCCAGCACGAGCCCATCAAGCCCTGT
AAGTCTGTGTGCGAGCGGGCCCGGCAGGGCTGTGAGCCCATACTCATCAAGTACCGCCACTCGTGGCCGGAGAACCTGGCCTGCGAGGAGCTGCCAGTGTACGACAG
GGGCGTGTGCATCTCTCCCGAGGCCATCGTTACTGGGCGCGCCCAGGTCACCGACAAAGCTGCGCGCTCTACTCTGTGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGG
GGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC
CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC
CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

sFRP4-Fc (identificador de secuencia n.º: 128)

ATGTTCCTCTCCATCCTAGTGGCGCTGTGCCTGTGGCTGCACCTGGCGCTGGGCGTGCGCGGCGCGCCCTGCGAGGCGGTGCGCATCCCTATGTGCCGGCACATGCC
CTGGAACATCACGCGGATGCCCAACCACCTGCACCACAGCACGCAGGAGAACGCCATCCTGGCCATCGAGCAGTACGAGGAGCTGGTGGACGTGAACTGCAGCGCCG
TGCTGCGCTTCTTCTTCTGTGCCATGTACGCGCCCATTTGCACCCTGGAGTTCCTGCACGACCCTATCAAGCCGTGCAAGTCGGTGTGCCAACGCGCGCGCGACGAC
TGCGAGCCCCTCATGAAGATGTACAACCACAGCTGGCCCGAAAGCCTGGCCTGCGACGAGCTGCCTGTCTATGACCGTGGCGTGTGCATTTCGCCTGAAGCCATCGT
CACGCTCGAGTCAGGAGGAGGAGGAGTCACCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAA
AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC
CATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

FIG. 5G

sFRP5-Fc (identificador de secuencia n.º: 129)

ATGCGGGCGGCGGCGGCGGCGGGGGGGCGTGCGGACGGCCGCGCTGGCGCTGCTGCTGGGGGCGCTGCACTGGGCGCCGGCGCGCTGCGAGGAGTACGACTACTATGG
CTGGCAGGCCGAGCCGCTGCACGGCCGCTCCTACTCCAAGCCGCCGCAGTGCCTTGACATCCCTGCCGACCTGCCGCTCTGCCACACGGTGGGCTACAAGCGCATGC
GGCTGCCCAACCTGCTGGAGCACGAGAGCCTGGCCGAAGTGAAGCAGCAGGCGAGCAGCTGGCTGCCGCTGCTGGCCAAGCGCTGCCACTCGGATACGCAGGTCTTC
CTGTGCTCGCTCTTTGCGCCCGTCTGTCTCGACCGGCCCATCTACCCGTGCCGCTCGCTGTGCGAGGCCGTGCGCGCCGGCTGCGCGCCGCTCATGGAGGCCTACGG
CTTCCCCTGGCCTGAGATGCTGCACTGCCACAAGTTCCCCCTGGACAACGACCTCTGCATCGCCGTGCAGTTCGGGCACCTGTGGCGCGCCCAGGTCACCGACAAAG
CTGCGCGCTCTACTCTGTGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG
CCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAG
GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT
GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

FIG. 5H

Frizzled 1 (NP_003496) (identificador de secuencia n.º: 1)

MAEEEAPKKSRAAGGGASWELCAGALSARLAEEGSGDAGGRRRPPVDPRRLARQLLLLLWLLEAPLLLGVRAQAAGQGPGQGPGPGQQPPPPPQQQQSGQQYNGERG
ISVPDHGYCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSAELKFFLCSMYAPVCTVLEQALPPCRSLCERARQGCEALMNKFGFQWPDTLK
CEKFPVHGAGELCVGQNTSDKGTPTPSLLPEFWTSNPQHGGGGHRGGFPGGAGASERGKFSCPRALKVPSYLNYHFLGEKDCGAPCEPTKVYGLMYFGPEELRFSRT
WIGIWSVLCCASTLFTVLTYLVDMRRFSYPERPIIFLSGCYTAVAVAYIAGFLLEDRVVCNDKFAEDGARTVAQGTKKEGCTILFMMLYFFSMASSIWWVILSLTWF
LAAGMKWGHEAIEANSQYFHLAAWAVPAIKTITILALGQVDGDVLSGVCFVGLNNVDALRGFVLAPLFVYLFIGTSFLLAGFVSLFRIRTIMKHDGTKTEKLEKLMV
RIGVFSVLYTVPATIVIACYFYEQAFRDQWERSWVAQSCKSYAIPCPHLQAGGGAPPHPPMSPDFTVFMIKYLMTLIVGITSGFWIWSGKTLNSWRKFYTRLTNSKQ
GETT

Frizzled 2 (NP_001457) (identificador de secuencia n.º: 2)

MRPRSALPRLLLPLLLLPAAGPAQFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYAPVCTVLEQAI
PPCRSICESARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEDGAPALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPPRYATLEHPFHCPRVLKVPSYLSYK
FLGERDCAAPCEPARPDGSMFFSQEETRFARLWILTWSVLCCASTFFTVTTYLVDMQRFRYPERPIIFLSGCYTMVSVAYIAGFVLQERVVCNERFSEDGYRTVVQG
TKKEGCTILFMMLYFFSMASSIWWVILSLTWFLAAGMKWGHEAIEANSQYFHLAAWAVPAVKTITILAMGQIDGDLLSGVCFVGLNSLDPLRGFVLAPLFVYLFIGT
SFLLAGFVSLFRIRTIMKHDGTKTEKLERLMVRIGVFSVLYTVPATIVIACYFYEQAFREHWERSWVSQHCKSLAIPCPAHYTPRMSPDFTVYMIKYLMTLIVGITS
GFWIWSGKTLHSWRKFYTRLTNSRHGETTV

Frizzled 3 (NP_059108) (identificador de secuencia n.º: 3)

MAMTWIVFSLWPLTVFMGHIGGHSLFSCEPITLRMCQDLPYNTTFMPNLLNHYDQQTAALAMEPFHPMVNLDCSRDFRPFLCALYAPICMEYGRVTLPCRRLCQRAY
SECSKLMEMFGVPWPEDMECSRFPDCDEPYPRLVDLNLAGEPTEGAPVAVQRDYGFWCPRELKIDPDLGYSFLHVRDCSPPCPNMYFRREELSFARYFIGLISIICL
SATLFTFLTFLIDVTRFRYPERPIIFYAVCYMMVSLIFFIGFLLEDRVACNASIPAQYKASTVTQGSHNKACTMLFMILYFFTMAGSVWWVILTITWFLAAVPKWGS
EAIEKKALLFHASAWGIPGTLTIILLAMNKIEGDNISGVCFVGLYDVDALRYFVLAPLCLYVVVGVSLLLAGIISLNRVRIEIPLEKENQDKLVKFMIRIGVFSILY
LVPLLVVIGCYFYEQAYRGIWETTWIQERCREYHIPCPYQVTQMSRPDLILFLMKYLMALIVGIPSVFWVGSKKTCFEWASFFHGRRKKEIVNESRQVLQEPDFAQS
LLRDPNTPIIRKSRGTSTQGTSTHASSTQLAMVDDQRSKAGSIHSKVSSYHGSLHRSRDGRYTPCSYRGMEERLPHGSMSRLTDHSRHSSSHRLNEQSRHSSIRDLS
NNPMTHITHGTSMNRVIEEDGTSA

Frizzled 4 (NP_036325) (identificador de secuencia n.º: 4)

MAWRGAGPSVPGAPGGVGLSLGLLLQLLLLLGPARGFGDEEERRCDPIRISMCQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDAELQLTTFTPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCT
EKINIPIGPCGGMCLSVKRRCEPVLKEFGFAWPESLNCSKFPPQNDHNHMCMEGPGDEEVPLPHKTPIQPGEECHSVGTNSDQYIWVKRSLNCVLKCGYDAGLYSRS
AKEFTDIWMAVWASLCFISTAFTVLTFLIDSSRFSYPERPIIFLSMCYNIYSIAYIVRLTVGRERISCDFEEAAEPVLIQEGLKNTGCAIIFLLMYFFGMASSIWWV
ILTLTWFLAAGLKWGHEAIEMHSSYFHIAAWAIPAVKTIVILIMRLVDADELTGLCYVGNQNLDALTGFVVAPLFTYLVIGTLFIAAGLVALFKIRSNLQKDGTKTD
KLERLMVKIGVFSVLYTVPATCVIACYFYEISNWALFRYSADDSNMAVEMLKIFMSLLVGITSGMWIWSAKTLHTWQKCSNRLVNSGKVKREKRGNGWVKPGKGSET
VV

FIG. 6A

Frizzled 5 (NP_003459) (identificador de secuencia n.º: 5)

MARPDPSAPPSLLLLLLAQLVGRAAAASKAPVCQEITVPMCRGIGYNLTHMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLRFFLCSMYTPICLPDYHKPLPPCRS
VCERAKAGCSPLMRQYGFAWPERMSCDRLPVLGRDAEVLCMDYNRSEATTAPPRPFPAKPTLPGPPGAPASGGECPAGGPFVCKCREPFVPILKESHPLYNKVRTGQ
VPNCAVPCYQPSFSADERTFATFWIGLWSVLCFISTSTTVATFLIDMERFRYPERPIIFLSACYLCVSLGFLVRLVVGHASVACSREHNHIHYETTGPALCTIVFLL
VYFFGMASSIWWVILSLTWFLAAGMKWGNEAIAGYAQYFHLAAWLIPSVKSITALALSSVDGDPVAGICYVGNQNLNSLRGFVLGPLVLYLLVGTLFLLAGFVSLFR
IRSVIKQGGTKTDKLEKLMIRIGIFTLLYTVPASIVVACYLYEQHYRESWEAALTCACPGHDTGQPRAKPEYWVLMLKYFMCLVVGITSGVWIWSGKTVESWRRFTS
RCCCRPRRGHKSGGAMAAGDYPEASAALTGRTGPPGPAATYHKQVSLSHV

Frizzled 6 (NP_003497) (identificador de secuencia n.º: 6)

MEMFTFLLTCIFLPLLRGHSLFTCEPITVPRCMKMAYNMTFFPNLMGHYDQSIAAVEMEHFLPLANLECSPNIETFLCKAFVPTCIEQIHVVPPCRKLCEKVYSDCK
KLIDTFGIRWPEELECDRLQYCDETVPVTFDPHTEFLGPQKKTEQVQRDIGFWCPRHLKTSGGQGYKFLGIDQCAPPCPNMYFKSDELEFAKSFIGTVSIFCLCATL
FTFLTFLIDVRRFRYPERPIIYYSVCYSIVSLMYFIGFLLGDSTACNKADEKLELGDTVVLGSQNKACTVLFMLLYFFTMAGTVWWVILTITWFLAAGRKWSCEAIE
QKAVWFHAVAWGTPGFLTVMLLAMNKVEGDNISGVCFVGLYDLDASRYFVLLPLCLCVFVGLSLLLAGIISLNHVRQVIQHDGRNQEKLKKFMIRIGVFSGLYLVPL
VTLLGCYVYEQVNRITWEITWVSDHCRQYHIPCPYQAKAKARPELALFMIKYLMTLIVGISAVFWVGSKKTCTEWAGFFKRNRKRDPISESRRVLQESCEFFLKHNS
KVKHKKKHYKPSSHKLKVISKSMGTSTGATANHGTSAVAITSHDYLGQETLTEIQTSPETSMREVKADGASTPRLREQDCGEPASPAASISRLSGEQVDGKGQAGSV
SESARSEGRISPKSDITDTGLAQSNNLQVPSSSEPSSLKGSTSLLVHPVSGVRKEQGGGCHSDT

Frizzled 7 (NP_003498) (identificador de secuencia n.º: 7)

MRDPGAAAPLSSLGLCALVLALLGALSAGAGAQPYHGEKGISVPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTILPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYA
PVCTVLDQAIPPCRSLCERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCENFPVHGAGEICVGQNTSDGSGGPGGGPTAYPTAPYLPDLPFTALPPGASDGRGRPAFPFSCPRQL
KVPPYLGYRFLGERDCGAPCEPGRANGLMYFKEEERRFARLWVGVWSVLCCASTLFTVLTYLVDMRRFSYPERPIIFLSGCYFMVAVAHVAGFLLEDRAVCVERFSD
DGYRTVAQGTKKEGCTILFMVLYFFGMASSIWWVILSLTWFLAAGMKWGHEAIEANSQYFHLAAWAVPAVKTITILAMGQVDGDLLSGVCYVGLSSVDALRGFVLAP
LFVYLFIGTSFLLAGFVSLFRIRTIMKHDGTKTEKLEKLMVRIGVFSVLYTVPATIVLACYFYEQAFREHWERTWLLQTCKSYAVPCPPGHFPPMSPDFTVFMIKYL
MTMIVGITTGFWIWSGKTLQSWRRFYHRLSHSSKGETAV

Frizzled 8 (NP_114072) (identificador de secuencia n.º: 8)

MEWGYLLEVTSLLAALALLQRSSGAAAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPC
RSVCERAKAGCAPLMRQYGFAWPDRMRCDRLPEQGNPDTLCMDYNRTDLTTAAPSPPRRLPPPPPGEQPPSGSGHGRPPGARPPHRGGGRGGGGGDAAAPPARGGGG
GGKARPPGGGAAPCEPGCQCRAPMVSVSSERHPLYNRVKTGQIANCALPCHNPFFSQDERAFTVFWIGLWSVLCFVSTFATVSTFLIDMERFKYPERPIIFLSACYL
FVSVGYLVRLVAGHEKVACSGGAPGAGGAGGAGGAAAGAGAAGAGAGGPGGRGEYEELGAVEQHVRYETTGPALCTVVFLLVYFFGMASSIWWVILSLTWFLAAGMK
WGNEAIAGYSQYFHLAAWLVPSVKSIAVLALSSVDGDPVAGICYVGNQSLDNLRGFVLAPLVIYLFIGTMFLLAGFVSLFRIRSVIKQQDGPTKTHKLEKLMIRLGL
FTVLYTVPAAVVVACLFYEQHNRPRWEATHNCPCLRDLQPDQARRPDYAVFMLKYFMCLVVGITSGVWVWSGKTLESWRSLCTRCCWASKGAAVGGGAGATAAGGGG
GPGGGGGGGPGGGGGPGGGGGSLYSDVSTGLTWRSGTASSVSYPKQMPLSQV

FIG. 6B

Frizzled 9 (NP_003499) (identificador de secuencia n.º: 9)

MAVAPLRGALLLWQLLAAGGAALEIGRFDPERGRGAAPCQAVEIPMCRGIGYNLTRMPNLLGHTSQGEAAAELAEFAPLVQYGCHSHLRFFLCSLYAPMCTDQVSTP
IPACRPMCEQARLRCAPIMEQFNFGWPDSLDCARLPTRNDPHALCMEAPENATAGPAEPHKGLGMLPVAPRPARPPGDLGPGAGGSGTCENPEKFQYVEKSRSCAPR
CGPGVEVFWSRRDKDFALVWMAVWSALCFFSTAFTVLTFLLEPHRFQYPERPIIFLSMCYNVYSLAFLIRAVAGAQSVACDQEAGALYVIQEGLENTGCTLVFLLLY
YFGMASSLWWVVLTLTWFLAAGKKWGHEAIEAHGSYFHMAAWGLPALKTIVILTLRKVAGDELTGLCYVASTDAAALTGFVLVPLSGYLVLGSSFLLTGFVALFHIR
KIMKTGGTNTEKLEKLMVKIGVFSILYTVPATCVIVCYVYERLNMDFWRLRATEQPCAAAAGPGGRRDCSLPGGSVPTVAVFMLKIFMSLVVGITSGVWVWSSKTFQ
TWQSLCYRKIAAGRARAKACRAPGSYGRGTHCHYKAPTVVLHMTKTDPSLENPTHL

Frizzled 10 (NP_009128) (identificador de secuencia n.º: 10)

MQRPGPRLWLVLQVMGSCAAISSMDMERPGDGKCQPIEIPMCKDIGYNMTRMPNLMGHENQREAAIQLHEFAPLVEYGCHGHLRFFLCSLYAPMCTEQVSTPIPACR
VMCEQARLKCSPIMEQFNFKWPDSLDCRKLPNKNDPNYLCMEAPNNGSDEPTRGSGLFPPLFRPQRPHSAQEHPLKDGGPGRGGCDNPGKFHHVEKSASCAPLCTPG
VDVYWSREDKRFAVVWLAIWAVLCFFSSAFTVLTFLIDPARFRYPERPIIFLSMCYCVYSVGYLIRLFAGAESIACDRDSGQLYVIQEGLESTGCTLVFLVLYYFGM
ASSLWWVVLTLTWFLAAGKKWGHEAIEANSSYFHLAAWAIPAVKTILILVMRRVAGDELTGVCYVGSMDVNALTGFVLIPLACYLVIGTSFILSGFVALFHIRRVMK
TGGENTDKLEKLMVRIGLFSVLYTVPATCVIACYFYERLNMDYWKILAAQHKCKMNNQTKTLDCLMAASIPAVEIFMVKIFMLLVVGITSGMWIWTSKTLQSWQQVC
SRRLKKKSRRKPASVITSGGIYKKAQHPQKTHHGKYEIPAQSPTCV

sFrp1 (NP_003003) (identificador de secuencia n.º: 11)

MGIGRSEGGRRGAALGVLLALGAALLAVGSASEYDYVSFQSDIGPYQSGRFYTKPPQCVDIPADLRLCHNVGYKKMVLPNLLEHETMAEVKQQASSWVPLLNKNCHA
GTQVFLCSLFAPVCLDRPIYPCRWLCEAVRDSCEPVMQFFGFYWPEMLKCDKFPEGDVCIAMTPPNATEASKPQGTTVCPPCDNELKSEAIIEHLCASEFALRMKIK
EVKKENGDKKIVPKKKKPLKLGPIKKKDLKKLVLYLKNGADCPCHQLDNLSHHFLIMGRKVKSQYLLTAIHKWDKKNKEFKNFMKKMKNHECPTFQSVFK

sFrp2 (NP_003004) (identificador de secuencia n.º: 12)

MLQGPGSLLLLFLASHCCLGSARGLFLFGQPDFSYKRSNCKPIPANLQLCHGIEYQNMRLPNLLGHETMKEVLEQAGAWIPLVMKQCHPDTKKFLCSLFAPVCLDDL
DETIQPCHSLCVQVKDRCAPVMSAFGFPWPDMLECDRFPQDNDLCIPLASSDHLLPATEEAPKVCEACKNKNDDDNDIMETLCKNDFALKIKVKEITYINRDTKIIL
ETKSKTIYKLNGVSERDLKKSVLWLKDSLQCTCEEMNDINAPYLVMGQKQGGELVITSVKRWQKGQREFKRISRSIRKLQC

FIG. 6C

sFrp3 (FRZB) (NP_001454) (identificador de secuencia n.º: 13)

MVCGSPGGMLLLRAGLLALAALCLLRVPGARAAACEPVRIPLCKSLPWNMTKMPNHLHHSTQANAILAIEQFEGLLGTHCSPDLLFFLCAMYAPICTIDFQHEPIKP
CKSVCERARQGCEPILIKYRHSWPENLACEELPVYDRGVCISPEAIVTADGADFPMDSSNGNCRGASSERCKCKPIRATQKTYFRNNYNYVIRAKVKEIKTKCHDVT
AVVEVKEILKSSLVNIPRDTVNLYTSSGCLCPPLNVNEEYIIMGYEDEERSRLLLVEGSIAEKWKDRLGKKVKRWDMKLRHLGLSKSDSSNSDSTQSQKSGRNSNPR
QARN

sFrp4 (NP_003005) (identificador de secuencia n.º: 14)

MFLSILVALCLWLHLALGVRGAPCEAVRIPMCRHMPWNITRMPNHLHHSTQENAILAIEQYEELVDVNCSAVLRFFFCAMYAPICTLEFLHDPIKPCKSVCQRARDD
CEPLMKMYNHSWPESLACDELPVYDRGVCISPEAIVTDLPEDVKWIDITPDMMVQERPLDVDCKRLSPDRCKCKKVKPTLATYLSKNYSYVIHAKIKAVQRSGCNEV
TTVVDVKEIFKSSSPIPRTQVPLITNSSCQCPHILPHQDVLIMCYEWRSRMMLLENCLVEKWRDQLSKRSIQWEERLQEQRRTVQDKKKTAGRTSRSNPPKPKGKPP
APKPASPKKNIKTRSAQKRTNPKRV

sFrp5 (NP_003006) (identificador de secuencia n.º: 15)

MRAAAAAGGVRTAALALLLGALHWAPARCEEYDYYGWQAEPLHGRSYSKPPQCLDIPADLPLCHTVGYKRMRLPNLLEHESLAEVKQQASSWLPLLAKRCHSDTQVF
LCSLFAPVCLDRPIYPCRSLCEAVRAGCAPLMEAYGFPWPEMLHCHKFPLDNDLCIAVQFGHLPATAPPVTKICAQCEMEHSADGLMEQMCSSDFVVKMRIKEIKIE
NGDRKLIGAQKKKKLLKPGPLKRKDTKRLVLHMKNGAGCPCPQLDSLAGSFLVMGRKVDGQLLLMAVYRWDKKNKEMKFAVKFMFSYPCSLYYPFFYGAAEPH

Ror1 (NP_005003) (identificador de secuencia n.º: 16)

MHRPRRRGTRPPLLALLAALLLAARGAAAQETELSVSAELVPTSSWNISSELNKDSYLTLDEPMNNITTSLGQTAELHCKVSGNPPPTIRWFKNDAPVVQEPRRLSF
RSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQCVATNGKEVVSSTGVLFVKFGPPPTASPGYSDEYEEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVYMESLHMQGEIENQITAAFTMIGTSSH
LSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDLCRDECEILENVLCQTEYIFARSNPMILMRLKLPNCEDLPQPESPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYNSTGVDY
RGTVSVTKSGRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPELNGGHSYCRNPGNQKEAPWCFTLDENFKSDLCDIPACDSKDSKEKNKMEILYILVPSVAIPLAIALLFFFICVC
RNNQKSSSAPVQRQPKHVRGQNVEMSMLNAYKPKSKAKELPLSAVRFMEELGECAFGKIYKGHLYLPGMDHAQLVAIKTLKDYNNPQQWMEFQQEASLMAELHHPNI
VCLLGAVTQEQPVCMLFEYINQGDLHEFLIMRSPHSDVGCSSDEDGTVKSSLDHGDFLHIAIQIAAGMEYLSSHFFVHKDLAARNILIGEQLHVKISDLGLSREIYS
ADYYRVQSKSLLPIRWMPPEAIMYGKFSSDSDIWSFGVVLWEIFSFGLQPYYGFSNQEVIEMVRKRQLLPCSEDCPPRMYSLMTECWNEIPSRRPRFKDIHVRLRSW
EGLSSHTSSTTPSGGNATTQTTSLSASPVSNLSNPRYPNYMFPSQGITPQGQIAGFIGPPIPQNQRFIPINGYPIPPGYAAFPAAHYQPTGPPRVIQHCPPPKSRSP
SSASGSTSTGHVTSLPSSGSNQEANIPLLPHMSIPNHPGGMGITVFGNKSQKPYKIDSKQASLLGDANIHGHTESMISAEL

FIG. 6D

356

Ror2 (NP_004551) (identificador de secuencia n.º: 17)

MARGSALPRRPLLCIPAVWAAAALLLSVSRTSGEVEVLDPNDPLGPLDGQDGPIPTLKGYFLNFLEPVNNITIVQGQTAILHCKVAGNPPPNVRWLKNDAPVVQEPR
RIIIRKTEYGSRLRIQDLDTTDTGYYQCVATNGMKTITATGVLFVRLGPTHSPNHNFQDDYHEDGFCQPYRGIACARFIGNRTIYVDSLQMQGEIENRITAAFTMIG
TSTHLSDQCSQFAIPSFCHFVFPLCDARSRTPKPRELCRDECEVLESDLCRQEYTIARSNPLILMRLQLPKCEALPMPESPDAANCMRIGIPAERLGRYHQCYNGSG
MDYRGTASTTKSGHQCQPWALQHPHSHHLSSTDFPELGGGHAYCRNPGGQMEGPWCFTQNKNVRMELCDVPSCSPRDSSKMGILYILVPSIAIPLVIACLFFLVCMC
RNKQKASASTPQRRQLMASPSQDMEMPLINQHKQAKLKEISLSAVRFMEELGEDRFGKVYKGHLFGPAPGEQTQAVAIKTLKDKAEGPLREEFRHEAMLRARLQHPN
VVCLLGVVTKDQPLSMIFSYCSHGDLHEFLVMRSPHSDVGSTDDDRTVKSALEPPDFVHLVAQIAAGMEYLSSHHVVHKDLATRNVLVYDKLNVKISDLGLFREVYA
ADYYKLLGNSLLPIRWMAPEAIMYGKFSIDSDIWSYGVVLWEVFSYGLQPYCGYSNQDVVEMIRNRQVLPCPDDCPAWVYALMIECWNEFPSRRPRFKDIHSRLRAW
GNLSNYNSSAQTSGASNTTQTSSLSTSPVSNVSNARYVGPKQKAPPFPQPQFIPMKGQIRPMVPPPQLYVPVNGYQPVPAYGAYLPNFYPVQIPMQMAPQQVPPQMV
PKPSSHHSGSGSTSTGYVTTAPSNTSMADRAALLSEGADDTQNAPEDGAQSTVQEAEEEEEGSVPETELLGDCDTLQVDEAQVQLEA

FIG. 6E

Frz1-Fc (identificador de secuencia n.º: 76)

MGGTAARLGAVILFVVIVGLHGVRGKIDEEGSGDAGGRRRPPVDPRRLARQLLLLLWLLEAPLLLGVRAQAAGQGPGQGPGPGQQPPPPPQQQQSGQQYNGERGISV
PDHGYCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSAELKFFLCSMYAPVCTVLEQALPPCRSLCERARQGCEALMNKFGFQWPDTLKCEK
FPVHGAGELCVGQNTSDK<u>ARGRAQVT</u>*DKAARSTLCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS*
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Frz2-Fc (identificador de secuencia n.º: 77)

MGGTAARLGAVILFVVIVGLHGVRGKIDARGAQFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYAP
VCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSED<u>GRAQVT</u>*DKAARSTLCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE*
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Frz3-Fc (identificador de secuencia n.º: 78)

MGGTAARLGAVILFVVIVGLHGVRGKIDARGHSLFSCEPITLRMCQDLPYNTTFMPNLLNHYDQQTAALAMEPFHPMVNLDCSRDFRPFLCALYAPICMEYGRVTLP
CRRLCQRAYSECSKLMEMFGVPWPEDMECSRFPDCDEPYPRLVDL<u>GRAQVT</u>*DKAARSTLCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV*
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Frz4-Fc (identificador de secuencia n.º: 79)

MGGTAARLGAVILFVVIVGLHGVRGKIDARGFGDEEERRCDPIRISMCQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDAELQLTTFTPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKINI
PIGPCGGMCLSVKRRCEPVLKEFGFAWPESLNCSKFPPQNDHNHMCMEGPGDEE<u>GRAQVT</u>*DKAARSTLCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV*
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Frz5-Fc (identificador de secuencia n.º: 75)

MGGTAARLGAVILFVVIVGLHGVRGKIDARGASKAPVCQEITVPMCRGIGYNLTHMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLRFFLCSMYTPICLPDYHKPL
PPCRSVCERAKAGCSPLMRQYGFAWPERMSCDRLPVLGRDAEVLCMDYNRSEA<u>GRAQVT</u>*DKAARSTLCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD*
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 7A

Frz6-Fc (identificador de secuencia n.º: 80)

MEMFTFLLTCIFLPLLRGHSLFTCEPITVPRCMKMAYNMTFFPNLMGHYDQSIAAVEMEHFLPLANLECSPNIETFLCKAFVPTCIEQIHVVPPCRKLCEKVYSDCK
KLIDTFGIRWPEELECDRLQYCDETVPVTFLESGGGGVTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Frz7-Fc (identificador de secuencia n.º: 81)

MRDPGAAAPLSSLGLCALVLALLGALSAGAGAQPYHGEKGISVPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTILPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYA
PVCTVLDQAIPPCRSLCERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCENFPVHGAGEICVGQNTSDGLESGGGGVTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Frz8-Fc (identificador de secuencia n.º: 74)

MEWGYLLEVTSLLAALAVLQRSSGAAAASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPC
RSVCERAKAGCAPLMRQYGFAWPDRMRCDRLPEQGNPDTLCMDYNRTDLESGGGGVTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Frz9-Fc (identificador de secuencia n.º: 82)

MAVAPLRGALLLWQLLAAGGAALEIGRFDPERGRGAAPCQAVEIPMCRGIGYNLTRMPNLLGHTSQGEAAAELAEFAPLVQYGCHSHLRFFLCSLYAPMCTDQVSTP
IPACRPMCEQARLRCAPIMEQFNFGWPDSLDCARLPTRNDPHALCMEAPENATLESGGGGVTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Frz10-Fc (identificador de secuencia n.º: 83)

MQRPGPRLWLVLQVMGSCAAISSMDMERPGDGKCQPIEIPMCKDIGYNMTRMPNLMGHENQREAAIQLHEFAPLVEYGCHGHLRFFLCSLYAPMCTEQVSTPIPACR
VMCEQARLKCSPIMEQFNFKWPDSLDCRKLPNKNDPNYLCMEAPNNGSLESGGGGVTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 7B

69

sFRP1-Fc (identificador de secuencia n.º: 84)

MGIGRSEGGRRGAALGVLLALGAALLAVGSASEYDYVSFQSDIGPYQSGRFYTKPPQCVDIPADLRLCHNVGYKKMVLPNLLEHETMAEVKQQASSWVPLLNKNCHA
GTQVFLCSLFAPVCLDRPIYPCRWLCEAVRDSCEPVMQFFGFYWPEMLKCDKFPEGDVCIAMTPPNAWRAQVTDKAARSTLCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

sFRP2-Fc (identificador de secuencia n.º: 85)

MLQGPGSLLLLFLASHCCLGSARGLFLFGQPDFSYKRSNCKPIPANLQLCHGIEYQNMRLPNLLGHETMKEVLEQAGAWIPLVMKQCHPDTKKFLCSLFAPVCLDDL
DETIQPCHSLCVQVKDRCAPVMSAFGFPWPDMLECDRFPQDNDLCIPLASSDH*WRAQVTDKAARSTLCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD*
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

sFRP3-Fc (identificador de secuencia n.º: 86)

MGGTAARLGAVILFVVIVGLHGVRGKIDARGAACEPVRIPLCKSLPWNMTKMPNHLHHSTQANAILAIEQFEGLLGTHCSPDLLFFLCAMYAPICTIDFQHEPIKPC
KSVCERARQGCEPILIKYRHSWPENLACEELPVYDRGVCISPEAIVT*GRAQVTDKAARSTLCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP*
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

sFRP4-Fc (identificador de secuencia n.º: 87)

MFLSILVALCLWLHLALGVRGAPCEAVRIPMCRHMPWNITRMPNHLHHSTQENAILAIEQYEELVDVNCSAVLRFFFCAMYAPICTLEFLHDPIKPCKSVCQRARDD
CEPLMKMYNHSWPESLACDELPVYDRGVCISPEAIVT*LESGGGGVTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG*
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

sFRP5-Fc (identificador de secuencia n.º: 88)

MKAAAAAGGVRIAALALLLGALHWAPARCEEIDTIGWQAEPLHGKSISAFFQCLDIPADLPLCAIVGYKRMRLPNLLEHESLAEVKQQASSWLPLLAKRCHSDTQVF
LCSLFAPVCLDRPIYPCRSLCEAVRAGCAPLMEAYGFPWPEMLHCHKFPLDNDLCIAVQFGHL*WRAQVTDKAARSTLCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR*
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 7C

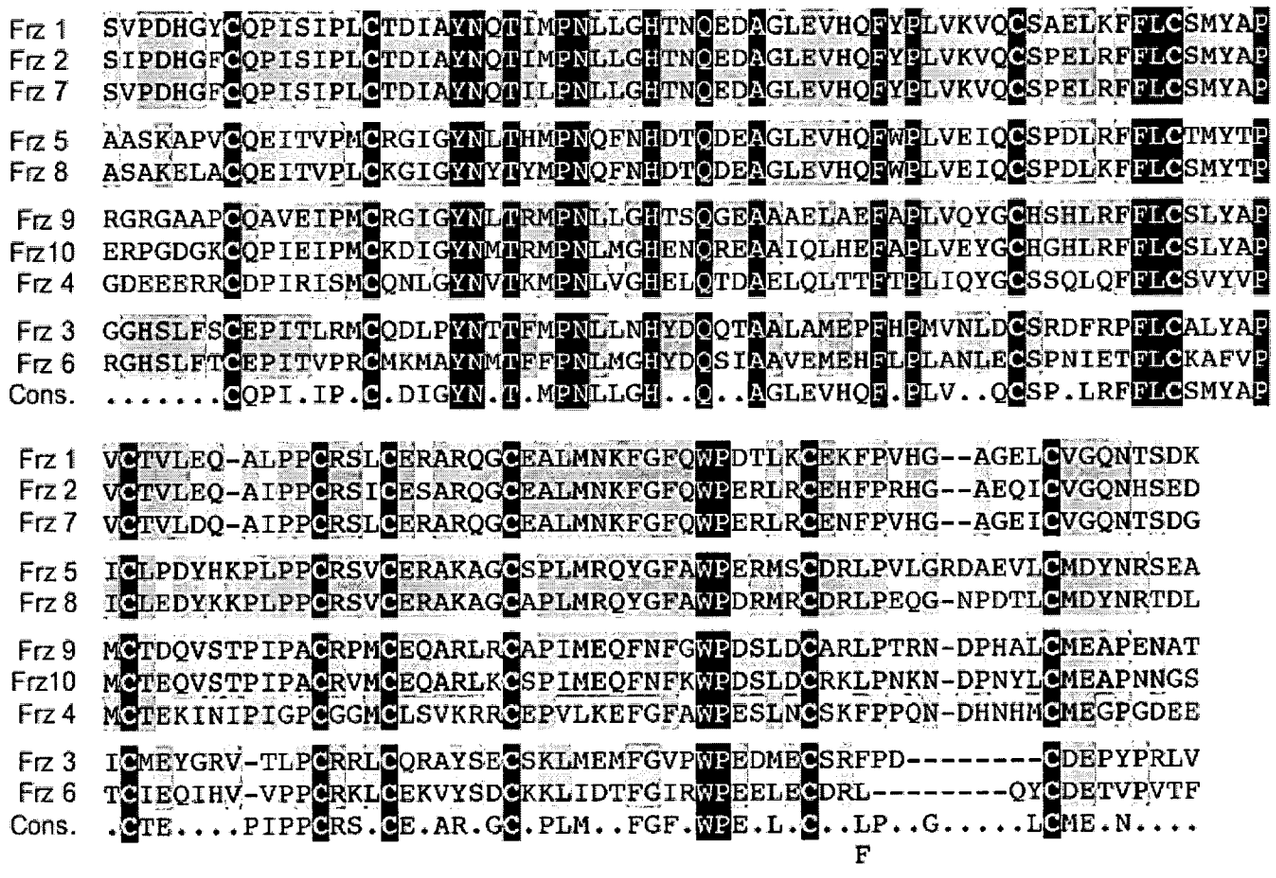

Frz 1 SVPDHGYCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSAELKFFLCSMYAP
Frz 2 SIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYAP
Frz 7 SVPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTILPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYAP
Frz 5 AASKAPVCQEITVPMCRGIGYNLTHMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLRFFLCTMYTP
Frz 8 ASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSMYTP
Frz 9 RGRGAAPCQAVEIPMCRGIGYNLTRMPNLLGHTSQGEAAAELAEFAPLVQYGCHSHLRFFLCSLYAP
Frz10 ERPGDGKCQPIEIPMCKDIGYNMTRMPNLMGHENQREAAIQLHEFAPLVEYGCHGHLRFFLCSLYAP
Frz 4 GDEEERRCDPIRISMCQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDAELQLTTFTPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVP
Frz 3 GGHSLFSCEPITLRMCQDLPYNTTFMPNLLNHYDQQTAALAMEPFHPMVNLDCSRDFRPFLCALYAP
Frz 6 RGHSLFTCEPITVPRCMKMAYNMTFFPNLMGHYDQSIAAVEMEHFLPLANLECSPNIETFLCKAFVP
Cons. .....CQPI.IP.C.DIGYN.T.MPNLLGH..Q..AGLEVHQF.PLV..QCSP.LRFFLCSMYAP
Frz 1 VCTVLEQ-ALPPCRSLCERARQGCEALMNKFGFQWPDTLKCEKFPVHG--AGELCVGQNTSDK
Frz 2 VCTVLEQ-AIPPCRSICESARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHG--AEQICVGQNHSED
Frz 7 VCTVLDQ-AIPPCRSLCERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCENFPVHG--AGEICVGQNTSDG
Frz 5 ICLPDYHKPLPPCRSVCERAKAGCSPLMRQYGFAWPERMSCDRLPVLGRDAEVLCMDYNRSEA
Frz 8 ICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAWPDRMRCDRLPEQG-NPDTLCMDYNRTDL
Frz 9 MCTDQVSTPIPACRPMCEQARLRCAPIMEQFNFGWPDSLDCARLPTRN-DPHALCMEAPENAT
Frz10 MCTEQVSTPIPACRVMCEQARLKCSPIMEQFNFKWPDSLDCRKLPNKN-DPNYLCMEAPNNGS
Frz 4 MCTEKINIPIGPCGGMCLSVKRRCEPVLKEFGFAWPESLNCSKFPPQN-DHNHMCMEGPGDEE
Frz 3 ICMEYGRV-TLPCRRLCQRAYSECSKLMEMFGVPWPEDMECSRFPD--------CDEPYPRLV
Frz 6 TCIEQIHV-VPPCRKLCEKVYSDCKKLIDTFGIRWPEELECDRL--------QYCDETVPVTF
Cons. .CTE....PIPPCRS.CE.AR.GC.PLM..FGF.WPE.L.C..LP..G.....LCME.N....
F

FIG. 8

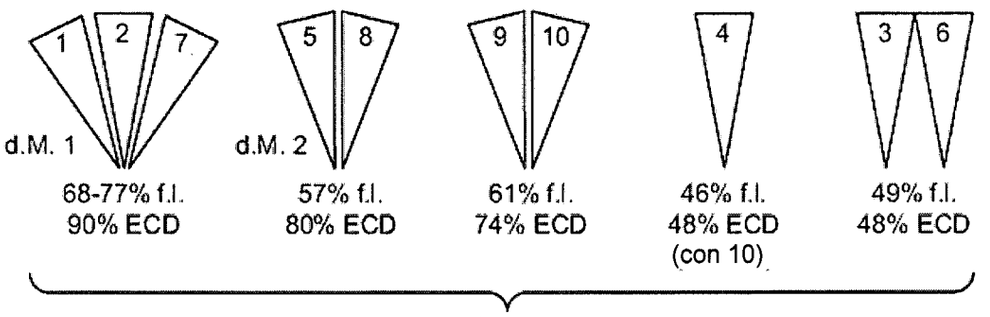


FIG. 9

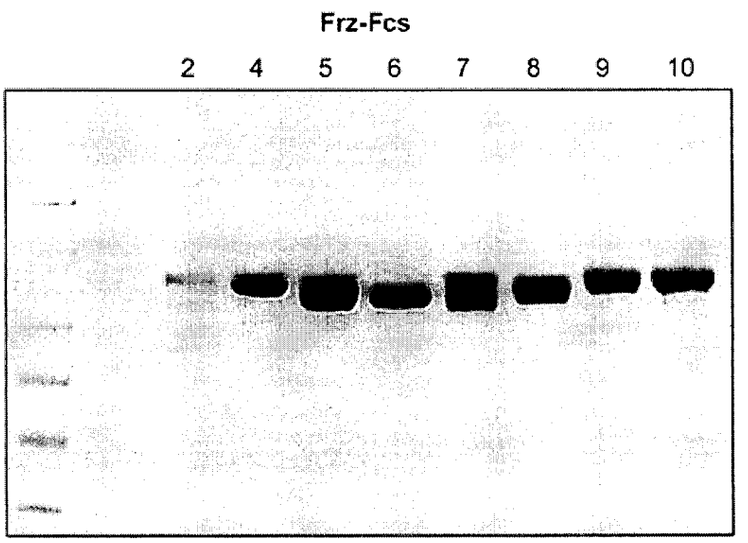


FIG. 10

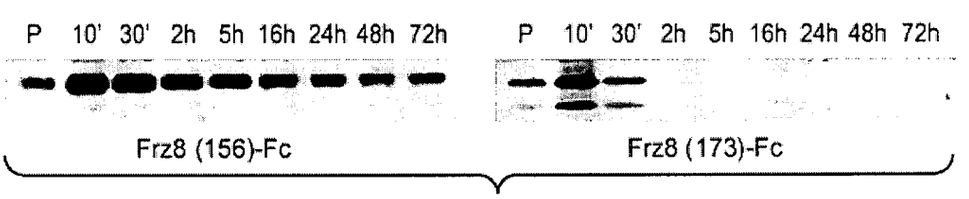


FIG. 11A

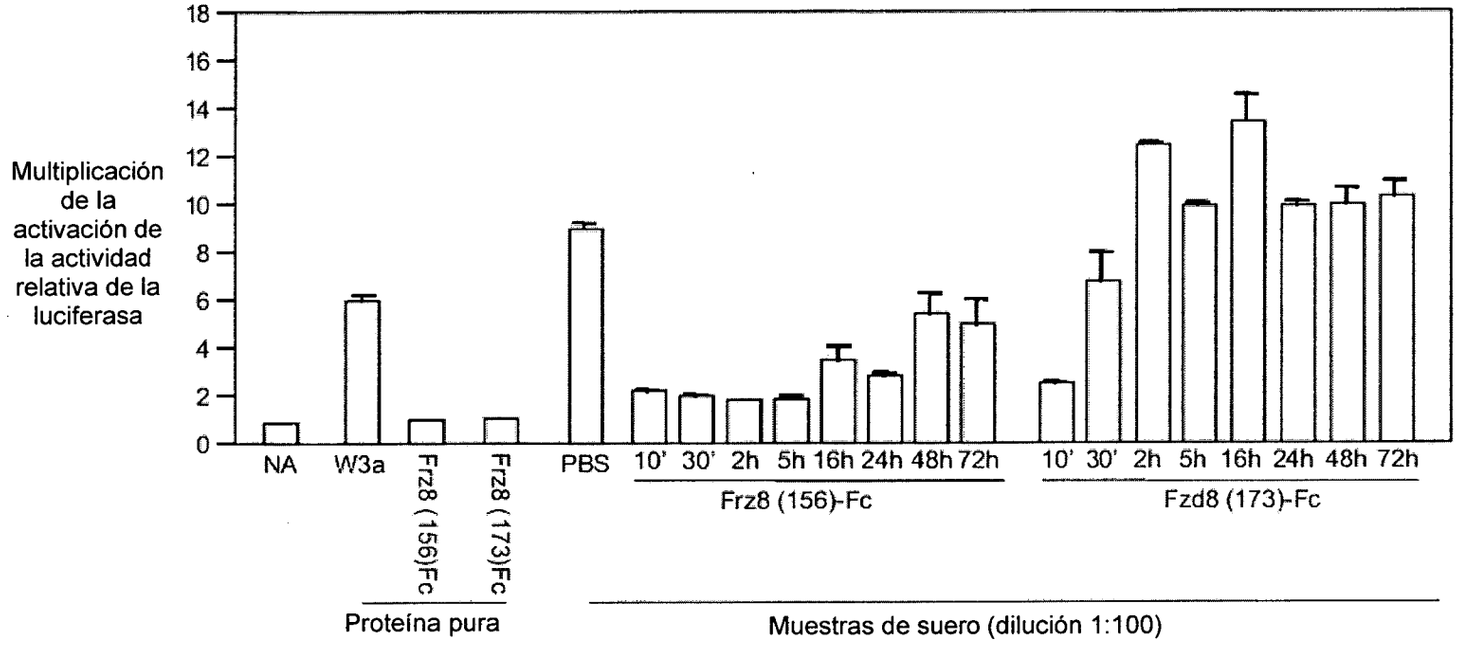

Multiplicación de la activación de la actividad relativa de la luciferasa
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
NA
W3a
Frz8 (156)Fc
Frz8 (173)Fc
PBS
10' 30' 2h 5h 16h 24h 48h 72h
Frz8 (156)-Fc
10' 30' 2h 5h 16h 24h 48h 72h
Fzd8 (173)-Fc
Proteína pura
Muestras de suero (dilución 1:100)

FIG. 11B

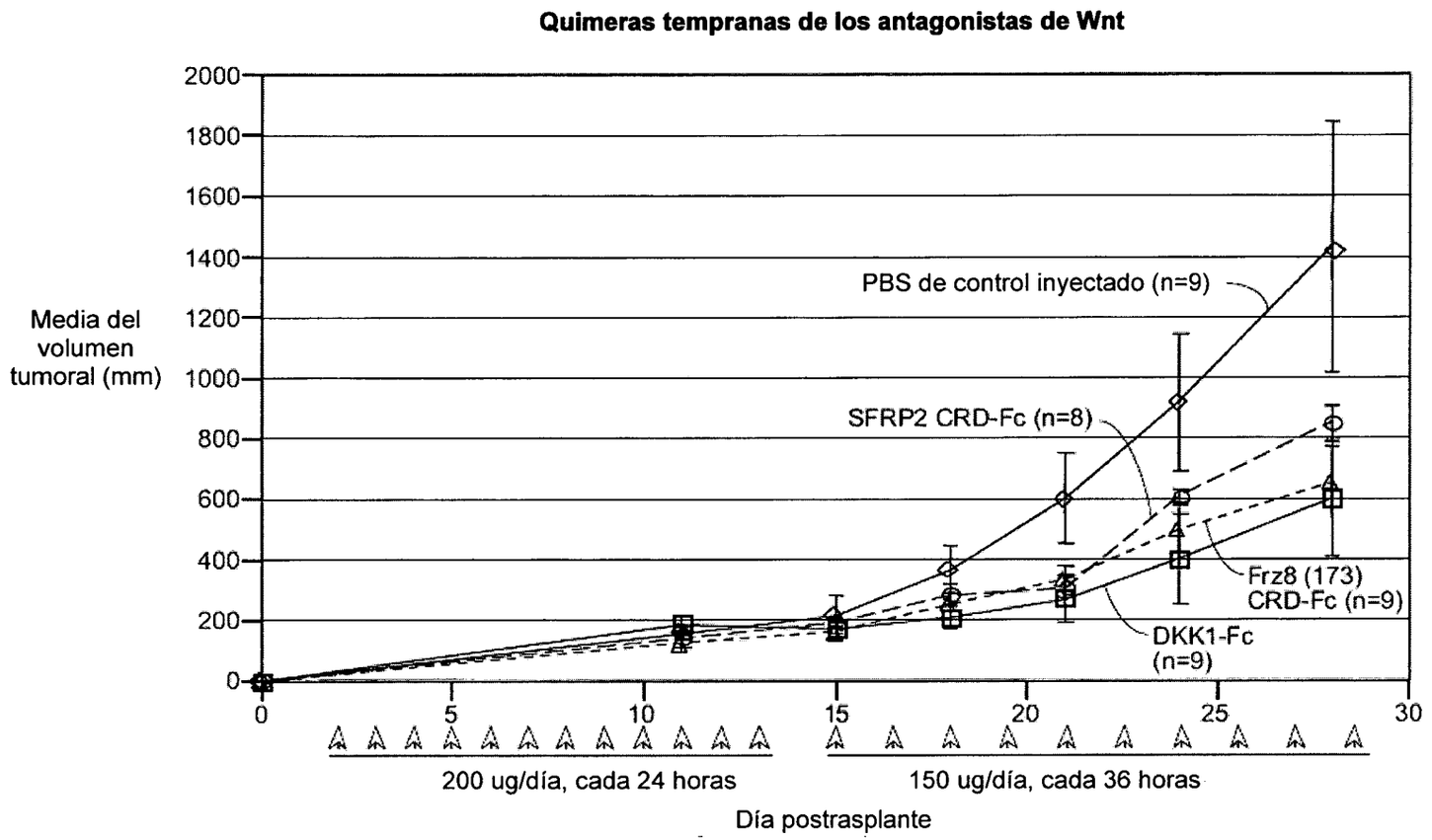
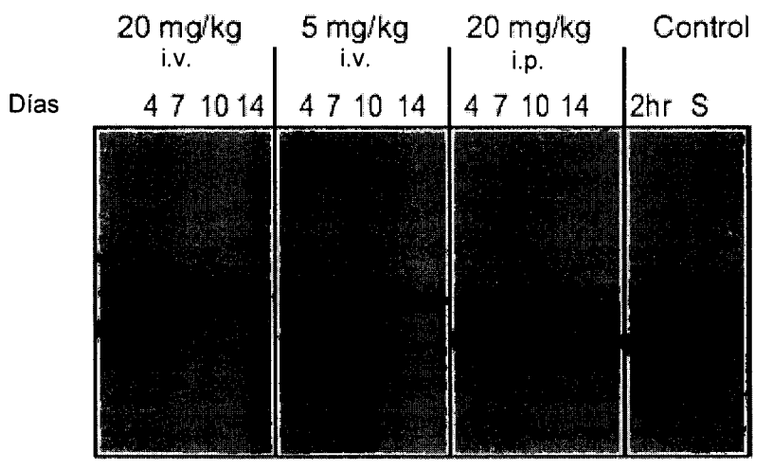

Quimeras tempranas de los antagonistas de Wnt
Media del volumen tumoral (mm)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
PBS de control inyectado (n=9)
SFRP2 CRD-Fc (n=8)
Frz8 (173) CRD-Fc (n=9)
DKK1-Fc (n=9)
0
5
10
15
20
25
30
200 ug/día, cada 24 horas
150 ug/día, cada 36 horas
Día postrasplante

FIG. 12



Con sonda con Fc antihumano de HRP

FIG. 13A

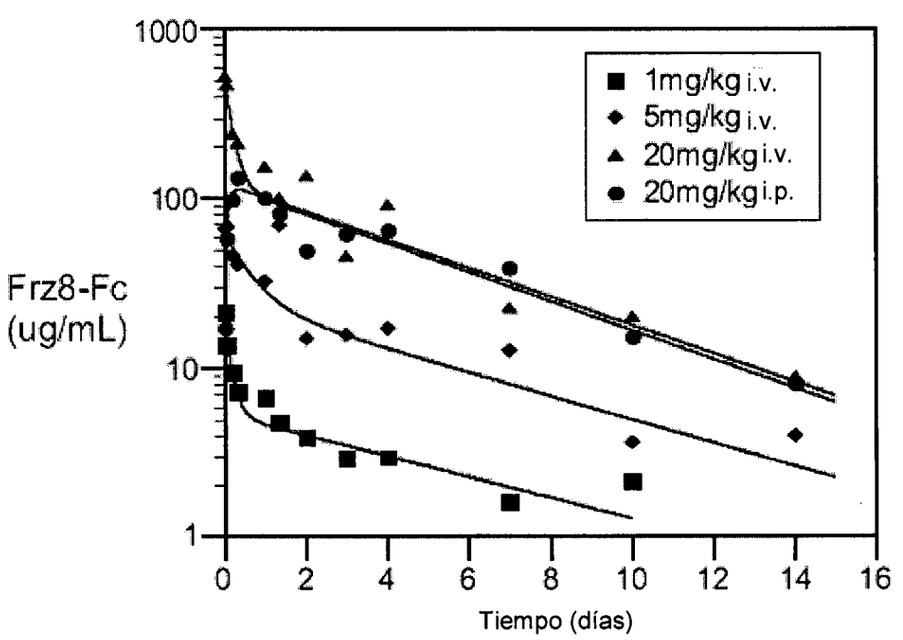
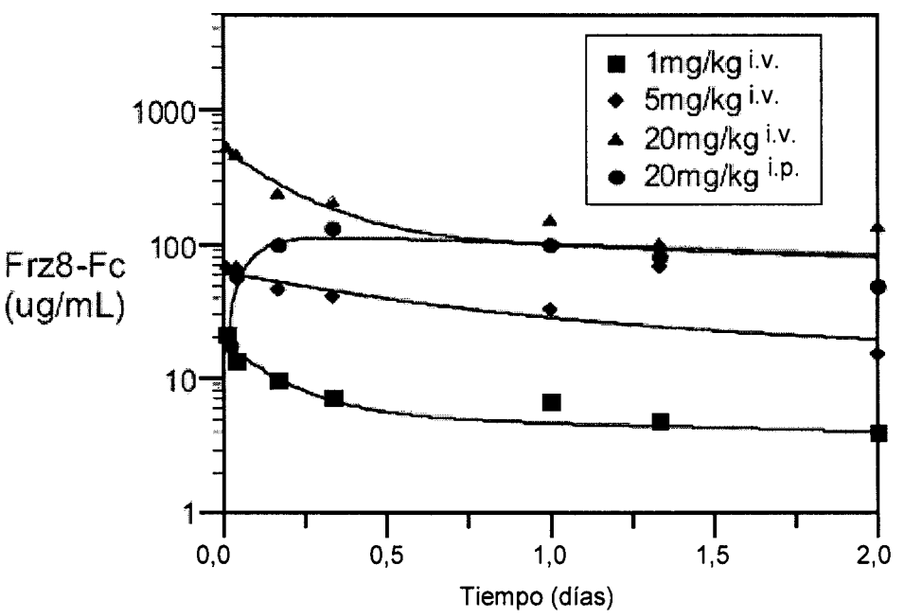


FIG. 13B

Símbolos = Observado
Líneas = Previsto



Símbolos = Observado
Líneas = Previsto

FIG. 13C

	Frz8-Fc 1 mg/kg i.v.	Frz8-Fc 5 mg/kg i.v.	Frz8-Fc 20 mg/kg i.v.	Frz8-Fc 20 mg/kg i.p.
AUC (día*ug/ml)	39,7	179	687	633
CL o CL/F (ml/día/kg)	25,2	28,0	29,1	31,6
Alfa HL (Horas)	2,76	10,0	3,29	
T1/2 (Días)	4,86	4,32	3,52	3,62
Tmáx (Horas)				8,38
Cmáx (ug/ml)	18,3	62,4	515	113
V1 (ml/kg)	54,6	80,1	38,8	
Vss o V/F (ml/kg)	167	154	133	165

FIG. 13D

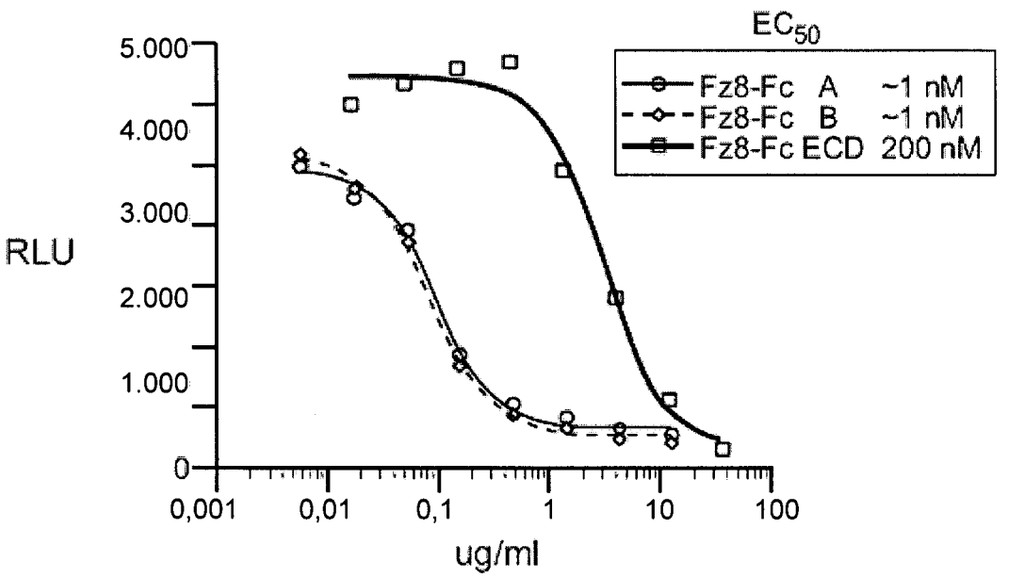


FIG. 14A

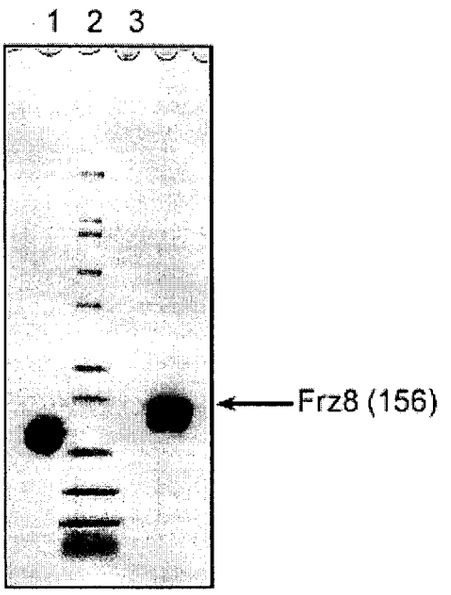


FIG. 14B

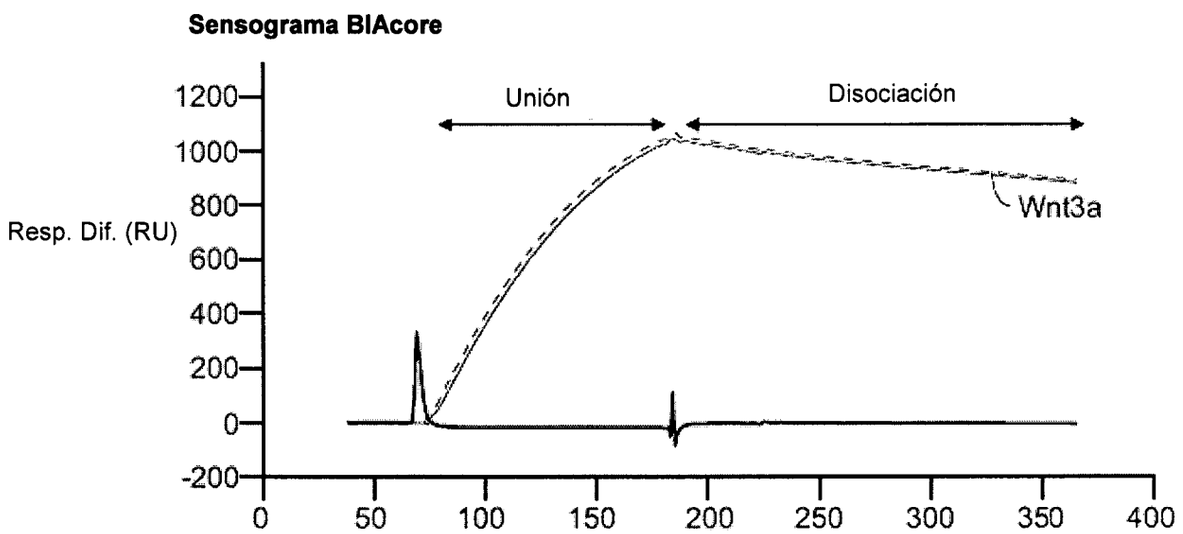


FIG. 15A

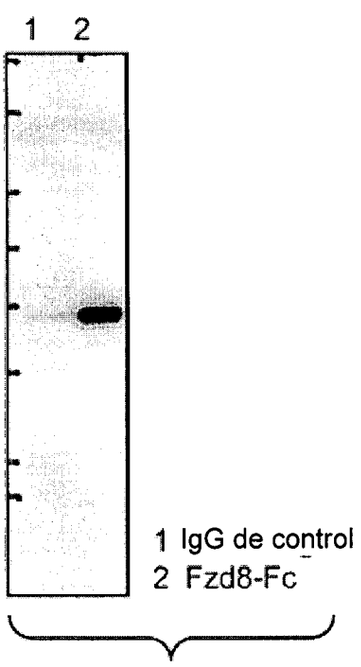


FIG. 15B

FIG. 16A

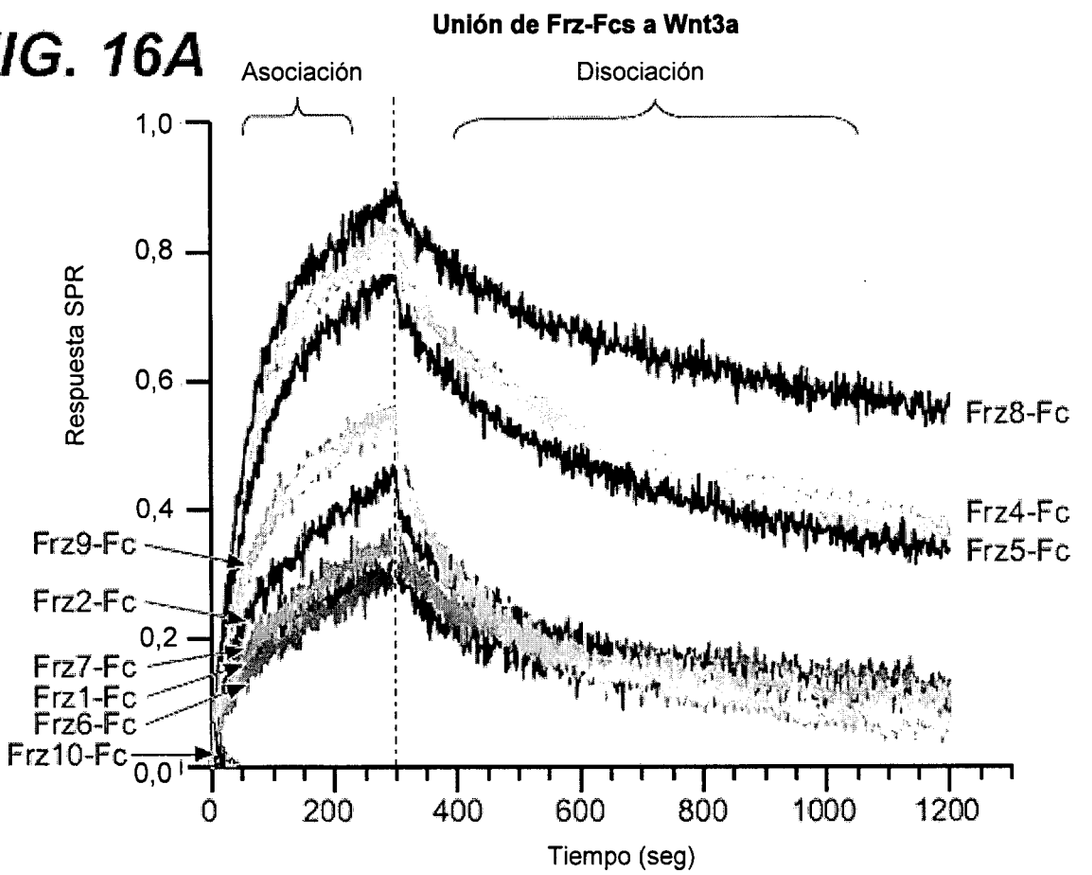
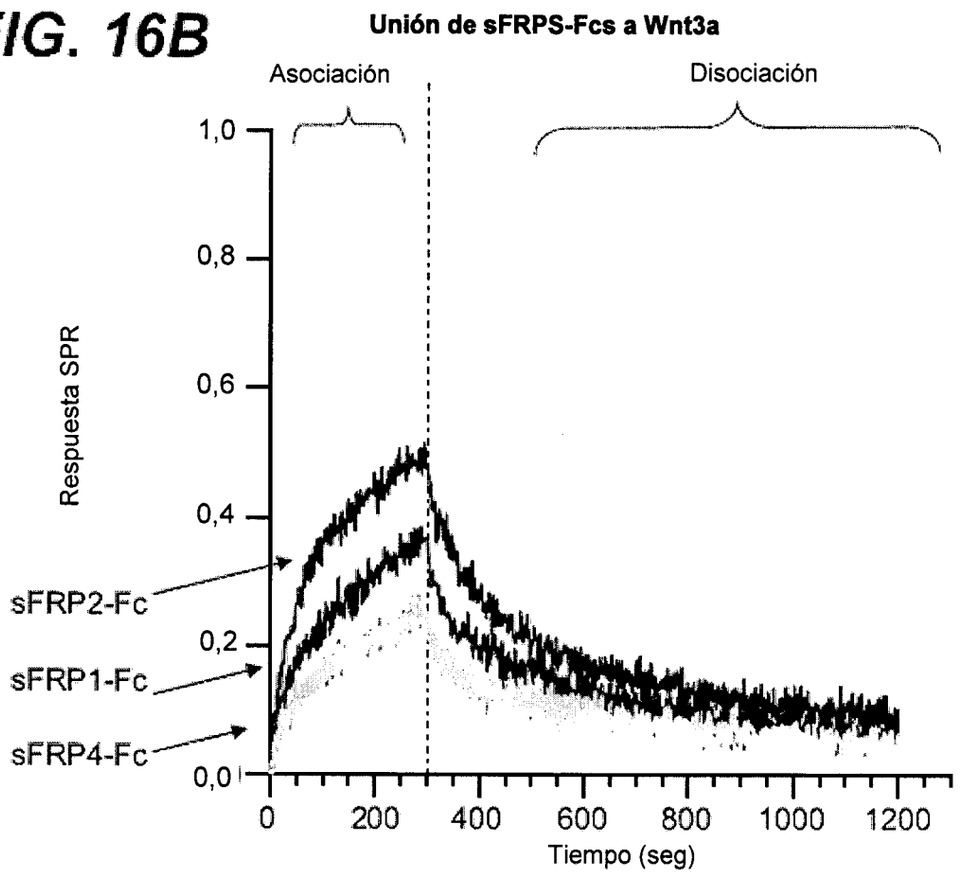

Unión de Frz-Fcs a Wnt3a
Asociación
Disociación
Respuesta SPR
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Frz8-Fc
Frz4-Fc
Frz5-Fc
Frz9-Fc
Frz2-Fc
Frz7-Fc
Frz1-Fc
Frz6-Fc
Frz10-Fc
0
200
400
600
800
1000
1200
Tiempo (seg)

FIG. 16B


Unión de sFRPS-Fcs a Wnt3a
Asociación
Disociación
Respuesta SPR
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
sFRP2-Fc
sFRP1-Fc
sFRP4-Fc
0
200
400
600
800
1000
1200
Tiempo (seg)

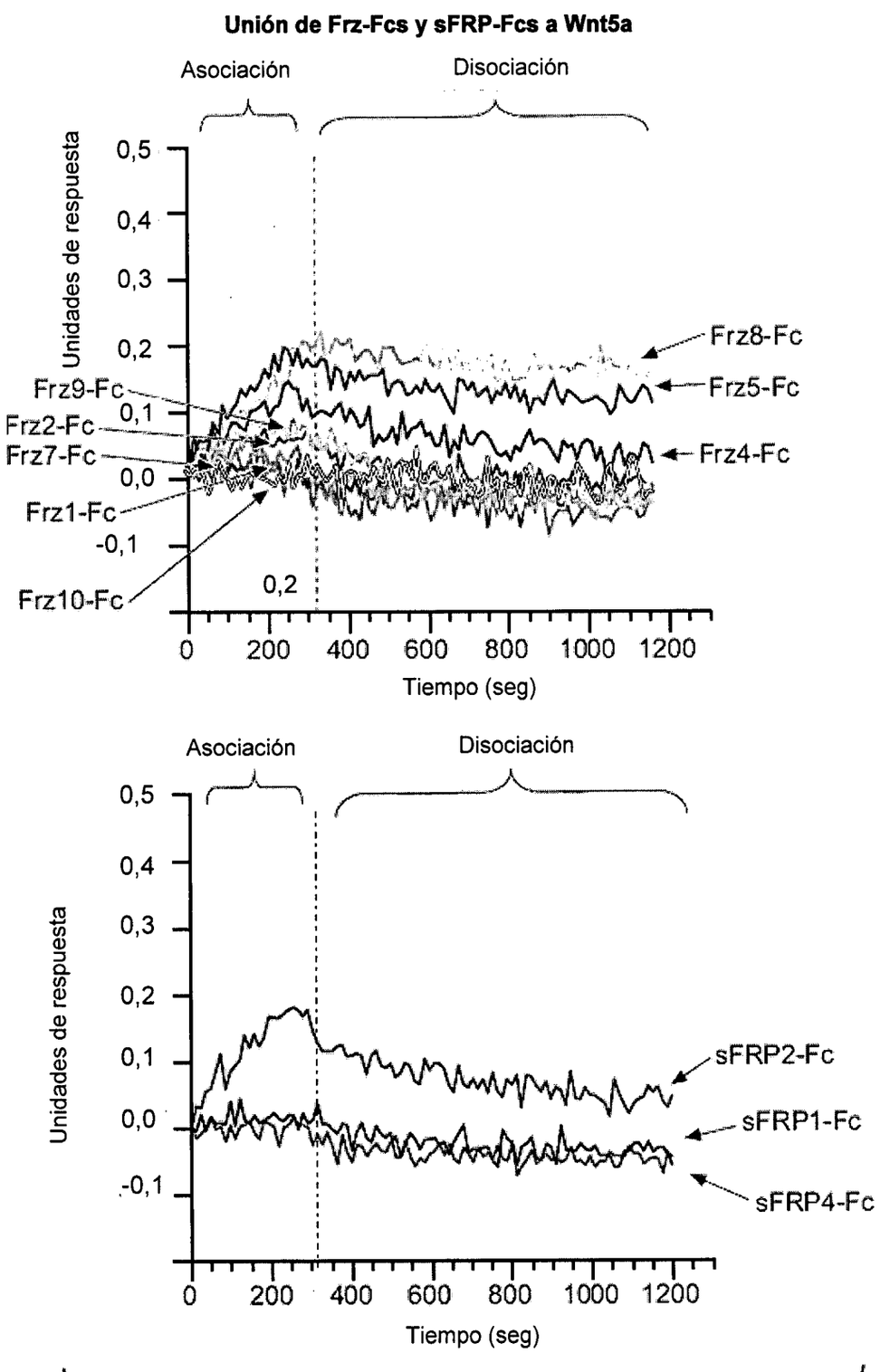

Unión de Frz-Fcs y sFRP-Fcs a Wnt5a
Asociación
Disociación
Unidades de respuesta
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
-0,1
0,2
Frz9-Fc
Frz2-Fc
Frz7-Fc
Frz1-Fc
Frz10-Fc
Frz8-Fc
Frz5-Fc
Frz4-Fc
0
200
400
600
800
1000
1200
Tiempo (seg)
Asociación
Disociación
Unidades de respuesta
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
-0,1
sFRP2-Fc
sFRP1-Fc
sFRP4-Fc
0
200
400
600
800
1000
1200
Tiempo (seg)

