

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 383**

51 Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08153652 .6**
96 Fecha de presentación: **03.01.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1985630**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.10.2008**

54 Título: **Receptor gustativo híbrido T1R2**

30 Prioridad:
03.01.2001 US 259227 P
19.04.2001 US 284547 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.07.2012

73 Titular/es:
SENOMYX, INC.
4767 NEXUS CENTRE DRIVE
SAN DIEGO, CA 92121, US

72 Inventor/es:
Adler, Jon, Elliott;
Li, Xiaodong;
Staszewski, Lena;
O'Connell, Shawn y
Zozulya, Sergey

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 385 383 T3

DESCRIPCIÓN

Receptor gustativo híbrido T1R2.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La invención se refiere a receptores quimiosensoriales acoplados a proteína G de mamíferos recién identificados, a la familia de dichos receptores, y a los genes y al ADNc que codifican dichos receptores. Más particularmente, la invención se refiere a receptores quimiosensoriales acoplados a proteína G de mamíferos recién identificados activos en la señalización gustativa, a una familia de dichos receptores, a los genes y al ADNc que codifican dichos receptores y a procedimientos de uso de dichos receptores, genes y ADNc en el análisis y descubrimiento de moduladores gustativos. La invención proporciona en particular una secuencia de ADN que codifica un nuevo receptor gustativo humano identificado a continuación como T1R2 y el polipéptido receptor correspondiente.

Descripción de la técnica relacionada

20 El sistema gustativo proporciona información sensorial acerca de la composición química del mundo exterior. Se piensa que los mamíferos tienen al menos cinco modalidades gustativas básicas: dulce, amargo, ácido, salado y umami. Véase, por ejemplo, Kawamura y col., *Introduction to Umami: A Basic Taste* (1987); Kinnamon y col., *Ann. Rev. Physiol.*, 54: 715-31 (1992); Lindemann, *Physiol. Rev.*, 76: 718-66 (1996); Stewart y col., *Am. J. Physiol.*, 272: 1-26 (1997). Se piensa que cada modalidad gustativa está mediada por un receptor o receptores proteicos diferentes que se expresan en células receptoras gustativas en la superficie de la lengua (Lindemann, *Physiol. Rev.* 76: 718-716 (1996)). Los receptores gustativos que reconocen los estímulos gustativos amargo, dulce y umami pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR) (Hoon y col., *Cell* 96: 451 (1999); Adler y col., *Cell* 100: 693 (2000)). (Se piensa que otras modalidades gustativas están mediadas por canales iónicos).

30 Los receptores acoplados a proteína G median otras muchas funciones fisiológicas, tales como la función endocrina, la función exocrina, la frecuencia cardíaca, la lipólisis y el metabolismo de hidratos de carbono. El análisis bioquímico y la clonación molecular de varios de dichos receptores han puesto de manifiesto muchos principios básicos con respecto a la función de estos receptores. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 5.691.188 describe cómo tras la unión de un ligando a un GPCR, el receptor experimenta un cambio conformacional, que conduce a la activación de una proteína G heterotrimérica promoviendo el desplazamiento del GDP unido por GTP en la superficie de la subunidad Ga y la posterior disociación de la subunidad Ga de las subunidades Gb y Gg. Las subunidades Ga libres y los complejos Gbg activan elementos aguas abajo de una diversidad de rutas de transducción de señales.

40 Actualmente se conocen secuencias completas o parciales de varios receptores quimiosensoriales humanos y de otros eucariotas. Véanse, por ejemplo, Pilpel, Y. y Lancet, D., *Protein Science*, 8: 969-977 (1999); Mombaerts, P., *Annu. Rev. Neurosci.*, 22: 487-50 (1999). Véanse también los documentos EP0867508A2, US 5874243, WO 92/17585, WO 95/18140, WO 97/17444, WO 99/67282. Debido a la complejidad de las interacciones ligando-receptor y, más particularmente, las interacciones estímulo gustativo-receptor, falta información acerca del reconocimiento ligando-receptor.

45 La identificación y caracterización de los GPCR que funcionan como receptores gustativos del dulce y del umami podría permitir nuevos procedimientos de descubrimiento de nuevos estímulos gustativos. Por ejemplo, la disponibilidad de receptores podría permitir la exploración para moduladores de receptores. Dichos compuestos modularían el sabor y podrían ser útiles en la industria alimentaria para mejorar el sabor de una diversidad de productos de consumo; por ejemplo, mejorar la apetencia de bebidas bajas en calorías a través del desarrollo de nuevos edulcorantes artificiales.

50 En parte, la presente invención aborda la necesidad de un mejor entendimiento de las interacciones entre receptores quimiosensoriales y estímulos químicos. La presente invención también proporciona, entre otras cosas, nuevos receptores quimiosensoriales y procedimientos para utilizar dichos receptores, y los genes y ADNc que codifican dichos receptores, para identificar moléculas que pueden usarse para modular la transducción quimiosensorial, tal como la sensación gustativa.

Sumario de la invención

60 La redacción de las reivindicaciones define la invención.

Otro objeto es proporcionar nuevas moléculas o combinaciones de moléculas que provocan una percepción gustativa predeterminada en un mamífero. Dichas moléculas o composiciones pueden generarse determinando un valor de percepción gustativa en un mamífero para una molécula o combinaciones de moléculas conocidas; determinando un valor de percepción gustativa en un mamífero para una o más moléculas o combinaciones de

- moléculas desconocidas; comparar el valor de la percepción gustativa en un mamífero para una o más composiciones desconocidas con el valor de percepción gustativa en un mamífero para una o más composiciones conocidas; seleccionar una molécula o combinación de moléculas que provocan una percepción gustativa predeterminada en un mamífero; y combinar dos o más moléculas o combinaciones de moléculas desconocidas para formar una molécula o combinación de moléculas que provoque una percepción gustativa predeterminada en un mamífero. La etapa de combinación produce una sola molécula o una combinación de moléculas que provocan una percepción gustativa predeterminada en un mamífero.
- Otro objeto más es proporcionar un procedimiento de exploración de uno o más compuestos para la presencia de un sabor detectable por un mamífero, que comprende: una etapa de poner en contacto dicho uno o más compuestos con al menos uno de los T1R descritos, fragmentos o variantes de los mismos, preferentemente en el que el mamífero es un ser humano.
- Otro objeto es proporcionar un procedimiento para simular un sabor, que comprende las etapas de: para cada uno de una pluralidad de T1R, o fragmentos o variantes de los mismos descritos en la presente memoria, preferentemente T1R humanos, determinar el grado en el que el T1R interacciona con el estímulo gustativo; y combinar una pluralidad de compuestos, teniendo cada uno una interacción previamente determinada con uno o más de los T1R, en cantidades que en conjunto proporcionen un perfil de estimulación de receptores que imite el perfil del sabor. La interacción de un estímulo gustativo con un T1R puede determinarse usando cualquiera de los ensayos de unión o indicadores descritos en la presente memoria. Después, la pluralidad de compuestos puede combinarse para formar una mezcla. Si se desea, uno o más de la pluralidad de los compuestos pueden combinarse covalentemente. Los compuestos combinados estimulan sustancialmente al menos el 50%, 60%, 70%, 75%, 80% ó 90% o todos los receptores que se estimulan sustancialmente por el estímulo gustativo.
- En otro aspecto más se proporciona un procedimiento en el que se ensaya una pluralidad de compuestos patrón frente a una pluralidad de T1R, o fragmentos o variantes de los mismos, para determinar el grado en el que cada T1R interacciona con cada compuesto patrón, generando de este modo un perfil de estimulación de receptores para cada compuesto patrón. Después, estos perfiles de estimulación de receptores pueden almacenarse en una base de datos relacional en un medio de almacenamiento de datos. El procedimiento puede comprender además proporcionar un perfil de estimulación de receptores deseado para un sabor; comparar el perfil de estimulación de receptores deseado con la base de datos relacional; y determinar una o más combinaciones de compuestos patrón que más estrechamente coincidan con el perfil de estimulación de receptores deseado. El procedimiento puede comprender además combinar compuestos patrón en una o más de las combinaciones establecidas para simular el sabor.
- Un objeto adicional es proporcionar un procedimiento para representar la percepción gustativa de un estímulo gustativo particular en un mamífero, que comprende las etapas de: proporcionar valores de X_1 a X_n representativos de la estimulación cuantitativa de cada uno de n T1R de dicho vertebrado, donde n es mayor que o igual a 2; y generar a partir de dichos valores una representación cuantitativa de la percepción gustativa. Los T1R pueden ser un receptor gustativo descrito en la presente memoria, o fragmentos o variantes de los mismos, la representación puede constituir un punto o un volumen en un espacio n -dimensional, puede constituir un gráfico o un espectro, y puede constituir una matriz de representaciones cuantitativas. Además, la etapa de suministro puede comprender poner en contacto una pluralidad de T1R producidos de forma recombinante, o fragmentos o variantes de los mismos, con una composición de ensayo y medir cuantitativamente la interacción de dicha composición con dichos receptores.
- Otro objeto más es proporcionar un procedimiento para predecir la percepción gustativa en un mamífero, generada por una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen una percepción gustativa desconocida en un mamífero, que comprende las etapas de: proporcionar valores de X_1 a X_n representativos de la estimulación cuantitativa de cada uno de n T1R de dicho vertebrado, donde n es mayor que o igual a 2; para una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen una percepción gustativa conocida en un mamífero; y generar a partir de dichos valores una representación cuantitativa de la percepción gustativa en un mamífero para la una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen una percepción gustativa conocida en un mamífero, proporcionando valores de X_1 a X_n representativos de la estimulación cuantitativa de cada uno de n T1R de dicho vertebrado, donde n es mayor que o igual a 2; para una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen una percepción gustativa desconocida en un mamífero; y generar a partir de dichos valores una representación cuantitativa de la percepción gustativa en un mamífero para la una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen una percepción gustativa desconocida en un mamífero, y predecir la percepción gustativa en un mamífero generada por una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen una percepción gustativa desconocida en un mamífero por comparación de la representación cuantitativa de la percepción gustativa en un mamífero para la una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen una percepción gustativa desconocida en un mamífero con la representación cuantitativa de la percepción gustativa en un mamífero para la una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen una percepción gustativa conocida en un mamífero. Los T1R usados en éste procedimiento pueden incluir un receptor gustativo, un fragmento o una variante del mismo, descritos en la presente invención.

Descripción detallada de las Figuras

Las Figuras 1a-1c presentan datos funcionales para el receptor T1R2/T1R3 humano. En la Figura 1a se muestran las respuestas de calcio intracelular de células HEK que expresan de forma estable $G\alpha_{15}$, que están transfectadas de forma transitoria con T1R2, T1R3 y T1R2/T1R3 humanos a diversas concentraciones de sacarosa. Cada panel se corresponde con aproximadamente 1000 células confluentes, transfectadas y cargadas con colorante de calcio. En la Figura 1b se muestra la inhibición de la actividad de T1R2/T1R3 por el inhibidor del sabor dulce gurmantina. En la Figura 1c se muestran respuestas de T1R2/T1R3 a la dosis para cuatro edulcorantes y los umbrales psicofísicos de detección correlacionados (círculos del eje X).

La Figura 2 presenta datos funcionales para el receptor T1R2/T1R3 de rata. Se muestran las respuestas de T1R2/T1R3 humano y T1R2/T1R3 de rata (así como receptores mixtos rata/humano) a sacarosa 350 mM, triptófano 25 mM, aspartamo 15 mM y monelina al 0,05%. El T1R2/T1R3 de rata no responde al aspartamo ni a la monelina, que no son apetitosos para roedores.

Las Figuras 3a-3c presentan datos funcionales para el receptor T1R2/T1R3 humano. En la Figura 3a se muestran respuestas de calcio intracelular de células HEK que expresan de forma estable $G\alpha_{15}$ que están transfectadas de forma transitoria con T1R1, T1R3 y T1R2/T1R3 humanos a diversas concentraciones de L- glutamato. En la Figura 3b se muestra la potenciación de la respuesta de T1R1/T1R3 por IMP. En la Figura 3c se muestran las respuestas de T1R1/T1R3 a la dosis para el L-glutamato y el L-glutamato más IMP 0,2 mM y los umbrales psicofísicos de detección correlacionados (círculos del eje X).

Las Figuras 4a-4b presentan experimentos de inmunofluorescencia y FACS que demuestran que la fusión del péptido PDZIP (SEC ID N°: 1) con el T1R2 humano potenciaba su expresión en la superficie de células HEK.

La Figura 5 presenta datos de formación de imágenes de fluorescencia automatizada para líneas celulares que expresan de forma estable $G\alpha_{15}$ y T1R1/T1R3 humano. Se determinaron las respuestas a la dosis de L-glutamato en presencia de IMP 0,5 mM.

La Figura 6 presenta datos de formación de imágenes de fluorescencia automatizada para líneas celulares que expresan de forma estable $G\alpha_{15}$ y T1R2/T1R3 humano. Se muestran las respuestas a las dosis de sacarosa, D-triptófano, sacarina y aspartamo para una línea celular estable.

Descripción detallada de la invención

Por lo tanto, la invención proporciona moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican receptores acoplados a proteína G específicos de célula gustativa ("GPCR") y los polipéptidos que codifican. Estas moléculas de ácidos nucleicos y los polipéptidos que codifican son miembros de la familia T1R de GPCR específicos de células gustativas. Se identifican miembros de la familia T1R de GPCR específicos de células gustativas en Hoon y col., Cell, 96: 541-551 (1999), documentos WO 00/06592 y WO 00/06593. Más particularmente, la invención proporciona ácidos nucleicos que codifican una nueva familia de GPCR específicos de células gustativas. Se hace referencia a estos ácidos nucleicos y a los receptores que codifican como miembros de la familia "T1R" de GPCR específicos de células gustativas. Los miembros de la familia T1R incluyen T1R1, T1R2 y T1R3 humanos. Como se ha descrito anteriormente, diferentes combinaciones de T1R median probablemente los sabores dulce y umami. Además, se piensa que los miembros de la familia T1R pueden actuar en combinación con otros miembros de la familia T1R, otros GPCR específicos de células gustativas o una combinación de los mismos, para lograr de este modo la transducción quimiosensorial del sabor. Por ejemplo, se piensa que T1R1 y T1R3 pueden coexpresarse dentro del mismo tipo de célula receptora gustativa y que los dos receptores pueden interactuar físicamente para formar un receptor gustativo heterodimérico. Como alternativa, tanto T1R1 como T1R3 pueden unirse de forma independiente al mismo tipo de ligando y su unión combinada puede dar como resultado una sensación gustativa percibida específica.

Estos ácidos nucleicos proporcionan sondas valiosas para la identificación de células gustativas, ya que los ácidos nucleicos se expresan específicamente en células gustativas. Por ejemplo, pueden usarse sondas para polipéptidos y proteínas T1R para identificar células gustativas presentes en papilas foliadas, circunvaladas y fungiformes, así como células gustativas presentes en las franjas gustativas (*geschmackstreifen*), la cavidad oral, el epitelio gastrointestinal y la epiglotis. También pueden servir como herramientas para la generación de mapas topográficos del gusto que aclaren la relación entre las células gustativas de la lengua y las neuronas sensoriales gustativas que conducen a los centros gustativos en el cerebro. En particular, pueden usarse procedimientos de detección de T1R para identificar células gustativas sensibles a estímulos gustativos dulces u otras modalidades específicas de estímulos gustativos. Además, los ácidos nucleicos y las proteínas que codifican pueden usarse como sondas para examinar detenidamente comportamientos inducidos por el sabor. Además, puede usarse la localización cromosómica de los genes que codifican T1R humanos para identificar enfermedades, mutaciones y rasgos causados por y asociados con miembros de la familia T1R.

Los ácidos nucleicos que codifican las proteínas y polipéptidos T1R de la invención pueden aislarse de una diversidad de fuentes, obtenerse por ingeniería genética, amplificarse, sintetizarse y/o expresarse de forma recombinante de acuerdo con los procedimientos desvelados en el documento WO 00/035374.

- 5 La invención también proporciona procedimientos de exploración para moduladores, por ejemplo, activadores, inhibidores, estimuladores, potenciadores, agonistas y antagonistas, de estos nuevos GPCR específicos de células gustativas. Dichos moduladores de la transducción del sabor son útiles para la modulación farmacológica, química y genética de las rutas de señalización gustativas. Estos procedimientos de exploración pueden usarse para identificar agonistas y antagonistas de la actividad de las células gustativas de gran afinidad. Después, estos compuestos
10 moduladores pueden usarse en las industrias alimentaria y farmacéutica para personalizar el sabor, por ejemplo, para modular los sabores dulces de alimentos o fármacos.

- Por lo tanto, la invención proporciona ensayos para detectar y caracterizar la modulación del sabor, en los que los miembros de la familia T1R actúan como moléculas indicadoras directas o indirectas del efecto de moduladores
15 sobre la transducción del sabor. Pueden usarse GPCR en ensayos para, por ejemplo, medir cambios en la unión a ligando, concentración iónica, potencial de membrana, flujo de corriente, flujo iónico, transcripción, transducción de señales, interacciones ligando-receptor, concentraciones de segundos mensajeros, *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*. En una realización, pueden usarse miembros de la familia T1R como indicadores indirectos a través de la unión a una segunda molécula indicadora, tal como la proteína verde fluorescente (véase, por ejemplo, Mistili y Spector, Nature
20 Biotechnology, 15: 961-964 (1997)). En otra realización, pueden expresarse de forma recombinante en células miembros de la familia T1R y puede ensayarse la modulación de la transducción del sabor a través de la actividad de GPCR, por medición de cambios en los niveles de Ca^{2+} y otros mensajeros intracelulares, tales como AMPc, GMPc o IP3.

- 25 En ciertas realizaciones, un dominio de un polipéptido T1R, por ejemplo, un dominio extracelular, transmembrana o intracelular, se fusiona con un polipéptido heterólogo, formando de este modo un polipéptido quimérico, por ejemplo, un polipéptido quimérico con actividad GPCR. Dichos polipéptidos quiméricos son útiles, por ejemplo, en ensayos para identificar ligandos, agonistas, antagonistas u otros moduladores de un polipéptido T1R. Además, dichos polipéptidos quiméricos son útiles para generar nuevos receptores gustativos con nueva especificidad de unión a
30 ligando, modos de regulación, rutas de transducción de señales u otras de dichas propiedades, o para generar nuevos receptores gustativos con nuevas combinaciones de especificidad de unión a ligando, modos de regulación, rutas de transducción de señales, etc.

- En una realización, se expresa un polipéptido T1R en una célula eucariota como un receptor quimérico con una
35 secuencia chaperona heteróloga que facilita el transporte a través de la membrana plasmática, o la maduración y la dirección a través de la ruta secretora. La secuencia heteróloga opcional puede ser una secuencia de rodopsina, tal como un fragmento N-terminal de una rodopsina. Dichos receptores T1R quiméricos pueden expresarse en cualquier célula eucariota, tal como en células HEK-293. Preferentemente, las células comprenden una proteína G, por ejemplo, $\text{G}\alpha 15$ o $\text{G}\alpha 16$ u otro tipo de proteína G promiscua capaz de emparejarse con una amplia variedad de
40 GPCR quimiosensoriales para una ruta de señalización intracelular o para una proteína de señalización tal como fosfolipasa C. Como alternativa, las células pueden expresar una proteína G quimérica o variante que se selecciona en base a su capacidad para acoplarse con T1R para producir un receptor gustativo T1R funcional. Los ejemplos de proteínas G variantes que se prefieren especialmente incluyen las variantes de proteína G descritas en el N° de serie de Estados Unidos 09/984.292, presentado el 29 de octubre del 2001, incorporado por referencia en el presente
45 documento en su totalidad y las variantes $\text{G}\alpha 15$ quiméricas desveladas en el documento US 6.818.747. Estas solicitudes desvelan variantes de proteínas G que han demostrado que se acoplan mejor con T1R que $\text{G}\alpha 15$, una proteína G promiscua muy conocida. La activación de dichos receptores quiméricos en dichas células puede detectarse usando cualquier procedimiento convencional, tal como mediante la detección de cambios en el calcio intracelular por detección de la fluorescencia dependiente de FURA-2 en la célula. Si las células hospedadoras
50 preferidas no expresan una proteína G apropiada pueden transfectarse con un gen que codifique una proteína G promiscua.

- Los procedimientos de ensayo para moduladores de la transducción del sabor incluyen ensayos de unión a ligando
55 *in vitro* usando: polipéptidos T1R, partes de los mismos, es decir, el dominio extracelular, la región transmembrana o combinaciones de los mismos, o proteínas quiméricas que comprenden uno o más dominios de un miembro de la familia T1R; ovocitos no humanos o células de cultivos tisulares que expresan polipéptidos T1R, fragmentos, o proteínas de fusión; la fosforilación y desfosforilación de miembros de la familia T1R; la unión de proteína G a GPCR; ensayos de unión a ligando; cambios en el voltaje, el potencial de membrana y la conductancia; ensayos de flujo iónico; cambios en los segundos mensajeros intracelulares, tales como GMPc, AMPc e inositol trifosfato; cambios en los niveles de calcio intracelular; y liberación de neurotransmisores.
60

- Además, se describen procedimientos de detección de ácidos nucleicos de T1R y expresión de proteínas, permitiendo la investigación de la regulación de la transducción del sabor y la identificación específica de células receptoras gustativas. Los miembros de la familia T1R también proporcionan sondas de ácidos nucleicos útiles para
65 investigaciones forenses y de paternidad. Los genes T1R también son útiles como sondas de ácidos nucleicos para identificar células receptoras gustativas, tales como células receptoras gustativas foliadas, fungiformes,

circunvaladas, de las franjas gustativas y de la epiglotis. También pueden usarse receptores T1R para generar anticuerpos monoclonales y policlonales útiles para identificar células receptoras gustativas. Pueden identificarse células receptoras gustativas usando técnicas tales como transcripción inversa y amplificación de ARNm, aislamiento de ARN total o ARN poli A+, transferencia de northern, transferencia puntual, hibridación *in situ*, protección frente a ARNasa, digestión con S1, sondaje de series de microchips de ADN, transferencias de Western y similares.

Funcionalmente, los polipéptidos T1R comprenden una familia de siete receptores transmembrana acoplados a proteína G relacionados, que se piensa que están implicados en la transducción del sabor y que pueden interaccionar con una proteína G para mediar la transducción de la señal gustativa (véase, por ejemplo, Fong, Cell Signal, 8: 217 (1996); Baldwin, Curr. Opin. Cell Biol., 6: 180 (1994)). Estructuralmente, las secuencias de nucleótidos de los miembros de la familia T1R pueden codificar polipéptidos relacionados que comprenden un dominio extracelular, siete dominios transmembrana y un dominio citoplasmático. Los genes de la familia T1R relacionados de otras especies comparten una identidad de secuencia de nucleótidos de al menos aproximadamente el 50% y, opcionalmente, del 60%, 70%, 80% ó 90% a lo largo de una región de al menos aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, opcionalmente de 100, 200, 500 o más nucleótidos de longitud, con las SEC ID N°: 1, 2, 3, 9, 11, 13, 15, 16, 20 o variantes modificadas de forma conservativa de las mismas, o codifican polipéptidos que comparten una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente del 35% al 50% y, opcionalmente, del 60%, 70%, 80% ó 90% a lo largo de una región de aminoácidos de al menos aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, opcionalmente de 50 a 100 aminoácidos de longitud con las SEC ID N°: 4, 10, 12, 14, 17, 21 o variantes modificadas de forma conservativa de las mismas.

También se han identificado varias secuencias de aminoácidos o dominios consenso que son característicos de miembros de la familia T1R. Por ejemplo, los miembros de la familia T1R comprenden típicamente una secuencia que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 50%, opcionalmente del 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95-99% o superior con las secuencias consenso de T1R 1 y 2 (SEC ID N°: 18 y 19 respectivamente). Por lo tanto, estos dominios conservados pueden usarse para identificar miembros de la familia T1R por identidad, hibridación específica o amplificación o unión específica por anticuerpos generados contra un dominio. Dichas secuencias consenso de T1R tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

Secuencia consenso de la familia T1R 1: (SEC ID N°:18)
(TR)C(FL)(RQP)R(RT)(SPV)(VERKT)FL(AE)(WL)(RHG)E
Secuencia consenso de la familia T1R 2: (SEC ID N°:19)
(LQ)P(EGT)(NRC)YN(RE)A(RK)(CGF)(VLI)T(FL)(AS)(ML)

Estas secuencias consenso incluyen las que se encuentran en los polipéptidos T1R descritos en la presente memoria, pero puede esperarse que miembros de la familia T1R de otros organismos comprendan secuencias consenso que tengan una identidad de aproximadamente el 75% o más con las secuencias consenso incluidas, que se describen específicamente en la presente memoria.

Pueden usarse regiones específicas de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de T1R para identificar variantes polimórficas, homólogos interespecie y alelos de miembros de la familia T1R. Esta identificación puede realizarse *in vitro*, por ejemplo, en condiciones de hibridación rigurosas o PCR (usando, *por ejemplo*, cebadores que codifican las secuencias consenso de T1R identificadas anteriormente) o usando la información de secuencia en un sistema informático para la comparación con otras secuencias de nucleótidos. También serán útiles diferentes alelos de genes de T1R dentro de una población de una sola especie en la determinación de si diferencias en las secuencias alélicas se correlacionan con diferencias en la percepción gustativa entre miembros de la población. Son útiles técnicas de amplificación de tipo PCR y de clonación clásicas para el aislamiento de ortólogos, por ejemplo, donde son suficientes cebadores degenerados para detectar genes relacionados entre especies, que típicamente tienen un mayor nivel de identidad relativa que miembros parálogos de la familia T1R dentro de una sola especie.

Por ejemplo, pueden usarse cebadores degenerados SAP077 (SEC ID N°: 5) y SAP0079 (SEC ID N°: 6) para amplificar y clonar genes de T1R3 de diferentes genomas de mamíferos. Por el contrario, los genes dentro de una sola especie que están relacionados con T1R3 se identifican mejor usando programas informáticos de reconocimiento de patrones de secuencias para buscar secuencias relacionadas. Típicamente, la identificación de variantes polimórficas y alelos de miembros de la familia T1R puede realizarse comparando una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 25 aminoácidos o más, por ejemplo, de 50-100 aminoácidos. Una identidad de aminoácidos de al menos aproximadamente del 35 al 50% y, opcionalmente, del 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95-99% o superior demuestra, típicamente, que una proteína es una variante polimórfica, homóloga interespecie o alelo de un miembro de la familia T1R. La comparación de secuencias puede realizarse usando cualquiera de los algoritmos de comparación de secuencias que se analizan a continuación. También pueden usarse anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos T1R o a una región conservada de los mismos para identificar alelos, homólogos interespecie y variantes polimórficas.

Las variantes polimórficas, homólogos interespecie y alelos de genes de T1R pueden confirmarse por examen de la expresión específica de células gustativas del supuesto polipéptido T1R. Típicamente, los polipéptidos T1R que

tienen una secuencia de aminoácidos descrita en la presente memoria pueden usarse como un control positivo en comparación con el supuesto polipéptido T1R para demostrar la identificación de una variante polimórfica o alelo de los miembros de la familia T1R. Se espera que las variantes polimórficas, alelos y homólogos interespecie conserven la estructura de siete transmembrana de un receptor acoplado a proteína G. Para detalles adicionales, véase el documento WO 00/06592, que describe miembros de la familia T1R relacionados, GPCR-B3. Los receptores GPCR-B3 se denominan en la presente memoria rT1R1 y mT1R1. Adicionalmente, véase el documento WO 00/06593, que también desvela miembros de la familia T1R relacionados, GPCR-B4. Los receptores GPCR-B4 se denominan en la presente memoria rT1R2 y mT1R2.

También puede usarse la información de secuencias de nucleótidos y aminoácidos para miembros de la familia T1R para construir modelos de polipéptidos específicos de células gustativas en un sistema informático. Estos modelos pueden usarse posteriormente para identificar compuestos que pueden activar o inhibir proteínas receptoras T1R. Después, dichos compuestos que modulan la actividad de miembros de la familia T1R pueden usarse para investigar el papel de los genes y receptores T1R en la transducción del sabor.

La presente invención también proporciona ensayos, preferentemente ensayos de alto rendimiento, para identificar moléculas que interaccionan con y/o modular un polipéptido de T1R. En numerosos ensayos, se usa un dominio particular de un miembro de la familia T1R, por ejemplo, un dominio o región extracelular, transmembrana o intracelular. En numerosas realizaciones, un dominio extracelular, región transmembrana o combinación de los mismos puede unirse a un sustrato sólido y usarse, por ejemplo, para aislar ligandos, agonistas, antagonistas o cualquier otra molécula que puede unirse a y/o modular la actividad de un polipéptido T1R.

En un aspecto de la invención, se proporciona un nuevo gen de GPCR humano de la familia T1R, denominado hT1R3. El gen hT1R3 se identificó a partir de la base de datos de secuencias del genoma humano incluyendo la división HTGS de GenBank. La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos conceptualmente traducida para hT1R3 se proporciona en las SEC ID N°: 1-4. El receptor hT1R3 se identificó en el clon genómico de BAC parcialmente secuenciado RP5-89003 (número de acceso de la base de datos AL 139287) en virtud de su similitud de secuencia con el receptor gustativo de rata candidato rT1R1 (número de acceso AF127389). Como referencia, la identidad por parejas entre las secuencias proteicas de hT1R3 y hT1R1 predichas es de aproximadamente el 34%.

Comparaciones de secuencias con miembros adicionales de la Familia C de GPCR (que incluye los receptores sensibles al calcio, supuestos receptores de feromonas V2R, receptores GABA-B, receptores gustativos de peces y receptores de glutamato metabotrópicos) indican que probablemente el hT1R3 pertenece al subgrupo de la familia C definido por T1R1 y un segundo receptor gustativo candidato de rata (rT1R2, número de acceso AF127390).

También se describe el ortólogo humano, denominado hT1R1, de un receptor gustativo de rata, denominado rT1R1. Los productos génicos de hT1R1 y rT1R1 tienen una identidad de aproximadamente el 74%. Se ha descrito el gen de ratón, mT1R1, véase Hoon y col., Cell, 96: 541-551 (2000) y se ha mapeado en un intervalo cromosómico homólogo al intervalo que contiene hT1R1. Las secuencias de nucleótidos y conceptualmente traducidas de hT1R1 se describen en la presente memoria como SEC ID N°: 15 y 16, respectivamente.

Aunque sin desear quedar ligada a ninguna teoría particular, se ha predicho que la familia de receptores T1R está implicada en la transducción del sabor dulce, en virtud de la unión de mT1R3 con el locus Sac, un locus en el extremo distal del cromosoma que influye en el sabor dulce. También se ha descrito que el T1R3 humano se localiza en 1 p36.2-1 p36.33, una región que presenta sintenia conservada con el intervalo de ratón que contiene Sac y T1R1. Sin embargo, los receptores de tipo T1R pueden mediar otras modalidades gustativas, tales como amarga, umami, ácida y salada.

Por ejemplo, estará dentro del nivel de especialidad en la técnica realizar sustituciones de aminoácidos usando protocolos conocidos de tecnología de genes recombinantes incluyendo PCR, clonación de genes, mutagénesis dirigida de ADNc, transfección de células hospedadoras y transcripción *in vitro*. Después, las variantes podrían explorarse para actividad funcional de GPCR específica de células gustativas.

A. Identificación y caracterización de polipéptidos T1R

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas y polipéptidos T1R de la invención pueden identificarse mediante traducción supuesta de las secuencias de ácidos nucleicos codificantes. Estas diversas secuencias de aminoácidos y las secuencias de ácidos nucleicos codificantes pueden compararse entre sí o con otras secuencias de acuerdo con varios procedimientos.

Por ejemplo, en la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencias si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmos de secuencias. Pueden usarse los parámetros por defecto del programa, como se describe a continuación para los programas BLASTN y BLASTP, o pueden designarse parámetros alternativos. Después, el algoritmo de comparación de secuencias calcula los porcentajes de identidad de secuencia para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, en

base a los parámetros del programa.

Una “ventana de comparación”, como se usa en la presente memoria, incluye referencias a un segmento de cualquiera del número de posiciones contiguas seleccionado del grupo constituido por de 20 a 600, habitualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150, en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alineen de forma óptima. Se conocen bien en la técnica procedimientos de alineamiento de secuencias para comparación. Un alineamiento de secuencias óptimo para comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch, J Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante el procedimiento de búsqueda por similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), mediante aplicaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y col., eds. 1995 suplemento)).

Un ejemplo preferido de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y de similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 que se describen en Altschul y col., Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402 (1977) y Altschul y col., J Mol. Biol. 215: 403-410 (1990), respectivamente. El programa informático para realizar análisis de BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencias de puntuación elevada (HSP) por identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia problema, que coincidan con o satisfagan alguna puntuación T umbral de valor positivo cuando se alineen con una palabra de la misma longitud en una secuencia de una base de datos. Se denomina T al umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul y col., Altschul y col., Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402 (1977) y Altschul y col., J Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)). Esta coincidencia inicial de palabras vecinas actúa como semilla para el inicio de búsquedas para encontrar HSP más largas que las contengan. Las coincidencias de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en tanto en cuanto la puntuación de alineamiento acumulativa pueda aumentarse. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para restos emparejados erróneamente; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de las coincidencias de palabras en cada dirección se interrumpe cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X de su valor máximo conseguido; la puntuación acumulativa se hace cero o inferior, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST, W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como parámetros por defecto una longitud de palabra (W) de 11, un valor esperado (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como parámetros por defecto una longitud de palabra de 3 y un valor esperado (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)) alineamientos (B) de 50, valor esperado (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas.

Otro ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP genera un alineamiento múltiple de secuencias a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineamientos progresivos de dos en dos para mostrar la relación y el porcentaje de identidad de secuencia. También representa un denominado “árbol” o “dendograma” que muestra las relaciones de agrupamiento usadas para generar el alineamiento (véase, por ejemplo, la Figura 2). PILEUP usa una simplificación del procedimiento de alineamiento progresivo de Fen y Doolittle, J Mol. Evol. 35: 351-360 (1987). El procedimiento usado es similar al procedimiento descrito por Higgins y Sharp, CABIOS 5: 151-153 (1989). El programa puede alinear hasta 300 secuencias, cada una de una longitud máxima de 5.000 nucleótidos o aminoácidos. El procedimiento de alineamiento múltiple comienza con el alineamiento de dos en dos de las dos secuencias más similares, produciendo un grupo de dos secuencias alineadas. Después, este grupo se alinea con la siguiente secuencia o grupo de secuencias alineadas más relacionadas. Dos grupos de secuencias se alinean mediante una extensión sencilla del alineamiento de dos en dos de dos secuencias individuales. El alineamiento final se consigue mediante una serie de alineamientos progresivos de dos en dos. El programa se pone en funcionamiento por designación de secuencias específicas y de sus coordenadas de aminoácidos o nucleótidos para regiones de comparación de secuencias y por designación de los parámetros del programa. Usando PILEUP, una secuencia de referencia se compara con otras secuencias de ensayo para determinar la relación de porcentaje de identidad de secuencia usando los siguientes parámetros: valor de huecos por defecto (3,00), valor de longitud de huecos por defecto (0,10) y huecos terminales ponderados. PILEUP puede obtenerse del paquete de programas informáticos de análisis de secuencias GCG, por ejemplo, versión 7.0 (Deveraux y col., Nuc. Acids Res. 12: 387-395 (1984)). Lo codificado por los genes se obtuvo por traducción conceptual de las fases de lectura abierta correspondientes. La comparación de estas secuencias proteicas con todas las proteínas conocidas en las bases de datos de secuencias públicas usando el algoritmo BLASTP reveló su fuerte homología con los miembros de la familia T1R, teniendo cada una de las secuencias de la familia T1R una identidad de aminoácidos de al menos aproximadamente del 35 al 50% y, preferentemente, de al menos el 55%, de al menos el 60%, de al menos el 65% y, más preferentemente, de al menos el 70% con al menos un miembro conocido de la familia.

B. Definiciones

Como se usan en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados atribuidos a los mismos a menos que se especifique otra cosa.

Las “células gustativas” incluyen células neuroepiteliales que están organizadas en grupos para formar botones gustativos de la lengua, por ejemplo, células foliadas, fungiformes y circunvaladas (véase, por ejemplo, Roper y col., Ann. Rev. Neurosci. 12: 329-353 (1989)). También se encuentran células gustativas en el paladar y otros tejidos, tales como el esófago y el estómago.

El término “T1R” se refiere a uno o más miembros de una familia de receptores acoplados a proteína G que se expresan en células gustativas tales como células foliadas, fungiformes y circunvaladas, así como células del paladar y del esófago (véase, por ejemplo, Hoon y col., Cell, 96: 541-551 (1999), incorporado en la presente memoria como referencia en su totalidad). También se hace referencia a miembros de esta familia como GPCR-B3 y TR1 en el documento WO 00/6592, así como GPCR-B4 y TR2 en el documento WO 00/06593. También se hace referencia a GPCR-B3 en la presente memoria como rT1R1 y se hace referencia a GPCR-B4 como rT1R2. También pueden identificarse células receptoras gustativas en base a su morfología (véase, por ejemplo, Roger, anteriormente) o mediante la expresión de proteínas expresadas específicamente en células gustativas. Los miembros de la familia T1R pueden tener la capacidad de actuar como receptores para la transducción del sabor dulce o para distinguir entre otras diversas modalidades gustativas.

Los ácidos nucleicos de “T1R” codifican una familia de GPCR con siete regiones transmembrana que tienen “actividad receptora acoplada a proteína G”, por ejemplo, pueden unirse a proteínas G en respuesta a estímulos extracelulares y promover la producción de segundos mensajeros tales como IP3, AMPc, GMPc y Ca^{2+} a través de la estimulación de enzimas tales como la fosfolipasa C y la adenilato ciclasa (para una descripción de la estructura y función de los GPCR, véanse, por ejemplo, Fong, anteriormente y Baldwin, anteriormente). Una sola célula gustativa puede contener muchos polipéptidos T1R diferentes.

Por lo tanto, la expresión familia “T1R” se refiere a variantes polimórficas, alelos, mutantes y homólogos interespecie que: (1) tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente del 35 al 50%, opcionalmente una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 60, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ó 99% con las SEC ID N°: 4, 10, 12, 14, 17 ó 21 a lo largo de una ventana de aproximadamente 25 aminoácidos, opcionalmente de 54-100 aminoácidos; (2) se unen específicamente a anticuerpos generados contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N°: 4, 10, 12, 14, 17, 21 y variantes modificadas de forma conservativa de las mismas; (3) están codificados por una molécula de ácido nucleico que hibrida específicamente (con un tamaño de al menos aproximadamente 100, opcionalmente de al menos aproximadamente 500-1000 nucleótidos) en condiciones de hibridación rigurosas con una secuencia seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N°: 1, 2, 3, 9, 11, 13, 15, 16, 20 y variantes modificadas de forma conservativa de las mismas; (4) comprenden una secuencia de una identidad de al menos aproximadamente del 35 al 50% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N°: 4, 10, 12, 14, 17 ó 21; ó (5) se amplifican por cebadores que hibridan específicamente en condiciones de hibridación rigurosas con la misma secuencia que conjuntos de cebadores degenerados que codifican las SEC ID N°: 7 y 8 y variantes modificadas de forma conservativa de las mismas.

Topológicamente, ciertos GPCR quimiosensoriales tienen un “dominio N-terminal”; “dominios extracelulares”; “dominios transmembrana” que comprenden siete regiones transmembrana y los correspondientes bucles citoplasmáticos y extracelulares; “dominios citoplasmáticos” y un “dominio C-terminal” (véanse, por ejemplo, Hoon y col., Cell, 96: 541-551 (1999); Buck y Axel, Cell, 65: 175-187 (1991). Estos dominios pueden identificarse estructuralmente usando procedimientos conocidos por los especialistas en la técnica, tales como programas de análisis de secuencias que identifican dominios hidrófobos e hidrófilos (véase, por ejemplo, Stryer, Biochemistry, (3ª ed. 1988); véase también cualquiera de varios programas de análisis de secuencias basados en Internet, tales como los que se encuentran en dot.imgen.bcm.tmc.edu). Dichos dominios son útiles para generar proteínas quiméricas y para ensayos de la invención *in vitro*, por ejemplo, ensayos de unión a ligando.

Por lo tanto, los “dominios extracelulares” se refieren a los dominios de polipéptidos T1R que sobresalen de la membrana celular y se exponen a la cara extracelular de la célula. Generalmente, dichos dominios incluyen el “dominio N-terminal”, que se expone a la cara extracelular de la célula y, opcionalmente, puede incluir partes de los bucles extracelulares del dominio transmembrana que se exponen a la cara extracelular de la célula, es decir, los bucles entre las regiones transmembrana 2 y 3, entre las regiones transmembrana 4 y 5 y entre las regiones transmembrana 6 y 7.

La región del “dominio N-terminal” comienza en el extremo N-terminal y se extiende hasta una región próxima al comienzo del dominio transmembrana. Más particularmente, en una realización de la invención, este dominio comienza en el extremo N-terminal y termina aproximadamente en el ácido glutámico conservado en la posición aminoacídica 563 más o menos aproximadamente 20 aminoácidos. Estos dominios extracelulares son útiles para los ensayos de unión a ligando *in vitro*, tanto en fase soluble como sólida. Además, las regiones transmembrana, que se

describen a continuación, también pueden unirse a ligando en combinación con el dominio extracelular y, por lo tanto, son útiles para los ensayos de unión a ligando *in vitro*.

El “dominio transmembrana”, que comprende las siete “regiones transmembrana”, se refiere al dominio de polipéptidos T1R que se sitúa en el interior de la membrana plasmática y también puede incluir los correspondientes bucles citoplasmáticos (intracelulares) y extracelulares. En una realización, ésta región se corresponde con el dominio de miembros de la familia T1R que comienza aproximadamente en el resto de ácido glutámico conservado en la posición aminoacídica 563 más o menos 20 aminoácidos y termina aproximadamente en el resto aminoacídico de tirosina conservada en la posición 812 más o menos aproximadamente 10 aminoácidos. Las siete regiones transmembrana y los bucles extracelular y citoplasmático pueden identificarse usando procedimientos convencionales, como se describen en Kyte y Doolittle, J. Mol. Biol., 157: 105-32 (1982)) o en Stryer, anteriormente.

Los “dominios citoplasmáticos” se refieren a los dominios de polipéptidos T1R que están hacia el interior de la célula, por ejemplo, el “dominio C-terminal” y los bucles intracelulares del dominio transmembrana, por ejemplo, el bucle intracelular entre las regiones transmembrana 1 y 2, el bucle intracelular entre las regiones transmembrana 3 y 4 y el bucle intracelular entre las regiones transmembrana 5 y 6. El “dominio C-terminal” se refiere a la región que abarca el extremo del último dominio transmembrana y el extremo C-terminal de la proteína y que normalmente se localiza en el interior del citoplasma. En una realización, esta región comienza en el resto aminoacídico de tirosina conservado en la posición 812 más o menos aproximadamente 10 aminoácidos, y continúa hasta el extremo C-terminal del polipéptido.

Las expresiones “región de unión a ligando” o “dominio de unión a ligando” se refieren a secuencias que proceden de un receptor quimiosensorial, particularmente un receptor gustativo, que sustancialmente incorpora al menos el dominio extracelular del receptor. En una realización, el dominio extracelular de la región de unión a ligando puede incluir el dominio N-terminal y, opcionalmente, partes del dominio transmembrana tales como los bucles extracelulares del dominio transmembrana. La región de unión a ligando puede ser capaz de unirse a un ligando y, más particularmente, a un estímulo gustativo.

La expresión “efectos funcionales”, en el contexto de ensayos para ensayar compuestos que modulan la transducción del sabor mediada por miembros de la familia T1R, incluye la determinación de cualquier parámetro que esté directa o indirectamente bajo la influencia del receptor, por ejemplo, efectos funcionales, físicos y químicos. Incluye la unión a ligando, cambios en el flujo iónico, el potencial de membrana, el flujo de corriente, la transcripción, la unión a proteína G, la fosforilación o desfosforilación de GPCR, la transducción de señales, interacciones ligando-receptor, concentraciones de segundos mensajeros (por ejemplo, AMPc, GMPc, IP3 o Ca^{2+} intracelular), *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*, y también incluye otros efectos fisiológicos como aumentos o disminuciones de la liberación de neurotransmisores u hormonas.

Por “determinar el efecto funcional”, en el contexto de ensayos, se entienden ensayos para un compuesto que aumenta o disminuye un parámetro que está directa o indirectamente bajo la influencia de un miembro de la familia T1R, por ejemplo, efectos funcionales, físicos y químicos. Dichos efectos funcionales pueden medirse por cualquier medio conocido por los especialistas en la técnica, por ejemplo, cambios en las características espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice de refracción), hidrodinámicas (por ejemplo, forma), cromatográficas o propiedades de solubilidad, pinzamiento zonal, colorantes sensibles a voltaje, corrientes celulares totales, flujo de radioisótopos, marcadores inducibles, expresión de genes de T1R en ovocitos no humanos; expresión de T1R en células de cultivos tisulares; activación transcripcional de genes de T1R; ensayos de unión a ligando; cambios en el voltaje, el potencial de membrana y la conductancia; ensayos de flujo iónico; cambios en segundos mensajeros intracelulares, tales como AMPc, GMPc e inositol trifosfato (IP3); cambios en los niveles de calcio intracelular; liberación de neurotransmisores y similares.

Los términos “inhibidores”, “activadores” y “moduladores” de genes o proteínas T1R se usan indistintamente para referirse a moléculas inhibidoras, activadoras o moduladoras identificadas usando ensayos *in vitro* e *in vivo* para la transducción del sabor, por ejemplo, ligandos, agonistas, antagonistas y sus homólogos y miméticos. Los inhibidores son compuestos que, por ejemplo, se unen a, bloquean parcial o totalmente la estimulación, disminuyen, impiden, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan o regulan negativamente la transducción del sabor, por ejemplo, antagonistas. Los activadores son compuestos que, por ejemplo, se unen a, estimulan, aumentan, abren, activan, facilitan, potencian la activación, sensibilizan o regulan positivamente la transducción del sabor, por ejemplo, agonistas. Los moduladores incluyen compuestos que, por ejemplo, alteran la interacción de un receptor con: proteínas extracelulares que se unen a activadores o inhibidores (por ejemplo, ebnarina y otros miembros de la familia de transportadores hidrófobos); proteínas G; quinasas (por ejemplo, homólogos de la rodopsina quinasa y de quinasas de receptores beta adrenérgicos que están implicadas en la desactivación y desensibilización de un receptor); y arrestinas, que también desactivan y desensibilizan receptores. Los moduladores pueden incluir versiones genéticamente modificadas de miembros de la familia T1R, por ejemplo, con actividad alterada, así como ligandos, antagonistas, agonistas, moléculas químicas pequeñas y similares de origen natural y sintético. Dichos ensayos para inhibidores y activadores incluyen, por ejemplo, expresar miembros de la familia T1R en células o membranas celulares, aplicar supuestos compuestos moduladores en presencia o ausencia de estímulos gustativos, por ejemplo, un estímulo gustativo dulce y, después, determinar los efectos funcionales sobre la transducción del

sabor, como se ha descrito anteriormente. Muestras o ensayos que comprenden miembros de la familia T1R que se tratan con un activador, inhibidor o modulador potencial se comparan con muestras de control sin el inhibidor, activador o modulador para examinar el grado de modulación. A las muestras de control (sin tratar con moduladores) se les asigna un valor de actividad de T1R relativo del 100%. La inhibición de un T1R se logra cuando el valor de la actividad de T1R con respecto al control es de aproximadamente el 80%, opcionalmente del 50% o del 25-0%. La activación de un T1R se logra cuando el valor de la actividad de T1R con respecto al control es del 110%, opcionalmente del 150%, opcionalmente del 200-500% o superior al 1000-3000%.

Los términos “purificado”, “sustancialmente purificado” y “aislado”, como se usan en la presente memoria, se refieren al estado de estar libre de otros compuestos diferentes con los que el compuesto de la invención se asocia normalmente en su estado natural, de tal modo que el sujeto “purificado”, “sustancialmente purificado” y “aislado” comprende al menos el 0,5%, 1%, 5%, 10% o 20% y, más preferentemente, al menos el 50% o 75% de la masa, en peso, de una muestra dada. En una realización preferida, estos términos se refieren al compuesto de la invención que comprende al menos el 95% de la masa, en peso, de una muestra dada. Como se usan en la presente memoria, los términos “purificado”, “sustancialmente purificado” y “aislado”, cuando se refieren a un ácido nucleico o proteína, o ácidos nucleicos o proteínas, también se refieren a un estado de purificación o concentración diferente del que se da de forma natural en el cuerpo de mamífero, especialmente de un ser humano. Cualquier grado de purificación o concentración mayor que el que se da de forma natural en el cuerpo de mamífero, especialmente de un ser humano, incluyendo (1) la purificación de otras estructuras o compuestos asociados o (2) la asociación con estructuras o compuestos con los que normalmente no está asociado en el cuerpo de mamífero, especialmente de un ser humano, está dentro del significado de “aislado”. El ácido nucleico o proteína, o las clases de ácidos nucleicos o proteínas, descritos en la presente memoria, pueden aislarse o asociarse de otro modo con estructuras o compuestos con los que normalmente no están asociados en la naturaleza, de acuerdo con una diversidad de procedimientos y procesos conocidos por los especialistas en la técnica.

Como se usa en la presente memoria, el término “aislado”, cuando se refiere a un ácido nucleico o polipéptido, se refiere a un estado de purificación o concentración diferente del que se da de forma natural en el cuerpo de mamífero, especialmente de un ser humano. Cualquier grado de purificación o concentración mayor que el que se da de forma natural en el cuerpo, incluyendo (1) la purificación de otras estructuras o compuestos asociados de origen natural o (2) la asociación con estructuras o compuestos con los que normalmente no está asociado en el cuerpo, están dentro del significado de “aislado”, como se usa en la presente memoria. Los ácidos nucleicos o polipéptidos descritos en la presente memoria pueden aislarse o asociarse de otro modo con estructuras o compuestos con los que normalmente no se asocian en la naturaleza, de acuerdo con una diversidad de procedimientos y procesos conocidos por los especialistas en la técnica.

Como se usan en la presente memoria, los términos “amplificar” y “amplificación” se refieren al uso de cualquier metodología de amplificación adecuada para generar o detectar ácidos nucleicos expresados de forma natural o recombinante, como se describe en detalle a continuación. Por ejemplo, la invención proporciona procedimientos y reactivos (por ejemplo, parejas de cebadores oligonucleotídicos degenerados específicos) para amplificar (por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa, PCR) ácidos nucleicos de la invención expresados de forma natural (por ejemplo, genómico o ARNm) o recombinante (por ejemplo, ADNc) (por ejemplo, secuencias de unión a estímulos gustativos de la invención) *in vivo* o *in vitro*.

La expresión “receptor de 7 transmembrana” se refiere a un polipéptido que pertenece a una superfamilia de proteínas transmembrana que tienen siete dominios que atraviesan la membrana plasmática siete veces (por lo tanto, los siete dominios se denominan dominios “transmembrana” o “TM” de TM I a TM VII). Las familias de receptores olfativos y ciertos receptores gustativos pertenecen cada una a esta superfamilia. Los polipéptidos de receptores de 7 transmembrana tienen estructuras primarias, secundarias y terciarias similares y características, como se describe con más detalle a continuación.

El término “biblioteca” se refiere a una preparación que es una mezcla de diferentes moléculas de ácidos nucleicos o polipéptidos, tal como la biblioteca de dominios quimiosensoriales, particularmente dominios de unión a ligando de receptores gustativos, generados de forma recombinante por amplificación del ácido nucleico con parejas de cebadores degenerados o una colección aislada de vectores que incorporan los dominios de unión a ligando amplificados o una mezcla de células transfectadas cada una de forma aleatoria con al menos un vector que codifica un receptor gustativo.

Las expresiones “ácido nucleico” o “secuencia de ácido nucleico” se refieren a un oligonucleótido desoxirribonucleotídico o ribonucleotídico en forma monocatenaria o bicatenaria. Las expresiones incluyen ácidos nucleicos, es decir, oligonucleótidos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales. El término también incluye estructuras de tipo ácido nucleico con cadenas principales sintéticas (véanse, por ejemplo, Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach, ed. F. Eckstein, Oxford Univ. Press (1991); Antisense Strategies, Annals of the N. Y. Academy of Sciences, Vol. 600, Eds. Baserga et al. (NYAS 1992); Milligan J. Med. Chem. 36: 1923-1937 (1993); Antisense Research and Applications (1993, CRC Press), documentos WO 97/03211; WO 96/39154; Mata, Toxicol. Appl. Pharmacol. 144: 189-197 (1997); Strauss-Soukup, Biochemistry 36: 8692-8698 (1997); Samstag, Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 6: 153-156 (1996)).

A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular también incluye implícitamente variantes modificadas de forma conservativa de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada de forma explícita. En concreto, pueden lograrse sustituciones de codones degenerados por generación, por ejemplo, de secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados se sustituye con restos de bases mixtas y/o de desoxiinosina (Batzner y col., Nucleic Acid Res., 19: 5081 (1991); Ohtsuka y col., J. Biol. Chem., 260: 2605-2608 (1985); Rossolini y col., Mol. Cell. Probes, 8: 91-98 (1994). El término ácido nucleico se usa indistintamente con el término de gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a un polímero de restos aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural.

La expresión “dominio de translocación de la membrana plasmática” o simplemente “dominio de translocación” se refiere a un dominio polipeptídico que, cuando se incorpora en el extremo amino terminal de una secuencia codificante de un polipéptido puede servir de “chaperona” o “translocar” la proteína híbrida (de “fusión”) con gran eficacia a la membrana plasmática de la célula. Por ejemplo, un “dominio de translocación” puede obtenerse a partir del extremo amino terminal del polipéptido receptor de rodopsina bovino, un receptor de 7 transmembrana. Sin embargo, puede usarse rodopsina de cualquier mamífero, así como otras secuencias facilitadoras de la translocación. Por lo tanto, el dominio de translocación es particularmente eficaz en la translocación de proteínas de fusión de 7 transmembrana a la membrana plasmática y una proteína (por ejemplo, un polipéptido receptor gustativo), que comprende un dominio de translocación amino terminal se transportará a la membrana plasmática más eficazmente que sin el dominio. Sin embargo, si el dominio N-terminal del polipéptido es activo en la unión, puede preferirse el uso de otros dominios de translocación.

El “dominio de translocación”, “dominio de unión a ligando” y las composiciones de receptores quiméricos descritas en la presente memoria también incluyen “análogos” o “variantes conservativas” y “miméticos” (“peptidomiméticos”) con estructuras y actividad que se corresponden sustancialmente con las secuencias ejemplares. Por lo tanto, las expresiones “variante conservativa” o “análogo” o “mimético” se refieren a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos modificada de tal modo que el cambio o cambios no alteren sustancialmente la estructura y/o actividad del polipéptido (las variantes conservativas), como se definen en la presente memoria. Éstas incluyen variaciones modificadas de forma conservativa de una secuencia de aminoácidos, es decir, sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos de los restos que no son críticos para la actividad de la proteína, o sustitución de aminoácidos con restos que tienen propiedades similares (por ejemplo, ácidos, básicos, cargados positivamente o negativamente, polares o no polares, etc.), de tal modo que las sustituciones de incluso aminoácidos críticos no alteren sustancialmente la estructura y/o actividad.