FIG. 16C

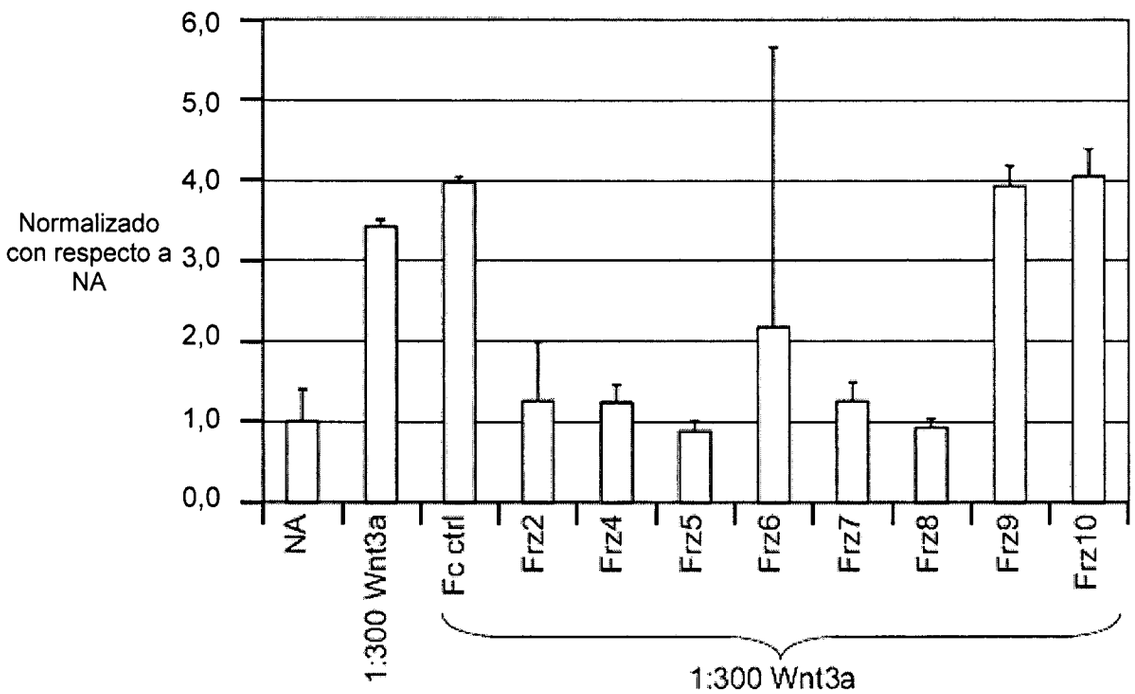

6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
Normalizado con respecto a NA
NA
1:300 Wnt3a
Fc ctrl
Frz2
Frz4
Frz5
Frz6
Frz7
Frz8
Frz9
Frz10
1:300 Wnt3a

FIG. 17A

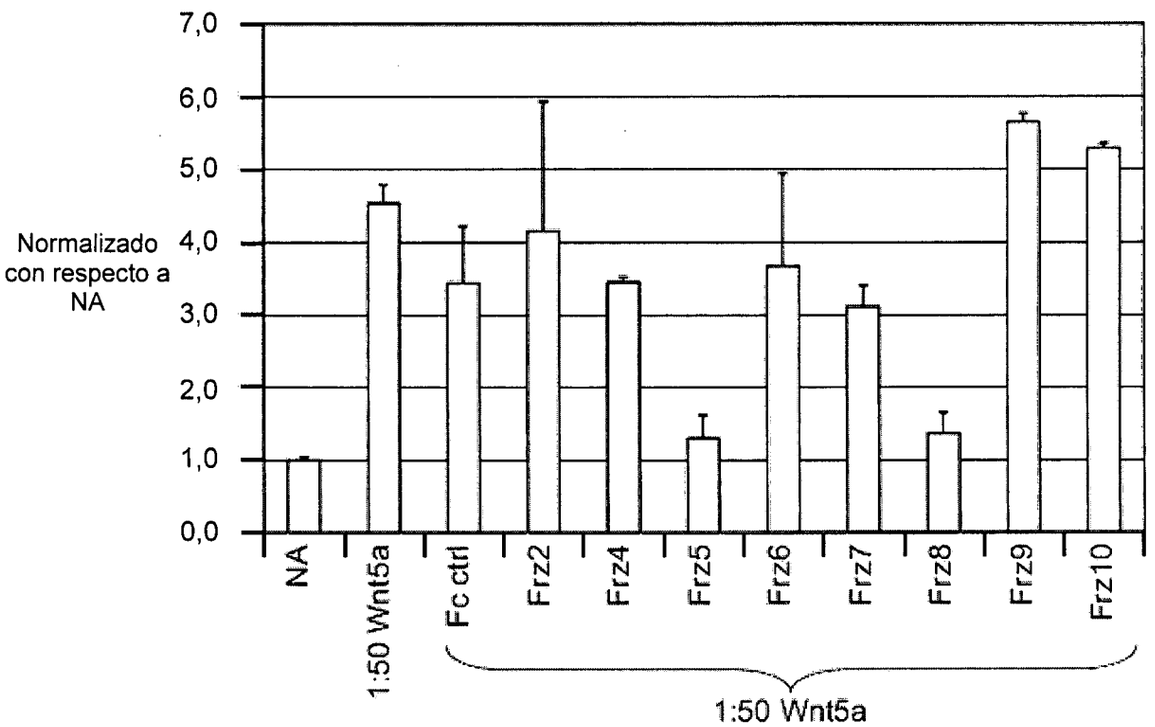

Normalizado con respecto a NA
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
NA
1:50 Wnt5a
Fc ctrl
Frz2
Frz4
Frz5
Frz6
Frz7
Frz8
Frz9
Frz10
1:50 Wnt5a

FIG. 17B

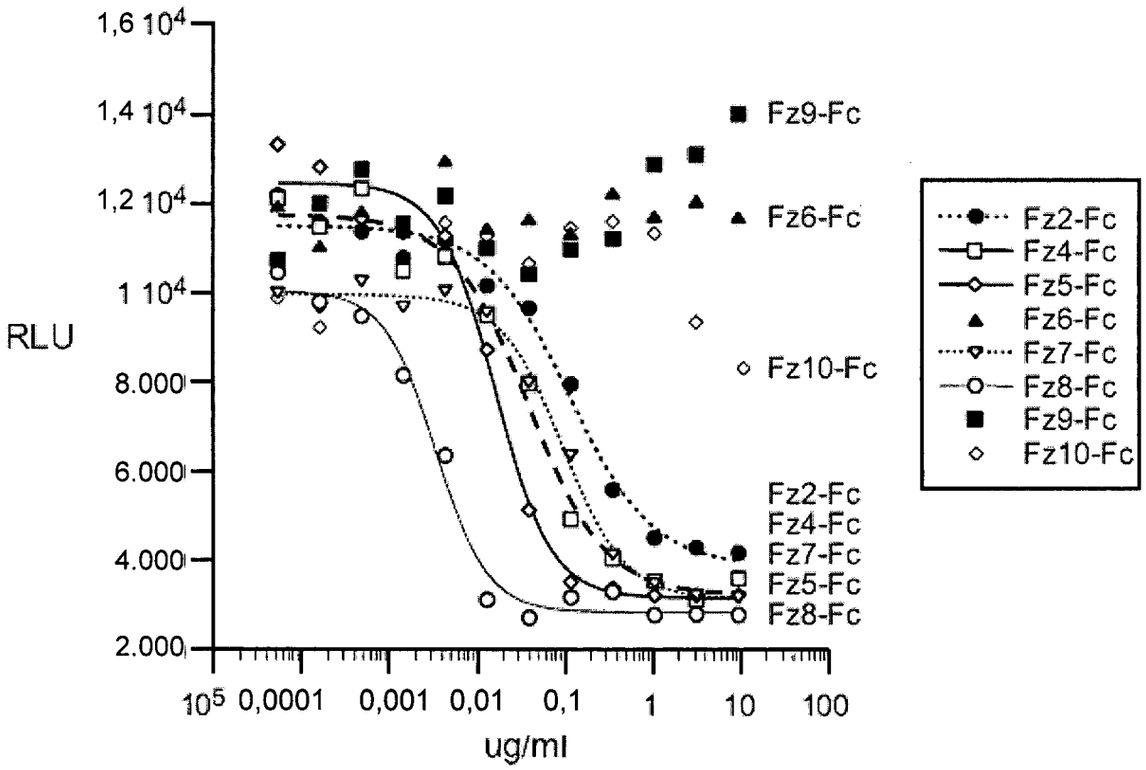

1,6 10^4
1,4 10^4
1,2 10^4
1 10^4
8.000
6.000
4.000
2.000
RLU
10^5 0,0001 0,001 0,01 0,1 1 10 100
ug/ml
Fz9-Fc
Fz6-Fc
Fz10-Fc
Fz2-Fc
Fz4-Fc
Fz7-Fc
Fz5-Fc
Fz8-Fc
Fz2-Fc
Fz4-Fc
Fz5-Fc
Fz6-Fc
Fz7-Fc
Fz8-Fc
Fz9-Fc
Fz10-Fc

FIG. 18

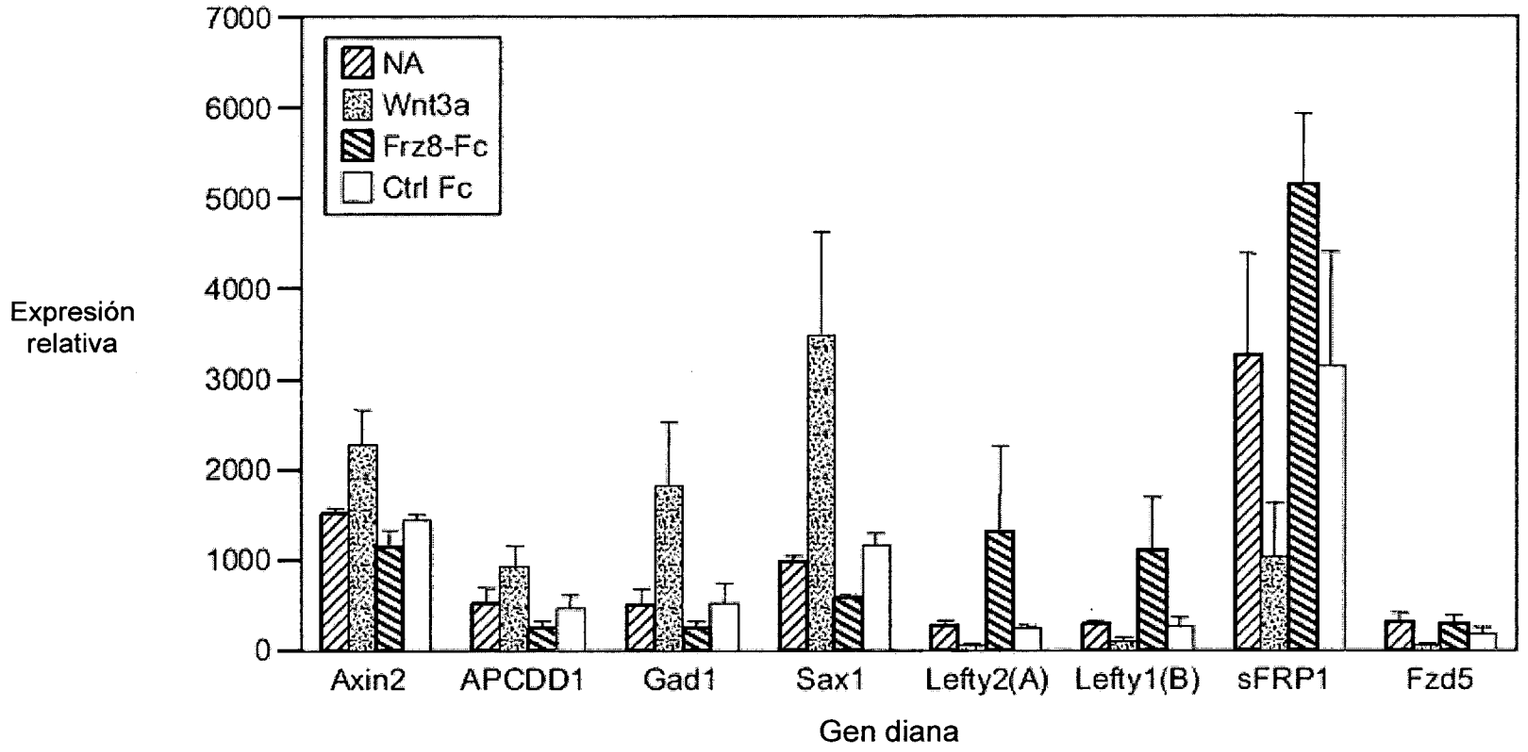

7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
NA
Wnt3a
Frz8-Fc
Ctrl Fc
Expresión relativa
Axin2
APCDD1
Gad1
Sax1
Lefty2(A)
Lefty1(B)
sFRP1
Fzd5
Gen diana

FIG. 19A

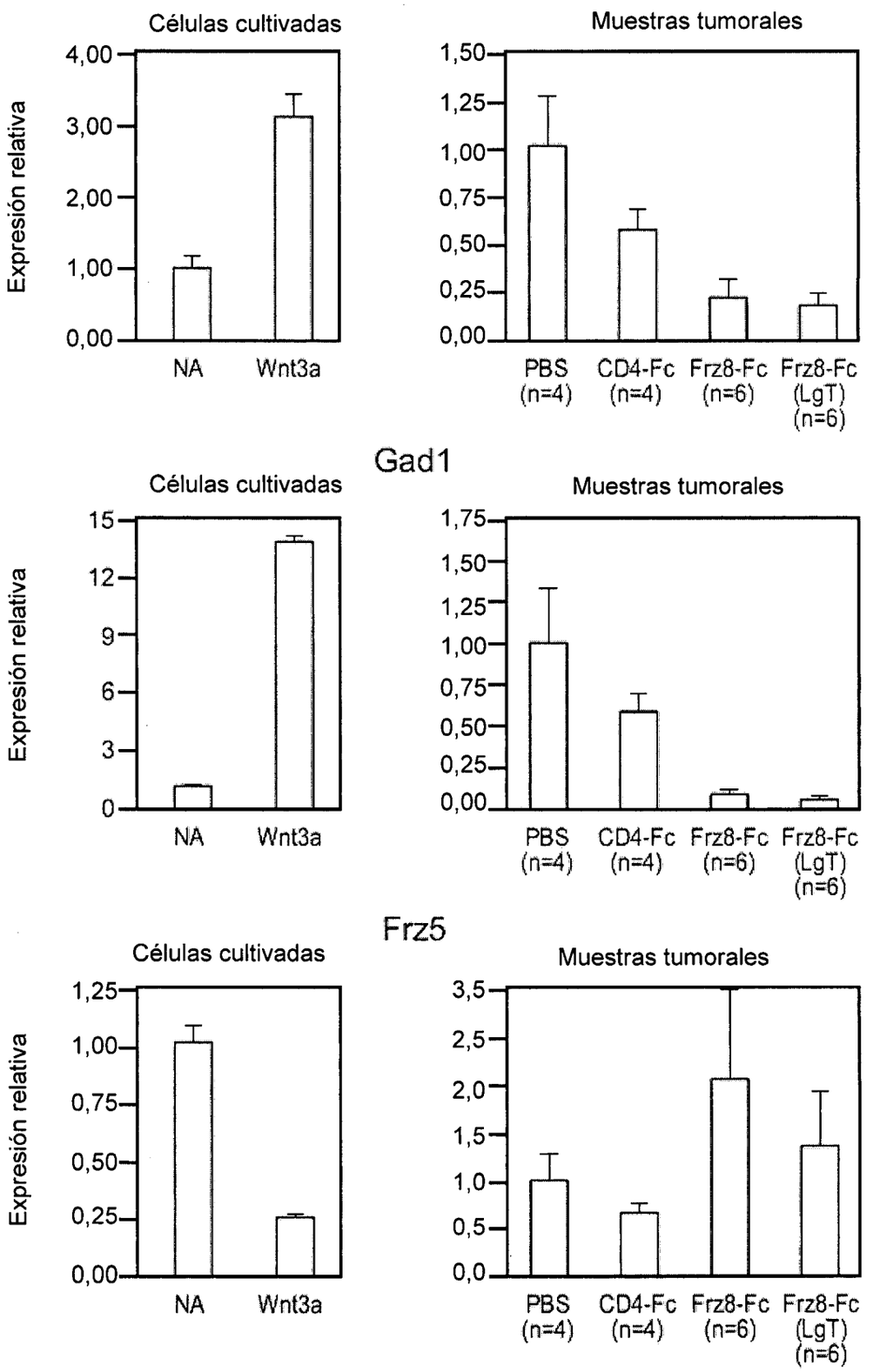

Células cultivadas
Muestras tumorales
Expresión relativa
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
NA
Wnt3a
1,50
1,25
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
PBS (n=4)
CD4-Fc (n=4)
Frz8-Fc (n=6)
Frz8-Fc (LgT) (n=6)
Gad1
15
12
9
6
3
0
Frz5
3,5
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0

FIG. 19B

Nombre del gen	N.º de entrada	Cebador anverso	Cebador reverso	Secuencia de la sonda
Lefty1 (B)	NM_020997	CTAAGCACTTACATGTGGAGATACTG (identificador de secuencia n.º: 89)	ACAGGACAAGTAAACAATGACACA (identificador de secuencia n.º: 90)	AACCTGAGGGCAGAAAGCCCAA (identificador de secuencia n.º: 91)
Lefty2 (A)	NM_003240	TTCCCACACTGTCTTAGAGAACTT (identificador de secuencia n.º: 92)	TTCTGAGTATCTACATTCAATTGCTTT (identificador de secuencia n.º: 93)	AAACATGCAAATACATGTGGTTTCTGGTGAC (identificador de secuencia n.º: 94)
Gad1	NM_000817	TGACTCGCTTAGCTGAAACCT (identificador de secuencia n.º: 95)	TGAGCCTGGTCACTTTATCTGA (identificador de secuencia n.º: 96)	TCAGAAGGTCTTCGGAAATGTTGCCT (identificador de secuencia n.º: 97)
APCDD1	NM_153000	TGTGGTTGCAGCCTGTCT (identificador de secuencia n.º: 98)	AACCAACTCTGCATTGGATTC (identificador de secuencia n.º: 99)	CCTTTGAAATTGTTTTACTCTCTGAGTTTTATATGCTG (identificador de secuencia n.º: 100)
Axin2	NM_004655	CTCCGTGTGTCGCCTAT (identificador de secuencia n.º: 101)	CATGACAAAAGTCATTGAGTACAAGA (identificador de secuencia n.º: 102)	TTGAGGGCTCAAGCTTTCCCTTGT (identificador de secuencia n.º: 103)
Sax1	XM_372331	GAACCTCGCGCTGTCTCT (identificador de secuencia n.º: 104)	ACTTGGTCCTGCGATTCTG (identificador de secuencia n.º: 105)	AGCCTCACCGAGACGCAGGTC (identificador de secuencia n.º: 106)
Fzd5	NM_003468	GGCAACAATTTACCTTTGCTT (identificador de secuencia n.º: 107)	GAACCAAGTGGAACTTCATTACA (identificador de secuencia n.º: 108)	CGCCAACCTTAGGATTGTAAAGCCC (identificador de secuencia n.º: 109)
sFRP1	NM_003012	CAGATACACAGGACATGGATGA (identificador de secuencia n.º: 110)	CAAAGCTTTTGTAAGAGACTTAGGAT (identificador de secuencia n.º: 111)	CCGTTTCCTCTAGTTTCTTCCTGTAGTACTCCTCT (identificador de secuencia n.º: 112)

FIG. 20

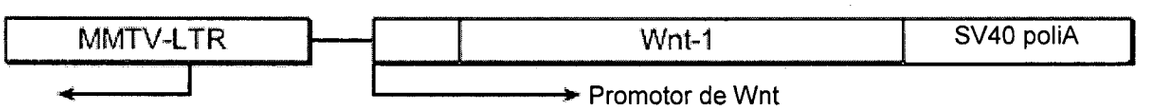


FIG. 21

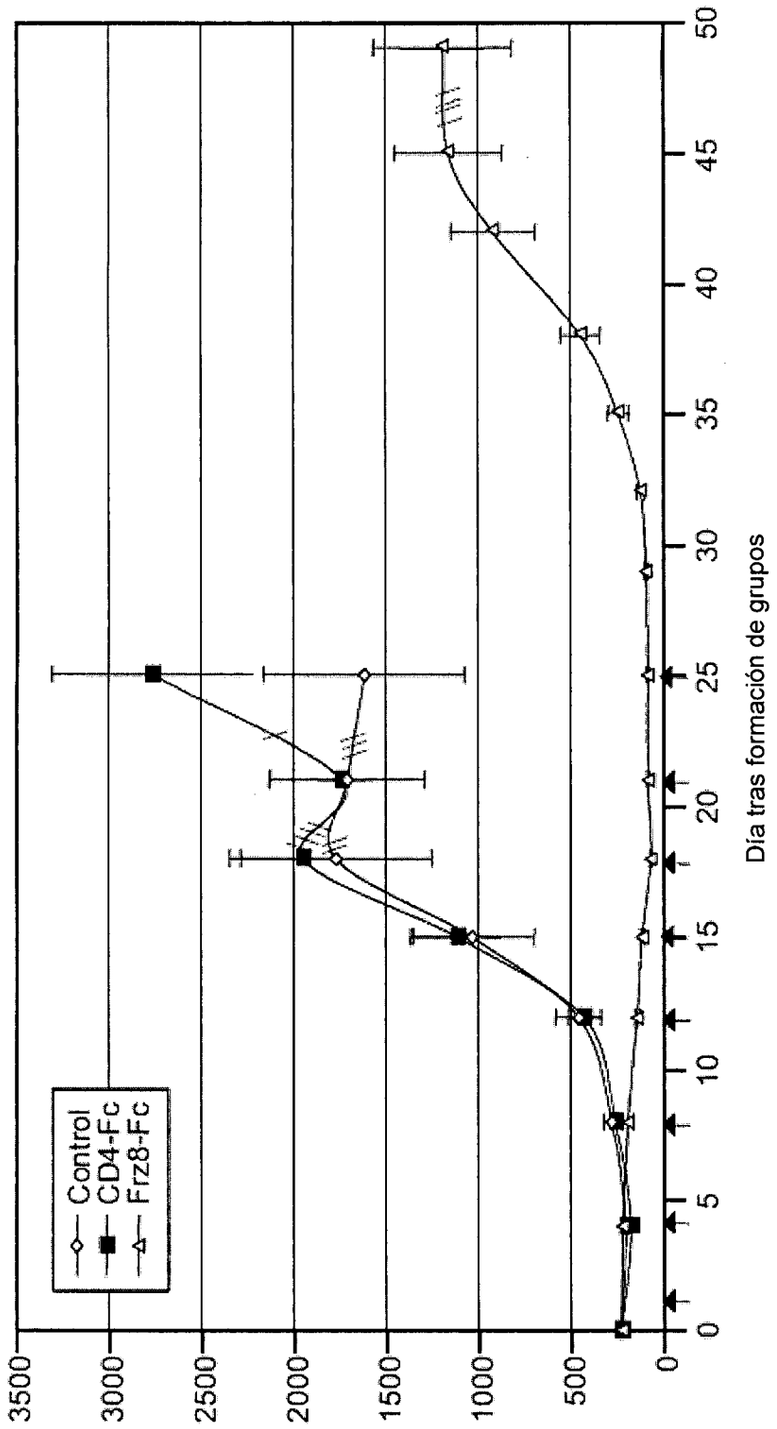

Control
CD4-Fc
Frz8-Fc
Vol. tumoral (mm3)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Día tras formación de grupos

FIG. 22A

Media de los volúmenes tumorales

	PBS i.p.		CD4 i.p.		Frz i.p.	
Día	**Media**	**SEM**	**Media**	**SEM**	**Media**	**SEM**
0	225,93	9,61	226,89	9,64	226,91	10,43
4	204,15	14,75	175,55	16,55	219,03	15,48
7	277,53	43,16	259,37	25,02	191,11	29,50
11	457,82	122,93	429,21	85,56	140,81	11,93
14	1031,84	333,62	1112,39	238,44	113,56	12,62
18	1767,01	513,69	1935,97	404,77	67,31	7,48

Media del % de cambio del volumen tumoral

	PBS i.p.		CD4 i.p.		Frz i.p.	
Día	**Media**	**SEM**	**Media**	**SEM**	**Media**	**SEM**
4	-8,07	7,36	-22,91	5,76	-3,66	4,79
7	28,57	23,12	14,51	10,51	-16,76	11,34
11	116,03	61,46	90,58	41,23	-37,28	5,31
14	396,12	165,30	388,61	105,48	-49,84	5,25
18	736,95	252,59	766,50	189,04	-69,67	3,51

FIG. 22B

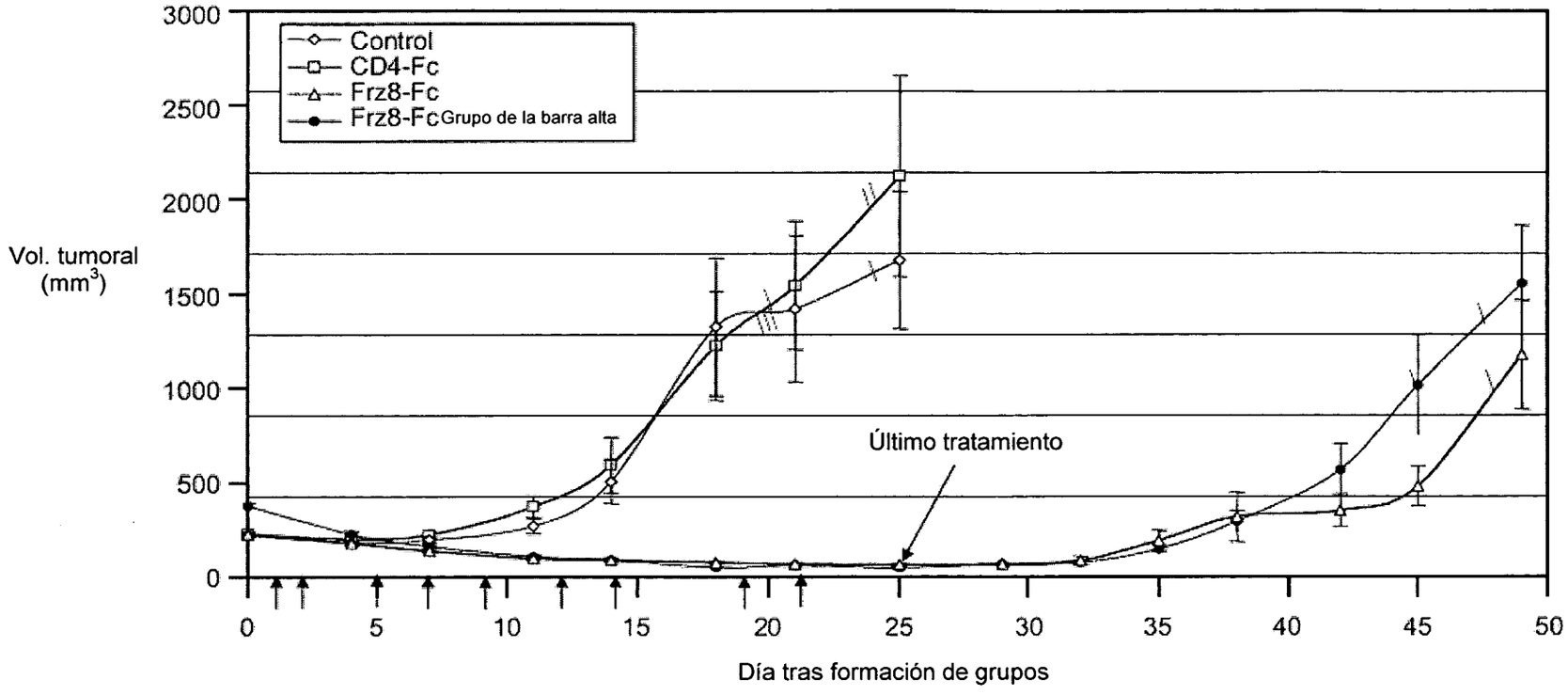

Control
CD4-Fc
Frz8-Fc
Frz8-Fc Grupo de la barra alta
Vol. tumoral (mm3)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Último tratamiento
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Día tras formación de grupos

FIG. 23A

Media de los volúmenes tumorales

	PBS i.v.		CD4 i.v.		Frz i.v.		Frz i.v. Grupo superior	
Día	**Media**	**SEM**	**Media**	**Media**	**SEM**	**SEM**	**Media**	**SEM**
0	225,77	10,49	225,61	10,09	225,95	9,97	376,03	13,90
4	181,27	12,97	202,13	13,68	178,60	10,86	225,50	16,47
7	196,93	16,02	224,70	18,96	137,38	7,15	161,01	10,29
11	268,38	41,88	371,32	62,94	97,76	11,03	107,32	7,90
14	504,20	122,01	592,14	161,73	89,54	10,45	88,39	8,27
18	1324,53	381,24	1224,00	315,88	73,27	7,01	52.66	7,52

Media del % de cambio del volumen tumoral

	PBS i.v.		CD4 i.v.		Frz i.v.		Frz i.v. Grupo superior	
Día	**Media**	**SEM**	**Media**	**Media**	**SEM**	**SEM**	**Media**	**SEM**
4	-19,75	4,49	-9,94	5,18	-20,97	3,31	-39,19	5,19
7	-12,72	6,13	3,06	11,85	-38,25	3,92	-56,90	2,88
11	16,07	15,71	71,13	30,63	-57,08	4,51	-71,22	2,23
14	110,70	45,68	177,25	75,09	-60,25	4,63	-76,15	2,15
18	440,18	143,18	477,62	150,60	-67,10	3,14	-85,64	2,17

FIG. 23B

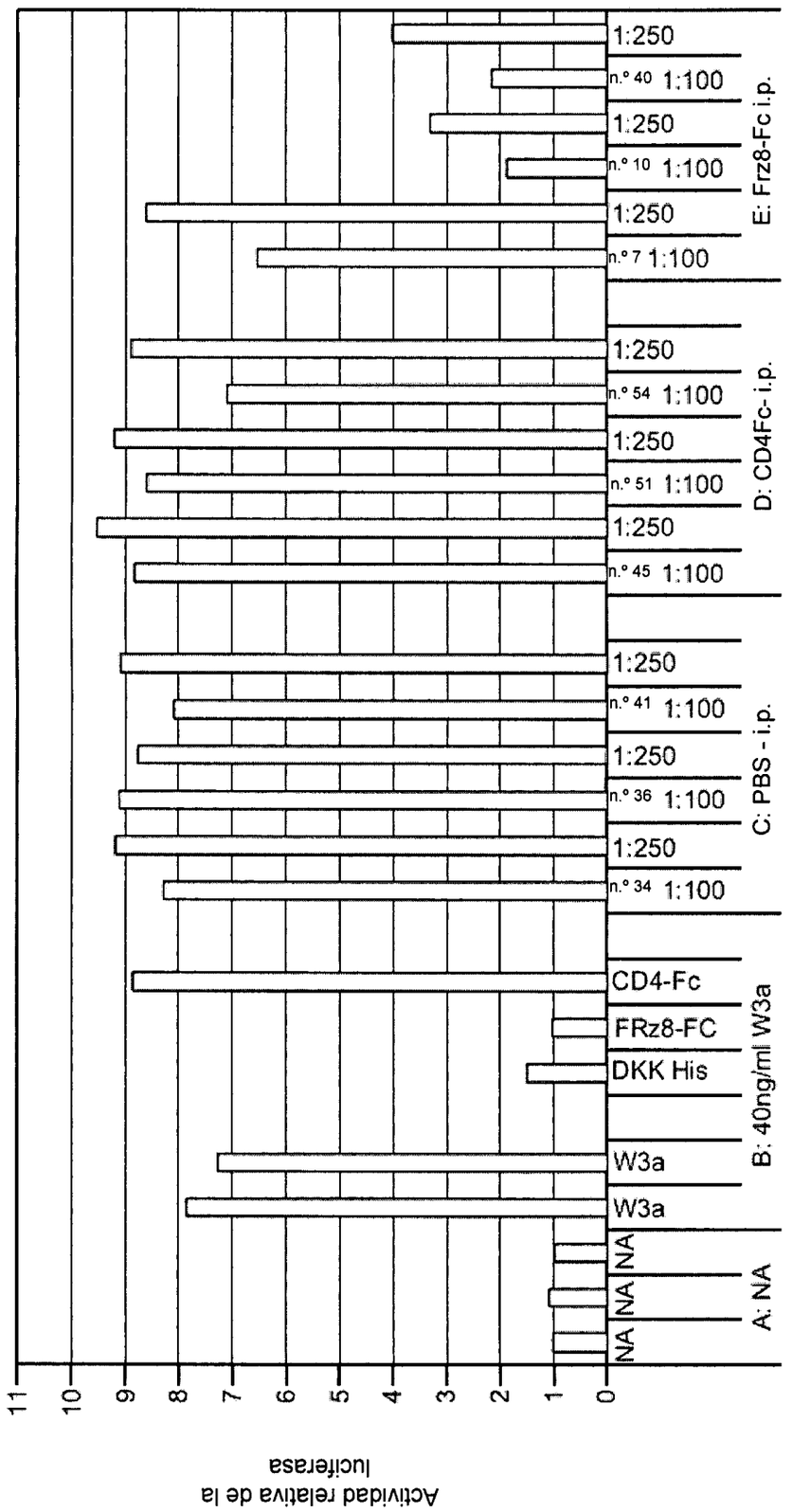

Actividad relativa de la luciferasa
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
A: NA
NA
NA
NA
B: 40ng/ml W3a
W3a
W3a
DKK His
FRz8-FC
CD4-Fc
C: PBS - i.p.
n.° 34 1:100
1:250
n.° 36 1:100
1:250
n.° 41 1:100
1:250
D: CD4Fc- i.p.
n.° 45 1:100
1:250
n.° 51 1:100
1:250
n.° 54 1:100
1:250
E: Frz8-Fc i.p.
n.° 7 1:100
1:250
n.° 10 1:100
1:250
n.° 40 1:100
1:250

FIG. 24A

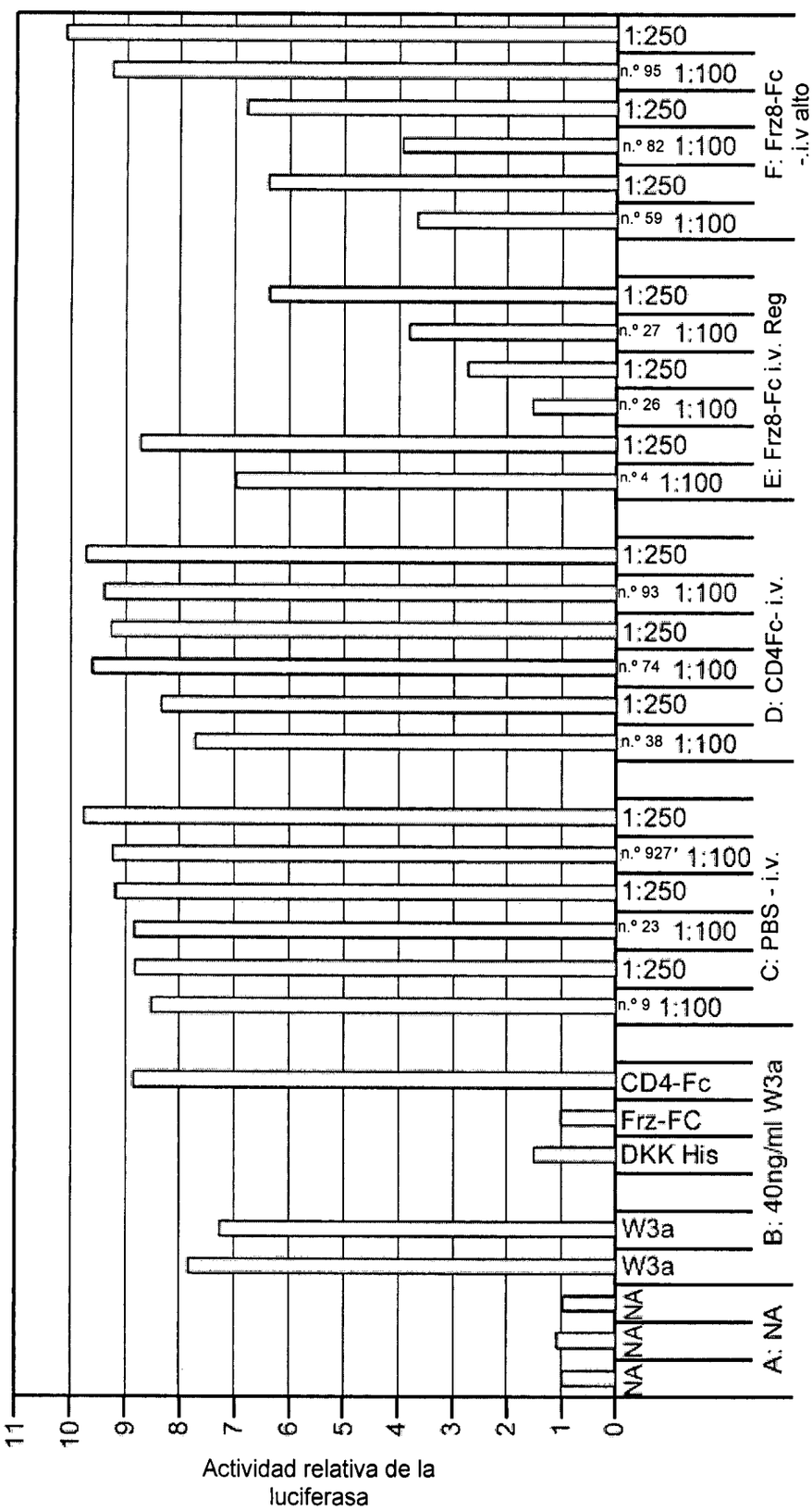

1:250
n.º 95 1:100
1:250
n.º 82 1:100
1:250
n.º 59 1:100
F: Frz8-Fc -.i.v alto
1:250
n.º 27 1:100
1:250
n.º 26 1:100
1:250
n.º 4 1:100
E: Frz8-Fc i.v. Reg
1:250
n.º 93 1:100
1:250
n.º 74 1:100
1:250
n.º 38 1:100
D: CD4Fc- i.v.
1:250
n.º 927' 1:100
1:250
n.º 23 1:100
1:250
n.º 9 1:100
C: PBS - i.v.
CD4-Fc
Frz-FC
DKK His
B: 40ng/ml W3a
W3a
W3a
NA
NA
NA
A: NA
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Actividad relativa de la luciferasa

FIG. 24B

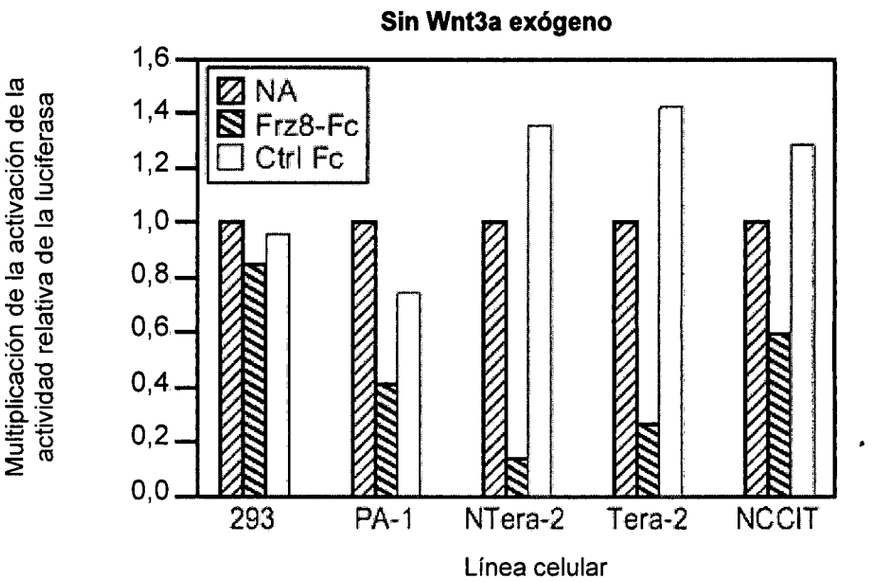


FIG. 25A

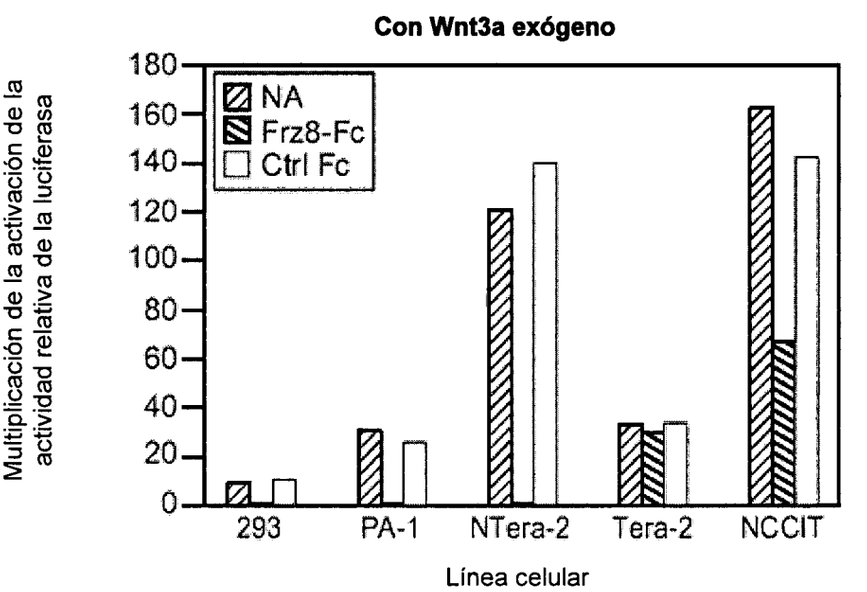


FIG. 25B

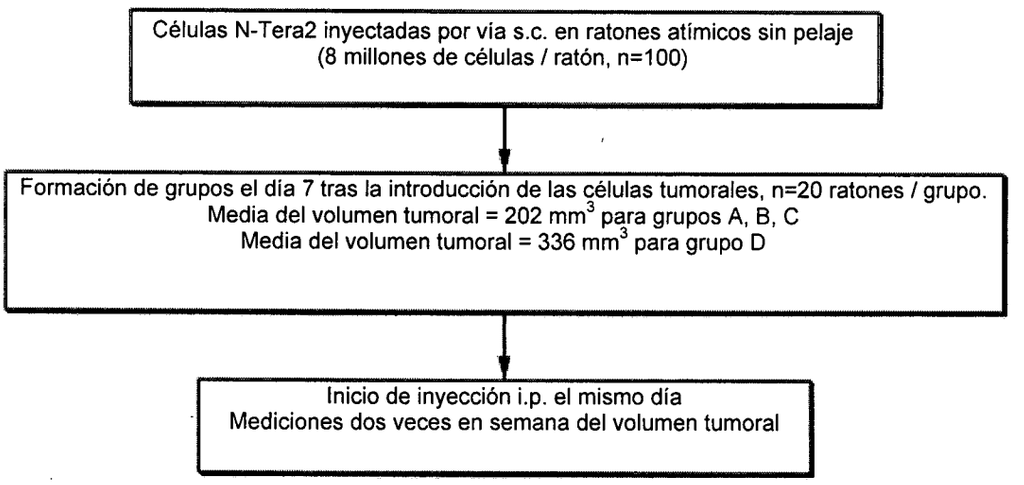

Células N-Tera2 inyectadas por vía s.c. en ratones atímicos sin pelaje
(8 millones de células / ratón, n=100)
Formación de grupos el día 7 tras la introducción de las células tumorales, n=20 ratones / grupo.
Media del volumen tumoral = 202 mm3 para grupos A, B, C
Media del volumen tumoral = 336 mm3 para grupo D
Inicio de inyección i.p. el mismo día
Mediciones dos veces en semana del volumen tumoral

FIG. 26A

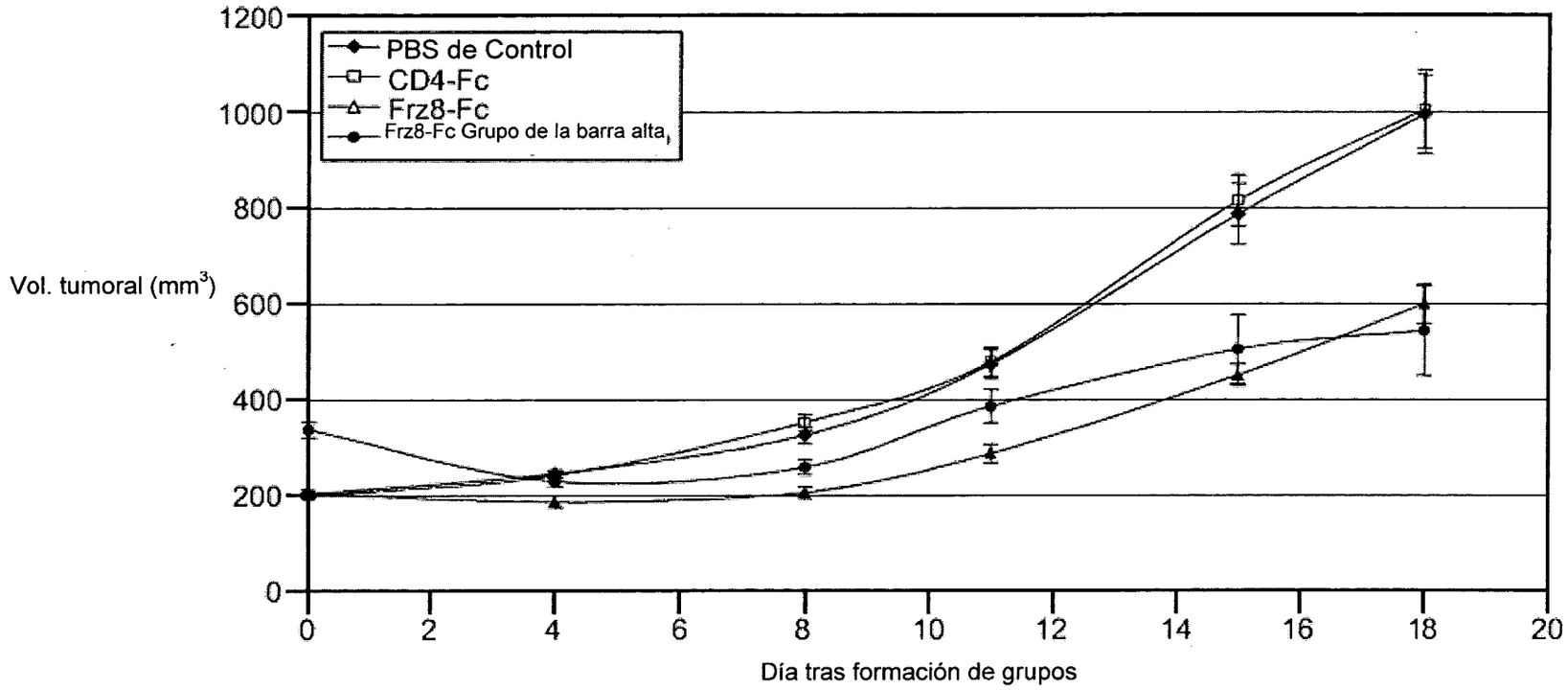

PBS de Control
CD4-Fc
Frz8-Fc
Frz8-Fc Grupo de la barra alta
Vol. tumoral (mm3)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Día tras formación de grupos

FIG. 26B

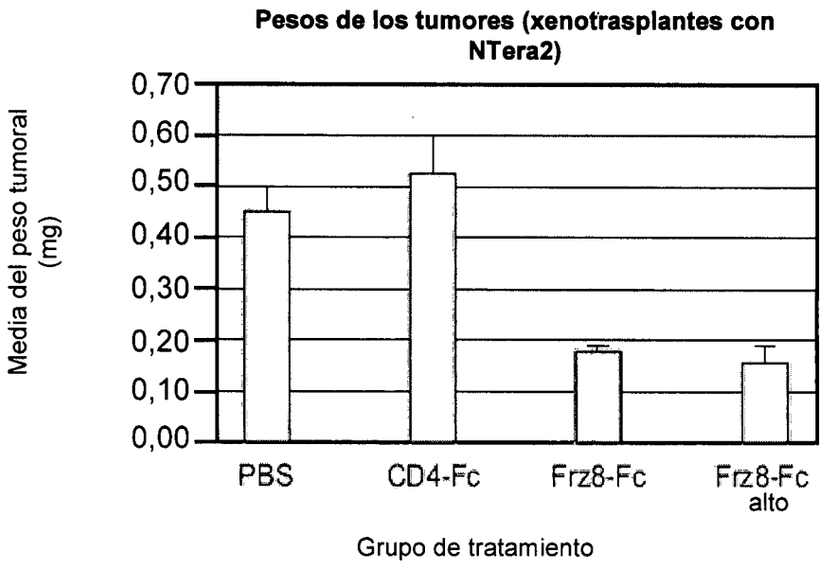


FIG. 26C

Media del volumen tumoral

	A-PBS		B-CD4		C-Frzd8		D-Frzd8 Hi	
Día	**Media**	**SEM**	**Media**	**Media**	**SEM**	**SEM**	**Media**	**SEM**
0	201,87	4,77	201,47	4,71	201,25	4,55	336,13	16,41
4	244,09	8,03	240,31	11,73	193,57	7,70	228,07	9,67
8	324,51	17,62	340,32	17,84	220,08	11,21	258,18	15,24
11	472,56	30,40	460,39	32,42	278,11	16,03	384,99	35,34
15	785,50	64,09	785,44	55,64	439,92	19,18	503,53	72,39
18	993,47	81,81	968,94	82,53	591,65	29,83	541,90	92,76

FIG. 26D

Media del % de cambio del volumen tumoral

	A-PBS		B-CD4		C-Frzd8		D-Frzd8 Hi	
Día	**Media**	**SEM**	**Media**	**Media**	**SEM**	**SEM**	**Media**	**SEM**
4	21,73	4,17	20,27	6,24	-3,01	4,42	-30,82	4,37
8	62,19	9,63	71,92	10,91	9,84	5,71	-21,16	6,81
11	136,08	16,35	131,68	17,58	38,88	8,53	14,16	8,50
15	293,50	34,54	295,91	30,72	119,74	10,17	48,53	18,47
18	398,22	46,14	387,96	44,41	195,07	40,24	58,76	25,38

FIG. 26E

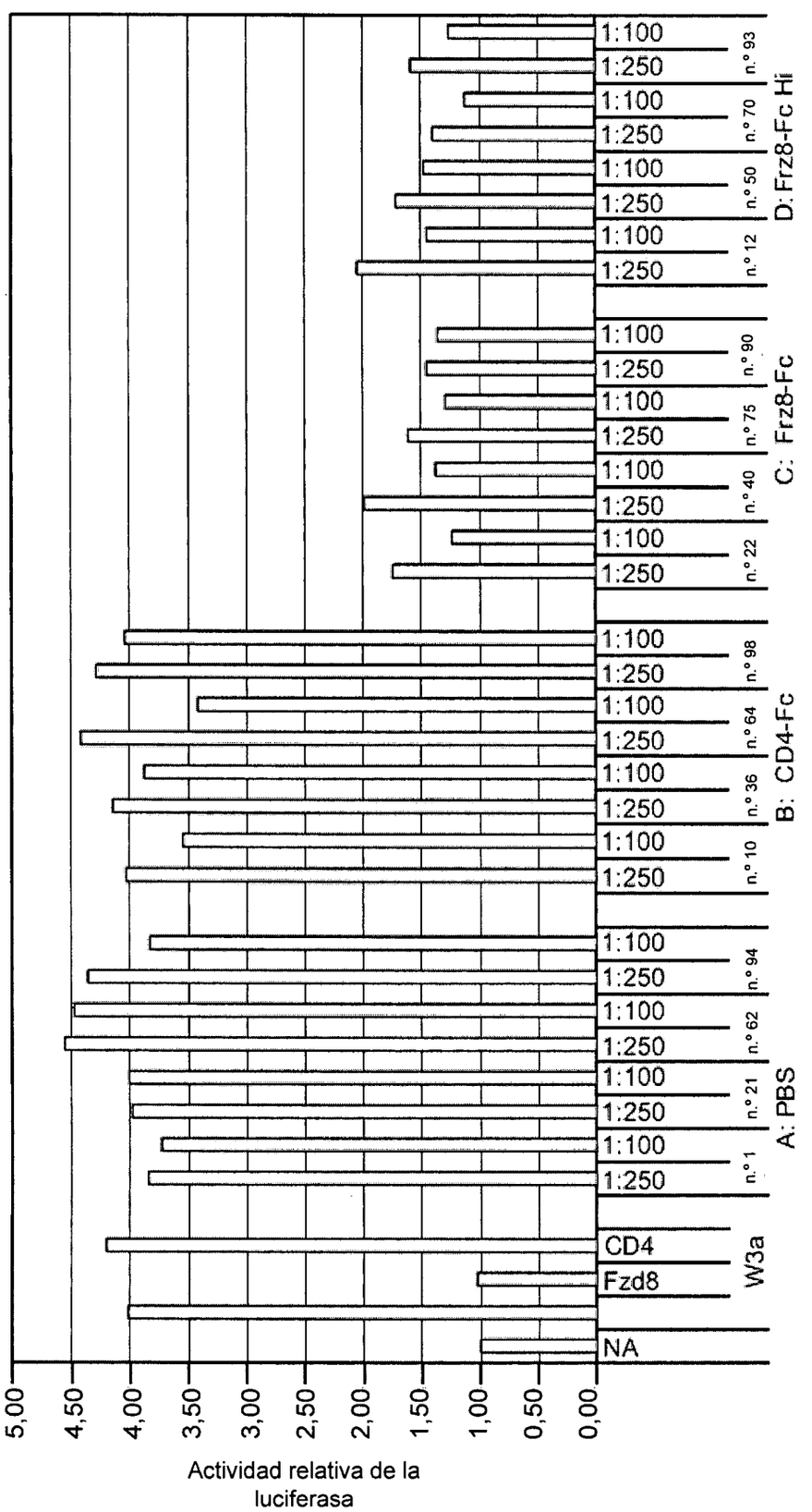

5,00
4,50
4,00
3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
Actividad relativa de la luciferasa
NA
Fzd8
CD4
W3a
1:250
1:100
n.° 1
n.° 21
n.° 62
n.° 94
A: PBS
n.° 10
n.° 36
n.° 64
n.° 98
B: CD4-Fc
n.° 22
n.° 40
n.° 75
n.° 90
C: Frz8-Fc
n.° 12
n.° 50
n.° 70
n.° 93
D: Frz8-Fc Hi

FIG. 27

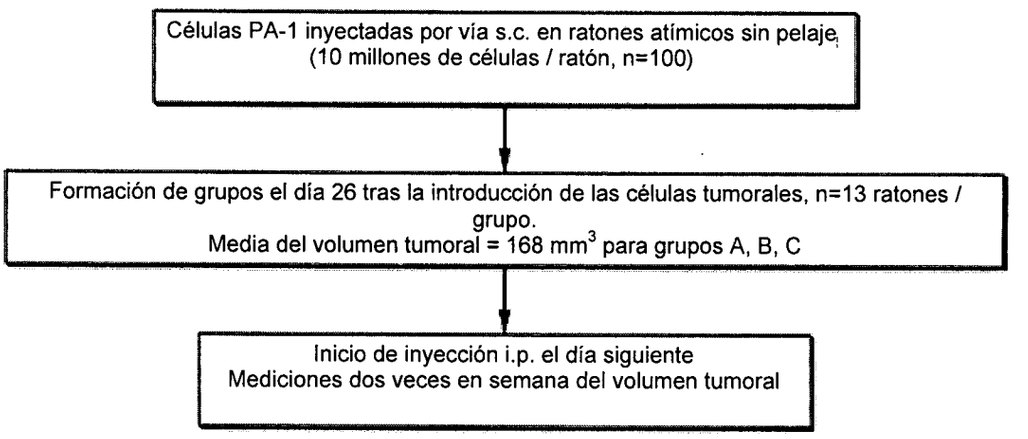


FIG. 28A

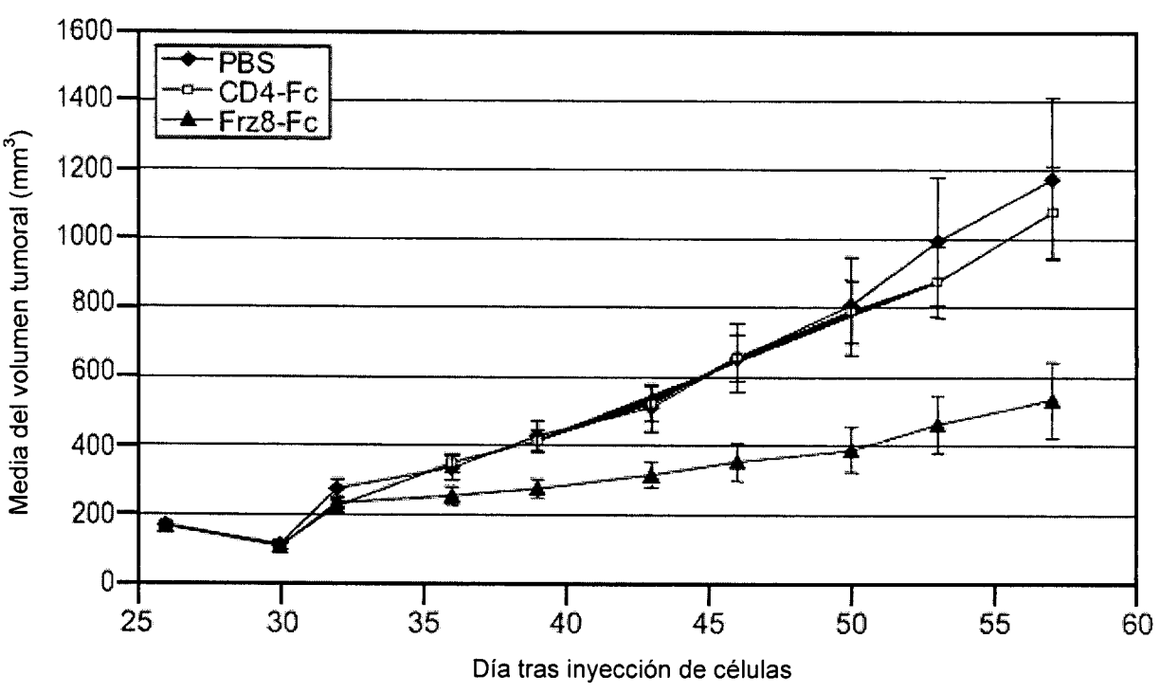


FIG. 28B

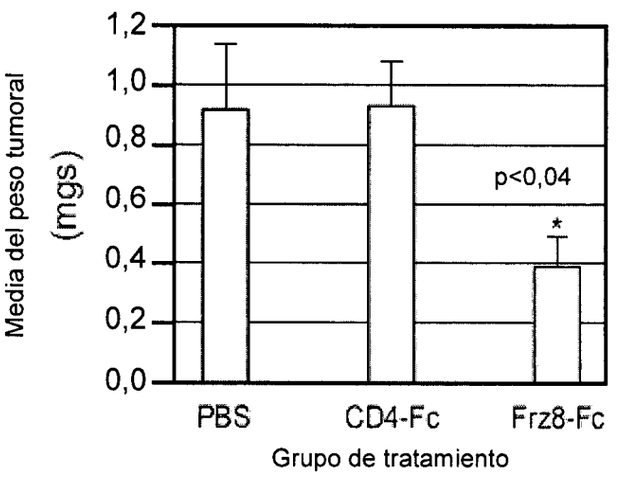


FIG. 28C

Media del volumen tumoral

	A-PBS		B-CD4		C-Frz8-Fc	
Día	**Media**	**SEM**	**Media**	**SEM**	**Media**	**SEM**
26	167,5	9,6	167,8	9,6	167,2	9,1
30	113,4	12,0	110,6	8,9	106,5	10,5
32	273,5	26,5	221,8	16,4	232,5	18,4
36	334,4	35,0	349,4	27,5	253,4	25,9
39	426,1	46,0	413,0	30,5	275,3	26,5
43	508,3	68,3	520,2	50,6	314,4	37,0
46	652,4	98,9	653,8	65,9	352,7	54,5
50	803,5	140,7	786,3	90,3	387,2	64,7
53	989,8	184,9	872,4	102,9	460,9	81,8
57	1170,0	232,2	1074,1	134,0	531,8	109,1

FIG. 28D

Media del % de cambio del volumen tumoral

	A-PBS		B-CD4		C-Frz8-Fc	
Día	**Media**	**SEM**	**Media**	**SEM**	**Media**	**SEM**
30	-33,5	5,3	-34,3	3,6	-37,4	3,5
32	61,5	11,6	32,6	7,7	38,7	6,3
36	96,8	16,2	108,8	12,6	49,1	9,5
39	152,5	22,6	155,4	18,4	62,7	10,0
43	197,7	35,1	223,2	32,2	84,9	14,4
46	279,9	50,8	304,0	38,7	104,6	22,2
50	363,8	68,8	385,7	52,6	123,2	28,7
53	476,1	96,8	443,3	61,1	164,8	35,5
57	579,2	121,2	562,7	72,6	203,1	49,2

FIG. 28E

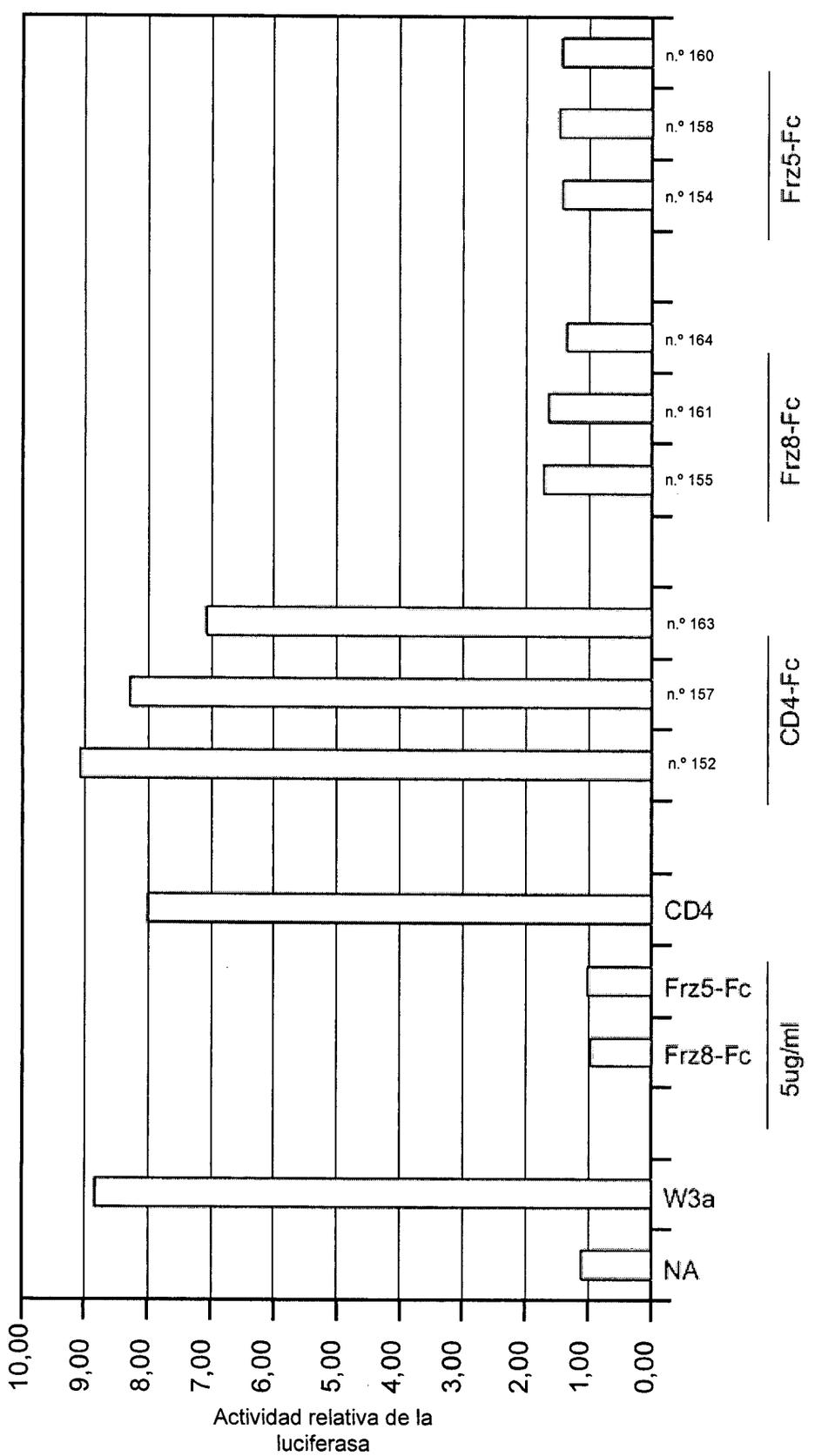

n.º 160
n.º 158
n.º 154
n.º 164
n.º 161
n.º 155
n.º 163
n.º 157
n.º 152
CD4
Frz5-Fc
Frz8-Fc
W3a
NA
Frz5-Fc
Frz8-Fc
CD4-Fc
5ug/ml
10,00
9,00
8,00
7,00
6,00
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
Actividad relativa de la luciferasa

FIG. 29

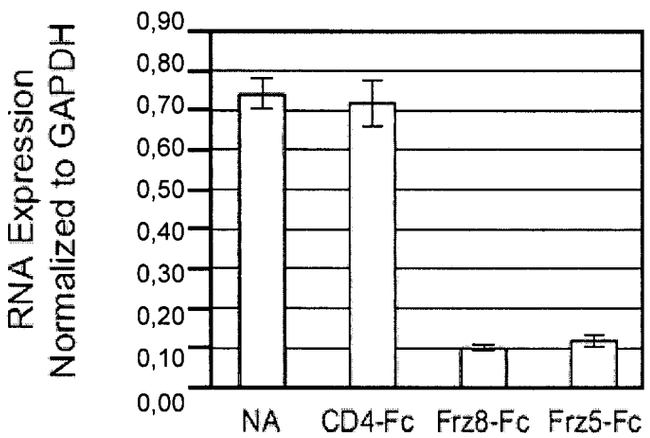


FIG. 30A

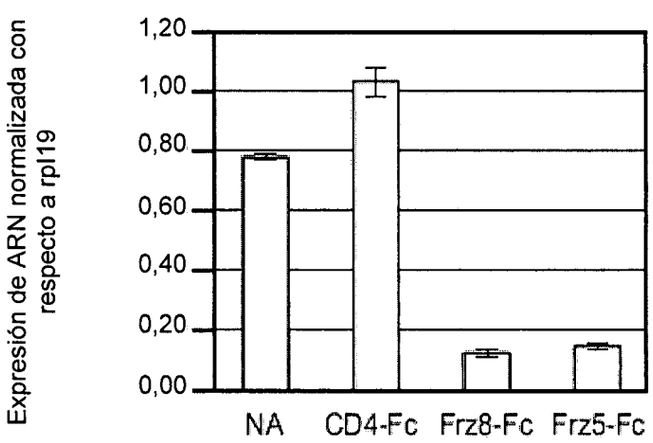


FIG. 30B

FIG. 31A-1

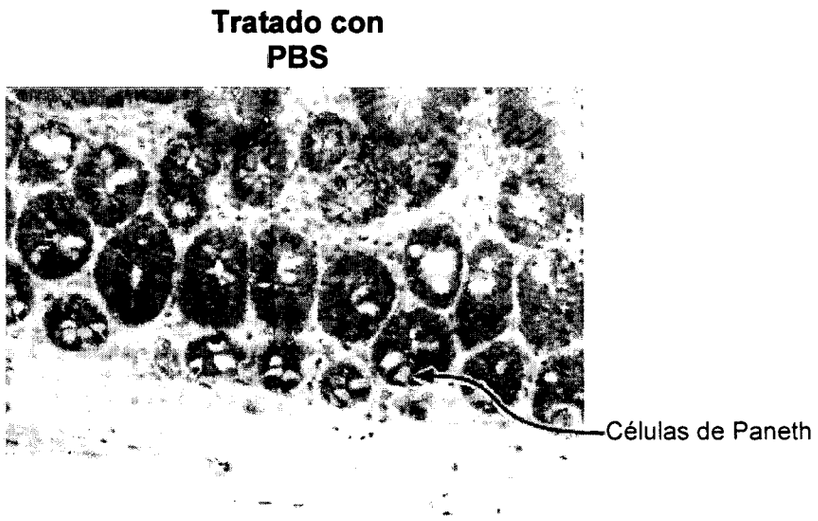
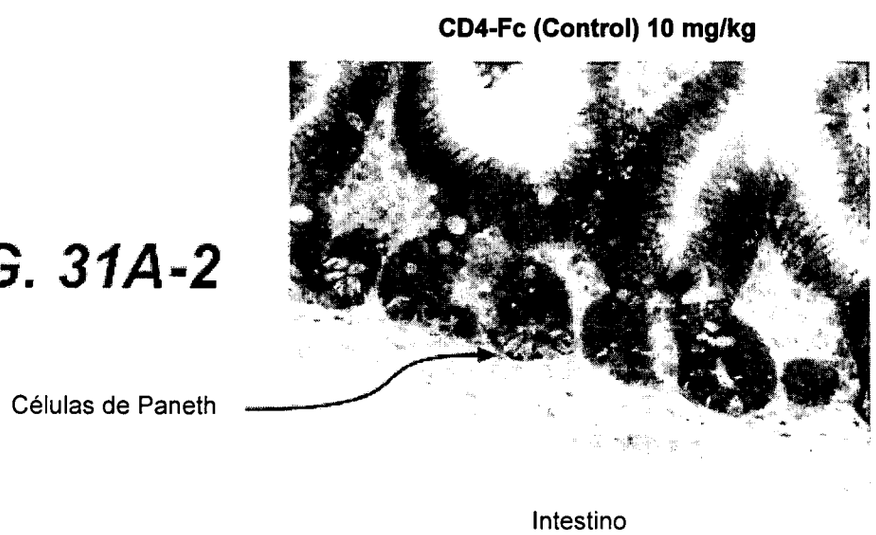
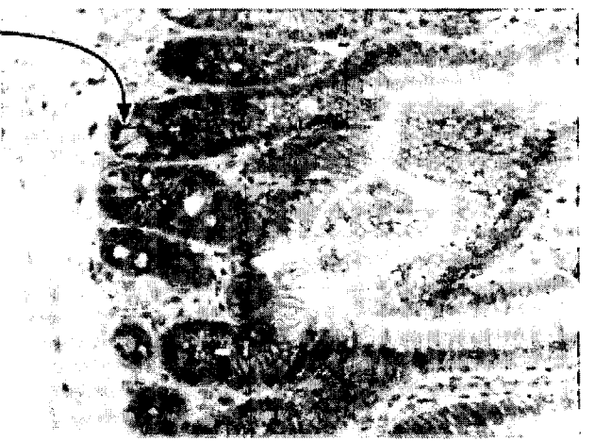


FIG. 31A-2



Frz8-Fc 10 mg/kg

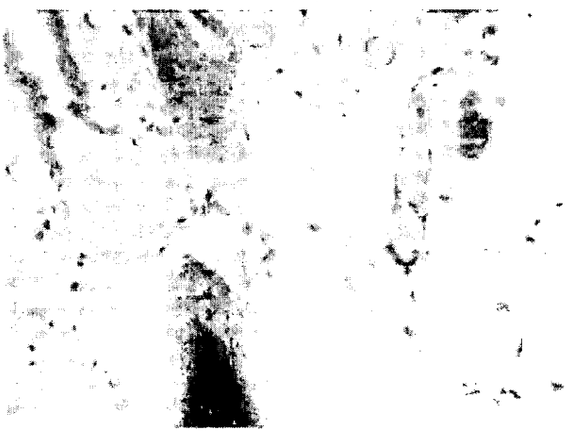
Células de Paneth



Intestino

FIG. 31A-3

Tratado con PBS

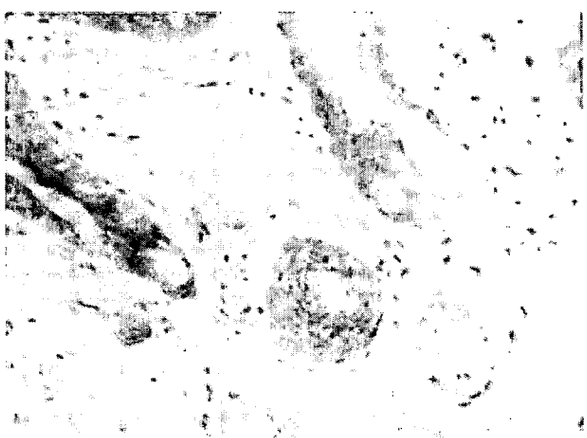


Piel

FIG. 31B-1

FIG. 31B-2

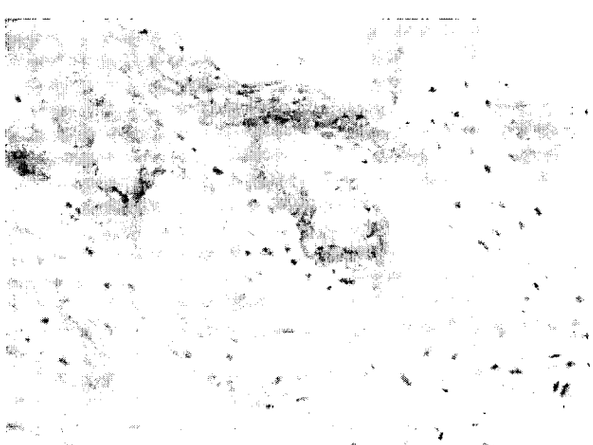
CD4-Fc (Control) 10 mg/kg



Piel

FIG. 31B-3

Frz8-Fc 10 mg/kg



Piel

Expresión de Wnt-1 en tumores humanos

Normal



FIG. 32A-1

Expresión de Wnt-1 en tumores humanos

Bajo grado



FIG. 32A-2

Expresión de Wnt-1 en tumores humanos

Alto grado

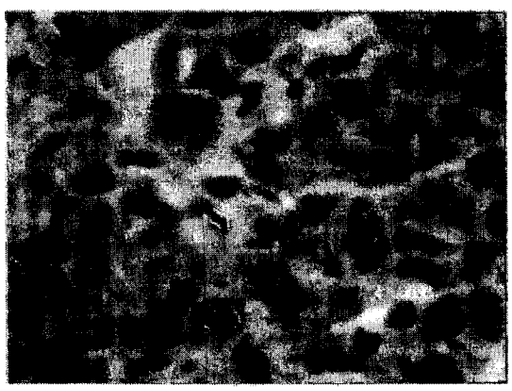
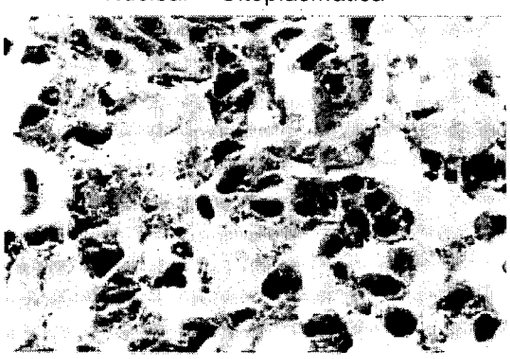


FIG. 32A-3

Localización nuclear y citoplasmática de la β-catenina en pacientes con cáncer de mama

Nuclear + Citoplasmática

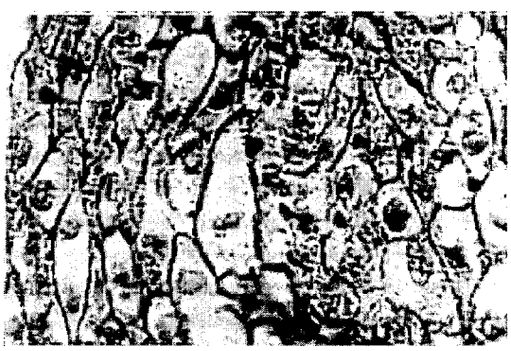


IHC de β-catenina

FIG. 32B-1

Localización nuclear y citoplasmática de la β-catenina en pacientes con cáncer de mama

Membrana plasmática



IHC de β-catenina

FIG. 32B-2

Localización nuclear y citoplasmática de la β-catenina en pacientes con cáncer de mama

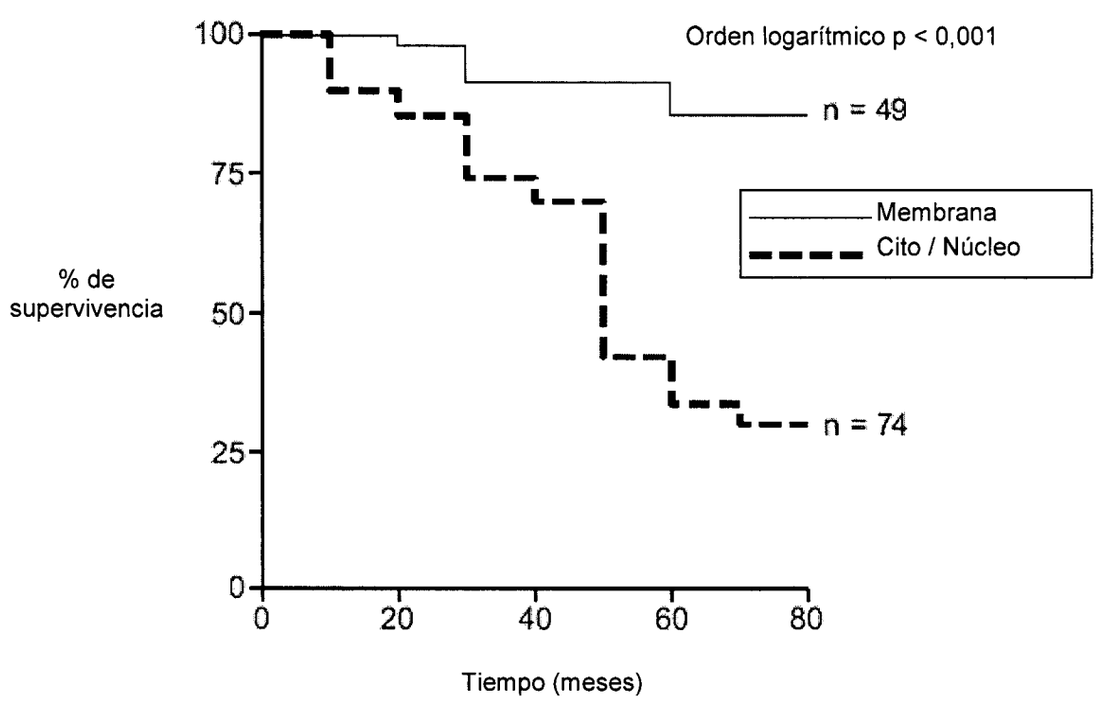


FIG. 32B-3

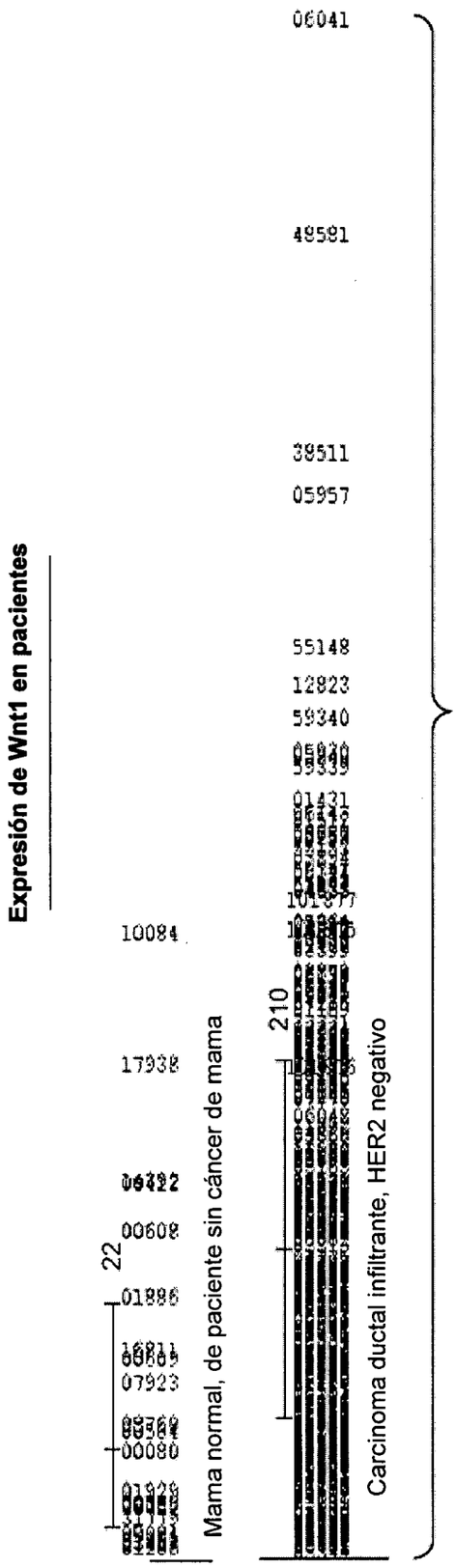

Expresión de Wnt1 en pacientes
22
210
Mama normal, de paciente sin cáncer de mama
Carcinoma ductal infiltrante, HER2 negativo

FIG. 32C

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC.
Ernst, James A.
Polakis, Paul
Rubinfeld, Bonnee
DeAlmeida, Venita I.