Más particularmente, la expresión “variantes modificadas de forma conservativa” se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, las variantes modificadas de forma conservativa se refieren a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada.

Por ejemplo, todos los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cualquier posición en la que un codón especifique una alanina, el codón puede modificarse por cualquiera de los codones descritos correspondientes sin modificar el polipéptido codificado.

Dichas variaciones de ácidos nucleicos son “variaciones silenciosas”, que son una especie de variaciones modificadas de forma conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico en la presente memoria que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un especialista reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que generalmente es el único codón para la metionina, y TGG, que generalmente es el único codón para el triptófano) puede modificarse para dar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Se conocen bien en la técnica tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Por ejemplo, una guía ejemplar para seleccionar sustituciones conservativas incluye (resto original seguido de sustitución ejemplar): ala/gly o ser; arg/lys; asn/gln o his; asp/glu; cys/ser; gln/asn; gly/asp; gly/ala o pro; his/asn o gln; ile/leu o val; leu/ile o val; lys/arg o gln o glu; met/leu o tyr o ile; phe/met o leu o tyr; ser/thr; thr/ser; trp/tyr; tyr/trp o phe; val/ile o leu. Una guía ejemplar alternativa usa los seis grupos siguientes, conteniendo cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre ellos: 1) alanina (A), serina (S), treonina (T); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (L); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); y 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W); (véanse también, por ejemplo, Creighton, Proteins, W. H. Freeman and Company (1984); Schultz y Schimer, Principles of Protein Structure,

Springer-Vrlag (1979)). Un especialista en la técnica entenderá que las sustituciones identificadas anteriormente no son las únicas sustituciones conservativas posibles. Por ejemplo, para algunos fines, se pueden considerar todos los aminoácidos cargados como sustituciones conservativas entre ellos, ya sean positivos o negativos. Además, también pueden considerarse “variaciones modificadas de forma conservativa” sustituciones, deleciones o adiciones individuales que modifiquen, añadan o delecionen un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en una secuencia codificada.

Los términos “mimético” y “peptidomimético” se refieren a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y/o funcionales de los polipéptidos, por ejemplo, dominios de translocación, dominios de unión a ligando o receptores quiméricos de la invención. El mimético puede estar totalmente compuesto por análogos sintéticos no naturales de aminoácidos o puede ser una molécula quimérica de, en parte aminoácidos peptídicos naturales, y en parte análogos no naturales de aminoácidos. El mimético también puede incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservativas de aminoácidos naturales siempre que dichas sustituciones tampoco alteren sustancialmente la estructura y/o actividad del mimético.

Como con los polipéptidos de la invención, que son variantes conservativas, una experimentación de rutina determinará si un mimético está dentro del alcance de la invención, es decir, que su estructura y/o función no están sustancialmente alteradas. Las composiciones miméticas de polipéptidos pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales no naturales que típicamente son de tres grupos estructurales: a) grupos de unión de restos distintos de las uniones por enlaces amida naturales (“enlace peptídico”); b) restos no naturales en lugar de restos aminoacídicos de origen natural; o c) restos que inducen mimetismo de la estructura secundaria, es decir, para inducir o estabilizar una estructura secundaria, por ejemplo, un giro beta, giro gamma, una lámina beta, una conformación de hélice alfa y similares. Un polipéptido puede caracterizarse como un mimético cuando todos o algunos de sus restos están unidos por medios químicos distintos de los enlaces peptídicos naturales. Los restos peptidomiméticos individuales pueden unirse mediante enlaces peptídicos, otros enlaces químicos o medios de acoplamiento, tales como, por ejemplo, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, maleimidias bifuncionales, N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) o N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC). Los grupos de unión que pueden ser una alternativa a las uniones por enlace amida tradicional (“enlace peptídico”) incluyen, por ejemplo, cetometileno (por ejemplo, -C(=O)-CH₂ para -C(=O)-NH-), aminometileno (CH₂-NH), etileno, olefina (CH=CH), éter (CH₂-O), tioéter (CH₂-S), tetrazol (CN₄), tiazol, retroamida, tioamida o éster (véase, por ejemplo, Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, págs. 267-357, “Peptide Backbone Modifications”, Marcell Dekker, NY (1983)). Un polipéptido también puede caracterizarse como un mimético por contener todos o algunos restos no naturales en lugar de restos aminoacídicos de origen natural; los restos no naturales están bien descritos en la bibliografía científica y de patentes.

Un “marcador” o un “resto detectable” es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen ³²P, colorantes fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas (por ejemplo, como se usan comúnmente en un ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos y proteínas que puedan hacerse detectables, por ejemplo, por incorporación de un radiomarcador en el péptido o que se usan para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el péptido.

Un “oligonucleótido o sonda de ácido nucleico marcada” es una que está unida covalentemente, a través de un enlazador o de un enlace químico, o no covalentemente, a través de enlaces iónicos, de van der Waals, electrostáticos o de hidrógeno con un marcador, de tal modo que la presencia de la sonda puede detectarse mediante la detección de la presencia del marcador unido a la sonda.

Como se usa en la presente memoria, un “oligonucleótido o sonda de ácido nucleico” se define como un ácido nucleico capaz de unirse a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos, habitualmente a través del emparejamiento de bases complementarias, habitualmente por formación de enlaces de hidrógeno. Como se usa en la presente memoria, una sonda puede incluir bases naturales (es decir, A, G, C o T) o modificadas (7-deazaguanosina, inosina, etc.). Además, las bases en una sonda pueden unirse por un enlace distinto de un enlace fosfodiéster, siempre que no interfiera con la hibridación. Por lo tanto, por ejemplo, las sondas pueden ser ácidos nucleicos peptídicos en los que las bases constituyentes están unidas por enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster. Un especialista en la técnica entenderá que las sondas pueden unirse a secuencias diana que carecen de una complementariedad total con la secuencia de la sonda, dependiendo de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Opcionalmente, las sondas están marcadas directamente, como con isótopos, cromóforos, luminóforos, cromógenos, o marcadas indirectamente, tal como con biotina, con la que después puede unirse un complejo de estreptavidina. Mediante el ensayo para determinar la presencia o ausencia de la sonda, se puede detectar la presencia o ausencia de la secuencia o subsecuencia seleccionada.

El término “heterólogo”, cuando se usa con respecto a partes de un ácido nucleico, indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce típicamente de forma recombinante, teniendo una o más secuencias de genes no relacionados organizadas para generar un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor de una fuente y una región codificante de otra fuente. De forma similar, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por

ejemplo, una proteína de fusión).

Un "promotor" se define como una serie de secuencias de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Como se usa en la presente memoria, un promotor incluye secuencias de ácidos nucleicos necesarias próximas al sitio de inicio de la transcripción, tales como, en el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento TATA. Opcionalmente, un promotor también incluye elementos potenciadores o represores distales, que pueden localizarse tan lejos como a varios miles de pares de bases desde el sitio de inicio de la transcripción. Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo en la mayoría de las condiciones ambientales y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que es activo bajo regulación ambiental o del desarrollo. La expresión "unido operativamente" se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de la expresión de un ácido nucleico (tal como un promotor o una serie de sitios de unión a un factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en la que la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico que se corresponde con la segunda secuencia.

Como se usa en la presente memoria, el término "recombinante" se refiere a un polinucleótido sintetizado o manipulado de otro modo *in vitro* (por ejemplo, un "polinucleótido recombinante"), para procedimientos de uso de polinucleótidos recombinantes para producir productos génicos en células u otros sistemas biológicos, o para un polipéptido ("proteína recombinante") codificado por un polinucleótido recombinante. Los "medios recombinantes" también incluyen la ligación de ácidos nucleicos que tienen diversas regiones o dominios codificantes o secuencias promotoras de diferentes fuentes en un casete o vector de expresión para la expresión, por ejemplo, expresión inducible o constitutiva, de una proteína de fusión que comprende un dominio de translocación de la invención y una secuencia de ácido nucleico amplificada usando un cebador de la invención.

La expresión "hibrida selectivamente (o específicamente) con" se refiere a la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula sólo con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones de hibridación rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, ADN o ARN total celular o de genoteca).

La expresión "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a condiciones en las que una sonda hibridará con su subsecuencia diana, típicamente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más elevadas. Una amplia guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridisation with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Generalmente, se selecciona que las condiciones rigurosas sean de aproximadamente 5-10°C inferiores al punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (en una fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidas) a la que el 50% de las sondas complementarias con la diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio (como las secuencias diana están presentes en exceso, a la T_m , el 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración salina es menor de aproximadamente ión sodio 1,0 M, típicamente una concentración de ión sodio de aproximadamente 0,01 a 1,0 M (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3, y la temperatura es de al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, mayores de 50 nucleótidos). También pueden lograrse condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva es de al menos dos veces la hibridación de fondo, opcionalmente 10 veces la hibridación de fondo. Pueden ser condiciones de hibridación rigurosas ejemplares las siguientes: formamida al 50%, SSC 5x y SDS al 1%, incubando a 42°C, o SSC 5x, SDS al 1%, incubando a 65°C, con lavado en SSC 0,2x y SDS al 0,1 % a 65°C. Dichas etapas de hibridación y de lavado pueden llevarse a cabo, por ejemplo, durante 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 minutos o más.

Los ácidos nucleicos que no hibridan entre sí en condiciones rigurosas están aun así sustancialmente relacionados si los polipéptidos que codifican están sustancialmente relacionados. Esto se produce, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético. En dichos casos, los ácidos nucleicos hibridan típicamente en condiciones de hibridación moderadamente rigurosas. Las "condiciones de hibridación moderadamente rigurosas" ejemplares incluyen una hibridación en un tampón de formamida al 40%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en SSC 1X a 45°C. Dichas etapas de hibridación y lavado pueden llevarse a cabo, por ejemplo, durante 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 minutos o más. Una hibridación positiva es al menos dos veces el fondo. Los especialistas reconocerán fácilmente que pueden utilizarse condiciones de hibridación y lavado alternativas para proporcionar condiciones de una rigurosidad similar.

El término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende una región marco conservada de un gen de inmunoglobulina o fragmentos del mismo que se une específicamente y reconoce un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de las regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como la miríada de genes de la región variable de inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) ejemplar comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos parejas idénticas de cadenas polipeptídicas, teniendo cada pareja una cadena “ligera” (de aproximadamente 25 kDa) y una “pesada” (de aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. Las expresiones cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) se refieren a estas cadenas ligera y pesada, respectivamente.

Un “anticuerpo quimérico” es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante o una parte de la misma, se modifica, reemplaza o intercambia, de tal modo que el sitio de unión al antígeno (región variable) se une a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o modificada, o a una molécula totalmente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una parte de la misma, se modifica, reemplaza o intercambia con una región variable que tiene una especificidad antigénica diferente o modificada.

Un anticuerpo “anti-T1R” es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido codificado por un gen T1R, ADNc o una subsecuencia del mismo.

El término “inmunoensayo” es un ensayo que usa un anticuerpo para unirse específicamente a un antígeno. El inmunoensayo se caracteriza por el uso de propiedades de unión específicas de un anticuerpo particular para aislar, dirigir y/o cuantificar el antígeno.

La expresión “se une específicamente (o selectivamente)” a un anticuerpo o “inmunorreacciona específicamente (o selectivamente) con”, cuando se refiere a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otras moléculas biológicas. Por lo tanto, en las condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados se unen a una proteína particular al menos dos veces el fondo y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo en dichas condiciones puede requerir un anticuerpo que se selecciona por su especificidad por una proteína particular. Por ejemplo, pueden seleccionarse anticuerpos policlonales generados contra un miembro de la familia T1R de una especie específica, tal como rata, ratón o ser humano, para obtener sólo los anticuerpos policlonales que son específicamente inmunorreactivos con el polipéptido T1R o una parte inmunogénica del mismo y no con otras proteínas, excepto por ortólogos o variantes polimórficas y alelos del polipéptido T1R. Esta selección puede lograrse eliminando los anticuerpos que presentan reacción cruzada con moléculas T1R de otra especie u otras moléculas T1R. También pueden seleccionarse anticuerpos que sólo reconozcan miembros de la familia T1R de GPCR, pero no GPCR de otras familias. Pueden usarse una diversidad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se usan de forma rutinaria inmunoensayos de ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, (1988), para una descripción de formatos de inmunoensayo y condiciones que pueden usarse para determinar una inmunorreactividad específica). Típicamente, una reacción específica o selectiva será de al menos dos veces la señal o ruido de fondo y, más típicamente, más de 10 a 100 veces el fondo.

La expresión “se asocia selectivamente con” se refiere a la capacidad de un ácido nucleico para “hibridar selectivamente” con otro como se ha definido anteriormente, o a la capacidad de un anticuerpo para “unirse selectivamente (o específicamente)” a una proteína, como se ha definido anteriormente.

La expresión “vector de expresión” se refiere a cualquier sistema de expresión recombinante con el fin de expresar una secuencia de ácido nucleico de la invención *in vitro* o *in vivo*, de forma constitutiva o inducible, en cualquier célula, incluyendo células procariotas, de levaduras, hongos, plantas, insectos o mamíferos. El término incluye sistemas de expresiones lineales o circulares. El término incluye sistemas de expresión que permanecen de forma episomal o se integran en el genoma de la célula hospedadora. Los sistemas de expresión pueden tener la capacidad de autorreplicarse o no, es decir, dirigir sólo la expresión transitoria en una célula. El término incluye la expresión recombinante de “casetes” que contienen solamente los elementos mínimos necesarios para la transcripción del ácido nucleico recombinante.

Por “célula hospedadora” se entiende una célula que contiene un vector de expresión y facilita la replicación o la expresión del vector de expresión. Las células hospedadoras pueden ser células procariotas tales como *E. coli*, o células eucariotas tales como células de levaduras, insectos, anfibios o mamíferos, tales como CHO, HeLa, HEK-293 y similares, por ejemplo, células cultivadas, explantes y células *in vivo*.

A. Aislamiento y expresión de polipéptidos T1R

El aislamiento y la expresión de los T1R de la invención, o fragmentos o variantes de los mismos, pueden realizarse como se describe a continuación. Para la amplificación de ácidos nucleicos que codifican regiones de unión a ligando de receptor gustativo pueden usarse cebadores de PCR y, opcionalmente, pueden generarse bibliotecas de estos ácidos nucleicos. Después pueden usarse vectores de expresión individuales o bibliotecas de vectores de

expresión para infectar o transfectar células hospedadoras para la expresión funcional de estos ácidos nucleicos o bibliotecas. Estos genes y vectores pueden prepararse y expresarse *in vitro* o *in vivo*. Un especialista reconocerá que, dentro de los vectores de la invención, pueden obtenerse fenotipos deseados para alterar y controlar la expresión de ácidos nucleicos modulando la expresión o la actividad de los genes y ácidos nucleicos (por ejemplo, promotores, potenciadores y similares). Para aumentar o disminuir la expresión o la actividad puede usarse cualquiera de los procedimientos conocidos descritos. La invención puede realizarse junto con cualquier procedimiento o protocolo conocido en la técnica, que están bien descritos en la bibliografía científica y de patentes.

Las secuencias de ácidos nucleicos de la invención y otros ácidos nucleicos usados para la realización práctica de la presente invención, ya sea ARN, ADNc, ADN genómico, vectores, virus o híbridos de los mismos, pueden aislarse de una diversidad de fuentes, modificarse por ingeniería genética, amplificarse y/o expresarse de forma recombinante. Puede usarse cualquier sistema de expresión recombinante incluyendo, además de células de mamífero, sistemas, por ejemplo, bacterianos, de levaduras, de insectos o de plantas.

Como alternativa, estos ácidos nucleicos pueden sintetizarse *in vitro* mediante técnicas de síntesis química bien conocidas, como se describe, por ejemplo, en Carruthers, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47: 411-418 (1982); Adams, Am. Chem. Soc 105: 661 (1983); Belousov, Nucleic Acids Res. 25: 3440-3444 (1997); Frenkel, Free Radic. Biol. Med. 19: 373-380 (1995); Blommers, Biochemistry 33: 7886-7896 (1994); Narang, Meth Enzymol. 68: 90 (1979); Brown, Meth. Enzymol. 68: 109 (1979); Beaucage, Tetra. Lett. 22: 1859 (1981); Patente de Estados Unidos N° 4.458.066. Después pueden obtenerse fragmentos de ADN bicatenario por síntesis de la cadena complementaria e hibridación de las cadenas entre sí en condiciones apropiadas, o por adición de la cadena complementaria usando ADN polimerasa con una secuencia cebadora apropiada.

En la bibliografía científica y de patentes se describen bien técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, para generar mutaciones en secuencias, subclonación, marcaje de sondas, secuenciación, hibridación y similares. Véanse, por ejemplo, Sambrook, ed., Molecular Cloning: a Laboratory Manual (2ª ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1997); Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I, Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N. Y. (1993).

Pueden analizarse y cuantificarse ácidos nucleicos, vectores, cápsides, polipéptidos y similares por cualquiera de varios medios generales bien conocidos por los especialistas en la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, procedimientos bioquímicos analíticos tales como RMN, espectrofotometría, radiografía, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía por hiperdifusión, diversos procedimientos inmunológicos, por ejemplo, reacciones de precipitación en medio líquido o en gel, inmunodifusión, inmunoelectroforesis, radioinmunoensayo (RIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos inmunofluorescentes, análisis de Southern, análisis de Northern, análisis de transferencia puntual, electroforesis en gel (por ejemplo, SDS-PAGE), RT-PCR, PCR cuantitativa, otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos o dianas o señales, radiomarcaje, recuento de centelleo y cromatografía de afinidad.

Pueden usarse cebadores oligonucleotídicos para amplificar fragmentos de ácidos nucleicos que codifican regiones de unión a ligando de receptor gustativo. Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria también pueden clonarse o medirse cuantitativamente usando técnicas de amplificación. Se conocen bien en la técnica procedimientos de amplificación e incluyen, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa, PCR (PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications, ed. Innis. Academic Press, N. Y. (1990) y PCR Strategies, ed. Innis, Academic Press, Inc., N. Y. (1995)), reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véanse, por ejemplo, Wu, Genomics 4: 560 (1989); Landegren; Science 241: 1077, (1988); Barringer, Gene 89: 117 (1990)); amplificación de la transcripción (véase, por ejemplo, Kwok, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173 (1989)); replicación de secuencia automantenida (véase, por ejemplo, Guatelli, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874 (1990)); amplificación por replicasa Q-beta (véase, por ejemplo, Smith, J. Clin. Microbiol. 35: 1477-1491 (1997)); ensayo de amplificación por replicasa Q-beta automático (véase, por ejemplo, Burg, Mol. Cell. Probes 10: 257-271 (1996)); y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario); véase también Berger, Methods Enzymol. 152: 307-316 (1987); Sambrook; Ausubel; patente de Estados Unidos N° 4.683.195 y 4.683.202; Sooknanan, Biotechnology 13: 563-564 (1995). Los cebadores pueden diseñarse para conservar la secuencia original del receptor de 7 membranas "donante". Como alternativa, los cebadores pueden codificar restos aminoacídicos que son sustituciones conservativas (por ejemplo, resto hidrófobo por hidrófobo, véase la discusión anterior) o sustituciones funcionalmente benignas (por ejemplo, que no impiden la inserción en la membrana plasmática, no causan escisión por peptidasa, ni causan un plegamiento anormal del receptor y similares). Una vez amplificados, los ácidos nucleicos, de forma individual o como bibliotecas, pueden clonarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica y, si se desea, en cualquiera de una diversidad de vectores usando procedimientos de biología molecular rutinarios; se describen procedimientos para la clonación de ácidos nucleicos amplificados *in vitro*, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N°: 5.426.039.

Las parejas de cebadores pueden diseñarse para amplificar de forma selectiva regiones de unión a ligando de los miembros de la familia T1R. Estas regiones pueden variar para diferentes ligandos o estímulos gustativos. Por lo

tanto, lo que puede ser una región de unión mínima para un estímulo gustativo, puede ser demasiado limitante para un segundo estímulo gustativo. Por consiguiente, pueden amplificarse regiones de unión a ligando de diferentes tamaños que comprenden estructuras de dominio extracelular diferentes.

Se conocen bien en la técnica ejemplos para diseñar parejas de cebadores degenerados. Por ejemplo, un programa informático de estrategia COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer (CODEHOP) está disponible en <http://blocks.fhcrc.org/codehop.html> y tiene un vínculo directo desde el sitio de alineamiento múltiple de secuencias BlockMaker para la predicción de cebadores híbridos que comienza con un conjunto de secuencias proteicas relacionadas, como regiones de unión a ligando de receptor gustativo conocidas (véase, por ejemplo, Rose, Nucleic Acids Res. 26: 1628-1635 (1998); Singh, Biotechniques 24: 318-319 (1998)).

En la técnica se conocen bien medios para sintetizar parejas de cebadores oligonucleotídicos. Pueden usarse pares de bases "naturales" o pares de bases sintéticas. Por ejemplo, el uso de bases de ácidos nucleicos artificiales ofrece un enfoque versátil para manipular la secuencia de cebadores y generar una mezcla más compleja de productos de amplificación. Diversas familias de bases de ácidos nucleicos artificiales son capaces de asumir múltiples orientaciones de enlaces de hidrógeno a través de giros de enlaces internos para proporcionar un medio para el reconocimiento molecular degenerado. La incorporación de estos análogos en una sola posición de un cebador de PCR permite la generación de una biblioteca compleja de productos de amplificación. Véase, por ejemplo, Hoops, Nucleic Acids Res. 25: 4866-4871 (1997). También pueden usarse moléculas no polares para mimetizar la forma de las bases de ADN naturales. Un mimético de forma de enlace no de hidrógeno para adenina puede replicarse eficazmente y selectivamente frente a un mimético de forma no polar para timina (véase, por ejemplo, Morales, Nat. Struct. Biol. 5: 950-954 (1998)). Por ejemplo, dos bases degeneradas pueden ser la base de pirimidina 6H,8H-3,4-dihidropirimido[4,5-c][1,2]oxacin-7-ona o la base de purina N6-metoxi-2,6-diaminopurina (véase, por ejemplo, Hill, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 4258-4263 (1998)). Los cebadores degenerados ejemplares incorporan la base de ácidos nucleicos análoga 5'-dimetoxitritil-N-benzoil-2'-desoxi-citidina.3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamida (el término "P" en las secuencias, véase anteriormente). Este análogo de pirimidina forma enlaces de hidrógeno con purinas, incluyendo restos de A y G.

Pueden aislarse variantes polimórficas, alelos y homólogos interespecie que sean sustancialmente idénticos a un receptor gustativo descrito en la presente memoria usando las sondas de ácidos nucleicos descritas anteriormente. Como alternativa, pueden usarse bibliotecas de expresión para clonar polipéptidos T1R y variantes polimórficas, alelos y homólogos interespecie de los mismos, mediante la detección de homólogos expresados inmunológicamente con antiseros o con anticuerpos purificados generados contra un polipéptido T1R, que también reconocen y se unen selectivamente al homólogo de T1R.

Pueden generarse ácidos nucleicos que codifican regiones de unión a ligando de receptores gustativos mediante amplificación (por ejemplo, PCR) de secuencias de ácidos nucleicos apropiadas usando parejas de cebadores degenerados. El ácido nucleico amplificado puede ser ADN genómico de cualquier célula o tejido o ARNm o ADNc obtenido de células que expresan receptores gustativos.

En una realización, pueden construirse secuencias codificantes de proteínas híbridas que comprenden ácidos nucleicos que codifican T1R fusionados a secuencias de translocación. También se proporcionan T1R híbridos que comprenden los motivos de translocación y dominios de unión a estímulos gustativos de otras familias de receptores quimiosensoriales, particularmente receptores gustativos. Estas secuencias de ácidos nucleicos pueden unirse operativamente a elementos de control de la transducción o de la traducción, por ejemplo, secuencias de inicio de la transcripción y de la traducción, promotores y potenciadores, terminadores de la transcripción y de la traducción, secuencias de poliadenilación y otras secuencias útiles para transcribir ADN en ARN. En la construcción de casetes de expresión recombinante, vectores y transgénicos, puede emplearse un fragmento promotor para dirigir la expresión del ácido nucleico deseado en todas las células o tejidos deseados.

En otra realización, las proteínas de fusión pueden incluir secuencias de translocación C-terminales o N-terminales. Además, las proteínas de fusión pueden comprender elementos adicionales, por ejemplo, para la detección y purificación de proteínas u otras aplicaciones. Los dominios que facilitan la detección y la purificación incluyen, por ejemplo, péptidos quelantes de metales tales como tractos de polihistidina, módulos de histidina-triptófano u otros dominios que permiten la purificación sobre metales inmovilizados; proteína de unión a maltosa; dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada; o el dominio utilizado en el FLAGS extension/affinity purification system (Inmunex Corp, Seattle WA).

La inclusión de secuencias enlazadoras escindibles tales como factor Xa (véase, por ejemplo, Ottavi, Biochimie 80: 289-293 (1998)), motivo de reconocimiento de proteasa subtilisina (véase, por ejemplo, Polyak, Protein Eng. 10: 615-619 (1997)); enteroquinasa (Invitrogen, San Diego, CA) y similares entre el dominio de translocación (para una expresión eficaz en la membrana plasmática) y el resto del polipéptido recién traducido puede ser útil para facilitar la purificación. Por ejemplo, una construcción puede incluir un polipéptido que codifica una secuencia de ácido nucleico unida a seis restos de histidina, seguido de una tiorredoxina, un sitio de escisión para enteroquinasa (véase, por ejemplo, Williams, Biochemistry 34: 1787-1797 (1995)), y un dominio de translocación C-terminal. Los restos de histidina facilitan la detección y la purificación mientras que el sitio de escisión para enteroquinasa proporciona un

medio para purificar la proteína o proteínas deseadas del resto de la proteína de fusión. Se describen bien en la bibliografía científica y de patentes la tecnología relacionada con vectores que codifican proteínas de fusión y la aplicación de proteínas de fusión, véase, por ejemplo, Kroll, DNA Cell. Biol. 12: 441-53 (1993).

- 5 Pueden introducirse vectores de expresión, como vectores de expresión individuales o como bibliotecas de vectores de expresión, que comprenden las secuencias codificantes del dominio de unión a ligando en un genoma o en el citoplasma o un núcleo de una célula y expresarse por una diversidad de técnicas convencionales, bien descritas en la bibliografía científica y de patentes. Véanse, por ejemplo, Roberts, Nature 328: 731 (1987); Berger, anteriormente; Scheneider, Protein Expr. Purif. 6435: 10 (1995); Sambrook; Tijssen; Ausubel. La información de producto de
10 fabricantes de reactivos biológicos y equipos experimentales también proporciona información con respecto a procedimientos biológicos conocidos. Los vectores pueden aislarse de fuentes naturales, obtenidas de fuentes tales como las bibliotecas de la ATCC o del GenBank, o prepararse mediante procedimientos sintéticos o recombinantes.

- Los ácidos nucleicos pueden expresarse en casetes de expresión, vectores o virus que se expresan de forma estable o transitoria en células (por ejemplo, sistemas de expresión episomales). Pueden incorporarse marcadores de selección en casetes de expresión y vectores para conferir un fenotipo seleccionable a células y secuencias transformadas. Por ejemplo, los marcadores de selección pueden codificar para el mantenimiento y la replicación episomal, de modo que no sea necesaria la integración en el genoma hospedador. Por ejemplo, el marcador puede codificar una resistencia a antibióticos (por ejemplo, cloranfenicol, kanamicina, G418, bleomicina, higromicina) o
20 resistencia a herbicida (por ejemplo, clorosulfurón o Basta) para permitir la selección de las células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, por ejemplo, Blondelet-Rouault, Gene 190: 315-317 (1997); Aubrecht, J. Pharmacol. Exp. Ther. 281: 992-997 (1997)). Debido a que genes marcadores de selección que confieren resistencia a sustratos, como neomicina o higromicina, sólo pueden utilizarse en el cultivo de tejidos, también se usan genes de quimiorresistencia como marcadores de selección *in vitro* e *in vivo*.

- 25 Una secuencia de ácido nucleico quimérica puede codificar un dominio de unión a ligando de T1R dentro de cualquier polipéptido de 7 transmembrana. Debido a que los polipéptidos receptores de 7 transmembrana tienen secuencias primarias y estructuras secundarias y terciarias similares, pueden identificarse fácilmente dominios estructurales (por ejemplo, dominio extracelular, dominios TM, dominios citoplasmáticos, etc.) mediante análisis de
30 secuencias. Por ejemplo, el modelado por homología, el análisis de Fourier y la detección de periodicidad helicoidal pueden identificar y caracterizar los siete dominios con una secuencia de receptor de 7 transmembrana. Pueden usarse algoritmos de la transformada rápida de Fourier (FFT) para evaluar los periodos dominantes que caracterizan perfiles de la hidrofobicidad y variabilidad de las secuencias analizadas. La potenciación de la detección de la periodicidad y el índice de periodicidad helicoidal alfa pueden realizarse, por ejemplo, como en Donnelly, Protein Sci. 2: 55-70 (1993). Se conocen bien en la técnica otros algoritmos de alineamiento y modelado, véase, por ejemplo, Peisch, Receptors Channels 4: 161-164 (1996); Kyte y Doolittle, J. Md. Bio., 157: 105-132 (1982); Cronet, Protein Eng. 6: 59-64 (1993) (homology and "discover modeling"); <http://bioinfo.weizmann.ac.il/>.

- La descripción también incluye, no sólo el ADN y las proteínas que tienen las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos especificadas, sino también fragmentos de ADN, particularmente fragmentos de, por ejemplo, 40, 60, 80, 100, 150, 200 ó 250 nucleótidos o más, así como fragmentos proteicos de, por ejemplo, 10, 20, 30, 50, 70, 100 ó 150 aminoácidos o más. Opcionalmente, los fragmentos de ácidos nucleicos pueden codificar un polipéptido antigénico que es capaz de unirse a un anticuerpo generado contra un miembro de la familia T1R. Además, un
45 fragmento proteico puede ser, opcionalmente, un fragmento antigénico que sea capaz de unirse a un anticuerpo generado contra un miembro de la familia T1R.

- También se contemplan proteínas quiméricas, que comprenden al menos 10, 20, 30, 50, 70, 100 ó 150 aminoácidos o más, de uno de al menos uno de los polipéptidos T1R descritos en la presente memoria, acopladas con aminoácidos adicionales que representan todo o parte de otro GPCR, preferentemente un miembro de la
50 superfamilia de 7 transmembrana. Estas quimeras pueden generarse a partir de los presentes receptores y otros GPCR, o pueden generarse por combinación de dos o más de los presentes receptores. En una realización, una parte de la quimera se corresponde con o procede del dominio extracelular de un polipéptido T1R de la invención. En otra realización, una parte de la quimera se corresponde con o procede del dominio extracelular de uno o más de los dominios transmembrana de un polipéptido T1R descrito en la presente memoria y la parte o partes restantes
55 pueden proceder de otro GPCR. Se conocen bien en la técnica receptores quiméricos, y también se conocen bien las técnicas para generarlos y la selección y los límites de dominios o fragmentos de receptores acoplados a proteína G para la incorporación en los mismos. Por lo tanto, este conocimiento de los especialistas en la técnica puede usarse fácilmente para generar dichos receptores quiméricos. El uso de dichos receptores quiméricos puede proporcionar, por ejemplo, una característica de selectividad gustativa de uno de los receptores específicamente
60 descritos en la presente memoria, unido a las características de transducción de señales de otro receptor, tal como un receptor bien conocido usado en sistemas de ensayo de la técnica anterior.

- Por ejemplo, un dominio tal como un dominio de unión a ligando, un dominio extracelular, un dominio transmembrana, un dominio citoplasmático, un dominio N-terminal, un dominio C-terminal o cualquier combinación
65 de los mismos puede unirse covalentemente a una proteína heteróloga. Por ejemplo, un dominio extracelular de T1R puede unirse a un dominio transmembrana de un GPCR heterólogo o un dominio extracelular de un GPCR

heterólogo puede unirse a un dominio transmembrana de T1R. Otras proteínas heterólogas de elección pueden incluir, por ejemplo, proteína verde fluorescente, β -gal, receptor de glutamato y la presecuencia de rodopsina.

También dentro del alcance de la invención están células hospedadoras para expresar los T1R, fragmentos o variantes. Para obtener elevados niveles de expresión de un gen o ácido nucleico clonado, tal como ADNc que codifica los T1R, fragmentos o variantes; típicamente, un especialista subclona la secuencia de ácidos nucleicos de interés en un vector de expresión que contiene un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un terminador de la transcripción/traducción y, para un ácido nucleico que codifica una proteína, un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción. Se conocen bien en la técnica promotores bacterianos adecuados y se describen en, por ejemplo, Sambrook y col. Sin embargo, pueden usarse sistemas de expresión bacterianos o eucariotas.

Para introducir secuencias de nucleótidos extrañas en células hospedadoras puede usarse cualquiera de los procedimientos bien conocidos. Estos incluyen el uso de transfección con fosfato de calcio, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, liposomas, microinyección, vectores plasmáticos, vectores virales y cualquiera de los otros procedimientos bien conocidos para introducir ADN genómico clonado, ADNc, ADN sintético u otro material genético extraño en una célula hospedadora (véase, por ejemplo, Sambrook et al.). Solamente es necesario que el procedimiento de modificación por ingeniería genética particular usado sea capaz de introducir con éxito al menos una molécula de ácido nucleico en la célula hospedadora capaz de expresar el T1R, fragmento o variante de interés.

Después de introducir el vector de expresión en las células, las células transfectadas se cultivan en condiciones que favorecen la expresión del receptor, fragmento o variante de interés, que después se recupera del cultivo usando técnicas convencionales. Se conocen bien en la técnica ejemplos de dichas técnicas. Véase, por ejemplo, el documento WO 00/06593.

B. Detección de polipéptidos T1R

Además de la detección de genes de T1R y de la expresión génica usando tecnología de hibridación de ácidos nucleicos, también se pueden usar inmunoensayos para detectar T1R, por ejemplo, para identificar células receptoras gustativas y variantes de miembros de la familia T1R. Pueden usarse inmunoensayos para analizar cualitativamente o cuantitativamente los T1R. En Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1988) puede encontrarse una visión de conjunto general de la tecnología aplicable.

1. Anticuerpos contra miembros de la familia T1R

Los especialistas en la técnica conocen procedimientos para la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionen específicamente con un miembro de la familia T1R (véase, por ejemplo, Coligan, Current Protocols in Immunology (1991); Harlow y Lane, anteriormente; Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2ª ed. 1986); y Kohler y Milstein, Nature, 256: 495-497 (1975)). Dichas técnicas incluyen la preparación de anticuerpos por selección de anticuerpos procedentes de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, así como la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales por inmunización de conejos o ratones (véanse, por ejemplo, Huse y col., Science, 246: 1275-1281 (1989); Ward y col., Nature, 341: 544- 546 (1989)).

Para producir anticuerpos específicamente reactivos con un miembro de la familia T1R Pueden usarse varios inmunógenos que comprenden T1R. Por ejemplo, puede aislarse un polipéptido T1R recombinante o un fragmento antigénico del mismo, como se describe en la presente memoria. Las regiones antigénicas adecuadas incluyen, por ejemplo, las secuencias de consenso que se usan para identificar miembros de la familia T1R. Pueden expresarse proteínas recombinantes en células eucariotas o procariotas, como se ha descrito anteriormente, y purificarse, como se ha descrito anteriormente en general. La proteína recombinante es el inmunógeno preferido para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales. Como alternativa, como inmunógeno, puede usarse un péptido sintético obtenido a partir de las secuencias descritas en la presente memoria y conjugado con una proteína transportadora. También puede usarse una proteína de origen natural en forma pura o impura. Después, el producto se inyecta en un animal capaz de producir anticuerpos. Para medir la proteína, pueden generarse anticuerpos monoclonales o policlonales para el uso posterior en inmunoensayos.

Los especialistas en la técnica conocen procedimientos de producción de anticuerpos policlonales. Por ejemplo, una cepa endogámica de ratones (por ejemplo, ratones BALB/C) o de conejos se inmuniza con la proteína usando un adyuvante convencional, tal como adyuvante de Freund, y un protocolo de inmunización convencional. La respuesta inmune del animal contra la preparación de inmunógeno se controla tomando muestras de sangre de ensayo y determinando el título de la reactividad contra el T1R. Cuando se obtienen títulos convenientemente elevados de anticuerpos contra el inmunógeno, se extrae sangre del animal y se preparan antisueros. Puede realizarse si se desea un fraccionamiento posterior de los antisueros para enriquecer para anticuerpos reactivos contra la proteína (véase Harlow y Lane, anteriormente).

Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales mediante diversas técnicas familiares para los especialistas en la técnica. En resumen, pueden immortalizarse células de bazo de un animal inmunizado con un antígeno deseado,

comúnmente por fusión con una célula de mieloma (véase Kohler y Milstein, Eur. J. Immuno., 6: 511-519 (1976)). Los procedimientos alternativos de immortalización incluyen la transformación con virus de Epstein Barr, oncogenes o retrovirus, u otros procedimientos bien conocidos en la técnica. Las colonias que se generan a partir de células immortalizadas individuales se exploran para determinar la producción de anticuerpos de la especificidad y afinidad deseadas por el antígeno y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidos por dichas células puede mejorarse mediante diversas técnicas, incluyendo la inyección en la cavidad peritoneal de un hospedador vertebrado. Como alternativa, se pueden aislar secuencias de ADN que codifican un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión del mismo, por exploración de una biblioteca de ADN de células B humanas de acuerdo con el protocolo general descrito por Huse y col., Science, 246: 1275-1281 (1989).

Se recogen y titulan sueros policlonales y anticuerpos monoclonales contra la proteína inmunógena en un inmunoensayo, por ejemplo, un inmunoensayo en fase sólida con el inmunógeno inmovilizado en un soporte sólido. Típicamente, se seleccionan antisueros policlonales con un título de 10^4 o superior y se ensayan para determinar su reactividad cruzada contra polipéptidos que no son T1R, o incluso otros miembros de la familia T1R u otras proteínas relacionadas de otros organismos, usando un inmunoensayo de unión competitiva. Habitualmente los antisueros policlonales y anticuerpos monoclonales específicos se unirán con una Kd de al menos aproximadamente 0,1 mM, más habitualmente de al menos aproximadamente 1 pM, opcionalmente de al menos aproximadamente 0,1 pM o mejor y, opcionalmente, de 0,01 pM o mejor.

Una vez que están disponibles anticuerpos específicos de miembros de la familia T1R, pueden detectarse proteínas T1R individuales y fragmentos de proteínas mediante una diversidad de procedimientos de inmunoensayo. Para una revisión de procedimientos inmunológicos e inmunoensayos, véase Basic and Clinical Immunology (Stites y Terr eds., 7ª ed. 1991). Además, los inmunoensayos de la presente invención pueden realizarse en cualquiera de varias configuraciones, que se revisan ampliamente en Enzyme Immunoassay (Maggio, ed., 1980); y Harlow y Lane, anteriormente.

2. Ensayos de unión inmunológicos

Pueden detectarse y/o cuantificarse proteínas T1R, fragmentos y variantes usando cualquiera de varios ensayos de unión inmunológicos bien reconocidos (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N°: 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288 y 4.837.168). Para una revisión de los inmunoensayos en general, véase también Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology, volumen 37 (Asai, ed. 1993); Basic and Clinical Immunology (Stites y Terr, eds., 7ª ed. 1991). Los ensayos de unión inmunológicos (o inmunoensayos) usan típicamente un anticuerpo que se une específicamente a una proteína o antígeno de elección (en este caso un miembro de la familia T1R o una subsecuencia antigénica del mismo). El anticuerpo (por ejemplo, anti-T1R) puede producirse por cualquiera de varios medios bien conocidos por los especialistas en la técnica y como se ha descrito anteriormente.

Con frecuencia, los inmunoensayos también usan un agente de marcaje para unirse específicamente a y marcar el complejo formado por el anticuerpo y el antígeno. El agente de marcaje puede ser en sí mismo uno de los restos que comprenden el complejo antígeno/anticuerpo. Por lo tanto, el agente de marcaje puede ser un polipéptido T1R marcado o un anticuerpo anti-T1R marcado. Como alternativa, el agente de marcaje puede ser un tercer resto, tal como un anticuerpo secundario, que se une específicamente al complejo anticuerpo/T1R (típicamente un anticuerpo secundario es específico para anticuerpos de la especie de la que se obtuvo el primer anticuerpo). Otras proteínas capaces de unirse específicamente a regiones constantes de inmunoglobulinas, tales como proteína A o proteína G, pueden usarse también como el agente marcador. Estas proteínas presentan una fuerte reactividad no inmunogénica con regiones constantes de inmunoglobulinas de una diversidad de especies (véase, por ejemplo, Kronval y col., J. Immunol., 111: 1401-1406 (1903); Akerstrom y col., J. Immunol., 135: 2589-2542 (1985)). El agente de marcaje puede modificarse con un resto detectable, tal como biotina, a la que puede unirse específicamente otra molécula, tal como estreptavidina. Los especialistas en la técnica conocen bien una diversidad de restos detectables.

En todos los ensayos pueden ser necesarias etapas de incubación y/o lavado después de cada combinación de reactivos. Las etapas de incubación pueden variar de aproximadamente 5 segundos a varias horas, opcionalmente de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 24 horas. Sin embargo, el tiempo de incubación dependerá del formato de ensayo, del antígeno, del volumen de la solución, de las concentraciones y similares. Habitualmente, los ensayos se llevarán a cabo a temperatura ambiente, aunque pueden realizarse en un intervalo de temperaturas, tales como de 10°C a 40°C.

a. Formatos de ensayo no competitivo

Los inmunoensayos para detectar un polipéptido T1R en una muestra pueden ser competitivos o no competitivos. Los inmunoensayos no competitivos son ensayos en los que la cantidad de antígeno se mide directamente. En un ensayo de tipo "sándwich" preferido, por ejemplo, los anticuerpos anti-T1R pueden unirse directamente a un sustrato sólido sobre el que se inmovilizan. Después, estos anticuerpos inmovilizados capturan el polipéptido T1R presente en la muestra de ensayo. De este modo, se inmoviliza el polipéptido T1R y después se une con un agente marcador, tal como un segundo anticuerpo de T1R que lleva un marcador. Como alternativa, el segundo anticuerpo puede

carecer de un marcador, pero puede unirse a su vez con un tercer anticuerpo marcado específico para anticuerpos de la especie de la que se obtiene el segundo anticuerpo. Típicamente, el segundo o tercer anticuerpo está modificado con un resto detectable, tal como biotina, con el que se une específicamente otra molécula, por ejemplo, estreptavidina para proporcionar un resto detectable.

b. Formatos de ensayo competitivo

En ensayos competitivos, la cantidad de polipéptido T1R presente en la muestra se mide indirectamente midiendo la cantidad de un polipéptido T1R conocido añadido (exógeno) desplazado (eliminado por competición) de un anticuerpo anti-T1R por el polipéptido T1R desconocido presente en una muestra. En un ensayo competitivo, una cantidad conocida de polipéptido T1R se añade a una muestra y, después, la muestra se pone en contacto con un anticuerpo que se une específicamente al T1R. La cantidad de polipéptido T1R exógeno unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de polipéptido T1R presente en la muestra. En una realización particularmente preferida, el anticuerpo se inmoviliza en un sustrato sólido. La cantidad de polipéptido T1R unido al anticuerpo puede determinarse por medición de la cantidad de polipéptido T1R presente en un complejo de T1R/anticuerpo o, como alternativa, por medición de la cantidad de proteína restante que no está formado complejos. La cantidad de polipéptido T1R puede detectarse proporcionando una molécula T1R marcada.

Otro ensayo competitivo preferido es un ensayo de inhibición de haptenos. En este ensayo, el polipéptido T1R conocido se inmoviliza sobre un sustrato sólido. Se añade una cantidad conocida de anticuerpo anti-T1R a la muestra y, después, la muestra se pone en contacto con el T1R inmovilizado. La cantidad de anticuerpo anti-T1R unido al polipéptido T1R inmovilizado conocido es inversamente proporcional a la cantidad de polipéptido T1R presente en la muestra. De nuevo, la cantidad de anticuerpo inmovilizado puede detectarse mediante la detección de la fracción de anticuerpo inmovilizada o de la fracción del anticuerpo que permanece en solución. La detección puede ser directa, cuando el anticuerpo está marcado, o indirecta, mediante la adición posterior de un resto marcado que se une específicamente al anticuerpo como se ha descrito anteriormente.

c. Determinaciones de la reactividad cruzada

También pueden usarse inmunoensayos en el formato de unión competitiva para las determinaciones de la reactividad cruzada. Por ejemplo, una proteína al menos parcialmente codificada por las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la presente memoria puede inmovilizarse en un soporte sólido. Se añaden proteínas (por ejemplo, polipéptidos T1R y homólogos) al ensayo que compite por la unión de los antisueros al antígeno inmovilizado. La capacidad de las proteínas añadidas para competir por la unión de los antisueros a la proteína inmovilizada se compara con la capacidad del polipéptido T1R codificado por las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la presente memoria para competir consigo mismo. El porcentaje de reactividad cruzada para las proteínas anteriores se calcula usando cálculos convencionales. Los antisueros con una reactividad cruzada menor del 10% con cada una de las proteínas añadidas enumeradas anteriormente se seleccionan y se combinan. Opcionalmente, los anticuerpos que presentan reacción cruzada se eliminan de los antisueros combinados mediante inmunoabsorción con las proteínas consideradas añadidas, por ejemplo, homólogos ligeramente relacionados. Además, pueden usarse péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos que representan motivos conservados que se usan para identificar miembros de la familia T1R en determinaciones de la reactividad cruzada.

Después, los antisueros inmunoabsorbidos y combinados se usan en un inmunoensayo de unión competitiva, como se ha descrito anteriormente, para comparar una segunda proteína, que se piensa que puede ser un alelo o variante polimórfica de un miembro de la familia T1R, con la proteína inmunógena (es decir, el polipéptido T1R codificado por las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la presente memoria). Para realizar esta comparación, las dos proteínas se ensayan cada una en un amplio intervalo de concentraciones y se determina la cantidad de cada proteína necesaria para inhibir el 50% de la unión de los antisueros con la proteína inmovilizada. Si la cantidad de la segunda proteína necesaria para inhibir el 50% de la unión es menor de 10 veces la cantidad de la proteína codificada por las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la presente memoria necesarias para inhibir el 50% de la unión, entonces se dice que la segunda proteína se une específicamente a los anticuerpos policlonales generados contra un inmunógeno de T1R.

También pueden usarse anticuerpos generados contra motivos conservados de T1R para preparar anticuerpos que se unan específicamente sólo a GPCR de la familia T1R, pero no a GPCR de otras familias.

Pueden prepararse anticuerpos policlonales que se unan específicamente a un miembro particular de la familia T1R eliminando los anticuerpos que presentan reactividad cruzada usando otros miembros de la familia T1R. Pueden prepararse anticuerpos policlonales específicos de especie de una forma similar. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos específicos contra el T1R1 humano eliminando los anticuerpos que presentan reactividad cruzada con secuencias ortólogas, por ejemplo, T1R1 de rata o T1R1 de ratón.

d. Otros formatos de ensayo

Para detectar y cuantificar la presencia de polipéptido T1R en la muestra se usa el análisis de transferencia de

Western (inmunotransferencia). La técnica generalmente comprende separar proteínas de la muestra por electroforesis en gel en base a su peso molecular, transferir las proteínas separadas a un soporte sólido adecuado (tal como un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nylon o un filtro de nylon derivatizado) e incubar la muestra con los anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido T1R1. Los anticuerpos anti-polipéptido T1R se unen específicamente al polipéptido T1R en el soporte sólido. Estos anticuerpos pueden estar marcados directamente o, como alternativa, pueden detectarse posteriormente usando anticuerpos marcados (por ejemplo, anticuerpos de oveja antirratón marcados) que se unen específicamente a los anticuerpos anti-T1R.

Otros formatos de ensayo incluyen inmunoensayos de liposomas (LIA), que usan liposomas diseñados para unirse a moléculas específicas (por ejemplo, anticuerpos) y liberar reactivos o marcadores encapsulados. Después, los productos químicos liberados se detectan de acuerdo con técnicas convencionales (véase Monroe y col., Amer. Clin. Prod. Rev., 5: 34-41 (1986)).

e. Reducción de la unión inespecífica

Un especialista en la técnica entenderá que, con frecuencia, es deseable minimizar la unión inespecífica en los inmunoensayos. En particular, cuando el ensayo implica un antígeno o un anticuerpo inmovilizado en un sustrato sólido es deseable minimizar la cantidad de unión inespecífica al sustrato. Se conocen bien por los especialistas en la técnica medios para reducir dicha unión inespecífica. Típicamente, esta técnica implica recubrir el sustrato con una composición proteica. En particular, se usan ampliamente composiciones proteicas tales como albúmina de suero bovino (BSA), leche en polvo desnatada y gelatina, prefiriéndose la leche en polvo.

f. Marcadores

El marcador particular o grupo detectable usado en el ensayo no es un aspecto crítico de la invención, siempre que no interfiera significativamente con la unión específica del anticuerpo usado en el ensayo. El grupo detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Se han desarrollado mucho dichos marcadores detectables en el campo de los inmunoensayos y, en general, puede aplicarse casi cualquier marcador útil en dichos procedimientos en la presente invención. Por lo tanto, un marcador es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles en la presente invención incluyen perlas magnéticas (por ejemplo, DYNABEADSTM), colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^{32}P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina y otros comúnmente usados en un ELISA) y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico coloreadas (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

El marcador puede acoplarse directa o indirectamente al componente deseado del ensayo de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Como se ha indicado anteriormente, puede usarse una amplia diversidad de marcadores dependiendo la elección del marcador de la sensibilidad necesaria, facilidad de conjugación con el compuesto, necesidades de estabilidad, instrumentos disponibles y condiciones de colocación.

Con frecuencia, se unen marcadores no radioactivos por medios indirectos. Generalmente, una molécula de ligando (por ejemplo, biotina) se une covalentemente a la molécula. Después, el ligando se une a otras moléculas (por ejemplo, molécula de estreptavidina) que son detectables intrínsecamente o se une covalentemente a un sistema de señal, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente. Los ligandos y sus dianas pueden usarse en cualquier combinación adecuada con anticuerpos que reconocen un polipéptido T1R o anticuerpos secundarios que reconocen anti-T1R.

Las moléculas también pueden conjugarse directamente con compuestos que generan señales, por ejemplo, por conjugación con una enzima o fluoróforo. Las enzimas de interés como marcadores serán principalmente hidrolasas, particularmente fosfatasas, esterasas y glicosidasas u oxidotasas, particularmente peroxidasas. Los compuestos fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, etc. Los compuestos quimioluminiscentes incluyen luciferina y 2,3-dihidroftalacinodionas, por ejemplo, luminol. Para una revisión de diversos sistemas productores de marcaje o señalización que pueden usarse, véase la patente de Estados Unidos N° 4.391.904.

Los especialistas en la técnica conocen bien medios de detección de marcadores. Por lo tanto, cuando el marcador es, por ejemplo, un marcador radiactivo, los medios para la detección incluyen un contador de centelleo o una película fotográfica como una autorradiografía. Cuando el marcador es un marcador fluorescente, puede detectarse por excitación del fluorocromo con la longitud de onda de luz apropiada y detección de la fluorescencia resultante. La fluorescencia puede detectarse a simple vista por medio de una película fotográfica, mediante el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos acoplados a cargas (CCD) o fotomultiplicadores y similares. De forma similar, pueden detectarse marcadores enzimáticos mediante el suministro de los sustratos apropiados para la enzima y detección del producto de reacción resultante. Por último, pueden detectarse marcadores colorimétricos sencillos mediante la observación del color asociado con el marcador. Por lo tanto, en diversos ensayos de varilla, el oro conjugado aparece frecuentemente rosa, mientras que diversas perlas conjugadas aparecen del color de la perla.

Algunos formatos de ensayo no requieren el uso de componentes marcados. Por ejemplo, pueden usarse ensayos de aglutinación para detectar la presencia de los anticuerpos diana. En este caso, las partículas recubiertas con antígeno se aglutinan mediante muestras que comprenden los anticuerpos diana. En este formato, no es necesario marcar ninguno de los componentes y la presencia del anticuerpo diana se detecta por inspección a simple vista.

5 **C. Detección de moduladores**

A continuación se describen composiciones y procedimientos para determinar si un compuesto de ensayo se une específicamente a un receptor quimiosensorial de la invención tanto *in vitro* como *in vivo*. Para evaluar el efecto de la unión a ligando a un polipéptido T1R de la invención pueden controlarse muchos aspectos de la fisiología celular. Estos ensayos pueden realizarse en células intactas que expresan un receptor quimiosensorial, en células permeabilizadas o en fracciones de membrana producidas por procedimientos convencionales.

Los receptores gustativos se unen a estímulos gustativos e inician la transducción del estímulo químico en señales eléctricas. Una proteína G activada o inhibida alterará a su vez las propiedades de las enzimas diana, canales y otras proteínas efectoras. Algunos ejemplos son la activación de la GMPc fosfodiesterasa por transducina en el sistema visual, la adenilato ciclasa por la proteína G estimuladora, la fosfolipasa C por Gq y otras proteínas G afines y la modulación de diversos canales por proteínas Gi y otras proteínas G. También pueden examinarse las consecuencias aguas abajo, tales como la generación de diacil glicerol e IP3 por la fosfolipasa C y, a su vez, la movilización de calcio por IP3.

Típicamente, las proteínas o polipéptidos T1R del ensayo se seleccionarán de un polipéptido que tiene una secuencia de la SEC ID N°: 4, 10, 12, 14, 17, 21 o sus fragmentos o variantes modificadas de forma conservativa. Opcionalmente, los fragmentos y las variantes pueden ser fragmentos antigénicos y variantes que se unen a un anticuerpo anti-T1R.

Como alternativa, las proteínas o los polipéptidos T1R del ensayo pueden obtenerse a partir de una célula hospedadora eucariota y pueden incluir una subsecuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N°: 4, 10, 12, 14, 17, 21 o sus fragmentos o variantes modificadas de forma conservativa. Generalmente, la identidad de la secuencia de aminoácidos será al menos del 35 al 50% u, opcionalmente, del 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99%. Opcionalmente, las proteínas o los polipéptidos T1R de los ensayos pueden comprender un dominio de una proteína T1R, tal como un dominio extracelular, región transmembrana, dominio transmembrana, dominio citoplasmático, dominio de unión a ligando y similares. Además, como se ha descrito anteriormente, la proteína T1R o un dominio de la misma puede unirse covalentemente a una proteína heteróloga para generar una proteína quimérica usada en los ensayos descritos en la presente memoria.

Se ensayan moduladores de la actividad del receptor T1R usando proteínas o polipéptidos T1R, como se han descrito anteriormente, recombinantes o de origen natural. Las proteínas o polipéptidos T1R pueden aislarse, expresarse en una célula, expresarse en una membrana obtenida de una célula, expresarse en un tejido o en un animal, ya sea recombinante o de origen natural. Por ejemplo, pueden usarse cortes de lengua, células disociadas de una lengua, células transformadas o membranas. La modulación puede ensayarse usando uno de los ensayos *in vitro* o *in vivo* descritos en la presente memoria.