<120> WNT ANTAGONISTS AND THEIR USE IN THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF WNT-MEDIATED DISORDERS

<130> P2368R1 WO

<150> US 60/825,063
<151> 2006-09-08

<150> US 60/951,175
<151> 2007-07-20

<160> 129

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 646
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Met Ala Glu Glu Glu Ala Pro Lys Lys Ser Arg Ala Ala Gly Gly Gly
1               5                  10                  15

Ala Ser Trp Glu Leu Cys Ala Gly Ala Leu Ser Ala Arg Leu Ala Glu
            20                  25                  30

Glu Gly Ser Gly Asp Ala Gly Gly Arg Arg Arg Pro Pro Val Asp Pro
        35                  40                  45

Arg Arg Leu Ala Arg Gln Leu Leu Leu Leu Leu Trp Leu Leu Glu Ala
    50                  55                  60

Pro Leu Leu Leu Gly Val Arg Ala Gln Ala Ala Gly Gln Gly Pro Gly
65                  70                  75                  80

Gln Gly Pro Gly Pro Gly Gln Gln Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gln Gln
                85                  90                  95

Gln Ser Gly Gln Gln Tyr Asn Gly Glu Arg Gly Ile Ser Val Pro Asp
            100                 105                 110

His Gly Tyr Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala
        115                 120                 125

Tyr Asn Gln Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu
    130                 135                 140

Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln
145                 150                 155                 160
```

```
Cys Ser Ala Glu Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val
                165                 170                 175

Cys Thr Val Leu Glu Gln Ala Leu Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu
            180                 185                 190

Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln
        195                 200                 205

Trp Pro Asp Thr Leu Lys Cys Glu Lys Phe Pro Val His Gly Ala Gly
    210                 215                 220

Glu Leu Cys Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Lys Gly Thr Pro Thr Pro
225                 230                 235                 240

Ser Leu Leu Pro Glu Phe Trp Thr Ser Asn Pro Gln His Gly Gly Gly
                245                 250                 255

Gly His Arg Gly Gly Phe Pro Gly Gly Ala Gly Ala Ser Glu Arg Gly
            260                 265                 270

Lys Phe Ser Cys Pro Arg Ala Leu Lys Val Pro Ser Tyr Leu Asn Tyr
        275                 280                 285

His Phe Leu Gly Glu Lys Asp Cys Gly Ala Pro Cys Glu Pro Thr Lys
    290                 295                 300

Val Tyr Gly Leu Met Tyr Phe Gly Pro Glu Glu Leu Arg Phe Ser Arg
305                 310                 315                 320

Thr Trp Ile Gly Ile Trp Ser Val Leu Cys Cys Ala Ser Thr Leu Phe
                325                 330                 335

Thr Val Leu Thr Tyr Leu Val Asp Met Arg Arg Phe Ser Tyr Pro Glu
            340                 345                 350

Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Gly Cys Tyr Thr Ala Val Ala Val Ala
        355                 360                 365

Tyr Ile Ala Gly Phe Leu Leu Glu Asp Arg Val Val Cys Asn Asp Lys
    370                 375                 380

Phe Ala Glu Asp Gly Ala Arg Thr Val Ala Gln Gly Thr Lys Lys Glu
385                 390                 395                 400

Gly Cys Thr Ile Leu Phe Met Met Leu Tyr Phe Phe Ser Met Ala Ser
                405                 410                 415

Ser Ile Trp Trp Val Ile Leu Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly
            420                 425                 430
```

```
Met Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn Ser Gln Tyr Phe His
        435                 440                 445

Leu Ala Ala Trp Ala Val Pro Ala Ile Lys Thr Ile Thr Ile Leu Ala
    450                 455                 460

Leu Gly Gln Val Asp Gly Asp Val Leu Ser Gly Val Cys Phe Val Gly
465                 470                 475                 480

Leu Asn Asn Val Asp Ala Leu Arg Gly Phe Val Leu Ala Pro Leu Phe
                485                 490                 495

Val Tyr Leu Phe Ile Gly Thr Ser Phe Leu Leu Ala Gly Phe Val Ser
            500                 505                 510

Leu Phe Arg Ile Arg Thr Ile Met Lys His Asp Gly Thr Lys Thr Glu
        515                 520                 525

Lys Leu Glu Lys Leu Met Val Arg Ile Gly Val Phe Ser Val Leu Tyr
    530                 535                 540

Thr Val Pro Ala Thr Ile Val Ile Ala Cys Tyr Phe Tyr Glu Gln Ala
545                 550                 555                 560

Phe Arg Asp Gln Trp Glu Arg Ser Trp Val Ala Gln Ser Cys Lys Ser
                565                 570                 575

Tyr Ala Ile Pro Cys Pro His Leu Gln Ala Gly Gly Gly Ala Pro Pro
            580                 585                 590

His Pro Pro Met Ser Pro Asp Phe Thr Val Phe Met Ile Lys Tyr Leu
        595                 600                 605

Met Thr Leu Ile Val Gly Ile Thr Ser Gly Phe Trp Ile Trp Ser Gly
    610                 615                 620

Lys Thr Leu Asn Ser Trp Arg Lys Phe Tyr Thr Arg Leu Thr Asn Ser
625                 630                 635                 640

Lys Gln Gly Glu Thr Thr
                645
```

<210> 2
<211> 565
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Arg Pro Arg Ser Ala Leu Pro Arg Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu
1               5                   10                  15
```

```
Leu Pro Ala Ala Gly Pro Ala Gln Phe His Gly Glu Lys Gly Ile Ser
            20                  25                  30

Ile Pro Asp His Gly Phe Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr
        35                  40                  45

Asp Ile Ala Tyr Asn Gln Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr
    50                  55                  60

Asn Gln Glu Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val
65                  70                  75                  80

Lys Val Gln Cys Ser Pro Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr
                85                  90                  95

Ala Pro Val Cys Thr Val Leu Glu Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser
            100                 105                 110

Ile Cys Glu Ser Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe
        115                 120                 125

Gly Phe Gln Trp Pro Glu Arg Leu Arg Cys Glu His Phe Pro Arg His
    130                 135                 140

Gly Ala Glu Gln Ile Cys Val Gly Gln Asn His Ser Glu Asp Gly Ala
145                 150                 155                 160

Pro Ala Leu Leu Thr Thr Ala Pro Pro Pro Gly Leu Gln Pro Gly Ala
                165                 170                 175

Gly Gly Thr Pro Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ala Pro Pro Arg Tyr
            180                 185                 190

Ala Thr Leu Glu His Pro Phe His Cys Pro Arg Val Leu Lys Val Pro
        195                 200                 205

Ser Tyr Leu Ser Tyr Lys Phe Leu Gly Glu Arg Asp Cys Ala Ala Pro
    210                 215                 220

Cys Glu Pro Ala Arg Pro Asp Gly Ser Met Phe Phe Ser Gln Glu Glu
225                 230                 235                 240

Thr Arg Phe Ala Arg Leu Trp Ile Leu Thr Trp Ser Val Leu Cys Cys
                245                 250                 255

Ala Ser Thr Phe Phe Thr Val Thr Thr Tyr Leu Val Asp Met Gln Arg
            260                 265                 270

Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Gly Cys Tyr Thr
        275                 280                 285
```

```
Met Val Ser Val Ala Tyr Ile Ala Gly Phe Val Leu Gln Glu Arg Val
    290                 295                 300

Val Cys Asn Glu Arg Phe Ser Glu Asp Gly Tyr Arg Thr Val Val Gln
305                 310                 315                 320

Gly Thr Lys Lys Glu Gly Cys Thr Ile Leu Phe Met Met Leu Tyr Phe
                325                 330                 335

Phe Ser Met Ala Ser Ser Ile Trp Trp Val Ile Leu Ser Leu Thr Trp
            340                 345                 350

Phe Leu Ala Ala Gly Met Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn
        355                 360                 365

Ser Gln Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Ala Val Pro Ala Val Lys Thr
    370                 375                 380

Ile Thr Ile Leu Ala Met Gly Gln Ile Asp Gly Asp Leu Leu Ser Gly
385                 390                 395                 400

Val Cys Phe Val Gly Leu Asn Ser Leu Asp Pro Leu Arg Gly Phe Val
                405                 410                 415

Leu Ala Pro Leu Phe Val Tyr Leu Phe Ile Gly Thr Ser Phe Leu Leu
            420                 425                 430

Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe Arg Ile Arg Thr Ile Met Lys His Asp
        435                 440                 445

Gly Thr Lys Thr Glu Lys Leu Glu Arg Leu Met Val Arg Ile Gly Val
    450                 455                 460

Phe Ser Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala Thr Ile Val Ile Ala Cys Tyr
465                 470                 475                 480

Phe Tyr Glu Gln Ala Phe Arg Glu His Trp Glu Arg Ser Trp Val Ser
                485                 490                 495

Gln His Cys Lys Ser Leu Ala Ile Pro Cys Pro Ala His Tyr Thr Pro
            500                 505                 510

Arg Met Ser Pro Asp Phe Thr Val Tyr Met Ile Lys Tyr Leu Met Thr
        515                 520                 525

Leu Ile Val Gly Ile Thr Ser Gly Phe Trp Ile Trp Ser Gly Lys Thr
    530                 535                 540

Leu His Ser Trp Arg Lys Phe Tyr Thr Arg Leu Thr Asn Ser Arg His
545                 550                 555                 560
```

Gly Glu Thr Thr Val
565

<210> 3
<211> 666
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Met Thr Trp Ile Val Phe Ser Leu Trp Pro Leu Thr Val Phe
1 5 10 15

Met Gly His Ile Gly Gly His Ser Leu Phe Ser Cys Glu Pro Ile Thr
20 25 30

Leu Arg Met Cys Gln Asp Leu Pro Tyr Asn Thr Thr Phe Met Pro Asn
35 40 45

Leu Leu Asn His Tyr Asp Gln Gln Thr Ala Ala Leu Ala Met Glu Pro
50 55 60

Phe His Pro Met Val Asn Leu Asp Cys Ser Arg Asp Phe Arg Pro Phe
65 70 75 80

Leu Cys Ala Leu Tyr Ala Pro Ile Cys Met Glu Tyr Gly Arg Val Thr
85 90 95

Leu Pro Cys Arg Arg Leu Cys Gln Arg Ala Tyr Ser Glu Cys Ser Lys
100 105 110

Leu Met Glu Met Phe Gly Val Pro Trp Pro Glu Asp Met Glu Cys Ser
115 120 125

Arg Phe Pro Asp Cys Asp Glu Pro Tyr Pro Arg Leu Val Asp Leu Asn
130 135 140

Leu Ala Gly Glu Pro Thr Glu Gly Ala Pro Val Ala Val Gln Arg Asp
145 150 155 160

Tyr Gly Phe Trp Cys Pro Arg Glu Leu Lys Ile Asp Pro Asp Leu Gly
165 170 175

Tyr Ser Phe Leu His Val Arg Asp Cys Ser Pro Pro Cys Pro Asn Met
180 185 190

Tyr Phe Arg Arg Glu Glu Leu Ser Phe Ala Arg Tyr Phe Ile Gly Leu
195 200 205

Ile Ser Ile Ile Cys Leu Ser Ala Thr Leu Phe Thr Phe Leu Thr Phe
210 215 220

```
Leu Ile Asp Val Thr Arg Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe
225                 230                 235                 240

Tyr Ala Val Cys Tyr Met Met Val Ser Leu Ile Phe Phe Ile Gly Phe
                245                 250                 255

Leu Leu Glu Asp Arg Val Ala Cys Asn Ala Ser Ile Pro Ala Gln Tyr
            260                 265                 270

Lys Ala Ser Thr Val Thr Gln Gly Ser His Asn Lys Ala Cys Thr Met
        275                 280                 285

Leu Phe Met Ile Leu Tyr Phe Phe Thr Met Ala Gly Ser Val Trp Trp
    290                 295                 300

Val Ile Leu Thr Ile Thr Trp Phe Leu Ala Ala Val Pro Lys Trp Gly
305                 310                 315                 320

Ser Glu Ala Ile Glu Lys Lys Ala Leu Leu Phe His Ala Ser Ala Trp
                325                 330                 335

Gly Ile Pro Gly Thr Leu Thr Ile Ile Leu Leu Ala Met Asn Lys Ile
            340                 345                 350

Glu Gly Asp Asn Ile Ser Gly Val Cys Phe Val Gly Leu Tyr Asp Val
        355                 360                 365

Asp Ala Leu Arg Tyr Phe Val Leu Ala Pro Leu Cys Leu Tyr Val Val
    370                 375                 380

Val Gly Val Ser Leu Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Leu Asn Arg Val
385                 390                 395                 400

Arg Ile Glu Ile Pro Leu Glu Lys Glu Asn Gln Asp Lys Leu Val Lys
                405                 410                 415

Phe Met Ile Arg Ile Gly Val Phe Ser Ile Leu Tyr Leu Val Pro Leu
            420                 425                 430

Leu Val Val Ile Gly Cys Tyr Phe Tyr Glu Gln Ala Tyr Arg Gly Ile
        435                 440                 445

Trp Glu Thr Thr Trp Ile Gln Glu Arg Cys Arg Glu Tyr His Ile Pro
    450                 455                 460

Cys Pro Tyr Gln Val Thr Gln Met Ser Arg Pro Asp Leu Ile Leu Phe
465                 470                 475                 480

Leu Met Lys Tyr Leu Met Ala Leu Ile Val Gly Ile Pro Ser Val Phe
                485                 490                 495
```

```
Trp Val Gly Ser Lys Lys Thr Cys Phe Glu Trp Ala Ser Phe Phe His
            500                 505                 510

Gly Arg Arg Lys Lys Glu Ile Val Asn Glu Ser Arg Gln Val Leu Gln
        515                 520                 525

Glu Pro Asp Phe Ala Gln Ser Leu Leu Arg Asp Pro Asn Thr Pro Ile
    530                 535                 540

Ile Arg Lys Ser Arg Gly Thr Ser Thr Gln Gly Thr Ser Thr His Ala
545                 550                 555                 560

Ser Ser Thr Gln Leu Ala Met Val Asp Asp Gln Arg Ser Lys Ala Gly
                565                 570                 575

Ser Ile His Ser Lys Val Ser Ser Tyr His Gly Ser Leu His Arg Ser
            580                 585                 590

Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Pro Cys Ser Tyr Arg Gly Met Glu Glu Arg
        595                 600                 605

Leu Pro His Gly Ser Met Ser Arg Leu Thr Asp His Ser Arg His Ser
    610                 615                 620

Ser Ser His Arg Leu Asn Glu Gln Ser Arg His Ser Ser Ile Arg Asp
625                 630                 635                 640

Leu Ser Asn Asn Pro Met Thr His Ile Thr His Gly Thr Ser Met Asn
                645                 650                 655

Arg Val Ile Glu Glu Asp Gly Thr Ser Ala
            660                 665
```

<210> 4
<211> 537
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

```
Met Ala Trp Arg Gly Ala Gly Pro Ser Val Pro Gly Ala Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Val Gly Leu Ser Leu Gly Leu Leu Leu Gln Leu Leu Leu Leu Leu Gly
            20                  25                  30

Pro Ala Arg Gly Phe Gly Asp Glu Glu Glu Arg Arg Cys Asp Pro Ile
        35                  40                  45

Arg Ile Ser Met Cys Gln Asn Leu Gly Tyr Asn Val Thr Lys Met Pro
    50                  55                  60

Asn Leu Val Gly His Glu Leu Gln Thr Asp Ala Glu Leu Gln Leu Thr
```

65 70 75 80

Thr Phe Thr Pro Leu Ile Gln Tyr Gly Cys Ser Ser Gln Leu Gln Phe
85 90 95

Phe Leu Cys Ser Val Tyr Val Pro Met Cys Thr Glu Lys Ile Asn Ile
100 105 110

Pro Ile Gly Pro Cys Gly Gly Met Cys Leu Ser Val Lys Arg Arg Cys
115 120 125

Glu Pro Val Leu Lys Glu Phe Gly Phe Ala Trp Pro Glu Ser Leu Asn
130 135 140

Cys Ser Lys Phe Pro Pro Gln Asn Asp His Asn His Met Cys Met Glu
145 150 155 160

Gly Pro Gly Asp Glu Glu Val Pro Leu Pro His Lys Thr Pro Ile Gln
165 170 175

Pro Gly Glu Glu Cys His Ser Val Gly Thr Asn Ser Asp Gln Tyr Ile
180 185 190

Trp Val Lys Arg Ser Leu Asn Cys Val Leu Lys Cys Gly Tyr Asp Ala
195 200 205

Gly Leu Tyr Ser Arg Ser Ala Lys Glu Phe Thr Asp Ile Trp Met Ala
210 215 220

Val Trp Ala Ser Leu Cys Phe Ile Ser Thr Ala Phe Thr Val Leu Thr
225 230 235 240

Phe Leu Ile Asp Ser Ser Arg Phe Ser Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile
245 250 255

Phe Leu Ser Met Cys Tyr Asn Ile Tyr Ser Ile Ala Tyr Ile Val Arg
260 265 270

Leu Thr Val Gly Arg Glu Arg Ile Ser Cys Asp Phe Glu Glu Ala Ala
275 280 285

Glu Pro Val Leu Ile Gln Glu Gly Leu Lys Asn Thr Gly Cys Ala Ile
290 295 300

Ile Phe Leu Leu Met Tyr Phe Phe Gly Met Ala Ser Ser Ile Trp Trp
305 310 315 320

Val Ile Leu Thr Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Leu Lys Trp Gly
325 330 335

His Glu Ala Ile Glu Met His Ser Ser Tyr Phe His Ile Ala Ala Trp

```
            340                 345                 350

Ala Ile Pro Ala Val Lys Thr Ile Val Ile Leu Ile Met Arg Leu Val
        355                 360                 365

Asp Ala Asp Glu Leu Thr Gly Leu Cys Tyr Val Gly Asn Gln Asn Leu
    370                 375                 380

Asp Ala Leu Thr Gly Phe Val Val Ala Pro Leu Phe Thr Tyr Leu Val
385                 390                 395                 400

Ile Gly Thr Leu Phe Ile Ala Ala Gly Leu Val Ala Leu Phe Lys Ile
                405                 410                 415

Arg Ser Asn Leu Gln Lys Asp Gly Thr Lys Thr Asp Lys Leu Glu Arg
            420                 425                 430

Leu Met Val Lys Ile Gly Val Phe Ser Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala
        435                 440                 445

Thr Cys Val Ile Ala Cys Tyr Phe Tyr Glu Ile Ser Asn Trp Ala Leu
    450                 455                 460

Phe Arg Tyr Ser Ala Asp Asp Ser Asn Met Ala Val Glu Met Leu Lys
465                 470                 475                 480

Ile Phe Met Ser Leu Leu Val Gly Ile Thr Ser Gly Met Trp Ile Trp
                485                 490                 495

Ser Ala Lys Thr Leu His Thr Trp Gln Lys Cys Ser Asn Arg Leu Val
            500                 505                 510

Asn Ser Gly Lys Val Lys Arg Glu Lys Arg Gly Asn Gly Trp Val Lys
        515                 520                 525

Pro Gly Lys Gly Ser Glu Thr Val Val
    530                 535


<210>  5
<211>  585
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  5

Met Ala Arg Pro Asp Pro Ser Ala Pro Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu
1               5                   10                  15

Leu Ala Gln Leu Val Gly Arg Ala Ala Ala Ala Ser Lys Ala Pro Val
            20                  25                  30

Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Met Cys Arg Gly Ile Gly Tyr Asn Leu
        35                  40                  45
```

```
Thr His Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu Ala Gly
    50                  55                  60

Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys Ser Pro
65                  70                  75                  80

Asp Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr Pro Ile Cys Leu Pro
                85                  90                  95

Asp Tyr His Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu Arg Ala
            100                 105                 110

Lys Ala Gly Cys Ser Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala Trp Pro
        115                 120                 125

Glu Arg Met Ser Cys Asp Arg Leu Pro Val Leu Gly Arg Asp Ala Glu
    130                 135                 140

Val Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Ser Glu Ala Thr Thr Ala Pro Pro
145                 150                 155                 160

Arg Pro Phe Pro Ala Lys Pro Thr Leu Pro Gly Pro Pro Gly Ala Pro
                165                 170                 175

Ala Ser Gly Gly Glu Cys Pro Ala Gly Gly Pro Phe Val Cys Lys Cys
            180                 185                 190

Arg Glu Pro Phe Val Pro Ile Leu Lys Glu Ser His Pro Leu Tyr Asn
        195                 200                 205

Lys Val Arg Thr Gly Gln Val Pro Asn Cys Ala Val Pro Cys Tyr Gln
    210                 215                 220

Pro Ser Phe Ser Ala Asp Glu Arg Thr Phe Ala Thr Phe Trp Ile Gly
225                 230                 235                 240

Leu Trp Ser Val Leu Cys Phe Ile Ser Thr Ser Thr Thr Val Ala Thr
                245                 250                 255

Phe Leu Ile Asp Met Glu Arg Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile
            260                 265                 270

Phe Leu Ser Ala Cys Tyr Leu Cys Val Ser Leu Gly Phe Leu Val Arg
        275                 280                 285

Leu Val Val Gly His Ala Ser Val Ala Cys Ser Arg Glu His Asn His
    290                 295                 300

Ile His Tyr Glu Thr Thr Gly Pro Ala Leu Cys Thr Ile Val Phe Leu
305                 310                 315                 320
```

```
Leu Val Tyr Phe Phe Gly Met Ala Ser Ser Ile Trp Trp Val Ile Leu
                325                 330                 335

Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Met Lys Trp Gly Asn Glu Ala
            340                 345                 350

Ile Ala Gly Tyr Ala Gln Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Leu Ile Pro
        355                 360                 365

Ser Val Lys Ser Ile Thr Ala Leu Ala Leu Ser Ser Val Asp Gly Asp
    370                 375                 380

Pro Val Ala Gly Ile Cys Tyr Val Gly Asn Gln Asn Leu Asn Ser Leu
385                 390                 395                 400

Arg Gly Phe Val Leu Gly Pro Leu Val Leu Tyr Leu Leu Val Gly Thr
                405                 410                 415

Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe Arg Ile Arg Ser Val
            420                 425                 430

Ile Lys Gln Gly Gly Thr Lys Thr Asp Lys Leu Glu Lys Leu Met Ile
        435                 440                 445

Arg Ile Gly Ile Phe Thr Leu Leu Tyr Thr Val Pro Ala Ser Ile Val
    450                 455                 460

Val Ala Cys Tyr Leu Tyr Glu Gln His Tyr Arg Glu Ser Trp Glu Ala
465                 470                 475                 480

Ala Leu Thr Cys Ala Cys Pro Gly His Asp Thr Gly Gln Pro Arg Ala
                485                 490                 495

Lys Pro Glu Tyr Trp Val Leu Met Leu Lys Tyr Phe Met Cys Leu Val
            500                 505                 510

Val Gly Ile Thr Ser Gly Val Trp Ile Trp Ser Gly Lys Thr Val Glu
        515                 520                 525

Ser Trp Arg Arg Phe Thr Ser Arg Cys Cys Cys Arg Pro Arg Arg Gly
    530                 535                 540

His Lys Ser Gly Gly Ala Met Ala Ala Gly Asp Tyr Pro Glu Ala Ser
545                 550                 555                 560

Ala Ala Leu Thr Gly Arg Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ala Ala Thr Tyr
                565                 570                 575

His Lys Gln Val Ser Leu Ser His Val
            580                 585
```

<210> 6
<211> 706
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

```
Met Glu Met Phe Thr Phe Leu Leu Thr Cys Ile Phe Leu Pro Leu Leu
1               5                  10                  15

Arg Gly His Ser Leu Phe Thr Cys Glu Pro Ile Thr Val Pro Arg Cys
            20                  25                  30

Met Lys Met Ala Tyr Asn Met Thr Phe Phe Pro Asn Leu Met Gly His
        35                  40                  45

Tyr Asp Gln Ser Ile Ala Ala Val Glu Met Glu His Phe Leu Pro Leu
    50                  55                  60

Ala Asn Leu Glu Cys Ser Pro Asn Ile Glu Thr Phe Leu Cys Lys Ala
65                  70                  75                  80

Phe Val Pro Thr Cys Ile Glu Gln Ile His Val Val Pro Pro Cys Arg
                85                  90                  95

Lys Leu Cys Glu Lys Val Tyr Ser Asp Cys Lys Lys Leu Ile Asp Thr
            100                 105                 110

Phe Gly Ile Arg Trp Pro Glu Glu Leu Glu Cys Asp Arg Leu Gln Tyr
        115                 120                 125

Cys Asp Glu Thr Val Pro Val Thr Phe Asp Pro His Thr Glu Phe Leu
    130                 135                 140

Gly Pro Gln Lys Lys Thr Glu Gln Val Gln Arg Asp Ile Gly Phe Trp
145                 150                 155                 160

Cys Pro Arg His Leu Lys Thr Ser Gly Gly Gln Gly Tyr Lys Phe Leu
                165                 170                 175

Gly Ile Asp Gln Cys Ala Pro Pro Cys Pro Asn Met Tyr Phe Lys Ser
            180                 185                 190

Asp Glu Leu Glu Phe Ala Lys Ser Phe Ile Gly Thr Val Ser Ile Phe
        195                 200                 205

Cys Leu Cys Ala Thr Leu Phe Thr Phe Leu Thr Phe Leu Ile Asp Val
    210                 215                 220

Arg Arg Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Tyr Tyr Ser Val Cys
225                 230                 235                 240
```

```
Tyr Ser Ile Val Ser Leu Met Tyr Phe Ile Gly Phe Leu Leu Gly Asp
                245                 250                 255

Ser Thr Ala Cys Asn Lys Ala Asp Glu Lys Leu Glu Leu Gly Asp Thr
            260                 265                 270

Val Val Leu Gly Ser Gln Asn Lys Ala Cys Thr Val Leu Phe Met Leu
        275                 280                 285

Leu Tyr Phe Phe Thr Met Ala Gly Thr Val Trp Trp Val Ile Leu Thr
    290                 295                 300

Ile Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Arg Lys Trp Ser Cys Glu Ala Ile
305                 310                 315                 320

Glu Gln Lys Ala Val Trp Phe His Ala Val Ala Trp Gly Thr Pro Gly
                325                 330                 335

Phe Leu Thr Val Met Leu Leu Ala Met Asn Lys Val Glu Gly Asp Asn
            340                 345                 350

Ile Ser Gly Val Cys Phe Val Gly Leu Tyr Asp Leu Asp Ala Ser Arg
        355                 360                 365

Tyr Phe Val Leu Leu Pro Leu Cys Leu Cys Val Phe Val Gly Leu Ser
    370                 375                 380

Leu Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Leu Asn His Val Arg Gln Val Ile
385                 390                 395                 400

Gln His Asp Gly Arg Asn Gln Glu Lys Leu Lys Lys Phe Met Ile Arg
                405                 410                 415

Ile Gly Val Phe Ser Gly Leu Tyr Leu Val Pro Leu Val Thr Leu Leu
            420                 425                 430

Gly Cys Tyr Val Tyr Glu Gln Val Asn Arg Ile Thr Trp Glu Ile Thr
        435                 440                 445

Trp Val Ser Asp His Cys Arg Gln Tyr His Ile Pro Cys Pro Tyr Gln
    450                 455                 460

Ala Lys Ala Lys Ala Arg Pro Glu Leu Ala Leu Phe Met Ile Lys Tyr
465                 470                 475                 480

Leu Met Thr Leu Ile Val Gly Ile Ser Ala Val Phe Trp Val Gly Ser
                485                 490                 495

Lys Lys Thr Cys Thr Glu Trp Ala Gly Phe Phe Lys Arg Asn Arg Lys
            500                 505                 510
```

```
Arg Asp Pro Ile Ser Glu Ser Arg Arg Val Leu Gln Glu Ser Cys Glu
        515                 520                 525

Phe Phe Leu Lys His Asn Ser Lys Val Lys His Lys Lys Lys His Tyr
    530                 535                 540

Lys Pro Ser Ser His Lys Leu Lys Val Ile Ser Lys Ser Met Gly Thr
545                 550                 555                 560

Ser Thr Gly Ala Thr Ala Asn His Gly Thr Ser Ala Val Ala Ile Thr
                565                 570                 575

Ser His Asp Tyr Leu Gly Gln Glu Thr Leu Thr Glu Ile Gln Thr Ser
            580                 585                 590

Pro Glu Thr Ser Met Arg Glu Val Lys Ala Asp Gly Ala Ser Thr Pro
        595                 600                 605

Arg Leu Arg Glu Gln Asp Cys Gly Glu Pro Ala Ser Pro Ala Ala Ser
    610                 615                 620

Ile Ser Arg Leu Ser Gly Glu Gln Val Asp Gly Lys Gly Gln Ala Gly
625                 630                 635                 640

Ser Val Ser Glu Ser Ala Arg Ser Glu Gly Arg Ile Ser Pro Lys Ser
                645                 650                 655

Asp Ile Thr Asp Thr Gly Leu Ala Gln Ser Asn Asn Leu Gln Val Pro
            660                 665                 670

Ser Ser Ser Glu Pro Ser Ser Leu Lys Gly Ser Thr Ser Leu Leu Val
        675                 680                 685

His Pro Val Ser Gly Val Arg Lys Glu Gln Gly Gly Gly Cys His Ser
    690                 695                 700

Asp Thr
705
```

<210> 7
<211> 574
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

```
Met Arg Asp Pro Gly Ala Ala Ala Pro Leu Ser Ser Leu Gly Leu Cys
1               5                   10                  15

Ala Leu Val Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu Ser Ala Gly Ala Gly Ala
            20                  25                  30
```

```
Gln Pro Tyr His Gly Glu Lys Gly Ile Ser Val Pro Asp His Gly Phe
        35                  40                  45

Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln
    50                  55                  60

Thr Ile Leu Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly
65                  70                  75                  80

Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser Pro
                85                  90                  95

Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val
            100                 105                 110

Leu Asp Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg
        115                 120                 125

Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu
    130                 135                 140

Arg Leu Arg Cys Glu Asn Phe Pro Val His Gly Ala Gly Glu Ile Cys
145                 150                 155                 160

Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Gly Ser Gly Gly Pro Gly Gly Gly Pro
                165                 170                 175

Thr Ala Tyr Pro Thr Ala Pro Tyr Leu Pro Asp Leu Pro Phe Thr Ala
            180                 185                 190

Leu Pro Pro Gly Ala Ser Asp Gly Arg Gly Arg Pro Ala Phe Pro Phe
        195                 200                 205

Ser Cys Pro Arg Gln Leu Lys Val Pro Pro Tyr Leu Gly Tyr Arg Phe
    210                 215                 220

Leu Gly Glu Arg Asp Cys Gly Ala Pro Cys Glu Pro Gly Arg Ala Asn
225                 230                 235                 240

Gly Leu Met Tyr Phe Lys Glu Glu Glu Arg Arg Phe Ala Arg Leu Trp
                245                 250                 255

Val Gly Val Trp Ser Val Leu Cys Cys Ala Ser Thr Leu Phe Thr Val
            260                 265                 270

Leu Thr Tyr Leu Val Asp Met Arg Arg Phe Ser Tyr Pro Glu Arg Pro
        275                 280                 285

Ile Ile Phe Leu Ser Gly Cys Tyr Phe Met Val Ala Val Ala His Val
    290                 295                 300
```

```
Ala Gly Phe Leu Leu Glu Asp Arg Ala Val Cys Val Glu Arg Phe Ser
305                 310                 315                 320

Asp Asp Gly Tyr Arg Thr Val Ala Gln Gly Thr Lys Lys Glu Gly Cys
                325                 330                 335

Thr Ile Leu Phe Met Val Leu Tyr Phe Phe Gly Met Ala Ser Ser Ile
            340                 345                 350

Trp Trp Val Ile Leu Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Met Lys
        355                 360                 365

Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn Ser Gln Tyr Phe His Leu Ala
    370                 375                 380

Ala Trp Ala Val Pro Ala Val Lys Thr Ile Thr Ile Leu Ala Met Gly
385                 390                 395                 400

Gln Val Asp Gly Asp Leu Leu Ser Gly Val Cys Tyr Val Gly Leu Ser
                405                 410                 415

Ser Val Asp Ala Leu Arg Gly Phe Val Leu Ala Pro Leu Phe Val Tyr
            420                 425                 430

Leu Phe Ile Gly Thr Ser Phe Leu Leu Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe
        435                 440                 445

Arg Ile Arg Thr Ile Met Lys His Asp Gly Thr Lys Thr Glu Lys Leu
    450                 455                 460

Glu Lys Leu Met Val Arg Ile Gly Val Phe Ser Val Leu Tyr Thr Val
465                 470                 475                 480

Pro Ala Thr Ile Val Leu Ala Cys Tyr Phe Tyr Glu Gln Ala Phe Arg
                485                 490                 495

Glu His Trp Glu Arg Thr Trp Leu Leu Gln Thr Cys Lys Ser Tyr Ala
            500                 505                 510

Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Pro Pro Met Ser Pro Asp Phe Thr
        515                 520                 525

Val Phe Met Ile Lys Tyr Leu Met Thr Met Ile Val Gly Ile Thr Thr
    530                 535                 540

Gly Phe Trp Ile Trp Ser Gly Lys Thr Leu Gln Ser Trp Arg Arg Phe
545                 550                 555                 560

Tyr His Arg Leu Ser His Ser Ser Lys Gly Glu Thr Ala Val
                565                 570
```

<210> 8
<211> 694
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

```
Met Glu Trp Gly Tyr Leu Leu Glu Val Thr Ser Leu Leu Ala Ala Leu
1               5                  10                  15

Ala Leu Leu Gln Arg Ser Ser Gly Ala Ala Ala Ala Ser Ala Lys Glu
            20                  25                  30

Leu Ala Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Leu Cys Lys Gly Ile Gly Tyr
        35                  40                  45

Asn Tyr Thr Tyr Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu
    50                  55                  60

Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys
65                  70                  75                  80

Ser Pro Asp Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr Pro Ile Cys
                85                  90                  95

Leu Glu Asp Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu
            100                 105                 110

Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala
        115                 120                 125

Trp Pro Asp Arg Met Arg Cys Asp Arg Leu Pro Glu Gln Gly Asn Pro
    130                 135                 140

Asp Thr Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Thr Asp Leu Thr Thr Ala Ala
145                 150                 155                 160

Pro Ser Pro Pro Arg Arg Leu Pro Pro Pro Pro Pro Gly Glu Gln Pro
                165                 170                 175

Pro Ser Gly Ser Gly His Gly Arg Pro Pro Gly Ala Arg Pro Pro His
            180                 185                 190

Arg Gly Gly Gly Arg Gly Gly Gly Gly Gly Asp Ala Ala Ala Pro Pro
        195                 200                 205

Ala Arg Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys Ala Arg Pro Pro Gly Gly Gly
    210                 215                 220

Ala Ala Pro Cys Glu Pro Gly Cys Gln Cys Arg Ala Pro Met Val Ser
225                 230                 235                 240

Val Ser Ser Glu Arg His Pro Leu Tyr Asn Arg Val Lys Thr Gly Gln
```

```
                245                 250                 255

Ile Ala Asn Cys Ala Leu Pro Cys His Asn Pro Phe Phe Ser Gln Asp
            260                 265                 270

Glu Arg Ala Phe Thr Val Phe Trp Ile Gly Leu Trp Ser Val Leu Cys
        275                 280                 285

Phe Val Ser Thr Phe Ala Thr Val Ser Thr Phe Leu Ile Asp Met Glu
    290                 295                 300

Arg Phe Lys Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Ala Cys Tyr
305                 310                 315                 320

Leu Phe Val Ser Val Gly Tyr Leu Val Arg Leu Val Ala Gly His Glu
                325                 330                 335

Lys Val Ala Cys Ser Gly Gly Ala Pro Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly
            340                 345                 350

Ala Gly Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly Ala Gly
        355                 360                 365

Gly Pro Gly Gly Arg Gly Glu Tyr Glu Glu Leu Gly Ala Val Glu Gln
    370                 375                 380

His Val Arg Tyr Glu Thr Thr Gly Pro Ala Leu Cys Thr Val Val Phe
385                 390                 395                 400

Leu Leu Val Tyr Phe Phe Gly Met Ala Ser Ser Ile Trp Trp Val Ile
                405                 410                 415

Leu Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Met Lys Trp Gly Asn Glu
            420                 425                 430

Ala Ile Ala Gly Tyr Ser Gln Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Leu Val
        435                 440                 445

Pro Ser Val Lys Ser Ile Ala Val Leu Ala Leu Ser Ser Val Asp Gly
    450                 455                 460

Asp Pro Val Ala Gly Ile Cys Tyr Val Gly Asn Gln Ser Leu Asp Asn
465                 470                 475                 480

Leu Arg Gly Phe Val Leu Ala Pro Leu Val Ile Tyr Leu Phe Ile Gly
                485                 490                 495

Thr Met Phe Leu Leu Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe Arg Ile Arg Ser
            500                 505                 510

Val Ile Lys Gln Gln Asp Gly Pro Thr Lys Thr His Lys Leu Glu Lys
```

515 520 525

Leu Met Ile Arg Leu Gly Leu Phe Thr Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala
530 535 540

Ala Val Val Val Ala Cys Leu Phe Tyr Glu Gln His Asn Arg Pro Arg
545 550 555 560

Trp Glu Ala Thr His Asn Cys Pro Cys Leu Arg Asp Leu Gln Pro Asp
565 570 575

Gln Ala Arg Arg Pro Asp Tyr Ala Val Phe Met Leu Lys Tyr Phe Met
580 585 590

Cys Leu Val Val Gly Ile Thr Ser Gly Val Trp Val Trp Ser Gly Lys
595 600 605

Thr Leu Glu Ser Trp Arg Ser Leu Cys Thr Arg Cys Cys Trp Ala Ser
610 615 620

Lys Gly Ala Ala Val Gly Gly Gly Ala Gly Ala Thr Ala Ala Gly Gly
625 630 635 640

Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly
645 650 655

Gly Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Leu Tyr Ser Asp Val Ser Thr Gly
660 665 670

Leu Thr Trp Arg Ser Gly Thr Ala Ser Ser Val Ser Tyr Pro Lys Gln
675 680 685

Met Pro Leu Ser Gln Val
690

<210> 9
<211> 591
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ala Val Ala Pro Leu Arg Gly Ala Leu Leu Leu Trp Gln Leu Leu
1 5 10 15

Ala Ala Gly Gly Ala Ala Leu Glu Ile Gly Arg Phe Asp Pro Glu Arg
20 25 30

Gly Arg Gly Ala Ala Pro Cys Gln Ala Val Glu Ile Pro Met Cys Arg
35 40 45

Gly Ile Gly Tyr Asn Leu Thr Arg Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr
50 55 60

```
Ser Gln Gly Glu Ala Ala Ala Glu Leu Ala Glu Phe Ala Pro Leu Val
65                  70                  75                  80

Gln Tyr Gly Cys His Ser His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr
                85                  90                  95

Ala Pro Met Cys Thr Asp Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg
            100                 105                 110

Pro Met Cys Glu Gln Ala Arg Leu Arg Cys Ala Pro Ile Met Glu Gln
        115                 120                 125

Phe Asn Phe Gly Trp Pro Asp Ser Leu Asp Cys Ala Arg Leu Pro Thr
    130                 135                 140

Arg Asn Asp Pro His Ala Leu Cys Met Glu Ala Pro Glu Asn Ala Thr
145                 150                 155                 160

Ala Gly Pro Ala Glu Pro His Lys Gly Leu Gly Met Leu Pro Val Ala
                165                 170                 175

Pro Arg Pro Ala Arg Pro Pro Gly Asp Leu Gly Pro Gly Ala Gly Gly
            180                 185                 190

Ser Gly Thr Cys Glu Asn Pro Glu Lys Phe Gln Tyr Val Glu Lys Ser
        195                 200                 205

Arg Ser Cys Ala Pro Arg Cys Gly Pro Gly Val Glu Val Phe Trp Ser
    210                 215                 220

Arg Arg Asp Lys Asp Phe Ala Leu Val Trp Met Ala Val Trp Ser Ala
225                 230                 235                 240

Leu Cys Phe Phe Ser Thr Ala Phe Thr Val Leu Thr Phe Leu Leu Glu
                245                 250                 255

Pro His Arg Phe Gln Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Met
            260                 265                 270

Cys Tyr Asn Val Tyr Ser Leu Ala Phe Leu Ile Arg Ala Val Ala Gly
        275                 280                 285

Ala Gln Ser Val Ala Cys Asp Gln Glu Ala Gly Ala Leu Tyr Val Ile
    290                 295                 300

Gln Glu Gly Leu Glu Asn Thr Gly Cys Thr Leu Val Phe Leu Leu Leu
305                 310                 315                 320

Tyr Tyr Phe Gly Met Ala Ser Ser Leu Trp Trp Val Val Leu Thr Leu
                325                 330                 335
```

```
Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Lys Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu
            340                 345                 350

Ala His Gly Ser Tyr Phe His Met Ala Ala Trp Gly Leu Pro Ala Leu
        355                 360                 365

Lys Thr Ile Val Ile Leu Thr Leu Arg Lys Val Ala Gly Asp Glu Leu
    370                 375                 380

Thr Gly Leu Cys Tyr Val Ala Ser Thr Asp Ala Ala Ala Leu Thr Gly
385                 390                 395                 400

Phe Val Leu Val Pro Leu Ser Gly Tyr Leu Val Leu Gly Ser Ser Phe
                405                 410                 415

Leu Leu Thr Gly Phe Val Ala Leu Phe His Ile Arg Lys Ile Met Lys
            420                 425                 430

Thr Gly Gly Thr Asn Thr Glu Lys Leu Glu Lys Leu Met Val Lys Ile
        435                 440                 445

Gly Val Phe Ser Ile Leu Tyr Thr Val Pro Ala Thr Cys Val Ile Val
    450                 455                 460

Cys Tyr Val Tyr Glu Arg Leu Asn Met Asp Phe Trp Arg Leu Arg Ala
465                 470                 475                 480

Thr Glu Gln Pro Cys Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gly Arg Arg Asp
                485                 490                 495

Cys Ser Leu Pro Gly Gly Ser Val Pro Thr Val Ala Val Phe Met Leu
            500                 505                 510

Lys Ile Phe Met Ser Leu Val Val Gly Ile Thr Ser Gly Val Trp Val
        515                 520                 525

Trp Ser Ser Lys Thr Phe Gln Thr Trp Gln Ser Leu Cys Tyr Arg Lys
    530                 535                 540

Ile Ala Ala Gly Arg Ala Arg Ala Lys Ala Cys Arg Ala Pro Gly Ser
545                 550                 555                 560

Tyr Gly Arg Gly Thr His Cys His Tyr Lys Ala Pro Thr Val Val Leu
                565                 570                 575

His Met Thr Lys Thr Asp Pro Ser Leu Glu Asn Pro Thr His Leu
            580                 585                 590
```

<210> 10
<211> 581

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

```
Met Gln Arg Pro Gly Pro Arg Leu Trp Leu Val Leu Gln Val Met Gly
1               5                  10                  15

Ser Cys Ala Ala Ile Ser Ser Met Asp Met Glu Arg Pro Gly Asp Gly
            20                  25                  30

Lys Cys Gln Pro Ile Glu Ile Pro Met Cys Lys Asp Ile Gly Tyr Asn
        35                  40                  45

Met Thr Arg Met Pro Asn Leu Met Gly His Glu Asn Gln Arg Glu Ala
    50                  55                  60

Ala Ile Gln Leu His Glu Phe Ala Pro Leu Val Glu Tyr Gly Cys His
65                  70                  75                  80

Gly His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met Cys Thr
                85                  90                  95

Glu Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Val Met Cys Glu Gln
            100                 105                 110

Ala Arg Leu Lys Cys Ser Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe Lys Trp
        115                 120                 125

Pro Asp Ser Leu Asp Cys Arg Lys Leu Pro Asn Lys Asn Asp Pro Asn
    130                 135                 140

Tyr Leu Cys Met Glu Ala Pro Asn Asn Gly Ser Asp Glu Pro Thr Arg
145                 150                 155                 160

Gly Ser Gly Leu Phe Pro Pro Leu Phe Arg Pro Gln Arg Pro His Ser
                165                 170                 175

Ala Gln Glu His Pro Leu Lys Asp Gly Gly Pro Gly Arg Gly Gly Cys
            180                 185                 190

Asp Asn Pro Gly Lys Phe His His Val Glu Lys Ser Ala Ser Cys Ala
        195                 200                 205

Pro Leu Cys Thr Pro Gly Val Asp Val Tyr Trp Ser Arg Glu Asp Lys
    210                 215                 220

Arg Phe Ala Val Val Trp Leu Ala Ile Trp Ala Val Leu Cys Phe Phe
225                 230                 235                 240

Ser Ser Ala Phe Thr Val Leu Thr Phe Leu Ile Asp Pro Ala Arg Phe
                245                 250                 255
```

```
Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Met Cys Tyr Cys Val
            260                 265                 270

Tyr Ser Val Gly Tyr Leu Ile Arg Leu Phe Ala Gly Ala Glu Ser Ile
        275                 280                 285

Ala Cys Asp Arg Asp Ser Gly Gln Leu Tyr Val Ile Gln Glu Gly Leu
    290                 295                 300

Glu Ser Thr Gly Cys Thr Leu Val Phe Leu Val Leu Tyr Tyr Phe Gly
305                 310                 315                 320

Met Ala Ser Ser Leu Trp Trp Val Val Leu Thr Leu Thr Trp Phe Leu
                325                 330                 335

Ala Ala Gly Lys Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn Ser Ser
            340                 345                 350

Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Ala Ile Pro Ala Val Lys Thr Ile Leu
        355                 360                 365

Ile Leu Val Met Arg Arg Val Ala Gly Asp Glu Leu Thr Gly Val Cys
    370                 375                 380

Tyr Val Gly Ser Met Asp Val Asn Ala Leu Thr Gly Phe Val Leu Ile
385                 390                 395                 400

Pro Leu Ala Cys Tyr Leu Val Ile Gly Thr Ser Phe Ile Leu Ser Gly
                405                 410                 415

Phe Val Ala Leu Phe His Ile Arg Arg Val Met Lys Thr Gly Gly Glu
            420                 425                 430

Asn Thr Asp Lys Leu Glu Lys Leu Met Val Arg Ile Gly Leu Phe Ser
        435                 440                 445

Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala Thr Cys Val Ile Ala Cys Tyr Phe Tyr
    450                 455                 460

Glu Arg Leu Asn Met Asp Tyr Trp Lys Ile Leu Ala Ala Gln His Lys
465                 470                 475                 480

Cys Lys Met Asn Asn Gln Thr Lys Thr Leu Asp Cys Leu Met Ala Ala
                485                 490                 495

Ser Ile Pro Ala Val Glu Ile Phe Met Val Lys Ile Phe Met Leu Leu
            500                 505                 510

Val Val Gly Ile Thr Ser Gly Met Trp Ile Trp Thr Ser Lys Thr Leu
        515                 520                 525
```

```
Gln Ser Trp Gln Gln Val Cys Ser Arg Arg Leu Lys Lys Lys Ser Arg
    530                 535                 540

Arg Lys Pro Ala Ser Val Ile Thr Ser Gly Gly Ile Tyr Lys Lys Ala
545                 550                 555                 560

Gln His Pro Gln Lys Thr His His Gly Lys Tyr Glu Ile Pro Ala Gln
                565                 570                 575

Ser Pro Thr Cys Val
            580
```

<210> 11
<211> 314
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

```
Met Gly Ile Gly Arg Ser Glu Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gly
1               5                   10                  15

Val Leu Leu Ala Leu Gly Ala Ala Leu Leu Ala Val Gly Ser Ala Ser
            20                  25                  30

Glu Tyr Asp Tyr Val Ser Phe Gln Ser Asp Ile Gly Pro Tyr Gln Ser
        35                  40                  45

Gly Arg Phe Tyr Thr Lys Pro Pro Gln Cys Val Asp Ile Pro Ala Asp
    50                  55                  60

Leu Arg Leu Cys His Asn Val Gly Tyr Lys Lys Met Val Leu Pro Asn
65                  70                  75                  80

Leu Leu Glu His Glu Thr Met Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser
                85                  90                  95

Trp Val Pro Leu Leu Asn Lys Asn Cys His Ala Gly Thr Gln Val Phe
            100                 105                 110

Leu Cys Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro
        115                 120                 125

Cys Arg Trp Leu Cys Glu Ala Val Arg Asp Ser Cys Glu Pro Val Met
    130                 135                 140

Gln Phe Phe Gly Phe Tyr Trp Pro Glu Met Leu Lys Cys Asp Lys Phe
145                 150                 155                 160

Pro Glu Gly Asp Val Cys Ile Ala Met Thr Pro Pro Asn Ala Thr Glu
                165                 170                 175
```

```
Ala Ser Lys Pro Gln Gly Thr Thr Val Cys Pro Pro Cys Asp Asn Glu
            180                 185                 190

Leu Lys Ser Glu Ala Ile Ile Glu His Leu Cys Ala Ser Glu Phe Ala
        195                 200                 205

Leu Arg Met Lys Ile Lys Glu Val Lys Lys Glu Asn Gly Asp Lys Lys
    210                 215                 220

Ile Val Pro Lys Lys Lys Lys Pro Leu Lys Leu Gly Pro Ile Lys Lys
225                 230                 235                 240

Lys Asp Leu Lys Lys Leu Val Leu Tyr Leu Lys Asn Gly Ala Asp Cys
                245                 250                 255

Pro Cys His Gln Leu Asp Asn Leu Ser His His Phe Leu Ile Met Gly
            260                 265                 270

Arg Lys Val Lys Ser Gln Tyr Leu Leu Thr Ala Ile His Lys Trp Asp
        275                 280                 285

Lys Lys Asn Lys Glu Phe Lys Asn Phe Met Lys Lys Met Lys Asn His
    290                 295                 300

Glu Cys Pro Thr Phe Gln Ser Val Phe Lys
305                 310
```

<210> 12
<211> 295
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

```
Met Leu Gln Gly Pro Gly Ser Leu Leu Leu Leu Phe Leu Ala Ser His
1               5                   10                  15

Cys Cys Leu Gly Ser Ala Arg Gly Leu Phe Leu Phe Gly Gln Pro Asp
            20                  25                  30

Phe Ser Tyr Lys Arg Ser Asn Cys Lys Pro Ile Pro Ala Asn Leu Gln
        35                  40                  45

Leu Cys His Gly Ile Glu Tyr Gln Asn Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu
    50                  55                  60

Gly His Glu Thr Met Lys Glu Val Leu Glu Gln Ala Gly Ala Trp Ile
65                  70                  75                  80

Pro Leu Val Met Lys Gln Cys His Pro Asp Thr Lys Lys Phe Leu Cys
                85                  90                  95

Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Asp Leu Asp Glu Thr Ile Gln
```

```
            100                 105                 110

Pro Cys His Ser Leu Cys Val Gln Val Lys Asp Arg Cys Ala Pro Val
        115                 120                 125

Met Ser Ala Phe Gly Phe Pro Trp Pro Asp Met Leu Glu Cys Asp Arg
    130                 135                 140

Phe Pro Gln Asp Asn Asp Leu Cys Ile Pro Leu Ala Ser Ser Asp His
145                 150                 155                 160

Leu Leu Pro Ala Thr Glu Glu Ala Pro Lys Val Cys Glu Ala Cys Lys
                165                 170                 175

Asn Lys Asn Asp Asp Asp Asn Asp Ile Met Glu Thr Leu Cys Lys Asn
            180                 185                 190

Asp Phe Ala Leu Lys Ile Lys Val Lys Glu Ile Thr Tyr Ile Asn Arg
        195                 200                 205

Asp Thr Lys Ile Ile Leu Glu Thr Lys Ser Lys Thr Ile Tyr Lys Leu
    210                 215                 220

Asn Gly Val Ser Glu Arg Asp Leu Lys Lys Ser Val Leu Trp Leu Lys
225                 230                 235                 240

Asp Ser Leu Gln Cys Thr Cys Glu Glu Met Asn Asp Ile Asn Ala Pro
                245                 250                 255

Tyr Leu Val Met Gly Gln Lys Gln Gly Gly Glu Leu Val Ile Thr Ser
            260                 265                 270

Val Lys Arg Trp Gln Lys Gly Gln Arg Glu Phe Lys Arg Ile Ser Arg
        275                 280                 285

Ser Ile Arg Lys Leu Gln Cys
    290                 295
```

<210> 13
<211> 325
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

```
Met Val Cys Gly Ser Pro Gly Gly Met Leu Leu Leu Arg Ala Gly Leu
1               5                   10                  15

Leu Ala Leu Ala Ala Leu Cys Leu Leu Arg Val Pro Gly Ala Arg Ala
            20                  25                  30

Ala Ala Cys Glu Pro Val Arg Ile Pro Leu Cys Lys Ser Leu Pro Trp
        35                  40                  45
```

```
Asn Met Thr Lys Met Pro Asn His Leu His His Ser Thr Gln Ala Asn
    50                  55                  60

Ala Ile Leu Ala Ile Glu Gln Phe Glu Gly Leu Leu Gly Thr His Cys
65                  70                  75                  80

Ser Pro Asp Leu Leu Phe Phe Leu Cys Ala Met Tyr Ala Pro Ile Cys
                85                  90                  95

Thr Ile Asp Phe Gln His Glu Pro Ile Lys Pro Cys Lys Ser Val Cys
            100                 105                 110

Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Pro Ile Leu Ile Lys Tyr Arg His
        115                 120                 125

Ser Trp Pro Glu Asn Leu Ala Cys Glu Glu Leu Pro Val Tyr Asp Arg
    130                 135                 140

Gly Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr Ala Asp Gly Ala Asp
145                 150                 155                 160

Phe Pro Met Asp Ser Ser Asn Gly Asn Cys Arg Gly Ala Ser Ser Glu
                165                 170                 175

Arg Cys Lys Cys Lys Pro Ile Arg Ala Thr Gln Lys Thr Tyr Phe Arg
            180                 185                 190

Asn Asn Tyr Asn Tyr Val Ile Arg Ala Lys Val Lys Glu Ile Lys Thr
        195                 200                 205

Lys Cys His Asp Val Thr Ala Val Val Glu Val Lys Glu Ile Leu Lys
    210                 215                 220

Ser Ser Leu Val Asn Ile Pro Arg Asp Thr Val Asn Leu Tyr Thr Ser
225                 230                 235                 240

Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Leu Asn Val Asn Glu Glu Tyr Ile Ile
                245                 250                 255

Met Gly Tyr Glu Asp Glu Glu Arg Ser Arg Leu Leu Leu Val Glu Gly
            260                 265                 270

Ser Ile Ala Glu Lys Trp Lys Asp Arg Leu Gly Lys Lys Val Lys Arg
        275                 280                 285

Trp Asp Met Lys Leu Arg His Leu Gly Leu Ser Lys Ser Asp Ser Ser
    290                 295                 300

Asn Ser Asp Ser Thr Gln Ser Gln Lys Ser Gly Arg Asn Ser Asn Pro
305                 310                 315                 320
```

Arg Gln Ala Arg Asn
325

<210> 14
<211> 346
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Phe Leu Ser Ile Leu Val Ala Leu Cys Leu Trp Leu His Leu Ala
1 5 10 15

Leu Gly Val Arg Gly Ala Pro Cys Glu Ala Val Arg Ile Pro Met Cys
20 25 30

Arg His Met Pro Trp Asn Ile Thr Arg Met Pro Asn His Leu His His
35 40 45

Ser Thr Gln Glu Asn Ala Ile Leu Ala Ile Glu Gln Tyr Glu Glu Leu
50 55 60

Val Asp Val Asn Cys Ser Ala Val Leu Arg Phe Phe Phe Cys Ala Met
65 70 75 80

Tyr Ala Pro Ile Cys Thr Leu Glu Phe Leu His Asp Pro Ile Lys Pro
85 90 95

Cys Lys Ser Val Cys Gln Arg Ala Arg Asp Asp Cys Glu Pro Leu Met
100 105 110

Lys Met Tyr Asn His Ser Trp Pro Glu Ser Leu Ala Cys Asp Glu Leu
115 120 125

Pro Val Tyr Asp Arg Gly Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr
130 135 140

Asp Leu Pro Glu Asp Val Lys Trp Ile Asp Ile Thr Pro Asp Met Met
145 150 155 160

Val Gln Glu Arg Pro Leu Asp Val Asp Cys Lys Arg Leu Ser Pro Asp
165 170 175

Arg Cys Lys Cys Lys Lys Val Lys Pro Thr Leu Ala Thr Tyr Leu Ser
180 185 190

Lys Asn Tyr Ser Tyr Val Ile His Ala Lys Ile Lys Ala Val Gln Arg
195 200 205

Ser Gly Cys Asn Glu Val Thr Thr Val Val Asp Val Lys Glu Ile Phe
210 215 220

```
Lys Ser Ser Ser Pro Ile Pro Arg Thr Gln Val Pro Leu Ile Thr Asn
225                 230                 235                 240

Ser Ser Cys Gln Cys Pro His Ile Leu Pro His Gln Asp Val Leu Ile
                245                 250                 255

Met Cys Tyr Glu Trp Arg Ser Arg Met Met Leu Leu Glu Asn Cys Leu
            260                 265                 270

Val Glu Lys Trp Arg Asp Gln Leu Ser Lys Arg Ser Ile Gln Trp Glu
        275                 280                 285

Glu Arg Leu Gln Glu Gln Arg Arg Thr Val Gln Asp Lys Lys Lys Thr
    290                 295                 300

Ala Gly Arg Thr Ser Arg Ser Asn Pro Pro Lys Pro Lys Gly Lys Pro
305                 310                 315                 320

Pro Ala Pro Lys Pro Ala Ser Pro Lys Lys Asn Ile Lys Thr Arg Ser
                325                 330                 335

Ala Gln Lys Arg Thr Asn Pro Lys Arg Val
            340                 345
```

<210> 15
<211> 317
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

```
Met Arg Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Val Arg Thr Ala Ala Leu Ala
1               5                   10                  15

Leu Leu Leu Gly Ala Leu His Trp Ala Pro Ala Arg Cys Glu Glu Tyr
            20                  25                  30

Asp Tyr Tyr Gly Trp Gln Ala Glu Pro Leu His Gly Arg Ser Tyr Ser
        35                  40                  45

Lys Pro Pro Gln Cys Leu Asp Ile Pro Ala Asp Leu Pro Leu Cys His
    50                  55                  60

Thr Val Gly Tyr Lys Arg Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu Glu His Glu
65                  70                  75                  80

Ser Leu Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser Trp Leu Pro Leu Leu
                85                  90                  95

Ala Lys Arg Cys His Ser Asp Thr Gln Val Phe Leu Cys Ser Leu Phe
            100                 105                 110
```

Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro Cys Arg Ser Leu Cys
115 120 125

Glu Ala Val Arg Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Glu Ala Tyr Gly Phe
130 135 140

Pro Trp Pro Glu Met Leu His Cys His Lys Phe Pro Leu Asp Asn Asp
145 150 155 160

Leu Cys Ile Ala Val Gln Phe Gly His Leu Pro Ala Thr Ala Pro Pro
165 170 175

Val Thr Lys Ile Cys Ala Gln Cys Glu Met Glu His Ser Ala Asp Gly
180 185 190

Leu Met Glu Gln Met Cys Ser Ser Asp Phe Val Val Lys Met Arg Ile
195 200 205

Lys Glu Ile Lys Ile Glu Asn Gly Asp Arg Lys Leu Ile Gly Ala Gln
210 215 220

Lys Lys Lys Lys Leu Leu Lys Pro Gly Pro Leu Lys Arg Lys Asp Thr
225 230 235 240

Lys Arg Leu Val Leu His Met Lys Asn Gly Ala Gly Cys Pro Cys Pro
245 250 255

Gln Leu Asp Ser Leu Ala Gly Ser Phe Leu Val Met Gly Arg Lys Val
260 265 270

Asp Gly Gln Leu Leu Leu Met Ala Val Tyr Arg Trp Asp Lys Lys Asn
275 280 285

Lys Glu Met Lys Phe Ala Val Lys Phe Met Phe Ser Tyr Pro Cys Ser
290 295 300

Leu Tyr Tyr Pro Phe Phe Tyr Gly Ala Ala Glu Pro His
305 310 315

<210> 16
<211> 937
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Met His Arg Pro Arg Arg Arg Gly Thr Arg Pro Pro Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala Gln Glu Thr
20 25 30

Glu Leu Ser Val Ser Ala Glu Leu Val Pro Thr Ser Ser Trp Asn Ile

35 40 45

Ser Ser Glu Leu Asn Lys Asp Ser Tyr Leu Thr Leu Asp Glu Pro Met
50 55 60

Asn Asn Ile Thr Thr Ser Leu Gly Gln Thr Ala Glu Leu His Cys Lys
65 70 75 80

Val Ser Gly Asn Pro Pro Pro Thr Ile Arg Trp Phe Lys Asn Asp Ala
85 90 95

Pro Val Val Gln Glu Pro Arg Arg Leu Ser Phe Arg Ser Thr Ile Tyr
100 105 110

Gly Ser Arg Leu Arg Ile Arg Asn Leu Asp Thr Thr Asp Thr Gly Tyr
115 120 125

Phe Gln Cys Val Ala Thr Asn Gly Lys Glu Val Val Ser Ser Thr Gly
130 135 140

Val Leu Phe Val Lys Phe Gly Pro Pro Pro Thr Ala Ser Pro Gly Tyr
145 150 155 160

Ser Asp Glu Tyr Glu Glu Asp Gly Phe Cys Gln Pro Tyr Arg Gly Ile
165 170 175

Ala Cys Ala Arg Phe Ile Gly Asn Arg Thr Val Tyr Met Glu Ser Leu
180 185 190

His Met Gln Gly Glu Ile Glu Asn Gln Ile Thr Ala Ala Phe Thr Met
195 200 205

Ile Gly Thr Ser Ser His Leu Ser Asp Lys Cys Ser Gln Phe Ala Ile
210 215 220

Pro Ser Leu Cys His Tyr Ala Phe Pro Tyr Cys Asp Glu Thr Ser Ser
225 230 235 240

Val Pro Lys Pro Arg Asp Leu Cys Arg Asp Glu Cys Glu Ile Leu Glu
245 250 255

Asn Val Leu Cys Gln Thr Glu Tyr Ile Phe Ala Arg Ser Asn Pro Met
260 265 270

Ile Leu Met Arg Leu Lys Leu Pro Asn Cys Glu Asp Leu Pro Gln Pro
275 280 285

Glu Ser Pro Glu Ala Ala Asn Cys Ile Arg Ile Gly Ile Pro Met Ala
290 295 300

Asp Pro Ile Asn Lys Asn His Lys Cys Tyr Asn Ser Thr Gly Val Asp

305 310 315 320

Tyr Arg Gly Thr Val Ser Val Thr Lys Ser Gly Arg Gln Cys Gln Pro
325 330 335

Trp Asn Ser Gln Tyr Pro His Thr His Thr Phe Thr Ala Leu Arg Phe
340 345 350

Pro Glu Leu Asn Gly Gly His Ser Tyr Cys Arg Asn Pro Gly Asn Gln
355 360 365

Lys Glu Ala Pro Trp Cys Phe Thr Leu Asp Glu Asn Phe Lys Ser Asp
370 375 380

Leu Cys Asp Ile Pro Ala Cys Asp Ser Lys Asp Ser Lys Glu Lys Asn
385 390 395 400

Lys Met Glu Ile Leu Tyr Ile Leu Val Pro Ser Val Ala Ile Pro Leu
405 410 415

Ala Ile Ala Leu Leu Phe Phe Phe Ile Cys Val Cys Arg Asn Asn Gln
420 425 430

Lys Ser Ser Ser Ala Pro Val Gln Arg Gln Pro Lys His Val Arg Gly
435 440 445

Gln Asn Val Glu Met Ser Met Leu Asn Ala Tyr Lys Pro Lys Ser Lys
450 455 460

Ala Lys Glu Leu Pro Leu Ser Ala Val Arg Phe Met Glu Glu Leu Gly
465 470 475 480

Glu Cys Ala Phe Gly Lys Ile Tyr Lys Gly His Leu Tyr Leu Pro Gly
485 490 495

Met Asp His Ala Gln Leu Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Asp Tyr Asn
500 505 510