45 **1. Ensayos de unión *in vitro***

También puede examinarse la transducción del sabor *in vitro* con reacciones solubles o en estado sólido, usando un polipéptido T1R de la invención. En una realización particular, puede usarse un dominio de unión a ligando usando T1R *in vitro* en reacciones solubles o en estado sólido para ensayar la unión a ligando.

Por ejemplo, se predice que el dominio N-terminal de T1R está implicado en la unión a ligando. Más particularmente, los T1R pertenecen a una subfamilia de GPCR que se caracteriza por segmentos N-terminales extracelulares grandes, de aproximadamente 600 aminoácidos. Se piensa que estos segmentos N-terminales forman, al menos en parte, los dominios de unión a ligando y, por lo tanto, son útiles en ensayos bioquímicos para identificar agonistas y antagonistas de T1R. El dominio de unión a ligando también puede contener partes adicionales del dominio extracelular, tales como los bucles extracelulares del dominio transmembrana. Se han usado ensayos similares con otros GPCR que están relacionados con los T1R, tales como los receptores de glutamato metabotrópicos (véase, por ejemplo, Han y Hampson, J. Biol. Chem. 274: 10008-10013 (1999)). Estos ensayos pueden implicar el desplazamiento de un ligando marcado radiactivamente o fluorescentemente, la medición de cambios en la fluorescencia intrínseca o cambios en la susceptibilidad proteolítica, etc.

La unión de un ligando a un polipéptido T1R de la invención puede ensayarse en solución, en una membrana bicapa, opcionalmente unido a una fase sólida, en una monocapa lipídica o en vesículas. La unión de un modulador puede ensayarse usando, por ejemplo, cambios en las características espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice de refracción), hidrodinámicas (por ejemplo, forma), cromatográficas o propiedades de solubilidad. Los ensayos de unión preferidos de la invención son ensayos de unión bioquímicos que usan dominios de T1R N-terminales solubles recombinantes.

También pueden examinarse las interacciones receptor-proteína G. Por ejemplo, puede examinarse la unión de la proteína G al receptor o su liberación del receptor. Más particularmente, en ausencia de GTP, un activador conducirá la formación de un complejo estrecho de una proteína G (las tres subunidades) con el receptor. Este complejo puede detectarse de una diversidad de formas, como se ha indicado anteriormente. Dicho ensayo puede modificarse para la búsqueda de inhibidores, por ejemplo, por adición de un activador al receptor y a la proteína G en ausencia de GTP que forme un complejo estrecho y después exploración para inhibidores por observación de la disociación del complejo de receptor-proteína G. En presencia de GTP, la liberación de la subunidad alfa de la proteína G de las otras dos subunidades de la proteína G sirve como un criterio de activación. Una proteína G activada o inhibida alterará a su vez las propiedades de enzimas diana, canales y otras proteínas efectoras.

En otra realización de la invención, puede usarse un ensayo de GTP γ S. Como se ha descrito anteriormente, tras la activación de un GPCR, la subunidad G α del complejo de proteína G se estimula para intercambiar el GDP unido por GTP. La estimulación mediada por ligando de la actividad de intercambio de la proteína G puede medirse en un ensayo bioquímico midiendo la unión de GTP γ ³⁵S marcado radiactivamente añadido con la proteína G en presencia de un ligando supuesto. Típicamente, se mezclan membranas que contienen el receptor quimiosensorial de interés con un complejo de proteínas G. Se añaden al ensayo inhibidores y/o activadores potenciales y GTP γ S y se mide la unión de GTP γ S a la proteína G. La unión puede medirse mediante recuento por centelleo líquido o por cualquier otro medio conocido en la técnica, incluyendo ensayos de proximidad de centelleo (SPA). En otros formatos de ensayo puede utilizarse GTP γ S marcado fluorescentemente.

2. Ensayos de polarización de fluorescencia.

En otra realización, pueden usarse ensayos basados en la polarización de la fluorescencia ("FP") para detectar y controlar la unión a ligando. La polarización de la fluorescencia es una técnica de laboratorio versátil para medir la unión en equilibrio, la hibridación de ácidos nucleicos y la actividad enzimática. Los ensayos de polarización de la fluorescencia son homogéneos ya que no requieren una etapa de separación tal como centrifugación, filtración, cromatografía, precipitación o electroforesis. Estos ensayos se realizan en tiempo real, directamente en solución y no requieren una fase inmovilizada. Los valores de polarización pueden medirse de forma repetida y después de la adición de los reactivos, puesto que la medición de la polarización es rápida y no destruye la muestra. En general, ésta técnica puede usarse para medir los valores de polarización de fluoróforos desde niveles picomolares reducidos a micromolares. Esta sección describe cómo puede usarse la polarización de la fluorescencia de forma sencilla y cuantitativa para medir la unión de ligandos a los polipéptidos T1R de la invención.

Cuando una molécula marcada fluorescentemente se excita con luz polarizada plana, emite luz que tiene un grado de polarización que es inversamente proporcional a su rotación molecular. Las moléculas grandes marcadas fluorescentemente permanecen relativamente inmóviles durante el estado excitado (4 nanosegundos en el caso de la fluoresceína) y la polarización de la luz permanece relativamente constante entre la excitación y la emisión. Las moléculas pequeñas marcadas fluorescentemente giran rápidamente durante el estado excitado y la polarización cambia significativamente entre la excitación y la emisión. Por lo tanto, las moléculas pequeñas tienen valores de polarización reducidos y las moléculas grandes tienen valores de polarización elevados. Por ejemplo, un oligonucleótido monocatenario marcado con fluoresceína tiene un valor de polarización relativamente bajo pero cuando hibrida con su cadena complementaria tiene un valor de polarización mayor. Cuando se usa FP para detectar y controlar la unión a estímulos gustativos que pueden activar o inhibir los receptores quimiosensoriales de la invención, pueden usarse estímulos gustativos marcados con fluorescencia o estímulos gustativos autofluorescentes.

La polarización de la fluorescencia (P) se define como:

$$P = \frac{Int_{\parallel} - Int_{\perp}}{Int_{\parallel} + Int_{\perp}}$$

Donde $I_{\parallel}$ es la intensidad de la luz de emisión paralela al plano de luz de excitación e $I_{\perp}$ es la intensidad de la luz de emisión perpendicular al plano de luz de excitación. Siendo P una proporción de intensidades de luz, es un número sin dimensiones. Por ejemplo, pueden usarse los Sistemas Beacon® y Beacon 2000™ junto con estos ensayos. Dichos sistemas expresan típicamente la polarización en unidades de milipolarización (1 unidad de polarización = 1000 unidades mP).

La relación entre la rotación y el tamaño molecular se describen mediante la ecuación de Perrin y se remite al lector a Jolley, M. E. (1991) en Journal of Analytical Toxicology, págs. 236-240, que proporciona una explicación minuciosa de esta ecuación. En resumen, la ecuación de Perrin indica que la polarización es directamente proporcional al tiempo de relajación rotacional, el tiempo que lleva a una molécula girar a través de un ángulo de aproximadamente 68,5°. El tiempo de relajación rotacional está relacionado con la viscosidad (η), la temperatura absoluta (T), el volumen molecular (V) y la constante de los gases (R) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Tiempo de relajación rotacional} = \frac{3\eta V}{RT}$$

El tiempo de relajación rotacional es pequeño (≈ 1 nanosegundo) para moléculas pequeñas (por ejemplo, fluoresceína) y grande (≈ 100 nanosegundos) para moléculas grandes (por ejemplo, inmunoglobulina). Si la viscosidad y la temperatura se mantienen constantes, el tiempo de relajación rotacional y, por lo tanto, la polarización, están directamente relacionados con el volumen molecular. Los cambios en el volumen molecular pueden deberse a interacciones con otras moléculas, disociación, polimerización, degradación, hibridación o cambios conformacionales de la molécula marcada fluorescentemente. Por ejemplo, se ha usado la polarización de la fluorescencia para medir la escisión enzimática de polímeros grandes marcados con fluoresceína mediante proteasas, ADNasas y ARNasas. También se ha usado para medir la unión en equilibrio para interacciones proteína/proteína, unión anticuerpo/antígeno y unión proteína/ADN.

3. Ensayos de alto rendimiento en estado sólido y solubles

En otra realización más, la invención proporciona ensayos solubles usando un polipéptido T1R; o una célula o tejido que expresa un polipéptido T1R. En otra realización, la invención proporciona ensayos *in vitro* basados en una fase sólida en un formato de alto rendimiento, donde el polipéptido T1R o la célula o tejido que expresa el polipéptido T1R está unido a un sustrato en fase sólida.

En los ensayos de alto rendimiento de la invención, es posible explorar hasta varios miles de moduladores o ligandos diferentes en un sólo día. En particular, puede usarse cada pocillo de una placa de microtitulación para realizar un ensayo separado frente a un modulador potencial seleccionado o, si se van a observar los efectos de la concentración o del tiempo de incubación, cada 5-10 pocillos pueden ensayar un solo modulador. Por lo tanto, una sola placa de microtitulación convencional puede ensayar aproximadamente 100 (por ejemplo, 96) moduladores. Si se usan placas de 1536 pocillos, entonces una sola placa puede ensayar fácilmente de aproximadamente 1000 a aproximadamente 1500 compuestos diferentes. También es posible ensayar múltiples compuestos en cada pocillo de la placa. Es posible ensayar varias placas diferentes por día; son posibles exploraciones de ensayo de hasta aproximadamente 6.000-20.000 compuestos diferentes usando los sistemas integrados de la invención. Más recientemente, se han desarrollado estrategias microfluídicas para la manipulación de reactivos.

La molécula de interés puede unirse al componente en estado sólido directa o indirectamente, a través de enlaces covalentes o no covalentes, por ejemplo, a través de un marcador. El marcador puede ser cualquiera de una diversidad de componentes. En general, una molécula que se une al marcador (molécula de unión al marcador) se fija a un soporte sólido y la molécula de interés marcada (por ejemplo, la molécula de transducción del sabor de interés) se une al soporte sólido por interacción del marcador y de la molécula de unión al marcador.

Pueden usarse varios marcadores y agentes de unión al marcador en base a interacciones moleculares conocidas descritas en la bibliografía. Por ejemplo, cuando un marcador tiene una molécula de unión natural, por ejemplo, biotina, proteína A o proteína G, puede usarse junto con moléculas de unión a marcadores apropiadas (avidina, estreptavidina, neutravidina, la región Fc de una inmunoglobulina, etc.). También están ampliamente disponibles anticuerpos contra moléculas con moléculas de unión naturales tales como biotina y moléculas de unión a marcadores apropiadas (véase, SIGMA Immunochemicals 1998 catálogo SIGMA, St. Louis MO).

De forma similar, puede usarse cualquier compuesto hapténico o antigénico en combinación con un anticuerpo apropiado para formar una pareja de marcador/molécula de unión al marcador. En el mercado, miles de anticuerpos específicos están disponibles y en la bibliografía se describen muchos anticuerpos adicionales. Por ejemplo, en una configuración común, el marcador es un primer anticuerpo y la molécula de unión al marcador es un segundo anticuerpo que reconoce el primer anticuerpo. Además de las interacciones anticuerpo-antígeno, también son apropiadas reacciones receptor-ligando como parejas de marcador y molécula de unión al marcador. Por ejemplo, agonistas y antagonistas de receptores de membrana celular (por ejemplo, interacciones receptor-ligando celulares tales como transferrina, c-kit, ligandos de receptores virales, receptores de citoquinas, receptores de quimioquinas, receptores de interleuquinas, receptores de inmunoglobulinas y anticuerpos, la familia de cadherinas, la familia de integrinas, la familia de selectinas y similares; véase, por ejemplo, Pigott y Power, The Adhesion Molecule Facts Book I (1993)). De forma similar, toxinas y venenos, epítopos virales, hormonas (por ejemplo, opiáceos, esteroides, etc.), receptores intracelulares (por ejemplo, que median los efectos de diversos ligandos pequeños, incluyendo esteroides, hormona tiroidea, retinoides y vitamina D; péptidos), fármacos, lectinas, azúcares, ácidos nucleicos (configuraciones poliméricas tanto lineales como cíclicas), oligosacáridos, proteínas, fosfolípidos y anticuerpos, pueden todos interaccionar con diversos receptores celulares.

También pueden formar un marcador o molécula de unión al marcador apropiado polímeros sintéticos, tales como poliuretanos, poliésteres, policarbonatos, poliureas, poliamidas, polietileniminas, sulfuros de poliarileno, polisiloxanos, polimidias y poliacetatos. También son útiles muchas otras parejas de marcador/molécula de unión al marcador en sistemas de ensayo descritos en la presente memoria, como será evidente para un especialista tras la revisión de esta descripción.

Enlazadores comunes tales como péptidos, poliéteres y similares también pueden servir como marcadores, e incluyen secuencias polipeptídicas tales como secuencias poli-gly de entre aproximadamente 5 y 200 aminoácidos. Dichos enlazadores flexibles son conocidos para especialistas en la técnica. Por ejemplo, están disponibles enlazadores de poli(etilenglicol) de Shearwater Polymers, Inc. Huntsville, Alabama. Opcionalmente, estos enlazadores tienen enlaces amida, enlaces sulfhidrilo o enlaces heterofuncionales.

Las moléculas de unión a marcadores se fijan a sustratos sólidos usando cualquiera de una diversidad de procedimientos disponibles actualmente. Comúnmente los sustratos sólidos se derivatizan o funcionalizan por exposición de toda o una parte del sustrato a un reactivo químico que fija un grupo químico a la superficie que es reactivo con una parte de la molécula de unión a marcador. Por ejemplo, los grupos que son adecuados para la unión a una parte de cadena mas larga incluirían aminas, grupos hidroxilo, tiol y carboxilo. Pueden usarse aminoalquilsilanos e hidroxialquilsilanos para funcionalizar una diversidad de superficies, tales como superficies de vidrio. La construcción de dichas series biopoliméricas en fase sólida está bien descrita en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963) (que describe la síntesis en fase sólida de, por ejemplo, péptidos); Geysen y col., J. Immun. Meth., 102: 259-274 (1987) (que describe la síntesis de componentes en fase sólida sobre horquillas); Frank y Doring, Tetrahedron, 44: 6031-6040 (1988) (que describe la síntesis de diversas secuencias peptídicas sobre discos de celulosa); Fodor y col., Science, 251: 767-777 (1991); Sheldon y col., Clinical Chemistry, 39 (4): 718-719 (1993); y Kozal y col., Nature Medicine, 2 (7): 753-759 (1996) (todos describen series de biopolímeros fijados a sustratos sólidos). Las estrategias no químicas para fijar moléculas de unión a marcadores a sustratos incluyen otros procedimientos comunes, tales como calor, reticulación por radiación UV y similares.

4. Ensayos basados en ordenador

Otros ensayo más para compuestos que modulan actividad del polipéptido T1R implica el diseño de compuestos asistido por ordenador, en el que se usa un sistema informático para generar una estructura tridimensional de un polipéptido T1R en base a la información estructural codificada por su secuencia de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos introducida interacciona directamente y activamente con un algoritmo preestablecido en un programa informático para dar los modelos estructurales secundario, terciario y cuaternario de la proteína. Después, los modelos de la estructura proteica se examinan para identificar regiones de la estructura que tienen la capacidad de unirse, por ejemplo, a ligandos. Después, estas regiones se usan para identificar ligandos que se unen a la proteína.

El modelo estructural tridimensional de la proteína se genera por introducción de las secuencias de aminoácidos de proteínas de al menos 10 restos aminoacídicos o de las secuencias de ácidos nucleicos correspondientes que codifican un polipéptido T1R en el sistema informático. La secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido T1R, o la secuencia de aminoácidos de la misma, puede ser cualquier secuencia descrita en la presente memoria y versiones de las mismas modificadas de forma conservativa.

La secuencia de aminoácidos representa la secuencia primaria o subsecuencia de la proteína, que codifica la información estructural de la proteína. Se introducen en el sistema informático al menos 10 restos de la secuencia de aminoácidos (o una secuencia de nucleótidos que codifica 10 aminoácidos) desde el teclado del ordenador, soportes legibles por ordenador que incluyen, pero sin limitación, medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, disquetes magnéticos, cintas, cartuchos y chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM), información distribuida por sitios de Internet y mediante RAM. Después, se genera el modelo estructural tridimensional de la proteína mediante la interacción de la secuencia de aminoácidos y el sistema informático, usando un programa informático conocido por los especialistas en la técnica.

La secuencia de aminoácidos representa una estructura primaria que codifica la información necesaria para formar la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína de interés. El programa informático examina determinados parámetros codificados por la secuencia primaria para generar el modelo estructural. Estos parámetros se denominan "términos de energía" e incluyen, principalmente potenciales electrostáticos, potenciales hidrófobos, superficies accesibles por disolvente y enlaces de hidrógeno. Los términos de energía secundarios incluyen los potenciales de van der Waals. Las moléculas biológicas forman las estructuras que minimizan los términos de energía de una forma acumulativa. Por lo tanto, el programa informático usa estos términos codificados por la estructura primaria o la secuencia de aminoácidos para generar el modelo estructural secundario.

Después, se forma la estructura terciaria de la proteína codificada por la estructura secundaria en base a los términos de energía de la estructura secundaria. En este punto, el usuario puede introducir variables adicionales tales como si la proteína está unida a membrana o soluble, su localización en el cuerpo y su localización celular, por ejemplo, citoplasmática, superficial o nuclear. Estas variables, junto con los términos de energía de la estructura secundaria, se usan para formar el modelo de la estructura terciaria. En el modelado de la estructura terciaria, el programa informático empareja las caras hidrófobas de la estructura secundaria con similares y las caras hidrófilas de la estructura secundaria con similares.

Una vez que se ha generado la estructura, el sistema informático identifica las posibles regiones de unión a ligando. Se generan estructuras tridimensionales para los ligandos potenciales introduciendo secuencias de aminoácidos o

de nucleótidos o de las fórmulas químicas de los compuestos, como se ha descrito anteriormente. Después, la estructura tridimensional del ligando potencial se compara con la del polipéptido T1R para identificar ligandos que se unen a la proteína. Se determina la afinidad de unión entre la proteína y los ligandos usando términos de energía para determinar qué ligandos tienen una probabilidad aumentada de unirse a la proteína.

También se usan sistemas informáticos para explorar para mutaciones, variantes polimórficas, alelos y homólogos interespecie de genes de T1R. Dichas mutaciones pueden asociarse con patologías o rasgos genéticos. Como se ha descrito anteriormente, también puede usarse GeneChip™ y la tecnología relacionada para explorar para mutaciones, variantes polimórficas, alelos y homólogos interespecie. Una vez que se han identificado las variantes, pueden usarse ensayos de diagnóstico para identificar pacientes que tengan dichos genes mutados. La identificación de los genes de T1R mutados implica la recepción de la entrada de una primera secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos de un gen de T1R, o de versiones modificadas de forma conservativa de la misma. La secuencia se introduce en el sistema informático como se ha descrito anteriormente. Después, la primera secuencia de ácido nucleico o aminoácidos se compara con una segunda secuencia de ácido nucleico o aminoácidos que tiene una identidad sustancial con la primera secuencia. La secuencia segunda se introduce en el sistema informático de la forma descrita anteriormente. Una vez se comparan la primera y la segunda secuencias, se identifican diferencias de nucleótidos o aminoácidos entre las secuencias. Dichas secuencias pueden representar diferencias alélicas en diversos genes de T1R y mutaciones asociadas con patologías y rasgos genéticos.

5. Ensayos de unión basados en células

En una realización, se expresa una proteína o un polipéptido T1R en una célula eucariota como un receptor quimérico con una secuencia chaperona heteróloga que facilita su maduración y dirección a través de la ruta secretora. Dichos polipéptidos T1R quiméricos pueden expresarse en cualquier célula eucariota, tal como en células HEK-293. Preferentemente, las células comprenden una proteína G funcional, por ejemplo, G α 15, que es capaz de asociar al receptor quimérico con una ruta señalización intracelular o a una proteína de señalización tal como fosfolipasa C. La activación de dichos receptores quiméricos en dichas células puede detectarse usando cualquier procedimiento convencional, tal como detectando cambios en el calcio intracelular por detección de la fluorescencia dependiente de FURA-2 en la célula.

Los receptores de GPCR activados se convierten en sustratos para quinasas que fosforilan la cola C-terminal del receptor (y posiblemente también otros sitios). Por lo tanto, los activadores promoverán la transferencia de 32P desde el GTP gamma-marcado hasta el receptor, que puede ensayarse con un contador de centelleo. La fosforilación de la cola C-terminal promoverá la unión de proteínas similares a arrestina e interferirá con la unión de proteínas G. La ruta de quinasa/arrestina desempeña un papel clave en la desensibilización de muchos receptores GPCR. Por ejemplo, serían útiles compuestos que modulan la duración del tiempo que un receptor gustativo permanece activo como un medio de prolongación de un sabor deseado o limitación de uno desagradable. Para una revisión general de la transducción de señales de GPCR y procedimientos de ensayo de la transducción de señales, véanse, por ejemplo, *Methods in Enzymology*, vols. 237 y 238 (1994) y volumen 96 (1983); Bourne y col., *Nature*, 10: 349: 117-27 (1997); Bourne y col., *Nature*, 348: 125-32 (1990); Pitcher y col., *Annu. rev. Biochem.*, 67: 653-92 (1998).

La modulación de T1R puede ensayarse por comparación de la respuesta de un polipéptido T1R tratado con un supuesto modulador de T1R con la respuesta de una muestra de control sin tratar. Dichos moduladores de T1R supuestos pueden incluir estímulos gustativos que inhiban o activen la actividad del polipéptido T1R. En una realización, a las muestras de control (sin tratar con activadores o inhibidores) se les asigna un valor de actividad de T1R relativo de 100. La inhibición de un polipéptido T1R se logra cuando el valor de actividad de T1R con respecto al control es de aproximadamente el 90%, opcionalmente del 50%, opcionalmente del 25-0%. La activación de un polipéptido T1R se logra cuando el valor de actividad de T1R con respecto al control es del 110%, opcionalmente del 150%, del 200-500% o del 1000-2000%.

Pueden evaluarse cambios en el flujo iónico determinando cambios en la polarización iónica (es decir, el potencial eléctrico) de la célula o membrana que expresa un polipéptido T1R. Un medio para determinar cambios en la polarización celular es por medición de cambios en la corriente (por lo tanto, medición de cambios en la polarización) con técnicas de pinzamiento de voltaje y pinzamiento zonal (véase, por ejemplo, el modo "unido a célula", el modo "dentro-fuera" y el modo "célula completa", por ejemplo, Ackerman y col., *New Engl. J. Med.*, 336: 1575-1595 (1997)). Usando el patrón se determinan de forma apropiada las corrientes de la célula completa. Otros ensayos conocidos incluyen: ensayos de flujo iónico de radiomarcado y ensayos de fluorescencia usando colorantes sensibles a voltaje (véanse, por ejemplo, Vestergaard Bogind y col., *J. Membrane Biol.*, 88: 67-75 (1988); Gonzales y Tsien, *Chem. Biol.*, 4: 269-277 (1997); Daniel y col., *J. Pharmacol. Meth.*, 25: 185-193 (1991); Holevinsky y col., *Membrane Biology*, 137: 59-70 (1994)). Generalmente, los compuestos a ensayar están presentes en el intervalo de 1 pM a 100 mM.

Los efectos de los compuestos de ensayo tras la función de los polipéptidos pueden medirse por examen de cualquiera de los parámetros descritos anteriormente. Cualquier cambio fisiológico adecuado que afecte a la actividad de GPCR puede usarse para evaluar la influencia de un compuesto de ensayo sobre los polipéptidos de esta invención. Cuando las consecuencias funcionales se determinan usando células intactas o animales, también

se pueden medir una diversidad de efectos tales como liberación de transmisores; liberación de hormonas, cambios transcripcionales para marcadores genéticos conocidos y no caracterizados (por ejemplo, transferencias de northern), cambios en el metabolismo celular tales como crecimiento celular o cambios de pH y cambios en los segundos mensajeros intracelulares, tales como Ca^{2+} , IP3, GMPc o AMPc.

Los ensayos preferidos para GPCR incluyen células que están cargadas con colorantes sensibles a iones o a voltaje para informar de la actividad del receptor. Los ensayos para determinar la actividad de dichos receptores también pueden usar agonistas y antagonistas conocidos para otros receptores acoplados a proteína G como controles negativos o positivos para evaluar la actividad de compuestos ensayados. En ensayos para identificar compuestos moduladores (por ejemplo, agonistas, antagonistas), se controlarán los cambios en el nivel de iones en el citoplasma o el voltaje de membrana usando un indicador fluorescente sensible a iones o al voltaje de membrana, respectivamente. Entre los indicadores sensibles a iones y sondas de voltaje que pueden emplearse están los descritos en Molecular Probes 1997 Catálogo. Para receptores acoplados a proteína G, pueden usarse proteínas G promiscuas tales como $\text{G}\alpha 15$ y $\text{G}\alpha 16$ en el ensayo de elección (Wilkie y col., Proc. Nat'l. Acad. Sci., 88: 10049-10053 (1991)). Dichas proteínas G promiscuas permiten el acoplamiento de una amplia variedad de receptores.

Típicamente, la activación del receptor inicia acontecimientos intracelulares posteriores, por ejemplo, aumentos en los segundos mensajeros tales como IP3, que liberan los depósitos intracelulares de iones de calcio. La activación de algunos receptores acoplados a proteína G estimula la formación de inositol trifosfato (IP3) a través de la hidrólisis mediada por fosfolipasa C de fosfatidilinositol (Berridge e Irvine, Nature, 312: 315-21 (1984)). El IP3 a su vez estimula la liberación de los depósitos de ión calcio intracelulares. Por lo tanto, puede usarse un cambio en los niveles de ión calcio citoplasmáticos o un cambio en los niveles de segundos mensajeros tales como IP3 para evaluar la función de un receptor acoplado a proteína G. Las células que expresan dichos receptores acoplados a proteína G pueden presentar niveles de calcio citoplasmático aumentados como resultado de la contribución de los depósitos intracelulares y a través de la activación de canales iónicos, en cuyo caso puede ser deseable aunque no necesario realizar dichos ensayos en tampón sin calcio, opcionalmente complementado con un agente quelante tal como EGTA para distinguir la respuesta de fluorescencia resultante de la liberación de calcio de los depósitos internos.

Otros ensayos pueden implicar determinar la actividad de receptores que, cuando se activan, dan como resultado un cambio en el nivel de nucleótidos cíclicos intracelulares, por ejemplo, AMPc o GMPc, por activación o inhibición de enzimas tales como la adenilato ciclasa. Existen canales iónicos de apertura dependiente de nucleótidos cíclicos, por ejemplo, canales de células fotorreceptoras de tipo bastón y canales de neuronas olfativas que son permeables a cationes tras la activación por la unión de AMPc o GMPc (véase, por ejemplo, Altenhofen y col., Proc. Nat'l Acad. Sci., 88: 9868-9872 (1991) y Dhallan y col., Nature, 347: 184-187 (1990)). En casos en los que la activación del receptor da como resultado una disminución en los niveles de nucleótidos cíclicos, puede ser preferible exponer a las células a agentes que aumenten los niveles de nucleótidos cíclicos intracelulares, por ejemplo, forskolina, antes de añadir un compuesto activador de receptores a las células en el ensayo. Pueden generarse células para este tipo de ensayo por cotransfección de una célula hospedadora con ADN que codifica un canal iónico de apertura dependiente de nucleótidos cíclicos, GPCR fosfatasa y ADN que codifica un receptor (por ejemplo, determinados receptores de glutamato, receptores de acetilcolina muscarínicos, receptores de dopamina, receptores de serotonina y similares) que, cuando se activa, provoca un cambio en los niveles de nucleótidos cíclicos en el citoplasma.

En una realización preferida, se mide la actividad de un polipéptido T1R por expresión de un gen de T1R en una célula heteróloga con una proteína G promiscua que conecta al receptor con una ruta de transducción de señales de fosfolipasa C (véase Offermanns y Simon, J. Biol. Chem., 270: 15175-15180 (1995)). Opcionalmente, la línea celular es HEK-293 (que no expresa de forma natural genes de T1R) y la proteína G promiscua es $\text{G}\alpha 15$ (Offermanns y Simon, anteriormente). La modulación de la transducción del sabor se ensaya por medición de los cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelular, que cambian en respuesta a la modulación de la ruta de transducción de señales de T1R a través de la administración de una molécula que se asocia con un polipéptido T1R. Opcionalmente, los cambios en los niveles de Ca^{2+} se miden usando colorantes indicadores fluorescentes de Ca^{2+} y formación de imágenes fluorométricas.

En una realización, los cambios en el AMPc o GMPc intracelular pueden medirse usando inmunoensayos. El procedimiento descrito en Offermanns y Simon, J. Biol. Chem., 270: 15175-15180 (1995), puede usarse para determinar el nivel de AMPc. Además, el procedimiento descrito en Felley-Bosco y col., Am. J. Resp. Cell and Mol. Biol., 11: 159-164 (1994) puede usarse para determinar el nivel de GMPc. Además, se describe un kit de ensayo para medir el AMPc y/o GMPc en la patente de Estados Unidos 4.115.538.

En otra realización, la hidrólisis del fosfatidilinositol (PI) puede analizarse de acuerdo con la patente de Estados Unidos 5.436.128. En resumen, el ensayo implica el marcaje de células con 3H-mioinositol durante 48 o más horas. Las células marcadas se tratan con un compuesto de ensayo durante una hora. Las células tratadas se lisan y se extraen en cloroformo-metanol-agua, después de lo cual los fosfatos de inositol se separan mediante cromatografía de intercambio iónico y se cuantifican por recuento de centelleo. La estimulación en veces se determina mediante el cálculo de la proporción del cpm en presencia de agonista con respecto a cpm en presencia de control de tampón. Así mismo, la inhibición en veces se determina mediante el cálculo de la proporción de cpm en presencia de

antagonista con respecto a los cpm en presencia de control de tampón (que puede o no contener un agonista).

En otra realización, pueden medirse los niveles de transcripción para evaluar los efectos de un compuesto de ensayo sobre la transducción de señales. Una célula hospedadora que contiene un polipéptido T1R de interés se pone en contacto con un compuesto de ensayo durante un tiempo suficiente para efectuar cualquier interacción y, después, se mide el nivel de expresión génica. La cantidad de tiempo para efectuar dichas interacciones puede determinarse empíricamente, tal como por procesamiento de un curso de tiempo y medición del nivel de transcripción en función del tiempo. La cantidad de transcripción puede medirse mediante el uso de cualquier procedimiento conocido por los especialistas en la técnica que sea adecuado. Por ejemplo, puede detectarse la expresión de ARNm de la proteína de interés usando transferencias de northern o pueden identificarse sus productos polipeptídicos usando inmunoensayos. Como alternativa, pueden usarse ensayos basados en la transcripción usando un gen indicador, como se describe en la patente de Estados Unidos N°: 5.436.128. Los genes indicadores pueden ser, por ejemplo, cloranfenicol acetiltransferasa, luciferasa, 3-galactosidasa y fosfatasa alcalina. Además, la proteína de interés puede usarse como un indicador indirecto a través de la unión a un segundo indicador tal como la proteína verde fluorescente (véase, por ejemplo, Mistili y Spector, *Nature Biotechnology*, 15: 961-964 (1997)).

Después, la cantidad de transcripción se compara con la cantidad de transcripción en la misma célula en la ausencia del compuesto de ensayo o puede compararse con la cantidad de transcripción en una célula sustancialmente idéntica que carece del polipéptido T1R de interés. Puede obtenerse una célula sustancialmente idéntica de las mismas células a partir de las que se preparó la célula recombinante pero que no se hayan modificado por introducción de un ADN heterólogo. Cualquier diferencia en la cantidad de transcripción indica que el compuesto de ensayo ha alterado en cierta forma la actividad del polipéptido T1R de interés.

6. Animales transgénicos no humanos que expresan receptores quimiosensoriales

Para ensayos de receptores, también pueden usarse animales no humanos que expresen una o más secuencias de receptores quimiosensoriales de la invención. Dicha expresión puede usarse para determinar si un compuesto de ensayo se une específicamente a un polipéptido receptor transmembrana gustativo de mamífero *in vivo* por contacto de un animal no humano transfectado de forma estable o transitoria con un ácido nucleico que codifica un receptor quimiosensorial o región de unión a ligando del mismo con un compuesto de ensayo y determinación de si el animal reacciona con el compuesto de ensayo por unión específica al polipéptido receptor.

Son particularmente útiles animales transfectados o infectados con los vectores de la invención para ensayos para identificar y caracterizar estímulos gustativos/ligandos que pueden unirse a un receptor o conjuntos de receptores específicos. Dichos animales infectados con vector que expresan secuencias de receptores quimiosensoriales humanos pueden usarse para la exploración *in vivo* de estímulos gustativos y su efecto sobre, por ejemplo, la fisiología celular (por ejemplo, sobre neuronas gustativas), sobre el SNC o el comportamiento.

Se conocen bien en la técnica medios para infectar/expresar los ácidos nucleicos y vectores individualmente o como bibliotecas. Pueden medirse una diversidad de parámetros de células individuales, órganos o animales completos mediante una diversidad de medios. Las secuencias de T1R de la invención pueden expresarse, por ejemplo, en tejidos gustativos de un animal por administración con un agente infeccioso, por ejemplo, un vector de expresión de adenovirus.

Los genes de receptores quimiosensoriales endógenos pueden permanecer funcionales y pueden presentar todavía actividad de tipo silvestre (nativa). En otras situaciones, cuando es deseable que toda la actividad de receptores quimiosensoriales sea por el receptor híbrido exógeno introducido, se prefiere el uso de una línea *knock out*. Se conocen bien en la técnica procedimientos para la construcción de animales transgénicos no humanos, particularmente ratones transgénicos, y la selección y preparación de construcciones recombinantes para generar células transformadas.

La construcción de una célula "*knock out*" se basa en la premisa de que el nivel de expresión de un gen particular en una célula de mamífero puede disminuirse o anularse completamente por introducción en el genoma de una nueva secuencia de ADN que sirva para interrumpir alguna parte de la secuencia de ADN del gen que se va a suprimir. Además, puede usarse la "inserción de trampas de genes" para interrumpir un gen hospedador y pueden usarse células madre embrionarias (ES, del inglés Embryonic Stem) de ratón para producir animales transgénicos *knock out* (véase por ejemplo, Holzschu, *Transgenic Res* 6: 97-106 (1997)). Típicamente, la inserción de lo exógeno es mediante recombinación homóloga entre secuencias de ácidos nucleicos complementarias. La secuencia exógena es alguna parte del gen diana que se va a modificar, tal como secuencias de exones, intrones o reguladoras de la transcripción o cualquier secuencia genómica que sea capaz de afectar al nivel de expresión del gen diana, o una combinación de las mismas. La dirección de genes a través de recombinación homóloga en células madre embrionarias pluripotenciales permite modificar con precisión la secuencia genómica de interés. Puede usarse cualquier técnica para generar, seleccionar, propagar un animal *knock out*, por ejemplo, véanse Bijvoet, *Hum. Mol. Genet.* 7: 53-62 (1998); Moreadith, *J. Mol. Med.* 75: 208-216 (1997); Tojo, *Cytotechnology* 19: 161-165 (1995); Mudgett, *Methods Mol. Biol.* 48: 167-184 (1995); Longo, *Transgenic Res.* 6: 321-328 (1997); patentes de Estados

Unidos N° 5.616.491; 5.464.764; 5.631.153; 5.487.992; 5.627.059; 5.272.071; documentos WO 91/09955; WO 93/09222; WO 96/29411; WO 95/31560; WO 91/12650.

Los ácidos nucleicos de la invención también pueden usarse como reactivos para producir células humanas “*knock out*” y su progenie. Asimismo, los ácidos nucleicos de la invención también pueden usarse como reactivos para producir ratones “*knock in*”. Las secuencias de genes de T1R humanas o de rata pueden reemplazar al T1R ortólogo en el genoma de ratón. De este modo, se produce un ratón que expresa un T1R humano o de rata. Después, este ratón puede usarse para analizar la función de T1R humanos o de rata y para identificar ligandos para dichos T1R.

10 **D. Moduladores**

Los compuestos ensayados como moduladores de un miembro de la familia T1R pueden ser cualquier compuesto químico pequeño o una entidad biológica, tal como una proteína, azúcar, ácido nucleico o lípido. Como alternativa, los moduladores pueden ser versiones genéticamente modificadas de un gen de T1R. Típicamente, los compuestos de ensayo serán moléculas químicas pequeñas y péptidos. Esencialmente puede usarse cualquier compuesto químico como un modulador o ligando potencial en los ensayos de la invención, aunque más frecuentemente se usan compuestos que pueden disolverse en soluciones acuosas u orgánicas (especialmente basadas en DMSO). Los ensayos se diseñan para explorar grandes bibliotecas químicas por automatización de las etapas de ensayo y suministro de compuestos a partir de cualquier fuente conveniente a los ensayos, que típicamente se procesan en paralelo (por ejemplo, en formatos de microtitulación o placas de microtitulación en ensayos robotizados). Se entenderá que existen muchos proveedores de compuestos químicos, incluyendo Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Suiza) y similares.

En una realización preferida, los procedimientos de exploración de alto rendimiento implican suministrar una biblioteca química o peptídica combinatoria que contiene un gran número de compuestos terapéuticos potenciales (compuestos moduladores o ligandos potenciales). Después, dichas “bibliotecas químicas combinatorias” o “bibliotecas de ligandos” se exploran en uno o más ensayos, como se describe en la presente memoria, para identificar los miembros de la biblioteca (especies o subclases químicas particulares) que presenten una actividad característica deseada. Los compuestos identificados de este modo pueden servir como “compuestos candidatos” convencionales o ellos mismos pueden usarse como agentes terapéuticos potenciales o reales.

Una biblioteca química combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generada por síntesis química o síntesis biológica, por combinación de varios “componentes básicos” químicos tales como reactivos. Por ejemplo, se forma una biblioteca química combinatoria lineal, tal como una biblioteca de polipéptidos, por combinación de un conjunto de componentes básicos químicos (aminoácidos) de todas las formas posibles para una longitud de compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipeptídico). Pueden sintetizarse millones de compuestos químicos a través de dicha mezcla combinatoria de componentes básicos químicos.

Los especialistas en la técnica conocen bien la preparación y exploración de bibliotecas químicas combinatorias. Dichas bibliotecas químicas combinatorias incluyen, pero sin limitación, bibliotecas peptídicas (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.010.175, Furka, Int. J. Pept. Prot. Res., 37: 487-493 (1991) y Houghton y col., Nature, 354: 84-88 (1991)). También pueden usarse otras químicas para generar bibliotecas de diversidad química. Dichas químicas incluyen, pero sin limitación: peptoides (por ejemplo, publicación PCT N° WO 91/19735), péptidos codificados (por ejemplo, publicación PTC WO 93/20242), bio-oligómeros aleatorios (por ejemplo, publicación PTC N° WO 92/00091), benzodiazepinas (por ejemplo, patente de Estados Unidos N° 5.288.514), diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobs y col., Proc. Nat. Acad. Sci., 90: 6909-6913 (1993)), polipéptidos vinílogos (Hagihara y col., J. Amer. Chem. Soc., 114: 6568 (1992)), peptidomiméticos no peptídicos con armazón de glucosa, (Hirschmann y col., J. Amer. Chem. Soc., 114: 9217-9218 (1992)), síntesis de análogos orgánicos de bibliotecas de compuestos pequeños (Chen y col., J. Amer. Chem. Soc., 116: 2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho y col., Science, 261: 1303 (1993)), peptidilfosfonatos (Campbell y col., J. Org. Chem. 59: 658 (1994)), bibliotecas de ácidos nucleicos (Ausubel, Berger y Sambrook, todos anteriormente), bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (patente de Estados Unidos 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (Vaughn y col., Nature Biotechnology, 14 (3): 309-314 (1996) y documento WO 97/00271 (PCT/US96/00271)), bibliotecas de carbohidratos (Liang y col., Science, 274: 1520-1522 (1996) y patente de Estados Unidos 5.593.853), librería de moléculas orgánicas pequeñas (benzodiazepinas, Baum, C&EM, enero 18, página 33 (1993); tiazolidinonas y metatiazanonas, patente de Estados Unidos N°: 5.549.974; pinrolidinas, patentes de Estados Unidos 5.525.735 y 5.519.134; compuestos de morfolino, patente de Estados Unidos 5.506.337; benzodiazepinas, 5.288.514 y similares).

En el mercado se encuentran disponibles dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias (véanse, por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS (Advanced Chem Tech, Louisville KY), Symphony (Rainin, Woburn, MA), 433A (Applied Biosystems, Foster City, CA), 9095 Plus (Millipore, Bedford, MA)). Además, numerosas bibliotecas combinatorias están en sí disponibles en el mercado (véanse, por ejemplo, ComGenex, Princeton, NJ; Tripos, Inc., St. Louis, MO; 3D Pharmaceuticals, Exton, PA; Martek Biosciences; Columbia, MD; etc.).

Los moduladores de T1R pueden usarse en cualquier producto alimenticio, golosina, composición farmacéutica o ingrediente de los mismos para modular de este modo el sabor del producto, composición o ingrediente de una forma deseada. Por ejemplo, pueden añadirse moduladores de T1R que potencien la sensación de sabor dulce para edulcorar un producto o composición, mientras que pueden añadirse moduladores de T1R que bloqueen sensaciones gustativas desagradables para mejorar el sabor de un producto o composición.

E. Procedimientos para representar y predecir la percepción del sabor

La descripción también se refiere a procedimientos para representar la percepción del sabor y/o para predecir la percepción del sabor en un mamífero, incluyendo un ser humano. Preferentemente, dichos procedimientos pueden realizarse usando los receptores y los genes que codifican dichos polipéptidos T1R descritos en la presente memoria.

En la invención también se contempla un procedimiento de exploración de uno o más compuestos para determinar la presencia de un sabor detectable por un mamífero, que comprende: poner en contacto dicho uno o más compuestos con los receptores descritos, preferentemente, en el que el mamífero es un ser humano. En la invención también se contempla un procedimiento para representar la percepción gustativa de un sabor particular en un mamífero que comprende las etapas de: proporcionar valores de X_1 a X_n representativos de la estimulación cuantitativa de cada uno de n receptores quimiosensoriales de dicho vertebrado, donde n es mayor que o igual a 2; y generar, a partir de dichos valores, una representación cuantitativa de la percepción gustativa. Los receptores quimiosensoriales pueden ser un receptor quimiosensorial descrito en la presente memoria, la representación puede constituir un punto o un volumen en un espacio n -dimensional, puede constituir un gráfico o un espectro y puede constituir una matriz de representaciones cuantitativas. Además, la etapa de suministro puede comprender poner en contacto a una pluralidad de receptores quimiosensoriales producidos de forma recombinante con una composición de ensayo y medir cuantitativamente la interacción de dicha composición con dichos receptores.

También se contempla un procedimiento para predecir la percepción gustativa en un mamífero generada por una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen una percepción gustativa desconocida en un mamífero, que comprende las etapas de: proporcionar valores de X_1 a X_n representativos de la estimulación cuantitativa de cada uno de los n receptores quimiosensoriales de dicho vertebrado, donde n es mayor que o igual a 2, para una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen una percepción gustativa conocida en un mamífero; y generar a partir de dichos valores una representación cuantitativa de la percepción gustativa en un mamífero para la una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen una percepción gustativa conocida en un mamífero, que proporcionan valores de X_1 a X_n representativos de la estimulación cuantitativa de cada uno de los n receptores quimiosensoriales de dicho vertebrado, donde n es mayor que o igual a 2, para una o mas moléculas o combinaciones de moléculas que producen una percepción gustativa desconocida en un mamífero; y generar a partir de dichos valores una representación cuantitativa de la percepción gustativa en un mamífero para la una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen una percepción gustativa desconocida en un mamífero y predecir la percepción gustativa en un mamífero generada por una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen una percepción gustativa desconocida en un mamífero por comparación de la representación cuantitativa de la percepción gustativa en un mamífero para la una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen una percepción gustativa desconocida en un mamífero con la representación cuantitativa de la percepción gustativa en un mamífero para la una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen una percepción gustativa conocida en un mamífero. Los receptores quimiosensoriales usados en éste procedimiento pueden incluir un receptor quimiosensorial descrito en la presente memoria.

En otra realización, se generan nuevas moléculas o combinaciones de moléculas que provocan una percepción gustativa predeterminada en un mamífero por determinación de un valor de percepción gustativa en un mamífero para una molécula o combinaciones de moléculas conocidas, como se ha descrito anteriormente; determinar un valor de percepción gustativa en un mamífero para una o mas moléculas o combinaciones de moléculas desconocidas, como se ha descrito anteriormente; comparar el valor de la percepción gustativa en un mamífero para una o más composiciones desconocidas con el valor de la percepción gustativa en un mamífero para una o más composiciones conocidas; seleccionar una molécula o combinaciones de moléculas que provoquen una percepción gustativa predeterminada en un mamífero; y combinar dos o más moléculas o combinaciones de moléculas desconocidas para formar una molécula o combinación de moléculas que provoque una percepción gustativa predeterminada en un mamífero. La etapa de combinación produce una sola molécula o una combinación de moléculas que provocan una percepción gustativa predeterminada en un mamífero.

En otra realización se proporciona un procedimiento para simular un sabor, que comprende las etapas de: para cada uno de una pluralidad de receptores quimiosensoriales clonados, preferentemente receptores humanos, determinar el grado en el que cada receptor interacciona con el estímulo gustativo; y combinar una pluralidad de compuestos, teniendo cada uno una interacción previamente determinada con uno o más de los receptores, en cantidades en las que en conjunto proporcionen un perfil de estimulación de receptores que mimetice el perfil para el estímulo gustativo. La interacción de un estímulo gustativo con un receptor quimiosensorial puede determinarse usando cualquiera de los ensayos de unión o indicadores descritos en la presente memoria. Después, la pluralidad de

compuestos puede combinarse para formar una mezcla. Si se desea, pueden combinarse covalentemente uno o más de la pluralidad de los compuestos. Los compuestos combinados estimulan sustancialmente al menos el 75%, 80% ó 90% de los receptores que se estimulan sustancialmente por el estímulo gustativo.

- 5 En otra realización, se ensaya una pluralidad de compuestos patrón frente a una pluralidad de receptores quimiosensoriales para determinar el grado en el que cada uno de los receptores interacciona con cada compuesto patrón, generando de este modo un perfil de estimulación de receptores para cada compuesto patrón. Después, estos perfiles de estimulación de receptores pueden almacenarse en una base de datos relacional en un medio de almacenamiento de datos. El procedimiento puede comprender además proporcionar un perfil de estimulación de
10 receptores deseado para un sabor; comparar el perfil de estimulación de receptores deseado con la base de datos relacional; y determinar una o más combinaciones de compuestos patrón que coincidan más estrechamente con el perfil de estimulación de receptores deseado. El procedimiento puede comprender además combinar compuestos patrón en una o más de las combinaciones establecidas para simular el sabor.

15 **F. Kits**

- Los genes de T1R y sus homólogos son herramientas útiles para identificar células receptoras quimiosensoriales para determinaciones forenses y de paternidad y para el examen de la transducción del sabor. Se usan reactivos
20 específicos de miembros de la familia T1R que hibridan específicamente con ácidos nucleicos de T1, tales como sondas y cebadores de T1R, y reactivos específicos de T1R que se unen específicamente a un polipéptido T1R, por ejemplo, anticuerpos de T1R para examinar la expresión de células gustativas y la regulación de la transducción del sabor.

- Los ensayos de ácidos nucleicos para determinar la presencia de ADN y ARN para un miembro de la familia T1R en
25 una muestra incluyen numerosas técnicas conocidas por los especialistas en la técnica, tales como análisis de southern, análisis de northern, transferencias puntuales, protección frente a ARNasa, análisis con S1, técnicas de amplificación tales como PCR e hibridación *in situ*. En la hibridación *in situ*, por ejemplo, el ácido nucleico diana se libera de su entorno celular de tal modo que esté disponible para la hibridación en el interior de la célula, al tiempo que preserva la morfología celular para una interpretación y análisis posterior. Los siguientes artículos proporcionan
30 una visión de conjunto de la técnica de la hibridación *in situ*: Singer y col., *Biotechniques*, 4: 230250 (1986); Haase y col., *Methods in Virology*, vol VII, págs. 189-226 (1984); y *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (Names y col., eds. 1987). Además, puede detectarse un polipéptido T1R con las diversas técnicas de inmunoensayo descritas anteriormente. Típicamente la muestra de ensayo se compara tanto con un control positivo (por ejemplo, una muestra que expresa un polipéptido T1R recombinante) como con un control negativo.

- También se describen kits para explorar para moduladores de miembros de la familia T1R. Dichos kits pueden prepararse a partir de materiales y reactivos fácilmente disponibles. Por ejemplo, dichos kits pueden comprender uno o más de cualquiera de los siguientes materiales: ácidos nucleicos o proteínas T1R, tubos de reacción e instrucciones para el ensayo de la actividad de T1R. Opcionalmente, el kit contiene un receptor T1R biológicamente
40 activo. Pueden prepararse una amplia diversidad de kits y componentes de acuerdo con la presente invención, dependiendo del uso deseado del kit y de las necesidades particulares del usuario.

Ejemplos

- 45 En las secuencias proteicas que se presentan en la presente memoria, el código de una letra X o Xaa se refiere a cualquiera de los veinte restos aminoacídicos comunes. En las secuencias de ADN que se presentan en la presente memoria, el código de una letra N o n se refiere a cualquiera de las cuatro bases nucleotídicas comunes, A, T, C o G.

EJEMPLO 1- hT1R3

- 50 El ADN genómico de hT1R3 se proporciona a continuación como la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2 mostrándose las secuencias codificantes predichas (cds) en negrita. El espacio entre los cóntigos 5' y 3' se muestra como puntos suspensivos ("....."). Las cds predichas de hT1R3 se describen en la SEC ID N° 3. Por último, se proporciona una secuencia de aminoácidos de hT1R3 predicha preferida como SEC ID N° 4, usando el código de una letra para los
55 aminoácidos.

ADN genómico de hT1R3 - cóntigo 5' (SEC ID N° 1)

AGCCTGGCAGTGGCCTCAGGCAGAGTCTGACGCGCACAACTTTTCAGGCCC
 AGGAAGCGAGGACACCACTGGGGCCCCAGGGTGTGGCAAGTGAGGATGGC
 AAGGGTTTTGCTAAACAAATCCTCTGCCCCGCTCCCCGCCCCGGGCTCACTCC
 ATGTGAGGCCCCAGTCGGGGCAGCCACCTGCCGTGCCTGTTGGAAGTTGCC
 TCTGCCATGCTGGGCCCTGCTGTCCTGGGCCTCAGCCTCTGGGCTCTCCTG
 CACCCTGGGACGGGGGGCCCCATTGTGCCTGTACAGCAACTTAGGATGAAG
 GGGGACTACGTGCTGGGGGGGCTGTTCCCCCTGGGCGAGGCCGAGGAGGC
 TGGCCTCCGCAGCCGGACACGGCCCAGCAGCCCTGTGTGCACCAGGTACA
 GAGGTGGGACGGCCTGGGTCTGGGGTCAGGGTGACCAGGTCTGGGGTGCTC
 CTGAGCTGGGGCCGAGGTGGCCATCTGCGGTTCTGTGTGGCCCCAGGTTCT
 CCTCAAACGGCCTGCTCTGGGCACTGGCCATGAAAATGGCCGTGGAGGAGA
 TCAACAACAAGTCGGATCTGCTGCCCGGGCTGCGCCTGGGCTACGACCTCT
 TTGATACGTGCTCGGAGCCTGTGGTGGCCATGAAGCCCAGCCTCATGTTCT
 GGCCAAGGCAGGCAGCCGCGACATCGCCGCCTACTGCAACTACACGCAGTA
 CCAGCCCCGTGTGCTGGCTGTCATCGGGCCCCACTCGTCAGAGCTCGCCAT
 GGTACCGGCAAGTTCTTCAGCTTCTTCCTCATGCCCCAGTGGGGCGCCCC
 CCACCATCACCCACCCCAACCAACCCCTGCCCCGTGGGAGCCCCCTTGTGT
 CAGGAGAATGC (SEC ID N°: 1)

ADN genómico de hT1R3 - cóntigo 3' (SEC ID N° 2)

.....TACATGCACCCACCCAGCCCTGCCCTGGGAGCCCTGTGTGAG
 AAGATGCTCTTGGCCTTGCAAGTCAAGTACGGTGCTAGCATGGAGCTGCTG
 AGCGCCCCGGGAGACCTTCCCCTCCTTCTTCCGCACCGTGCCCAGCGACCGT
 GTGCAGCTGACGGCCGCGCGGAGCTGCTGCAGGAGTTCGGCTGGAAGTG
 GGTGGCCGCCCTGGGCAGCGACGACGAGTACGGCCGGCAGGGCCTGAGC
 ATCTTCTCGGCCCTGGCCGCGGCACGCGGCATCTGCATCGCGCACGAGGG
 CCTGGTGGCGCTGCCCCGTGCCGATGACTCGCGGCTGGGGAAGGTGCAGG
 ACGTCCTGCACCAGGTGAACCAGAGCAGCGTGCAGGTGGTGCTGCTGTTGG
 CCTCCGTGCACGCGGCCACGCCCTCTTCAACTACAGCATCAGCAGCAGGC
 TCTCGCCCAAGGTGTGGGTGGCCAGCGAGGCCTGGCTGACCTCTGACCTGG
 TCATGGGGCTGCCCGGCATGGCCCAGATGGGCACGGTGCTTGGCTTCCTCC
 AGAGGGGTGCCAGCTGCACGAGTTCCCCCAGTACGTGAAGACGCACCTG
 GCCCTGGCCACCGACCCGGCCTTCTGCTCTGCCCTGGGCGAGAGGGAGCA