Asn Pro Gln Gln Trp Met Glu Phe Gln Gln Glu Ala Ser Leu Met Ala
515 520 525

Glu Leu His His Pro Asn Ile Val Cys Leu Leu Gly Ala Val Thr Gln
530 535 540

Glu Gln Pro Val Cys Met Leu Phe Glu Tyr Ile Asn Gln Gly Asp Leu
545 550 555 560

His Glu Phe Leu Ile Met Arg Ser Pro His Ser Asp Val Gly Cys Ser
565 570 575

Ser Asp Glu Asp Gly Thr Val Lys Ser Ser Leu Asp His Gly Asp Phe

580 585 590

Leu His Ile Ala Ile Gln Ile Ala Ala Gly Met Glu Tyr Leu Ser Ser
595 600 605

His Phe Phe Val His Lys Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Ile Gly
610 615 620

Glu Gln Leu His Val Lys Ile Ser Asp Leu Gly Leu Ser Arg Glu Ile
625 630 635 640

Tyr Ser Ala Asp Tyr Tyr Arg Val Gln Ser Lys Ser Leu Leu Pro Ile
645 650 655

Arg Trp Met Pro Pro Glu Ala Ile Met Tyr Gly Lys Phe Ser Ser Asp
660 665 670

Ser Asp Ile Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Ser Phe
675 680 685

Gly Leu Gln Pro Tyr Tyr Gly Phe Ser Asn Gln Glu Val Ile Glu Met
690 695 700

Val Arg Lys Arg Gln Leu Leu Pro Cys Ser Glu Asp Cys Pro Pro Arg
705 710 715 720

Met Tyr Ser Leu Met Thr Glu Cys Trp Asn Glu Ile Pro Ser Arg Arg
725 730 735

Pro Arg Phe Lys Asp Ile His Val Arg Leu Arg Ser Trp Glu Gly Leu
740 745 750

Ser Ser His Thr Ser Ser Thr Thr Pro Ser Gly Gly Asn Ala Thr Thr
755 760 765

Gln Thr Thr Ser Leu Ser Ala Ser Pro Val Ser Asn Leu Ser Asn Pro
770 775 780

Arg Tyr Pro Asn Tyr Met Phe Pro Ser Gln Gly Ile Thr Pro Gln Gly
785 790 795 800

Gln Ile Ala Gly Phe Ile Gly Pro Pro Ile Pro Gln Asn Gln Arg Phe
805 810 815

Ile Pro Ile Asn Gly Tyr Pro Ile Pro Pro Gly Tyr Ala Ala Phe Pro
820 825 830

Ala Ala His Tyr Gln Pro Thr Gly Pro Pro Arg Val Ile Gln His Cys
835 840 845

Pro Pro Pro Lys Ser Arg Ser Pro Ser Ser Ala Ser Gly Ser Thr Ser

```
    850                 855                 860

Thr Gly His Val Thr Ser Leu Pro Ser Ser Gly Ser Asn Gln Glu Ala
865                 870                 875                 880

Asn Ile Pro Leu Leu Pro His Met Ser Ile Pro Asn His Pro Gly Gly
                885                 890                 895

Met Gly Ile Thr Val Phe Gly Asn Lys Ser Gln Lys Pro Tyr Lys Ile
            900                 905                 910

Asp Ser Lys Gln Ala Ser Leu Leu Gly Asp Ala Asn Ile His Gly His
        915                 920                 925

Thr Glu Ser Met Ile Ser Ala Glu Leu
    930                 935
```

<210> 17
<211> 943
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

```
Met Ala Arg Gly Ser Ala Leu Pro Arg Arg Pro Leu Leu Cys Ile Pro
1               5                   10                  15

Ala Val Trp Ala Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ser Val Ser Arg Thr Ser
            20                  25                  30

Gly Glu Val Glu Val Leu Asp Pro Asn Asp Pro Leu Gly Pro Leu Asp
        35                  40                  45

Gly Gln Asp Gly Pro Ile Pro Thr Leu Lys Gly Tyr Phe Leu Asn Phe
    50                  55                  60

Leu Glu Pro Val Asn Asn Ile Thr Ile Val Gln Gly Gln Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

Leu His Cys Lys Val Ala Gly Asn Pro Pro Pro Asn Val Arg Trp Leu
                85                  90                  95

Lys Asn Asp Ala Pro Val Val Gln Glu Pro Arg Arg Ile Ile Ile Arg
            100                 105                 110

Lys Thr Glu Tyr Gly Ser Arg Leu Arg Ile Gln Asp Leu Asp Thr Thr
        115                 120                 125

Asp Thr Gly Tyr Tyr Gln Cys Val Ala Thr Asn Gly Met Lys Thr Ile
    130                 135                 140

Thr Ala Thr Gly Val Leu Phe Val Arg Leu Gly Pro Thr His Ser Pro
145                 150                 155                 160
```

```
Asn His Asn Phe Gln Asp Asp Tyr His Glu Asp Gly Phe Cys Gln Pro
                165                 170                 175

Tyr Arg Gly Ile Ala Cys Ala Arg Phe Ile Gly Asn Arg Thr Ile Tyr
            180                 185                 190

Val Asp Ser Leu Gln Met Gln Gly Glu Ile Glu Asn Arg Ile Thr Ala
        195                 200                 205

Ala Phe Thr Met Ile Gly Thr Ser Thr His Leu Ser Asp Gln Cys Ser
    210                 215                 220

Gln Phe Ala Ile Pro Ser Phe Cys His Phe Val Phe Pro Leu Cys Asp
225                 230                 235                 240

Ala Arg Ser Arg Thr Pro Lys Pro Arg Glu Leu Cys Arg Asp Glu Cys
                245                 250                 255

Glu Val Leu Glu Ser Asp Leu Cys Arg Gln Glu Tyr Thr Ile Ala Arg
            260                 265                 270

Ser Asn Pro Leu Ile Leu Met Arg Leu Gln Leu Pro Lys Cys Glu Ala
        275                 280                 285

Leu Pro Met Pro Glu Ser Pro Asp Ala Ala Asn Cys Met Arg Ile Gly
    290                 295                 300

Ile Pro Ala Glu Arg Leu Gly Arg Tyr His Gln Cys Tyr Asn Gly Ser
305                 310                 315                 320

Gly Met Asp Tyr Arg Gly Thr Ala Ser Thr Thr Lys Ser Gly His Gln
                325                 330                 335

Cys Gln Pro Trp Ala Leu Gln His Pro His Ser His His Leu Ser Ser
            340                 345                 350

Thr Asp Phe Pro Glu Leu Gly Gly Gly His Ala Tyr Cys Arg Asn Pro
        355                 360                 365

Gly Gly Gln Met Glu Gly Pro Trp Cys Phe Thr Gln Asn Lys Asn Val
    370                 375                 380

Arg Met Glu Leu Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Pro Arg Asp Ser Ser
385                 390                 395                 400

Lys Met Gly Ile Leu Tyr Ile Leu Val Pro Ser Ile Ala Ile Pro Leu
                405                 410                 415

Val Ile Ala Cys Leu Phe Phe Leu Val Cys Met Cys Arg Asn Lys Gln
            420                 425                 430
```

```
Lys Ala Ser Ala Ser Thr Pro Gln Arg Arg Gln Leu Met Ala Ser Pro
        435                 440                 445

Ser Gln Asp Met Glu Met Pro Leu Ile Asn Gln His Lys Gln Ala Lys
    450                 455                 460

Leu Lys Glu Ile Ser Leu Ser Ala Val Arg Phe Met Glu Glu Leu Gly
465                 470                 475                 480

Glu Asp Arg Phe Gly Lys Val Tyr Lys Gly His Leu Phe Gly Pro Ala
                485                 490                 495

Pro Gly Glu Gln Thr Gln Ala Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Asp Lys
            500                 505                 510

Ala Glu Gly Pro Leu Arg Glu Glu Phe Arg His Glu Ala Met Leu Arg
        515                 520                 525

Ala Arg Leu Gln His Pro Asn Val Val Cys Leu Leu Gly Val Val Thr
    530                 535                 540

Lys Asp Gln Pro Leu Ser Met Ile Phe Ser Tyr Cys Ser His Gly Asp
545                 550                 555                 560

Leu His Glu Phe Leu Val Met Arg Ser Pro His Ser Asp Val Gly Ser
                565                 570                 575

Thr Asp Asp Asp Arg Thr Val Lys Ser Ala Leu Glu Pro Pro Asp Phe
            580                 585                 590

Val His Leu Val Ala Gln Ile Ala Ala Gly Met Glu Tyr Leu Ser Ser
        595                 600                 605

His His Val Val His Lys Asp Leu Ala Thr Arg Asn Val Leu Val Tyr
    610                 615                 620

Asp Lys Leu Asn Val Lys Ile Ser Asp Leu Gly Leu Phe Arg Glu Val
625                 630                 635                 640

Tyr Ala Ala Asp Tyr Tyr Lys Leu Leu Gly Asn Ser Leu Leu Pro Ile
                645                 650                 655

Arg Trp Met Ala Pro Glu Ala Ile Met Tyr Gly Lys Phe Ser Ile Asp
            660                 665                 670

Ser Asp Ile Trp Ser Tyr Gly Val Val Leu Trp Glu Val Phe Ser Tyr
        675                 680                 685

Gly Leu Gln Pro Tyr Cys Gly Tyr Ser Asn Gln Asp Val Val Glu Met
    690                 695                 700
```

```
Ile Arg Asn Arg Gln Val Leu Pro Cys Pro Asp Asp Cys Pro Ala Trp
705                 710                 715                 720

Val Tyr Ala Leu Met Ile Glu Cys Trp Asn Glu Phe Pro Ser Arg Arg
                725                 730                 735

Pro Arg Phe Lys Asp Ile His Ser Arg Leu Arg Ala Trp Gly Asn Leu
            740                 745                 750

Ser Asn Tyr Asn Ser Ser Ala Gln Thr Ser Gly Ala Ser Asn Thr Thr
        755                 760                 765

Gln Thr Ser Ser Leu Ser Thr Ser Pro Val Ser Asn Val Ser Asn Ala
    770                 775                 780

Arg Tyr Val Gly Pro Lys Gln Lys Ala Pro Pro Phe Pro Gln Pro Gln
785                 790                 795                 800

Phe Ile Pro Met Lys Gly Gln Ile Arg Pro Met Val Pro Pro Pro Gln
                805                 810                 815

Leu Tyr Val Pro Val Asn Gly Tyr Gln Pro Val Pro Ala Tyr Gly Ala
            820                 825                 830

Tyr Leu Pro Asn Phe Tyr Pro Val Gln Ile Pro Met Gln Met Ala Pro
        835                 840                 845

Gln Gln Val Pro Pro Gln Met Val Pro Lys Pro Ser Ser His His Ser
    850                 855                 860

Gly Ser Gly Ser Thr Ser Thr Gly Tyr Val Thr Thr Ala Pro Ser Asn
865                 870                 875                 880

Thr Ser Met Ala Asp Arg Ala Ala Leu Leu Ser Glu Gly Ala Asp Asp
                885                 890                 895

Thr Gln Asn Ala Pro Glu Asp Gly Ala Gln Ser Thr Val Gln Glu Ala
            900                 905                 910

Glu Glu Glu Glu Glu Gly Ser Val Pro Glu Thr Glu Leu Leu Gly Asp
        915                 920                 925

Cys Asp Thr Leu Gln Val Asp Glu Ala Gln Val Gln Leu Glu Ala
    930                 935                 940
```

<210> 18
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Ser Val Pro Asp His Gly Tyr Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys
1 5 10 15

Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His
20 25 30

Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu
35 40 45

Val Lys Val Gln Cys Ser Ala Glu Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met
50 55 60

Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val Leu Glu Gln Ala Leu Pro Pro Cys Arg
65 70 75 80

Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys
85 90 95

Phe Gly Phe Gln Trp Pro Asp Thr Leu Lys Cys Glu Lys Phe Pro Val
100 105 110

His Gly Ala Gly Glu Leu Cys Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Lys
115 120 125

<210> 19
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Ser Ile Pro Asp His Gly Phe Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys
1 5 10 15

Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His
20 25 30

Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu
35 40 45

Val Lys Val Gln Cys Ser Pro Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met
50 55 60

Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val Leu Glu Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg
65 70 75 80

Ser Ile Cys Glu Ser Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys
85 90 95

Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu Arg Leu Arg Cys Glu His Phe Pro Arg
100 105 110

His Gly Ala Glu Gln Ile Cys Val Gly Gln Asn His Ser Glu Asp
115 120 125

<210> 20
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

His Ser Leu Phe Ser Cys Glu Pro Ile Thr Leu Arg Met Cys Gln Asp
1 5 10 15

Leu Pro Tyr Asn Thr Thr Phe Met Pro Asn Leu Leu Asn His Tyr Asp
20 25 30

Gln Gln Thr Ala Ala Leu Ala Met Glu Pro Phe His Pro Met Val Asn
35 40 45

Leu Asp Cys Ser Arg Asp Phe Arg Pro Phe Leu Cys Ala Leu Tyr Ala
50 55 60

Pro Ile Cys Met Glu Tyr Gly Arg Val Thr Leu Pro Cys Arg Arg Leu
65 70 75 80

Cys Gln Arg Ala Tyr Ser Glu Cys Ser Lys Leu Met Glu Met Phe Gly
85 90 95

Val Pro Trp Pro Glu Asp Met Glu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Cys Asp
100 105 110

Glu Pro Tyr Pro Arg Leu Val
115

<210> 21
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

Glu Arg Arg Cys Asp Pro Ile Arg Ile Ser Met Cys Gln Asn Leu Gly
1 5 10 15

Tyr Asn Val Thr Lys Met Pro Asn Leu Val Gly His Glu Leu Gln Thr
20 25 30

Asp Ala Glu Leu Gln Leu Thr Thr Phe Thr Pro Leu Ile Gln Tyr Gly
35 40 45

Cys Ser Ser Gln Leu Gln Phe Phe Leu Cys Ser Val Tyr Val Pro Met
50 55 60

Cys Thr Glu Lys Ile Asn Ile Pro Ile Gly Pro Cys Gly Gly Met Cys
65 70 75 80

Leu Ser Val Lys Arg Arg Cys Glu Pro Val Leu Lys Glu Phe Gly Phe
85 90 95

Ala Trp Pro Glu Ser Leu Asn Cys Ser Lys Phe Pro Pro Gln Asn Asp
100 105 110

His Asn His Met Cys Met Glu Gly Pro Gly Asp Glu Glu
115 120 125

<210> 22
<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Ala Ser Lys Ala Pro Val Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Met Cys Arg
1 5 10 15

Gly Ile Gly Tyr Asn Leu Thr His Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp
20 25 30

Thr Gln Asp Glu Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val
35 40 45

Glu Ile Gln Cys Ser Pro Asp Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr
50 55 60

Thr Pro Ile Cys Leu Pro Asp Tyr His Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg
65 70 75 80

Ser Val Cys Glu Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ser Pro Leu Met Arg Gln
85 90 95

Tyr Gly Phe Ala Trp Pro Glu Arg Met Ser Cys Asp Arg Leu Pro Val
100 105 110

Leu Gly Arg Asp Ala Glu Val Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Ser Glu
115 120 125

Ala

<210> 23
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

His Ser Leu Phe Thr Cys Glu Pro Ile Thr Val Pro Arg Cys Met Lys
1 5 10 15

Met Ala Tyr Asn Met Thr Phe Phe Pro Asn Leu Met Gly His Tyr Asp
20 25 30

Gln Ser Ile Ala Ala Val Glu Met Glu His Phe Leu Pro Leu Ala Asn
35 40 45

Leu Glu Cys Ser Pro Asn Ile Glu Thr Phe Leu Cys Lys Ala Phe Val
50 55 60

Pro Thr Cys Ile Glu Gln Ile His Val Val Pro Pro Cys Arg Lys Leu
65 70 75 80

Cys Glu Lys Val Tyr Ser Asp Cys Lys Lys Leu Ile Asp Thr Phe Gly
85 90 95

Ile Arg Trp Pro Glu Glu Leu Glu Cys Asp Arg Leu Gln Tyr Cys Asp
100 105 110

Glu Thr Val Pro Val Thr Phe
115

<210> 24
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Ser Val Pro Asp His Gly Phe Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys
1 5 10 15

Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln Thr Ile Leu Pro Asn Leu Leu Gly His
20 25 30

Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu
35 40 45

Val Lys Val Gln Cys Ser Pro Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met
50 55 60

Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val Leu Asp Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg
65 70 75 80

Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys
85 90 95

Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu Arg Leu Arg Cys Glu Asn Phe Pro Val
100 105 110

His Gly Ala Gly Glu Ile Cys Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Gly
115 120 125

<210> 25

<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

Ala Ser Ala Lys Glu Leu Ala Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Leu Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ile Gly Tyr Asn Tyr Thr Tyr Met Pro Asn Gln Phe Asn His
20 25 30

Asp Thr Gln Asp Glu Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu
35 40 45

Val Glu Ile Gln Cys Ser Pro Asp Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met
50 55 60

Tyr Thr Pro Ile Cys Leu Glu Asp Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Cys
65 70 75 80

Arg Ser Val Cys Glu Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Arg
85 90 95

Gln Tyr Gly Phe Ala Trp Pro Asp Arg Met Arg Cys Asp Arg Leu Pro
100 105 110

Glu Gln Gly Asn Pro Asp Thr Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Thr Asp
115 120 125

Leu

<210> 26
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Ala Ala Pro Cys Gln Ala Val Glu Ile Pro Met Cys Arg Gly Ile Gly
1 5 10 15

Tyr Asn Leu Thr Arg Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Ser Gln Gly
20 25 30

Glu Ala Ala Ala Glu Leu Ala Glu Phe Ala Pro Leu Val Gln Tyr Gly
35 40 45

Cys His Ser His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met
50 55 60

Cys Thr Asp Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Pro Met Cys
65 70 75 80

```
Glu Gln Ala Arg Leu Arg Cys Ala Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe
                85                  90                  95

Gly Trp Pro Asp Ser Leu Asp Cys Ala Arg Leu Pro Thr Arg Asn Asp
            100                 105                 110

Pro His Ala Leu Cys Met Glu Ala Pro Glu Asn Ala Thr
        115                 120                 125
```

<210> 27
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

```
Asp Gly Lys Cys Gln Pro Ile Glu Ile Pro Met Cys Lys Asp Ile Gly
1               5                   10                  15

Tyr Asn Met Thr Arg Met Pro Asn Leu Met Gly His Glu Asn Gln Arg
            20                  25                  30

Glu Ala Ala Ile Gln Leu His Glu Phe Ala Pro Leu Val Glu Tyr Gly
        35                  40                  45

Cys His Gly His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met
    50                  55                  60

Cys Thr Glu Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Val Met Cys
65                  70                  75                  80

Glu Gln Ala Arg Leu Lys Cys Ser Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe
                85                  90                  95

Lys Trp Pro Asp Ser Leu Asp Cys Arg Lys Leu Pro Asn Lys Asn Asp
            100                 105                 110

Pro Asn Tyr Leu Cys Met Glu Ala Pro Asn Asn Gly Ser
        115                 120                 125
```

<210> 28
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

```
Phe Tyr Thr Lys Pro Pro Gln Cys Val Asp Ile Pro Ala Asp Leu Arg
1               5                   10                  15

Leu Cys His Asn Val Gly Tyr Lys Lys Met Val Leu Pro Asn Leu Leu
            20                  25                  30

Glu His Glu Thr Met Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser Trp Val
```

35 40 45

Pro Leu Leu Asn Lys Asn Cys His Ala Gly Thr Gln Val Phe Leu Cys
50 55 60

Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro Cys Arg
65 70 75 80

Trp Leu Cys Glu Ala Val Arg Asp Ser Cys Glu Pro Val Met Gln Phe
85 90 95

Phe Gly Phe Tyr Trp Pro Glu Met Leu Lys Cys Asp Lys Phe Pro Glu
100 105 110

Gly Asp Val Cys Ile Ala Met Thr Pro Pro Asn Ala
115 120

<210> 29
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Phe Ser Tyr Lys Arg Ser Asn Cys Lys Pro Ile Pro Ala Asn Leu Gln
1 5 10 15

Leu Cys His Gly Ile Glu Tyr Gln Asn Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu
20 25 30

Gly His Glu Thr Met Lys Glu Val Leu Glu Gln Ala Gly Ala Trp Ile
35 40 45

Pro Leu Val Met Lys Gln Cys His Pro Asp Thr Lys Lys Phe Leu Cys
50 55 60

Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Asp Leu Asp Glu Thr Ile Gln
65 70 75 80

Pro Cys His Ser Leu Cys Val Gln Val Lys Asp Arg Cys Ala Pro Val
85 90 95

Met Ser Ala Phe Gly Phe Pro Trp Pro Asp Met Leu Glu Cys Asp Arg
100 105 110

Phe Pro Gln Asp Asn Asp Leu Cys Ile Pro Leu Ala Ser Ser Asp His
115 120 125

<210> 30
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

```
Ala Ala Cys Glu Pro Val Arg Ile Pro Leu Cys Lys Ser Leu Pro Trp
1               5                   10                  15

Asn Met Thr Lys Met Pro Asn His Leu His His Ser Thr Gln Ala Asn
            20                  25                  30

Ala Ile Leu Ala Ile Glu Gln Phe Glu Gly Leu Leu Gly Thr His Cys
        35                  40                  45

Ser Pro Asp Leu Leu Phe Phe Leu Cys Ala Met Tyr Ala Pro Ile Cys
    50                  55                  60

Thr Ile Asp Phe Gln His Glu Pro Ile Lys Pro Cys Lys Ser Val Cys
65                  70                  75                  80

Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Pro Ile Leu Ile Lys Tyr Arg His
                85                  90                  95

Ser Trp Pro Glu Asn Leu Ala Cys Glu Glu Leu Pro Val Tyr Asp Arg
            100                 105                 110

Gly Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr
        115                 120
```

<210> 31
<211> 126
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

```
Val Arg Gly Ala Pro Cys Glu Ala Val Arg Ile Pro Met Cys Arg His
1               5                   10                  15

Met Pro Trp Asn Ile Thr Arg Met Pro Asn His Leu His His Ser Thr
            20                  25                  30

Gln Glu Asn Ala Ile Leu Ala Ile Glu Gln Tyr Glu Glu Leu Val Asp
        35                  40                  45

Val Asn Cys Ser Ala Val Leu Arg Phe Phe Phe Cys Ala Met Tyr Ala
    50                  55                  60

Pro Ile Cys Thr Leu Glu Phe Leu His Asp Pro Ile Lys Pro Cys Lys
65                  70                  75                  80

Ser Val Cys Gln Arg Ala Arg Asp Asp Cys Glu Pro Leu Met Lys Met
                85                  90                  95

Tyr Asn His Ser Trp Pro Glu Ser Leu Ala Cys Asp Glu Leu Pro Val
            100                 105                 110
```

Tyr Asp Arg Gly Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr
115 120 125

<210> 32
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Ser Tyr Ser Lys Pro Pro Gln Cys Leu Asp Ile Pro Ala Asp Leu Pro
1 5 10 15

Leu Cys His Thr Val Gly Tyr Lys Arg Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu
20 25 30

Glu His Glu Ser Leu Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser Trp Leu
35 40 45

Pro Leu Leu Ala Lys Arg Cys His Ser Asp Thr Gln Val Phe Leu Cys
50 55 60

Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro Cys Arg
65 70 75 80

Ser Leu Cys Glu Ala Val Arg Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Glu Ala
85 90 95

Tyr Gly Phe Pro Trp Pro Glu Met Leu His Cys His Lys Phe Pro Leu
100 105 110

Asp Asn Asp Leu Cys Ile Ala Val Gln Phe Gly His Leu
115 120 125

<210> 33
<211> 142
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Glu Tyr Glu Glu Asp Gly Phe Cys Gln Pro Tyr Arg Gly Ile Ala Cys
1 5 10 15

Ala Arg Phe Ile Gly Asn Arg Thr Val Tyr Met Glu Ser Leu His Met
20 25 30

Gln Gly Glu Ile Glu Asn Gln Ile Thr Ala Ala Phe Thr Met Ile Gly
35 40 45

Thr Ser Ser His Leu Ser Asp Lys Cys Ser Gln Phe Ala Ile Pro Ser
50 55 60

Leu Cys His Tyr Ala Phe Pro Tyr Cys Asp Glu Thr Ser Ser Val Pro
65 70 75 80

```
Lys Pro Arg Asp Leu Cys Arg Asp Glu Cys Glu Ile Leu Glu Asn Val
                85                  90                  95

Leu Cys Gln Thr Glu Tyr Ile Phe Ala Arg Ser Asn Pro Met Ile Leu
            100                 105                 110

Met Arg Leu Lys Leu Pro Asn Cys Glu Asp Leu Pro Gln Pro Glu Ser
        115                 120                 125

Pro Glu Ala Ala Asn Cys Ile Arg Ile Gly Ile Pro Met Ala
    130                 135                 140
```

<210> 34
<211> 142
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

```
Asp Tyr His Glu Asp Gly Phe Cys Gln Pro Tyr Arg Gly Ile Ala Cys
1               5                   10                  15

Ala Arg Phe Ile Gly Asn Arg Thr Ile Tyr Val Asp Ser Leu Gln Met
            20                  25                  30

Gln Gly Glu Ile Glu Asn Arg Ile Thr Ala Ala Phe Thr Met Ile Gly
        35                  40                  45

Thr Ser Thr His Leu Ser Asp Gln Cys Ser Gln Phe Ala Ile Pro Ser
    50                  55                  60

Phe Cys His Phe Val Phe Pro Leu Cys Asp Ala Arg Ser Arg Thr Pro
65                  70                  75                  80

Lys Pro Arg Glu Leu Cys Arg Asp Glu Cys Glu Val Leu Glu Ser Asp
                85                  90                  95

Leu Cys Arg Gln Glu Tyr Thr Ile Ala Arg Ser Asn Pro Leu Ile Leu
            100                 105                 110

Met Arg Leu Gln Leu Pro Lys Cys Glu Ala Leu Pro Met Pro Glu Ser
        115                 120                 125

Pro Asp Ala Ala Asn Cys Met Arg Ile Gly Ile Pro Ala Glu
    130                 135                 140
```

<210> 35
<211> 235
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

```
Met Ala Glu Glu Glu Ala Pro Lys Lys Ser Arg Ala Ala Gly Gly Gly
1               5                  10                  15

Ala Ser Trp Glu Leu Cys Ala Gly Ala Leu Ser Ala Arg Leu Ala Glu
            20                  25                  30

Glu Gly Ser Gly Asp Ala Gly Gly Arg Arg Arg Pro Pro Val Asp Pro
        35                  40                  45

Arg Arg Leu Ala Arg Gln Leu Leu Leu Leu Leu Trp Leu Leu Glu Ala
    50                  55                  60

Pro Leu Leu Leu Gly Val Arg Ala Gln Ala Ala Gly Gln Gly Pro Gly
65                  70                  75                  80

Gln Gly Pro Gly Pro Gly Gln Gln Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gln Gln
                85                  90                  95

Gln Ser Gly Gln Gln Tyr Asn Gly Glu Arg Gly Ile Ser Val Pro Asp
            100                 105                 110

His Gly Tyr Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala
        115                 120                 125

Tyr Asn Gln Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu
    130                 135                 140

Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln
145                 150                 155                 160

Cys Ser Ala Glu Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val
                165                 170                 175

Cys Thr Val Leu Glu Gln Ala Leu Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu
            180                 185                 190

Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln
        195                 200                 205

Trp Pro Asp Thr Leu Lys Cys Glu Lys Phe Pro Val His Gly Ala Gly
    210                 215                 220

Glu Leu Cys Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Lys
225                 230                 235
```

<210> 36
<211> 158
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Met Arg Pro Arg Ser Ala Leu Pro Arg Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu

1 5 10 15

Leu Pro Ala Ala Gly Pro Ala Gln Phe His Gly Glu Lys Gly Ile Ser
20 25 30

Ile Pro Asp His Gly Phe Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr
35 40 45

Asp Ile Ala Tyr Asn Gln Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr
50 55 60

Asn Gln Glu Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val
65 70 75 80

Lys Val Gln Cys Ser Pro Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr
85 90 95

Ala Pro Val Cys Thr Val Leu Glu Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser
100 105 110

Ile Cys Glu Ser Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe
115 120 125

Gly Phe Gln Trp Pro Glu Arg Leu Arg Cys Glu His Phe Pro Arg His
130 135 140

Gly Ala Glu Gln Ile Cys Val Gly Gln Asn His Ser Glu Asp
145 150 155

<210> 37
<211> 141
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Met Ala Met Thr Trp Ile Val Phe Ser Leu Trp Pro Leu Thr Val Phe
1 5 10 15

Met Gly His Ile Gly Gly His Ser Leu Phe Ser Cys Glu Pro Ile Thr
20 25 30

Leu Arg Met Cys Gln Asp Leu Pro Tyr Asn Thr Thr Phe Met Pro Asn
35 40 45

Leu Leu Asn His Tyr Asp Gln Gln Thr Ala Ala Leu Ala Met Glu Pro
50 55 60

Phe His Pro Met Val Asn Leu Asp Cys Ser Arg Asp Phe Arg Pro Phe
65 70 75 80

Leu Cys Ala Leu Tyr Ala Pro Ile Cys Met Glu Tyr Gly Arg Val Thr
85 90 95

Leu Pro Cys Arg Arg Leu Cys Gln Arg Ala Tyr Ser Glu Cys Ser Lys
100 105 110

Leu Met Glu Met Phe Gly Val Pro Trp Pro Glu Asp Met Glu Cys Ser
115 120 125

Arg Phe Pro Asp Cys Asp Glu Pro Tyr Pro Arg Leu Val
130 135 140

<210> 38
<211> 166
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

Met Ala Trp Arg Gly Ala Gly Pro Ser Val Pro Gly Ala Pro Gly Gly
1 5 10 15

Val Gly Leu Ser Leu Gly Leu Leu Leu Gln Leu Leu Leu Leu Leu Gly
20 25 30

Pro Ala Arg Gly Phe Gly Asp Glu Glu Glu Arg Arg Cys Asp Pro Ile
35 40 45

Arg Ile Ser Met Cys Gln Asn Leu Gly Tyr Asn Val Thr Lys Met Pro
50 55 60

Asn Leu Val Gly His Glu Leu Gln Thr Asp Ala Glu Leu Gln Leu Thr
65 70 75 80

Thr Phe Thr Pro Leu Ile Gln Tyr Gly Cys Ser Ser Gln Leu Gln Phe
85 90 95

Phe Leu Cys Ser Val Tyr Val Pro Met Cys Thr Glu Lys Ile Asn Ile
100 105 110

Pro Ile Gly Pro Cys Gly Gly Met Cys Leu Ser Val Lys Arg Arg Cys
115 120 125

Glu Pro Val Leu Lys Glu Phe Gly Phe Ala Trp Pro Glu Ser Leu Asn
130 135 140

Cys Ser Lys Phe Pro Pro Gln Asn Asp His Asn His Met Cys Met Glu
145 150 155 160

Gly Pro Gly Asp Glu Glu
165

<210> 39
<211> 155
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

```
Met Ala Arg Pro Asp Pro Ser Ala Pro Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu
1               5                   10                  15

Leu Ala Gln Leu Val Gly Arg Ala Ala Ala Ala Ser Lys Ala Pro Val
            20                  25                  30

Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Met Cys Arg Gly Ile Gly Tyr Asn Leu
        35                  40                  45

Thr His Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu Ala Gly
    50                  55                  60

Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys Ser Pro
65                  70                  75                  80

Asp Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr Pro Ile Cys Leu Pro
                85                  90                  95

Asp Tyr His Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu Arg Ala
            100                 105                 110

Lys Ala Gly Cys Ser Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala Trp Pro
        115                 120                 125

Glu Arg Met Ser Cys Asp Arg Leu Pro Val Leu Gly Arg Asp Ala Glu
    130                 135                 140

Val Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Ser Glu Ala
145                 150                 155
```

<210> 40
<211> 137
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

```
Met Glu Met Phe Thr Phe Leu Leu Thr Cys Ile Phe Leu Pro Leu Leu
1               5                   10                  15

Arg Gly His Ser Leu Phe Thr Cys Glu Pro Ile Thr Val Pro Arg Cys
            20                  25                  30

Met Lys Met Ala Tyr Asn Met Thr Phe Phe Pro Asn Leu Met Gly His
        35                  40                  45

Tyr Asp Gln Ser Ile Ala Ala Val Glu Met Glu His Phe Leu Pro Leu
    50                  55                  60

Ala Asn Leu Glu Cys Ser Pro Asn Ile Glu Thr Phe Leu Cys Lys Ala
```

65 70 75 80

Phe Val Pro Thr Cys Ile Glu Gln Ile His Val Val Pro Pro Cys Arg
85 90 95

Lys Leu Cys Glu Lys Val Tyr Ser Asp Cys Lys Lys Leu Ile Asp Thr
100 105 110

Phe Gly Ile Arg Trp Pro Glu Glu Leu Glu Cys Asp Arg Leu Gln Tyr
115 120 125

Cys Asp Glu Thr Val Pro Val Thr Phe
130 135

<210> 41
<211> 168
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Met Arg Asp Pro Gly Ala Ala Ala Pro Leu Ser Ser Leu Gly Leu Cys
1 5 10 15

Ala Leu Val Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu Ser Ala Gly Ala Gly Ala
20 25 30

Gln Pro Tyr His Gly Glu Lys Gly Ile Ser Val Pro Asp His Gly Phe
35 40 45

Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln
50 55 60

Thr Ile Leu Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly
65 70 75 80

Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser Pro
85 90 95

Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val
100 105 110

Leu Asp Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg
115 120 125

Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu
130 135 140

Arg Leu Arg Cys Glu Asn Phe Pro Val His Gly Ala Gly Glu Ile Cys
145 150 155 160

Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Gly
165

<210> 42
<211> 156
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

Met Glu Trp Gly Tyr Leu Leu Glu Val Thr Ser Leu Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15

Ala Leu Leu Gln Arg Ser Ser Gly Ala Ala Ala Ala Ser Ala Lys Glu
20 25 30

Leu Ala Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Leu Cys Lys Gly Ile Gly Tyr
35 40 45

Asn Tyr Thr Tyr Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu
50 55 60

Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys
65 70 75 80

Ser Pro Asp Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr Pro Ile Cys
85 90 95

Leu Glu Asp Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu
100 105 110

Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala
115 120 125

Trp Pro Asp Arg Met Arg Cys Asp Arg Leu Pro Glu Gln Gly Asn Pro
130 135 140

Asp Thr Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Thr Asp Leu
145 150 155

<210> 43
<211> 160
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Met Ala Val Ala Pro Leu Arg Gly Ala Leu Leu Leu Trp Gln Leu Leu
1 5 10 15

Ala Ala Gly Gly Ala Ala Leu Glu Ile Gly Arg Phe Asp Pro Glu Arg
20 25 30

Gly Arg Gly Ala Ala Pro Cys Gln Ala Val Glu Ile Pro Met Cys Arg
35 40 45

Gly Ile Gly Tyr Asn Leu Thr Arg Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr
50 55 60

Ser Gln Gly Glu Ala Ala Ala Glu Leu Ala Glu Phe Ala Pro Leu Val
65 70 75 80

Gln Tyr Gly Cys His Ser His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr
85 90 95

Ala Pro Met Cys Thr Asp Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg
100 105 110

Pro Met Cys Glu Gln Ala Arg Leu Arg Cys Ala Pro Ile Met Glu Gln
115 120 125

Phe Asn Phe Gly Trp Pro Asp Ser Leu Asp Cys Ala Arg Leu Pro Thr
130 135 140

Arg Asn Asp Pro His Ala Leu Cys Met Glu Ala Pro Glu Asn Ala Thr
145 150 155 160

<210> 44
<211> 155
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Met Gln Arg Pro Gly Pro Arg Leu Trp Leu Val Leu Gln Val Met Gly
1 5 10 15

Ser Cys Ala Ala Ile Ser Ser Met Asp Met Glu Arg Pro Gly Asp Gly
20 25 30

Lys Cys Gln Pro Ile Glu Ile Pro Met Cys Lys Asp Ile Gly Tyr Asn
35 40 45

Met Thr Arg Met Pro Asn Leu Met Gly His Glu Asn Gln Arg Glu Ala
50 55 60

Ala Ile Gln Leu His Glu Phe Ala Pro Leu Val Glu Tyr Gly Cys His
65 70 75 80

Gly His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met Cys Thr
85 90 95

Glu Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Val Met Cys Glu Gln
100 105 110

Ala Arg Leu Lys Cys Ser Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe Lys Trp
115 120 125

Pro Asp Ser Leu Asp Cys Arg Lys Leu Pro Asn Lys Asn Asp Pro Asn

130 135 140

Tyr Leu Cys Met Glu Ala Pro Asn Asn Gly Ser
145 150 155

<210> 45
<211> 174
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

Met Gly Ile Gly Arg Ser Glu Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gly
1 5 10 15

Val Leu Leu Ala Leu Gly Ala Ala Leu Leu Ala Val Gly Ser Ala Ser
20 25 30

Glu Tyr Asp Tyr Val Ser Phe Gln Ser Asp Ile Gly Pro Tyr Gln Ser
35 40 45

Gly Arg Phe Tyr Thr Lys Pro Pro Gln Cys Val Asp Ile Pro Ala Asp
50 55 60

Leu Arg Leu Cys His Asn Val Gly Tyr Lys Lys Met Val Leu Pro Asn
65 70 75 80

Leu Leu Glu His Glu Thr Met Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser
85 90 95

Trp Val Pro Leu Leu Asn Lys Asn Cys His Ala Gly Thr Gln Val Phe
100 105 110

Leu Cys Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro
115 120 125

Cys Arg Trp Leu Cys Glu Ala Val Arg Asp Ser Cys Glu Pro Val Met
130 135 140

Gln Phe Phe Gly Phe Tyr Trp Pro Glu Met Leu Lys Cys Asp Lys Phe
145 150 155 160

Pro Glu Gly Asp Val Cys Ile Ala Met Thr Pro Pro Asn Ala
165 170

<210> 46
<211> 160
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

Met Leu Gln Gly Pro Gly Ser Leu Leu Leu Leu Phe Leu Ala Ser His
1 5 10 15

```
Cys Cys Leu Gly Ser Ala Arg Gly Leu Phe Leu Phe Gly Gln Pro Asp
            20                  25                  30

Phe Ser Tyr Lys Arg Ser Asn Cys Lys Pro Ile Pro Ala Asn Leu Gln
        35                  40                  45

Leu Cys His Gly Ile Glu Tyr Gln Asn Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu
    50                  55                  60

Gly His Glu Thr Met Lys Glu Val Leu Glu Gln Ala Gly Ala Trp Ile
65                  70                  75                  80

Pro Leu Val Met Lys Gln Cys His Pro Asp Thr Lys Lys Phe Leu Cys
                85                  90                  95

Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Asp Leu Asp Glu Thr Ile Gln
            100                 105                 110

Pro Cys His Ser Leu Cys Val Gln Val Lys Asp Arg Cys Ala Pro Val
        115                 120                 125

Met Ser Ala Phe Gly Phe Pro Trp Pro Asp Met Leu Glu Cys Asp Arg
    130                 135                 140

Phe Pro Gln Asp Asn Asp Leu Cys Ile Pro Leu Ala Ser Ser Asp His
145                 150                 155                 160
```

<210> 47
<211> 155
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

```
Met Val Cys Gly Ser Pro Gly Gly Met Leu Leu Leu Arg Ala Gly Leu
1               5                   10                  15

Leu Ala Leu Ala Ala Leu Cys Leu Leu Arg Val Pro Gly Ala Arg Ala
            20                  25                  30

Ala Ala Cys Glu Pro Val Arg Ile Pro Leu Cys Lys Ser Leu Pro Trp
        35                  40                  45

Asn Met Thr Lys Met Pro Asn His Leu His His Ser Thr Gln Ala Asn
    50                  55                  60

Ala Ile Leu Ala Ile Glu Gln Phe Glu Gly Leu Leu Gly Thr His Cys
65                  70                  75                  80

Ser Pro Asp Leu Leu Phe Phe Leu Cys Ala Met Tyr Ala Pro Ile Cys
                85                  90                  95
```

```
Thr Ile Asp Phe Gln His Glu Pro Ile Lys Pro Cys Lys Ser Val Cys
            100                 105                 110

Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Pro Ile Leu Ile Lys Tyr Arg His
        115                 120                 125

Ser Trp Pro Glu Asn Leu Ala Cys Glu Glu Leu Pro Val Tyr Asp Arg
    130                 135                 140

Gly Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr
145                 150                 155
```

<210> 48
<211> 144
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

```
Met Phe Leu Ser Ile Leu Val Ala Leu Cys Leu Trp Leu His Leu Ala
1               5                   10                  15

Leu Gly Val Arg Gly Ala Pro Cys Glu Ala Val Arg Ile Pro Met Cys
            20                  25                  30

Arg His Met Pro Trp Asn Ile Thr Arg Met Pro Asn His Leu His His
        35                  40                  45

Ser Thr Gln Glu Asn Ala Ile Leu Ala Ile Glu Gln Tyr Glu Glu Leu
    50                  55                  60

Val Asp Val Asn Cys Ser Ala Val Leu Arg Phe Phe Phe Cys Ala Met
65                  70                  75                  80

Tyr Ala Pro Ile Cys Thr Leu Glu Phe Leu His Asp Pro Ile Lys Pro
                85                  90                  95

Cys Lys Ser Val Cys Gln Arg Ala Arg Asp Asp Cys Glu Pro Leu Met
            100                 105                 110

Lys Met Tyr Asn His Ser Trp Pro Glu Ser Leu Ala Cys Asp Glu Leu
        115                 120                 125

Pro Val Tyr Asp Arg Gly Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr
    130                 135                 140
```

<210> 49
<211> 170
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

```
Met Arg Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Val Arg Thr Ala Ala Leu Ala
1               5                   10                  15
```

```
Leu Leu Leu Gly Ala Leu His Trp Ala Pro Ala Arg Cys Glu Glu Tyr
            20                  25                  30

Asp Tyr Tyr Gly Trp Gln Ala Glu Pro Leu His Gly Arg Ser Tyr Ser
        35                  40                  45

Lys Pro Pro Gln Cys Leu Asp Ile Pro Ala Asp Leu Pro Leu Cys His
    50                  55                  60

Thr Val Gly Tyr Lys Arg Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu Glu His Glu
65                  70                  75                  80

Ser Leu Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser Trp Leu Pro Leu Leu
                85                  90                  95

Ala Lys Arg Cys His Ser Asp Thr Gln Val Phe Leu Cys Ser Leu Phe
            100                 105                 110

Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro Cys Arg Ser Leu Cys
        115                 120                 125

Glu Ala Val Arg Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Glu Ala Tyr Gly Phe
    130                 135                 140

Pro Trp Pro Glu Met Leu His Cys His Lys Phe Pro Leu Asp Asn Asp
145                 150                 155                 160

Leu Cys Ile Ala Val Gln Phe Gly His Leu
                165                 170
```

<210> 50
<211> 163
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

```
Gln Ala Ala Gly Gln Gly Pro Gly Gln Gly Pro Gly Pro Gly Gln Gln
1               5                   10                  15

Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gln Gln Gln Ser Gly Gln Gln Tyr Asn Gly
            20                  25                  30

Glu Arg Gly Ile Ser Val Pro Asp His Gly Tyr Cys Gln Pro Ile Ser
        35                  40                  45

Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln Thr Ile Met Pro Asn
    50                  55                  60

Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln
65                  70                  75                  80
```

```
Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser Ala Glu Leu Lys Phe Phe
                85                  90                  95

Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val Leu Glu Gln Ala Leu
            100                 105                 110

Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala
        115                 120                 125

Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Asp Thr Leu Lys Cys Glu
    130                 135                 140

Lys Phe Pro Val His Gly Ala Gly Glu Leu Cys Val Gly Gln Asn Thr
145                 150                 155                 160

Ser Asp Lys
```

<210> 51
<211> 136
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51

```
Ala Gln Phe His Gly Glu Lys Gly Ile Ser Ile Pro Asp His Gly Phe
1               5                   10                  15

Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln
            20                  25                  30

Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly
        35                  40                  45

Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser Pro
    50                  55                  60

Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val
65                  70                  75                  80

Leu Glu Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser Ile Cys Glu Ser Ala Arg
                85                  90                  95

Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu
            100                 105                 110

Arg Leu Arg Cys Glu His Phe Pro Arg His Gly Ala Glu Gln Ile Cys
        115                 120                 125

Val Gly Gln Asn His Ser Glu Asp
    130                 135
```

<210> 52
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52

His Ser Leu Phe Ser Cys Glu Pro Ile Thr Leu Arg Met Cys Gln Asp
1 5 10 15

Leu Pro Tyr Asn Thr Thr Phe Met Pro Asn Leu Leu Asn His Tyr Asp
20 25 30

Gln Gln Thr Ala Ala Leu Ala Met Glu Pro Phe His Pro Met Val Asn
35 40 45

Leu Asp Cys Ser Arg Asp Phe Arg Pro Phe Leu Cys Ala Leu Tyr Ala
50 55 60

Pro Ile Cys Met Glu Tyr Gly Arg Val Thr Leu Pro Cys Arg Arg Leu
65 70 75 80

Cys Gln Arg Ala Tyr Ser Glu Cys Ser Lys Leu Met Glu Met Phe Gly
85 90 95

Val Pro Trp Pro Glu Asp Met Glu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Cys Asp
100 105 110

Glu Pro Tyr Pro Arg Leu Val
115

<210> 53
<211> 130
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

Phe Gly Asp Glu Glu Glu Arg Arg Cys Asp Pro Ile Arg Ile Ser Met
1 5 10 15

Cys Gln Asn Leu Gly Tyr Asn Val Thr Lys Met Pro Asn Leu Val Gly
20 25 30

His Glu Leu Gln Thr Asp Ala Glu Leu Gln Leu Thr Thr Phe Thr Pro
35 40 45

Leu Ile Gln Tyr Gly Cys Ser Ser Gln Leu Gln Phe Phe Leu Cys Ser
50 55 60

Val Tyr Val Pro Met Cys Thr Glu Lys Ile Asn Ile Pro Ile Gly Pro
65 70 75 80

Cys Gly Gly Met Cys Leu Ser Val Lys Arg Arg Cys Glu Pro Val Leu
85 90 95

Lys Glu Phe Gly Phe Ala Trp Pro Glu Ser Leu Asn Cys Ser Lys Phe
100 105 110

Pro Pro Gln Asn Asp His Asn His Met Cys Met Glu Gly Pro Gly Asp
115 120 125

Glu Glu
130

<210> 54
<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

Ala Ser Lys Ala Pro Val Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Met Cys Arg
1 5 10 15

Gly Ile Gly Tyr Asn Leu Thr His Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp
20 25 30

Thr Gln Asp Glu Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val
35 40 45

Glu Ile Gln Cys Ser Pro Asp Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr
50 55 60

Thr Pro Ile Cys Leu Pro Asp Tyr His Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg
65 70 75 80

Ser Val Cys Glu Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ser Pro Leu Met Arg Gln
85 90 95

Tyr Gly Phe Ala Trp Pro Glu Arg Met Ser Cys Asp Arg Leu Pro Val
100 105 110

Leu Gly Arg Asp Ala Glu Val Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Ser Glu
115 120 125

Ala

<210> 55
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55

His Ser Leu Phe Thr Cys Glu Pro Ile Thr Val Pro Arg Cys Met Lys
1 5 10 15

Met Ala Tyr Asn Met Thr Phe Phe Pro Asn Leu Met Gly His Tyr Asp
20 25 30

Gln Ser Ile Ala Ala Val Glu Met Glu His Phe Leu Pro Leu Ala Asn
35 40 45

Leu Glu Cys Ser Pro Asn Ile Glu Thr Phe Leu Cys Lys Ala Phe Val
50 55 60

Pro Thr Cys Ile Glu Gln Ile His Val Val Pro Pro Cys Arg Lys Leu
65 70 75 80

Cys Glu Lys Val Tyr Ser Asp Cys Lys Lys Leu Ile Asp Thr Phe Gly
85 90 95

Ile Arg Trp Pro Glu Glu Leu Glu Cys Asp Arg Leu Gln Tyr Cys Asp
100 105 110

Glu Thr Val Pro Val Thr Phe
115

<210> 56
<211> 136
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

Gln Pro Tyr His Gly Glu Lys Gly Ile Ser Val Pro Asp His Gly Phe
1 5 10 15

Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln
20 25 30

Thr Ile Leu Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly
35 40 45

Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser Pro
50 55 60

Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val
65 70 75 80

Leu Asp Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg
85 90 95

Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu
100 105 110

Arg Leu Arg Cys Glu Asn Phe Pro Val His Gly Ala Gly Glu Ile Cys
115 120 125

Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Gly

130 135

<210> 57
<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

Ala Ser Ala Lys Glu Leu Ala Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Leu Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ile Gly Tyr Asn Tyr Thr Tyr Met Pro Asn Gln Phe Asn His
20 25 30

Asp Thr Gln Asp Glu Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu
35 40 45

Val Glu Ile Gln Cys Ser Pro Asp Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met
50 55 60

Tyr Thr Pro Ile Cys Leu Glu Asp Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Cys
65 70 75 80

Arg Ser Val Cys Glu Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Arg
85 90 95

Gln Tyr Gly Phe Ala Trp Pro Asp Arg Met Arg Cys Asp Arg Leu Pro
100 105 110

Glu Gln Gly Asn Pro Asp Thr Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Thr Asp
115 120 125

Leu

<210> 58
<211> 139
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58

Ala Leu Glu Ile Gly Arg Phe Asp Pro Glu Arg Gly Arg Gly Ala Ala
1 5 10 15

Pro Cys Gln Ala Val Glu Ile Pro Met Cys Arg Gly Ile Gly Tyr Asn
20 25 30

Leu Thr Arg Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Ser Gln Gly Glu Ala
35 40 45

Ala Ala Glu Leu Ala Glu Phe Ala Pro Leu Val Gln Tyr Gly Cys His
50 55 60

Ser His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met Cys Thr
65 70 75 80

Asp Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Pro Met Cys Glu Gln
85 90 95

Ala Arg Leu Arg Cys Ala Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe Gly Trp
100 105 110

Pro Asp Ser Leu Asp Cys Ala Arg Leu Pro Thr Arg Asn Asp Pro His
115 120 125

Ala Leu Cys Met Glu Ala Pro Glu Asn Ala Thr
130 135

<210> 59
<211> 135
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

Ile Ser Ser Met Asp Met Glu Arg Pro Gly Asp Gly Lys Cys Gln Pro
1 5 10 15

Ile Glu Ile Pro Met Cys Lys Asp Ile Gly Tyr Asn Met Thr Arg Met
20 25 30

Pro Asn Leu Met Gly His Glu Asn Gln Arg Glu Ala Ala Ile Gln Leu
35 40 45

His Glu Phe Ala Pro Leu Val Glu Tyr Gly Cys His Gly His Leu Arg
50 55 60

Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met Cys Thr Glu Gln Val Ser
65 70 75 80

Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Val Met Cys Glu Gln Ala Arg Leu Lys
85 90 95

Cys Ser Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe Lys Trp Pro Asp Ser Leu
100 105 110

Asp Cys Arg Lys Leu Pro Asn Lys Asn Asp Pro Asn Tyr Leu Cys Met
115 120 125

Glu Ala Pro Asn Asn Gly Ser
130 135

<210> 60
<211> 144
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

Ala Ser Glu Tyr Asp Tyr Val Ser Phe Gln Ser Asp Ile Gly Pro Tyr
1 5 10 15

Gln Ser Gly Arg Phe Tyr Thr Lys Pro Pro Gln Cys Val Asp Ile Pro
20 25 30

Ala Asp Leu Arg Leu Cys His Asn Val Gly Tyr Lys Lys Met Val Leu
35 40 45

Pro Asn Leu Leu Glu His Glu Thr Met Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala
50 55 60

Ser Ser Trp Val Pro Leu Leu Asn Lys Asn Cys His Ala Gly Thr Gln
65 70 75 80

Val Phe Leu Cys Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile
85 90 95

Tyr Pro Cys Arg Trp Leu Cys Glu Ala Val Arg Asp Ser Cys Glu Pro
100 105 110

Val Met Gln Phe Phe Gly Phe Tyr Trp Pro Glu Met Leu Lys Cys Asp
115 120 125

Lys Phe Pro Glu Gly Asp Val Cys Ile Ala Met Thr Pro Pro Asn Ala
130 135 140

<210> 61
<211> 142
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

Leu Gly Ser Ala Arg Gly Leu Phe Leu Phe Gly Gln Pro Asp Phe Ser
1 5 10 15

Tyr Lys Arg Ser Asn Cys Lys Pro Ile Pro Ala Asn Leu Gln Leu Cys
20 25 30

His Gly Ile Glu Tyr Gln Asn Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu Gly His
35 40 45

Glu Thr Met Lys Glu Val Leu Glu Gln Ala Gly Ala Trp Ile Pro Leu
50 55 60

Val Met Lys Gln Cys His Pro Asp Thr Lys Lys Phe Leu Cys Ser Leu
65 70 75 80

Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Asp Leu Asp Glu Thr Ile Gln Pro Cys
85 90 95

```
His Ser Leu Cys Val Gln Val Lys Asp Arg Cys Ala Pro Val Met Ser
            100                 105                 110

Ala Phe Gly Phe Pro Trp Pro Asp Met Leu Glu Cys Asp Arg Phe Pro
        115                 120                 125

Gln Asp Asn Asp Leu Cys Ile Pro Leu Ala Ser Ser Asp His
    130                 135                 140
```

<210> 62
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62

```
Ala Ala Cys Glu Pro Val Arg Ile Pro Leu Cys Lys Ser Leu Pro Trp
1               5                   10                  15

Asn Met Thr Lys Met Pro Asn His Leu His His Ser Thr Gln Ala Asn
            20                  25                  30

Ala Ile Leu Ala Ile Glu Gln Phe Glu Gly Leu Leu Gly Thr His Cys
        35                  40                  45

Ser Pro Asp Leu Leu Phe Phe Leu Cys Ala Met Tyr Ala Pro Ile Cys
    50                  55                  60

Thr Ile Asp Phe Gln His Glu Pro Ile Lys Pro Cys Lys Ser Val Cys
65                  70                  75                  80

Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Pro Ile Leu Ile Lys Tyr Arg His
                85                  90                  95

Ser Trp Pro Glu Asn Leu Ala Cys Glu Glu Leu Pro Val Tyr Asp Arg
            100                 105                 110

Gly Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr
        115                 120
```

<210> 63
<211> 126
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63

```
Val Arg Gly Ala Pro Cys Glu Ala Val Arg Ile Pro Met Cys Arg His
1               5                   10                  15

Met Pro Trp Asn Ile Thr Arg Met Pro Asn His Leu His His Ser Thr
            20                  25                  30
```

Gln Glu Asn Ala Ile Leu Ala Ile Glu Gln Tyr Glu Glu Leu Val Asp
35 40 45

Val Asn Cys Ser Ala Val Leu Arg Phe Phe Phe Cys Ala Met Tyr Ala
50 55 60

Pro Ile Cys Thr Leu Glu Phe Leu His Asp Pro Ile Lys Pro Cys Lys
65 70 75 80

Ser Val Cys Gln Arg Ala Arg Asp Asp Cys Glu Pro Leu Met Lys Met
85 90 95

Tyr Asn His Ser Trp Pro Glu Ser Leu Ala Cys Asp Glu Leu Pro Val
100 105 110

Tyr Asp Arg Gly Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr
115 120 125

<210> 64
<211> 143
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64

Arg Cys Glu Glu Tyr Asp Tyr Tyr Gly Trp Gln Ala Glu Pro Leu His
1 5 10 15

Gly Arg Ser Tyr Ser Lys Pro Pro Gln Cys Leu Asp Ile Pro Ala Asp
20 25 30

Leu Pro Leu Cys His Thr Val Gly Tyr Lys Arg Met Arg Leu Pro Asn
35 40 45

Leu Leu Glu His Glu Ser Leu Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser
50 55 60

Trp Leu Pro Leu Leu Ala Lys Arg Cys His Ser Asp Thr Gln Val Phe
65 70 75 80

Leu Cys Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro
85 90 95

Cys Arg Ser Leu Cys Glu Ala Val Arg Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met
100 105 110

Glu Ala Tyr Gly Phe Pro Trp Pro Glu Met Leu His Cys His Lys Phe
115 120 125

Pro Leu Asp Asn Asp Leu Cys Ile Ala Val Gln Phe Gly His Leu
130 135 140

<210> 65

<211> 162
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

Thr Gly Val Leu Phe Val Lys Phe Gly Pro Pro Pro Thr Ala Ser Pro
1 5 10 15

Gly Tyr Ser Asp Glu Tyr Glu Glu Asp Gly Phe Cys Gln Pro Tyr Arg
20 25 30

Gly Ile Ala Cys Ala Arg Phe Ile Gly Asn Arg Thr Val Tyr Met Glu
35 40 45

Ser Leu His Met Gln Gly Glu Ile Glu Asn Gln Ile Thr Ala Ala Phe
50 55 60

Thr Met Ile Gly Thr Ser Ser His Leu Ser Asp Lys Cys Ser Gln Phe
65 70 75 80

Ala Ile Pro Ser Leu Cys His Tyr Ala Phe Pro Tyr Cys Asp Glu Thr
85 90 95

Ser Ser Val Pro Lys Pro Arg Asp Leu Cys Arg Asp Glu Cys Glu Ile
100 105 110

Leu Glu Asn Val Leu Cys Gln Thr Glu Tyr Ile Phe Ala Arg Ser Asn
115 120 125

Pro Met Ile Leu Met Arg Leu Lys Leu Pro Asn Cys Glu Asp Leu Pro
130 135 140

Gln Pro Glu Ser Pro Glu Ala Ala Asn Cys Ile Arg Ile Gly Ile Pro
145 150 155 160

Met Ala

<210> 66
<211> 162
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66

Thr Gly Val Leu Phe Val Arg Leu Gly Pro Thr His Ser Pro Asn His
1 5 10 15

Asn Phe Gln Asp Asp Tyr His Glu Asp Gly Phe Cys Gln Pro Tyr Arg
20 25 30

Gly Ile Ala Cys Ala Arg Phe Ile Gly Asn Arg Thr Ile Tyr Val Asp
35 40 45

Ser Leu Gln Met Gln Gly Glu Ile Glu Asn Arg Ile Thr Ala Ala Phe
50 55 60

Thr Met Ile Gly Thr Ser Thr His Leu Ser Asp Gln Cys Ser Gln Phe
65 70 75 80

Ala Ile Pro Ser Phe Cys His Phe Val Phe Pro Leu Cys Asp Ala Arg
85 90 95

Ser Arg Thr Pro Lys Pro Arg Glu Leu Cys Arg Asp Glu Cys Glu Val
100 105 110

Leu Glu Ser Asp Leu Cys Arg Gln Glu Tyr Thr Ile Ala Arg Ser Asn
115 120 125

Pro Leu Ile Leu Met Arg Leu Gln Leu Pro Lys Cys Glu Ala Leu Pro
130 135 140

Met Pro Glu Ser Pro Asp Ala Ala Asn Cys Met Arg Ile Gly Ile Pro
145 150 155 160

Ala Glu

<210> 67
<211> 227
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

```
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Gly Lys
225
```

<210> 68
<211> 230
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

```
Asp Lys Ala Ala Arg Ser Thr Leu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
1               5                   10                  15

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            20                  25                  30

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        35                  40                  45

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    50                  55                  60

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
65                  70                  75                  80

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                85                  90                  95

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            100                 105                 110

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
```

```
        115                 120                 125

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    130                 135                 140

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
145                 150                 155                 160

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                165                 170                 175

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            180                 185                 190

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        195                 200                 205

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    210                 215                 220

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230
```

<210> 69
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Peptide linker

<400> 69

```
Glu Ser Gly Gly Gly Gly Val Thr
1               5
```

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Peptide linker

<400> 70

```
Leu Glu Ser Gly Gly Gly Gly Val Thr
1               5
```

<210> 71
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Peptide linker

<400> 71

Gly Arg Ala Gln Val Thr
1 5

<210> 72
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide linker

<400> 72

Trp Arg Ala Gln Val Thr
1 5

<210> 73
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Peptide linker

<400> 73

Ala Arg Gly Arg Ala Gln Val Thr
1 5

<210> 74
<211> 391
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Frz8-Fc chimeric protein

<400> 74

Met Glu Trp Gly Tyr Leu Leu Glu Val Thr Ser Leu Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15

Ala Val Leu Gln Arg Ser Ser Gly Ala Ala Ala Ala Ser Ala Lys Glu
20 25 30

Leu Ala Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Leu Cys Lys Gly Ile Gly Tyr
35 40 45

Asn Tyr Thr Tyr Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu
50 55 60

Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys
65 70 75 80

Ser Pro Asp Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr Pro Ile Cys
85 90 95

Leu Glu Asp Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu

```
            100                 105                 110

Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala
        115                 120                 125

Trp Pro Asp Arg Met Arg Cys Asp Arg Leu Pro Glu Gln Gly Asn Pro
    130                 135                 140

Asp Thr Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Thr Asp Leu Glu Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Gly Gly Val Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
                165                 170                 175

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
            180                 185                 190

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
        195                 200                 205

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
    210                 215                 220

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
225                 230                 235                 240

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
                245                 250                 255

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
            260                 265                 270

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
        275                 280                 285

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
    290                 295                 300

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
305                 310                 315                 320

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
                325                 330                 335

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
            340                 345                 350

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
        355                 360                 365

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
```

370 375 380

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385 390

<210> 75
<211> 396
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Frz5-Fc chimeric protein

<400> 75

Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
1 5 10 15

Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Ile Asp Ala Arg Gly Ala
20 25 30

Ser Lys Ala Pro Val Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Met Cys Arg Gly
35 40 45

Ile Gly Tyr Asn Leu Thr His Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr
50 55 60

Gln Asp Glu Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu
65 70 75 80

Ile Gln Cys Ser Pro Asp Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr
85 90 95

Pro Ile Cys Leu Pro Asp Tyr His Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser
100 105 110

Val Cys Glu Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ser Pro Leu Met Arg Gln Tyr
115 120 125

Gly Phe Ala Trp Pro Glu Arg Met Ser Cys Asp Arg Leu Pro Val Leu
130 135 140

Gly Arg Asp Ala Glu Val Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Ser Glu Ala
145 150 155 160

Gly Arg Ala Gln Val Thr Asp Lys Ala Ala Arg Ser Thr Leu Cys Pro
165 170 175

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
180 185 190

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
195 200 205

```
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
    210                 215                 220

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
225                 230                 235                 240

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
                245                 250                 255

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
            260                 265                 270

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
        275                 280                 285

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
    290                 295                 300

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
305                 310                 315                 320

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
                325                 330                 335

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
            340                 345                 350

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
        355                 360                 365

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
    370                 375                 380

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385                 390                 395


<210>  76
<211>  470
<212>  PRT
<213>  Artificial sequence

<220>
<223>  Frz1-Fc chimeric protein

<400>  76

Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
1               5                   10                  15

Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Ile Asp Glu Glu Gly Ser
            20                  25                  30

Gly Asp Ala Gly Gly Arg Arg Arg Pro Pro Val Asp Pro Arg Arg Leu
```

```
        35                  40                  45

Ala Arg Gln Leu Leu Leu Leu Leu Trp Leu Leu Glu Ala Pro Leu Leu
    50                  55                  60

Leu Gly Val Arg Ala Gln Ala Ala Gly Gln Gly Pro Gly Gln Gly Pro
65                  70                  75                  80

Gly Pro Gly Gln Gln Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gln Gln Gln Ser Gly
                85                  90                  95

Gln Gln Tyr Asn Gly Glu Arg Gly Ile Ser Val Pro Asp His Gly Tyr
            100                 105                 110

Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln
        115                 120                 125

Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly
    130                 135                 140

Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser Ala
145                 150                 155                 160

Glu Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val
                165                 170                 175

Leu Glu Gln Ala Leu Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg
            180                 185                 190

Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Asp
        195                 200                 205

Thr Leu Lys Cys Glu Lys Phe Pro Val His Gly Ala Gly Glu Leu Cys
    210                 215                 220

Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Lys Ala Arg Gly Arg Ala Gln Val Thr
225                 230                 235                 240

Asp Lys Ala Ala Arg Ser Thr Leu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
```

305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 77
<211> 403
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Frz2-Fc chimeric protein

<400> 77

Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
1 5 10 15

Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Ile Asp Ala Arg Gly Ala
20 25 30

Gln Phe His Gly Glu Lys Gly Ile Ser Ile Pro Asp His Gly Phe Cys
35 40 45

Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln Thr
50 55 60

```
Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly Leu
65                  70                  75                  80

Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser Pro Glu
                85                  90                  95

Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val Leu
            100                 105                 110

Glu Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser Ile Cys Glu Arg Ala Arg Gln
        115                 120                 125

Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu Arg
    130                 135                 140

Leu Arg Cys Glu His Phe Pro Arg His Gly Ala Glu Gln Ile Cys Val
145                 150                 155                 160

Gly Gln Asn His Ser Glu Asp Gly Arg Ala Gln Val Thr Asp Lys Ala
                165                 170                 175

Ala Arg Ser Thr Leu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
            180                 185                 190

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
        195                 200                 205

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
    210                 215                 220

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
225                 230                 235                 240

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
                245                 250                 255

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
            260                 265                 270

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
        275                 280                 285

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
    290                 295                 300

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
305                 310                 315                 320

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
                325                 330                 335
```

```
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
            340                 345                 350

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
        355                 360                 365

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
    370                 375                 380

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
385                 390                 395                 400

Pro Gly Lys
```

<210> 78
<211> 388
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Frz3-Fc chimeric protein

<400> 78

```
Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
1               5                   10                  15

Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Ile Asp Ala Arg Gly His
            20                  25                  30

Ser Leu Phe Ser Cys Glu Pro Ile Thr Leu Arg Met Cys Gln Asp Leu
        35                  40                  45

Pro Tyr Asn Thr Thr Phe Met Pro Asn Leu Leu Asn His Tyr Asp Gln
    50                  55                  60

Gln Thr Ala Ala Leu Ala Met Glu Pro Phe His Pro Met Val Asn Leu
65                  70                  75                  80

Asp Cys Ser Arg Asp Phe Arg Pro Phe Leu Cys Ala Leu Tyr Ala Pro
                85                  90                  95

Ile Cys Met Glu Tyr Gly Arg Val Thr Leu Pro Cys Arg Arg Leu Cys
            100                 105                 110

Gln Arg Ala Tyr Ser Glu Cys Ser Lys Leu Met Glu Met Phe Gly Val
        115                 120                 125

Pro Trp Pro Glu Asp Met Glu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Cys Asp Glu
    130                 135                 140

Pro Tyr Pro Arg Leu Val Asp Leu Gly Arg Ala Gln Val Thr Asp Lys
```

145 150 155 160

Ala Ala Arg Ser Thr Leu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
165 170 175

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
180 185 190

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
195 200 205

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
210 215 220

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
225 230 235 240

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
245 250 255

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
260 265 270

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
275 280 285

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
290 295 300

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
305 310 315 320

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
325 330 335

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
340 345 350

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
355 360 365

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
370 375 380

Ser Pro Gly Lys
385

<210> 79
<211> 397
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Frz4-Fc chimeric protein

<400> 79

```
Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
1               5                  10                  15

Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Ile Asp Ala Arg Gly Phe
            20                  25                  30

Gly Asp Glu Glu Glu Arg Arg Cys Asp Pro Ile Arg Ile Ser Met Cys
        35                  40                  45

Gln Asn Leu Gly Tyr Asn Val Thr Lys Met Pro Asn Leu Val Gly His
    50                  55                  60

Glu Leu Gln Thr Asp Ala Glu Leu Gln Leu Thr Thr Phe Thr Pro Leu
65                  70                  75                  80

Ile Gln Tyr Gly Cys Ser Ser Gln Leu Gln Phe Phe Leu Cys Ser Val
                85                  90                  95

Tyr Val Pro Met Cys Thr Glu Lys Ile Asn Ile Pro Ile Gly Pro Cys
            100                 105                 110

Gly Gly Met Cys Leu Ser Val Lys Arg Arg Cys Glu Pro Val Leu Lys
        115                 120                 125

Glu Phe Gly Phe Ala Trp Pro Glu Ser Leu Asn Cys Ser Lys Phe Pro
    130                 135                 140

Pro Gln Asn Asp His Asn His Met Cys Met Glu Gly Pro Gly Asp Glu
145                 150                 155                 160

Glu Gly Arg Ala Gln Val Thr Asp Lys Ala Ala Arg Ser Thr Leu Cys
                165                 170                 175

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
            180                 185                 190

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
        195                 200                 205

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
    210                 215                 220

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
225                 230                 235                 240

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
                245                 250                 255
```

```
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
            260                 265                 270

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
        275                 280                 285

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
    290                 295                 300

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
305                 310                 315                 320

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
                325                 330                 335

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
            340                 345                 350

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
        355                 360                 365

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
    370                 375                 380

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385                 390                 395
```

<210> 80
<211> 373
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Frz6-Fc chimeric protein

<400> 80

```
Met Glu Met Phe Thr Phe Leu Leu Thr Cys Ile Phe Leu Pro Leu Leu
1               5                   10                  15

Arg Gly His Ser Leu Phe Thr Cys Glu Pro Ile Thr Val Pro Arg Cys
            20                  25                  30

Met Lys Met Ala Tyr Asn Met Thr Phe Phe Pro Asn Leu Met Gly His
        35                  40                  45

Tyr Asp Gln Ser Ile Ala Ala Val Glu Met Glu His Phe Leu Pro Leu
    50                  55                  60

Ala Asn Leu Glu Cys Ser Pro Asn Ile Glu Thr Phe Leu Cys Lys Ala
65                  70                  75                  80

Phe Val Pro Thr Cys Ile Glu Gln Ile His Val Val Pro Pro Cys Arg
```

85 90 95

Lys Leu Cys Glu Lys Val Tyr Ser Asp Cys Lys Lys Leu Ile Asp Thr
100 105 110

Phe Gly Ile Arg Trp Pro Glu Glu Leu Glu Cys Asp Arg Leu Gln Tyr
115 120 125

Cys Asp Glu Thr Val Pro Val Thr Phe Leu Glu Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Val Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
145 150 155 160

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
165 170 175

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
180 185 190

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
195 200 205

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
210 215 220

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
225 230 235 240

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
245 250 255

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
260 265 270

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
275 280 285

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
290 295 300

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
305 310 315 320

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
325 330 335

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
340 345 350

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

355 360 365

Leu Ser Pro Gly Lys
370

<210> 81
<211> 404
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Frz7-Fc chimeric protein

<400> 81

Met Arg Asp Pro Gly Ala Ala Ala Pro Leu Ser Ser Leu Gly Leu Cys
1 5 10 15

Ala Leu Val Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu Ser Ala Gly Ala Gly Ala
20 25 30

Gln Pro Tyr His Gly Glu Lys Gly Ile Ser Val Pro Asp His Gly Phe
35 40 45

Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln
50 55 60

Thr Ile Leu Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly
65 70 75 80

Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser Pro
85 90 95

Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val
100 105 110

Leu Asp Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg
115 120 125

Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu
130 135 140

Arg Leu Arg Cys Glu Asn Phe Pro Val His Gly Ala Gly Glu Ile Cys
145 150 155 160

Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Gly Leu Glu Ser Gly Gly Gly Gly Val
165 170 175

Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
180 185 190

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
195 200 205

```
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
    210                 215                 220

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
225                 230                 235                 240

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
                245                 250                 255

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
            260                 265                 270

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
        275                 280                 285

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
    290                 295                 300

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
305                 310                 315                 320

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
                325                 330                 335

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
            340                 345                 350

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
        355                 360                 365

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
    370                 375                 380

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
385                 390                 395                 400

Ser Pro Gly Lys
```

<210> 82
<211> 396
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Frz9-Fc chimeric protein