GGGTCTGGAGGAGGACGTGGTGGGCCAGCGCTGCCCCGAGTGTGACTGCA
 TCACGCTGCAGAACGTGAGCGCAGGGCTAAATCACCACCAGACGTTCTCTG
 TCTACGCAGCTGTGTATAGCGTGGCCCAGGCCCTGCACAACACTCTTCAGTG
 CAACGCCTCAGGCTGCCCCGCGCAGGACCCCGTGAAGCCCTGGCAGGTGA
 GCCCGGGAGATGGGGGTGTGCTGTCTCTGCATGTGCCAGGCCACCAGG
 CACGGCCACCACGCCTGAGCTGGAGGTGGCTGGCGGCTCAGCCCCGTCCC
 CCGCCCCGAGCTCCTGGAGAACATGTACAACCTGACCTTCCACGTGGGCGG
 GCTGCCGCTGCGGTTTCGACAGCAGCGGAAACGTGGACATGGAGTACGACCT
 GAAGCTGTGGGTGTGGCAGGGCTCAGTGCCCAGGCTCCACGACGTGGGCA
 GGTTC AACGGCAGCCTCAGGACAGAGCGCCTGAAGATCCGCTGGCACACGT
 CTGACAACCAGGTGAGGTGAGGGTGGGTGTGCCAGGCGTGCCCGTGGTAG
 CCCCCGCGGCAGGGCGCAGCCTGGGGGTGGGGGCCGTTCCAGTCTCCCGT
 GGGCATGCCAGCCGAGCAGAGCCAGACCCAGGCCTGTGCGCAGAAGCC
 CGTGTCCCGGTGCTCGCGGCAGTGCCAGGAGGGCCAGGTGCGCCGGGTCA
 AGGGGTTCCACTCCTGCTGCTACGACTGTGTGGACTGCGAGGCGGGCAGCT
 ACCGGCAAACCCAGGTGAGCCGCCTTCCCGGCAGGCGGGGGTGGGAACG
 CAGCAGGGGAGGGTCCTGCCAAGTCCTGACTCTGAGACCAGAGCCACAGG
 GTACAAGACGAACACCCAGCGCCCTTCTCCTCTCTCACAGACGACATCGCCT
 GCACCTTTTGTGGCCAGGATGAGTGGTCCCCGGAGCGAAGCACACGCTGCT
 TCCGCCGCAGGTCTCGGTTCTGGCATGGGGCGAGCCGGCTGTGCTGCTGC
 TGCTCCTGCTGCTGAGCCTGGCGCTGGGCCTTGTGCTGGCTGCTTTGGGGC
 TGTTCTGTTACCATCGGGACAGCCCACTGGTTCAGGCCTCGGGGGGGCCCC
 TGGCCTGCTTTGGCCTGGTGTGCCTGGGCCTGGTCTGCCTCAGCGTCCTCC
 TGTTCCCTGGCCAGCCAGCCCTGCCCGATGCCTGGCCCAGCAGCCCTTGT
 CCCACCTCCCGCTCACGGGCTGCCTGAGCACACTCTTCCTGCAGGCGGGCCG
 AGATCTTCGTGGAGTCAGAACTGCCTCTGAGCTGGGCAGACCGGCTGAGTG
 GCTGCCTGCGGGGGGCCCTGGGCCTGGCTGGTGGTGGTGGCTGGCCATGCTG
 GTGGAGGTCGCACTGTGCACCTGGTACCTGGTGGCCTTCCCGCCGGAGGTG
 GTGACGGACTGGCACATGCTGCCACGGAGGCGCTGGTGCCTGCCGCAC
 ACGCTCCTGGGTGAGCTTCGGCCTAGCGCACGCCACCAATGCCACGCTGGC
 CTTTCTCTGCTTCCTGGGCACTTTCCTGGTGGGAGCCAGCCGGGCTGCTAC
 AACCGTGCCCGTGGCCTCAGCTTGGCATGCTGGCCTACTTCATCACCTGGG
 TCTCCTTTGTGCCCTCCTGGCCAATGTGCAGGTGGTCCTCAGGCCCGCCGT

GCAGATGGGCGCCCTCCTGCTCTGTGTCTGGGCATCCTGGCTGCCTTCCA
 CCTGCCCAGGTGTTACCTGCTCATGCGGCAGCCAGGGCTCAACACCCCCGA
 GTTCTTCCTGGGAGGGGGCCCTGGGGATGCCCAAGGCCAGAATGACGGGA
 ACACAGGAAATCAGGGGAAACATGAGTGACCCAACCCTGTGATCTCAGCCC
 CGGTGAACCCAGACTTAGCTGCGATCCCCCCCAAGCCAGCAATGACCCGTG
 TCTCGCTACAGAGACCCTCCCGCTCTAGGTTCTGACCCCAGGTTGTCTCCTG
 ACCCTGACCCACAGTGAGCCCTAGGCCTGGAGCACGTGGACACCCCTGTG
 ACCATC (SEC ID N°: 2)

ADN genómico de longitud completa de hT1R3 (SEC ID N° 20)

AGCCTGGCAGTGGCCTCAGGCAGAGTCTGACGCGCACAACTTTTCAGGCCC
 AGGAAGCGAGGACACCACTGGGGCCCCAGGGTGTGGCAAGTGAGGATGGC
 AAGGGTTTTGCTAAACAAATCCTCTGCCCGCTCCCCGCCCCGGGCTCACTCC
 ATGTGAGGCCCCAGTCGGGGCAGCCACCTGCCGTGCCTGTTGGAAGTTGCC
 TCTGCCATGCTGGGCCCTGCTGTCTCTGGGCCTCAGCCTCTGGGCTCTCCTG
 CACCCTGGGACGGGGGGCCCCATTGTGCCTGTCACAGCAACTTAGGATGAAG
 GGGGACTACGTGCTGGGGGGGCTGTTCCCCCTGGGCGAGGCCGAGGAGGC
 TGGCCTCCGCAGCCGGACACGGCCCAGCAGCCCTGTGTGCACCAGGTACA
 GAGGTGGGACGGCCTGGGTGCGGGTCAGGGTGACCAGGTCTGGGGTGCTC
 CTGAGCTGGGGCCGAGGTGGCCATCTGCGGTTCTGTGTGGCCCCAGGTTCT
 CCTCAAACGGCCTGCTCTGGGCACTGGCCATGAAAATGGCCGTGGAGGAGA
 TCAACAACAAGTCGGATCTGCTGCCCGGGCTGCGCCTGGGCTACGACCTCT
 TTGATACGTGCTCGGAGCCTGTGGTGGCCATGAAGCCCAGCCTCATGTTCT
 GGCCAAGGCAGGCAGCCGCGACATCGCCGCCTACTGCAACTACACGCAGTA
 CCAGCCCCGTGTGCTGGCTGTCATCGGGCCCCACTCGTCAGAGCTCGCCAT
 GGTCACCGGCAAGTTCTTCAGCTTCTTCCTCATGCCCCAGTGGGGCGCCCC
 CCACCATCACCCACCCCAACCAACCCCTGCCCGTGGGAGCCCTTGTGT
 CAGGAGAATGCTACATGCACCCACCCAGCCCTGCCCTGGGAGCCCTGTGT
 CAGAAGATGCTCTTGGCCTTGCAAGTCAAGTACGGTGCTAGCATGGAGCTG
 CTGAGCGCCCCGGGAGACCTTCCCCTCCTTCTTCCGCACCGTGCCCAGCGAC
 CGTGTGCAGCTGACGGCCGCGCGGAGCTGCTGCAGGAGTTGGGCTGGAA
 CTGGGTGGCCGCCCTGGGCAGCGACGACGAGTACGGCCGGCAGGGCCTGA
 GCATCTTCTCGGCCCTGGCCGCGGCACGCGGCATCTGCATCGCGCACGAG
 GGCTGGTGCCGCTGCCCGTGCCGATGACTCGCGGCTGGGGAAGGTGCA

GGACGTCCTGCACCAGGTGAACCAGAGCAGCGTGCAGGTGGTGCTGCTGTT
CGCCTCCGTGCACGCCGCCACGCCCTCTTCAACTACAGCATCAGCAGCAG
GCTCTCGCCCAAGGTGTGGGTGGCCAGCGAGGCCTGGCTGACCTCTGACCT
GGTCATGGGGCTGCCCCGGCATGGCCCAGATGGGCACGGTGCTTGGCTTCCT
CCAGAGGGGTGCCAGCTGCACGAGTTCCCCCAGTACGTGAAGACGCACCT
GGCCCTGGCCACCGACCCGGCCTTCTGCTGTGCCCTGGGCGAGAGGGAGC
AGGGTCTGGAGGAGGACGTGGTGGGCCAGCGCTGCCCGCAGTGTGACTGC
ATCACGCTGCAGAACGTGAGCGCAGGGCTAAATCACCACCAGACGTTCTCT
GTCTACGCAGCTGTGTATAGCGTGGCCCAGGCCCTGCACAACACTCTTCAGT
GCAACGCCTCAGGCTGCCCCGGCGCAGGACCCCGTGAAGCCCTGGCAGGTG
AGCCCGGGAGATGGGGGTGTGCTGTCTCTGCATGTGCCCAGGCCACCAG
GCACGGCCACCACGCCTGAGCTGGAGGTGGCTGGCGGCTCAGCCCCGTCC
CCCGCCCGCAGCTCCTGGAGAACATGTACAACCTGACCTTCCACGTGGGCG
GGCTGCCGCTGCGGTTTCGACAGCAGCGGAAACGTGGACATGGAGTACGAC
CTGAAGCTGTGGGTGTGGCAGGGCTCAGTGCCCAGGCTCCACGACGTGGG
CAGGTTCAACGGCAGCCTCAGGACAGAGCGCCTGAAGATCCGCTGGCACAC
GTCTGACAACCAGGTGAGGTGAGGGTGGGTGTGCCAGGCGTGCCCGTGGT
AGCCCCCGCGGCAGGGCGCAGCCTGGGGGTGGGGGCGGTTCCAGTCTCCC
GTGGGCATGCCCAGCCGAGCAGAGCCAGACCCCAGGCCTGTGCGCAGAAG
CCCGTGTCCCGGTGCTCGCGGCAGTGCCAGGAGGGGCCAGGTGCGCCGGGT
CAAGGGGTTCACCTCCTGCTGCTACGACTGTGTGGACTGCGAGGCGGGCAG
CTACCGGCAAAACCCAGGTGAGCCGCCTTCCCGGCAGGCGGGGGTGGGAA
CGCAGCAGGGGAGGGTCTGCCAAGTCTGACTCTGAGACCAGAGCCCACA
GGGTACAAGACGAACACCCAGCGCCCTTCTCCTCTCTCACAGACGACATCG
CCTGCACCTTTTGTGGCCAGGATGAGTGGTCCCCGGAGCGAAGCACACGCT
GCTTCCGCCGCAGGTCTCGGTTCTGGCATGGGGCGAGCCGGCTGTGCTGC
TGCTGCTCCTGCTGCTGAGCCTGGCGCTGGGCCTTGTGCTGGCTGCTTTGG
GGCTGTTTCGTTACCATCGGGACAGCCCACTGGTTCAGGCCTCGGGGGGGC
CCCTGGCCTGCTTTGGCCTGGTGTGCCTGGGCCTGGTCTGCCTCAGCGTCC
TCCTGTTCCCTGGCCAGCCAGCCCTGCCCGATGCCTGGCCCAGCAGCCCT
TGTCCACCTCCCGCTCACGGGCTGCCTGAGCACACTCTTCCTGCAGGCGG
CCGAGATCTTCGTGGAGTCAGAACTGCCTCTGAGCTGGGCAGACCGGCTGA
GTGGCTGCCTGCGGGGGGCCCTGGGCCTGGCTGGTGGTGTGCTGCTGGCCATG

CTGGTGGAGGTGCGACTGTGCACCTGGTACCTGGTGGCCTTCCCGCCGGAG
 GTGGTGACGGACTGGCACATGCTGCCCACGGAGGCGCTGGTGCCTGCGG
 CACACGCTCCTGGGTGAGCTTCGGCCTAGCGCACGCCACCAATGCCACGCT
 GGCTTTCTCTGCTTCCTGGGCACTTTCCTGGTGGGAGCCAGCCGGGCTG
 CTACAACCGTGCCCGTGGCCTCACCTTTGCCATGCTGGCCTACTTCATCACC
 TGGGTCTCCTTTGTGCCCCCTCCTGGCCAATGTGCAGGTGGTCTCAGGCCC
 GCCGTGCAGATGGGCGCCCTCCTGCTCTGTGTCTCCTGGGCATCCTGGCTGCC
 TTCCACCTGCCCAGGTGTTACCTGCTCATGCGGCAGCCAGGGCTCAACACC
 CCCGAGTTCTTCCTGGGAGGGGGCCCTGGGGATGCCCAAGGCCAGAATGA
 CGGGAACACAGGAAATCAGGGGAAACATGAGTGACCCAACCCTGTGATCTC
 AGCCCCGGTGAACCCAGACTTAGCTGCGATCCCCCCCCAAGCCAGCAATGAC
 CCGTGTCTCGCTACAGAGACCCTCCCGCTCTAGGTTCTGACCCAGGTTGTCT
 TCCTGACCCTGACCCACAGTGAGCCCTAGGCCTGGAGCACGTGGACACCC
 CTGTGACCATC (SEC ID N° 20)

Cds predicha de hT1R3 (SEC ID N° 3)

ATGCTGGGCCCTGCTGTCTCCTGGGCCTCAGCCTCTGGGCTCTCCTGCACCCT
 GGGACGGGGGCCCCATTGTGCCTGTCACAGCAACTTAGGATGAAGGGGGAC
 TACGTGCTGGGGGGGCTGTTCCCCCTGGGCGAGGCCGAGGAGGCTGGCCT
 CCGCAGCCGGACACGGCCCAGCAGCCCTGTGTGCACCAGGTTCTCCTCAA
 CGGCCTGCTCTGGGCACTGGCCATGAAAATGGCCGTGGAGGAGATCAACAA
 CAAGTCGGATCTGCTGCCCCGGGCTGCGCCTGGGCTACGACCTCTTTGATAC
 GTGCTCGGAGCCTGTGGTGGCCATGAAGCCAGCCTCATGTTCTCCTGGCCAA
 GGCAGGCAGCCGCGACATCGCCGCCTACTGCAACTACACGCAGTACCAGCC
 CCGTGTGCTGGCTGTCTATCGGGCCCCACTCGTCAGAGCTCGCCATGGTCAC
 CGGCAAGTTCTTCAGCTTCTTCCTCATGCCCCAGGTCAGCTACGGGTGCTAGC
 ATGGAGCTGCTGAGCGCCCCGGGAGACCTTCCCCTCCTTCTTCCGCACCGTG
 CCCAGCGACCGTGTGCAGCTGACGGCCGCCGCGGAGCTGCTGCAGGAGTT
 CGGCTGGAAGTGGGTGGCCGCCCTGGGCAGCGACGACGAGTACGGCCGGC
 AGGGCCTGAGCATCTTCTCGGCCCTGGCCGCGGCACGCGGCATCTGCATCG
 CGCACGAGGGCCTGGTGGCGCTGCCCCGTGCCGATGACTCGCGGCTGGGG
 AAGGTGCAGGACGTCCTGCACCAGGTGAACCAGAGCAGCGTGCAGGTGGTG
 CTGCTGTTGCGCTCCGTGCACGCCGCCACGCCCTCTTCAACTACAGCATCA
 GCAGCAGGCTCTCGCCCAAGGTGTGGGTGGCCAGCGAGGCCTGGCTGACC

TCTGACCTGGTCATGGGGCTGCCCCGGCATGGCCCAGATGGGACAGGTGCTT
GGCTTCCTCCAGAGGGGTGCCCAGCTGCACGAGTTCCCCCAGTACGTGAAG
ACGCACCTGGCCCTGGCCACCGACCCGGCCTTCTGCTCTGCCCTGGGCGAG
AGGGAGCAGGGTCTGGAGGAGGACGTGGTGGGCCAGCGCTGCCCGCAGTG
TGA CTGCATCACGCTGCAGAACGTGAGCGCAGGGCTAAATCACCACCAGAC
GTTCTCTGTCTACGCAGCTGTGTATAGCGTGGCCCAGGCCCTGCACAACACT
CTTCAGTGCAACGCCTCAGGCTGCCCCGCGCAGGACCCCGTGAAGCCCTGG
CAGCTCCTGGAGAACATGTACAACCTGACCTTCCACGTGGGCGGGCTGCCG
CTGCGGTTTCGACAGCAGCGGAAACGTGGACATGGAGTACGACCTGAAGCTG
TGGGTGTGGCAGGGCTCAGTGCCCAGGCTCCACGACGTGGGCAGGTTCAAC
GGCAGCCTCAGGACAGAGCGCCTGAAGATCCGCTGGCACACGTCTGACAAC
CAGAAGCCCGTGTCCCGGTGCTCGCGGCAGTGCCAGGAGGGGCCAGGTGCG
CCGGGTCAAGGGGTTCCACTCCTGCTGCTACGACTGTGTGGACTGCGAGGC
GGGCAGCTACCGGCAAAACCCAGACGACATCGCCTGCACCTTTTGTGGCCA
GGATGAGTGGTCCCCGGAGCGAAGCACACGCTGCTTCCGCCGCAGGTCTCG
GTTCTGCGCATGGGGCGAGCCGGCTGTGCTGCTGCTGCTCCTGCTGCTGAG
CCTGGCGCTGGGCCTTGTGCTGGCTGCTTTGGGGCTGTTCGTTACCATCG
GGACAGCCCACTGGTTCAGGCCTCGGGGGGGCCCTGGCCTGCTTTGGCC
TGGTGTGCCTGGGCCTGGTCTGCCTCAGCGTCCTCCTGTTCCCTGGCCAGC
CCAGCCCTGCCCGATGCCTGGCCCAGCAGCCCTTGTCCACCTCCCGCTCA
CGGGCTGCCTGAGCACACTCTTCCTGCAGGCGGCCGAGATCTTCGTGGAGT
CAGAACTGCCTCTGAGCTGGGCAGACCGGCTGAGTGGCTGCCTGCGGGGG
CCCTGGGCCTGGCTGGTGGTGTGCTGCTGGCCATGCTGGTGGAGGTGCGACT
GTGCACCTGGTACCTGGTGGCCTTCCCGCCGGAGGTGGTGACGGACTGGCA
CATGCTGCCCACGGAGGCGCTGGTGCACCTGCCGCACACGCTCCTGGGTGAG
CTTCGGCCTAGCGCACGCCACCAATGCCACGCTGGCCTTTCTCTGCTTCCTG
GGCACTTTCTGCTGGTGCAGGAGCCAGCCGGGCTGCTACAACCGTGCCCGTGGC
CTCACCTTTGCCATGCTGGCCTACTTCATCACCTGGGTCTCCTTTGTGCCCC
TCCTGGCCAATGTGCAGGTGGTCCTCAGGCCCGCCGTGCAGATGGGCGCCC
TCCTGCTCTGTGTCTGCGCATCCTGGCTGCCTTCCACCTGCCAGGTGTTA
CCTGCTCATGCGGCAGCCAGGGCTCAACACCCCCGAGTTCTTCCTGGGAGG
GGGCCCTGGGGATGCCCAAGGCCAGAATGACGGGAACACAGGAAATCAGG
GGAAACATGAGTGA (SEC ID N°: 3)

Traducción conceptual de hT1R3 (SEC ID N° 4)

MLGPAVLGLSLWALLHPGTGAPLCLSQQLRMKGDYVLGGFLPLGEAEEAGLR
 RTRPSSPVCTRFSSNGLLWALAMKMAVEEINNKS DLLPGLRLGYDLFDTCSEPV
 VAMKPSLMFLAKAGSRDIAAYCNYTQYQPRVLAVIGPHSSELAMVTGKFFSFFLM
 PQVSYGASMELLSARETFPSFFRTVPSDRVQLTAAEELLQEF GWNWVAALGSD
 DEYGRQGLSIFSALAAARGICIAHEGLVPLPRADDSRLGKVQDVLHQVNQSSVQ
 VVLLFASVHAHAHALFNYSISSRLSPKVWVASEAWLTSDLVMGLPGMAQMGTVLG
 FLQGAQLHEFPQYVKTHLALATDPAFCSALGEREQGLEEDVVGQRCPQCDCIT
 LQNVSAGLNHHQTFSVYAAVYSVAQALHNTLQCNASGCPAQDPVKPWQLLENM
 YNLTFHVGGPLPRFDSSGNVDM EYDLKLWVWQGSVPRLHDVGRFNGLRTERL
 KIRWHTSDNQKPVSRC SRQCQEGQVRRVKGFHSCCYDCVDCEAGSYRQNPDD
 IACTFCGQDEWSPERSTRCFRRRSRFLAWGEPVLLLLLLLLSLALGLVLAALGLF
 VHHRDSPLVQASGGPLACFGLVCLGLVCLSVLLFPGQPSPARCLAQQPLSHLPL
 TGCLSTLFLQAAEIFVESELPLSWADRLSGCLRGPWAWLVVLLAMLVEVALCTW
 YLVAFPPEVVTDWHMLPTEALVHCRTRSWVSFGLAHATNATLAFLCFLGTFLVR
 SQPGCYNRARGLT FAMLAYFITWVSFVPLL ANVQVVL RPAVQMGA LLLCVLGILA
 AFHLPRCYLLMRQPGLNTPEFFLGGGPGDAQGQNDGNTGNQ GKHE (SEC ID
 N°: 4)

EJEMPLO 2 - rT1R3 y mT1R3

- 5 Se aislaron segmentos de los genes de T1R3 de rata y de ratón mediante amplificación por PCR de ADN genómico usando cebadores degenerados basados en la secuencia del T1R3 humano. Los cebadores degenerados SAP077 (5'-CGNTTYTNGCNTGGGGNGARCC-3'; SEC ID N° 5) y SAP079 (5'-CGNGCNCGRTRTARCANCCNGG-3'; SEC ID N° 6) son complementarios a los restos del T1R3 humano RFLAWGEP (que se corresponden con la SEC ID N° 7) y PGCYNRAR (que se corresponden con la SEC ID N° 8), respectivamente. Los productos de PCR se clonaron y secuenciaron. El plásmido SAV115 lleva un segmento clonado del gen de T1R3 de ratón y el SAV118 lleva un segmento de gen de rata. Estas secuencias, que se muestran a continuación, representan claramente los homólogos de roedores del T1R3 humano, puesto que el segmento de ratón tiene una identidad del 74% con el segmento correspondiente del T1R3 humano, y el segmento de rata tiene una identidad del 80% con el segmento correspondiente del T1R3 humano. Los segmentos de ratón y de rata tienen una identidad del 88%. Ninguna otra secuencia de la base de datos tiene una identidad superior al 40% con estos segmentos de T1R3.

Segmento de T1R3 de ratón de SAV115 en orientación con sentido (secuencia que se corresponde con el cebador degenerado eliminado) (SEC ID N° 9)

5

GTGCTGTCACTCCTCCTGCTGCTTTGCCTGGTGCTGGGTCTAGCACTGGCTG
CTCTGGGGCTCTCTGTCCACCACTGGGACAGCCCTCTTGTCCAGGCCTCAG
GCGGCTCACAGTTCTGCTTTGGCCTGATCTGCCTAGGCCTCTTCTGCCTCAG
TGTCTTCTGTTCCCAGGACGGCCAAGCTCTGCCAGCTGCCTTGACAACAA
CCAATGGCTCACCTCCCTCTCACAGGCTGCCTGAGCACACTCTTCCTGCAAG
CAGCTGAGACCTTTGTGGAGTCTGAGCTGCCACTGAGCTGGGCAAACCTGGC
TATGCAGCTACCTTCGGGACTCTGGCCTGCTAGTGGTACTGTTGGCCACTTT
TGTGGAGGCAGCACTATGTGCCTGGTATTTGACCGCTTCACCAGAAGTGGTG
ACAGACTGGTCAGTGCTGCCCACAGAGGTACTGGAGCACTGCCACGTGCGT
TCCTGGGTCAACCTGGGCTTGGTGACATCACCATGCAATGGTAGCTTTTC
TCTGCTTTCTGGGCACTTTCCTGGTACAAGACCAG (SEC ID N°: 9)

Segmento de mT1R3, traducción conceptual (SEC ID N° 10)

10

VLSELLLLCLVLGLALAALGLSVHHWDSPLVQASGGSQFCFGLICLGLFCLSVLLF
PGRPSSASCLAQQPMAHLPLTGCLSTLFLQAAETFESELPISWANWLCSYLRD
SGLLVLLATFVEAALCAWYLTASPEVVDWSVLPTEVLEHCHVRSWVNLGLVH
ITNAMVAFLCFLGTFLVQDQ (SEC ID N°: 10)

Segmento de T1R3 de rata de SAV118 en orientación con sentido (secuencia que se corresponde con el cebador degenerado eliminado) (SEC ID N° 11)

15

GTGCTGTCACTTCTCCTGCTGCTTTGCCTGGTGCTGGGCCTGACACTGGCTG
CCCTGGGGCTCTTTGTCCACTACTGGGACAGCCCTCTTGTTCAAGGCCTCAGG
TGGGTCACTGTTCTGCTTTGGCCTGATCTGCCTAGGCCTCTTCTGCCTCAGT
GTCCTTCTGTTCCCAGGACGACCACGCTCTGCCAGCTGCCTTGCCCAACAAC
CAATGGCTCACCTCCCTCTCACAGGCTGCCTGAGCACACTCTTCCTGCAAGC
AGCCGAGATCTTTGTGGAGTCTGAGCTGCCACTGAGTTGGGCAAACCTGGCT
CTGCAGCTACCTTCGGGGCCCCTGGGCTTGGCTGGTGGTACTGCTGGCCAC
TCTTGTGGAGGCTGCACTATGTGCCTGGTACTTGATGGCTTTCCCTCCAGAG
GTGGTGACAGATTGGCAGGTGCTGCCCACGGAGGTACTGGAACACTGCCGC
ATGCGTTCCTGGGTGAGCCTGGGCTTGGTGACATCACCATGCAGGGGTA
GCTTTCCTCTGCTTTCTGGGCACTTTCCTGGTACAAAGCCAG (SEC ID N°: 11)

Segmento de rT1R3, traducción conceptual (SEC ID Nº 12)

VLSLLLLLCLVLGLTLAALGLFVHYWDSPLVQASGGSLFCFGLICLGLFCLSVLLFP
 GRPRSASCLAQQPMAHLPLTGCLSTLFLQAAEIFVESELPLSWANWLC SYLRGP
 WAWLVLLATLVEAALCAWYLMFAFPPEVVTDWQVLPTEVLEHCRMRSWVSLGL
 VHITNAGVAFLCFLGTFLVQSQ (SEC ID Nº: 12)

EJEMPLO 3 - Clonación de rT1R3

5 Los fragmentos de mT1R3 y rT1R3 identificados anteriormente como SEC ID Nº 9 y 11 se usaron para explorar una biblioteca de ADNc procedente de tejido gustativo de rata. Se secuenció un clon positivo y se descubrió que contenía la secuencia de rT1R3 de longitud completa, que se presenta a continuación como SEC ID Nº 13. La comparación de secuencias con las secuencias parciales de mT1R3 y rT1R3 y con la secuencia de hT1R3 de longitud completa estableció que este ADNc representa el homólogo de rata para hT1R3. Por ejemplo, la identidad de aminoácidos de dos en dos entre rT1R3 y hT1R3 es de aproximadamente el 72%, mientras que la secuencia anotada más relacionada en los bancos de datos de secuencias de ADN públicos tiene una identidad de solo aproximadamente el 33% con rT1R3.