<400> 82

```
Met Ala Val Ala Pro Leu Arg Gly Ala Leu Leu Leu Trp Gln Leu Leu
1               5                   10                  15

Ala Ala Gly Gly Ala Ala Leu Glu Ile Gly Arg Phe Asp Pro Glu Arg
```

```
            20                  25                  30

Gly Arg Gly Ala Ala Pro Cys Gln Ala Val Glu Ile Pro Met Cys Arg
        35                  40                  45

Gly Ile Gly Tyr Asn Leu Thr Arg Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr
    50                  55                  60

Ser Gln Gly Glu Ala Ala Ala Glu Leu Ala Glu Phe Ala Pro Leu Val
65                  70                  75                  80

Gln Tyr Gly Cys His Ser His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr
                85                  90                  95

Ala Pro Met Cys Thr Asp Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg
            100                 105                 110

Pro Met Cys Glu Gln Ala Arg Leu Arg Cys Ala Pro Ile Met Glu Gln
        115                 120                 125

Phe Asn Phe Gly Trp Pro Asp Ser Leu Asp Cys Ala Arg Leu Pro Thr
    130                 135                 140

Arg Asn Asp Pro His Ala Leu Cys Met Glu Ala Pro Glu Asn Ala Thr
145                 150                 155                 160

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Gly Val Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
                165                 170                 175

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
            180                 185                 190

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
        195                 200                 205

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
    210                 215                 220

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
225                 230                 235                 240

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
                245                 250                 255

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
            260                 265                 270

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
        275                 280                 285

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
```

290 295 300

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
305 310 315 320

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
325 330 335

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
340 345 350

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
355 360 365

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
370 375 380

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385 390 395

<210> 83
<211> 391
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Frz10-Fc chimeric protein

<400> 83

Met Gln Arg Pro Gly Pro Arg Leu Trp Leu Val Leu Gln Val Met Gly
1 5 10 15

Ser Cys Ala Ala Ile Ser Ser Met Asp Met Glu Arg Pro Gly Asp Gly
20 25 30

Lys Cys Gln Pro Ile Glu Ile Pro Met Cys Lys Asp Ile Gly Tyr Asn
35 40 45

Met Thr Arg Met Pro Asn Leu Met Gly His Glu Asn Gln Arg Glu Ala
50 55 60

Ala Ile Gln Leu His Glu Phe Ala Pro Leu Val Glu Tyr Gly Cys His
65 70 75 80

Gly His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met Cys Thr
85 90 95

Glu Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Val Met Cys Glu Gln
100 105 110

Ala Arg Leu Lys Cys Ser Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe Lys Trp
115 120 125

```
Pro Asp Ser Leu Asp Cys Arg Lys Leu Pro Asn Lys Asn Asp Pro Asn
    130                 135                 140

Tyr Leu Cys Met Glu Ala Pro Asn Asn Gly Ser Leu Glu Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Gly Gly Val Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
                165                 170                 175

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
            180                 185                 190

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
        195                 200                 205

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
    210                 215                 220

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
225                 230                 235                 240

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
                245                 250                 255

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
            260                 265                 270

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
        275                 280                 285

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
    290                 295                 300

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
305                 310                 315                 320

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
                325                 330                 335

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
            340                 345                 350

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
        355                 360                 365

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
    370                 375                 380

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385                 390
```

<210> 84
<211> 410
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sFRP1-Fc chimeric protein

<400> 84

```
Met Gly Ile Gly Arg Ser Glu Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gly
1               5                  10                  15

Val Leu Leu Ala Leu Gly Ala Ala Leu Leu Ala Val Gly Ser Ala Ser
            20                  25                  30

Glu Tyr Asp Tyr Val Ser Phe Gln Ser Asp Ile Gly Pro Tyr Gln Ser
        35                  40                  45

Gly Arg Phe Tyr Thr Lys Pro Pro Gln Cys Val Asp Ile Pro Ala Asp
    50                  55                  60

Leu Arg Leu Cys His Asn Val Gly Tyr Lys Lys Met Val Leu Pro Asn
65                  70                  75                  80

Leu Leu Glu His Glu Thr Met Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser
                85                  90                  95

Trp Val Pro Leu Leu Asn Lys Asn Cys His Ala Gly Thr Gln Val Phe
            100                 105                 110

Leu Cys Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro
        115                 120                 125

Cys Arg Trp Leu Cys Glu Ala Val Arg Asp Ser Cys Glu Pro Val Met
    130                 135                 140

Gln Phe Phe Gly Phe Tyr Trp Pro Glu Met Leu Lys Cys Asp Lys Phe
145                 150                 155                 160

Pro Glu Gly Asp Val Cys Ile Ala Met Thr Pro Pro Asn Ala Trp Arg
                165                 170                 175

Ala Gln Val Thr Asp Lys Ala Ala Arg Ser Thr Leu Cys Pro Pro Cys
            180                 185                 190

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        195                 200                 205

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    210                 215                 220

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
```

225 230 235 240

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
245 250 255

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
260 265 270

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
275 280 285

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
290 295 300

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
305 310 315 320

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
325 330 335

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
340 345 350

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
355 360 365

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
370 375 380

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
385 390 395 400

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
405 410

<210> 85
<211> 396
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sFRP2-Fc chimeric protein

<400> 85

Met Leu Gln Gly Pro Gly Ser Leu Leu Leu Leu Phe Leu Ala Ser His
1 5 10 15

Cys Cys Leu Gly Ser Ala Arg Gly Leu Phe Leu Phe Gly Gln Pro Asp
20 25 30

Phe Ser Tyr Lys Arg Ser Asn Cys Lys Pro Ile Pro Ala Asn Leu Gln
35 40 45

```
Leu Cys His Gly Ile Glu Tyr Gln Asn Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu
    50                  55                  60

Gly His Glu Thr Met Lys Glu Val Leu Glu Gln Ala Gly Ala Trp Ile
65                  70                  75                  80

Pro Leu Val Met Lys Gln Cys His Pro Asp Thr Lys Lys Phe Leu Cys
                85                  90                  95

Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Asp Leu Asp Glu Thr Ile Gln
            100                 105                 110

Pro Cys His Ser Leu Cys Val Gln Val Lys Asp Arg Cys Ala Pro Val
        115                 120                 125

Met Ser Ala Phe Gly Phe Pro Trp Pro Asp Met Leu Glu Cys Asp Arg
    130                 135                 140

Phe Pro Gln Asp Asn Asp Leu Cys Ile Pro Leu Ala Ser Ser Asp His
145                 150                 155                 160

Trp Arg Ala Gln Val Thr Asp Lys Ala Ala Arg Ser Thr Leu Cys Pro
                165                 170                 175

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
            180                 185                 190

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
        195                 200                 205

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
    210                 215                 220

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
225                 230                 235                 240

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
                245                 250                 255

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
            260                 265                 270

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
        275                 280                 285

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
    290                 295                 300

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
305                 310                 315                 320
```

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
325 330 335

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
340 345 350

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
355 360 365

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
370 375 380

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385 390 395

<210> 86
<211> 390
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sFRP3-Fc chimeric construct

<400> 86

Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
1 5 10 15

Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Ile Asp Ala Arg Gly Ala
20 25 30

Ala Cys Glu Pro Val Arg Ile Pro Leu Cys Lys Ser Leu Pro Trp Asn
35 40 45

Met Thr Lys Met Pro Asn His Leu His His Ser Thr Gln Ala Asn Ala
50 55 60

Ile Leu Ala Ile Glu Gln Phe Glu Gly Leu Leu Gly Thr His Cys Ser
65 70 75 80

Pro Asp Leu Leu Phe Phe Leu Cys Ala Met Tyr Ala Pro Ile Cys Thr
85 90 95

Ile Asp Phe Gln His Glu Pro Ile Lys Pro Cys Lys Ser Val Cys Glu
100 105 110

Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Pro Ile Leu Ile Lys Tyr Arg His Ser
115 120 125

Trp Pro Glu Asn Leu Ala Cys Glu Glu Leu Pro Val Tyr Asp Arg Gly
130 135 140

Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr Gly Arg Ala Gln Val Thr

145 150 155 160

Asp Lys Ala Ala Arg Ser Thr Leu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
165 170 175

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
180 185 190

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
195 200 205

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
210 215 220

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
225 230 235 240

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
245 250 255

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
260 265 270

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
275 280 285

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
290 295 300

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
305 310 315 320

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
325 330 335

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
340 345 350

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
355 360 365

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
370 375 380

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385 390

<210> 87
<211> 380
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sFRP4-Fc chimeric protein

<400> 87

Met Phe Leu Ser Ile Leu Val Ala Leu Cys Leu Trp Leu His Leu Ala
1 5 10 15

Leu Gly Val Arg Gly Ala Pro Cys Glu Ala Val Arg Ile Pro Met Cys
20 25 30

Arg His Met Pro Trp Asn Ile Thr Arg Met Pro Asn His Leu His His
35 40 45

Ser Thr Gln Glu Asn Ala Ile Leu Ala Ile Glu Gln Tyr Glu Glu Leu
50 55 60

Val Asp Val Asn Cys Ser Ala Val Leu Arg Phe Phe Phe Cys Ala Met
65 70 75 80

Tyr Ala Pro Ile Cys Thr Leu Glu Phe Leu His Asp Pro Ile Lys Pro
85 90 95

Cys Lys Ser Val Cys Gln Arg Ala Arg Asp Asp Cys Glu Pro Leu Met
100 105 110

Lys Met Tyr Asn His Ser Trp Pro Glu Ser Leu Ala Cys Asp Glu Leu
115 120 125

Pro Val Tyr Asp Arg Gly Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr
130 135 140

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Gly Val Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
145 150 155 160

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
165 170 175

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
180 185 190

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
195 200 205

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
210 215 220

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
225 230 235 240

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
245 250 255

```
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
            260                 265                 270

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
        275                 280                 285

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
    290                 295                 300

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
305                 310                 315                 320

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
            340                 345                 350

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
        355                 360                 365

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    370                 375                 380
```

<210> 88
<211> 406
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sFRP5-Fc chimeric protein

<400> 88

```
Met Arg Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Val Arg Thr Ala Ala Leu Ala
1               5                   10                  15

Leu Leu Leu Gly Ala Leu His Trp Ala Pro Ala Arg Cys Glu Glu Tyr
            20                  25                  30

Asp Tyr Tyr Gly Trp Gln Ala Glu Pro Leu His Gly Arg Ser Tyr Ser
        35                  40                  45

Lys Pro Pro Gln Cys Leu Asp Ile Pro Ala Asp Leu Pro Leu Cys His
    50                  55                  60

Thr Val Gly Tyr Lys Arg Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu Glu His Glu
65                  70                  75                  80

Ser Leu Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser Trp Leu Pro Leu Leu
                85                  90                  95

Ala Lys Arg Cys His Ser Asp Thr Gln Val Phe Leu Cys Ser Leu Phe
```

```
            100                 105                 110

Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro Cys Arg Ser Leu Cys
        115                 120                 125

Glu Ala Val Arg Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Glu Ala Tyr Gly Phe
    130                 135                 140

Pro Trp Pro Glu Met Leu His Cys His Lys Phe Pro Leu Asp Asn Asp
145                 150                 155                 160

Leu Cys Ile Ala Val Gln Phe Gly His Leu Trp Arg Ala Gln Val Thr
                165                 170                 175

Asp Lys Ala Ala Arg Ser Thr Leu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
            180                 185                 190

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        195                 200                 205

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
    210                 215                 220

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
225                 230                 235                 240

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
                245                 250                 255

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
            260                 265                 270

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
        275                 280                 285

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
    290                 295                 300

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
305                 310                 315                 320

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
                325                 330                 335

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
            340                 345                 350

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
        355                 360                 365

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
```

370 375 380

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
385 390 395 400

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
405

<210> 89
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 89
ctaagcactt acatgtggag atactg 26

<210> 90
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 90
acaggacaag taaacaatga caca 24

<210> 91
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe sequence

<400> 91
aacctgaggg cagaaagccc aa 22

<210> 92
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 92
ttcccacact gtcttagaga actt 24

<210> 93
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 93

ttctgagtat ctacattcaa ttgcttt 27

<210> 94
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe sequence

<400> 94
aaacatgcaa atacatgtgg tttctggtga c 31

<210> 95
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 95
tgactcgctt agctgaaacc t 21

<210> 96
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 96
tgagcctggt cactttatct ga 22

<210> 97
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe sequence

<400> 97
tcagaaggtc ttcggaaatg ttgcct 26

<210> 98
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 98
tgtggttgca gcctgtct 18

<210> 99
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 99
aaccaactct gcattggatt c 21

<210> 100
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe sequence

<400> 100
cctttgaaat tgttttactc tctgagtttt atatgctg 38

<210> 101
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 101
ctccgtgtgt cgcctat 17

<210> 102
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 102
catgacaaaa gtcattgagt acaaga 26

<210> 103
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe sequence

<400> 103
ttgagggctc aagctttccc ttgt 24

<210> 104
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 104
gaacctcgcg ctgtctct 18

<210> 105

<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 105
acttggtcct gcgattctg 19

<210> 106
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe sequence

<400> 106
agcctcaccg agacgcaggt c 21

<210> 107
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 107
ggcaacaatt tacctttgct t 21

<210> 108
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 108
gaaccaagtg gaacttcatt aca 23

<210> 109
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe sequence

<400> 109
cgccaacctt aggattgtaa agccc 25

<210> 110
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 110

cagatacaca ggacatggat ga 22

<210> 111
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 111
caaagctttt gtaagagact taggat 26

<210> 112
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe sequence

<400> 112
ccgtttcctc tagtttcttc ctgtagtact cctct 35

<210> 113
<211> 409
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Frz8(1-173)-Fc chimeric protein

<400> 113

Met Glu Trp Gly Tyr Leu Leu Glu Val Thr Ser Leu Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15

Ala Val Leu Gln Arg Ser Ser Gly Ala Ala Ala Ala Ser Ala Lys Glu
20 25 30

Leu Ala Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Leu Cys Lys Gly Ile Gly Tyr
35 40 45

Asn Tyr Thr Tyr Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu
50 55 60

Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys
65 70 75 80

Ser Pro Asp Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr Pro Ile Cys
85 90 95

Leu Glu Asp Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu
100 105 110

Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala
115 120 125

Trp Pro Asp Arg Met Arg Cys Asp Arg Leu Pro Glu Gln Gly Asn Pro
130 135 140

Asp Thr Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Thr Asp Leu Thr Thr Ala Ala
145 150 155 160

Pro Ser Pro Pro Arg Arg Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Glu Ser
165 170 175

Gly Gly Gly Gly Val Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
180 185 190

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
195 200 205

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
210 215 220

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
225 230 235 240

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
245 250 255

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
260 265 270

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
275 280 285

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
290 295 300

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
305 310 315 320

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
325 330 335

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
340 345 350

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
355 360 365

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
370 375 380

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
385 390 395 400

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
405

<210> 114
<211> 388
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Frz3-Fc chimeric protein

<400> 114

Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
1 5 10 15

Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Ile Asp Ala Arg Gly His
20 25 30

Ser Leu Phe Ser Cys Glu Pro Ile Thr Leu Arg Met Cys Gln Asp Leu
35 40 45

Pro Tyr Asn Thr Thr Phe Met Pro Asn Leu Leu Asn His Tyr Asp Gln
50 55 60

Gln Thr Ala Ala Leu Ala Met Glu Pro Phe His Pro Met Val Asn Leu
65 70 75 80

Asp Cys Ser Arg Asp Phe Arg Pro Phe Leu Cys Ala Leu Tyr Ala Pro
85 90 95

Ile Cys Met Glu Tyr Gly Arg Val Thr Leu Pro Cys Arg Arg Leu Cys
100 105 110

Gln Arg Ala Tyr Ser Glu Cys Ser Lys Leu Met Glu Met Phe Gly Val
115 120 125

Pro Trp Pro Glu Asp Met Glu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Cys Asp Glu
130 135 140

Pro Tyr Pro Arg Leu Val Asp Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Gly Val
145 150 155 160

Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
165 170 175

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
180 185 190

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
195 200 205

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

210 215 220

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
225 230 235 240

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
245 250 255

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
260 265 270

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
275 280 285

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
290 295 300

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
305 310 315 320

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
325 330 335

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
340 345 350

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
355 360 365

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
370 375 380

Ser Pro Gly Lys
385

<210> 115
<211> 1410
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Frz1-Fc construct

<400> 115
atgggggga ctgccgccag gttgggggcc gtgattttgt ttgtcgtcat agtgggcctc 60

catggggtcc gcggcaaaat cgatgaggag ggcagcgggg acgccggtgg ccgccgccgc 120

ccgccagttg acccccggcg attggcgcgc cagctgctgc tgctgctttg gctgctggag 180

gctccgctgc tgctgggggt ccgggcccag gcggcgggcc aggggccagg ccaggggccc 240

gggccggggc agcaaccgcc gccgccgcct cagcagcaac agagcgggca gcagtacaac 300

ggcgagcggg gcatctccgt cccggaccac ggctattgcc agcccatctc catcccgctg 360

tgcacggaca tcgcgtacaa ccagaccatc atgcccaacc tgctgggcca cacgaaccag 420

gaggacgcgg gcctggaggt gcaccagttc taccctctag tgaaagtgca gtgttccgct 480

gagctcaagt tcttcctgtg ctccatgtac gcgcccgtgt gcaccgtgct agagcaggcg 540

ctgccgccct gccgctccct gtgcgagcgc gcgcgccagg gctgcgaggc gctcatgaac 600

aagttcggct tccagtggcc agacacgctc aagtgtgaga agttcccggt gcacggcgcc 660

ggcgagctgt gcgtgggcca gaacacgtcc gacaaggctc gagggcgcgc ccaggtcacc 720

gacaaagctg cgcgctctac tctgtgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 780

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 840

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 960

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1020

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaagag 1140

atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1260

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1380

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1410

<210> 116
<211> 1209
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Frz2-Fc construct

<400> 116
atgggggga ctgccgccag gttgggggcc gtgattttgt ttgtcgtcat agtgggcctc 60

catggggtcc gcggcaaaat cgatgctcga ggggcccagt tccacgggga gaagggcatc 120

tccatcccgg accacggctt ctgccagccc atctccatcc cgctgtgcac ggacatcgcc 180

tacaaccaga ccatcatgcc caaccttctg ggccacacga accaggagga cgcaggccta 240

gaggtgcacc agttctatcc gctggtgaag gtgcagtgct cgcccgaact gcgcttcttc 300

ctgtgctcca tgtacgcacc cgtgtgcacc gtgctggaac aggccatccc gccgtgccgc 360

tctatctgtg agcgcgcgcg ccagggctgc gaagccctca tgaacaagtt cggttttcag 420

tggcccgagc gcctgcgctg cgagcacttc ccgcgccacg gcgccgagca gatctgcgtc 480

ggccagaacc actccgagga cgggcgcgcc caggtcaccg acaaagctgc gcgctctact 540

ctgtgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggga cgtcagtctt cctcttcccc 600

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 660

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 720

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 780

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 840

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 900

gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaagaga tgaccaagaa ccaggtcagc 960

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1020

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1080

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1140

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1200

ccgggtaaa 1209

<210> 117
<211> 1164
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Frz3-Fc construct

<400> 117
atgggggga ctgccgccag gttgggggcc gtgattttgt ttgtcgtcat agtgggcctc 60

catggggtcc gcggcaaaat cgatgctcga ggccactccc tgttcagctg tgagccaatc 120

acccttcgaa tgtgtcagga tctgccttac aataccacct tcatgcctaa tctgctcaat 180

cactacgacc agcaaactgc tgccttggca atggagccct tccaccctat ggtcaacctg 240

gactgtagca gggacttccg tccatttttg tgtgccttgt atgcacctat ctgtatggag 300

tacggccgcg tgacattgcc ttgtaggagg ctgtgtcagc gagcttacag tgagtgcagc 360

aaacttatgg aaatgtttgg cgtcccctgg ccagaagata tggagtgcag tcggttccca 420

gactgtgacg agccataccc tagactggtt gatctcctcg agtcaggagg aggaggagtc 480

accgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 540

gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 600

acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 660

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 720

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 780

aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 840

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga agagatgacc 900

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 960

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1020

tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1080

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1140

agcctctccc tgtctccggg taaa 1164

<210> 118
<211> 1191
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Frz4-Fc construct

<400> 118
atgggggga ctgccgccag gttgggggcc gtgattttgt ttgtcgtcat agtgggcctc 60

catggggtcc gcggcaaaat cgatgctcga gggttcgggg acgaggaaga gcggcgctgc 120

gaccccatcc gcatctccat gtgccagaac ctcggctaca acgtgaccaa gatgcccaac 180

ctggttgggc acgagctgca gacggacgcc gagctgcagc tgacaacttt cacaccgctc 240

atccagtacg gctgctccag ccagctgcag ttcttccttt gttctgttta tgtgccaatg 300

tgcacagaga agatcaacat ccccattggc ccatgcggcg gcatgtgtct ttcagtcaag 360

agacgctgtg aacccgtcct gaaggaattt ggatttgcct ggccagagag tctgaactgc 420

agcaaattcc caccacagaa cgaccacaac cacatgtgca tggaagggcc aggtgatgaa 480

gaggggcgcg cccaggtcac cgacaaagct gcgcgctcta ctctgtgccc accgtgccca 540

gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 600

ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 660

cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 720

ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 780

caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 840

cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 900

ctgccccccat cccgggaaga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa 960

ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1020

tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc 1080

accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1140

gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a 1191

<210> 119
<211> 1188
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Frz5-Fc construct

<400> 119
atgggggga ctgccgccag gttgggggcc gtgattttgt ttgtcgtcat agtgggcctc 60

catggggtcc gcggcaaaat cgatgctcga ggggcgtcca aggccccggt gtgccaggaa 120

atcacggtgc ccatgtgccg cggcatcggc tacaacctga cgcacatgcc caaccagttc 180

aaccacgaca cgcaggacga ggcgggcctg gaggtgcacc agttctggcc gctggtggag 240

atccaatgct cgccggacct gcgcttcttc ctatgctcta tgtacacgcc catctgtctg 300

cccgactacc acaagccgct gccgccctgc cgctcggtgt gcgagcgcgc caaggccggc 360

tgctcgccgc tgatgcgcca gtacggcttc gcctggcccg agcgcatgag ctgcgaccgc 420

ctcccggtgc tgggccgcga cgccgaggtc ctctgcatgg attacaaccg cagcgaggcc 480

gggcgcgccc aggtcaccga caaagctgcg cgctctactc tgtgcccacc gtgcccagca 540

cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 600

atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 660

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 720

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 780

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 840

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 900

cccccatccc gggaagagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 960

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1020

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 1080

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1140

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa 1188

<210> 120
<211> 1119
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Frz6-Fc construct

<400> 120
atggaaatgt ttacattttt gttgacgtgt atttttctac ccctcctaag agggcacagt 60

ctcttcacct gtgaaccaat tactgttccc agatgtatga aaatggccta caacatgacg 120

tttttcccta atctgatggg tcattatgac cagagtattg ccgcggtgga aatggagcat 180

tttcttcctc tcgcaaatct ggaatgttca ccaaacattg aaactttcct ctgcaaagca 240

tttgtaccaa cctgcataga acaaattcat gtggttccac cttgtcgtaa actttgtgag 300

aaagtatatt ctgattgcaa aaaattaatt gacacttttg ggatccgatg gcctgaggag 360

cttgaatgtg acagattaca atactgtgat gagactgttc ctgtaacttt tctcgagtca 420

ggaggaggag gagtcaccga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc 480

ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 540

cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag 600

ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 660

cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 720

aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 780

accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc 840

cgggaagaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc 900

agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 960

cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1020

agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1080

cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaa 1119

<210> 121
<211> 1212
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Frz7-Fc construct

<400> 121
atgcgggacc ccggcgcggc cgctccgctt tcgtccctgg gcctctgtgc cctggtgctg 60

gcgctgctgg gcgcactgtc cgcgggcgcc ggggcgcagc cgtaccacgg agagaagggc 120

atctccgtgc cggaccacgg cttctgccag cccatctcca tcccgctgtg cacggacatc 180

gcctacaacc agaccatcct gcccaacctg ctgggccaca cgaaccaaga ggacgcgggc 240

ctcgaggtgc accagttcta cccgctggtg aaggtgcagt gttctcccga actccgcttt 300

ttcttatgct ccatgtatgc gcccgtgtgc accgtgctcg atcaggccat cccgccgtgt 360

cgttctctgt gcgagcgcgc ccgccagggc tgcgaggcgc tcatgaacaa gttcggcttc 420

cagtggcccg agcggctgcg ctgcgagaac ttcccggtgc acggtgcggg cgagatctgc 480

gtgggccaga acacgtcgga cggcctcgag tcaggaggag gaggagtcac cgacaaaact 540

cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctcctggggg gaccgtcagt cttcctcttc 600

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg 660

gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 720

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 780

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 840

tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 900

cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggaag agatgaccaa gaaccaggtc 960

agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1020

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1080

ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1140

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1200

tctccgggta aa 1212

<210> 122

<211> 1176
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Frz8-Fc chimeric construct

<400> 122
atggagtggg gttacctgtt ggaagtgacc tcgctcctag ccgccttggc ggtgctacag 60

cgctctagcg gcgctgccgc ggcttcggcc aaggagctgg cgtgccaaga gatcacggtg 120

ccgttgtgca aaggcatcgg ttacaactac acttacatgc ccaaccagtt caaccacgac 180

acgcaagatg aggcgggcct agaggtgcac cagttttggc cgctggtgga gatacagtgc 240

tccccggacc tcaagttctt tctgtgtagc atgtacacgc ccatctgcct ggaggactac 300

aagaagcctc tgccgccttg tcgctctgtg tgtgaacgcg ccaaggccgg ctgcgcgccg 360

ctcatgcgcc agtacggctt tgcttggcct gaccgcatgc gctgcgatcg gttgccggag 420

cagggcaacc cggacactct gtgcatggac tacaaccgca ccgacctcga gtcaggagga 480

ggaggagtca ccgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 540

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 600

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 660

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 720

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 780

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc 840

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggaa 900

gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 960

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1020

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1080

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1140

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga 1176

<210> 123
<211> 1188
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Frz9-Fc construct

<400> 123
atggccgtgg cgcctctgcg gggggcgctg ctgctgtggc agctgctggc ggcgggcggc 60

gcggcactgg agatcggccg cttcgacccg gagcgcgggc gcggggctgc gccgtgccag 120

gcggtggaga tccccatgtg ccgcggcatc ggctacaacc tgacccgcat gcccaacctg 180

ctgggccaca cgtcgcaggg cgaggcggct gccgagctag cggagttcgc gccgctggtg 240

cagtacggct gccacagcca cctgcgcttc ttcctgtgct cgctctacgc gcccatgtgc 300

accgaccagg tctcgacgcc cattcccgcc tgccggccca tgtgcgagca ggcgcgcctg 360

cgctgcgcgc ccatcatgga gcagttcaac ttcggctggc cggactcgct cgactgcgcc 420

cggctgccca cgcgcaacga cccgcacgcg ctgtgcatgg aggcgcccga gaacgccacg 480

ctcgagtcag gaggaggagg agtcaccgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 540

cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 600

atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 660

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 720

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 780

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 840

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 900

cccccatccc gggaagagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 960

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1020

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 1080

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1140

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa 1188

<210> 124
<211> 1173
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Frz10-Fc construct

<400> 124
atgcagcgcc cgggcccccg cctgtggctg gtcctgcagg tgatgggctc gtgcgccgcc 60

atcagctcca tggacatgga gcgcccgggc gacggcaaat gccagcccat cgagatcccg 120

atgtgcaagg acatcggcta caacatgact cgtatgccca acctgatggg ccacgagaac 180

cagcgcgagg cagccatcca gttgcacgag ttcgcgccgc tggtggagta cggctgccac 240

ggccacctcc gcttcttcct gtgctcgctg tacgcgccga tgtgcaccga gcaggtctct 300

acccccatcc ccgcctgccg ggtcatgtgc gagcaggccc ggctcaagtg ctccccgatt 360

atggagcagt tcaacttcaa gtggcccgac tccctggact gccggaaact ccccaacaag 420

aacgacccca actacctgtg catggaggcg cccaacaacg gctcgctcga gtcaggagga 480

ggaggagtca ccgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 540

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 600

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 660

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 720

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 780

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc 840

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggaa 900

gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 960

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1020

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1080

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1140

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1173

<210> 125
<211> 1230
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sFRP1-Fc construct

<400> 125
atgggcatcg ggcgcagcga ggggggccgc cgcggggcag ccctgggcgt gctgctggcg 60

ctgggcgcgg cgcttctggc cgtgggctcg gccagcgagt acgactacgt gagcttccag 120

tcggacatcg gcccgtacca gagcgggcgc ttctacacca agccacctca gtgcgtggac 180

atccccgcgg acctgcggct gtgccacaac gtgggctaca agaagatggt gctgcccaac 240

ctgctggagc acgagaccat ggcggaggtg aagcagcagg ccagcagctg ggtgcccctg 300

ctcaacaaga actgccacgc cggcacccag gtcttcctct gctcgctctt cgcgcccgtc 360

tgcctggacc ggcccatcta cccgtgtcgc tggctctgcg aggccgtgcg cgactcgtgc 420

gagccggtca tgcagttctt cggcttctac tggcccgaga tgcttaagtg tgacaagttc 480

cccgaggggg acgtctgcat cgccatgacg ccgcccaatg cctggcgcgc ccaggtcacc 540

gacaaagctg cgcgctctac tctgtgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 600

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 660

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 720

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 780

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 840

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 900

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaagag 960

atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1020

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1080

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1140

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1200

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1230

<210> 126
<211> 1188
<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>
<223> sFRP2-Fc construct

<400> 126
atgctgcagg gccctggctc gctgctgctg ctcttcctcg cctcgcactg ctgcctgggc 60

tcggcgcgcg ggctcttcct ctttggccag cccgacttct cctacaagcg cagcaattgc 120

aagcccatcc ctgccaacct gcagctgtgc cacggcatcg aataccagaa catgcggctg 180

cccaacctgc tgggccacga gaccatgaag gaggtgctgg agcaggccgg cgcttggatc 240

ccgctggtca tgaagcagtg ccacccggac accaagaagt tcctgtgctc gctcttcgcc 300

cccgtctgcc tcgatgacct agacgagacc atccagccat gccactcgct ctgcgtgcag 360

gtgaaggacc gctgcgcccc ggtcatgtcc gccttcggct tcccctggcc cgacatgctt 420

gagtgcgacc gtttccccca ggacaacgac ctttgcatcc ccctcgctag cagcgaccac 480

tggcgcgccc aggtcaccga caaagctgcg cgctctactc tgtgcccacc gtgcccagca 540

cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 600

atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 660

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 720

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 780

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 840

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 900

cccccatccc gggaagagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 960

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1020

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 1080

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1140

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa 1188

<210> 127
<211> 1170
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sFRP3-Fc construct

<400> 127
atgggggga ctgccgccag gttgggggcc gtgattttgt ttgtcgtcat agtgggcctc 60

catggggtcc gcggcaaaat cgatgctcga ggggcagcct gtgagcccgt ccgcatcccc 120

ctgtgcaagt ccctgccctg gaacatgact aagatgccca accacctgca ccacagcact 180

caggccaacg ccatcctggc catcgagcag ttcgaaggtc tgctgggcac ccactgcagc 240

cccgatctgc tcttcttcct ctgtgccatg tacgcgccca tctgcaccat tgacttccag 300

cacgagccca tcaagccctg taagtctgtg tgcgagcggg cccggcaggg ctgtgagccc 360

atactcatca agtaccgcca ctcgtggccg gagaacctgg cctgcgagga gctgccagtg 420

tacgacaggg gcgtgtgcat ctctcccgag gccatcgtta ctgggcgcgc ccaggtcacc 480

gacaaagctg cgcgctctac tctgtgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 540

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 600

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 660

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 720

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 780

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 840

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaagag 900

atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 960

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1020

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1080

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1140

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1170

<210> 128
<211> 1140
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sFRP4-Fc construct

<400> 128
atgttcctct ccatcctagt ggcgctgtgc ctgtggctgc acctggcgct gggcgtgcgc 60

ggcgcgccct gcgaggcggt gcgcatccct atgtgccggc acatgccctg gaacatcacg 120

cggatgccca accacctgca ccacagcacg caggagaacg ccatcctggc catcgagcag 180

tacgaggagc tggtggacgt gaactgcagc gccgtgctgc gcttcttctt ctgtgccatg 240

tacgcgccca tttgcaccct ggagttcctg cacgacccta tcaagccgtg caagtcggtg 300

tgccaacgcg cgcgcgacga ctgcgagccc ctcatgaaga tgtacaacca cagctggccc 360

gaaagcctgg cctgcgacga gctgcctgtc tatgaccgtg gcgtgtgcat ttcgcctgaa 420

gccatcgtca cgctcgagtc aggaggagga ggagtcaccg acaaaactca cacatgccca 480

ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 540

aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 600

cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 660

aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 720

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 780

ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 840

gtgtacaccc tgccccatc ccgggaagag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 900

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 960

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1020

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1080

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1140

<210> 129
<211> 1218
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sFRP5-Fc construct

<400> 129
atgcgggcgg cggcggcggc ggggggcgtg cggacggccg cgctggcgct gctgctgggg 60

gcgctgcact gggcgccggc gcgctgcgag gagtacgact actatggctg gcaggccgag 120

ccgctgcacg gccgctccta ctccaagccg ccgcagtgcc ttgacatccc tgccgacctg 180

ccgctctgcc acacggtggg ctacaagcgc atgcggctgc ccaacctgct ggagcacgag 240

agcctggccg aagtgaagca gcaggcgagc agctggctgc cgctgctggc caagcgctgc 300

cactcggata cgcaggtctt cctgtgctcg ctctttgcgc ccgtctgtct cgaccggccc 360

atctacccgt gccgctcgct gtgcgaggcc gtgcgcgccg gctgcgcgcc gctcatggag 420

gcctacggct tcccctggcc tgagatgctg cactgccaca agttccccct ggacaacgac 480

ctctgcatcg ccgtgcagtt cgggcacctg tggcgcgccc aggtcaccga caaagctgcg 540

cgctctactc tgtgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc 600

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 660

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 720

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 780

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 840

aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 900

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaagagat gaccaagaac 960

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1020

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1080

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1140

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1200

tccctgtctc cgggtaaa 1218

Lista de Secuencias - 109916
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC.
Ernst , James
Polakis , Paul
Rubinfeld, Bonnee
DeAlmeida , Venita

<120> ANTAGONISTAS DEL GEN WNT Y SU USO EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE TRASTORNOS MEDIADOS POR EL WNT

<130> P2368R1 WO

<150> US 60/825,063
<151> 2006-09-08

<150> US 60/951,175
<151> 2007-07-20

<160> 129

<170> Patente versión 3,4

<210> 1
<211> 646
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Glu Glu Glu Ala Pro Lys Lys Ser Arg Ala Ala Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ala Ser Trp Glu Leu Cys Ala Gly Ala Leu Ser Ala Arg Leu Ala Glu
20 25 30

Glu Gly Ser Gly Asp Ala Gly Gly Arg Arg Arg Pro Pro Val Asp Pro
35 40 45

Arg Arg Leu Ala Arg Gln Leu Leu Leu Leu Leu Trp Leu Leu Glu Ala
50 55 60

Pro Leu Leu Leu Gly Val Arg Ala Gln Ala Ala Gly Gln Gly Pro Gly
65 70 75 80

Gln Gly Pro Gly Pro Gly Gln Gln Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gln Gln
85 90 95

Gln Ser Gly Gln Gln Tyr Asn Gly Glu Arg Gly Ile Ser Val Pro Asp
100 105 110

His Gly Tyr Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala
115 120 125

Tyr Asn Gln Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu
130 135 140

Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln
145 150 155 160

Cys Ser Ala Glu Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val
165 170 175

Cys Thr Val Leu Glu Gln Ala Leu Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu
180 185 190

Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln
195 200 205

Trp Pro Asp Thr Leu Lys Cys Glu Lys Phe Pro Val His Gly Ala Gly
210 215 220

Glu Leu Cys Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Lys Gly Thr Pro Thr Pro
225 230 235 240

Ser Leu Leu Pro Glu Phe Trp Thr Ser Asn Pro Gln His Gly Gly Gly
245 250 255

Gly His Arg Gly Gly Phe Pro Gly Gly Ala Gly Ala Ser Glu Arg Gly
260 265 270

Lys Phe Ser Cys Pro Arg Ala Leu Lys Val Pro Ser Tyr Leu Asn Tyr
275 280 285

His Phe Leu Gly Glu Lys Asp Cys Gly Ala Pro Cys Glu Pro Thr Lys
290 295 300

Val Tyr Gly Leu Met Tyr Phe Gly Pro Glu Glu Leu Arg Phe Ser Arg
305 310 315 320

Thr Trp Ile Gly Ile Trp Ser Val Leu Cys Cys Ala Ser Thr Leu Phe
325 330 335

Thr Val Leu Thr Tyr Leu Val Asp Met Arg Arg Phe Ser Tyr Pro Glu
340 345 350

Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Gly Cys Tyr Thr Ala Val Ala Val Ala
355 360 365

Tyr Ile Ala Gly Phe Leu Leu Glu Asp Arg Val Val Cys Asn Asp Lys
370 375 380

Phe Ala Glu Asp Gly Ala Arg Thr Val Ala Gln Gly Thr Lys Lys Glu
385 390 395 400

Gly Cys Thr Ile Leu Phe Met Met Leu Tyr Phe Phe Ser Met Ala Ser
405 410 415

Ser Ile Trp Trp Val Ile Leu Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly
420 425 430

Met Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn Ser Gln Tyr Phe His
435 440 445

Leu Ala Ala Trp Ala Val Pro Ala Ile Lys Thr Ile Thr Ile Leu Ala
450 455 460

Leu Gly Gln Val Asp Gly Asp Val Leu Ser Gly Val Cys Phe Val Gly
465 470 475 480

Leu Asn Asn Val Asp Ala Leu Arg Gly Phe Val Leu Ala Pro Leu Phe
485 490 495

Val Tyr Leu Phe Ile Gly Thr Ser Phe Leu Leu Ala Gly Phe Val Ser
500 505 510

Leu Phe Arg Ile Arg Thr Ile Met Lys His Asp Gly Thr Lys Thr Glu
515 520 525

Lys Leu Glu Lys Leu Met Val Arg Ile Gly Val Phe Ser Val Leu Tyr
530 535 540

Thr Val Pro Ala Thr Ile Val Ile Ala Cys Tyr Phe Tyr Glu Gln Ala
545 550 555 560

Phe Arg Asp Gln Trp Glu Arg Ser Trp Val Ala Gln Ser Cys Lys Ser
565 570 575

Tyr Ala Ile Pro Cys Pro His Leu Gln Ala Gly Gly Gly Ala Pro Pro
580 585 590

His Pro Pro Met Ser Pro Asp Phe Thr Val Phe Met Ile Lys Tyr Leu
595 600 605

Met Thr Leu Ile Val Gly Ile Thr Ser Gly Phe Trp Ile Trp Ser Gly
610 615 620

Lys Thr Leu Asn Ser Trp Arg Lys Phe Tyr Thr Arg Leu Thr Asn Ser
625 630 635 640

Lys Gln Gly Glu Thr Thr
645

<210> 2
<211> 565
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Pro Arg Ser Ala Leu Pro Arg Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Pro Ala Ala Gly Pro Ala Gln Phe His Gly Glu Lys Gly Ile Ser
20 25 30

Ile Pro Asp His Gly Phe Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr
35 40 45

Asp Ile Ala Tyr Asn Gln Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr
50 55 60

Asn Gln Glu Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val
65 70 75 80

Lys Val Gln Cys Ser Pro Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr
85 90 95

Ala Pro Val Cys Thr Val Leu Glu Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser
100 105 110

Ile Cys Glu Ser Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe
115 120 125

Gly Phe Gln Trp Pro Glu Arg Leu Arg Cys Glu His Phe Pro Arg His
130 135 140

Gly Ala Glu Gln Ile Cys Val Gly Gln Asn His Ser Glu Asp Gly Ala
145 150 155 160

Pro Ala Leu Leu Thr Thr Ala Pro Pro Pro Gly Leu Gln Pro Gly Ala
165 170 175

Gly Gly Thr Pro Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ala Pro Pro Arg Tyr
180 185 190

Ala Thr Leu Glu His Pro Phe His Cys Pro Arg Val Leu Lys Val Pro
195 200 205

Ser Tyr Leu Ser Tyr Lys Phe Leu Gly Glu Arg Asp Cys Ala Ala Pro
210 215 220

Cys Glu Pro Ala Arg Pro Asp Gly Ser Met Phe Phe Ser Gln Glu Glu
225 230 235 240

Thr Arg Phe Ala Arg Leu Trp Ile Leu Thr Trp Ser Val Leu Cys Cys
245 250 255

Ala Ser Thr Phe Phe Thr Val Thr Thr Tyr Leu Val Asp Met Gln Arg
260 265 270

Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Gly Cys Tyr Thr
275 280 285

Met Val Ser Val Ala Tyr Ile Ala Gly Phe Val Leu Gln Glu Arg Val
290 295 300

Val Cys Asn Glu Arg Phe Ser Glu Asp Gly Tyr Arg Thr Val Val Gln
305 310 315 320

Gly Thr Lys Lys Glu Gly Cys Thr Ile Leu Phe Met Met Leu Tyr Phe
325 330 335

Phe Ser Met Ala Ser Ser Ile Trp Trp Val Ile Leu Ser Leu Thr Trp
340 345 350

Phe Leu Ala Ala Gly Met Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn
355 360 365

Ser Gln Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Ala Val Pro Ala Val Lys Thr
370 375 380

Ile Thr Ile Leu Ala Met Gly Gln Ile Asp Gly Asp Leu Leu Ser Gly
385 390 395 400

Val Cys Phe Val Gly Leu Asn Ser Leu Asp Pro Leu Arg Gly Phe Val
405 410 415

Leu Ala Pro Leu Phe Val Tyr Leu Phe Ile Gly Thr Ser Phe Leu Leu
420 425 430

Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe Arg Ile Arg Thr Ile Met Lys His Asp
435 440 445

Gly Thr Lys Thr Glu Lys Leu Glu Arg Leu Met Val Arg Ile Gly Val
450 455 460

Phe Ser Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala Thr Ile Val Ile Ala Cys Tyr
465 470 475 480

Phe Tyr Glu Gln Ala Phe Arg Glu His Trp Glu Arg Ser Trp Val Ser
485 490 495

Gln His Cys Lys Ser Leu Ala Ile Pro Cys Pro Ala His Tyr Thr Pro
500 505 510

Arg Met Ser Pro Asp Phe Thr Val Tyr Met Ile Lys Tyr Leu Met Thr
515 520 525

Leu Ile Val Gly Ile Thr Ser Gly Phe Trp Ile Trp Ser Gly Lys Thr
530 535 540

Leu His Ser Trp Arg Lys Phe Tyr Thr Arg Leu Thr Asn Ser Arg His
545 550 555 560

Gly Glu Thr Thr Val
565

<210> 3
<211> 666
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Met Thr Trp Ile Val Phe Ser Leu Trp Pro Leu Thr Val Phe
1 5 10 15

Met Gly His Ile Gly Gly His Ser Leu Phe Ser Cys Glu Pro Ile Thr
20 25 30

Leu Arg Met Cys Gln Asp Leu Pro Tyr Asn Thr Thr Phe Met Pro Asn
35 40 45

Leu Leu Asn His Tyr Asp Gln Gln Thr Ala Ala Leu Ala Met Glu Pro
50 55 60

Phe His Pro Met Val Asn Leu Asp Cys Ser Arg Asp Phe Arg Pro Phe
65 70 75 80

Leu Cys Ala Leu Tyr Ala Pro Ile Cys Met Glu Tyr Gly Arg Val Thr
85 90 95

Leu Pro Cys Arg Arg Leu Cys Gln Arg Ala Tyr Ser Glu Cys Ser Lys
100 105 110

Leu Met Glu Met Phe Gly Val Pro Trp Pro Glu Asp Met Glu Cys Ser
115 120 125

Arg Phe Pro Asp Cys Asp Glu Pro Tyr Pro Arg Leu Val Asp Leu Asn
130 135 140

Leu Ala Gly Glu Pro Thr Glu Gly Ala Pro Val Ala Val Gln Arg Asp
145 150 155 160

Tyr Gly Phe Trp Cys Pro Arg Glu Leu Lys Ile Asp Pro Asp Leu Gly
165 170 175

Tyr Ser Phe Leu His Val Arg Asp Cys Ser Pro Pro Cys Pro Asn Met
180 185 190

Tyr Phe Arg Arg Glu Glu Leu Ser Phe Ala Arg Tyr Phe Ile Gly Leu
195 200 205

Ile Ser Ile Ile Cys Leu Ser Ala Thr Leu Phe Thr Phe Leu Thr Phe
210 215 220

Leu Ile Asp Val Thr Arg Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe
225 230 235 240

Tyr Ala Val Cys Tyr Met Met Val Ser Leu Ile Phe Phe Ile Gly Phe
245 250 255

Leu Leu Glu Asp Arg Val Ala Cys Asn Ala Ser Ile Pro Ala Gln Tyr
260 265 270

Lys Ala Ser Thr Val Thr Gln Gly Ser His Asn Lys Ala Cys Thr Met
275 280 285

Leu Phe Met Ile Leu Tyr Phe Phe Thr Met Ala Gly Ser Val Trp Trp
290 295 300

Val Ile Leu Thr Ile Thr Trp Phe Leu Ala Ala Val Pro Lys Trp Gly
305 310 315 320

Ser Glu Ala Ile Glu Lys Lys Ala Leu Leu Phe His Ala Ser Ala Trp
325 330 335

Gly Ile Pro Gly Thr Leu Thr Ile Ile Leu Leu Ala Met Asn Lys Ile
340 345 350

Glu Gly Asp Asn Ile Ser Gly Val Cys Phe Val Gly Leu Tyr Asp Val
355 360 365

Asp Ala Leu Arg Tyr Phe Val Leu Ala Pro Leu Cys Leu Tyr Val Val
370 375 380

Val Gly Val Ser Leu Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Leu Asn Arg Val
385 390 395 400

Arg Ile Glu Ile Pro Leu Glu Lys Glu Asn Gln Asp Lys Leu Val Lys
405 410 415

Phe Met Ile Arg Ile Gly Val Phe Ser Ile Leu Tyr Leu Val Pro Leu
420 425 430

Leu Val Val Ile Gly Cys Tyr Phe Tyr Glu Gln Ala Tyr Arg Gly Ile
435 440 445

Trp Glu Thr Thr Trp Ile Gln Glu Arg Cys Arg Glu Tyr His Ile Pro
450 455 460

Cys Pro Tyr Gln Val Thr Gln Met Ser Arg Pro Asp Leu Ile Leu Phe
465 470 475 480

Leu Met Lys Tyr Leu Met Ala Leu Ile Val Gly Ile Pro Ser Val Phe
485 490 495

Trp Val Gly Ser Lys Lys Thr Cys Phe Glu Trp Ala Ser Phe Phe His
500 505 510

Gly Arg Arg Lys Lys Glu Ile Val Asn Glu Ser Arg Gln Val Leu Gln
515 520 525

Glu Pro Asp Phe Ala Gln Ser Leu Leu Arg Asp Pro Asn Thr Pro Ile
530 535 540

Ile Arg Lys Ser Arg Gly Thr Ser Thr Gln Gly Thr Ser Thr His Ala
545 550 555 560

Ser Ser Thr Gln Leu Ala Met Val Asp Asp Gln Arg Ser Lys Ala Gly
565 570 575

Ser Ile His Ser Lys Val Ser Ser Tyr His Gly Ser Leu His Arg Ser
580 585 590

Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Pro Cys Ser Tyr Arg Gly Met Glu Glu Arg
595 600 605

Leu Pro His Gly Ser Met Ser Arg Leu Thr Asp His Ser Arg His Ser
610 615 620

Ser Ser His Arg Leu Asn Glu Gln Ser Arg His Ser Ser Ile Arg Asp
625 630 635 640

Leu Ser Asn Asn Pro Met Thr His Ile Thr His Gly Thr Ser Met Asn
645 650 655

Arg Val Ile Glu Glu Asp Gly Thr Ser Ala
660 665

<210> 4
<211> 537
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Trp Arg Gly Ala Gly Pro Ser Val Pro Gly Ala Pro Gly Gly
1 5 10 15

Val Gly Leu Ser Leu Gly Leu Leu Leu Gln Leu Leu Leu Leu Leu Gly
20 25 30

Pro Ala Arg Gly Phe Gly Asp Glu Glu Glu Arg Arg Cys Asp Pro Ile
35 40 45

Arg Ile Ser Met Cys Gln Asn Leu Gly Tyr Asn Val Thr Lys Met Pro
50 55 60

Asn Leu Val Gly His Glu Leu Gln Thr Asp Ala Glu Leu Gln Leu Thr
65 70 75 80

Thr Phe Thr Pro Leu Ile Gln Tyr Gly Cys Ser Ser Gln Leu Gln Phe
85 90 95

Phe Leu Cys Ser Val Tyr Val Pro Met Cys Thr Glu Lys Ile Asn Ile
100 105 110

Pro Ile Gly Pro Cys Gly Gly Met Cys Leu Ser Val Lys Arg Arg Cys
115 120 125

Glu Pro Val Leu Lys Glu Phe Gly Phe Ala Trp Pro Glu Ser Leu Asn
130 135 140

Cys Ser Lys Phe Pro Pro Gln Asn Asp His Asn His Met Cys Met Glu
145 150 155 160

Gly Pro Gly Asp Glu Glu Val Pro Leu Pro His Lys Thr Pro Ile Gln
165 170 175

Pro Gly Glu Glu Cys His Ser Val Gly Thr Asn Ser Asp Gln Tyr Ile
180 185 190

Trp Val Lys Arg Ser Leu Asn Cys Val Leu Lys Cys Gly Tyr Asp Ala
195 200 205

Gly Leu Tyr Ser Arg Ser Ala Lys Glu Phe Thr Asp Ile Trp Met Ala
210 215 220

Val Trp Ala Ser Leu Cys Phe Ile Ser Thr Ala Phe Thr Val Leu Thr
225 230 235 240

Phe Leu Ile Asp Ser Ser Arg Phe Ser Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile

245 250 255

Phe Leu Ser Met Cys Tyr Asn Ile Tyr Ser Ile Ala Tyr Ile Val Arg
260 265 270

Leu Thr Val Gly Arg Glu Arg Ile Ser Cys Asp Phe Glu Glu Ala Ala
275 280 285

Glu Pro Val Leu Ile Gln Glu Gly Leu Lys Asn Thr Gly Cys Ala Ile
290 295 300

Ile Phe Leu Leu Met Tyr Phe Phe Gly Met Ala Ser Ser Ile Trp Trp
305 310 315 320

Val Ile Leu Thr Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Leu Lys Trp Gly
325 330 335

His Glu Ala Ile Glu Met His Ser Ser Tyr Phe His Ile Ala Ala Trp
340 345 350

Ala Ile Pro Ala Val Lys Thr Ile Val Ile Leu Ile Met Arg Leu Val
355 360 365

Asp Ala Asp Glu Leu Thr Gly Leu Cys Tyr Val Gly Asn Gln Asn Leu
370 375 380

Asp Ala Leu Thr Gly Phe Val Val Ala Pro Leu Phe Thr Tyr Leu Val
385 390 395 400

Ile Gly Thr Leu Phe Ile Ala Ala Gly Leu Val Ala Leu Phe Lys Ile
405 410 415

Arg Ser Asn Leu Gln Lys Asp Gly Thr Lys Thr Asp Lys Leu Glu Arg
420 425 430

Leu Met Val Lys Ile Gly Val Phe Ser Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala
435 440 445

Thr Cys Val Ile Ala Cys Tyr Phe Tyr Glu Ile Ser Asn Trp Ala Leu
450 455 460

Phe Arg Tyr Ser Ala Asp Asp Ser Asn Met Ala Val Glu Met Leu Lys
465 470 475 480

Ile Phe Met Ser Leu Leu Val Gly Ile Thr Ser Gly Met Trp Ile Trp
485 490 495

Ser Ala Lys Thr Leu His Thr Trp Gln Lys Cys Ser Asn Arg Leu Val
500 505 510

Asn Ser Gly Lys Val Lys Arg Glu Lys Arg Gly Asn Gly Trp Val Lys
515 520 525

Pro Gly Lys Gly Ser Glu Thr Val Val
530 535

<210> 5
<211> 585
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Ala Arg Pro Asp Pro Ser Ala Pro Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Gln Leu Val Gly Arg Ala Ala Ala Ala Ser Lys Ala Pro Val
20 25 30

Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Met Cys Arg Gly Ile Gly Tyr Asn Leu
35 40 45

Thr His Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu Ala Gly
50 55 60

Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys Ser Pro
65 70 75 80

Asp Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr Pro Ile Cys Leu Pro
85 90 95

Asp Tyr His Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu Arg Ala
100 105 110

Lys Ala Gly Cys Ser Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala Trp Pro
115 120 125

Glu Arg Met Ser Cys Asp Arg Leu Pro Val Leu Gly Arg Asp Ala Glu
130 135 140

Val Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Ser Glu Ala Thr Thr Ala Pro Pro
145 150 155 160

Arg Pro Phe Pro Ala Lys Pro Thr Leu Pro Gly Pro Pro Gly Ala Pro
165 170 175

Ala Ser Gly Gly Glu Cys Pro Ala Gly Gly Pro Phe Val Cys Lys Cys
180 185 190

Arg Glu Pro Phe Val Pro Ile Leu Lys Glu Ser His Pro Leu Tyr Asn
195 200 205

Lys Val Arg Thr Gly Gln Val Pro Asn Cys Ala Val Pro Cys Tyr Gln
210 215 220

Pro Ser Phe Ser Ala Asp Glu Arg Thr Phe Ala Thr Phe Trp Ile Gly
225 230 235 240

Leu Trp Ser Val Leu Cys Phe Ile Ser Thr Ser Thr Thr Val Ala Thr
245 250 255

Phe Leu Ile Asp Met Glu Arg Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile
260 265 270

Phe Leu Ser Ala Cys Tyr Leu Cys Val Ser Leu Gly Phe Leu Val Arg
275 280 285

Leu Val Val Gly His Ala Ser Val Ala Cys Ser Arg Glu His Asn His
290 295 300

Ile His Tyr Glu Thr Thr Gly Pro Ala Leu Cys Thr Ile Val Phe Leu
305 310 315 320

Leu Val Tyr Phe Phe Gly Met Ala Ser Ser Ile Trp Trp Val Ile Leu
325 330 335

Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Met Lys Trp Gly Asn Glu Ala
340 345 350

Ile Ala Gly Tyr Ala Gln Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Leu Ile Pro
355 360 365

Ser Val Lys Ser Ile Thr Ala Leu Ala Leu Ser Ser Val Asp Gly Asp
370 375 380

Pro Val Ala Gly Ile Cys Tyr Val Gly Asn Gln Asn Leu Asn Ser Leu
385 390 395 400

Arg Gly Phe Val Leu Gly Pro Leu Val Leu Tyr Leu Leu Val Gly Thr
405 410 415

Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe Arg Ile Arg Ser Val
420 425 430

Ile Lys Gln Gly Gly Thr Lys Thr Asp Lys Leu Glu Lys Leu Met Ile
435 440 445

Arg Ile Gly Ile Phe Thr Leu Leu Tyr Thr Val Pro Ala Ser Ile Val
450 455 460

Val Ala Cys Tyr Leu Tyr Glu Gln His Tyr Arg Glu Ser Trp Glu Ala
465 470 475 480

Ala Leu Thr Cys Ala Cys Pro Gly His Asp Thr Gly Gln Pro Arg Ala
485 490 495

Lys Pro Glu Tyr Trp Val Leu Met Leu Lys Tyr Phe Met Cys Leu Val
500 505 510

Val Gly Ile Thr Ser Gly Val Trp Ile Trp Ser Gly Lys Thr Val Glu
515 520 525

Ser Trp Arg Arg Phe Thr Ser Arg Cys Cys Cys Arg Pro Arg Arg Gly
530 535 540

His Lys Ser Gly Gly Ala Met Ala Ala Gly Asp Tyr Pro Glu Ala Ser
545 550 555 560

Ala Ala Leu Thr Gly Arg Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ala Ala Thr Tyr
565 570 575

His Lys Gln Val Ser Leu Ser His Val
580 585

<210> 6
<211> 706
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Glu Met Phe Thr Phe Leu Leu Thr Cys Ile Phe Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15

Arg Gly His Ser Leu Phe Thr Cys Glu Pro Ile Thr Val Pro Arg Cys
20 25 30

Met Lys Met Ala Tyr Asn Met Thr Phe Phe Pro Asn Leu Met Gly His
35 40 45

Tyr Asp Gln Ser Ile Ala Ala Val Glu Met Glu His Phe Leu Pro Leu
50 55 60

Ala Asn Leu Glu Cys Ser Pro Asn Ile Glu Thr Phe Leu Cys Lys Ala
65 70 75 80

Phe Val Pro Thr Cys Ile Glu Gln Ile His Val Val Pro Pro Cys Arg
85 90 95

Lys Leu Cys Glu Lys Val Tyr Ser Asp Cys Lys Lys Leu Ile Asp Thr
100 105 110

Phe Gly Ile Arg Trp Pro Glu Glu Leu Glu Cys Asp Arg Leu Gln Tyr
115 120 125

Cys Asp Glu Thr Val Pro Val Thr Phe Asp Pro His Thr Glu Phe Leu
130 135 140

Gly Pro Gln Lys Lys Thr Glu Gln Val Gln Arg Asp Ile Gly Phe Trp
145 150 155 160

Cys Pro Arg His Leu Lys Thr Ser Gly Gly Gln Gly Tyr Lys Phe Leu
165 170 175

Gly Ile Asp Gln Cys Ala Pro Pro Cys Pro Asn Met Tyr Phe Lys Ser
180 185 190

Asp Glu Leu Glu Phe Ala Lys Ser Phe Ile Gly Thr Val Ser Ile Phe
195 200 205

Cys Leu Cys Ala Thr Leu Phe Thr Phe Leu Thr Phe Leu Ile Asp Val
210 215 220

Arg Arg Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Tyr Tyr Ser Val Cys
225 230 235 240

Tyr Ser Ile Val Ser Leu Met Tyr Phe Ile Gly Phe Leu Leu Gly Asp
245 250 255

Ser Thr Ala Cys Asn Lys Ala Asp Glu Lys Leu Glu Leu Gly Asp Thr
260 265 270

Val Val Leu Gly Ser Gln Asn Lys Ala Cys Thr Val Leu Phe Met Leu
275 280 285

Leu Tyr Phe Phe Thr Met Ala Gly Thr Val Trp Trp Val Ile Leu Thr
290 295 300

Ile Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Arg Lys Trp Ser Cys Glu Ala Ile
305 310 315 320

Glu Gln Lys Ala Val Trp Phe His Ala Val Ala Trp Gly Thr Pro Gly
325 330 335

Phe Leu Thr Val Met Leu Leu Ala Met Asn Lys Val Glu Gly Asp Asn
340 345 350

Ile Ser Gly Val Cys Phe Val Gly Leu Tyr Asp Leu Asp Ala Ser Arg
355 360 365

Tyr Phe Val Leu Leu Pro Leu Cys Leu Cys Val Phe Val Gly Leu Ser
370 375 380

Leu Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Leu Asn His Val Arg Gln Val Ile
385 390 395 400

Gln His Asp Gly Arg Asn Gln Glu Lys Leu Lys Lys Phe Met Ile Arg
405 410 415

Ile Gly Val Phe Ser Gly Leu Tyr Leu Val Pro Leu Val Thr Leu Leu
420 425 430

Gly Cys Tyr Val Tyr Glu Gln Val Asn Arg Ile Thr Trp Glu Ile Thr
435 440 445

Trp Val Ser Asp His Cys Arg Gln Tyr His Ile Pro Cys Pro Tyr Gln
450 455 460

Ala Lys Ala Lys Ala Arg Pro Glu Leu Ala Leu Phe Met Ile Lys Tyr
465 470 475 480

Leu Met Thr Leu Ile Val Gly Ile Ser Ala Val Phe Trp Val Gly Ser
485 490 495

Lys Lys Thr Cys Thr Glu Trp Ala Gly Phe Phe Lys Arg Asn Arg Lys
500 505 510

Arg Asp Pro Ile Ser Glu Ser Arg Arg Val Leu Gln Glu Ser Cys Glu
515 520 525

Phe Phe Leu Lys His Asn Ser Lys Val Lys His Lys Lys Lys His Tyr
530 535 540

Lys Pro Ser Ser His Lys Leu Lys Val Ile Ser Lys Ser Met Gly Thr
545 550 555 560

Ser Thr Gly Ala Thr Ala Asn His Gly Thr Ser Ala Val Ala Ile Thr
565 570 575

Ser His Asp Tyr Leu Gly Gln Glu Thr Leu Thr Glu Ile Gln Thr Ser
580 585 590

Pro Glu Thr Ser Met Arg Glu Val Lys Ala Asp Gly Ala Ser Thr Pro
595 600 605

Arg Leu Arg Glu Gln Asp Cys Gly Glu Pro Ala Ser Pro Ala Ala Ser
610 615 620

Ile Ser Arg Leu Ser Gly Glu Gln Val Asp Gly Lys Gly Gln Ala Gly
625 630 635 640

Ser Val Ser Glu Ser Ala Arg Ser Glu Gly Arg Ile Ser Pro Lys Ser
645 650 655

Asp Ile Thr Asp Thr Gly Leu Ala Gln Ser Asn Asn Leu Gln Val Pro
660 665 670

Ser Ser Ser Glu Pro Ser Ser Leu Lys Gly Ser Thr Ser Leu Leu Val
675 680 685

His Pro Val Ser Gly Val Arg Lys Glu Gln Gly Gly Gly Cys His Ser
690 695 700

Asp Thr
705

<210> 7
<211> 574
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Arg Asp Pro Gly Ala Ala Ala Pro Leu Ser Ser Leu Gly Leu Cys
1 5 10 15

Ala Leu Val Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu Ser Ala Gly Ala Gly Ala
20 25 30

Gln Pro Tyr His Gly Glu Lys Gly Ile Ser Val Pro Asp His Gly Phe
35 40 45

Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln
50 55 60

Thr Ile Leu Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly
65 70 75 80

Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser Pro
85 90 95

Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val
100 105 110

Leu Asp Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg
115 120 125

Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu
130 135 140

Arg Leu Arg Cys Glu Asn Phe Pro Val His Gly Ala Gly Glu Ile Cys
145 150 155 160

Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Gly Ser Gly Gly Pro Gly Gly Gly Pro
165 170 175

Thr Ala Tyr Pro Thr Ala Pro Tyr Leu Pro Asp Leu Pro Phe Thr Ala
180 185 190

Leu Pro Pro Gly Ala Ser Asp Gly Arg Gly Arg Pro Ala Phe Pro Phe
195 200 205

Ser Cys Pro Arg Gln Leu Lys Val Pro Pro Tyr Leu Gly Tyr Arg Phe
210 215 220

Leu Gly Glu Arg Asp Cys Gly Ala Pro Cys Glu Pro Gly Arg Ala Asn
225 230 235 240

Gly Leu Met Tyr Phe Lys Glu Glu Glu Arg Arg Phe Ala Arg Leu Trp
245 250 255

Val Gly Val Trp Ser Val Leu Cys Cys Ala Ser Thr Leu Phe Thr Val
260 265 270

Leu Thr Tyr Leu Val Asp Met Arg Arg Phe Ser Tyr Pro Glu Arg Pro
275 280 285

Ile Ile Phe Leu Ser Gly Cys Tyr Phe Met Val Ala Val Ala His Val
290 295 300

Ala Gly Phe Leu Leu Glu Asp Arg Ala Val Cys Val Glu Arg Phe Ser
305 310 315 320

Asp Asp Gly Tyr Arg Thr Val Ala Gln Gly Thr Lys Lys Glu Gly Cys
325 330 335

Thr Ile Leu Phe Met Val Leu Tyr Phe Phe Gly Met Ala Ser Ser Ile
340 345 350

Trp Trp Val Ile Leu Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Met Lys
355 360 365

Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn Ser Gln Tyr Phe His Leu Ala
370 375 380

Ala Trp Ala Val Pro Ala Val Lys Thr Ile Thr Ile Leu Ala Met Gly
385 390 395 400

Gln Val Asp Gly Asp Leu Leu Ser Gly Val Cys Tyr Val Gly Leu Ser
405 410 415

Ser Val Asp Ala Leu Arg Gly Phe Val Leu Ala Pro Leu Phe Val Tyr
420 425 430

Leu Phe Ile Gly Thr Ser Phe Leu Leu Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe
435 440 445

Arg Ile Arg Thr Ile Met Lys His Asp Gly Thr Lys Thr Glu Lys Leu
450 455 460

Glu Lys Leu Met Val Arg Ile Gly Val Phe Ser Val Leu Tyr Thr Val
465 470 475 480

Pro Ala Thr Ile Val Leu Ala Cys Tyr Phe Tyr Glu Gln Ala Phe Arg
485 490 495

Glu His Trp Glu Arg Thr Trp Leu Leu Gln Thr Cys Lys Ser Tyr Ala
500 505 510

Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Pro Pro Met Ser Pro Asp Phe Thr
515 520 525

Val Phe Met Ile Lys Tyr Leu Met Thr Met Ile Val Gly Ile Thr Thr
530 535 540

Gly Phe Trp Ile Trp Ser Gly Lys Thr Leu Gln Ser Trp Arg Arg Phe
545 550 555 560

Tyr His Arg Leu Ser His Ser Ser Lys Gly Glu Thr Ala Val
565 570

<210> 8
<211> 694
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Glu Trp Gly Tyr Leu Leu Glu Val Thr Ser Leu Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15

Ala Leu Leu Gln Arg Ser Ser Gly Ala Ala Ala Ala Ser Ala Lys Glu
20 25 30

Leu Ala Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Leu Cys Lys Gly Ile Gly Tyr
35 40 45

Asn Tyr Thr Tyr Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu

50 55 60

Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys
65 70 75 80

Ser Pro Asp Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr Pro Ile Cys
85 90 95

Leu Glu Asp Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu
100 105 110

Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala
115 120 125

Trp Pro Asp Arg Met Arg Cys Asp Arg Leu Pro Glu Gln Gly Asn Pro
130 135 140

Asp Thr Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Thr Asp Leu Thr Thr Ala Ala
145 150 155 160

Pro Ser Pro Pro Arg Arg Leu Pro Pro Pro Pro Pro Gly Glu Gln Pro
165 170 175

Pro Ser Gly Ser Gly His Gly Arg Pro Pro Gly Ala Arg Pro Pro His
180 185 190

Arg Gly Gly Gly Arg Gly Gly Gly Gly Gly Asp Ala Ala Ala Pro Pro
195 200 205

Ala Arg Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys Ala Arg Pro Pro Gly Gly Gly
210 215 220

Ala Ala Pro Cys Glu Pro Gly Cys Gln Cys Arg Ala Pro Met Val Ser
225 230 235 240

Val Ser Ser Glu Arg His Pro Leu Tyr Asn Arg Val Lys Thr Gly Gln
245 250 255

Ile Ala Asn Cys Ala Leu Pro Cys His Asn Pro Phe Phe Ser Gln Asp
260 265 270

Glu Arg Ala Phe Thr Val Phe Trp Ile Gly Leu Trp Ser Val Leu Cys
275 280 285

Phe Val Ser Thr Phe Ala Thr Val Ser Thr Phe Leu Ile Asp Met Glu
290 295 300

Arg Phe Lys Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Ala Cys Tyr
305 310 315 320

Leu Phe Val Ser Val Gly Tyr Leu Val Arg Leu Val Ala Gly His Glu
325 330 335

Lys Val Ala Cys Ser Gly Gly Ala Pro Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly
340 345 350

Ala Gly Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly Ala Gly
355 360 365

Gly Pro Gly Gly Arg Gly Glu Tyr Glu Glu Leu Gly Ala Val Glu Gln
370 375 380

His Val Arg Tyr Glu Thr Thr Gly Pro Ala Leu Cys Thr Val Val Phe

385 390 395 400

Leu Leu Val Tyr Phe Phe Gly Met Ala Ser Ser Ile Trp Trp Val Ile
405 410 415

Leu Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Met Lys Trp Gly Asn Glu
420 425 430

Ala Ile Ala Gly Tyr Ser Gln Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Leu Val
435 440 445

Pro Ser Val Lys Ser Ile Ala Val Leu Ala Leu Ser Ser Val Asp Gly
450 455 460

Asp Pro Val Ala Gly Ile Cys Tyr Val Gly Asn Gln Ser Leu Asp Asn
465 470 475 480

Leu Arg Gly Phe Val Leu Ala Pro Leu Val Ile Tyr Leu Phe Ile Gly
485 490 495

Thr Met Phe Leu Leu Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe Arg Ile Arg Ser
500 505 510

Val Ile Lys Gln Gln Asp Gly Pro Thr Lys Thr His Lys Leu Glu Lys
515 520 525

Leu Met Ile Arg Leu Gly Leu Phe Thr Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala
530 535 540

Ala Val Val Val Ala Cys Leu Phe Tyr Glu Gln His Asn Arg Pro Arg
545 550 555 560

Trp Glu Ala Thr His Asn Cys Pro Cys Leu Arg Asp Leu Gln Pro Asp
565 570 575

Gln Ala Arg Arg Pro Asp Tyr Ala Val Phe Met Leu Lys Tyr Phe Met
580 585 590

Cys Leu Val Val Gly Ile Thr Ser Gly Val Trp Val Trp Ser Gly Lys
595 600 605

Thr Leu Glu Ser Trp Arg Ser Leu Cys Thr Arg Cys Cys Trp Ala Ser
610 615 620

Lys Gly Ala Ala Val Gly Gly Gly Ala Gly Ala Thr Ala Ala Gly Gly
625 630 635 640

Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly
645 650 655

Gly Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Leu Tyr Ser Asp Val Ser Thr Gly
660 665 670

Leu Thr Trp Arg Ser Gly Thr Ala Ser Ser Val Ser Tyr Pro Lys Gln
675 680 685

Met Pro Leu Ser Gln Val
690

<210> 9
<211> 591
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

```
Met Ala Val Ala Pro Leu Arg Gly Ala Leu Leu Leu Trp Gln Leu Leu
1               5                  10                  15

Ala Ala Gly Gly Ala Ala Leu Glu Ile Gly Arg Phe Asp Pro Glu Arg
            20                  25                  30

Gly Arg Gly Ala Ala Pro Cys Gln Ala Val Glu Ile Pro Met Cys Arg
        35                  40                  45

Gly Ile Gly Tyr Asn Leu Thr Arg Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr
    50                  55                  60

Ser Gln Gly Glu Ala Ala Ala Glu Leu Ala Glu Phe Ala Pro Leu Val
65                  70                  75                  80

Gln Tyr Gly Cys His Ser His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr
                85                  90                  95

Ala Pro Met Cys Thr Asp Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg
            100                 105                 110

Pro Met Cys Glu Gln Ala Arg Leu Arg Cys Ala Pro Ile Met Glu Gln
        115                 120                 125

Phe Asn Phe Gly Trp Pro Asp Ser Leu Asp Cys Ala Arg Leu Pro Thr
    130                 135                 140

Arg Asn Asp Pro His Ala Leu Cys Met Glu Ala Pro Glu Asn Ala Thr
145                 150                 155                 160

Ala Gly Pro Ala Glu Pro His Lys Gly Leu Gly Met Leu Pro Val Ala
                165                 170                 175

Pro Arg Pro Ala Arg Pro Pro Gly Asp Leu Gly Pro Gly Ala Gly Gly
            180                 185                 190

Ser Gly Thr Cys Glu Asn Pro Glu Lys Phe Gln Tyr Val Glu Lys Ser
        195                 200                 205

Arg Ser Cys Ala Pro Arg Cys Gly Pro Gly Val Glu Val Phe Trp Ser
    210                 215                 220

Arg Arg Asp Lys Asp Phe Ala Leu Val Trp Met Ala Val Trp Ser Ala
225                 230                 235                 240

Leu Cys Phe Phe Ser Thr Ala Phe Thr Val Leu Thr Phe Leu Leu Glu
                245                 250                 255

Pro His Arg Phe Gln Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Met
            260                 265                 270

Cys Tyr Asn Val Tyr Ser Leu Ala Phe Leu Ile Arg Ala Val Ala Gly
        275                 280                 285

Ala Gln Ser Val Ala Cys Asp Gln Glu Ala Gly Ala Leu Tyr Val Ile
    290                 295                 300

Gln Glu Gly Leu Glu Asn Thr Gly Cys Thr Leu Val Phe Leu Leu Leu
305                 310                 315                 320

Tyr Tyr Phe Gly Met Ala Ser Ser Leu Trp Trp Val Val Leu Thr Leu
                325                 330                 335
```

Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Lys Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu
340 345 350

Ala His Gly Ser Tyr Phe His Met Ala Ala Trp Gly Leu Pro Ala Leu
355 360 365

Lys Thr Ile Val Ile Leu Thr Leu Arg Lys Val Ala Gly Asp Glu Leu
370 375 380

Thr Gly Leu Cys Tyr Val Ala Ser Thr Asp Ala Ala Ala Leu Thr Gly
385 390 395 400

Phe Val Leu Val Pro Leu Ser Gly Tyr Leu Val Leu Gly Ser Ser Phe
405 410 415

Leu Leu Thr Gly Phe Val Ala Leu Phe His Ile Arg Lys Ile Met Lys
420 425 430

Thr Gly Gly Thr Asn Thr Glu Lys Leu Glu Lys Leu Met Val Lys Ile
435 440 445

Gly Val Phe Ser Ile Leu Tyr Thr Val Pro Ala Thr Cys Val Ile Val
450 455 460

Cys Tyr Val Tyr Glu Arg Leu Asn Met Asp Phe Trp Arg Leu Arg Ala
465 470 475 480

Thr Glu Gln Pro Cys Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gly Arg Arg Asp
485 490 495

Cys Ser Leu Pro Gly Gly Ser Val Pro Thr Val Ala Val Phe Met Leu
500 505 510

Lys Ile Phe Met Ser Leu Val Val Gly Ile Thr Ser Gly Val Trp Val
515 520 525

Trp Ser Ser Lys Thr Phe Gln Thr Trp Gln Ser Leu Cys Tyr Arg Lys
530 535 540

Ile Ala Ala Gly Arg Ala Arg Ala Lys Ala Cys Arg Ala Pro Gly Ser
545 550 555 560

Tyr Gly Arg Gly Thr His Cys His Tyr Lys Ala Pro Thr Val Val Leu
565 570 575

His Met Thr Lys Thr Asp Pro Ser Leu Glu Asn Pro Thr His Leu
580 585 590

<210> 10
<211> 581
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Gln Arg Pro Gly Pro Arg Leu Trp Leu Val Leu Gln Val Met Gly
1 5 10 15

Ser Cys Ala Ala Ile Ser Ser Met Asp Met Glu Arg Pro Gly Asp Gly
20 25 30

Lys Cys Gln Pro Ile Glu Ile Pro Met Cys Lys Asp Ile Gly Tyr Asn
35 40 45

Met Thr Arg Met Pro Asn Leu Met Gly His Glu Asn Gln Arg Glu Ala
50 55 60

Ala Ile Gln Leu His Glu Phe Ala Pro Leu Val Glu Tyr Gly Cys His
65 70 75 80

Gly His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met Cys Thr
85 90 95

Glu Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Val Met Cys Glu Gln
100 105 110

Ala Arg Leu Lys Cys Ser Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe Lys Trp
115 120 125

Pro Asp Ser Leu Asp Cys Arg Lys Leu Pro Asn Lys Asn Asp Pro Asn
130 135 140

Tyr Leu Cys Met Glu Ala Pro Asn Asn Gly Ser Asp Glu Pro Thr Arg
145 150 155 160

Gly Ser Gly Leu Phe Pro Pro Leu Phe Arg Pro Gln Arg Pro His Ser
165 170 175

Ala Gln Glu His Pro Leu Lys Asp Gly Gly Pro Gly Arg Gly Gly Cys
180 185 190

Asp Asn Pro Gly Lys Phe His His Val Glu Lys Ser Ala Ser Cys Ala
195 200 205

Pro Leu Cys Thr Pro Gly Val Asp Val Tyr Trp Ser Arg Glu Asp Lys
210 215 220

Arg Phe Ala Val Val Trp Leu Ala Ile Trp Ala Val Leu Cys Phe Phe
225 230 235 240

Ser Ser Ala Phe Thr Val Leu Thr Phe Leu Ile Asp Pro Ala Arg Phe
245 250 255

Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Met Cys Tyr Cys Val
260 265 270

Tyr Ser Val Gly Tyr Leu Ile Arg Leu Phe Ala Gly Ala Glu Ser Ile
275 280 285

Ala Cys Asp Arg Asp Ser Gly Gln Leu Tyr Val Ile Gln Glu Gly Leu
290 295 300

Glu Ser Thr Gly Cys Thr Leu Val Phe Leu Val Leu Tyr Tyr Phe Gly
305 310 315 320

Met Ala Ser Ser Leu Trp Trp Val Val Leu Thr Leu Thr Trp Phe Leu
325 330 335

Ala Ala Gly Lys Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn Ser Ser
340 345 350

Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Ala Ile Pro Ala Val Lys Thr Ile Leu
355 360 365

Ile Leu Val Met Arg Arg Val Ala Gly Asp Glu Leu Thr Gly Val Cys
370 375 380

Tyr Val Gly Ser Met Asp Val Asn Ala Leu Thr Gly Phe Val Leu Ile
385 390 395 400

Pro Leu Ala Cys Tyr Leu Val Ile Gly Thr Ser Phe Ile Leu Ser Gly
405 410 415

Phe Val Ala Leu Phe His Ile Arg Arg Val Met Lys Thr Gly Gly Glu
420 425 430

Asn Thr Asp Lys Leu Glu Lys Leu Met Val Arg Ile Gly Leu Phe Ser
435 440 445

Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala Thr Cys Val Ile Ala Cys Tyr Phe Tyr
450 455 460

Glu Arg Leu Asn Met Asp Tyr Trp Lys Ile Leu Ala Ala Gln His Lys
465 470 475 480

Cys Lys Met Asn Asn Gln Thr Lys Thr Leu Asp Cys Leu Met Ala Ala
485 490 495

Ser Ile Pro Ala Val Glu Ile Phe Met Val Lys Ile Phe Met Leu Leu
500 505 510

Val Val Gly Ile Thr Ser Gly Met Trp Ile Trp Thr Ser Lys Thr Leu
515 520 525

Gln Ser Trp Gln Gln Val Cys Ser Arg Arg Leu Lys Lys Lys Ser Arg
530 535 540

Arg Lys Pro Ala Ser Val Ile Thr Ser Gly Gly Ile Tyr Lys Lys Ala
545 550 555 560

Gln His Pro Gln Lys Thr His His Gly Lys Tyr Glu Ile Pro Ala Gln
565 570 575

Ser Pro Thr Cys Val
580

<210> 11
<211> 314
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Gly Ile Gly Arg Ser Glu Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gly
1 5 10 15

Val Leu Leu Ala Leu Gly Ala Ala Leu Leu Ala Val Gly Ser Ala Ser
20 25 30

Glu Tyr Asp Tyr Val Ser Phe Gln Ser Asp Ile Gly Pro Tyr Gln Ser
35 40 45

Gly Arg Phe Tyr Thr Lys Pro Pro Gln Cys Val Asp Ile Pro Ala Asp
50 55 60

Leu Arg Leu Cys His Asn Val Gly Tyr Lys Lys Met Val Leu Pro Asn
65 70 75 80

Leu Leu Glu His Glu Thr Met Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser
85 90 95

Trp Val Pro Leu Leu Asn Lys Asn Cys His Ala Gly Thr Gln Val Phe
100 105 110

Leu Cys Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro
115 120 125

Cys Arg Trp Leu Cys Glu Ala Val Arg Asp Ser Cys Glu Pro Val Met
130 135 140

Gln Phe Phe Gly Phe Tyr Trp Pro Glu Met Leu Lys Cys Asp Lys Phe
145 150 155 160

Pro Glu Gly Asp Val Cys Ile Ala Met Thr Pro Pro Asn Ala Thr Glu
165 170 175

Ala Ser Lys Pro Gln Gly Thr Thr Val Cys Pro Pro Cys Asp Asn Glu
180 185 190

Leu Lys Ser Glu Ala Ile Ile Glu His Leu Cys Ala Ser Glu Phe Ala
195 200 205

Leu Arg Met Lys Ile Lys Glu Val Lys Lys Glu Asn Gly Asp Lys Lys
210 215 220

Ile Val Pro Lys Lys Lys Lys Pro Leu Lys Leu Gly Pro Ile Lys Lys
225 230 235 240

Lys Asp Leu Lys Lys Leu Val Leu Tyr Leu Lys Asn Gly Ala Asp Cys
245 250 255

Pro Cys His Gln Leu Asp Asn Leu Ser His His Phe Leu Ile Met Gly
260 265 270

Arg Lys Val Lys Ser Gln Tyr Leu Leu Thr Ala Ile His Lys Trp Asp
275 280 285

Lys Lys Asn Lys Glu Phe Lys Asn Phe Met Lys Lys Met Lys Asn His
290 295 300

Glu Cys Pro Thr Phe Gln Ser Val Phe Lys
305 310

<210> 12
<211> 295
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Leu Gln Gly Pro Gly Ser Leu Leu Leu Leu Phe Leu Ala Ser His
1 5 10 15

Cys Cys Leu Gly Ser Ala Arg Gly Leu Phe Leu Phe Gly Gln Pro Asp
20 25 30

Phe Ser Tyr Lys Arg Ser Asn Cys Lys Pro Ile Pro Ala Asn Leu Gln
35 40 45

Leu Cys His Gly Ile Glu Tyr Gln Asn Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu
50 55 60

Gly His Glu Thr Met Lys Glu Val Leu Glu Gln Ala Gly Ala Trp Ile
65 70 75 80

Pro Leu Val Met Lys Gln Cys His Pro Asp Thr Lys Lys Phe Leu Cys

85 90 95

Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Asp Leu Asp Glu Thr Ile Gln
100 105 110

Pro Cys His Ser Leu Cys Val Gln Val Lys Asp Arg Cys Ala Pro Val
115 120 125

Met Ser Ala Phe Gly Phe Pro Trp Pro Asp Met Leu Glu Cys Asp Arg
130 135 140

Phe Pro Gln Asp Asn Asp Leu Cys Ile Pro Leu Ala Ser Ser Asp His
145 150 155 160

Leu Leu Pro Ala Thr Glu Glu Ala Pro Lys Val Cys Glu Ala Cys Lys
165 170 175

Asn Lys Asn Asp Asp Asp Asn Asp Ile Met Glu Thr Leu Cys Lys Asn
180 185 190

Asp Phe Ala Leu Lys Ile Lys Val Lys Glu Ile Thr Tyr Ile Asn Arg
195 200 205

Asp Thr Lys Ile Ile Leu Glu Thr Lys Ser Lys Thr Ile Tyr Lys Leu
210 215 220

Asn Gly Val Ser Glu Arg Asp Leu Lys Lys Ser Val Leu Trp Leu Lys
225 230 235 240

Asp Ser Leu Gln Cys Thr Cys Glu Glu Met Asn Asp Ile Asn Ala Pro
245 250 255

Tyr Leu Val Met Gly Gln Lys Gln Gly Gly Glu Leu Val Ile Thr Ser
260 265 270

Val Lys Arg Trp Gln Lys Gly Gln Arg Glu Phe Lys Arg Ile Ser Arg
275 280 285

Ser Ile Arg Lys Leu Gln Cys
290 295

<210> 13
<211> 325
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Val Cys Gly Ser Pro Gly Gly Met Leu Leu Leu Arg Ala Gly Leu
1 5 10 15

Leu Ala Leu Ala Ala Leu Cys Leu Leu Arg Val Pro Gly Ala Arg Ala
20 25 30

Ala Ala Cys Glu Pro Val Arg Ile Pro Leu Cys Lys Ser Leu Pro Trp
35 40 45

Asn Met Thr Lys Met Pro Asn His Leu His His Ser Thr Gln Ala Asn
50 55 60

Ala Ile Leu Ala Ile Glu Gln Phe Glu Gly Leu Leu Gly Thr His Cys
65 70 75 80

Ser Pro Asp Leu Leu Phe Phe Leu Cys Ala Met Tyr Ala Pro Ile Cys
85 90 95

Thr Ile Asp Phe Gln His Glu Pro Ile Lys Pro Cys Lys Ser Val Cys
100 105 110

Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Pro Ile Leu Ile Lys Tyr Arg His
115 120 125

Ser Trp Pro Glu Asn Leu Ala Cys Glu Glu Leu Pro Val Tyr Asp Arg
130 135 140

Gly Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr Ala Asp Gly Ala Asp
145 150 155 160

Phe Pro Met Asp Ser Ser Asn Gly Asn Cys Arg Gly Ala Ser Ser Glu
165 170 175

Arg Cys Lys Cys Lys Pro Ile Arg Ala Thr Gln Lys Thr Tyr Phe Arg
180 185 190

Asn Asn Tyr Asn Tyr Val Ile Arg Ala Lys Val Lys Glu Ile Lys Thr
195 200 205

Lys Cys His Asp Val Thr Ala Val Val Glu Val Lys Glu Ile Leu Lys
210 215 220

Ser Ser Leu Val Asn Ile Pro Arg Asp Thr Val Asn Leu Tyr Thr Ser
225 230 235 240

Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Leu Asn Val Asn Glu Glu Tyr Ile Ile
245 250 255

Met Gly Tyr Glu Asp Glu Glu Arg Ser Arg Leu Leu Leu Val Glu Gly
260 265 270

Ser Ile Ala Glu Lys Trp Lys Asp Arg Leu Gly Lys Lys Val Lys Arg
275 280 285

Trp Asp Met Lys Leu Arg His Leu Gly Leu Ser Lys Ser Asp Ser Ser
290 295 300

Asn Ser Asp Ser Thr Gln Ser Gln Lys Ser Gly Arg Asn Ser Asn Pro
305 310 315 320

Arg Gln Ala Arg Asn
325

<210> 14
<211> 346
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Phe Leu Ser Ile Leu Val Ala Leu Cys Leu Trp Leu His Leu Ala
1 5 10 15

Leu Gly Val Arg Gly Ala Pro Cys Glu Ala Val Arg Ile Pro Met Cys
20 25 30

Arg His Met Pro Trp Asn Ile Thr Arg Met Pro Asn His Leu His His
35 40 45

Ser Thr Gln Glu Asn Ala Ile Leu Ala Ile Glu Gln Tyr Glu Glu Leu
50 55 60

Val Asp Val Asn Cys Ser Ala Val Leu Arg Phe Phe Phe Cys Ala Met
65 70 75 80

Tyr Ala Pro Ile Cys Thr Leu Glu Phe Leu His Asp Pro Ile Lys Pro
85 90 95

Cys Lys Ser Val Cys Gln Arg Ala Arg Asp Asp Cys Glu Pro Leu Met
100 105 110

Lys Met Tyr Asn His Ser Trp Pro Glu Ser Leu Ala Cys Asp Glu Leu
115 120 125

Pro Val Tyr Asp Arg Gly Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr
130 135 140

Asp Leu Pro Glu Asp Val Lys Trp Ile Asp Ile Thr Pro Asp Met Met
145 150 155 160

Val Gln Glu Arg Pro Leu Asp Val Asp Cys Lys Arg Leu Ser Pro Asp
165 170 175

Arg Cys Lys Cys Lys Lys Val Lys Pro Thr Leu Ala Thr Tyr Leu Ser
180 185 190

Lys Asn Tyr Ser Tyr Val Ile His Ala Lys Ile Lys Ala Val Gln Arg
195 200 205

Ser Gly Cys Asn Glu Val Thr Thr Val Val Asp Val Lys Glu Ile Phe
210 215 220

Lys Ser Ser Ser Pro Ile Pro Arg Thr Gln Val Pro Leu Ile Thr Asn
225 230 235 240

Ser Ser Cys Gln Cys Pro His Ile Leu Pro His Gln Asp Val Leu Ile
245 250 255

Met Cys Tyr Glu Trp Arg Ser Arg Met Met Leu Leu Glu Asn Cys Leu
260 265 270

Val Glu Lys Trp Arg Asp Gln Leu Ser Lys Arg Ser Ile Gln Trp Glu
275 280 285

Glu Arg Leu Gln Glu Gln Arg Arg Thr Val Gln Asp Lys Lys Lys Thr
290 295 300

Ala Gly Arg Thr Ser Arg Ser Asn Pro Pro Lys Pro Lys Gly Lys Pro
305 310 315 320

Pro Ala Pro Lys Pro Ala Ser Pro Lys Lys Asn Ile Lys Thr Arg Ser
325 330 335

Ala Gln Lys Arg Thr Asn Pro Lys Arg Val
340 345

<210> 15
<211> 317
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Arg Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Val Arg Thr Ala Ala Leu Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Ala Leu His Trp Ala Pro Ala Arg Cys Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Tyr Tyr Gly Trp Gln Ala Glu Pro Leu His Gly Arg Ser Tyr Ser
35 40 45

Lys Pro Pro Gln Cys Leu Asp Ile Pro Ala Asp Leu Pro Leu Cys His
50 55 60

Thr Val Gly Tyr Lys Arg Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu Glu His Glu
65 70 75 80

Ser Leu Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser Trp Leu Pro Leu Leu
85 90 95

Ala Lys Arg Cys His Ser Asp Thr Gln Val Phe Leu Cys Ser Leu Phe
100 105 110

Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro Cys Arg Ser Leu Cys
115 120 125

Glu Ala Val Arg Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Glu Ala Tyr Gly Phe
130 135 140

Pro Trp Pro Glu Met Leu His Cys His Lys Phe Pro Leu Asp Asn Asp
145 150 155 160

Leu Cys Ile Ala Val Gln Phe Gly His Leu Pro Ala Thr Ala Pro Pro
165 170 175

Val Thr Lys Ile Cys Ala Gln Cys Glu Met Glu His Ser Ala Asp Gly
180 185 190

Leu Met Glu Gln Met Cys Ser Ser Asp Phe Val Val Lys Met Arg Ile
195 200 205

Lys Glu Ile Lys Ile Glu Asn Gly Asp Arg Lys Leu Ile Gly Ala Gln
210 215 220

Lys Lys Lys Lys Leu Leu Lys Pro Gly Pro Leu Lys Arg Lys Asp Thr
225 230 235 240

Lys Arg Leu Val Leu His Met Lys Asn Gly Ala Gly Cys Pro Cys Pro
245 250 255

Gln Leu Asp Ser Leu Ala Gly Ser Phe Leu Val Met Gly Arg Lys Val
260 265 270

Asp Gly Gln Leu Leu Leu Met Ala Val Tyr Arg Trp Asp Lys Lys Asn
275 280 285

Lys Glu Met Lys Phe Ala Val Lys Phe Met Phe Ser Tyr Pro Cys Ser
290 295 300

Leu Tyr Tyr Pro Phe Phe Tyr Gly Ala Ala Glu Pro His
305 310 315

<210> 16
<211> 937
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Met His Arg Pro Arg Arg Arg Gly Thr Arg Pro Pro Leu Leu Ala Leu

1 5 10 15

Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala Gln Glu Thr
20 25 30

Glu Leu Ser Val Ser Ala Glu Leu Val Pro Thr Ser Ser Trp Asn Ile
35 40 45

Ser Ser Glu Leu Asn Lys Asp Ser Tyr Leu Thr Leu Asp Glu Pro Met
50 55 60

Asn Asn Ile Thr Thr Ser Leu Gly Gln Thr Ala Glu Leu His Cys Lys
65 70 75 80

Val Ser Gly Asn Pro Pro Pro Thr Ile Arg Trp Phe Lys Asn Asp Ala
85 90 95

Pro Val Val Gln Glu Pro Arg Arg Leu Ser Phe Arg Ser Thr Ile Tyr
100 105 110

Gly Ser Arg Leu Arg Ile Arg Asn Leu Asp Thr Thr Asp Thr Gly Tyr
115 120 125

Phe Gln Cys Val Ala Thr Asn Gly Lys Glu Val Val Ser Ser Thr Gly
130 135 140

Val Leu Phe Val Lys Phe Gly Pro Pro Pro Thr Ala Ser Pro Gly Tyr
145 150 155 160

Ser Asp Glu Tyr Glu Glu Asp Gly Phe Cys Gln Pro Tyr Arg Gly Ile
165 170 175

Ala Cys Ala Arg Phe Ile Gly Asn Arg Thr Val Tyr Met Glu Ser Leu
180 185 190

His Met Gln Gly Glu Ile Glu Asn Gln Ile Thr Ala Ala Phe Thr Met
195 200 205

Ile Gly Thr Ser Ser His Leu Ser Asp Lys Cys Ser Gln Phe Ala Ile
210 215 220

Pro Ser Leu Cys His Tyr Ala Phe Pro Tyr Cys Asp Glu Thr Ser Ser
225 230 235 240

Val Pro Lys Pro Arg Asp Leu Cys Arg Asp Glu Cys Glu Ile Leu Glu
245 250 255

Asn Val Leu Cys Gln Thr Glu Tyr Ile Phe Ala Arg Ser Asn Pro Met
260 265 270

Ile Leu Met Arg Leu Lys Leu Pro Asn Cys Glu Asp Leu Pro Gln Pro
275 280 285

Glu Ser Pro Glu Ala Ala Asn Cys Ile Arg Ile Gly Ile Pro Met Ala
290 295 300

Asp Pro Ile Asn Lys Asn His Lys Cys Tyr Asn Ser Thr Gly Val Asp
305 310 315 320

Tyr Arg Gly Thr Val Ser Val Thr Lys Ser Gly Arg Gln Cys Gln Pro
325 330 335

Trp Asn Ser Gln Tyr Pro His Thr His Thr Phe Thr Ala Leu Arg Phe

340 345 350

Pro Glu Leu Asn Gly Gly His Ser Tyr Cys Arg Asn Pro Gly Asn Gln
355 360 365

Lys Glu Ala Pro Trp Cys Phe Thr Leu Asp Glu Asn Phe Lys Ser Asp
370 375 380

Leu Cys Asp Ile Pro Ala Cys Asp Ser Lys Asp Ser Lys Glu Lys Asn
385 390 395 400

Lys Met Glu Ile Leu Tyr Ile Leu Val Pro Ser Val Ala Ile Pro Leu
405 410 415

Ala Ile Ala Leu Leu Phe Phe Phe Ile Cys Val Cys Arg Asn Asn Gln
420 425 430

Lys Ser Ser Ser Ala Pro Val Gln Arg Gln Pro Lys His Val Arg Gly
435 440 445

Gln Asn Val Glu Met Ser Met Leu Asn Ala Tyr Lys Pro Lys Ser Lys
450 455 460

Ala Lys Glu Leu Pro Leu Ser Ala Val Arg Phe Met Glu Glu Leu Gly
465 470 475 480

Glu Cys Ala Phe Gly Lys Ile Tyr Lys Gly His Leu Tyr Leu Pro Gly
485 490 495

Met Asp His Ala Gln Leu Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Asp Tyr Asn
500 505 510

Asn Pro Gln Gln Trp Met Glu Phe Gln Gln Glu Ala Ser Leu Met Ala
515 520 525

Glu Leu His His Pro Asn Ile Val Cys Leu Leu Gly Ala Val Thr Gln
530 535 540

Glu Gln Pro Val Cys Met Leu Phe Glu Tyr Ile Asn Gln Gly Asp Leu
545 550 555 560

His Glu Phe Leu Ile Met Arg Ser Pro His Ser Asp Val Gly Cys Ser
565 570 575

Ser Asp Glu Asp Gly Thr Val Lys Ser Ser Leu Asp His Gly Asp Phe
580 585 590

Leu His Ile Ala Ile Gln Ile Ala Ala Gly Met Glu Tyr Leu Ser Ser
595 600 605

His Phe Phe Val His Lys Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Ile Gly
610 615 620

Glu Gln Leu His Val Lys Ile Ser Asp Leu Gly Leu Ser Arg Glu Ile
625 630 635 640

Tyr Ser Ala Asp Tyr Tyr Arg Val Gln Ser Lys Ser Leu Leu Pro Ile
645 650 655

Arg Trp Met Pro Pro Glu Ala Ile Met Tyr Gly Lys Phe Ser Ser Asp
660 665 670

Ser Asp Ile Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Ser Phe

675 680 685

Gly Leu Gln Pro Tyr Tyr Gly Phe Ser Asn Gln Glu Val Ile Glu Met
690 695 700

Val Arg Lys Arg Gln Leu Leu Pro Cys Ser Glu Asp Cys Pro Pro Arg
705 710 715 720

Met Tyr Ser Leu Met Thr Glu Cys Trp Asn Glu Ile Pro Ser Arg Arg
725 730 735

Pro Arg Phe Lys Asp Ile His Val Arg Leu Arg Ser Trp Glu Gly Leu
740 745 750

Ser Ser His Thr Ser Ser Thr Thr Pro Ser Gly Gly Asn Ala Thr Thr
755 760 765

Gln Thr Thr Ser Leu Ser Ala Ser Pro Val Ser Asn Leu Ser Asn Pro
770 775 780

Arg Tyr Pro Asn Tyr Met Phe Pro Ser Gln Gly Ile Thr Pro Gln Gly
785 790 795 800

Gln Ile Ala Gly Phe Ile Gly Pro Pro Ile Pro Gln Asn Gln Arg Phe
805 810 815

Ile Pro Ile Asn Gly Tyr Pro Ile Pro Pro Gly Tyr Ala Ala Phe Pro
820 825 830

Ala Ala His Tyr Gln Pro Thr Gly Pro Pro Arg Val Ile Gln His Cys
835 840 845

Pro Pro Pro Lys Ser Arg Ser Pro Ser Ser Ala Ser Gly Ser Thr Ser
850 855 860

Thr Gly His Val Thr Ser Leu Pro Ser Ser Gly Ser Asn Gln Glu Ala
865 870 875 880

Asn Ile Pro Leu Leu Pro His Met Ser Ile Pro Asn His Pro Gly Gly
885 890 895

Met Gly Ile Thr Val Phe Gly Asn Lys Ser Gln Lys Pro Tyr Lys Ile
900 905 910

Asp Ser Lys Gln Ala Ser Leu Leu Gly Asp Ala Asn Ile His Gly His
915 920 925

Thr Glu Ser Met Ile Ser Ala Glu Leu
930 935

<210> 17
<211> 943
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Ala Arg Gly Ser Ala Leu Pro Arg Arg Pro Leu Leu Cys Ile Pro
1 5 10 15

Ala Val Trp Ala Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ser Val Ser Arg Thr Ser
20 25 30

Gly Glu Val Glu Val Leu Asp Pro Asn Asp Pro Leu Gly Pro Leu Asp
35 40 45

Gly Gln Asp Gly Pro Ile Pro Thr Leu Lys Gly Tyr Phe Leu Asn Phe
50 55 60

Leu Glu Pro Val Asn Asn Ile Thr Ile Val Gln Gly Gln Thr Ala Ile
65 70 75 80

Leu His Cys Lys Val Ala Gly Asn Pro Pro Pro Asn Val Arg Trp Leu
85 90 95

Lys Asn Asp Ala Pro Val Val Gln Glu Pro Arg Arg Ile Ile Ile Arg
100 105 110

Lys Thr Glu Tyr Gly Ser Arg Leu Arg Ile Gln Asp Leu Asp Thr Thr
115 120 125

Asp Thr Gly Tyr Tyr Gln Cys Val Ala Thr Asn Gly Met Lys Thr Ile
130 135 140

Thr Ala Thr Gly Val Leu Phe Val Arg Leu Gly Pro Thr His Ser Pro
145 150 155 160

Asn His Asn Phe Gln Asp Asp Tyr His Glu Asp Gly Phe Cys Gln Pro
165 170 175

Tyr Arg Gly Ile Ala Cys Ala Arg Phe Ile Gly Asn Arg Thr Ile Tyr
180 185 190

Val Asp Ser Leu Gln Met Gln Gly Glu Ile Glu Asn Arg Ile Thr Ala
195 200 205

Ala Phe Thr Met Ile Gly Thr Ser Thr His Leu Ser Asp Gln Cys Ser
210 215 220

Gln Phe Ala Ile Pro Ser Phe Cys His Phe Val Phe Pro Leu Cys Asp
225 230 235 240

Ala Arg Ser Arg Thr Pro Lys Pro Arg Glu Leu Cys Arg Asp Glu Cys
245 250 255

Glu Val Leu Glu Ser Asp Leu Cys Arg Gln Glu Tyr Thr Ile Ala Arg
260 265 270

Ser Asn Pro Leu Ile Leu Met Arg Leu Gln Leu Pro Lys Cys Glu Ala
275 280 285

Leu Pro Met Pro Glu Ser Pro Asp Ala Ala Asn Cys Met Arg Ile Gly
290 295 300

Ile Pro Ala Glu Arg Leu Gly Arg Tyr His Gln Cys Tyr Asn Gly Ser
305 310 315 320

Gly Met Asp Tyr Arg Gly Thr Ala Ser Thr Thr Lys Ser Gly His Gln
325 330 335

Cys Gln Pro Trp Ala Leu Gln His Pro His Ser His His Leu Ser Ser
340 345 350

Thr Asp Phe Pro Glu Leu Gly Gly Gly His Ala Tyr Cys Arg Asn Pro
355 360 365

Gly Gly Gln Met Glu Gly Pro Trp Cys Phe Thr Gln Asn Lys Asn Val
370 375 380

Arg Met Glu Leu Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Pro Arg Asp Ser Ser
385 390 395 400

Lys Met Gly Ile Leu Tyr Ile Leu Val Pro Ser Ile Ala Ile Pro Leu
405 410 415

Val Ile Ala Cys Leu Phe Phe Leu Val Cys Met Cys Arg Asn Lys Gln
420 425 430

Lys Ala Ser Ala Ser Thr Pro Gln Arg Arg Gln Leu Met Ala Ser Pro
435 440 445

Ser Gln Asp Met Glu Met Pro Leu Ile Asn Gln His Lys Gln Ala Lys
450 455 460

Leu Lys Glu Ile Ser Leu Ser Ala Val Arg Phe Met Glu Glu Leu Gly
465 470 475 480

Glu Asp Arg Phe Gly Lys Val Tyr Lys Gly His Leu Phe Gly Pro Ala
485 490 495

Pro Gly Glu Gln Thr Gln Ala Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Asp Lys
500 505 510

Ala Glu Gly Pro Leu Arg Glu Glu Phe Arg His Glu Ala Met Leu Arg
515 520 525

Ala Arg Leu Gln His Pro Asn Val Val Cys Leu Leu Gly Val Val Thr
530 535 540

Lys Asp Gln Pro Leu Ser Met Ile Phe Ser Tyr Cys Ser His Gly Asp
545 550 555 560

Leu His Glu Phe Leu Val Met Arg Ser Pro His Ser Asp Val Gly Ser
565 570 575

Thr Asp Asp Asp Arg Thr Val Lys Ser Ala Leu Glu Pro Pro Asp Phe
580 585 590

Val His Leu Val Ala Gln Ile Ala Ala Gly Met Glu Tyr Leu Ser Ser
595 600 605

His His Val Val His Lys Asp Leu Ala Thr Arg Asn Val Leu Val Tyr
610 615 620

Asp Lys Leu Asn Val Lys Ile Ser Asp Leu Gly Leu Phe Arg Glu Val
625 630 635 640

Tyr Ala Ala Asp Tyr Tyr Lys Leu Leu Gly Asn Ser Leu Leu Pro Ile
645 650 655

Arg Trp Met Ala Pro Glu Ala Ile Met Tyr Gly Lys Phe Ser Ile Asp
660 665 670

Ser Asp Ile Trp Ser Tyr Gly Val Val Leu Trp Glu Val Phe Ser Tyr
675 680 685

Gly Leu Gln Pro Tyr Cys Gly Tyr Ser Asn Gln Asp Val Val Glu Met
690 695 700

Ile Arg Asn Arg Gln Val Leu Pro Cys Pro Asp Asp Cys Pro Ala Trp
705 710 715 720

Val Tyr Ala Leu Met Ile Glu Cys Trp Asn Glu Phe Pro Ser Arg Arg
725 730 735

Pro Arg Phe Lys Asp Ile His Ser Arg Leu Arg Ala Trp Gly Asn Leu
740 745 750

Ser Asn Tyr Asn Ser Ser Ala Gln Thr Ser Gly Ala Ser Asn Thr Thr
755 760 765

Gln Thr Ser Ser Leu Ser Thr Ser Pro Val Ser Asn Val Ser Asn Ala
770 775 780

Arg Tyr Val Gly Pro Lys Gln Lys Ala Pro Pro Phe Pro Gln Pro Gln
785 790 795 800

Phe Ile Pro Met Lys Gly Gln Ile Arg Pro Met Val Pro Pro Pro Gln
805 810 815

Leu Tyr Val Pro Val Asn Gly Tyr Gln Pro Val Pro Ala Tyr Gly Ala
820 825 830

Tyr Leu Pro Asn Phe Tyr Pro Val Gln Ile Pro Met Gln Met Ala Pro
835 840 845

Gln Gln Val Pro Pro Gln Met Val Pro Lys Pro Ser Ser His His Ser
850 855 860

Gly Ser Gly Ser Thr Ser Thr Gly Tyr Val Thr Thr Ala Pro Ser Asn
865 870 875 880

Thr Ser Met Ala Asp Arg Ala Ala Leu Leu Ser Glu Gly Ala Asp Asp
885 890 895

Thr Gln Asn Ala Pro Glu Asp Gly Ala Gln Ser Thr Val Gln Glu Ala
900 905 910

Glu Glu Glu Glu Glu Gly Ser Val Pro Glu Thr Glu Leu Leu Gly Asp
915 920 925

Cys Asp Thr Leu Gln Val Asp Glu Ala Gln Val Gln Leu Glu Ala
930 935 940

<210> 18
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Ser Val Pro Asp His Gly Tyr Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys
1 5 10 15

Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His
20 25 30

Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu
35 40 45

Val Lys Val Gln Cys Ser Ala Glu Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met
50 55 60

Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val Leu Glu Gln Ala Leu Pro Pro Cys Arg
65 70 75 80

Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys
85 90 95

Phe Gly Phe Gln Trp Pro Asp Thr Leu Lys Cys Glu Lys Phe Pro Val
100 105 110

His Gly Ala Gly Glu Leu Cys Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Lys
115 120 125

<210> 19
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Ser Ile Pro Asp His Gly Phe Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys
1 5 10 15

Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His
20 25 30

Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu
35 40 45

Val Lys Val Gln Cys Ser Pro Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met
50 55 60

Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val Leu Glu Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg
65 70 75 80

Ser Ile Cys Glu Ser Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys
85 90 95

Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu Arg Leu Arg Cys Glu His Phe Pro Arg
100 105 110

His Gly Ala Glu Gln Ile Cys Val Gly Gln Asn His Ser Glu Asp
115 120 125

<210> 20
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

His Ser Leu Phe Ser Cys Glu Pro Ile Thr Leu Arg Met Cys Gln Asp
1 5 10 15

Leu Pro Tyr Asn Thr Thr Phe Met Pro Asn Leu Leu Asn His Tyr Asp
20 25 30

Gln Gln Thr Ala Ala Leu Ala Met Glu Pro Phe His Pro Met Val Asn
35 40 45

Leu Asp Cys Ser Arg Asp Phe Arg Pro Phe Leu Cys Ala Leu Tyr Ala
50 55 60

Pro Ile Cys Met Glu Tyr Gly Arg Val Thr Leu Pro Cys Arg Arg Leu
65 70 75 80

Cys Gln Arg Ala Tyr Ser Glu Cys Ser Lys Leu Met Glu Met Phe Gly
85 90 95

Val Pro Trp Pro Glu Asp Met Glu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Cys Asp

100 105 110

Glu Pro Tyr Pro Arg Leu Val
115

<210> 21
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

Glu Arg Arg Cys Asp Pro Ile Arg Ile Ser Met Cys Gln Asn Leu Gly
1 5 10 15

Tyr Asn Val Thr Lys Met Pro Asn Leu Val Gly His Glu Leu Gln Thr
20 25 30

Asp Ala Glu Leu Gln Leu Thr Thr Phe Thr Pro Leu Ile Gln Tyr Gly
35 40 45

Cys Ser Ser Gln Leu Gln Phe Phe Leu Cys Ser Val Tyr Val Pro Met
50 55 60

Cys Thr Glu Lys Ile Asn Ile Pro Ile Gly Pro Cys Gly Gly Met Cys
65 70 75 80

Leu Ser Val Lys Arg Arg Cys Glu Pro Val Leu Lys Glu Phe Gly Phe
85 90 95

Ala Trp Pro Glu Ser Leu Asn Cys Ser Lys Phe Pro Pro Gln Asn Asp
100 105 110

His Asn His Met Cys Met Glu Gly Pro Gly Asp Glu Glu
115 120 125

<210> 22
<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Ala Ser Lys Ala Pro Val Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Met Cys Arg
1 5 10 15

Gly Ile Gly Tyr Asn Leu Thr His Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp
20 25 30

Thr Gln Asp Glu Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val
35 40 45

Glu Ile Gln Cys Ser Pro Asp Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr
50 55 60

Thr Pro Ile Cys Leu Pro Asp Tyr His Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg
65 70 75 80

Ser Val Cys Glu Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ser Pro Leu Met Arg Gln
85 90 95

Tyr Gly Phe Ala Trp Pro Glu Arg Met Ser Cys Asp Arg Leu Pro Val
100 105 110

Leu Gly Arg Asp Ala Glu Val Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Ser Glu
115 120 125

Ala

<210> 23
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

His Ser Leu Phe Thr Cys Glu Pro Ile Thr Val Pro Arg Cys Met Lys
1 5 10 15

Met Ala Tyr Asn Met Thr Phe Phe Pro Asn Leu Met Gly His Tyr Asp
20 25 30

Gln Ser Ile Ala Ala Val Glu Met Glu His Phe Leu Pro Leu Ala Asn
35 40 45

Leu Glu Cys Ser Pro Asn Ile Glu Thr Phe Leu Cys Lys Ala Phe Val
50 55 60

Pro Thr Cys Ile Glu Gln Ile His Val Val Pro Pro Cys Arg Lys Leu
65 70 75 80

Cys Glu Lys Val Tyr Ser Asp Cys Lys Lys Leu Ile Asp Thr Phe Gly
85 90 95

Ile Arg Trp Pro Glu Glu Leu Glu Cys Asp Arg Leu Gln Tyr Cys Asp
100 105 110

Glu Thr Val Pro Val Thr Phe
115

<210> 24
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Ser Val Pro Asp His Gly Phe Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys
1 5 10 15

Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln Thr Ile Leu Pro Asn Leu Leu Gly His
20 25 30

Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu
35 40 45

Val Lys Val Gln Cys Ser Pro Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met
50 55 60

Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val Leu Asp Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg
65 70 75 80

Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys
85 90 95

Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu Arg Leu Arg Cys Glu Asn Phe Pro Val
100 105 110

His Gly Ala Gly Glu Ile Cys Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Gly
115 120 125

<210> 25

<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

Ala Ser Ala Lys Glu Leu Ala Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Leu Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ile Gly Tyr Asn Tyr Thr Tyr Met Pro Asn Gln Phe Asn His
20 25 30

Asp Thr Gln Asp Glu Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu
35 40 45

Val Glu Ile Gln Cys Ser Pro Asp Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met
50 55 60

Tyr Thr Pro Ile Cys Leu Glu Asp Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Cys
65 70 75 80

Arg Ser Val Cys Glu Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Arg
85 90 95

Gln Tyr Gly Phe Ala Trp Pro Asp Arg Met Arg Cys Asp Arg Leu Pro
100 105 110

Glu Gln Gly Asn Pro Asp Thr Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Thr Asp
115 120 125

Leu

<210> 26
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Ala Ala Pro Cys Gln Ala Val Glu Ile Pro Met Cys Arg Gly Ile Gly
1 5 10 15

Tyr Asn Leu Thr Arg Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Ser Gln Gly
20 25 30

Glu Ala Ala Ala Glu Leu Ala Glu Phe Ala Pro Leu Val Gln Tyr Gly
35 40 45

Cys His Ser His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met
50 55 60

Cys Thr Asp Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Pro Met Cys
65 70 75 80

Glu Gln Ala Arg Leu Arg Cys Ala Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe
85 90 95

Gly Trp Pro Asp Ser Leu Asp Cys Ala Arg Leu Pro Thr Arg Asn Asp
100 105 110

Pro His Ala Leu Cys Met Glu Ala Pro Glu Asn Ala Thr
115 120 125

<210> 27
<211> 125
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Asp Gly Lys Cys Gln Pro Ile Glu Ile Pro Met Cys Lys Asp Ile Gly
1 5 10 15

Tyr Asn Met Thr Arg Met Pro Asn Leu Met Gly His Glu Asn Gln Arg
20 25 30

Glu Ala Ala Ile Gln Leu His Glu Phe Ala Pro Leu Val Glu Tyr Gly
35 40 45

Cys His Gly His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met
50 55 60

Cys Thr Glu Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Val Met Cys
65 70 75 80

Glu Gln Ala Arg Leu Lys Cys Ser Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe
85 90 95

Lys Trp Pro Asp Ser Leu Asp Cys Arg Lys Leu Pro Asn Lys Asn Asp
100 105 110

Pro Asn Tyr Leu Cys Met Glu Ala Pro Asn Asn Gly Ser
115 120 125

<210> 28
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Phe Tyr Thr Lys Pro Pro Gln Cys Val Asp Ile Pro Ala Asp Leu Arg
1 5 10 15

Leu Cys His Asn Val Gly Tyr Lys Lys Met Val Leu Pro Asn Leu Leu
20 25 30

Glu His Glu Thr Met Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser Trp Val
35 40 45

Pro Leu Leu Asn Lys Asn Cys His Ala Gly Thr Gln Val Phe Leu Cys
50 55 60

Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro Cys Arg
65 70 75 80

Trp Leu Cys Glu Ala Val Arg Asp Ser Cys Glu Pro Val Met Gln Phe
85 90 95

Phe Gly Phe Tyr Trp Pro Glu Met Leu Lys Cys Asp Lys Phe Pro Glu
100 105 110

Gly Asp Val Cys Ile Ala Met Thr Pro Pro Asn Ala
115 120

<210> 29
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Phe Ser Tyr Lys Arg Ser Asn Cys Lys Pro Ile Pro Ala Asn Leu Gln
1 5 10 15

Leu Cys His Gly Ile Glu Tyr Gln Asn Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu
20 25 30

Gly His Glu Thr Met Lys Glu Val Leu Glu Gln Ala Gly Ala Trp Ile
35 40 45

Pro Leu Val Met Lys Gln Cys His Pro Asp Thr Lys Lys Phe Leu Cys
50 55 60

Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Asp Leu Asp Glu Thr Ile Gln
65 70 75 80

Pro Cys His Ser Leu Cys Val Gln Val Lys Asp Arg Cys Ala Pro Val
85 90 95

Met Ser Ala Phe Gly Phe Pro Trp Pro Asp Met Leu Glu Cys Asp Arg
100 105 110

Phe Pro Gln Asp Asn Asp Leu Cys Ile Pro Leu Ala Ser Ser Asp His
115 120 125

<210> 30
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Ala Ala Cys Glu Pro Val Arg Ile Pro Leu Cys Lys Ser Leu Pro Trp
1 5 10 15

Asn Met Thr Lys Met Pro Asn His Leu His His Ser Thr Gln Ala Asn
20 25 30

Ala Ile Leu Ala Ile Glu Gln Phe Glu Gly Leu Leu Gly Thr His Cys
35 40 45

Ser Pro Asp Leu Leu Phe Phe Leu Cys Ala Met Tyr Ala Pro Ile Cys
50 55 60

Thr Ile Asp Phe Gln His Glu Pro Ile Lys Pro Cys Lys Ser Val Cys
65 70 75 80

Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Pro Ile Leu Ile Lys Tyr Arg His
85 90 95

Ser Trp Pro Glu Asn Leu Ala Cys Glu Glu Leu Pro Val Tyr Asp Arg
100 105 110

Gly Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr
115 120

<210> 31
<211> 126
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Val Arg Gly Ala Pro Cys Glu Ala Val Arg Ile Pro Met Cys Arg His
1 5 10 15

Met Pro Trp Asn Ile Thr Arg Met Pro Asn His Leu His His Ser Thr
20 25 30

Gln Glu Asn Ala Ile Leu Ala Ile Glu Gln Tyr Glu Glu Leu Val Asp
35 40 45

Val Asn Cys Ser Ala Val Leu Arg Phe Phe Phe Cys Ala Met Tyr Ala
50 55 60

Pro Ile Cys Thr Leu Glu Phe Leu His Asp Pro Ile Lys Pro Cys Lys
65 70 75 80

Ser Val Cys Gln Arg Ala Arg Asp Asp Cys Glu Pro Leu Met Lys Met
85 90 95

Tyr Asn His Ser Trp Pro Glu Ser Leu Ala Cys Asp Glu Leu Pro Val
100 105 110

Tyr Asp Arg Gly Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr
115 120 125

<210> 32
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Ser Tyr Ser Lys Pro Pro Gln Cys Leu Asp Ile Pro Ala Asp Leu Pro
1 5 10 15

Leu Cys His Thr Val Gly Tyr Lys Arg Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu
20 25 30

Glu His Glu Ser Leu Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser Trp Leu
35 40 45

Pro Leu Leu Ala Lys Arg Cys His Ser Asp Thr Gln Val Phe Leu Cys
50 55 60

Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro Cys Arg
65 70 75 80

Ser Leu Cys Glu Ala Val Arg Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Glu Ala
85 90 95

Tyr Gly Phe Pro Trp Pro Glu Met Leu His Cys His Lys Phe Pro Leu
100 105 110

Asp Asn Asp Leu Cys Ile Ala Val Gln Phe Gly His Leu
115 120 125

<210> 33
<211> 142
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Glu Tyr Glu Glu Asp Gly Phe Cys Gln Pro Tyr Arg Gly Ile Ala Cys
1 5 10 15

Ala Arg Phe Ile Gly Asn Arg Thr Val Tyr Met Glu Ser Leu His Met
20 25 30

Gln Gly Glu Ile Glu Asn Gln Ile Thr Ala Ala Phe Thr Met Ile Gly
35 40 45

Thr Ser Ser His Leu Ser Asp Lys Cys Ser Gln Phe Ala Ile Pro Ser
50 55 60

Leu Cys His Tyr Ala Phe Pro Tyr Cys Asp Glu Thr Ser Ser Val Pro
65 70 75 80

Lys Pro Arg Asp Leu Cys Arg Asp Glu Cys Glu Ile Leu Glu Asn Val
85 90 95

Leu Cys Gln Thr Glu Tyr Ile Phe Ala Arg Ser Asn Pro Met Ile Leu
100 105 110

Met Arg Leu Lys Leu Pro Asn Cys Glu Asp Leu Pro Gln Pro Glu Ser
115 120 125

Pro Glu Ala Ala Asn Cys Ile Arg Ile Gly Ile Pro Met Ala
130 135 140

<210> 34
<211> 142
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Asp Tyr His Glu Asp Gly Phe Cys Gln Pro Tyr Arg Gly Ile Ala Cys
1 5 10 15

Ala Arg Phe Ile Gly Asn Arg Thr Ile Tyr Val Asp Ser Leu Gln Met
20 25 30

Gln Gly Glu Ile Glu Asn Arg Ile Thr Ala Ala Phe Thr Met Ile Gly
35 40 45

Thr Ser Thr His Leu Ser Asp Gln Cys Ser Gln Phe Ala Ile Pro Ser
50 55 60

Phe Cys His Phe Val Phe Pro Leu Cys Asp Ala Arg Ser Arg Thr Pro
65 70 75 80

Lys Pro Arg Glu Leu Cys Arg Asp Glu Cys Glu Val Leu Glu Ser Asp
85 90 95

Leu Cys Arg Gln Glu Tyr Thr Ile Ala Arg Ser Asn Pro Leu Ile Leu
100 105 110

Met Arg Leu Gln Leu Pro Lys Cys Glu Ala Leu Pro Met Pro Glu Ser
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Asn Cys Met Arg Ile Gly Ile Pro Ala Glu
130 135 140

<210> 35
<211> 235
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Met Ala Glu Glu Glu Ala Pro Lys Lys Ser Arg Ala Ala Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ala Ser Trp Glu Leu Cys Ala Gly Ala Leu Ser Ala Arg Leu Ala Glu
20 25 30

Glu Gly Ser Gly Asp Ala Gly Gly Arg Arg Arg Pro Pro Val Asp Pro
35 40 45

Arg Arg Leu Ala Arg Gln Leu Leu Leu Leu Leu Trp Leu Leu Glu Ala
50 55 60

Pro Leu Leu Leu Gly Val Arg Ala Gln Ala Ala Gly Gln Gly Pro Gly
65 70 75 80

Gln Gly Pro Gly Pro Gly Gln Gln Pro Pro Pro Pro Gln Gln Gln
85 90 95

Gln Ser Gly Gln Gln Tyr Asn Gly Glu Arg Gly Ile Ser Val Pro Asp
100 105 110

His Gly Tyr Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala
115 120 125

Tyr Asn Gln Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu
130 135 140

Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln
145 150 155 160

Cys Ser Ala Glu Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val
165 170 175

Cys Thr Val Leu Glu Gln Ala Leu Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu
180 185 190

Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln
195 200 205

Trp Pro Asp Thr Leu Lys Cys Glu Lys Phe Pro Val His Gly Ala Gly
210 215 220

Glu Leu Cys Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Lys
225 230 235

<210> 36
<211> 158
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Met Arg Pro Arg Ser Ala Leu Pro Arg Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Pro Ala Ala Gly Pro Ala Gln Phe His Gly Glu Lys Gly Ile Ser
20 25 30

Ile Pro Asp His Gly Phe Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr
35 40 45

Asp Ile Ala Tyr Asn Gln Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr
50 55 60

Asn Gln Glu Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val
65 70 75 80

Lys Val Gln Cys Ser Pro Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr
85 90 95

Ala Pro Val Cys Thr Val Leu Glu Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser
100 105 110

Ile Cys Glu Ser Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe

115 120 125

Gly Phe Gln Trp Pro Glu Arg Leu Arg Cys Glu His Phe Pro Arg His
130 135 140

Gly Ala Glu Gln Ile Cys Val Gly Gln Asn His Ser Glu Asp
145 150 155

<210> 37
<211> 141
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Met Ala Met Thr Trp Ile Val Phe Ser Leu Trp Pro Leu Thr Val Phe
1 5 10 15

Met Gly His Ile Gly Gly His Ser Leu Phe Ser Cys Glu Pro Ile Thr
20 25 30

Leu Arg Met Cys Gln Asp Leu Pro Tyr Asn Thr Thr Phe Met Pro Asn
35 40 45

Leu Leu Asn His Tyr Asp Gln Gln Thr Ala Ala Leu Ala Met Glu Pro
50 55 60

Phe His Pro Met Val Asn Leu Asp Cys Ser Arg Asp Phe Arg Pro Phe
65 70 75 80

Leu Cys Ala Leu Tyr Ala Pro Ile Cys Met Glu Tyr Gly Arg Val Thr
85 90 95

Leu Pro Cys Arg Arg Leu Cys Gln Arg Ala Tyr Ser Glu Cys Ser Lys
100 105 110

Leu Met Glu Met Phe Gly Val Pro Trp Pro Glu Asp Met Glu Cys Ser
115 120 125

Arg Phe Pro Asp Cys Asp Glu Pro Tyr Pro Arg Leu Val
130 135 140

<210> 38
<211> 166
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

Met Ala Trp Arg Gly Ala Gly Pro Ser Val Pro Gly Ala Pro Gly Gly
1 5 10 15

Val Gly Leu Ser Leu Gly Leu Leu Leu Gln Leu Leu Leu Leu Leu Gly
20 25 30

Pro Ala Arg Gly Phe Gly Asp Glu Glu Glu Arg Arg Cys Asp Pro Ile
35 40 45

Arg Ile Ser Met Cys Gln Asn Leu Gly Tyr Asn Val Thr Lys Met Pro
50 55 60

Asn Leu Val Gly His Glu Leu Gln Thr Asp Ala Glu Leu Gln Leu Thr
65 70 75 80

Thr Phe Thr Pro Leu Ile Gln Tyr Gly Cys Ser Ser Gln Leu Gln Phe
85 90 95

Phe Leu Cys Ser Val Tyr Val Pro Met Cys Thr Glu Lys Ile Asn Ile
100 105 110

Pro Ile Gly Pro Cys Gly Gly Met Cys Leu Ser Val Lys Arg Arg Cys
115 120 125

Glu Pro Val Leu Lys Glu Phe Gly Phe Ala Trp Pro Glu Ser Leu Asn
130 135 140

Cys Ser Lys Phe Pro Pro Gln Asn Asp His Asn His Met Cys Met Glu
145 150 155 160

Gly Pro Gly Asp Glu Glu
165

<210> 39
<211> 155
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Met Ala Arg Pro Asp Pro Ser Ala Pro Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Gln Leu Val Gly Arg Ala Ala Ala Ala Ser Lys Ala Pro Val
20 25 30

Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Met Cys Arg Gly Ile Gly Tyr Asn Leu
35 40 45

Thr His Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu Ala Gly
50 55 60

Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys Ser Pro
65 70 75 80

Asp Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr Pro Ile Cys Leu Pro
85 90 95

Asp Tyr His Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu Arg Ala
100 105 110

Lys Ala Gly Cys Ser Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala Trp Pro
115 120 125

Glu Arg Met Ser Cys Asp Arg Leu Pro Val Leu Gly Arg Asp Ala Glu
130 135 140

Val Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Ser Glu Ala
145 150 155

<210> 40
<211> 137
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Met Glu Met Phe Thr Phe Leu Leu Thr Cys Ile Phe Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15

Arg Gly His Ser Leu Phe Thr Cys Glu Pro Ile Thr Val Pro Arg Cys
20 25 30

Met Lys Met Ala Tyr Asn Met Thr Phe Phe Pro Asn Leu Met Gly His

35 40 45

Tyr Asp Gln Ser Ile Ala Ala Val Glu Met Glu His Phe Leu Pro Leu
50 55 60

Ala Asn Leu Glu Cys Ser Pro Asn Ile Glu Thr Phe Leu Cys Lys Ala
65 70 75 80

Phe Val Pro Thr Cys Ile Glu Gln Ile His Val Val Pro Pro Cys Arg
85 90 95

Lys Leu Cys Glu Lys Val Tyr Ser Asp Cys Lys Lys Leu Ile Asp Thr
100 105 110

Phe Gly Ile Arg Trp Pro Glu Glu Leu Glu Cys Asp Arg Leu Gln Tyr
115 120 125

Cys Asp Glu Thr Val Pro Val Thr Phe
130 135

<210> 41
<211> 168
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Met Arg Asp Pro Gly Ala Ala Ala Pro Leu Ser Ser Leu Gly Leu Cys
1 5 10 15

Ala Leu Val Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu Ser Ala Gly Ala Gly Ala
20 25 30

Gln Pro Tyr His Gly Glu Lys Gly Ile Ser Val Pro Asp His Gly Phe
35 40 45

Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln
50 55 60

Thr Ile Leu Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly
65 70 75 80

Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser Pro
85 90 95

Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val
100 105 110

Leu Asp Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg
115 120 125

Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu
130 135 140

Arg Leu Arg Cys Glu Asn Phe Pro Val His Gly Ala Gly Glu Ile Cys
145 150 155 160

Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Gly
165

<210> 42
<211> 156
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

```
Met Glu Trp Gly Tyr Leu Leu Glu Val Thr Ser Leu Leu Ala Ala Leu
1               5                  10                  15

Ala Leu Leu Gln Arg Ser Ser Gly Ala Ala Ala Ala Ser Ala Lys Glu
            20                  25                  30

Leu Ala Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Leu Cys Lys Gly Ile Gly Tyr
        35                  40                  45

Asn Tyr Thr Tyr Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu
    50                  55                  60

Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys
65                  70                  75                  80

Ser Pro Asp Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr Pro Ile Cys
                85                  90                  95

Leu Glu Asp Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu
            100                 105                 110

Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala
        115                 120                 125

Trp Pro Asp Arg Met Arg Cys Asp Arg Leu Pro Glu Gln Gly Asn Pro
    130                 135                 140

Asp Thr Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Thr Asp Leu
145                 150                 155
```

<210> 43
<211> 160
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

```
Met Ala Val Ala Pro Leu Arg Gly Ala Leu Leu Leu Trp Gln Leu Leu
1               5                  10                  15

Ala Ala Gly Gly Ala Ala Leu Glu Ile Gly Arg Phe Asp Pro Glu Arg
            20                  25                  30

Gly Arg Gly Ala Ala Pro Cys Gln Ala Val Glu Ile Pro Met Cys Arg
        35                  40                  45

Gly Ile Gly Tyr Asn Leu Thr Arg Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr
    50                  55                  60

Ser Gln Gly Glu Ala Ala Ala Glu Leu Ala Glu Phe Ala Pro Leu Val
65                  70                  75                  80

Gln Tyr Gly Cys His Ser His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr
                85                  90                  95

Ala Pro Met Cys Thr Asp Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg
            100                 105                 110

Pro Met Cys Glu Gln Ala Arg Leu Arg Cys Ala Pro Ile Met Glu Gln
        115                 120                 125

Phe Asn Phe Gly Trp Pro Asp Ser Leu Asp Cys Ala Arg Leu Pro Thr
    130                 135                 140
```

Arg Asn Asp Pro His Ala Leu Cys Met Glu Ala Pro Glu Asn Ala Thr
145 150 155 160

<210> 44
<211> 155
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Met Gln Arg Pro Gly Pro Arg Leu Trp Leu Val Leu Gln Val Met Gly
1 5 10 15

Ser Cys Ala Ala Ile Ser Ser Met Asp Met Glu Arg Pro Gly Asp Gly
20 25 30

Lys Cys Gln Pro Ile Glu Ile Pro Met Cys Lys Asp Ile Gly Tyr Asn
35 40 45

Met Thr Arg Met Pro Asn Leu Met Gly His Glu Asn Gln Arg Glu Ala
50 55 60

Ala Ile Gln Leu His Glu Phe Ala Pro Leu Val Glu Tyr Gly Cys His
65 70 75 80

Gly His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met Cys Thr
85 90 95

Glu Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Val Met Cys Glu Gln
100 105 110

Ala Arg Leu Lys Cys Ser Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe Lys Trp
115 120 125

Pro Asp Ser Leu Asp Cys Arg Lys Leu Pro Asn Lys Asn Asp Pro Asn
130 135 140

Tyr Leu Cys Met Glu Ala Pro Asn Asn Gly Ser
145 150 155

<210> 45
<211> 174
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

Met Gly Ile Gly Arg Ser Glu Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gly
1 5 10 15

Val Leu Leu Ala Leu Gly Ala Ala Leu Leu Ala Val Gly Ser Ala Ser
20 25 30

Glu Tyr Asp Tyr Val Ser Phe Gln Ser Asp Ile Gly Pro Tyr Gln Ser
35 40 45

Gly Arg Phe Tyr Thr Lys Pro Pro Gln Cys Val Asp Ile Pro Ala Asp
50 55 60

Leu Arg Leu Cys His Asn Val Gly Tyr Lys Lys Met Val Leu Pro Asn
65 70 75 80

Leu Leu Glu His Glu Thr Met Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser
85 90 95

Trp Val Pro Leu Leu Asn Lys Asn Cys His Ala Gly Thr Gln Val Phe
100 105 110

Leu Cys Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro
115 120 125

Cys Arg Trp Leu Cys Glu Ala Val Arg Asp Ser Cys Glu Pro Val Met
130 135 140

Gln Phe Phe Gly Phe Tyr Trp Pro Glu Met Leu Lys Cys Asp Lys Phe
145 150 155 160

Pro Glu Gly Asp Val Cys Ile Ala Met Thr Pro Pro Asn Ala
165 170

<210> 46
<211> 160
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

Met Leu Gln Gly Pro Gly Ser Leu Leu Leu Leu Phe Leu Ala Ser His
1 5 10 15

Cys Cys Leu Gly Ser Ala Arg Gly Leu Phe Leu Phe Gly Gln Pro Asp
20 25 30

Phe Ser Tyr Lys Arg Ser Asn Cys Lys Pro Ile Pro Ala Asn Leu Gln
35 40 45

Leu Cys His Gly Ile Glu Tyr Gln Asn Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu
50 55 60

Gly His Glu Thr Met Lys Glu Val Leu Glu Gln Ala Gly Ala Trp Ile
65 70 75 80

Pro Leu Val Met Lys Gln Cys His Pro Asp Thr Lys Lys Phe Leu Cys
85 90 95

Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Asp Leu Asp Glu Thr Ile Gln
100 105 110

Pro Cys His Ser Leu Cys Val Gln Val Lys Asp Arg Cys Ala Pro Val
115 120 125

Met Ser Ala Phe Gly Phe Pro Trp Pro Asp Met Leu Glu Cys Asp Arg
130 135 140

Phe Pro Gln Asp Asn Asp Leu Cys Ile Pro Leu Ala Ser Ser Asp His
145 150 155 160

<210> 47
<211> 155
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

Met Val Cys Gly Ser Pro Gly Gly Met Leu Leu Leu Arg Ala Gly Leu
1 5 10 15

Leu Ala Leu Ala Ala Leu Cys Leu Leu Arg Val Pro Gly Ala Arg Ala
20 25 30

Ala Ala Cys Glu Pro Val Arg Ile Pro Leu Cys Lys Ser Leu Pro Trp
35 40 45

Asn Met Thr Lys Met Pro Asn His Leu His His Ser Thr Gln Ala Asn
50 55 60

Ala Ile Leu Ala Ile Glu Gln Phe Glu Gly Leu Leu Gly Thr His Cys
65 70 75 80

Ser Pro Asp Leu Leu Phe Phe Leu Cys Ala Met Tyr Ala Pro Ile Cys
85 90 95

Thr Ile Asp Phe Gln His Glu Pro Ile Lys Pro Cys Lys Ser Val Cys
100 105 110

Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Pro Ile Leu Ile Lys Tyr Arg His
115 120 125

Ser Trp Pro Glu Asn Leu Ala Cys Glu Glu Leu Pro Val Tyr Asp Arg
130 135 140

Gly Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr
145 150 155

<210> 48
<211> 144
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

Met Phe Leu Ser Ile Leu Val Ala Leu Cys Leu Trp Leu His Leu Ala
1 5 10 15

Leu Gly Val Arg Gly Ala Pro Cys Glu Ala Val Arg Ile Pro Met Cys
20 25 30

Arg His Met Pro Trp Asn Ile Thr Arg Met Pro Asn His Leu His His
35 40 45

Ser Thr Gln Glu Asn Ala Ile Leu Ala Ile Glu Gln Tyr Glu Glu Leu
50 55 60

Val Asp Val Asn Cys Ser Ala Val Leu Arg Phe Phe Phe Cys Ala Met
65 70 75 80

Tyr Ala Pro Ile Cys Thr Leu Glu Phe Leu His Asp Pro Ile Lys Pro
85 90 95

Cys Lys Ser Val Cys Gln Arg Ala Arg Asp Asp Cys Glu Pro Leu Met
100 105 110

Lys Met Tyr Asn His Ser Trp Pro Glu Ser Leu Ala Cys Asp Glu Leu
115 120 125

Pro Val Tyr Asp Arg Gly Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr
130 135 140

<210> 49
<211> 170
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

Met Arg Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Val Arg Thr Ala Ala Leu Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Ala Leu His Trp Ala Pro Ala Arg Cys Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Tyr Tyr Gly Trp Gln Ala Glu Pro Leu His Gly Arg Ser Tyr Ser
35 40 45

Lys Pro Pro Gln Cys Leu Asp Ile Pro Ala Asp Leu Pro Leu Cys His
50 55 60

Thr Val Gly Tyr Lys Arg Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu Glu His Glu
65 70 75 80

Ser Leu Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser Trp Leu Pro Leu Leu
85 90 95

Ala Lys Arg Cys His Ser Asp Thr Gln Val Phe Leu Cys Ser Leu Phe
100 105 110

Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro Cys Arg Ser Leu Cys
115 120 125

Glu Ala Val Arg Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Glu Ala Tyr Gly Phe
130 135 140

Pro Trp Pro Glu Met Leu His Cys His Lys Phe Pro Leu Asp Asn Asp
145 150 155 160

Leu Cys Ile Ala Val Gln Phe Gly His Leu
165 170

<210> 50
<211> 163
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

Gln Ala Ala Gly Gln Gly Pro Gly Gln Gly Pro Gly Pro Gly Gln Gln
1 5 10 15

Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gln Gln Gln Ser Gly Gln Gln Tyr Asn Gly
20 25 30

Glu Arg Gly Ile Ser Val Pro Asp His Gly Tyr Cys Gln Pro Ile Ser
35 40 45

Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln Thr Ile Met Pro Asn
50 55 60

Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln
65 70 75 80

Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser Ala Glu Leu Lys Phe Phe
85 90 95

Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val Leu Glu Gln Ala Leu
100 105 110

Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala
115 120 125

Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Asp Thr Leu Lys Cys Glu
130 135 140

Lys Phe Pro Val His Gly Ala Gly Glu Leu Cys Val Gly Gln Asn Thr
145 150 155 160

Ser Asp Lys

<210> 51
<211> 136
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51

Ala Gln Phe His Gly Glu Lys Gly Ile Ser Ile Pro Asp His Gly Phe
1 5 10 15

Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln
20 25 30

Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly
35 40 45

Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser Pro
50 55 60

Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val
65 70 75 80

Leu Glu Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser Ile Cys Glu Ser Ala Arg
85 90 95

Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu
100 105 110

Arg Leu Arg Cys Glu His Phe Pro Arg His Gly Ala Glu Gln Ile Cys
115 120 125

Val Gly Gln Asn His Ser Glu Asp
130 135

<210> 52
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52

His Ser Leu Phe Ser Cys Glu Pro Ile Thr Leu Arg Met Cys Gln Asp
1 5 10 15

Leu Pro Tyr Asn Thr Thr Phe Met Pro Asn Leu Leu Asn His Tyr Asp
20 25 30

Gln Gln Thr Ala Ala Leu Ala Met Glu Pro Phe His Pro Met Val Asn
35 40 45

Leu Asp Cys Ser Arg Asp Phe Arg Pro Phe Leu Cys Ala Leu Tyr Ala
50 55 60

Pro Ile Cys Met Glu Tyr Gly Arg Val Thr Leu Pro Cys Arg Arg Leu
65 70 75 80

Cys Gln Arg Ala Tyr Ser Glu Cys Ser Lys Leu Met Glu Met Phe Gly
85 90 95

Val Pro Trp Pro Glu Asp Met Glu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Cys Asp
100 105 110

Glu Pro Tyr Pro Arg Leu Val

115

<210> 53
<211> 130
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

Phe Gly Asp Glu Glu Glu Arg Arg Cys Asp Pro Ile Arg Ile Ser Met
1 5 10 15

Cys Gln Asn Leu Gly Tyr Asn Val Thr Lys Met Pro Asn Leu Val Gly
20 25 30

His Glu Leu Gln Thr Asp Ala Glu Leu Gln Leu Thr Thr Phe Thr Pro
35 40 45

Leu Ile Gln Tyr Gly Cys Ser Ser Gln Leu Gln Phe Phe Leu Cys Ser
50 55 60

Val Tyr Val Pro Met Cys Thr Glu Lys Ile Asn Ile Pro Ile Gly Pro
65 70 75 80

Cys Gly Gly Met Cys Leu Ser Val Lys Arg Arg Cys Glu Pro Val Leu
85 90 95

Lys Glu Phe Gly Phe Ala Trp Pro Glu Ser Leu Asn Cys Ser Lys Phe
100 105 110

Pro Pro Gln Asn Asp His Asn His Met Cys Met Glu Gly Pro Gly Asp
115 120 125

Glu Glu
130

<210> 54
<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

Ala Ser Lys Ala Pro Val Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Met Cys Arg
1 5 10 15

Gly Ile Gly Tyr Asn Leu Thr His Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp
20 25 30

Thr Gln Asp Glu Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val
35 40 45

Glu Ile Gln Cys Ser Pro Asp Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr
50 55 60

Thr Pro Ile Cys Leu Pro Asp Tyr His Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg
65 70 75 80

Ser Val Cys Glu Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ser Pro Leu Met Arg Gln
85 90 95

Tyr Gly Phe Ala Trp Pro Glu Arg Met Ser Cys Asp Arg Leu Pro Val
100 105 110

Leu Gly Arg Asp Ala Glu Val Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Ser Glu
115 120 125

Ala

<210> 55
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55

His Ser Leu Phe Thr Cys Glu Pro Ile Thr Val Pro Arg Cys Met Lys
1 5 10 15

Met Ala Tyr Asn Met Thr Phe Phe Pro Asn Leu Met Gly His Tyr Asp
20 25 30

Gln Ser Ile Ala Ala Val Glu Met Glu His Phe Leu Pro Leu Ala Asn
35 40 45

Leu Glu Cys Ser Pro Asn Ile Glu Thr Phe Leu Cys Lys Ala Phe Val
50 55 60

Pro Thr Cys Ile Glu Gln Ile His Val Val Pro Pro Cys Arg Lys Leu
65 70 75 80

Cys Glu Lys Val Tyr Ser Asp Cys Lys Lys Leu Ile Asp Thr Phe Gly
85 90 95

Ile Arg Trp Pro Glu Glu Leu Glu Cys Asp Arg Leu Gln Tyr Cys Asp
100 105 110

Glu Thr Val Pro Val Thr Phe
115

<210> 56
<211> 136
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

Gln Pro Tyr His Gly Glu Lys Gly Ile Ser Val Pro Asp His Gly Phe
1 5 10 15

Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln
20 25 30

Thr Ile Leu Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly
35 40 45

Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser Pro
50 55 60

Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val
65 70 75 80

Leu Asp Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg
85 90 95

Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu
100 105 110

Arg Leu Arg Cys Glu Asn Phe Pro Val His Gly Ala Gly Glu Ile Cys
115 120 125

Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Gly

130 135

<210> 57
<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

Ala Ser Ala Lys Glu Leu Ala Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Leu Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ile Gly Tyr Asn Tyr Thr Tyr Met Pro Asn Gln Phe Asn His
20 25 30

Asp Thr Gln Asp Glu Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu
35 40 45

Val Glu Ile Gln Cys Ser Pro Asp Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met
50 55 60

Tyr Thr Pro Ile Cys Leu Glu Asp Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Cys
65 70 75 80

Arg Ser Val Cys Glu Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Arg
85 90 95

Gln Tyr Gly Phe Ala Trp Pro Asp Arg Met Arg Cys Asp Arg Leu Pro
100 105 110

Glu Gln Gly Asn Pro Asp Thr Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Thr Asp
115 120 125

Leu

<210> 58
<211> 139
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58

Ala Leu Glu Ile Gly Arg Phe Asp Pro Glu Arg Gly Arg Gly Ala Ala
1 5 10 15

Pro Cys Gln Ala Val Glu Ile Pro Met Cys Arg Gly Ile Gly Tyr Asn
20 25 30

Leu Thr Arg Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Ser Gln Gly Glu Ala
35 40 45

Ala Ala Glu Leu Ala Glu Phe Ala Pro Leu Val Gln Tyr Gly Cys His
50 55 60

Ser His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met Cys Thr
65 70 75 80

Asp Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Pro Met Cys Glu Gln
85 90 95

Ala Arg Leu Arg Cys Ala Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe Gly Trp
100 105 110

Pro Asp Ser Leu Asp Cys Ala Arg Leu Pro Thr Arg Asn Asp Pro His
115 120 125

Ala Leu Cys Met Glu Ala Pro Glu Asn Ala Thr
130 135

<210> 59
<211> 135
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

Ile Ser Ser Met Asp Met Glu Arg Pro Gly Asp Gly Lys Cys Gln Pro
1 5 10 15

Ile Glu Ile Pro Met Cys Lys Asp Ile Gly Tyr Asn Met Thr Arg Met
20 25 30

Pro Asn Leu Met Gly His Glu Asn Gln Arg Glu Ala Ala Ile Gln Leu
35 40 45

His Glu Phe Ala Pro Leu Val Glu Tyr Gly Cys His Gly His Leu Arg
50 55 60

Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met Cys Thr Glu Gln Val Ser
65 70 75 80

Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Val Met Cys Glu Gln Ala Arg Leu Lys
85 90 95

Cys Ser Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe Lys Trp Pro Asp Ser Leu
100 105 110

Asp Cys Arg Lys Leu Pro Asn Lys Asn Asp Pro Asn Tyr Leu Cys Met
115 120 125

Glu Ala Pro Asn Asn Gly Ser
130 135

<210> 60
<211> 144
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

Ala Ser Glu Tyr Asp Tyr Val Ser Phe Gln Ser Asp Ile Gly Pro Tyr
1 5 10 15

Gln Ser Gly Arg Phe Tyr Thr Lys Pro Pro Gln Cys Val Asp Ile Pro
20 25 30

Ala Asp Leu Arg Leu Cys His Asn Val Gly Tyr Lys Lys Met Val Leu
35 40 45

Pro Asn Leu Leu Glu His Glu Thr Met Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala
50 55 60

Ser Ser Trp Val Pro Leu Leu Asn Lys Asn Cys His Ala Gly Thr Gln
65 70 75 80

Val Phe Leu Cys Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile
85 90 95

Tyr Pro Cys Arg Trp Leu Cys Glu Ala Val Arg Asp Ser Cys Glu Pro
100 105 110

Val Met Gln Phe Phe Gly Phe Tyr Trp Pro Glu Met Leu Lys Cys Asp

115 120 125

Lys Phe Pro Glu Gly Asp Val Cys Ile Ala Met Thr Pro Pro Asn Ala
130 135 140

<210> 61
<211> 142
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

Leu Gly Ser Ala Arg Gly Leu Phe Leu Phe Gly Gln Pro Asp Phe Ser
1 5 10 15

Tyr Lys Arg Ser Asn Cys Lys Pro Ile Pro Ala Asn Leu Gln Leu Cys
20 25 30

His Gly Ile Glu Tyr Gln Asn Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu Gly His
35 40 45

Glu Thr Met Lys Glu Val Leu Glu Gln Ala Gly Ala Trp Ile Pro Leu
50 55 60

Val Met Lys Gln Cys His Pro Asp Thr Lys Lys Phe Leu Cys Ser Leu
65 70 75 80

Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Asp Leu Asp Glu Thr Ile Gln Pro Cys
85 90 95

His Ser Leu Cys Val Gln Val Lys Asp Arg Cys Ala Pro Val Met Ser
100 105 110

Ala Phe Gly Phe Pro Trp Pro Asp Met Leu Glu Cys Asp Arg Phe Pro
115 120 125

Gln Asp Asn Asp Leu Cys Ile Pro Leu Ala Ser Ser Asp His
130 135 140

<210> 62
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62

Ala Ala Cys Glu Pro Val Arg Ile Pro Leu Cys Lys Ser Leu Pro Trp
1 5 10 15

Asn Met Thr Lys Met Pro Asn His Leu His His Ser Thr Gln Ala Asn
20 25 30

Ala Ile Leu Ala Ile Glu Gln Phe Glu Gly Leu Leu Gly Thr His Cys
35 40 45

Ser Pro Asp Leu Leu Phe Phe Leu Cys Ala Met Tyr Ala Pro Ile Cys
50 55 60

Thr Ile Asp Phe Gln His Glu Pro Ile Lys Pro Cys Lys Ser Val Cys
65 70 75 80

Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Pro Ile Leu Ile Lys Tyr Arg His
85 90 95

Ser Trp Pro Glu Asn Leu Ala Cys Glu Glu Leu Pro Val Tyr Asp Arg
100 105 110

Gly Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr
115 120

<210> 63
<211> 126
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63

Val Arg Gly Ala Pro Cys Glu Ala Val Arg Ile Pro Met Cys Arg His
1 5 10 15

Met Pro Trp Asn Ile Thr Arg Met Pro Asn His Leu His His Ser Thr
20 25 30

Gln Glu Asn Ala Ile Leu Ala Ile Glu Gln Tyr Glu Glu Leu Val Asp
35 40 45

Val Asn Cys Ser Ala Val Leu Arg Phe Phe Phe Cys Ala Met Tyr Ala
50 55 60

Pro Ile Cys Thr Leu Glu Phe Leu His Asp Pro Ile Lys Pro Cys Lys
65 70 75 80

Ser Val Cys Gln Arg Ala Arg Asp Asp Cys Glu Pro Leu Met Lys Met
85 90 95

Tyr Asn His Ser Trp Pro Glu Ser Leu Ala Cys Asp Glu Leu Pro Val
100 105 110

Tyr Asp Arg Gly Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr
115 120 125

<210> 64
<211> 143
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64

Arg Cys Glu Glu Tyr Asp Tyr Tyr Gly Trp Gln Ala Glu Pro Leu His
1 5 10 15

Gly Arg Ser Tyr Ser Lys Pro Pro Gln Cys Leu Asp Ile Pro Ala Asp
20 25 30

Leu Pro Leu Cys His Thr Val Gly Tyr Lys Arg Met Arg Leu Pro Asn
35 40 45

Leu Leu Glu His Glu Ser Leu Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser
50 55 60

Trp Leu Pro Leu Leu Ala Lys Arg Cys His Ser Asp Thr Gln Val Phe
65 70 75 80

Leu Cys Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro
85 90 95

Cys Arg Ser Leu Cys Glu Ala Val Arg Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met
100 105 110

Glu Ala Tyr Gly Phe Pro Trp Pro Glu Met Leu His Cys His Lys Phe
115 120 125

Pro Leu Asp Asn Asp Leu Cys Ile Ala Val Gln Phe Gly His Leu

130 135 140

<210> 65
<211> 162
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

Thr Gly Val Leu Phe Val Lys Phe Gly Pro Pro Pro Thr Ala Ser Pro
1 5 10 15

Gly Tyr Ser Asp Glu Tyr Glu Glu Asp Gly Phe Cys Gln Pro Tyr Arg
20 25 30

Gly Ile Ala Cys Ala Arg Phe Ile Gly Asn Arg Thr Val Tyr Met Glu
35 40 45

Ser Leu His Met Gln Gly Glu Ile Glu Asn Gln Ile Thr Ala Ala Phe
50 55 60

Thr Met Ile Gly Thr Ser Ser His Leu Ser Asp Lys Cys Ser Gln Phe
65 70 75 80

Ala Ile Pro Ser Leu Cys His Tyr Ala Phe Pro Tyr Cys Asp Glu Thr
85 90 95

Ser Ser Val Pro Lys Pro Arg Asp Leu Cys Arg Asp Glu Cys Glu Ile
100 105 110

Leu Glu Asn Val Leu Cys Gln Thr Glu Tyr Ile Phe Ala Arg Ser Asn
115 120 125

Pro Met Ile Leu Met Arg Leu Lys Leu Pro Asn Cys Glu Asp Leu Pro
130 135 140

Gln Pro Glu Ser Pro Glu Ala Ala Asn Cys Ile Arg Ile Gly Ile Pro
145 150 155 160

Met Ala

<210> 66
<211> 162
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66

Thr Gly Val Leu Phe Val Arg Leu Gly Pro Thr His Ser Pro Asn His
1 5 10 15

Asn Phe Gln Asp Asp Tyr His Glu Asp Gly Phe Cys Gln Pro Tyr Arg
20 25 30

Gly Ile Ala Cys Ala Arg Phe Ile Gly Asn Arg Thr Ile Tyr Val Asp
35 40 45

Ser Leu Gln Met Gln Gly Glu Ile Glu Asn Arg Ile Thr Ala Ala Phe
50 55 60

Thr Met Ile Gly Thr Ser Thr His Leu Ser Asp Gln Cys Ser Gln Phe
65 70 75 80

Ala Ile Pro Ser Phe Cys His Phe Val Phe Pro Leu Cys Asp Ala Arg
85 90 95

Ser Arg Thr Pro Lys Pro Arg Glu Leu Cys Arg Asp Glu Cys Glu Val
100 105 110

Leu Glu Ser Asp Leu Cys Arg Gln Glu Tyr Thr Ile Ala Arg Ser Asn
115 120 125

Pro Leu Ile Leu Met Arg Leu Gln Leu Pro Lys Cys Glu Ala Leu Pro
130 135 140

Met Pro Glu Ser Pro Asp Ala Ala Asn Cys Met Arg Ile Gly Ile Pro
145 150 155 160

Ala Glu

<210> 67
<211> 227
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 68
<211> 230
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

Asp Lys Ala Ala Arg Ser Thr Leu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
1 5 10 15

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
20 25 30

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
35 40 45

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
50 55 60

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
85 90 95

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
100 105 110

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
115 120 125

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
130 135 140

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
145 150 155 160

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
165 170 175

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
180 185 190

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
195 200 205

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
210 215 220

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 69
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Conector de péptido

<400> 69

Glu Ser Gly Gly Gly Gly Val Thr
1 5

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Conector de péptido

<400> 70

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Gly Val Thr
1 5

<210> 71
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Conector de péptido

<400> 71

Gly Arg Ala Gln Val Thr
1 5

<210> 72
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Conector de péptido

<400> 72

Trp Arg Ala Gln Val Thr
1 5

<210> 73
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Conector de péptido

<400> 73

Ala Arg Gly Arg Ala Gln Val Thr
1 5

<210> 74
<211> 391
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína quimérica Frz8-Fc

<400> 74

Met Glu Trp Gly Tyr Leu Leu Glu Val Thr Ser Leu Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15

Ala Val Leu Gln Arg Ser Ser Gly Ala Ala Ala Ala Ser Ala Lys Glu
20 25 30

Leu Ala Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Leu Cys Lys Gly Ile Gly Tyr
35 40 45

Asn Tyr Thr Tyr Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu
50 55 60

Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys

65 70 75 80

Ser Pro Asp Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr Pro Ile Cys
85 90 95

Leu Glu Asp Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu
100 105 110

Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala
115 120 125

Trp Pro Asp Arg Met Arg Cys Asp Arg Leu Pro Glu Gln Gly Asn Pro
130 135 140

Asp Thr Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Thr Asp Leu Glu Ser Gly Gly
145 150 155 160

Gly Gly Val Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
165 170 175

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
180 185 190

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
195 200 205

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
210 215 220

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
225 230 235 240

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
245 250 255

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
260 265 270

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
275 280 285

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
290 295 300

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
305 310 315 320

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
325 330 335

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
340 345 350

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
355 360 365

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
370 375 380

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385 390

<210> 75

<211> 396
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína quimérica Frz5-Fc

<400> 75

Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
1 5 10 15

Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Ile Asp Ala Arg Gly Ala
20 25 30

Ser Lys Ala Pro Val Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Met Cys Arg Gly
35 40 45

Ile Gly Tyr Asn Leu Thr His Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr
50 55 60

Gln Asp Glu Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu
65 70 75 80

Ile Gln Cys Ser Pro Asp Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr
85 90 95

Pro Ile Cys Leu Pro Asp Tyr His Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser
100 105 110

Val Cys Glu Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ser Pro Leu Met Arg Gln Tyr
115 120 125

Gly Phe Ala Trp Pro Glu Arg Met Ser Cys Asp Arg Leu Pro Val Leu
130 135 140

Gly Arg Asp Ala Glu Val Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Ser Glu Ala
145 150 155 160

Gly Arg Ala Gln Val Thr Asp Lys Ala Ala Arg Ser Thr Leu Cys Pro
165 170 175

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
180 185 190

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
195 200 205

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
210 215 220

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
225 230 235 240

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
245 250 255

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
260 265 270

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
275 280 285

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
290 295 300

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
305 310 315 320

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
325 330 335

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
340 345 350

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
355 360 365

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
370 375 380

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385 390 395

<210> 76
<211> 470
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína quimérica Frz1-Fc

<400> 76

Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
1 5 10 15

Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Ile Asp Glu Glu Gly Ser
20 25 30

Gly Asp Ala Gly Gly Arg Arg Arg Pro Pro Val Asp Pro Arg Arg Leu
35 40 45

Ala Arg Gln Leu Leu Leu Leu Leu Trp Leu Leu Glu Ala Pro Leu Leu
50 55 60

Leu Gly Val Arg Ala Gln Ala Ala Gly Gln Gly Pro Gly Gln Gly Pro
65 70 75 80

Gly Pro Gly Gln Gln Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gln Gln Gln Ser Gly
85 90 95

Gln Gln Tyr Asn Gly Glu Arg Gly Ile Ser Val Pro Asp His Gly Tyr
100 105 110

Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln
115 120 125

Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly
130 135 140

Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser Ala
145 150 155 160

Glu Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val
165 170 175

Leu Glu Gln Ala Leu Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg
180 185 190

Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Asp

195 200 205

Thr Leu Lys Cys Glu Lys Phe Pro Val His Gly Ala Gly Glu Leu Cys
210 215 220

Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Lys Ala Arg Gly Arg Ala Gln Val Thr
225 230 235 240

Asp Lys Ala Ala Arg Ser Thr Leu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 77
<211> 403
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína quimérica Frz2-Fc

<400> 77

Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
1 5 10 15

Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Ile Asp Ala Arg Gly Ala
20 25 30

Gln Phe His Gly Glu Lys Gly Ile Ser Ile Pro Asp His Gly Phe Cys
35 40 45

Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln Thr
50 55 60

Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly Leu
65 70 75 80

Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser Pro Glu
85 90 95

Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val Leu
100 105 110

Glu Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser Ile Cys Glu Arg Ala Arg Gln
115 120 125

Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu Arg
130 135 140

Leu Arg Cys Glu His Phe Pro Arg His Gly Ala Glu Gln Ile Cys Val
145 150 155 160

Gly Gln Asn His Ser Glu Asp Gly Arg Ala Gln Val Thr Asp Lys Ala
165 170 175

Ala Arg Ser Thr Leu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
180 185 190

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
195 200 205

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
210 215 220

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
225 230 235 240

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
245 250 255

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
260 265 270

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
275 280 285

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
290 295 300

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
305 310 315 320

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
325 330 335

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
340 345 350

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
355 360 365

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
370 375 380

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
385 390 395 400

Pro Gly Lys

<210> 78
<211> 388
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína quimérica Frz3-Fc

<400> 78

Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
1 5 10 15

Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Ile Asp Ala Arg Gly His
20 25 30

Ser Leu Phe Ser Cys Glu Pro Ile Thr Leu Arg Met Cys Gln Asp Leu
35 40 45

Pro Tyr Asn Thr Thr Phe Met Pro Asn Leu Leu Asn His Tyr Asp Gln
50 55 60

Gln Thr Ala Ala Leu Ala Met Glu Pro Phe His Pro Met Val Asn Leu
65 70 75 80

Asp Cys Ser Arg Asp Phe Arg Pro Phe Leu Cys Ala Leu Tyr Ala Pro
85 90 95

Ile Cys Met Glu Tyr Gly Arg Val Thr Leu Pro Cys Arg Arg Leu Cys
100 105 110

Gln Arg Ala Tyr Ser Glu Cys Ser Lys Leu Met Glu Met Phe Gly Val
115 120 125

Pro Trp Pro Glu Asp Met Glu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Cys Asp Glu
130 135 140

Pro Tyr Pro Arg Leu Val Asp Leu Gly Arg Ala Gln Val Thr Asp Lys
145 150 155 160

Ala Ala Arg Ser Thr Leu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
165 170 175

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
180 185 190

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
195 200 205

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
210 215 220

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

225 230 235 240

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
245 250 255

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
260 265 270

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
275 280 285

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
290 295 300

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
305 310 315 320

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
325 330 335

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
340 345 350

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
355 360 365

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
370 375 380

Ser Pro Gly Lys
385

<210> 79
<211> 397
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína quimérica Frz4-Fc

<400> 79

Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
1 5 10 15

Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Ile Asp Ala Arg Gly Phe
20 25 30

Gly Asp Glu Glu Glu Arg Arg Cys Asp Pro Ile Arg Ile Ser Met Cys
35 40 45

Gln Asn Leu Gly Tyr Asn Val Thr Lys Met Pro Asn Leu Val Gly His
50 55 60

Glu Leu Gln Thr Asp Ala Glu Leu Gln Leu Thr Thr Phe Thr Pro Leu
65 70 75 80

Ile Gln Tyr Gly Cys Ser Ser Gln Leu Gln Phe Phe Leu Cys Ser Val
85 90 95

Tyr Val Pro Met Cys Thr Glu Lys Ile Asn Ile Pro Ile Gly Pro Cys
100 105 110

Gly Gly Met Cys Leu Ser Val Lys Arg Arg Cys Glu Pro Val Leu Lys
115 120 125

Glu Phe Gly Phe Ala Trp Pro Glu Ser Leu Asn Cys Ser Lys Phe Pro
130 135 140

Pro Gln Asn Asp His Asn His Met Cys Met Glu Gly Pro Gly Asp Glu
145 150 155 160

Glu Gly Arg Ala Gln Val Thr Asp Lys Ala Ala Arg Ser Thr Leu Cys
165 170 175

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
180 185 190

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
195 200 205

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
210 215 220

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
225 230 235 240

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
245 250 255

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
260 265 270

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
275 280 285

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
290 295 300

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
305 310 315 320

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
325 330 335

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
340 345 350

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
355 360 365

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
370 375 380

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385 390 395

<210> 80
<211> 373
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína quimérica Frz4-Fc

<400> 80

Met Glu Met Phe Thr Phe Leu Leu Thr Cys Ile Phe Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15

Arg Gly His Ser Leu Phe Thr Cys Glu Pro Ile Thr Val Pro Arg Cys

20 25 30

Met Lys Met Ala Tyr Asn Met Thr Phe Phe Pro Asn Leu Met Gly His
35 40 45

Tyr Asp Gln Ser Ile Ala Ala Val Glu Met Glu His Phe Leu Pro Leu
50 55 60

Ala Asn Leu Glu Cys Ser Pro Asn Ile Glu Thr Phe Leu Cys Lys Ala
65 70 75 80

Phe Val Pro Thr Cys Ile Glu Gln Ile His Val Val Pro Pro Cys Arg
85 90 95

Lys Leu Cys Glu Lys Val Tyr Ser Asp Cys Lys Lys Leu Ile Asp Thr
100 105 110

Phe Gly Ile Arg Trp Pro Glu Glu Leu Glu Cys Asp Arg Leu Gln Tyr
115 120 125

Cys Asp Glu Thr Val Pro Val Thr Phe Leu Glu Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Val Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
145 150 155 160

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
165 170 175

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
180 185 190

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
195 200 205

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
210 215 220

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
225 230 235 240

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
245 250 255

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
260 265 270

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
275 280 285

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
290 295 300

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
305 310 315 320

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
325 330 335

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
340 345 350

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

355 360 365

Leu Ser Pro Gly Lys
370

<210> 81
<211> 404
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína quimérica Frz7-Fc

<400> 81

Met Arg Asp Pro Gly Ala Ala Ala Pro Leu Ser Ser Leu Gly Leu Cys
1 5 10 15

Ala Leu Val Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu Ser Ala Gly Ala Gly Ala
20 25 30

Gln Pro Tyr His Gly Glu Lys Gly Ile Ser Val Pro Asp His Gly Phe
35 40 45

Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln
50 55 60

Thr Ile Leu Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly
65 70 75 80

Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser Pro
85 90 95

Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val
100 105 110

Leu Asp Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg
115 120 125

Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu
130 135 140

Arg Leu Arg Cys Glu Asn Phe Pro Val His Gly Ala Gly Glu Ile Cys
145 150 155 160

Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Gly Leu Glu Ser Gly Gly Gly Gly Val
165 170 175

Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
180 185 190

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
195 200 205

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
210 215 220

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
225 230 235 240

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
245 250 255

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
260 265 270

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
275 280 285

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
290 295 300

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
305 310 315 320

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
325 330 335

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
340 345 350

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
355 360 365

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
370 375 380

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
385 390 395 400

Ser Pro Gly Lys

<210> 82
<211> 396
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína quimérica Frz9-Fc

<400> 82

Met Ala Val Ala Pro Leu Arg Gly Ala Leu Leu Leu Trp Gln Leu Leu
1 5 10 15

Ala Ala Gly Gly Ala Ala Leu Glu Ile Gly Arg Phe Asp Pro Glu Arg
20 25 30

Gly Arg Gly Ala Ala Pro Cys Gln Ala Val Glu Ile Pro Met Cys Arg
35 40 45

Gly Ile Gly Tyr Asn Leu Thr Arg Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr
50 55 60

Ser Gln Gly Glu Ala Ala Ala Glu Leu Ala Glu Phe Ala Pro Leu Val
65 70 75 80

Gln Tyr Gly Cys His Ser His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr
85 90 95

Ala Pro Met Cys Thr Asp Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg
100 105 110

Pro Met Cys Glu Gln Ala Arg Leu Arg Cys Ala Pro Ile Met Glu Gln
115 120 125

Phe Asn Phe Gly Trp Pro Asp Ser Leu Asp Cys Ala Arg Leu Pro Thr
130 135 140

Arg Asn Asp Pro His Ala Leu Cys Met Glu Ala Pro Glu Asn Ala Thr

145 150 155 160

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Gly Val Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
165 170 175

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
180 185 190

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
195 200 205

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
210 215 220

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
225 230 235 240

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
245 250 255

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
260 265 270

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
275 280 285

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
290 295 300

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
305 310 315 320

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
325 330 335

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
340 345 350

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
355 360 365

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
370 375 380

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385 390 395

<210> 83
<211> 391
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína quimérica Frz10-Fc

<400> 83

Met Gln Arg Pro Gly Pro Arg Leu Trp Leu Val Leu Gln Val Met Gly
1 5 10 15

Ser Cys Ala Ala Ile Ser Ser Met Asp Met Glu Arg Pro Gly Asp Gly
20 25 30

Lys Cys Gln Pro Ile Glu Ile Pro Met Cys Lys Asp Ile Gly Tyr Asn
35 40 45

Met Thr Arg Met Pro Asn Leu Met Gly His Glu Asn Gln Arg Glu Ala
50 55 60

Ala Ile Gln Leu His Glu Phe Ala Pro Leu Val Glu Tyr Gly Cys His
65 70 75 80

Gly His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met Cys Thr
85 90 95

Glu Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Val Met Cys Glu Gln
100 105 110

Ala Arg Leu Lys Cys Ser Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe Lys Trp
115 120 125

Pro Asp Ser Leu Asp Cys Arg Lys Leu Pro Asn Lys Asn Asp Pro Asn
130 135 140

Tyr Leu Cys Met Glu Ala Pro Asn Asn Gly Ser Leu Glu Ser Gly Gly
145 150 155 160

Gly Gly Val Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
165 170 175

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
180 185 190

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
195 200 205

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
210 215 220

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
225 230 235 240

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
245 250 255

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
260 265 270

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
275 280 285

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
290 295 300

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
305 310 315 320

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
325 330 335

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
340 345 350

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
355 360 365

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
370 375 380

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385 390

<210> 84
<211> 410
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína quimérica sFRP1-Fc

<400> 84

Met Gly Ile Gly Arg Ser Glu Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gly
1 5 10 15

Val Leu Leu Ala Leu Gly Ala Ala Leu Leu Ala Val Gly Ser Ala Ser
20 25 30

Glu Tyr Asp Tyr Val Ser Phe Gln Ser Asp Ile Gly Pro Tyr Gln Ser
35 40 45

Gly Arg Phe Tyr Thr Lys Pro Pro Gln Cys Val Asp Ile Pro Ala Asp
50 55 60

Leu Arg Leu Cys His Asn Val Gly Tyr Lys Lys Met Val Leu Pro Asn
65 70 75 80

Leu Leu Glu His Glu Thr Met Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser
85 90 95

Trp Val Pro Leu Leu Asn Lys Asn Cys His Ala Gly Thr Gln Val Phe
100 105 110

Leu Cys Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro
115 120 125

Cys Arg Trp Leu Cys Glu Ala Val Arg Asp Ser Cys Glu Pro Val Met
130 135 140

Gln Phe Phe Gly Phe Tyr Trp Pro Glu Met Leu Lys Cys Asp Lys Phe
145 150 155 160

Pro Glu Gly Asp Val Cys Ile Ala Met Thr Pro Pro Asn Ala Trp Arg
165 170 175

Ala Gln Val Thr Asp Lys Ala Ala Arg Ser Thr Leu Cys Pro Pro Cys
180 185 190

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
195 200 205

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
210 215 220

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
225 230 235 240

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
245 250 255

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
260 265 270

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

275 280 285

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
290 295 300

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
305 310 315 320

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
325 330 335

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
340 345 350

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
355 360 365

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
370 375 380

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
385 390 395 400

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
405 410

<210> 85
<211> 396
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína quimérica sFRP2-Fc

<400> 85

Met Leu Gln Gly Pro Gly Ser Leu Leu Leu Leu Phe Leu Ala Ser His
1 5 10 15

Cys Cys Leu Gly Ser Ala Arg Gly Leu Phe Leu Phe Gly Gln Pro Asp
20 25 30

Phe Ser Tyr Lys Arg Ser Asn Cys Lys Pro Ile Pro Ala Asn Leu Gln
35 40 45

Leu Cys His Gly Ile Glu Tyr Gln Asn Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu
50 55 60

Gly His Glu Thr Met Lys Glu Val Leu Glu Gln Ala Gly Ala Trp Ile
65 70 75 80

Pro Leu Val Met Lys Gln Cys His Pro Asp Thr Lys Lys Phe Leu Cys
85 90 95

Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Asp Leu Asp Glu Thr Ile Gln
100 105 110

Pro Cys His Ser Leu Cys Val Gln Val Lys Asp Arg Cys Ala Pro Val
115 120 125

Met Ser Ala Phe Gly Phe Pro Trp Pro Asp Met Leu Glu Cys Asp Arg
130 135 140

Phe Pro Gln Asp Asn Asp Leu Cys Ile Pro Leu Ala Ser Ser Asp His
145 150 155 160

Trp Arg Ala Gln Val Thr Asp Lys Ala Ala Arg Ser Thr Leu Cys Pro
165 170 175

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
180 185 190

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
195 200 205

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
210 215 220

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
225 230 235 240

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
245 250 255

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
260 265 270

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
275 280 285

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
290 295 300

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
305 310 315 320

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
325 330 335

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
340 345 350

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
355 360 365

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
370 375 380

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385 390 395

<210> 86
<211> 390
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína quimérica sFRP3-Fc

<400> 86

Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
1 5 10 15

Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Ile Asp Ala Arg Gly Ala
20 25 30

Ala Cys Glu Pro Val Arg Ile Pro Leu Cys Lys Ser Leu Pro Trp Asn
35 40 45

Met Thr Lys Met Pro Asn His Leu His His Ser Thr Gln Ala Asn Ala

50 55 60

Ile Leu Ala Ile Glu Gln Phe Glu Gly Leu Leu Gly Thr His Cys Ser
65 70 75 80

Pro Asp Leu Leu Phe Phe Leu Cys Ala Met Tyr Ala Pro Ile Cys Thr
85 90 95

Ile Asp Phe Gln His Glu Pro Ile Lys Pro Cys Lys Ser Val Cys Glu
100 105 110

Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Pro Ile Leu Ile Lys Tyr Arg His Ser
115 120 125

Trp Pro Glu Asn Leu Ala Cys Glu Glu Leu Pro Val Tyr Asp Arg Gly
130 135 140

Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr Gly Arg Ala Gln Val Thr
145 150 155 160

Asp Lys Ala Ala Arg Ser Thr Leu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
165 170 175

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
180 185 190

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
195 200 205

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
210 215 220

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
225 230 235 240

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
245 250 255

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
260 265 270

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
275 280 285

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
290 295 300

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
305 310 315 320

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
325 330 335

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
340 345 350

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
355 360 365

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
370 375 380

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

385 390

<210> 87
<211> 380
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína quimérica sFRP4-Fc

<400> 87

Met Phe Leu Ser Ile Leu Val Ala Leu Cys Leu Trp Leu His Leu Ala
1 5 10 15

Leu Gly Val Arg Gly Ala Pro Cys Glu Ala Val Arg Ile Pro Met Cys
20 25 30

Arg His Met Pro Trp Asn Ile Thr Arg Met Pro Asn His Leu His His
35 40 45

Ser Thr Gln Glu Asn Ala Ile Leu Ala Ile Glu Gln Tyr Glu Glu Leu
50 55 60

Val Asp Val Asn Cys Ser Ala Val Leu Arg Phe Phe Phe Cys Ala Met
65 70 75 80

Tyr Ala Pro Ile Cys Thr Leu Glu Phe Leu His Asp Pro Ile Lys Pro
85 90 95

Cys Lys Ser Val Cys Gln Arg Ala Arg Asp Asp Cys Glu Pro Leu Met
100 105 110

Lys Met Tyr Asn His Ser Trp Pro Glu Ser Leu Ala Cys Asp Glu Leu
115 120 125

Pro Val Tyr Asp Arg Gly Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr
130 135 140

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Gly Val Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
145 150 155 160

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
165 170 175

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
180 185 190

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
195 200 205

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
210 215 220

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
225 230 235 240

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
245 250 255

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
260 265 270

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
275 280 285

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
290 295 300

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
305 310 315 320

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
325 330 335

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
340 345 350

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
355 360 365

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375 380

<210> 88
<211> 406
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína quimérica sFRP5-Fc

<400> 88

Met Arg Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Val Arg Thr Ala Ala Leu Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Ala Leu His Trp Ala Pro Ala Arg Cys Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Tyr Tyr Gly Trp Gln Ala Glu Pro Leu His Gly Arg Ser Tyr Ser
35 40 45

Lys Pro Pro Gln Cys Leu Asp Ile Pro Ala Asp Leu Pro Leu Cys His
50 55 60

Thr Val Gly Tyr Lys Arg Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu Glu His Glu
65 70 75 80

Ser Leu Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser Trp Leu Pro Leu Leu
85 90 95

Ala Lys Arg Cys His Ser Asp Thr Gln Val Phe Leu Cys Ser Leu Phe
100 105 110

Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro Cys Arg Ser Leu Cys
115 120 125

Glu Ala Val Arg Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Glu Ala Tyr Gly Phe
130 135 140

Pro Trp Pro Glu Met Leu His Cys His Lys Phe Pro Leu Asp Asn Asp
145 150 155 160

Leu Cys Ile Ala Val Gln Phe Gly His Leu Trp Arg Ala Gln Val Thr
165 170 175

Asp Lys Ala Ala Arg Ser Thr Leu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
180 185 190

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

195 200 205

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
210 215 220

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
225 230 235 240

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
245 250 255

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
260 265 270

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
275 280 285

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
290 295 300

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
305 310 315 320

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
325 330 335

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
340 345 350

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
355 360 365

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
370 375 380

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
385 390 395 400

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
405

<210> 89
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador PCR

<400> 89
ctaagcactt acatgtggag atactg 26

<210> 90
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador PCR

<400> 90
acaggacaag taaacaatga caca 24

<210> 91
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de la sonda

<400> 91
aacctgaggg cagaaagccc aa 22

<210> 92
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador PCR

<400> 92
ttcccacact gtcttagaga actt 24

<210> 93
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador PCR

<400> 93
ttctgagtat ctacattcaa ttgcttt 27

<210> 94
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de la sonda

<400> 94
aaacatgcaa atacatgtgg tttctggtga c 31

<210> 95
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador PCR

<400> 95
tgactcgctt agctgaaacc t 21

<210> 96
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador PCR

<400> 96
tgagcctggt cactttatct ga 22

<210> 97
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de la sonda

<400> 97
tcagaaggtc ttcggaaatg ttgcct 26

<210> 98
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador PCR

<400> 98
tgtggttgca gcctgtct 18

<210> 99
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador PCR

<400> 99
aaccaactct gcattggatt c 21

<210> 100
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de la sonda

<400> 100
cctttgaaat tgttttactc tctgagtttt atatgctg 38

<210> 101
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador PCR

<400> 101
ctccgtgtgt cgcctat 17

<210> 102
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador PCR

<400> 102
catgacaaaa gtcattgagt acaaga 26

<210> 103
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de la sonda

<400> 103
ttgagggctc aagctttccc ttgt 24

<210> 104
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador PCR

<400> 104
gaacctcgcg ctgtctct 18

<210> 105
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador PCR

<400> 105
acttggtcct gcgattctg 19

<210> 106
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de la sonda

<400> 106
agcctcaccg agacgcaggt c 21

<210> 107
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador PCR

<400> 107
ggcaacaatt tacctttgct t 21

<210> 108
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador PCR

<400> 108
gaaccaagtg gaacttcatt aca 23

<210> 109
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de la sonda

<400> 109
cgccaacctt aggattgtaa agccc 25

<210> 110
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador PCR

<400> 110
cagatacaca ggacatggat ga 22

<210> 111
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PCR primer

<400> 111
caaagctttt gtaagagact taggat 26

<210> 112
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de la sonda

<400> 112
ccgtttcctc tagtttcttc ctgtagtact cctct 35

<210> 113
<211> 409
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína quimérica Frz8(1-173)-Fc

<400> 113

Met Glu Trp Gly Tyr Leu Leu Glu Val Thr Ser Leu Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15

Ala Val Leu Gln Arg Ser Ser Gly Ala Ala Ala Ala Ser Ala Lys Glu
20 25 30

Leu Ala Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Leu Cys Lys Gly Ile Gly Tyr
35 40 45

Asn Tyr Thr Tyr Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu
50 55 60

Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys
65 70 75 80

Ser Pro Asp Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr Pro Ile Cys
85 90 95

Leu Glu Asp Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu
100 105 110

Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala
115 120 125

Trp Pro Asp Arg Met Arg Cys Asp Arg Leu Pro Glu Gln Gly Asn Pro
130 135 140

Asp Thr Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Thr Asp Leu Thr Thr Ala Ala
145 150 155 160

Pro Ser Pro Pro Arg Arg Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Glu Ser
165 170 175

Gly Gly Gly Gly Val Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
180 185 190

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
195 200 205

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
210 215 220

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
225 230 235 240

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
245 250 255

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
260 265 270

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
275 280 285

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
290 295 300

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
305 310 315 320

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
325 330 335

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
340 345 350

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
355 360 365

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
370 375 380

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
385 390 395 400

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
405

<210> 114
<211> 388
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína quimérica Frz3-Fc

<400> 114

Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
1 5 10 15

Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Ile Asp Ala Arg Gly His
20 25 30

Ser Leu Phe Ser Cys Glu Pro Ile Thr Leu Arg Met Cys Gln Asp Leu
35 40 45

Pro Tyr Asn Thr Thr Phe Met Pro Asn Leu Leu Asn His Tyr Asp Gln
50 55 60

Gln Thr Ala Ala Leu Ala Met Glu Pro Phe His Pro Met Val Asn Leu
65 70 75 80

Asp Cys Ser Arg Asp Phe Arg Pro Phe Leu Cys Ala Leu Tyr Ala Pro
85 90 95

Ile Cys Met Glu Tyr Gly Arg Val Thr Leu Pro Cys Arg Arg Leu Cys
100 105 110

Gln Arg Ala Tyr Ser Glu Cys Ser Lys Leu Met Glu Met Phe Gly Val
115 120 125

Pro Trp Pro Glu Asp Met Glu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Cys Asp Glu
130 135 140

Pro Tyr Pro Arg Leu Val Asp Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Gly Val

145 150 155 160

Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
165 170 175

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
180 185 190

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
195 200 205

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
210 215 220

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
225 230 235 240

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
245 250 255

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
260 265 270

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
275 280 285

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
290 295 300

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
305 310 315 320

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
325 330 335

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
340 345 350

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
355 360 365

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
370 375 380

Ser Pro Gly Lys
385

<210> 115
<211> 1410
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo Frz1-Fc

<400> 115
atgggggga ctgccgccag gttgggggcc gtgattttgt ttgtcgtcat agtgggcctc 60

catggggtcc gcggcaaaat cgatgaggag ggcagcgggg acgccggtgg ccgccgccgc 120

ccgccagttg acccccggcg attggcgcgc cagctgctgc tgctgctttg gctgctggag 180

gctccgctgc tgctgggggt ccgggcccag gcggcgggcc aggggccagg ccaggggccc 240

gggccggggc agcaaccgcc gccgccgcct cagcagcaac agagcgggca gcagtacaac 300

ggcgagcggg gcatctccgt cccggaccac ggctattgcc agcccatctc catcccgctg 360

tgcacggaca tcgcgtacaa ccagaccatc atgcccaacc tgctgggcca cacgaaccag 420

gaggacgcgg gcctggaggt gcaccagttc taccctctag tgaaagtgca gtgttccgct 480

gagctcaagt tcttcctgtg ctccatgtac gcgcccgtgt gcaccgtgct agagcaggcg 540

ctgccgccct gccgctccct gtgcgagcgc gcgcgccagg gctgcgaggc gctcatgaac 600

aagttcggct tccagtggcc agacacgctc aagtgtgaga agttcccggt gcacggcgcc 660

ggcgagctgt gcgtgggcca gaacacgtcc gacaaggctc gagggcgcgc ccaggtcacc 720

gacaaagctg cgcgctctac tctgtgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 780

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 840

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 960

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1020

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaagag 1140

atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1260

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1380

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1410

<210> 116
<211> 1209
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo Frz2-Fc

<400> 116
atgggggga ctgccgccag gttgggggcc gtgattttgt ttgtcgtcat agtgggcctc 60

catggggtcc gcggcaaaat cgatgctcga ggggcccagt tccacgggga gaagggcatc 120

tccatcccgg accacggctt ctgccagccc atctccatcc cgctgtgcac ggacatcgcc 180

tacaaccaga ccatcatgcc caaccttctg ggccacacga accaggagga cgcaggccta 240

gaggtgcacc agttctatcc gctggtgaag gtgcagtgct cgcccgaact gcgcttcttc 300

ctgtgctcca tgtacgcacc cgtgtgcacc gtgctggaac aggccatccc gccgtgccgc 360

tctatctgtg agcgcgcgcg ccagggctgc gaagccctca tgaacaagtt cggttttcag 420

tggcccgagc gcctgcgctg cgagcacttc ccgcgccacg gcgccgagca gatctgcgtc 480

ggccagaacc actccgagga cgggcgcgcc caggtcaccg acaaagctgc gcgctctact 540

ctgtgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 600

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 660

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 720

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 780

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 840

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 900

gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaagaga tgaccaagaa ccaggtcagc 960

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1020

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1080

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1140

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1200

ccgggtaaa 1209

<210> 117
<211> 1164
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo Frz3-Fc

<400> 117
atgggggga ctgccgccag gttgggggcc gtgattttgt ttgtcgtcat agtgggcctc 60

catggggtcc gcggcaaaat cgatgctcga ggccactccc tgttcagctg tgagccaatc 120

acccttcgaa tgtgtcagga tctgccttac aataccacct tcatgcctaa tctgctcaat 180

cactacgacc agcaaactgc tgccttggca atggagccct tccaccctat ggtcaacctg 240

gactgtagca gggacttccg tccatttttg tgtgccttgt atgcacctat ctgtatggag 300

tacggccgcg tgacattgcc ttgtaggagg ctgtgtcagc gagcttacag tgagtgcagc 360

aaacttatgg aaatgtttgg cgtcccctgg ccagaagata tggagtgcag tcggttccca 420

gactgtgacg agccataccc tagactggtt gatctcctcg agtcaggagg aggaggagtc 480

accgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 540

gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 600

acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 660

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 720

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 780

aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 840

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga agagatgacc 900

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 960

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1020

tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1080

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1140

agcctctccc tgtctccggg taaa 1164

<210> 118
<211> 1191
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo Frz4-Fc

<400> 118
atgggggga ctgccgccag gttgggggcc gtgattttgt ttgtcgtcat agtgggcctc 60

catggggtcc gcggcaaaat cgatgctcga gggttcgggg acgaggaaga gcggcgctgc 120

gaccccatcc gcatctccat gtgccagaac ctcggctaca acgtgaccaa gatgcccaac 180

ctggttgggc acgagctgca gacggacgcc gagctgcagc tgacaacttt cacaccgctc 240

atccagtacg gctgctccag ccagctgcag ttcttccttt gttctgttta tgtgccaatg 300

tgcacagaga agatcaacat ccccattggc ccatgcggcg gcatgtgtct ttcagtcaag 360

agacgctgtg aacccgtcct gaaggaattt ggatttgcct ggccagagag tctgaactgc 420

agcaaattcc caccacagaa cgaccacaac cacatgtgca tggaagggcc aggtgatgaa 480

gaggggcgcg cccaggtcac cgacaaagct gcgcgctcta ctctgtgccc accgtgccca 540

gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 600

ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 660

cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 720

ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 780

caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 840

cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 900

ctgccccccat cccgggaaga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa 960

ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1020

tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc 1080

accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1140

gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a 1191

<210> 119
<211> 1188
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo Frz5-Fc

<400> 119
atgggggga ctgccgccag gttgggggcc gtgattttgt ttgtcgtcat agtgggcctc 60

catggggtcc gcggcaaaat cgatgctcga ggggcgtcca aggccccggt gtgccaggaa 120

atcacggtgc ccatgtgccg cggcatcggc tacaacctga cgcacatgcc caaccagttc 180

aaccacgaca cgcaggacga ggcgggcctg gaggtgcacc agttctggcc gctggtggag 240

atccaatgct cgccggacct gcgcttcttc ctatgctcta tgtacacgcc catctgtctg 300

cccgactacc acaagccgct gccgccctgc cgctcggtgt gcgagcgcgc caaggccggc 360

tgctcgccgc tgatgcgcca gtacggcttc gcctggcccg agcgcatgag ctgcgaccgc 420

ctcccggtgc tgggccgcga cgccgaggtc ctctgcatgg attacaaccg cagcgaggcc 480

gggcgcgccc aggtcaccga caaagctgcg cgctctactc tgtgcccacc gtgcccagca 540

cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 600

atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 660

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 720

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 780

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 840

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 900

cccccatccc gggaagagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 960

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1020

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 1080

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1140

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa 1188

<210> 120
<211> 1119
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo Frz6-Fc

<400> 120
atggaaatgt ttacattttt gttgacgtgt atttttctac ccctcctaag agggcacagt 60

ctcttcacct gtgaaccaat tactgttccc agatgtatga aaatggccta caacatgacg 120

ttttttccta atctgatggg tcattatgac cagagtattg ccgcggtgga aatggagcat 180

tttcttcctc tcgcaaatct ggaatgttca ccaaacattg aaactttcct ctgcaaagca 240

tttgtaccaa cctgcataga acaaattcat gtggttccac cttgtcgtaa actttgtgag 300

aaagtatatt ctgattgcaa aaaattaatt gacacttttg ggatccgatg gcctgaggag 360

cttgaatgtg acagattaca atactgtgat gagactgttc ctgtaacttt tctcgagtca 420

ggaggaggag gagtcaccga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc 480

ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 540

cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag 600

ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 660

cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 720

aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 780

accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc 840

cgggaagaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc 900

agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 960

cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1020

agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1080

cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaa 1119

<210> 121
<211> 1212
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo Frz7-Fc

<400> 121
atgcgggacc ccggcgcggc cgctccgctt tcgtccctgg gcctctgtgc cctggtgctg 60

gcgctgctgg gcgcactgtc cgcgggcgcc ggggcgcagc cgtaccacgg agagaagggc 120

atctccgtgc cggaccacgg cttctgccag cccatctcca tcccgctgtg cacggacatc 180

gcctacaacc agaccatcct gcccaacctg ctgggccaca cgaaccaaga ggacgcgggc 240

ctcgaggtgc accagttcta cccgctggtg aaggtgcagt gttctcccga actccgcttt 300

ttcttatgct ccatgtatgc gcccgtgtgc accgtgctcg atcaggccat cccgccgtgt 360

cgttctctgt gcgagcgcgc ccgccagggc tgcgaggcgc tcatgaacaa gttcggcttc 420

cagtggcccg agcggctgcg ctgcgagaac ttcccggtgc acggtgcggg cgagatctgc 480

gtgggccaga acacgtcgga cggcctcgag tcaggaggag gaggagtcac cgacaaaact 540

cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctcctggggg gaccgtcagt cttcctcttc 600

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg 660

gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 720

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 780

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 840

tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 900

cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggaag agatgaccaa gaaccaggtc 960

agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1020

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1080

ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1140

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1200

tctccgggta aa 1212

<210> 122
<211> 1176
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> constructo quimérico Frz8-Fc

<400> 122
atggagtggg gttacctgtt ggaagtgacc tcgctcctag ccgccttggc ggtgctacag 60

cgctctagcg gcgctgccgc ggcttcggcc aaggagctgg cgtgccaaga gatcacggtg 120

ccgttgtgca aaggcatcgg ttacaactac acttacatgc ccaaccagtt caaccacgac 180

acgcaagatg aggcgggcct agaggtgcac cagttttggc cgctggtgga gatacagtgc 240

tccccggacc tcaagttctt tctgtgtagc atgtacacgc ccatctgcct ggaggactac 300

aagaagcctc tgccgccttg tcgctctgtg tgtgaacgcg ccaaggccgg ctgcgcgccg 360

ctcatgcgcc agtacggctt tgcttggcct gaccgcatgc gctgcgatcg gttgccggag 420

cagggcaacc cggacactct gtgcatggac tacaaccgca ccgacctcga gtcaggagga 480

ggaggagtca ccgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 540

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 600

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 660

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 720

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 780

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 840

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggaa 900

gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 960

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1020

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1080

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1140

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga 1176

<210> 123
<211> 1188
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo Frz9-Fc

<400> 123
atggccgtgg cgcctctgcg gggggcgctg ctgctgtggc agctgctggc ggcgggcggc 60

gcggcactgg agatcggccg cttcgacccg gagcgcgggc gcggggctgc gccgtgccag 120

gcggtggaga tccccatgtg ccgcggcatc ggctacaacc tgacccgcat gcccaacctg 180

ctgggccaca cgtcgcaggg cgaggcggct gccgagctag cggagttcgc gccgctggtg 240

cagtacggct gccacagcca cctgcgcttc ttcctgtgct cgctctacgc gcccatgtgc 300

accgaccagg tctcgacgcc cattcccgcc tgccggccca tgtgcgagca ggcgcgcctg 360

cgctgcgcgc ccatcatgga gcagttcaac ttcggctggc cggactcgct cgactgcgcc 420

cggctgccca cgcgcaacga cccgcacgcg ctgtgcatgg aggcgcccga gaacgccacg 480

ctcgagtcag gaggaggagg agtcaccgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 540

cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 600

atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 660

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 720

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 780

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 840

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 900

cccccatccc gggaagagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 960

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1020

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 1080

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1140

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa 1188

<210> 124
<211> 1173
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo Frz10-Fc

<400> 124
atgcagcgcc cgggcccccg cctgtggctg gtcctgcagg tgatgggctc gtgcgccgcc 60

atcagctcca tggacatgga gcgcccgggc gacggcaaat gccagcccat cgagatcccg 120

atgtgcaagg acatcggcta caacatgact cgtatgccca acctgatggg ccacgagaac 180

cagcgcgagg cagccatcca gttgcacgag ttcgcgccgc tggtggagta cggctgccac 240

ggccacctcc gcttcttcct gtgctcgctg tacgcgccga tgtgcaccga gcaggtctct 300

acccccatcc ccgcctgccg ggtcatgtgc gagcaggccc ggctcaagtg ctccccgatt 360

atggagcagt tcaacttcaa gtggcccgac tccctggact gccggaaact ccccaacaag 420

aacgacccca actacctgtg catggaggcg cccaacaacg gctcgctcga gtcaggagga 480

ggaggagtca ccgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 540

ggaccgtcag tcttcctctt cccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 600

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 660

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 720

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 780

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc 840

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggaa 900

gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 960

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1020

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1080

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1140

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1173

<210> 125
<211> 1230
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sFRP1-Fc

<400> 125
atgggcatcg ggcgcagcga ggggggccgc cgcggggcag ccctgggcgt gctgctggcg 60

ctgggcgcgg cgcttctggc cgtgggctcg gccagcgagt acgactacgt gagcttccag 120

tcggacatcg gcccgtacca gagcgggcgc ttctacacca agccacctca gtgcgtggac 180

atccccgcgg acctgcggct gtgccacaac gtgggctaca agaagatggt gctgcccaac 240

ctgctggagc acgagaccat ggcggaggtg aagcagcagg ccagcagctg ggtgcccctg 300

ctcaacaaga actgccacgc cggcacccag gtcttcctct gctcgctctt cgcgcccgtc 360

tgcctggacc ggcccatcta cccgtgtcgc tggctctgcg aggccgtgcg cgactcgtgc 420

gagccggtca tgcagttctt cggcttctac tggcccgaga tgcttaagtg tgacaagttc 480

cccgaggggg acgtctgcat cgccatgacg ccgcccaatg cctggcgcgc ccaggtcacc 540

gacaaagctg cgcgctctac tctgtgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 600

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 660

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 720

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 780

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 840

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 900

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaagag 960

atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1020

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1080

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1140

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1200

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1230

<210> 126
<211> 1188
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sFRP2-Fc

<400> 126
atgctgcagg gccctggctc gctgctgctg ctcttcctcg cctcgcactg ctgcctgggc 60

tcggcgcgcg ggctcttcct ctttggccag cccgacttct cctacaagcg cagcaattgc 120

aagcccatcc ctgccaacct gcagctgtgc cacggcatcg aataccagaa catgcggctg 180

cccaacctgc tgggccacga gaccatgaag gaggtgctgg agcaggccgg cgcttggatc 240

ccgctggtca tgaagcagtg ccacccggac accaagaagt tcctgtgctc gctcttcgcc 300

cccgtctgcc tcgatgacct agacgagacc atccagccat gccactcgct ctgcgtgcag 360

gtgaaggacc gctgcgcccc ggtcatgtcc gccttcggct tcccctggcc cgacatgctt 420

gagtgcgacc gtttcccccа ggacaacgac ctttgcatcc ccctcgctag cagcgaccac 480

tggcgcgccc aggtcaccga caaagctgcg cgctctactc tgtgcccacc gtgcccagca 540

cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 600

atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 660

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 720

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 780

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 840

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 900

cccccatccc gggaagagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 960

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1020

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 1080

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1140

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa 1188

<210> 127
<211> 1170
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sFRP3-Fc

<400> 127
atgggggga ctgccgccag gttgggggcc gtgattttgt ttgtcgtcat agtgggcctc 60

catggggtcc gcggcaaaat cgatgctcga ggggcagcct gtgagcccgt ccgcatcccc 120

ctgtgcaagt ccctgccctg gaacatgact aagatgccca accacctgca ccacagcact 180

caggccaacg ccatcctggc catcgagcag ttcgaaggtc tgctgggcac ccactgcagc 240

cccgatctgc tcttcttcct ctgtgccatg tacgcgccca tctgcaccat tgacttccag 300

cacgagccca tcaagccctg taagtctgtg tgcgagcggg cccggcaggg ctgtgagccc 360

atactcatca agtaccgcca ctcgtggccg gagaacctgg cctgcgagga gctgccagtg 420

tacgacaggg gcgtgtgcat ctctcccgag gccatcgtta ctgggcgcgc ccaggtcacc 480

gacaaagctg cgcgctctac tctgtgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 540

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 600

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 660

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 720

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 780

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 840

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaagag 900

atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 960

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1020

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1080

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1140

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1170

<210> 128
<211> 1140
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sFRP4-Fc

<400> 128
atgttcctct ccatcctagt ggcgctgtgc ctgtggctgc acctggcgct gggcgtgcgc 60

ggcgcgccct gcgaggcggt gcgcatccct atgtgccggc acatgccctg gaacatcacg 120

cggatgccca accacctgca ccacagcacg caggagaacg ccatcctggc catcgagcag 180

tacgaggagc tggtggacgt gaactgcagc gccgtgctgc gcttcttctt ctgtgccatg 240

tacgcgccca tttgcaccct ggagttcctg cacgacccta tcaagccgtg caagtcggtg 300

tgccaacgcg cgcgcgacga ctgcgagccc ctcatgaaga tgtacaacca cagctggccc 360

gaaagcctgg cctgcgacga gctgcctgtc tatgaccgtg gcgtgtgcat ttcgcctgaa 420

gccatcgtca cgctcgagtc aggaggagga ggagtcaccg acaaaactca cacatgccca 480

ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 540

aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 600

cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 660

aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 720

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 780

ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 840

gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaagag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 900

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 960

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1020

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1080

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1140

<210> 129
<211> 1218
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sFRP5-Fc

<400> 129
atgcgggcgg cggcggcggc ggggggcgtg cggacggccg cgctggcgct gctgctgggg 60

gcgctgcact gggcgccggc gcgctgcgag gagtacgact actatggctg gcaggccgag 120

ccgctgcacg gccgctccta ctccaagccg ccgcagtgcc ttgacatccc tgccgacctg 180

ccgctctgcc acacggtggg ctacaagcgc atgcggctgc ccaacctgct ggagcacgag 240

agcctggccg aagtgaagca gcaggcgagc agctggctgc cgctgctggc caagcgctgc 300

cactcggata cgcaggtctt cctgtgctcg ctctttgcgc ccgtctgtct cgaccggccc 360

atctacccgt gccgctcgct gtgcgaggcc gtgcgcgccg gctgcgcgcc gctcatggag 420

gcctacggct tcccctggcc tgagatgctg cactgccaca agttcccccc ggacaacgac 480

ctctgcatcg ccgtgcagtt cgggcacctg tggcgcgccc aggtcaccga caaagctgcg 540

cgctctactc tgtgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc 600

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 660

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 720

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 780

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 840

aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 900

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaagagat gaccaagaac 960

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1020

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1080

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1140

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1200

tccctgtctc cgggtaaa 1218

PATENT COOPERATION TREATY PCT/US2007/077845

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

ROPP, Traci
Genentech, Inc.
1 DNA Way, MS-49
South San Francisco, California 94080
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)* 05 October 2007 (05.10.2007)	
Applicant's or agent's file reference P2368R1 WO	**IMPORTANT NOTIFICATION**
International application No. PCT/US2007/077845	International filing date *(day/month/year)* 07 September 2007 (07.09.2007)
International publication date *(day/month/year)* **Not yet published**	Priority date *(day/month/year)* 08 September 2006 (08.09.2006)
Applicant GENENTECH, INC. et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. *(If applicable)* The **letters "NR"** appearing in the right-hand column denote **a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau** under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. *(If applicable)***An asterisk (*)** appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes **a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b)** (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
08 September 2006 (08.09.2006)	60/825,063	US	26 September 2007 (26.09.2007)
20 July 2007 (20.07.2007)	60/951,175	US	26 September 2007 (26.09.2007)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Yoshiko Kuwahara
Facsimile No. +41 22 338 82 70
Telephone No. +41 22 338 74 07

P2368R1 WO

PCT REQUEST

Original (for **SUBMISSION**)

0	**For receiving Office use only**	
0-1	International Application No.	PCT/US07/77845
0-2	International Filing Date	07 SEP 2007 (07.09.07)
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	PCT INTERNATIONAL APPLICATION RO/US

0-4	**Form PCT/RO/101 PCT Request**	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.51.022.197 MT/FOP 20070701/0.20.5.10
0-5	**Petition** The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	**Receiving Office (specified by the applicant)**	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	**Applicant's or agent's file reference**	P2368R1 WO
I	**Title of Invention**	WNT ANTAGONISTS AND THEIR USE IN THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF WNT-MEDIATED DISORDERS
II	**Applicant**	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	GENENTECH, INC.
II-5	Address	1 DNA Way South San Francisco, California 94080 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	650.225.1000
II-9	Facsimile No.	650.952.9881

PCT REQUEST

Original (for **SUBMISSION**)

III-1	**Applicant and/or inventor**	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	ERNST, James A.
III-1-5	Address	758 Clayton Street San Francisco, California 94117 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US
III-2	**Applicant and/or inventor**	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	POLAKIS, Paul
III-2-5	Address	260 Corte Madera Avenue Mill Valley, California 94941 United States of America
III-2-6	State of nationality	US
III-2-7	State of residence	US
III-3	**Applicant and/or inventor**	
III-3-1	This person is	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	RUBINFELD, Bonnee
III-3-5	Address	4186 Quail Run Drive Danville, California 94506 United States of America
III-3-6	State of nationality	US
III-3-7	State of residence	US
III-4	**Applicant and/or inventor**	
III-4-1	This person is	applicant and inventor
III-4-2	Applicant for	US only
III-4-4	Name (LAST, First)	DEALMEIDA, Venita I.
III-4-5	Address	965 Buckland Avenue San Carlos, California 94070 United States of America
III-4-6	State of nationality	IN
III-4-7	State of residence	US

PCT REQUEST

Original (for **SUBMISSION**)

IV-1	**Agent or common representative; or address for correspondence** The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	ROPP, Traci
IV-1-2	Address	Genentech, Inc. 1 DNA Way, MS-49 South San Francisco, California 94080 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	650.467.0481
IV-1-4	Facsimile No.	650.952.9881
IV-1-5	e-mail	tracir@gene.com
IV-1-6	Agent's registration No.	44,307
IV-2	**Additional agent(s)**	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	AGARWAL, Atulya R. (40,887); ANDRUS, Alex (44,509); BARNES, Elizabeth M. (35,059); COBURN, Cara M. (46,631); BARRY, Anna L. (51,436); CUI, Steven X. (44,637); ELLIOTT, Jennifer (50,584); EVANS, David (41,430); GIL, Anna (46,726); HASAK, Janet E. (28,616); JOHNSTON, Sean A. (35,910); KALINOWSKI, Grant (48,314); KRESNAK, Mark T. (42,767); KUBINEC, Jeffrey S. (36,575); LEE, Wendy M. (40,378); MARSCHANG, Diane L. (35,600); NAIK, Paul (49,075); PASQUALONE, Danielle (43,847); PAZDERA, Minako (46,984); PLEASURE, Irene (45,506); SCHWARTZ, Timothy R. (32,171); SHERMAN, Daniel (53,586); SHIN, Elinor K. (43,117); SVOBODA, Craig G. (39,044); TAN, Lee K. (39,447); WALSH, Christopher J. (55,709); WANG, Min (51,303); YEUNG, Bonnie (53,811)
V	DESIGNATIONS	
V-1	**The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.**	

PCT REQUEST

Original (for **SUBMISSION**)

VI-1	**Priority claim of earlier national application**	
VI-1-1	Filing date	08 September 2006 (08.09.2006)
VI-1-2	Number	60/825,063
VI-1-3	Country	US
VI-2	**Priority claim of earlier national application**	
VI-2-1	Filing date	20 July 2007 (20.07.2007)
VI-2-2	Number	60/951,175
VI-2-3	Country	US
VI-3	**Priority document request** The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1, VI-2
VI-4	**Incorporation by reference :** where an element of the international application referred to in Article 11(1)(iii)(d) or (e) or a part of the description, claims or drawings referred to in Rule 20.5(a) is not otherwise contained in this international application but is completely contained in an earlier application whose priority is claimed on the date on which one or more elements referred to in Article 11(1)(iii) were first received by the receiving Office, that element or part is, subject to confirmation under Rule 20.6, incorporated by reference in this international application for the purposes of Rule 20.6.	
VII-1	**International Searching Authority Chosen**	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)

VIII	**Declarations**	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	–	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	–	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	–	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	–	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	–	

P2368R1 WO

PCT REQUEST

Original (for **SUBMISSION**)

IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	6	✓
IX-2	Description (excluding sequence listing part)	114	–
IX-3	Claims	6	–
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	59	–
IX-7a	Sub-total number of sheets	186	
IX-6a	Sequence listing part of description	0	–
IX-7	TOTAL	186	
	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	–
IX-11	Copy of general power of attorney	reference no. none	–
IX-16(A)	Sequence listing in electronic form		
IX-16(A)-(i)	copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application)	–	1 txt file
IX-17	PCT-SAFE physical media	–	✓
IX-19	**Figure of the drawings which should accompany the abstract**	22A	
IX-20	**Language of filing of the international application**	English	
X-1	**Signature of applicant, agent or common representative**	/Traci ROPP, Reg. No. 44,307/	
X-1-1	Name (LAST, First)	ROPP, Traci	
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		

PCT REQUEST

Original (for **SUBMISSION**)

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY 07.09.07

10-1	**Date of actual receipt of the purported international application**	07 SEP 2007
10-2	**Drawings:**	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	**Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application**	
10-4	**Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)**	
10-5	**International Searching Authority**	**ISA/EP**
10-6	**Transmittal of search copy delayed until search fee is paid**	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	**Date of receipt of the record copy by the International Bureau**	

607

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

02 JUL 2008 NAN/THR/ls

Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark Office
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450
www.uspto.gov

Traci Ropp
GENENTECH, INC.
1 DNA Way MS 49
South San Francisco, CA 94080

RECEIVED
JUL 17 2008
GENENTECH, INC.
LEGAL DEPT.

In re Application of
GENENTECH, INC.
PCT No.: PCT/US2007/077845 ✓
Int. Filing Date: 07 September 2007 ✓
Priority Date: 08 September 2006 ✓
Attorney Docket No.: P2368R1 WO ✓
For: WNT ANTAGONISTS AND THEIR USE IN THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF WNT-MEDIATED DISORDERS ✓

DECISION

This decision is in response to the petition under 37 CFR 1.182 filed with the United States Receiving Office (RO/US) on 03 June 2008.

BACKGROUND

On 07 September 2007, applicant submitted the above-captioned international application electronically using the USPTO EFS-Web filing system and PCT-SAFE. The Request indicated that the description includes a sequence listing as part of the description; however, the number of sheets of the sequence listing was listed as "0" in Box No. IX-6a of the Request. The Request further indicated that the international application was accompanied by a sequence listing in electronic form identified as "1 txt file" under Box No. IX-16(A)-(I) of the Request. An 81-page sequence listing was submitted electronically with the papers.

On 13 March 2008, the international application was published by the International Bureau (IB) without the sequence listing as part of the application.

On 03 June 2008, applicant submitted a petition under 37 CFR 1.182.

DISCUSSION

Applicant requests that the RO/US consider the sequence listing submitted on 07 September 2007 as part of the international application as intended. Applicant authorized the RO/US to charge the required fees to Deposit Account No. 07-0630. Applicant requested that the $400.00 petition fee be waived.

Applicant prepared the Request using PCT-SAFE. A review of the international application shows that Box No. IX-6a *Sequence listing part of description* appears on

the Request submitted using PCT-SAFE. This box does not appear unless applicant specifically requests this action when filing the international application. For this to appear, applicant must check the box on the "Biology" tab that "This description contains a sequence listing." After applicant completes this step, the "Contents" tab will show that the description includes a "Sequence listing part of the description" and applicant must fill in the number of pages. Applicant also filed an 81-page sequence listing electronically with the initial filing on 07 September 2007.

Because applicant did the steps outlined in the preceding paragraph, it is clear that applicant intended that the 81-page sequence listing be considered part of the international application despite the fact that applicant indicated that the number of sheets of the sequence listing was "0." This was clearly a mistake. Applicant explains that the error occurred because "Applicants were told on numerous occasions by authorized personnel at the PCT Help Desk that there was no fee for submitting a sequence listing when a PCT application is filed through EFS Web. As such, Applicants indicated . . . that the number of pages for the sequence listing was "0."

Thus, it is concluded that the 81-page sequence listing submitted electronically in compliance with Annex C of the PCT Administrative Instructions was intended to be part of the international application. However, applicant failed to properly complete the Request form. Nonetheless, applicant is responsible for knowing the proper procedures for filing a PCT application and filing out a Request form using PCT-SAFE. For this reason, the $400.00 petition fee will not be waived.

CONCLUSION

Applicant's petition under 37 CFR 1.182 is hereby **GRANTED**.

The 81-page sequence listing submitted in electronic form on 07 September 2007 shall form part of the international application.

This application is being forwarded to the RO/US for further processing.

A copy of the 81-page sequence listing will be forwarded to the IB along with a copy of this decision. Applicant should request that the IB republish the international application with the sequence listing.

James Thomson

James Thomson
Attorney Advisor
Office of PCT Legal Administration

PCT/US2007/077845

Tel.: (571) 272-3302

cc: The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20
Switzerland

TO:TRACI H. ROPP COMPANY:1 DNA WAY

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

AUGUST 15, 2007

PTAS

500335358A

TRACI H. ROPP
1 DNA WAY
MS#49
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 08/15/2007

REEL/FRAME: 019698/0968
NUMBER OF PAGES: 7

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).
DOCKET NUMBER: PR2368-1

ASSIGNOR:
ERNST, JAMES A. DOC DATE: 08/13/2007

ASSIGNOR:
POLAKIS, PAUL DOC DATE: 07/26/2007

ASSIGNOR:
RUBINFELD, BONNEE DOC DATE: 07/30/2007

ASSIGNOR:
DEALMEIDA, VENITA I. DOC DATE: 07/30/2007

ASSIGNEE:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY

TO:TRACI H. ROPP COMPANY:1 DNA WAY

SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA

94080-4990

019698/0968 PAGE 2

SERIAL NUMBER: 60951175 FILING DATE: 07/20/2007
PATENT NUMBER: ISSUE DATE:
TITLE: WNT ANTAGONISTS AND THEIR USE IN THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF WNT-MEDIATED DISORDERS

ASSIGNMENT SERVICES BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

TO:TRACI H. ROPP COMPANY:1 DNA WAY

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

08/15/2007
500335358

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
James A. Ernst	08/13/2007
Paul Polakis	07/26/2007
Bonnee Rubinfeld	07/30/2007
Venita I. DeAlmeida	07/30/2007

RECEIVING PARTY DATA

Name:	Genentech, Inc.
Street Address:	1 DNA Way
City:	South San Francisco
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080-4990

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	60951175

CH $40.00 60951175

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)952-9881
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: (650) 467-0481
Email: mazzeo.joan@gene.com
Correspondent Name: Traci H. Ropp
Address Line 1: 1 DNA Way
Address Line 2: MS#49
Address Line 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080-4990

ATTORNEY DOCKET NUMBER:	PR2368-1
NAME OF SUBMITTER:	Traci H. Ropp

Total Attachments: 5

TO:TRACI H. ROPP COMPANY:1 DNA WAY

source=PR2368_1_Executed_Assignment#page1.tif
source=PR2368_1_Executed_Assignment#page2.tif
source=PR2368_1_Executed_Assignment#page3.tif
source=PR2368_1_Executed_Assignment#page4.tif
source=PR2368_1_Executed_Assignment#page5.tif

Docket No. PR2368-1

ASSIGNMENT

WHEREAS, James A. Ernst, a citizen of US, residing at 758 Clayton Street, San Francisco, CA 94117, and Paul Polakis, a citizen of US, residing at 265 West Blithedale Avenue, Mill Valley, CA 94941, and Bonnee Rubinfeld, a citizen of US, residing at 4186 Quail Run Drive, Danville, CA 94506, and Venita I. DeAlmeida, a citizen of IN, residing at 965 Buckland Avenue, San Carlos, CA 94070 (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

WNT ANTAGONISTS AND THEIR USE IN THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF WNT-MEDIATED DISORDERS

for which a provisional application Serial No. 60/951,175 (Docket No. PR2368-1) has been filed by them on July 20, 2007; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Application No. 60/951,175 Docket No. PR2368-1

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco
Dated: 8/13/07

James A. Ernst

South San Francisco
Dated: _____

Paul Polakis

South San Francisco
Dated: _____

Bonnee Rubinfeld

South San Francisco
Dated: _____

Venita I. DeAlmeida

626

Application No. 60/951,175 Docket No. PR2368-1

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: _____

James A. Ernst

South San Francisco

Dated: 7/26/07

Paul Polakis

South San Francisco

Dated: _____

Bonnee Rubinfeld

South San Francisco

Dated: _____

Venita I. DeAlmeida

Application No. 60/951,175 Docket No. PR2368-1

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: _____

James A. Ernst

South San Francisco

Dated: _____

Paul Polakis

South San Francisco

Dated: 7.30.07

Bonnee Rubinfeld

South San Francisco

Dated: _____

Venita I. DeAlmeida

Application No. 60/951,175 Docket No. PR2368-1

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: _____

_____
James A. Ernst

South San Francisco

Dated: _____

_____
Paul Polakis

South San Francisco

Dated: _____

_____
Bonnee Rubinfeld

South San Francisco

Dated: 7/30/2007

V DeAlmeida
Venita I. DeAlmeida

109116
629

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

JANUARY 18, 2007

PTAS

500208374A

500208374A

CRAIG G. SVOBODA
1 DNA WAY
M/S 49
SO. SAN FRANCISCO, CA 94080-4990

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 01/17/2007

REEL/FRAME: 018768/0131
NUMBER OF PAGES: 7

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).
DOCKET NUMBER: PR2368

ASSIGNOR:
ERNST, JAMES A. DOC DATE: 12/13/2006

ASSIGNOR:
POLAKIS, PAUL DOC DATE: 12/12/2006

ASSIGNOR:
RUBINFELD, BONNEE DOC DATE: 12/19/2006

ASSIGNOR:
DEALMEIDA, VENITA I. DOC DATE: 01/16/2007

ASSIGNEE:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
M/S 49
SO SAN FRANCISCO, CALIFORNIA

94080-4990

SERIAL NUMBER: 60825063 FILING DATE: 09/08/2006
PATENT NUMBER: ISSUE DATE:
TITLE: WNT ANTAGONISTS AND THEIR USE IN THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF WNT-MEDIATED DISORDERS

ASSIGNMENT SERVICES BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

01/17/2007
500208374

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
James A. Ernst	12/13/2006
Paul Polakis	12/12/2006
Bonnee Rubinfeld	12/19/2006
Venita I. DeAlmeida	01/16/2007

RECEIVING PARTY DATA

Name:	Genentech, Inc.
Street Address:	1 DNA Way
Internal Address:	M/S 49
City:	So San Francisco
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080-4990

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	60825063

CH $40.00 60825063

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)952-9881
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: 6502251489
Email: svoboda@gene.com
Correspondent Name: Craig G. Svoboda
Address Line 1: 1 DNA Way
Address Line 2: M/S 49
Address Line 4: So. San Francisco, CALIFORNIA 94080-4990

ATTORNEY DOCKET NUMBER:	PR2368
NAME OF SUBMITTER:	Craig G. Svoboda

Total Attachments: 5
source=PR2368_Assignment#page1.tif
source=PR2368_Assignment#page2.tif
source=PR2368_Assignment#page3.tif
source=PR2368_Assignment#page4.tif
source=PR2368_Assignment#page5.tif

637

Docket No. PR2368

ASSIGNMENT

WHEREAS, James A. Ernst, a citizen of US, residing at 758 Clayton Street, San Francisco, CA 94117, and Paul Polakis, a citizen of US, residing at 265 West Blithedale Avenue, Mill Valley, CA 94941, and Bonnee Rubinfeld, a citizen of US, residing at 4186 Quail Run Drive, Danville, CA 94506, and Venita I. DeAlmeida, a citizen of IN, residing at 965 Buckland Avenue, San Carlos, CA 94070 (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

WNT Antagonists and Their Use in the Diagnosis and Treatment of WNT-Mediated Disorders

for which a provisional application Serial No. 60/825,0630 (Docket No. PR2368) has been filed by them on September 8, 2006; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

#634

Application No. 60/825,0630 Docket No. PR2368

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco
Dated: 12/13/06

James A. Ernst
James A. Ernst

South San Francisco
Dated: _____

_____
Paul Polakis

South San Francisco
Dated: _____

_____
Bonnee Rubinfeld

South San Francisco
Dated: _____

_____
Venita I. DeAlmeida

Application No. 60/825,0630 Docket No. PR2368

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: _____

James A. Ernst

South San Francisco

Dated: 12·12·06

Paul Polakis

Paul Polakis

South San Francisco

Dated: _____

Bonnee Rubinfeld

South San Francisco

Dated: _____

Venita I. DeAlmeida

Application No. 60/825,0630 Docket No. PR2368

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco
Dated: _____

James A. Ernst

South San Francisco
Dated: _____

Paul Polakis

South San Francisco
Dated: 12/19/06

Bonnee Rubinfeld

South San Francisco
Dated: _____

Venita I. DeAlmeida

637

Application No. 60/825,0630 Docket No. PR2368

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: _____

James A. Ernst

South San Francisco

Dated: _____

Paul Polakis

South San Francisco

Dated: _____

Bonnee Rubinfeld

South San Francisco

Dated: 1/16/07

VDeAlmeida

Venita I. DeAlmeida

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*

This public document

2. has been signed by T. Lawrence

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the twelfth of March, 2009

7. by *Assistant Authentication Officer, United States Department of State*

8. No. 09016766-4

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Sonya N. Johnson

6-40

A 7171986

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

February 28, 2009

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON JANUARY 17, 2007.

By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office

T. Lawrence

T. LAWRENCE
Certifying Officer

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
James A. Ernst	12/13/2006
Paul Polakis	12/12/2006
Bonnee Rubinfeld	12/19/2006
Venita I. DeAlmeida	01/16/2007

RECEIVING PARTY DATA

Name:	Genentech, Inc.
Street Address:	1 DNA Way
Internal Address:	M/S 49
City:	So San Francisco
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080-4990

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	60825063

CH $40.00 60825063

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)952-9881
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: 6502251489
Email: svoboda@gene.com
Correspondent Name: Craig G. Svoboda
Address Line 1: 1 DNA Way
Address Line 2: M/S 49
Address Line 4: So. San Francisco, CALIFORNIA 94080-4990

ATTORNEY DOCKET NUMBER:	PR2368
NAME OF SUBMITTER:	Craig G. Svoboda

Total Attachments: 5
source=PR2368_Assignment#page1.tif
source=PR2368_Assignment#page2.tif
source=PR2368_Assignment#page3.tif
source=PR2368_Assignment#page4.tif
source=PR2368_Assignment#page5.tif

6293

Docket No. PR2368

ASSIGNMENT

WHEREAS, James A. Ernst, a citizen of US, residing at 758 Clayton Street, San Francisco, CA 94117, and Paul Polakis, a citizen of US, residing at 265 West Blithedale Avenue, Mill Valley, CA 94941, and Bonnee Rubinfeld, a citizen of US, residing at 4186 Quail Run Drive, Danville, CA 94506, and Venita I. DeAlmeida, a citizen of IN, residing at 965 Buckland Avenue, San Carlos, CA 94070 (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

WNT Antagonists and Their Use in the Diagnosis and Treatment of WNT-Mediated Disorders

for which a provisional application Serial No. 60/825,0630 (Docket No. PR2368) has been filed by them on September 8, 2006; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

Application No. 60/825,0630 Docket No. PR2368

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco
Dated: 12/13/06

James A. Ernst

South San Francisco
Dated: _____

_____
Paul Polakis

South San Francisco
Dated: _____

_____
Bonnee Rubinfeld

South San Francisco
Dated: _____

_____
Venita I. DeAlmeida

Application No. 60/825,0630 Docket No. PR2368

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: _____

James A. Ernst

South San Francisco

Dated: 12·12·06

Paul Polakis

Paul Polakis

South San Francisco

Dated: _____

Bonnee Rubinfeld

South San Francisco

Dated: _____

Venita I. DeAlmeida

Application No. 60/825,0630 Docket No. PR2368

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: _____

_____
James A. Ernst

South San Francisco

Dated: _____

_____
Paul Polakis

South San Francisco

Dated: 12/19/06

Bonnee Rubinfeld
Bonnee Rubinfeld

South San Francisco

Dated: _____

_____
Venita I. DeAlmeida

647

Application No. 60/825,0630 Docket No. PR2368

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: _____

_____

James A. Ernst

South San Francisco

Dated: _____

_____

Paul Polakis

South San Francisco

Dated: _____

_____

Bonnee Rubinfeld

South San Francisco

Dated: 1/16/07

VDeAlmeida

Venita I. DeAlmeida

649

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Cesión a GENENTECH, INC. firmado por los cedentes y el cesionario.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por T. Lawrence
3. actuando en capacidad de Funcionario que Certifica
4. lleva el sello/timbre de la Oficina de Marcas y Patentes de E.U.

Certificado

5. en Washington D.C.
6. el doce de Marzo de 2009
7. por el Funcionario de Autenticación Asistente, Departamento de Estado de Estados Unidos
8. No. 09016766-4
9. Sello/timbre

10. Firma

(Firma)

Sonya N. Johnson

[sello]

650

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
A TODO AQUEL QUE PUEDA LLEGARLE LA PRESENTE:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE ESTADOS UNIDOS
Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos

28 de Febrero de 2009

ESTE ES PARA CERTIFICAR QUE EL ANEXO ES UNA COPIA VERDADERA DE LOS ARCHIVOS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO ARCHIVADO EL 17 DE ENERO DE 2007

Por autoridad del
Subsecretario de Comercio para la Propiedad Intelectual
y Director de la Oficina de Marcas y Patente de Estados Unidos

(Firma)

T. LAWRENCE
Funcionario que Certifica

Hay un sello que dice:

Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos
Departamento de Comercio

650
651

CESIÓN DE PATENTE

Versión electrónica v1.1

Versión de la hoja v1.1

TIPO DE PRESENTACIÓN:	CESIÓN NUEVA
NATURALEZA DEL ACUERDO:	CESIÓN

DATOS DE LA PARTE CEDENTE:

Nombre	Fecha de ejecución
James, A. Ernst	12/13/2006
Paul Polakis	12/12/2006
Bonnee Rubinfeld	12/19/2006
Venita I. DeAlmeida	01/16/2006

DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE

Nombre:	Genentech, Inc.
Dirección:	1 DNA Way
Dirección Interna:	M/S 49
Ciudad:	South San Francisco
Estado/País:	CALIFORNIA
Código Postal:	94080-4990

NÚMEROS DEL PROPIETARIO Total: 1

Tipo de Propiedad	Número
Número de solicitud	60825063

DATOS DE CORRESPONDENCIA

NUMERO DE FAX: (650) 849-6666

La correspondencia se enviará por Correo de Estados Unidos cuando los intentos de hacerlo por fax no sean exitosos.

Teléfono: 650 – 225 – 1489

Email: svoboda@gene.com

Nombre de destinatario: Craig G. Svoboda

Dirección línea 1: 1 DNA Way

Dirección línea 2: M/S 49

Dirección Línea 4: So. San Francisco, CALIFORNIA 94080-4990

NUMERO DE EXPEDIENTE DEL ABOGADO:	PR2368
NOMBRE DEL REMITENTE:	Craig G. Svoboda

Anexos totales: 5

Fuente= PR2368_Cesión#página1.tif

Fuente= PR2368_Cesión#página2.tif

Fuente= PR2368_Cesión#página3.tif

Fuente= PR2368_Cesión#página4.tif

Fuente= PR2368_Cesión#página5.tif

653

Número de Archivo: PR2368

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, James A.ERNST, ciudadano de Estados Unidos, residente en 758 Clayton Street, San Francisco, CA 94117, y Paul POLAKIS, ciudadano de Estados Unidos, residente en 265 West Blithedale Avenue, Mill Valley, CA 94941, y Bonnee RUBINFELD, ciudadano de Estados Unidos, residente en 4186 Quail Run Drive, Danville, CA 94506, y Venita I. DeALMEIDA, ciudadano de India, residente en 965 Buckland Avenue, San Carlos, CA 94070 (en adelante referidos como "CEDENTE"), han inventado una invención nueva y útil en

ANTAGONISTAS DE WNT Y SU USO EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE TRASTORNOS MEDIADOS POR WNT

para la cual se presentó la solicitud provisional No. 60/825,0630 (Expediente No. PR2368) por ellos el 8 de septiembre de 2006; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las Letras de patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dicho CEDENTE ha y por la presente vende, cede, transfiere y traspasa a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de Paris para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a las Letras de patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas Letras de patentes a GENENTECH, INC., de acuerdo con esta cesión.

Dicho CEDENTE garantiza y acuerda cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENETECH, INC., a disfrutar hasta su máxima extensión el derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTE incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENETECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucran dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucran dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dicho CEDENTE al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENETECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben lastimar a benefició de dicha GENETECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTE, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Dicho CEDENTE por la presente garantizan y manifiestan que no ha entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

PATENTE
ROLLO: 018768 CUADRO: 0133

564

Solicitud No.: 60/825,0630

Número de Archivo: PR2368

EN TESTIMONIO DE LO CUAL suscribimos como sigue:

(Firma)

South San Francisco — James A. Ernst

Fechado: 12/13/ 06

South San Francisco — Paul Polakis

Fechado: _____

South San Francisco — Bonnee Rubinfeld

Fechado: _____

South San Francisco — Venita I. DeAlmeida

Fechado: _____

PATENTE
ROLLO: 018768 CUADRO: 0134

Solicitud No.: 60/825,0630

Número de Archivo: PR2368

EN TESTIMONIO DE LO CUAL suscribimos como sigue:

South San Francisco

Fechado: _____

_____
James A. Ernst

South San Francisco

Fechado: 12/13/ 06

_____ (Firma)
Paul Polakis

South San Francisco

Fechado: _____

_____
Bonnee Rubinfeld

South San Francisco

Fechado: _____

_____
Venita I. DeAlmeida

PATENTE
ROLLO: 018768 CUADRO: 0135

656

Solicitud No.: 60/825,0630

Número de Archivo: PR2368

EN TESTIMONIO DE LO CUAL suscribimos como sigue:

South San Francisco

Fechado: _____

James A. Ernst

South San Francisco

Fechado: _____

Paul Polakis

South San Francisco

Fechado: 12/13/06

(Firma)
Bonnee Rubinfeld

South San Francisco

Fechado: _____

Venita I. DeAlmeida

PATENTE
ROLLO: 018768 CUADRO: 0136

Solicitud No.: 60/825,0630

Número de Archivo: PR2368

EN TESTIMONIO DE LO CUAL suscribimos como sigue:

South San Francisco

Fechado: _____

_____
James A. Ernst

South San Francisco

Fechado: _____

_____
Paul Polakis

South San Francisco

Fechado: _____

_____
Bonnee Rubinfeld

South San Francisco

Fechado: 12/13/06

_____(Firma)_____
Venita I. DeAlmeida

DOCUMENTADO: 01/17/2007

PATENTE
ROLLO: 018768 CUADRO: 0137

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*

This public document

2. has been signed by E. Bornett

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the twelfth of March, 2009

7. by *Assistant Authentication Officer, United States Department of State*

8. No. 09016766-5

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Sonya N. Johnson

68

A 7171986

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

March 03, 2009

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON AUGUST 15, 2007.

By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office

E. BORNETT
Certifying Officer

661

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
James A. Ernst	08/13/2007
Paul Polakis	07/26/2007
Bonnee Rubinfeld	07/30/2007
Venita I. DeAlmeida	07/30/2007

RECEIVING PARTY DATA

Name:	Genentech, Inc.
Street Address:	1 DNA Way
City:	South San Francisco
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080-4990

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	60951175

CH $40.00 60951175

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)952-9881
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: (650) 467-0481
Email: mazzeo.joan@gene.com
Correspondent Name: Traci H. Ropp
Address Line 1: 1 DNA Way
Address Line 2: MS#49
Address Line 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080-4990

ATTORNEY DOCKET NUMBER:	PR2368-1
NAME OF SUBMITTER:	Traci H. Ropp

Total Attachments: 5

500335358

source=PR2368_1_Executed_Assignment#page1.tif
source=PR2368_1_Executed_Assignment#page2.tif
source=PR2368_1_Executed_Assignment#page3.tif
source=PR2368_1_Executed_Assignment#page4.tif
source=PR2368_1_Executed_Assignment#page5.tif

Docket No. PR2368-1

ASSIGNMENT

WHEREAS, James A. Ernst, a citizen of US, residing at 758 Clayton Street, San Francisco, CA 94117, and Paul Polakis, a citizen of US, residing at 265 West Blithedale Avenue, Mill Valley, CA 94941, and Bonnee Rubinfeld, a citizen of US, residing at 4186 Quail Run Drive, Danville, CA 94506, and Venita I. DeAlmeida, a citizen of IN, residing at 965 Buckland Avenue, San Carlos, CA 94070 (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

WNT ANTAGONISTS AND THEIR USE IN THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF WNT-MEDIATED DISORDERS

for which a provisional application Serial No. 60/951,175 (Docket No. PR2368-1) has been filed by them on July 20, 2007; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

664

Application No. 60/951,175 Docket No. PR2368-1

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: 8/13/07

James A. Ernst

South San Francisco

Dated: _____

Paul Polakis

South San Francisco

Dated: _____

Bonnee Rubinfeld

South San Francisco

Dated: _____

Venita I. DeAlmeida

Application No. 60/951,175 Docket No. PR2368-1

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: _____

_____
James A. Ernst

South San Francisco

Dated: 7/26/07

_____
Paul Polakis

South San Francisco

Dated: _____

_____
Bonnee Rubinfeld

South San Francisco

Dated: _____

_____
Venita I. DeAlmeida

666

Application No. 60/951,175 Docket No. PR2368-1

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: _____

_____
James A. Ernst

South San Francisco

Dated: _____

_____
Paul Polakis

South San Francisco

Dated: 7.30.07

Bonnee Rubinfeld
Bonnee Rubinfeld

South San Francisco

Dated: _____

_____
Venita I. DeAlmeida

Application No. 60/951,175 Docket No. PR2368-1

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: _____

_____
James A. Ernst

South San Francisco

Dated: _____

_____
Paul Polakis

South San Francisco

Dated: _____

_____
Bonnee Rubinfeld

South San Francisco

Dated: 7/30/2007

VDeAlmeida
Venita I. DeAlmeida

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Cesión a GENENTECH, INC. firmado por los cedentes y el cesionario.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por E. Bornett
3. actuando en capacidad de Funcionario que Certifica
4. lleva el sello/timbre de la Oficina de Marcas y Patentes de E.U.

Certificado

5. en Washington D.C.
6. el doce de Marzo de 2009
7. por el Funcionario de Autenticación Asistente, Departamento de Estado de Estados Unidos
8. No. 09016766-5
9. Sello/timbre

10. Firma

(Firma)

Sonya N. Johnson

[sello]

670

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
A TODO AQUEL QUE PUEDA LLEGARLE LA PRESENTE:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE ESTADOS UNIDOS
Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos

3 de marzo de 2009

ESTE ES PARA CERTIFICAR QUE EL ANEXO ES UNA COPIA VERDADERA DE LOS ARCHIVOS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO ARCHIVADO EL 15 DE AGOSTO DE 2007

Por autoridad del
Subsecretario de Comercio para la Propiedad Intelectual
y Director de la Oficina de Marcas y Patente de Estados Unidos

_____(Firma)_____
E. Bornett
Funcionario que Certifica

Hay un sello que dice:
Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos
Departamento de Comercio

CESIÓN DE PATENTE

Versión electrónica v1.1

Versión de la hoja v1.1

TIPO DE PRESENTACIÓN:	CESIÓN NUEVA
NATURALEZA DEL ACUERDO:	CESIÓN

DATOS DE LA PARTE CEDENTE:

Nombre	Fecha de ejecución
James, A. Ernst	08/13/2006
Paul Polakis	07/26/2006
Bonnee Rubinfeld	07/30/2006
Venita I. DeAlmeida	07/30/2006

DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE

Nombre:	Genentech, Inc.
Dirección:	1 DNA Way
Ciudad:	South San Francisco
Estado/País:	CALIFORNIA
Código Postal:	94080-4990

NÚMEROS DEL PROPIETARIO Total: 1

Tipo de Propiedad	Número
Número de solicitud	60951175

DATOS DE CORRESPONDENCIA

NUMERO DE FAX: (650) 952-9881

La correspondencia se enviará por Correo de Estados Unidos cuando los intentos de hacerlo por fax no sean exitosos.

Teléfono: 650 – 467-0481

Email: mazzeo.joan@gene.com

Nombre de destinatario: Traci H. Ropp

Dirección línea 1: 1 DNA Way

Dirección línea 2: MS#49

Dirección Línea 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080-4990

NUMERO DE EXPEDIENTE DEL ABOGADO:	PR2368-1
NOMBRE DEL REMITENTE:	Traci H. Ropp

Anexos totales: 5

Fuente= PR2368_1_Cesión_Ejecutada#página1.tif

Fuente= PR2368_1_Cesión_Ejecutada #página2.tif

Fuente= PR2368_1_Cesión_Ejecutada #página3.tif

Fuente= PR2368_1_Cesión_Ejecutada #página4.tif

Fuente= PR2368_1_Cesión_Ejecutada #página5.tif

Número de Archivo: PR2368

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, James A.ERNST, ciudadano de Estados Unidos, residente en 758 Clayton Street, San Francisco, CA 94117, y Paul POLAKIS, ciudadano de Estados Unidos, residente en 265 West Blithedale Avenue, Mill Valley, CA 94941, y Bonnee RUBINFELD, ciudadano de Estados Unidos, residente en 4186 Quail Run Drive, Danville, CA 94506, y Venita I. DeALMEIDA, ciudadano de India, residente en 965 Buckland Avenue, San Carlos, CA 94070 (en adelante referidos como "CEDENTE"), han inventado una invención nueva y útil en

ANTAGONISTAS DE WNT Y SU USO EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE TRASTORNOS MEDIADOS POR WNT

para la cual se presentó la solicitud provisional No. 60/951,175 (Expediente No. PR2368-1) por ellos el 20 de julio de 2007; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las Letras de patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dicho CEDENTE ha y por la presente vende, cede, transfiere y traspasa a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de Paris para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a las Letras de patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas Letras de patentes a GENENTECH, INC., de acuerdo con esta cesión.

Dicho CEDENTE garantiza y acuerda cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENETECH, INC., a disfrutar hasta su máxima extensión el derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTE incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENETECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucran dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucran dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dicho CEDENTE al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENETECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben lastimar a benefició de dicha GENETECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTE, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

PATENTE
ROLLO: 019698 CUADRO: 0970

Solicitud No.: 60/951,175

Número de Archivo: PR2368-1

Dicho CEDENTE por la presente garantizan y manifiestan que no ha entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL suscribimos como sigue:

(Firma)

South San Francisco — James A. Ernst

Fechado: 8/13/07

South San Francisco — Paul Polakis

Fechado: _____

South San Francisco — Bonnee Rubinfeld

Fechado: _____

South San Francisco — Venita I. DeAlmeida

Fechado: _____

PATENTE
ROLLO: 019698 CUADRO: 0971

675

Solicitud No.: 60/951,175

Número de Archivo: PR2368-1

EN TESTIMONIO DE LO CUAL suscribimos como sigue:

South San Francisco

Fechado: _____

James A. Ernst

(Firma)

South San Francisco

Fechado: 7/26/07

Paul Polakis

South San Francisco

Fechado: _____

Bonnee Rubinfeld

South San Francisco

Fechado: _____

Venita I. DeAlmeida

PATENTE
ROLLO: 019698 CUADRO: 0972

Solicitud No.: 60/951,175

Número de Archivo: PR2368-1

EN TESTIMONIO DE LO CUAL suscribimos como sigue:

South San Francisco

Fechado: _____

James A. Ernst

South San Francisco

Fechado: _____

Paul Polakis

South San Francisco

Fechado: 7/30/07

(Firma)
Bonnee Rubinfeld

South San Francisco

Fechado: _____

Venita I. DeAlmeida

PATENTE
ROLLO: 019698 CUADRO: 0973

Solicitud No.: 60/951,175

Número de Archivo: PR2368-1

EN TESTIMONIO DE LO CUAL suscribimos como sigue:

South San Francisco

Fechado: _____

James A. Ernst

South San Francisco

Fechado: _____

Paul Polakis

South San Francisco

Fechado: _____

Bonnee Rubinfeld

South San Francisco

Fechado: 7/30/07

_____(Firma)_____
Venita I. DeAlmeida

DOCUMENTADO: 08/15/2007

PATENTE
ROLLO: 019698 CUADRO: 0974

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country: United States of America*
   This public document
2. *has been signed by AIDA MICLAT GUIAM*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of AIDA MICLAT GUIAM, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 15th day of December 2005*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 267083*
9. *Seal/Stamp:*

10. *Signature*

Como Notaria 16 del Circulo de Bogotá, hago constar que esta fotocopia, corresponde a copia, de copia que he tenido a la vista Bogotá, D.C. - República de Colombia

DIC 2005

BEATRIZ VARGAS NAVARRO
NOTARIA 16

Secretary of State

BY

NP-24 A (REV. 4-05)

OSP 05 90772

679

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of San Mateo } ss.

On December 6, 2005 (Date) before me, Aida Miclat Guiam (Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public"))

personally appeared Timothy R. Schwartz (Name(s) of Signer(s))

☐ personally known to me
☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person~~(s)~~ whose name~~(s)~~ is/~~are~~ subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/~~she/they~~ executed the same in his/~~her/their~~ authorized capacity~~(ies)~~, and that by his/~~her/their~~ signature~~(s)~~ on the instrument the person~~(s)~~, or the entity upon behalf of which the person~~(s)~~ acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

Signature of Notary Public

AIDA MICLAT GUIAM
Commission # 1455662
Notary Public - California
San Mateo County
My Comm. Expires Dec 9, 2007

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: _____

Document Date: _____ Number of Pages: _____

Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

© 1999 National Notary Association • 9350 De Soto Ave., P.O. Box 2402 • Chatsworth, CA 91313-2402 • www.nationalnotary.org Prod. No. 5907 Reorder: Call Toll-Free 1-800-876-6827

Brigard & Castro
BOGOTA - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **BEATRIZ JARAMILLO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **HECTOR GOMEZ MEJIA**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **BEATRIZ JARAMILLO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **HECTOR GOMEZ MEJIA**,, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

Nombre
Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We) **Genentech, Inc.**
1 DNA Way

domiciled in **South San Francisco, California 94080-4990**
USA

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **BEATRIZ JARAMILLO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **HECTOR GOMEZ MEJIA**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or explotation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages: claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **BEATRIZ JARAMILLO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in **South San Francisco, California USA**

this 6th day of December 2005

Signature

Name Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Title Section Patent Counsel
Authorized Corporate Signatory
Genentech, Inc.

701

AUTHORIZATION

Genentech, Inc. hereby authorizes any of Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec and Timothy R. Schwartz, for so long as they remain employees of Genentech, Inc., to execute, on its behalf, any submissions associated with the filing, prosecution, granting, and extension and maintenance of grant of patent and trademark applications in the U.S. and foreign countries, contracts relating to biological deposits with the American Type Culture Collection, and assignments to publishers of copyrights covering works authored by Genentech employees.

August 27, 2002
Dated

Sean Johnston
Sean A. Johnston
Vice President,Intellectual Property
Genentech, Inc.



680
702

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por **Genentech, Inc.** domiciliada en **1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, Estados Unidos de América**.

ESTADO DE CALIFORNIA
SECRETARIA DE ESTADO

APOSTILLA
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1 País: Estados Unidos de América
Esta documento público
2. ha sido firmado por AIDA MICLAT GUIAM
3. actuando en capacidad de Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello/timbre de AIDA MICLAT GUIAM, Notario Público
Estado de California

CERTIFICADO

5. en Sacramento, California
6. el 15 de diciembre de 2005
7. por el Secretario de Estado Delegado, Estado de California
8. No. 267083
9. Sello/Timbre

10. Firma

(Firma)
Secretario de Estado



RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

Estado de California)
} ss.
Condado de San Mateo)

El 6 de diciembre de 2005, ante mi, AIDA MICLAT GUIAM, apareció personalmente Thimoty R. Schwartz

☐ a quien conozco personalmente

☒ quien demostró ante mi en base a evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre esta suscrito en el instrumento y quien reconoció ante mi que ejecutó el mismo en su capacidad autorizada, y que por su firma en el instrumento la persona o la entidad a nombre de la cual la persona actuó, ejecutó el instrumento.

Hay un sello que dice:
AIDA MICLAT GUIAM
COMISIÓN # 14556612
Notario Público-California
Condado de San Mateo
Mi comisión expira Dic. 9 de 2007

Atestigua mi firma y sello oficial,

AIDA MICLAT GUIAM

----------**OPCIONAL**----------

Aunque la información en esta sección no es requerida por la ley, puede probar ser valiosa para las personas que se basan en el documento y puede prevenir la remoción y readhesión fraudulenta de esta forma a otro documento

Descripción adicional de cualquier documento anexo

Título o tipo de documento: _____

Fecha del Documento: _____ Número de páginas: _____

Firmante(s) diferente(s) a (los) nombrado(s) arriba: _____

Capacidad(es) Reivindicada(s) por el (los) firmante(s)

Nombre del firmante:_____

☐ Individuo
☐ Funcionario Corporativo – Titulo(s): _____
☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
☐ Abogado de hecho
☐ Fideicomisario
☐ Guardián o conservador
☐ Otro: _____

El firmante representa: _____

Huella Índice derecho del firmante
Parte alta del dedo aquí



704

AUTORIZACION

Genentech, Inc. por la presente autoriza a cualquiera de Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec y Thomity R. Schwartz, mientras permanezcan como empleados de Genentech, Inc., a ejecutar, a su nombre, cualquier solicitud asociada con presentación, procesamiento, consecución, y extensión y mantenimiento de concesión de solicitudes de patente y marca registrada en los Estados Unidos y países extranjeros, contratos relacionados con depósitos biológicos con la Colección Americana de Tipo de Cultivo, y cesiones a publicistas de derechos de autor que cubran los trabajos de autoría de los empleados de Genentech.

27 de Agosto de 2002
Fechado

(Firma)
Sean A. Johnston
Vicepresidente, Propiedad Intelectual
Genentech, Inc.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. *Country: United States of America*

This public document:

2. *has been signed by Harriet Smith Windsor*

3. *acting in the capacity of Secretary of State of Delaware*

4. *bears the seal/stamp of Office of Secretary of State*

Certified

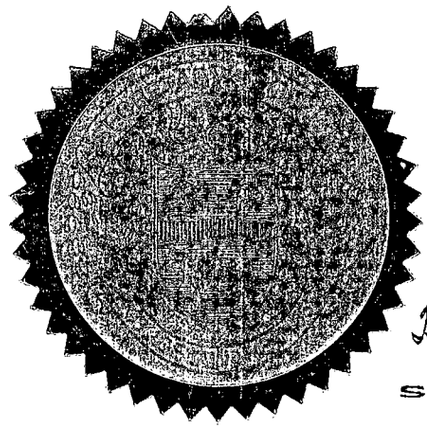
5. *at Dover, Delaware*

6. *the twenty-fourth day of May, A.D. 2005*

7. *by Secretary of State, Delaware Department of State*

8. *No. 0254030*

9. *Seal/Stamp:*



10. *Signature:*

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

Como Notaria 16 del Circuito de Bogotá, hago constar que esta fotocopia, corresponde a la vista de copia que fue presentado a la vista D.C. - República de Colombia

11 DIC 2006

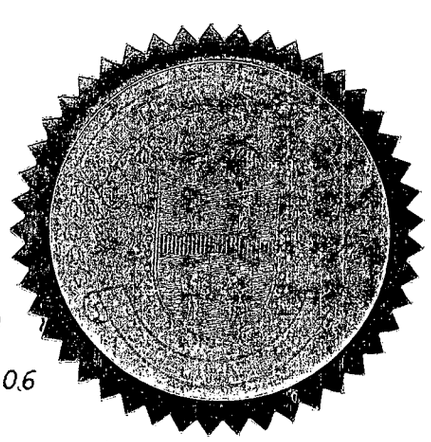
BEATRIZ HELENA GUERRERO NAVARRO
NOTARIA 16

706

Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.



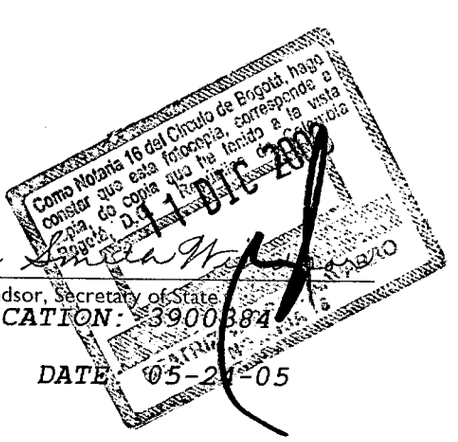
Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050426506

AUTHENTICATION: 3900884

DATE: 05-24-05



707

AMENDED AND RESTATED

CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (the "**Corporation**"), a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware, does hereby amend the Certificate of Incorporation of the Corporation, which was originally filed on December 23, 1986 under the name "Genentech Delaware, Inc.", and subsequently amended.

The Certificate of Incorporation of the Corporation is hereby restated and further amended to read in its entirety as follows:

ARTICLE 1

The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

The address of the registered office of the Corporation in the State of Delaware is Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, County of New Castle, Delaware 19805. The name of its registered agent at such address is Corporation Service Company.

ARTICLE 3

The purpose of the Corporation is to engage in any lawful act or activity for which corporations may be organized under the General Corporation Law of the State of Delaware as the same exists or may hereafter be amended ("**Delaware Law**").



ARTICLE 4

SECTION 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is four hundred million (400,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("**Preferred Stock**"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("**Common Stock**") The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the provisions of Section 242(b)(2) of Delaware Law.

SECTION 4.02. *Common Stock.* (a) *Issuance and Consideration.* Any unissued or treasury shares of the Common Stock may be issued for such consideration as may be fixed in accordance with applicable law from time to time by the Board of Directors.

(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, or in shares of stock and the holders of the Preferred Stock shall not be entitled to participate in any such dividends (unless otherwise provided by the Board of Directors in any resolution providing for the issue of a series of Preferred Stock).

SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

(a) *Series and Limits of Variations between Series.* Any unissued or treasury shares of the Preferred Stock may be issued from time to time in one or more series for such consideration as may be fixed from time to time by the Board of Directors. Before any shares of Preferred Stock of any particular series shall be issued, a certificate shall be filed with the Secretary of State of Delaware setting forth the designation, rights, privileges, restrictions, and conditions to be attached to the Preferred Stock of such series and such other matters as may be required and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine, in the manner provided by law, the particulars of

Como Notaria constan que esta copia, de copia que se Bogotá, D.C. - República de Colombia
11 DIC 2006
BEATRIZ NAVARRO

the shares of such series (so far as not inconsistent with the provisions of this Article 4 applicable to all series of Preferred Stock), including, but not limited to, the following:

(i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;

(ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;

(iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;

(iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;

(v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;

(vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;

(vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and

(viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.

Como Notaria 16 del Circulo de Bogotá, hago constar que esta fotocopia, corresponde a la vista copia, de copia que he tenido a la vista Bogotá, D.C. - República de Colombia
11 DIC 2006
BEATRIZ NAVARRO
NOTARIA 16

ARTICLE 5

SECTION 5.01. *Amendment of Bylaws by Directors.* (a) In furtherance and not in limitation of the powers conferred by statute, the Board of Directors is expressly authorized to make, alter, amend, repeal and rescind the bylaws of the Corporation, subject to Sections 5.01(b) and 5.01(c) hereof.

(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

SECTION 5.02. *Amendment of Certificate of Incorporation.* Section 5.01(b) of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon. Section 5.01(c) and Articles 8 and 9 of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

ARTICLE 6

SECTION 6.01. *Election of Directors by Holders of Preferred Stock.* During any period when the holders of any Preferred Stock or any one or more series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect a specified number of directors, by reason of dividend arrearages or other provisions giving them the right to do so, then and during such time as such right continues (i) the then otherwise authorized number of directors shall be increased by such specified number of directors, and the holders of such Preferred Stock or such series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect the additional directors so provided for, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series; (ii) each such additional director shall serve for such term, and have such voting powers, as shall be stated in the provisions pertaining to such Preferred Stock or series; and (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof are

Como Notaria 16 del Circulo de Bogotá, D.C. - República de Colombia
11 DIC 2006
BEATRIZ NAVARRO

divested of such rights to elect a specified number of directors, voting as a class, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, the terms of office of all directors elected by the holders of such Preferred Stock or series, voting as a class pursuant to such provisions or elected to fill any vacancies resulting from the death, resignation or removal of directors so elected by the holders of such Preferred Stock or series, shall forthwith terminate and the authorized number of directors shall be reduced accordingly.

SECTION 6.02. *Ballots*. Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

SECTION 6.03. *Elimination of Certain Personal Liability of Directors*. (a) A director of the Corporation shall not be liable to the Corporation or its stockholders for monetary damages for breach of fiduciary duty as a director to the fullest extent permitted by Delaware Law.

(b) Each person (and the heirs, executors or administrators of such person) who was or is a party or is threatened to be made a party to, or is involved in any threatened, pending or completed action, suit or proceeding, whether civil, criminal, administrative or investigative, by reason of the fact that such person is or was a director of the Corporation or is or was serving at the request of the Corporation as a director of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise, shall be indemnified and held harmless by the Corporation to the fullest extent permitted by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall also include the right to be paid by the Corporation the expenses incurred in connection with any such proceeding in advance of its final disposition to the fullest extent authorized by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall be a contract right.

(c) The Corporation may, by action of its Board of Directors, provide indemnification to such of the officers, employees and agents of the Corporation to such extent and to such effect as the Board of Directors shall determine to be appropriate and authorized by Delaware Law.

(d) The Corporation shall have power to purchase and maintain insurance on behalf of any person who is or was a director, officer, employee or agent of the Corporation, or is or was serving at the request of the Corporation as a director, officer, employee or agent of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise against any expense, liability or loss incurred by such person in any such capacity or arising out of his status as such, whether or

Como Notaria 16 del C... conster que esta fotocopia es copia, de copia que he tenido a... Bogotá, D.C. - República de... 11 DIC 2006 BEATRIZ NAVARRO NOTARIA 16

not the Corporation would have the power to indemnify him against such liability under Delaware Law.

(e) The rights and authority conferred in this Section 6.03 shall not be exclusive of any other right which any person may otherwise have or hereafter acquire.

(f) Neither the alteration, amendment, repeal or recission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect of this Section 6.03 in respect of any acts or omissions occurring prior to such alteration, amendment, repeal, recission, adoption or modification.

ARTICLE 7

SECTION 7.01. *Section 203 of Delaware Law.* The Corporation hereby elects not to be governed by Section 203 of Delaware Law.

ARTICLE 8

SECTION 8.01. *Relationship With Roche.* In anticipation that the Corporation will cease to be a wholly owned subsidiary of Roche Holdings, Inc., but that Roche (as defined in Section 8.05) will remain a stockholder of the Corporation, and in anticipation that the Corporation (as defined in Section 8.05) and Roche may engage in the same or similar activities or lines of business and have an interest in the same areas of corporate opportunities, and in recognition of (i) the benefits to be derived by the Corporation through its continued contractual, corporate and business relations with Roche (including service of officers and directors of Roche as directors of the Corporation) and (ii) the difficulties attendant to any director, who desires and endeavors fully to satisfy such director's fiduciary duties, in determining the full scope of such duties in any particular situation, the provisions of this Article 8 are set forth to regulate, define and guide the conduct of certain affairs of the Corporation as they may involve Roche and its officers and directors, and the powers, rights, duties and liabilities

Como Notaria 16 del Circuito de Bogotá, D.C. - República de Colombia hago constar que esta fotocopia, que antecede a copia, es copia fiel tomada de la vista 11 DIC 2006 BEATRIZ VARGAS NAVARRO NOTARIA 16

of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

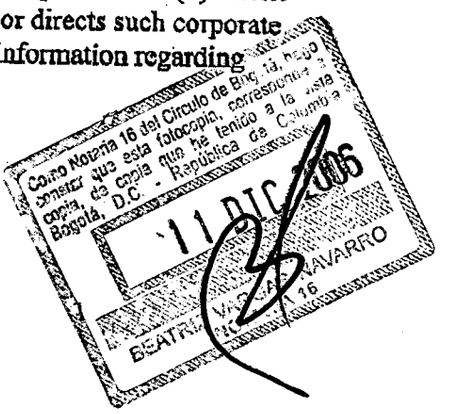
SECTION 8.02. *Similar Business Activities*. Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(a) Roche shall not have a duty to refrain from engaging directly or indirectly in the same or similar business activities or lines of business as the Corporation, and

(b) neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty by reason of any such activities of Roche or of such person's participation therein.

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty as a stockholder of the Corporation or controlling person of a stockholder by reason of the fact that Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself, directs such corporate opportunity to another person or entity, or does not communicate information regarding, or offer, such corporate opportunity to the Corporation.

SECTION 8.03. *Corporate Opportunities*. In the event that a director, officer or employee of the Corporation who is also a director, officer or employee of Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for the Corporation and Roche (whether such potential transaction or matter is proposed by a third-party or is conceived of by such director, officer or employee of the Corporation), such director, officer or employee shall be entitled to offer such corporate opportunity to the Corporation or Roche as such director, officer or employee deems appropriate under the circumstances in his sole discretion, and no such director, officer or employee shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that (i) such director, officer or employee offered such corporate opportunity to Roche (rather than the Corporation) or did not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation or (ii) Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself or directs such corporate opportunity to another person or does not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation.



SECTION 8.04. *Deemed Consent of Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 8.

SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term **"Corporation"** shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests, and (ii) the term **"Roche"** shall mean Roche Holdings, Inc. and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities (other than the Corporation, defined in accordance with clause (i) of this Section 8.05) that are **"affiliates"** (as defined in Rule 12b-2 under the Securities Exchange Act of 1934, as amended) of Roche Holdings, Inc.

SECTION 8.06. *Termination; Binding Effect.* Notwithstanding anything in this Certificate of Incorporation to the contrary, the foregoing provisions of this Article 8 shall expire on the date that Roche ceases to own beneficially Common Stock representing at least 5% of the number of outstanding shares of Common Stock of the Corporation and no person who is a director or officer of the Corporation is also a director or officer of Roche. Neither such expiration, nor the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 8 nor the adoption of any provision of this Amended and Restated Certificate of Incorporation inconsistent with any provision of this Article 8 shall eliminate or reduce the effect of this Article 8 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 8, would accrue or arise, prior to such expiration, alteration, amendment, repeal or adoption.

SECTION 8.07. *Article 9.* The provisions of this Article 8 are in addition to the provisions of Article 9.

ARTICLE 9

SECTION 9.01. *Contracts Not Void.* No contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) between the Corporation and Roche shall be void or voidable solely for the reason that Roche is a party thereto, or solely because any directors or officers of the Corporation who are affiliated with Roche are present at or participate in the

Como Notaria 16 del Circulo de Bogotá, D.C. Certifica que esta fotocopia, corresponde a copia, de copia que he tenido a la vista Bogotá, D.C. República de Colombia
11 DIC 2006
BEATRIZ NAVARRO
NOTARIA 16

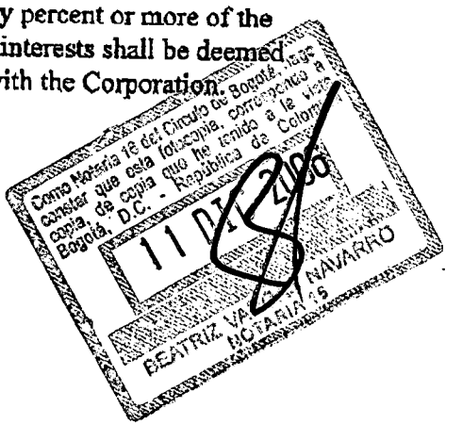
meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) shall be governed by the provisions of this Amended and Restated Certificate of Incorporation, the Corporation's Bylaws, Delaware Law and other applicable law. For purposes of this Article 9, the terms the "**Corporation**" and "**Roche**" have the meanings set forth in Section 8.05.

SECTION 9.02. *Quorum.* Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof). Outstanding shares of Common Stock owned by Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of stockholders that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof).

SECTION 9.03. *No Liability For Good Faith Actions.* Neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that Roche or an officer of director thereof in good faith takes any action or exercises any rights or gives or withholds any consent in connection with any agreement or contract between Roche and the Corporation. No vote cast or other action taken by any person who is an officer, director or other representative of Roche, which vote is cast or action is taken by such person in his capacity as a director of this Corporation, shall constitute an action of or the exercise of a right by or a consent of Roche for the purpose of any such agreement or contract.

SECTION 9.04. *Deemed Consent by Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

SECTION 9.05. *Contracts Covered.* For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests shall be deemed to be a contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation.



SECTION 9.06. *Binding Effect.* Neither the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 9 nor the adoption of any provision inconsistent with any provision of this Article 9 shall eliminate or reduce the effect of this Article 9 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 9, would accrue or arise, prior to such alteration, amendment, change, repeal or adoption.

SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.

Como Notaria 16 del Circuito de Bogotá, hago constar que esta fotocopia, corresponde a copia, de copia que he tenido a la vista Bogotá, D.C. - República de Colombia
1 DIC 2005
BEATRIZ NAVARRO
NOTARIA 16

IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 245 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of the General Corporation Law of the State of Delaware, has been executed this 22nd day of July, 1999.

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President,
General Counsel and Secretary



718

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
   Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254030
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



preferenciales, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Trecientos millones (300,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del número de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto afirmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de la Corporación con derecho a votar por la misma independiente de las consideraciones de la Sección 242(b)(2) de la Ley de Delaware.

SECCION 4.02. *Acción Común.* (a) *Emisión y Consideración.* Cualquier acción sin emitir o del tesoro del las Acciones Comunes puede emitirse para tal consideración como pueda fijarse de acuerdo con la ley aplicable cada cierto tiempo por la Junta Directiva.

(b) *Dividendos.* Sujeto a los derechos de los accionistas de las Acciones Preferenciales, los accionistas de Acciones Comunes deberán tener el derecho a recibir, cuando y como se declare por la Junta Directiva, de los activos de la Corporación los cuales están disponibles para ello por ley, dividendos pagables ya sea en dinero, propiedad, o acciones y los accionistas de la Acción Preferencial no tendrán derecho a participar en tales dividendos (a menos que la Junta Directiva determine lo contrario en cualquier resolución que condiciona la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

SECCIÓN 4.03. *Acción Preferencial*

(a) *Series y Límites de Variaciones entre Series.* Cualquier acción no emitida o del tesoro de las Acciones Preferenciales puede emitirse cada cierto tiempo en una o más series para tal consideración como pueda ser fijada cada cierto tiempo por la Junta Directiva. Antes de que se emita cualquier acción de las Acciones Preferenciales de cualquier serie particular, se deberá presentar un certificado ante el Secretario de Estado de Delaware estableciendo las designaciones, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones que irán anexas a las Acciones Preferenciales de tal serie y tales otras cuestiones como puedan requerirse, y la Junta Directiva deberá fijar y determinar, y por la presente está expresamente autorizada para fijar y determinar, en la forma provista por la ley, los

Como Notaria 16 del Circulo de Bogotá, hago constar que esta fotocopia, corresponde a copia de copia que he tenido a la vista Bogotá, D.C. - República de Colombia
2006
NOTARIA 16

720

CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
GENENTECH, INC.

Genentech, Inc (la "**Corporación**"), una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, por la presente corrige el Certificado de Incorporación, el fue presentado originalmente el 23 de diciembre de 1986, bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y corregido subsiguientemente.

Por la presente se vuelve a redactar el certificado de incorporación de la Corporación y se corrige aun más para que diga en su totalidad lo que sigue:

ARTICULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech, Inc.

ARTICULO 2

La dirección de la oficina registrada de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, Ciudad de Wilmington, Condado de New castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTICULO 3

El propósito de a Corporación es el de participar en cualquier acto o actividad legal para las cuales las corporaciones pueden ser organizadas bajo la Ley General de Corporación del Estado de Delaware como existe o puede ser modificada la misma en adelante ("**Delaware Law**").



ARTICULO 4

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de cuatrocientos millones (400,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones

particulares de las acciones de tal serie (siempre y cuando no sean inconsistentes con las condiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las series de Acciones Preferenciales), incluyendo, pero sin limitarse a, las siguientes:

(i) la designación distintiva de tal serie y el número de las acciones que han de constituir tal serie, numero que puede incrementarse (excepto cuando lo determine de otro modo la Junta Directiva al crear tal serie) o reducida (pero no por debajo del número de acciones de las mismas que están vigentes) cada cierto tiempo por una acción semejante de la Junta Directiva;

(ii) la tasa anual de dividendos a pagar sobre las acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales se pagarán tales dividendos y le fecha a partir de la cual los dividendos serán acumulativos en el evento que la Junta Directiva determine que los dividendos serán acumulativos;

(iii) si la serie tendrá o no derechos de voto, además de los derechos de voto provistos por la ley, y de ser así, los términos de tales derechos de voto;

(iv) si tal serie tendrá o no privilegios de conversión y, de ser así, los términos y condiciones de tal conversión, incluyendo, pero sin estar limitado a, la condición para ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y de tal forma como la Junta Directiva lo determine;

(v) si las acciones de tal serie serán o no redimibles y, de ser así, los términos y condiciones de tal redención, incluyendo la fecha o fechas en las cuales o después de las cuales pueden ser redimibles y la cantidad a pagar por acción en caso de redención, cantidad que variará bajo diferentes condiciones y en diferentes fechas de redención;

(vi) si tal serie tendrá o no un fondo de inversión para la redención o compra de acciones de esa serie y, de ser así, los términos y la cantidad de tal fondo de inversión;

(vii) los derechos de las acciones de tal serien caso de una liquidación, disolución o cierre voluntaria o involuntaria de la Corporación, y

los derechos relativos de prioridad, de haber, de pago de acciones de esa serie; y

(viii) cualquier otro derecho relativo, preferencia y limitación de tal serie.

ARTICULO 5

SECCION 5.01. *Enmiendas a los estatutos por los Directores.* (a) En adición y no limitando los poderes conferidos por estatutos, la Junta Directiva esta expresamente autorizada para hacer, alterar, enmendar, rechazar y rescindir los estatutos de la Corporación, sujetos a las secciones 5.01(b) y 5.01(c) a continuación.

(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.04, 3.05, 3.14 y 5.06 de los estatutos solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos solo pueden ser alteradas, enmendadas, repelidas, o rescindidas por le voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar las mismas.

SECCION 5.02. *Enmienda del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación solo puede ser alterada, enmendada, repelida, o rescindida por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a voto sobre la misma que representen a más del 60% de las acciones con derecho a votar la misma. La sección 5.01(c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar la misma que representen más del 90% de las acciones con derecho a voto la misma.

ARTICULO 6

SECCION 6.01. *Elección del Directorio por los Accionistas de Acción Preferencial.* Durante cualquier periodo cuando los accionistas de cualquier

acción preferencial cualquiera de una o más series de las mismas, que voten como una clase, tengan derecho a elegir un número específico de directores, por razón a atrasos en los dividendos u otras condiciones que les dan el derecho a hacerlo, entonces y durante el tiempo que continúe el derecho (i) el número de directores autorizado de otro modo será incrementado por tal número de directores especificado, y los accionistas de tales Acciones Preferenciales o tales series de las mismas, que votan como una clase, tendrán derecho a elegir los directores adicionales para lo que se provee, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones Preferenciales o series; (ii) cada uno de tales directores adicionales servirá durante tal termino, y tendrá tales poderes de voto, como se han de otorgar en las provisiones pertinentes a tales Acciones Preferenciales o series; y (iii) siempre que los accionistas de cualquiera de tales Acciones Preferenciales o series de las mismas están desprovistos de tales derechos a elegir un número específico de directores, votando como clase, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones preferenciales o series, los términos de oficio de todos los directores elegidos por los accionistas de tales Acciones preferenciales o series, que votan como clase, de acuerdo con las condiciones o elegidos para llenar cualquier vacante resultante de la muerte, renuncia o remoción de directores así elegidos por los accionistas de tales Acciones Preferenciales o series, terminarán en adelante y el número autorizado de directores será reducido en concordancia.

SECCION 6.02. *Votaciones.* Las elecciones de directores en una reunión anual o especial de accionistas necesaria no serán por votos escritos a menos que los estatutos de la Corporación digan lo contrario.

SECCION 6.03. *Eliminación de cierta responsabilidad personal de los directores.* (a) Un director de la Corporación no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por daños monetarios por violación del deber fiduciario como director hasta donde lo permita la Ley de Delaware.

(b) Cada persona (y sus herederos, ejecutores o administradores de tal persona) quien fue o es una parte o esta amenazado de ser parte de o esta involucrado en cualquier acción, demanda o proceso amenazado, pendiente, o completado, ya sea civil, criminal, administrativo o investigativo, por razón del hecho de que esa persona es o fue un director de la Corporación o es o estaba sirviendo por solicitud de la Corporación como un director de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa, será indemnizado y completamente protegido por la Corporación hasta donde lo

permita la Ley de Delaware. El derecho a la indemnización concedido en esta sección 6.03 también debe incluir el derecho a que la Corporación le pague los gastos incurridos en conexión cuna cualquiera de tales procesos por adelantado de su decisión final hasta donde los autoriza la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferido en esta sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, por acción de su Junta Directiva, proporcionar indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta tal punto y a tal efecto como lo determine apropiado la Junta Directiva y lo autorice la Ley de Delaware.

(d) La Corporación tendrá el poder de comprar y mantener un seguro a nombre de cualquier persona quien es o fue director, funcionario, empleado o agente de la corporación, o esta o estuvo en servicio por pedido de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa contra cualquier gasto, responsabilidad o pérdida incurrida por tal persona en cualquier capacidad o que surge de su estado como tal, ya sea si la Corporación tiene o no el poder de indemnizarlo contra tal responsabilidad bajo la ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán exclusivos de ningún otro derecho el cual cualquier otra persona pueda tener o adquirir de aquí en adelante.

(f) Ni la alteración, enmienda, rechazo o rescisión de esta Sección 6.03, ni la adopción de ninguna condición de este Certificado de Incorporación o de los Estatutos de la Corporación, ni, hasta donde lo permite la Ley de Delaware, ninguna modificación de la ley, debe eliminar o reducir el efecto de esta Sección 6.03 respecto a ninguno de los actos u omisiones que ocurran antes de la alteración, enmienda, rechazo, rescisión, adopción o modificación.



ARTICULO 7

SECCION 7.01, *Sección 203 de la Ley de Delaware*. Por la presente la Corporación elige no ser gobernada por la Sección 203 de la Ley de Delaware.

ARTICULO 8

SECCION 8.01. *Relación con Roche.* Anticipándose a que la Corporación cese de ser un subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define en la Sección 8.05) y Roche puede entrar en actividades o líneas de negocios semejantes o similares y tener un interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus relaciones contractuales, corporativas y de negocios con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades concomitantes a cualquier director, quien desea y se propone satisfacer completamente tales deberes fiduciarios del director, al determinar el alcance completo de tales deberes en cualquier situación particular, las condiciones de este artículos 8 se establecen para regular, definir y guiar la conducta de ciertas cuestiones de la Corporación ya que pueden involucrar a Roche y sus funcionaros y directores, y los poderes, derechos, deberes y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con éste.

SECCION 8.02. *Actividades en Negocios Similares.* Excepto que Roche Holdings, Inc. pueda de otra forma acordarlo por escrito,

(a) Roche no tendrá el deber de abstenerse de entrar directamente o indirectamente en actividades de negocios o líneas de negocios semejantes o similares a las de la Corporación, y

(b) ni Roche ni ninguno de sus funcionarios o director de la misma será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar cualquier deber fiduciario por razón de alguna de tales actividades de Roche o de la participación de tal persona en las mismas.

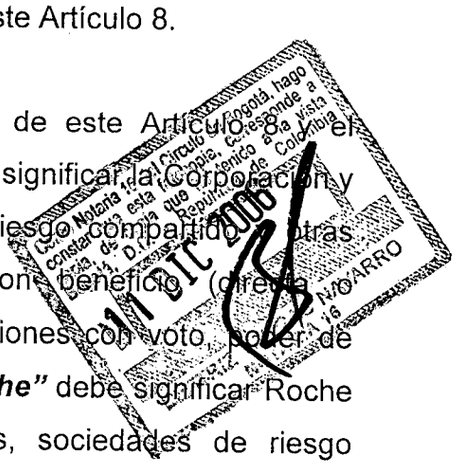
En el evento que Roche adquiera conocimientos de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa tanto para Roche como para la Corporación, Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario como accionista de la Corporación o la persona que controla a un accionista por razón del hacho

que Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma, dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad, o no comunica información respecto, u ofrece, tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.03. *Oportunidades Corporativas.* En el evento que un director, funcionario o empleado de la Corporación quien también es director, funcionario o empleado de Roche adquiera conocimiento de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (ya se si esta transacción o materia potencial es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación o no), tal director, funcionario o empleado debe tener el derecho a ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o Roche como tal director, funcionario o empleado los considere apropiado bajo las circunstancias de su discreción, y tal director, funcionario o empleado no será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario o deber de lealtad o faltar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de ningún beneficio personal inapropiado por razón del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de a la Corporación) o no comunicó información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche busca o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 8.

SECCION 8.05, *Definiciones.* Para propósitos de este Artículo 8 y el Artículo 9 solamente, (i) el término ***"Corporación"*** debe significar la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido, otras entidades en las cuales la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poder de voto o intereses de voto similares, y (ii) el término ***"Roche"*** debe significar Roche Holdings, Inc y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido, asociaciones y otras entidades (diferentes a la Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta sección 8.05) que son ***"afiliados"*** (como se



define en la Regla 12b-2 bajo el Acta de Intercambio de Valores de 1934, como se enmendó) de Roche Holdings, Inc.

SECCION 8.06, *Finalización: Efecto Obligante.* Son consideración con nada en este Certificado de Incorporación que lo contradiga, las condiciones anteriores de este Artículo 8 deberán expirar en la fecha que Roche cese de poseer con beneficios Acciones Comunes que representen al menos 5% del número de acciones vigentes de las Acciones Comunes de la Corporación y nadie que se director o funcionario de la Corporación sea también director o funcionario de Roche. Ni tal vencimiento, ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 8 así como tampoco ninguna condición de este Certificado de Incorporación Enmendado y Vuelto a Redactar inconsistente con alguna de las condiciones de este Artículo 8 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 respecto a cualquier materia, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, excepto por este Artículo 8, pueda acaecer o surgir, antes de tal vencimiento, alteración, enmienda o adopción.

SECCION 8.07. *Artículo 9.* Las condiciones de este Artículo son adicionales a las condiciones del Artículo 9.

ARTICULO 9

SECCION 9.01. *Contratos no nulos.* Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización de los mismos) entre la Corporación y Roche será nulo u anulable solamente por razón de que Roche es parte del mismo, o solamente porque cualquiera de los directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados a Roche están presentes en o participan en la reunión de la Junta Directiva o comité de la misma que autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, enmienda, modificación o finalización, o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito, pero cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo) estará gobernado por las condiciones de este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y otras leyes aplicables. Para propósitos de este Artículo 9, los términos "***Corporación***" y "***Roche***" tienen los significados establecidos en la Sección 8.05.

SECCION 9.02. *Quórum.* Los Directores de la Corporación que son también directores o funcionarios de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo). Las acciones vigentes de las Acciones Comunes de propiedad de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de accionistas que autorice o apruebe tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo).

SECCION 9.03. *No responsabilidad por acciones de buena fe.* Ni Roche ni ningún funcionario o director de la misma será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar cualquiera de los deberes fiduciarios o deberes de lealtad o por fallar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o por derivación de cualquier beneficio personal por razón del hecho que Roche o un funcionario o director de la misma de buena fe tome cualquier acción o ejerza cualquier derecho o de o retenga cualquier consentimiento en conexión con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto dado u otra acción tomada por cualquier persona que es un funcionario, director o representante de Roche, donde el voto o acción es tomado por tal persona en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho o un consentimiento de Roche para los propósitos de cualquiera de tal acuerdo o contrato.

SECCION 9.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 9.

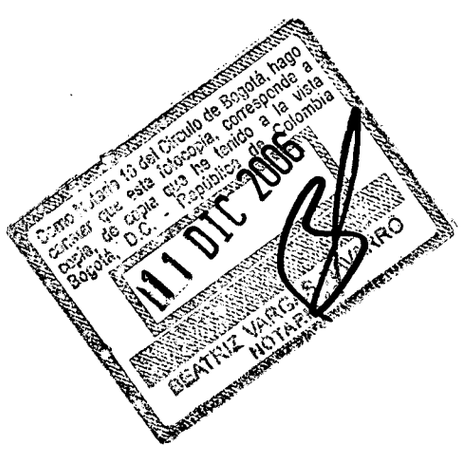
SECCION 9.05. *Contratos cubiertos.* Para propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o cualquier corporación, sociedad, sociedad de riesgo conjunto, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) el cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poderes de voto o intereses de voto similares vigentes se considerará un contrato, acuerdo o transacción con la Corporación.

SECCION 9.06. *Efecto obligante.* Ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 9 ni la adopción de alguna condición inconsistente con cualquier condición de este Artículo 9 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 respecto a cualquier materia que ocurra, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, a no ser por este Artículo 9, pueda acaecer o surgir, antes de tal alteración, enmienda, cambio, rechazo o adopción.

SECCION 9.07. *Artículo 8.* Las condiciones de este Artículo 9 son adicionales a las condiciones del Artículo 8.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, el cual ha sido adoptado de acuerdo con las secciones 242 y 245 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware y por consentimiento escrito de el único accionista de la Corporación de acuerdo con la sección 228 de Ley General de Corporación del Estado de Delaware, ha sido ejecutado este 22 de Julio de 1999.

GENENTECH, INC.
Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título: Vicepresidente
Consejo General y Secretaría



97.200

730

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

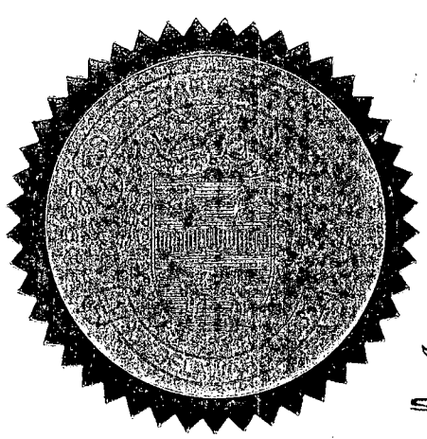
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254031

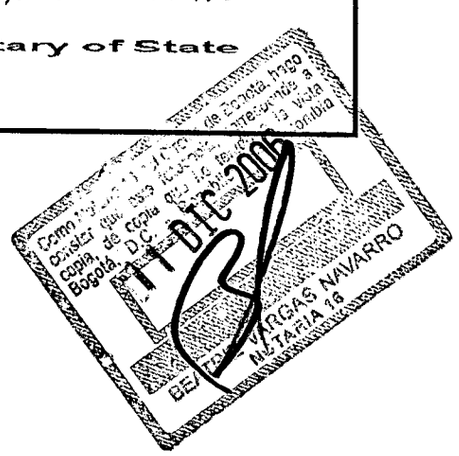
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

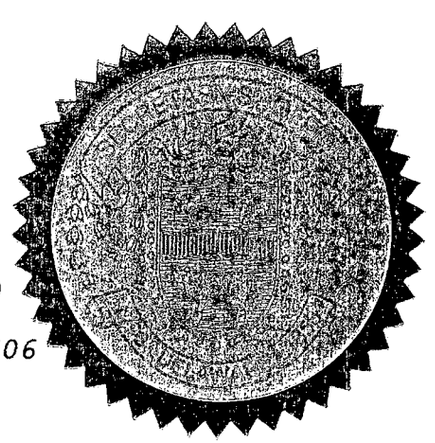


Delaware

731

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.



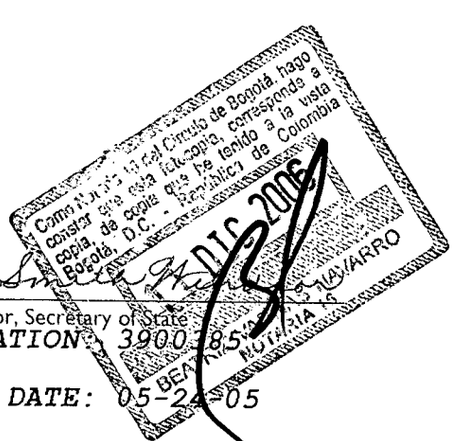
2112549

050426506

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 3900285

DATE: 05-24-05



STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 05:00 PM 05/15/2000
001245251 - 2112549

CERTIFICATE OF AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> "Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

GENENTECH, INC.

By: Stephen Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel and Secretary

75841

733

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
   Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254031
9. Sello/timbre

10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



734

DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOQUINTO DIA DE MAYO, A. D. 2000, A LAS 5 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900385

FECHA: 05 – 24 – 05

735

DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL VIGÉSIMO SEGUNDO DÍA DE JULIO, A. D. 1999, A LAS 9 EN PUNTO DE LA MAÑANA.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900384

FECHA: 05 – 24 – 05

736

CERTIFICADO DE ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

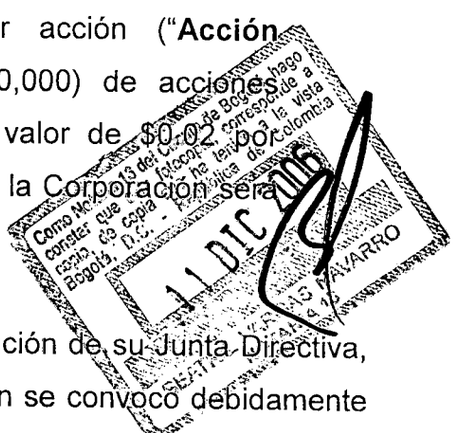
Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmiende cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

> SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de setecientos millones (700,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Seiscientos millones (600,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.



SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.

737

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 15 de Mayo de 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

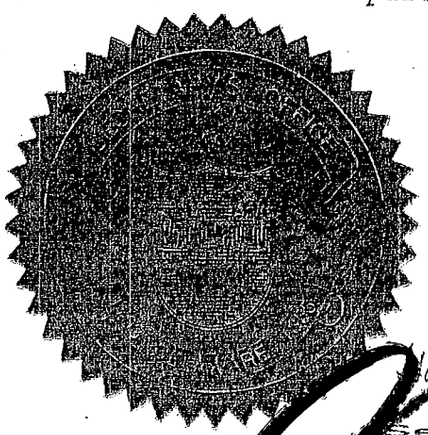
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254033

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.

15 SEP 2008

NOTARIO CUARENTA

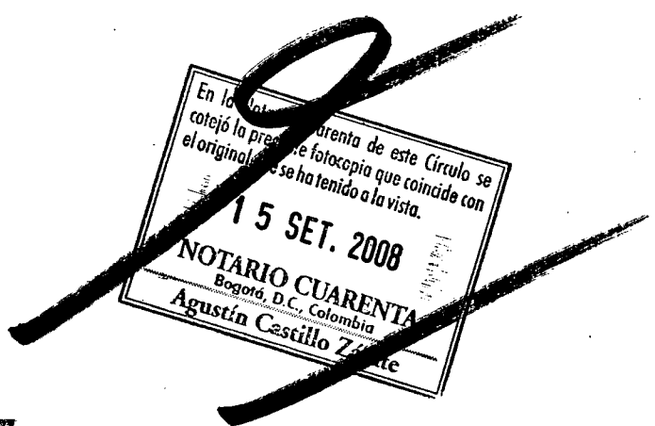
Bogotá, D.C., Colombia

Agustín Castillo Zárate

Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 3900387

DATE: 05-24-05

739

State of Delaware
Secretary of State
Division of Corporations
Delivered 07:44 PM 04/16/2004
FILED 07:39 PM 04/16/2004
SRV 040281669 - 2112549 FILE

CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

GENENTECH, INC.

By: _____

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Executive Vice President, General Counsel and Secretary

#153087

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que es fiel y coincide con el original que se ha tenido a la vista.
15 SET 2008
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

740

TRÁDUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
   Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254033
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
15 SET. 200
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C. Colombia
Agustín Castillo Zárate

DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOSEXTO DIA DE ABRIL, A. D. 2004, A LAS 7:39 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

742

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmiende cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

> SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de tres mil cien millones (3,100,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Tres mil millones (3,000,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
15 SET. 2008
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C. Colombia
Agustín Cardillo Zárate

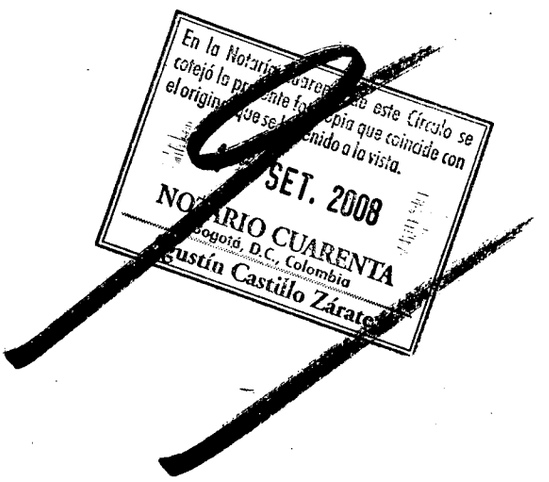
TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 16 de Abril de 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



744

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. *Country: United States of America*

This public document:

2. *has been signed by Harriet Smith Windsor*

3. *acting in the capacity of Secretary of State of Delaware*

4. *bears the seal/stamp of Office of Secretary of State*

Certified

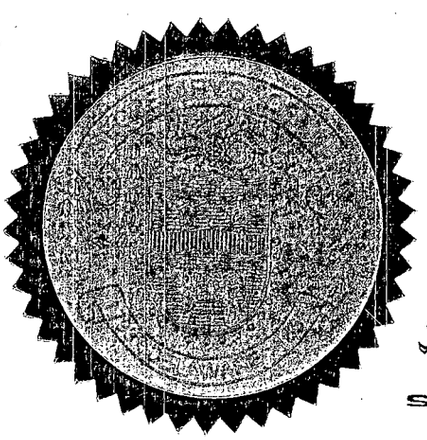
5. *at Dover, Delaware*

6. *the twenty-fourth day of May, A.D. 2005*

7. *by Secretary of State, Delaware Department of State*

8. *No. 0254032*

9. *Seal/Stamp:*



10. *Signature:*

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.

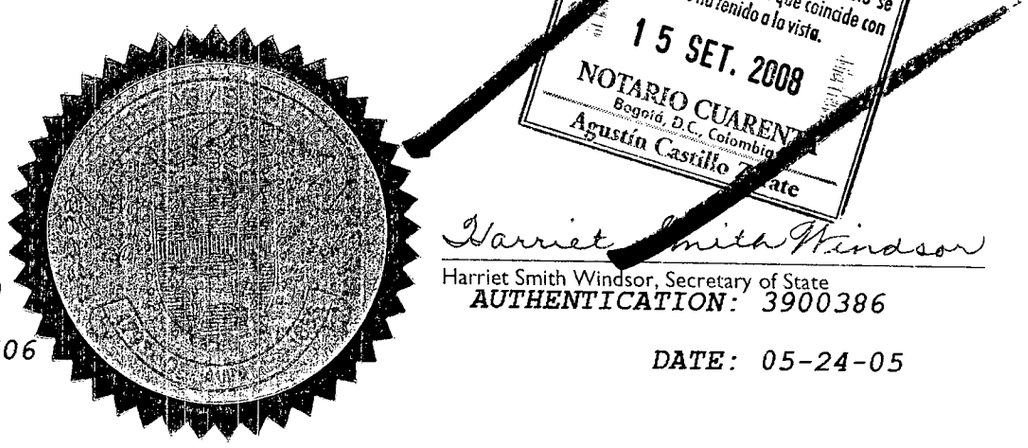
15 SET. 2008

NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C. Colombia
Agustín Castillo Zárate

Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050426506

AUTHENTICATION: 3900386

DATE: 05-24-05

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 02:05 PM 05/10/2001
010226224 – 2112549

S ////STATE/OF/DELAWARE///// V
T ///SECRETARY/OF/STATE///// O
A DIVISION/OF/CORPORATIONS// I
M FILED/09/00/AM/05/10/2001/ B
P ///010226224/+/2112549//// 7456
BY Sandy Miller

CERTIFICATE OF AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> "Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is one billion three hundred million (1,300,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). One billion two hundred million (1,200,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2001.

GENENTECH, INC.

By: _____

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Senior Vice President, General Counsel and Secretary

86747

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
15 SET. 2008
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

747

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

APOSTILLA

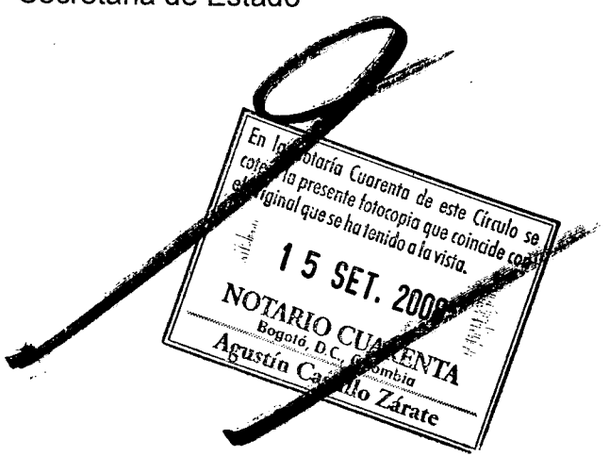
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
   Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254032
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



748

DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMO DIA DE MAYO, A. D. 2001, A LAS 2:05 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900386

FECHA: 05 – 24 – 05

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmiende cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

> SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de mil trescientos millones (1,300,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Mil doscientos millones (1,200,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

En la Notaría a mi cargo el presente documento de este Círculo se encuentra fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
5 SET. 2008
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Codazzi Zárate

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.

750

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



74 400 430 ~~430~~

751

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. *Country: United States of America*

This public document:

2. *has been signed by Harriet Smith Windsor*

3. *acting in the capacity of Secretary of State of Delaware*

4. *bears the seal/stamp of Office of Secretary of State*

Certified

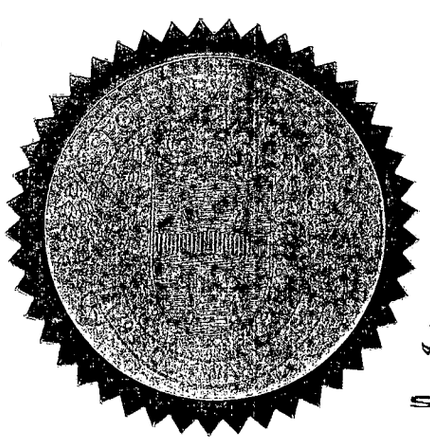
5. *at Dover, Delaware*

6. *the twenty-fourth day of May, A.D. 2005*

7. *by Secretary of State, Delaware Department of State*

8. *No. 0254032*

9. *Seal/Stamp:*



10. *Signature:*

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



752

Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.

2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 3900386

DATE: 05-24-05

Como Fiel que copia - Republica de Colombia
Bogotá, hago constar que copia corresponde a la vista
BEATRIZ LONGA NAVARRO
NOTARIA 16

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 02:05 PM 05/10/2001
010228224 - 2112549

S ////STATE/OF/DELAWARE///// V
T ///SECRETARY/OF/STATE///// O
A DIVISION/OF/CORPORATIONS// I
M FILED/09:00/AM/05/10/2001/ D
P ///010228224/2112549//// 753
BY Sandy Miller

CERTIFICATE OF AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> "Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is one billion three hundred million (1,300,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). One billion two hundred million (1,200,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2001.

GENENTECH, INC.

By: Stephen Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel and Secretary

Como Notaria 16 del Circuito de Bogotá, hago constar que esta fotocopia corresponde a la vista, que no tengo a la vista. República de Colombia
NOTARIA 16
BEATRIZ NAVARRO

86747

754

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
   Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254032
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



755

DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMO DIA DE MAYO, A. D. 2001, A LAS 2:05 EN PUNTO DE LA TARDE.

Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900386

FECHA: 05 – 24 – 05

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

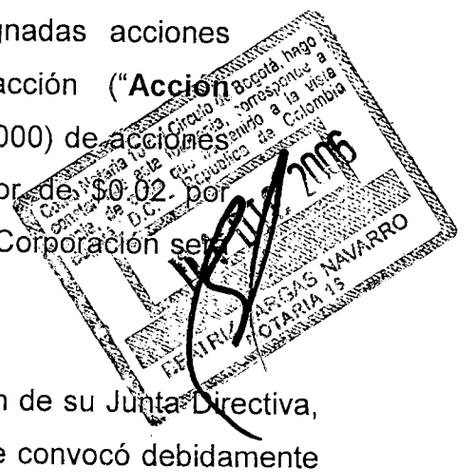
Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmiende cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

> SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de mil trescientos millones (1,300,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Mil doscientos millones (1,200,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.



SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [X] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [✓]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [✓]
- Descripción de la invención [✓]
- Dibujos de ser estos pertinentes [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [✓]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Firma Responsable

Fecha_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-034961- -00000-0000
Fecha: 2009-04-03 17:42:40 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 757

Carrera 13 No. 27-00 Piso 6, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 759

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
GENENTECH INC

REFERENCIA	Radicación No.	9 34961
	Solicitud internacional	PCT/US2007/077845
	Fecha inicio fase nacional	08/04/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	8276
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC, 03 JUN. 2009

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

jfernand