15 Cds predicha de rT1R3 (SEC ID Nº 13)

ATGCCGGGTTTGGCTATCTTGGGCCTCAGTCTGGCTGCTTTCCTGGAGCTTG
 GGATGGGGTCCTCTTTGTGTCTGTCACAGCAATTCAAGGCACAAGGGGACTA
 TATATTGGGTGGACTATTTCCCTGGGCACAAGTGAAGGAGGCCACTCTCAAC
 CAGAGAACACAGCCCAACGGCATCCTATGTACCAGGTTCTCGCCCCTTGGTT
 TGTTCTGGCCATGGCTATGAAGATGGCTGTAGAGGAGATCAACAATGGATC
 TGCCTTGCTCCCTGGGCTGCGACTGGGCTATGACCTGTTTGACACATGCTCA
 GAGCCAGTGGTCACCATGAAGCCCAGCCTCATGTTTCATGGCCAAGGTGGGA
 AGTCAAAGCATTGCTGCCTACTGCAACTACACACAGTACCAACCCCGTGTGC
 TGGCTGTCATTGGTCCCCACTCATCAGAGCTTGCCCTCATTACAGGCAAGTT
 CTTGAGCTTCTTCCTCATGCCACAGGTCAGCTATAGTGCCAGCATGGATCGG
 CTAAGTGACCGGGAAACATTTCCATCCTTCTTCCGCACAGTGCCCAAGTGACC
 GGGTGACAGCTGCAGGCCGTTGTGACACTGTTGCAGAATTTGAGCTGGAAGT
 GGGTGGCTGCCTTAGGTAGTGATGATGACTATGGCCGGGAAGGTCTGAGCA
 TCTTTTCTGGTCTGGCCAAGTACAGAGGTATCTGCATTGCACACGAGGGCCT
 GGTGCCACAACATGACACTAGTGGCCAACAATTGGGCAAGGTGGTGGATGT
 GCTACGCCAAGTGAACCAAAGCAAAGTACAGGTGGTGGTGGTGTGTTGTCATCT
 GCCCGTGCTGTCTACTCCCTTTTGTAGCTACAGCATCCTTCATGACCTCTCACC

CAAGGTATGGGTGGCCAGTGAGTCCTGGCTGACCTCTGACCTGGTCATGAC
ACTTCCCAATATTGCCCGTGTGGGCACTGTTCTTGGGTTTCTGCAGCGCGGT
GCCCTACTGCCTGAATTTTCCCATTTATGTGGAGACTCGCCTTGCCCTAGCTG
CTGACCCAACATTCTGTGCCTCCCTGAAAGCTGAGTTGGATCTGGAGGAGCG
CGTGATGGGGCCACGCTGTTCACAATGTGACTACATCATGCTACAGAACCTG
TCATCTGGGCTGATGCAGAACCTATCAGCTGGGCAGTTGCACCACCAAATAT
TTGCAACCTATGCAGCTGTGTACAGTGTGGCTCAGGCCCTTCACAACACCCT
GCAGTGCAATGTCTCACATTGCCACACATCAGAGCCTGTTCAACCCTGGCAG
CTCCTGGAGAACATGTACAATATGAGTTTCCGTGCTCGAGACTTGACACTGC
AGTTTGATGCCAAAGGGAGTGTAGACATGGAATATGACCTGAAGATGTGGGT
GTGGCAGAGCCCTACACCTGTACTACATACTGTAGGCACCTTCAACGGCACC
CTTCAGCTGCAGCACTCGAAAATGTATTGGCCAGGCAACCAGGTGCCAGTCT
CCCAGTGCTCCCGGCAGTGCAAAGATGGCCAGGTGCGCAGAGTAAAGGGCT
TTCATTCCCTGCTGCTATGACTGTGTGGACTGCAAGGCAGGGAGCTACCGGAA
GCATCCAGATGACTTCACCTGTACTCCATGTGGCAAGGATCAGTGGTCCCCA
GAAAAAAGCACAACTGCTTACCTCGCAGGCCCAAGTTTCTGGCTTGGGGG
GAGCCAGCTGTGCTGTCACTTCTCCTGCTGCTTTGCCTGGTGCTGGGCCTGA
CACTGGCTGCCCTGGGGCTCTTTGTCCACTACTGGGACAGCCCTCTTGTTCA
GGCCTCAGGTGGGTCACTGTTCTGCTTTGGCCTGATCTGCCTAGGCCTCTTC
TGCTCAGTGTCCTTCTGTTCCAGGACGACCACGCTCTGCCAGCTGCCTTG
CCCAACAACCAATGGCTCACCTCCCTCTCACAGGCTGCCTGAGCACACTCTT
CCTGCAAGCAGCCGAGATCTTTGTGGAGTCTGAGCTGCCACTGAGTTGGGC
AACTGGCTCTGCAGCTACCTTCGGGGCCCCCTGGGCTTGGCTGGTGGTACT
GCTGGCCACTCTTGTTGGAGGCTGCACTATGTGCCTGGTACTTGATGGCTTTC
CCTCCAGAGGTGGTGACAGATTGGCAGGTGCTGCCACGGAGGTACTGGAA
CACTGCCGCATGCGTTCCTGGGTGAGCCTGGGCTTGGTGACATCACCAAT
GCAGTGTTAGCTTTCCTCTGCTTTCTGGGCACTTTCCTGGTACAGAGCCAGC
CTGGTCGCTATAACCGTGCCCGTGGCCTCACCTTCGCCATGCTAGCTTATTT
CATCATCTGGGTCTCTTTTGTGCCCTCCTGGCTAATGTGCAGGTGGCCTAC
CAGCCAGCTGTGCAGATGGGTGCTATCTTATTCTGTGCCCTGGGCATCCTGG
CCACCTTCCACCTGCCCAAATGCTATGTACTTCTGTGGCTGCCAGAGCTCAA
CACCCAGGAGTTCTTCTGGGAAGGAGCCCCAAGGAAGCATCAGATGGGAA
TAGTGGTAGTAGTGAGGCAACTCGGGGACACAGTGAATGA (SEC ID N°: 13)

Traducción conceptual de rT1R3 (SEC ID N° 14)

MPGLAILGLSLAAFLELGMGSSCLSSQQFKAQGDYILGGLFPLGTTEEATLNQRT
 QPNGILCTRFSPGLFLAMAMKMAVEEINNGSALLPGLRLGYDLFDTCSEPVVMT
 KPSLMFMAKVGSQSIAAYCNYTQYQPRVLAVIGPHSSELALITGKFFSFFLMPQV
 SYSASMDRLSDRETFFSFFRTVPSDRVQLQAVVTLQNFSWNWVAALGSDDDY
 GREGLSIFSGLANSRGICIAHEGLVPQHDTSGQQQLGKVVDVLRQVNQSKVQVW
 LFASARAVYSLFSYSILHDLSPKVWVASESWLTSDLVMTLPNIARVGTVLGFLQR
 GALLPEFSHYVETRLAALADPTFCASLKAELDLEERVMGPRCSQCDYIMLQNLSS
 GLMQNLSAGQLHHQIFATYAAVYSVAQALHNTLQCNVSHCHTSEPVQPWQLLE
 NMYNMSFRARDLTQLQFDAQGSVDMEYDLKMWWVQSPTPVLHTVGTENGTLQL
 QHSMYWPNGNQVPVSQCSRQCKDGQVRRVKGFHSCCYDCVDCKAGSYRKHP
 DDFTCTPCGKDQWSPEKSTTCLPRRPKFLAWGEPAVLSLLLLLCLVLGLTLAAL
 GLFVHYWDSPLVQASGGSFLFCGLICLGLFCLSVLLFPGRPRSASCLAQQPMAH
 LPLTGCLSTLFLQAAEIFVESELPLSWANWLCSYLRGPWAWLVLLATLVEAALC
 AWYLMAFPPEVVTDWQVLPTEVLEHCRMRSWVSLGLVHITNAVLAFLCFLGTFL
 VQSQPGRYNRARGLTFFAMLAYFIIWVSFVPLLANVQVAYQPAVQMGAIFCALGI
 LATFHLPKCYVLLWLPELNTQEFFLGRSPKEASDGNSGSSEATRGRHSE (SEC ID
 N°: 14)

EJEMPLO 4 - Expresión de mT1R3

- 5 El fragmento de T1R3 de ratón descrito anteriormente contenido en SAV115 se amplificó por PCR usando cebadores directo M13 e inverso M13 y después se purificó en gel. El molde de ADN de T1R3 se colocó en una reacción de marcaje de transcripción *in vitro* donde se incorporaba UTP marcado con digoxigenina en una sonda de ARNc antisentido. Esta sonda se hibridó con tejido gustativo de ratón adulto que contenía papilas circunvaladas. La
- 10 hibridación *in situ* y la detección de T1R3 se realizaron siguiendo el protocolo de Schaeren-wiemers y col., Histochemistry, 100: 431-400 (1993). En resumen, se seccionó lengua de ratón congelada fresca a 14 µm y se preparó para la hibridación. Se hibridaron 200 ng/ml de la sonda antisentido de T1R3 con digoxigenina durante 14 horas a 72°C. La etapa posterior a la hibridación consistía en un lavado con SSC 0,2x a 72°C. La detección de digoxigenina se logró por incubación con una dilución 1:5000 de anticuerpo anti-DIG con fosfatasa alcalina seguido
- 15 de una reacción de 12 horas de la fosfatasa en NBT/BCIP.

EJEMPLO 5 - hT1R1

- 20 El ortólogo humano (n° de acceso de la base de datos AL159177) de un receptor gustativo de rata, denominado rT1R1, se proporciona a continuación como SEC ID N°:15. La cds predicha se indica en negrita y algunos intervalos de secuencia de intrones se señalan como series de N. Las secuencias de nucleótidos y conceptualmente traducida de hT1R1 también se describen en la presente memoria como SEC ID N° 16 y 17, respectivamente.

ADN genómico de hT1R1 (SEC ID N° 15)

GAGAATCTCGCGAGATCCCGTCGGTCCGCCCCGCTGCCCTCCCAGCTGCCG
AAAAGAGGGGCTCCGAGCCGCCGGCGCCCTCTGCCGGCAACCTCCGGAA
GCACACTAGGAGGTTCCAGCCGATCTGGTCGAGGGGCTCCACGGAGGACTC
CATTTACGTTACGCAAATTCCCTACCCCAGCCGGCCGGAGAGAGAAAGCCAG
AAACCTCGCGACCAGCCATGGGCCACCTCTCCGGAAAAACACCGGGATATTT
TTTTTCTCCTGCAGAAAAAGCTTTAGGATTGGCAGTTTAAACAAAACATGTCT
ATTTGCATACCTTCGGTTTGCATGCATTTGTTTCGAAGTGAGCAACCCTGGGT
AACAAAGGCGAAAGTATATGACAATTTGCTCAGAATCTTAATGTCAGAAAAGTG
GAGACTGGGGCAGGGGGGTGTCGACTCAAAGCTGTGTCTCATTTAGTAAACT
GAGGCCCAGGTAAAAAGTTCTGAAACCTCGCAACACCCGGAGAAATTGTGT
CCAGCCTCCACCTCGCCCCAAAATGCCAGAGCTCCTTTTCTAAGCCAGGTG
AAGTCACAGAGCGTGGACAGAACCCACAACCGTCCAGAGGAAGGGTCACTG
GGTGCCACCTGGTTTGCATCTGTGCCTTCGTCTGCCAGTTCCTGAGTGGG
ACCGCAGGCCCCGGAATGTCAAGGCAAACAGTCCTGCTTCAGCCACTGGGCT
CCAGTCCCACCCCTTTTGGGGGCCTGAAGTTAGGAAGCATCCGGCAGCTGC
CTTCTATTTAAGCAACTGGCCTCCTTAGAGGCCACTCCTTGGCCATGCCAGG
CGCGGGCATCTGGCCAGCATGCTGCTCTGCACGGCTCGCCTGGTCCGGCCTG
CAGCTTCTCATTTCTGCTGCTGGGCCTTTGCCTGCCATAGCACGGAGTCTT
CTCCTGACTTCACCCTCCCCGGAGATTACCTCCTGGCAGGCCTGTTCCCTCT
CCATTCTGGCTGTCTGCAGGTGAGGCACAGACCCGAGGTGACCCTGTGTGA
CAGGTGAGTGAGGGGCCAGCAGAGCCACACTTAGTGGGACCCCTGGCTATA
GGGCCCCCTCTGGCTGCCATCCTCCAAACAGGACCTTGCCTCTGCCTTTGCCC
CTTGAAGTGTCCCCAGGCCTTGTTTCATCAATCCACTTGCCACCTAAGTGCTG
GCTAGACCTTCCTAGACACTTCGGCCAGTTTCCAATTATTTACCCTTGCTGT
TAGAATGTNN

NNNNNNNAATTCCTTAAACTAAATTTCTCACTTTCTCTCTCTCTCTGAAAACA
 CTGACTAATGTAGCAGGTTTCTCTGCTCCAGGACTTCAGGACCTTTTCGATG
 CTAATAAGTTTCTCCATCAGGGCCAGCTTGTTCTCCTACTGAGCTTGAGAG
 CCCTTGTTGAAGTTGTGGTTTGGGGGACTGGACCGATGACCTCAAAGGTTCC
 CTTTGCTCCCAAGCCTCAGAGTCTAGGAGGCCAGAGGGTCTCAGCAGGCCT
 TTGTCCTTCTCAGCTGTCTCTTACTGGCTTTCTCCACAGGTCTTGAGCTTCA
 ATGAGCATGGCTACCACCTCTTCCAGGCTATGCGGCTTGGGGTTGAGGAGA
 TAAACAACCTCCACGGGCCCTGCTGCCCAACATCACCTGGGGTACCAGCTGT
 ATGATGTGTGTTCTGACTCTGCCAATGTGTATGCCACGCTGAGAGTGCTCTC
 CCTGCCAGGGCAACACCACATAGAGCTCCAAGGAGACCTTCTCCACTATTCC
 CCTACGGTGCTGGCAGTGATTGGGCCTGACAGCACCAACCGTGCTGCCACC
 ACAGCCGCCCTGCTGAGCCCTTTCTGGTGCCCATGGTAAGCTGGAGCCTC
 AGACCTTTGCCCATCTCCCTTCAGGCAAGTCTGGGNNNNNNNNNNNNNNNN
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGCCACCATGCCCGGCTA
 ATTTTTTTGTATTTTTAGTAGAGACGGGGTTTCACCGTGTTAGCCAGGCTGGT
 CGCAAACCTCCTAACCTCGTGATCCACCCACCTCGGCCTCCCAATGTGCTGGG
 ATTACAGGTGTGAGCCACTGCACCCGGCCATAATGTATTAATAATAAAATA
 ATTATACAACCTACCATAATGTAGAATCAGTGGGAGCCCTGAGCTTGTTTTCC
 TACAACCTAGATGGTCCCATCTGGGGGTGATGGGAGACAGTGACAGATCATCA
 GACATTAGATTCTCATAAGTAGCGTGCAACCCAGATCCCTCGCATGTGCAGT
 TCACAGTAGGGTTCAAGCTCCTACAAGAATCTGATGCTGCTGCTGATCTGAC
 AGGAGGGGAGCAGCTGTAAATACAGATGAAGCTTCGCTTACTCACCAGCTGC
 TCACCTCCTCCTGTGAGGCCCGGTTCTAACAGGCCACTGACCTAACTTCTG
 CCCTGACCTACACATGCTTCTCTTCTTCTTCTTCAAACCTGCCTCCAGTGGAAGT
 CCCTGAAGGTCCCCAAACACACGGGACTATTTCACTCCTATGCAGGTTTTGT
 CTCCTTTGCTTGGAATGCATCCCCTCACCCCTTGTCGCCAGGCAGATTCCCA
 CCCCTCCCCCAGAACCTGCCCCAGTGAGCCTTCGCAGGTGATTTGTCAGTT
 TCACAGGCTGAGGGGTGCTCTCCTGGTCTCCCCGGCTCCCTGTATCCCCAC
 ACCCAGCACAGGGCCAGGCACTGGGGGGGCCTTCAGTGAGACTGAAATG
 GCTGAACGGGACCTCCCATAGATTAGCTATGCGGCCAGCAGCGAGACGCTC
 AGCGTGAAGCGGCAGTATCCCTCTTTCCTGCGCACCATCCCCAATGACAAGT
 ACCAGGTGGAGACCATGGTGCTGCTGCTGCAGAAGTTCGGGTGGACCTGGA
 TCTCTCTGGTTGGCAGCAGTGACGACTATGGGCAGCTAGGGGTGCAGGCAC

TGGAGAACCAGGCCACTGGTCAGGGGATCTGCATTGCTTTCAAGGACATCAT
GCCCTTCTCTGCCCAGGTGGGCGATGAGAGGATGCAGTGCCTCATGCGCCA
CCTGGCCCAGGCCGGGGCCACCGTCGTGGTTGTTTTTCCAGCCGGCAGTT
GGCCAGGGTGTTTTTCGAGTCCGTGGTGCTGACCAACCTGACTGGCAAGGT
GTGGGTGCGCTCAGAAGCCTGGGCCCCTCTCCAGGCACATCACTGGGGTGCC
CGGGATCCAGCGCATTGGGATGGTGCTGGGCGTGGCCATCCAGAAGAGGG
CTGTCCCTGGCCTGAAGGCGTTTGAAGAAGCCTATGCCCGGGCAGACAAGA
AGGCCCCTAGGCCTTGCCACAAGGGCTCCTGGTGACAGCAATCAGCTCT
GCAGAGAATGCCAAGCTTTCATGGCACACACGATGCCCAAGCTCAAAGCCTT
CTCCATGAGTTCTGCCTACAACGCATACCGGGCTGTGTATGCGGTGGCCCAT
GGCCTCCACCAGCTCCTGGGCTGTGCCTCTGGAGCTTGTTCCAGGGGGCCGA
GTCTACCCCTGGCAGGTAAGAGAGCCCACCCAGCACCTCCTGTCAGGGAG
AACAGCCAATCCTGAGATGAGCAGAGTGGGCACTCTCCGGTCACTCTAAATG
CCAAGGGGGATAAATGCCACTAACTTGAGGTTTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGT
TTTTTGAGACAGTCTGGCTCTGTCACCCAGGCTGCAGTGTAGTGATGCGATC
TCGGCTCTCTGCAACTTCCACCTCCTGGGTTCAAGTGATTCTCTTGCCTCGG
CCTCCTGAGTAGCTGGGATTACAGGCACCCACCACCATGCCTGGATAATTTT
TCTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTGAGATAGAGTCTCGCTCTGTTGCCCAGGCTGGA
ATGCAGTGGTGCGATCTTGGCTCACTGTGAGCTCCGCCTCCCAGGTTCATC
CATTCCCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGGTGGGACTACGGGCGCCCGCCAC
CACGCCCAGCTAATTTTTTTTTGTATTTTGTAGTAGAGACGGGGTTTCACCATGT
TAGCCAGGATGGTCTCAATCTCCTGACCTTGTCATCCGCCCACCTCGTCCTC
CCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCGCACCCGGCCTAATTTTTGT
ATTTTGTAGTAGAGATGGGGTTTCACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTC
CTGGCATCAAGTGATCCTCCTGCTTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAG
GCATTAGCTCTCTTCTCTTAGACAGATCTTCTCTCTGATCCTTGCCTTCTCTC
ACCCACTGTGTCTTGGAAGTGTCAAGTGATAAGATCCAGGGCTAAAAGTGTG
TGTAAGGAGTGTTTGTAGAGGCCTCCTCTCAGGAGGTTGGTGGGGAAGAT
TGAGGGGCTTCCTAAGAAGGAAGGGACGAGACCTTCCTGATGGGCTGAAAC
CACCAGGACGGAAACCCAGGAAGGCCCCAGGCCCTTGCTTCTGGGACCATG
TGGGTCTGTGCTGTCTGTGGTGGCTTCATGATACGCGTTTCTTTCAGCTTTTG
GAGCAGATCCACAAGGTGCATTTCTTCTACACAAGGACACTGTGGCGTTTA
ATGACAACAGAGATCCCCTCAGTAGCTATAACATAATTGCCTGGGACTGGAA

TGGACCCAAGTGGACCTTCACGGTCCTCGGTTCCCTCCACATGGTCTCCAGTT
 CAGCTAAACATAAATGAGACCAAAATCCAGTGGCACGGAAAGGACAACCAG
 GTAATGGGGATGTGGCTACTCACCATGTAAGTGGCTTATGGGCAACCTAGAG
 CCTGGGGGTGATGCTGACACAGTGTACAGGGAGCAGGAGGGGGGGCCCCAG
 GGGTCCAGCTGCCACCACTCTACCCATCCTGGCCAGGGAAGCAGGGAAGAC
 ACTCCGTAGGCGAGTGTGCAGATGCCCTGGGGCGGAAGTTCACACGACCAG
 GGGCCCTGCCCTGGGAGTGAGCCCTGAGGGCAGATGCACAGAGATTCTGTT
 TTCTGTTCCACATGTGAGCTGTCCCTTGACTTGGGCCCCCTACGTGTGGCCCC
 TCTGGCTTCTTACAGGTGCCTAAGTCTGTGTGTTCCAGCGACTGTCTTGAAG
 GGCACCAGCGAGTGGTTACGGGTTTCCATCACTGCTGCTTTGAGTGTGTGCC
 CTGTGGGGCTGGGACCTTCCTCAACAAGAGTGGTGAGTGGGCAATGGAGCA
 GGCGAGCTACCCAGCACTCCCGGGGGCTGCACGGTGGAGGGAGGGCCTCC
 CTTGGGCCCCATGTGCCCTGCCCCAGAACCAAGGCCCAGTCACTGGGCTGC
 CAGTTAGCTTCAGGTTGGAGGACACCTGCTACCAGACAGAATTCTGATCAAG
 AGAATCAGCCACTGGGTGCGGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTTGG
 GAGGCTGAGGCGGGTGGATCACTTGAGGTCGGGAGTTCGAGACCAGCCTG
 GCCAACATGGTGAAACCCCATCTCTACCAAAAATATAAAAAATTAGCTGGGTG
 TGGTGGCGCGTGCCTGTAATCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAA
 TCACTTGAACCCAGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCCAAGATGCATTCCAGC
 CTGGACCACAAAGCGAGAATTCTGTCCTCCCCCAAAAAAGAAAGGAGGCCGGG
 CGCGGTGGCTCACACCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGTGGGTG
 GATCACCTGAGGTCAGGAGTTCGAGACCAGCCTGACCAACATGGTGAAACC
 CCATCTCTACTAAAAATACAAAAAAGTTAGCCGGGCGTGTGTGGCGTGTGCC
 TGTAATTCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAACCCGG
 GAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCCAAGATTGCACCATTGCACTCCAGCCTGGG
 CGACAAGAGAAAACTCTGTCTCAAAAAAAGAAAGAAAGAAAGAAATTAGCC
 AACTGAAAGCCTTAGACTGAGGTGTGTCCTCTGTTAGAGAGCTGTCATCACA
 ACTCCTACAAAAGCAGTCGTATCCTGAATTCAACCTCTTTCTCTAAATGAATAT
 AGCTATTGTTCCCTTTGTGCCCTCTTGTCCTACTGTCCCTTCTGTTGCCCATG
 CCAAAGACAGCTAGCTCCTTGAACAGCTTGGCCTGAATACAGATACTAGCGT
 GTCTGCAGCAGAGAAAAAACAGCATTCCCCATCCAGAAATGCAAGGTCAAG
 AACAGAGAGCAAATTAGGTAGCTAAGGACTCAGGTCCTTAGTTGGTGTCCAG
 GGGCCACATTCTTTCTTTTCAACATCTCTGTAGGGACAGGAATACTTCCCTTC

TGTCCTCAGAGGGTCAGGACTCAGAGAAACCACAGAGCAGCAGCTCAGGAA
AGTGGTTCATGGAAATGCTGGCAAGAGAGAGGGGTTACAATGCCCTCCCTTG
GGAGCAGGCTGCTCCCATCAGATCGTAACCTCTCTGGTATGTGGGCAGAGC
TACCAGGTTAAGGTCCTCCCTAGGGTTTGCAAACCCTCATGGGATCATGAG
CCATACAGAACCGACCTGTGTGTCTCCAGAGTCTGTAATTAACACAGGCATTT
TGAGGAAATGCGTGGCCTCAGGCCCACTCCCGGCTACCCCATCCCACTA
TGCCTAGTATAGTCTAGCTGCCCTGGTACAATTCTCCAGTATCTTGACAGGC
CCCTATTTCTTATTCCTACTCTGCTCATCTGGCTCTCAGGAACCTTCTTG GCC
TTCCCTTTCAGACCTCTACAGATGCCAGCCTTGTTGGGAAAGAAGAGTGGGCA
CCTGAGGGAAGCCAGACCTGCTTCCCGCGCACTGTGGTGTGTTTTGGCTTTGC
GTGAGCACACCTCTTGGGTGCTGCTGGCAGCTAACACGCTGCTGCTGCTGC
TGCTGCTTGGGACTGCTGGCCTGTTTGCCTGGCACCTAGACACCCCTGTGGT
GAGGTCAGCAGGGGGCGCCTGTGCTTCTTATGCTGGGCTCCCTGGCAGC
AGGTAGTGGCAGCCTCTATGGCTTCTTTGGGGAACCCACAAGGCCTGCGTG
CTTGCTACGCCAGGCCCTCTTTGCCCTTGTTTTACCATCTTCCTGTCCTGCC
TGACAGTTCGCTCATTCCAATAATCATCATCTTCAAGTTTTCCACCAAGGTA
CCTACATTCTACCACGCCTGGGTCCAAAACCACGGTGCTGGCCTGTTTGTGA
TGATCAGCTCAGCGGCCAGCTGCTTATCTGTCTAACTTGGCTGGTGGTGTG
GACCCCACTGCCTGCTAGGGAATACCAGCGCTTCCCCCATCTGGTGATGCTT
GAGTGACAGAGACCAACTCCCTGGGCTTCATACTGGCCTTCCTCTACAATG
GCCTCCTCTCCATCAGTGCCTTTGCCTGCAGCTACCTGGGTAAGGACTTGCC
AGAGAACTACAACGAGGGCCAAATGTGTCACCTTCAGCCTGCTCTTCAACTTC
GTGTCCTGGATCGCCTTCTTCACCACGGCCAGCGTCTACGACGGCAAGTAC
CTGCCTGCGGCCAACATGATGGCTGGGCTGAGCAGCCTGAGCAGCGGCTTC
GGTGGGTATTTCTGCCTAAGTGCTACGTGATCCTCTGCCGCCAGACCTCA
ACAGCACAGAGCACTTCCAGGCCTCCATTGAGGACTACACGAGGCGCTGCG
GCTCCACCTGACCAGTGGGTGAGCAGGCACGGCTGGCAGCCTTCTCTGCCC
TGAGGGTCGAAGGTCGAGCAGGCCGGGGGTGTCCGGGAGGTCTTTGGGCA
TCGCGGTCTGGGGTTGGGACGTGTAAGCGCCTGGGAGAGCCTAGACCAGG
CTCCGGGCTGCCAATAAAGAAGTGAAATGCGTATCTGGTCTCCTGTCGTGGG
AGAGTGTGAGGTGTAACGGATTCAAGTCTGAACCCAGAGCCTGGAAAAGGC
TGACCGCCCAGATTGACGTTGCTAGGCAACTCCGGAGGCGGGCCCAGCGCC
AAAAGAACAGGGCGAGGCGTCGTCCCCGCATCCCATTGGCCGTTCTCTGCG
GGGCCCCGCCCTCGGGGGCCGGAGCTAGAAGCTCTACGCTTCCGAGGCGC
ACCTCCTGGCCTGCACGCTTTGACGT (SEC ID N°: 15)

Cds predicha de hT1R1 (SEC ID N° 16)

ATGCTGCTCTGCACGGCTCGCCTGGTCGGCCTGCAGCTTCTCATTTCTGCT
 GCTGGGCCTTTGCCTGCCATAGCACGGAGTCTTCTCCTGACTTCACCCTCCC
 CGGAGATTACCTCCTGGCAGGCCTGTTCCCTCTCCATTCTGGCTGTCTGCAG
 GTGAGGCACAGACCCGAGGTGACCCTGTGTGACAGGTCTTGTAGCTTCAAT
 GAGCATGGCTACCACCTCTTCCAGGCTATGCGGCTTGGGGTTGAGGAGATA
 AACAACTCCACGGCCCTGCTGCCCAACATCACCTGGGGTACCAGCTGTATG
 ATGTGTGTTCTGACTCTGCCAATGTGTATGCCACGCTGAGAGTGCTCTCCCT
 GCCAGGGCAACACCACATAGAGCTCCAAGGAGACCTTCTCCACTATTCCCCT
 ACGGTGCTGGCAGTGATTGGGCCTGACAGCACCAACCGTGCTGCCACCACA
 GCCGCCCTGCTGAGCCCTTTCTGGTGCCCATGATTAGCTATGCGGCCAGC
 AGCGAGACGCTCAGCGTGAAGCGGCAGTATCCCTCTTTCCTGCGCACCATC
 CCCAATGACAAGTACCAGGTGGAGACCATGGTGCTGCTGCTGCAGAAGTTC
 GGGTGGACCTGGATCTCTCTGGTTGGCAGCAGTGACGACTATGGGCAGCTA
 GGGGTGCAGGCACTGGAGAACCAGGCCACTGGTCAGGGGATCTGCATTGCT
 TTCAAGGACATCATGCCCTTCTCTGCCCAGGTGGGCGATGAGAGGATGCAG
 TGCCTCATGCGCCACCTGGCCCAGGCCGGGGCCACCGTCGTGGTTGTTTTT
 TCCAGCCGGCAGTTGGCCAGGGTGTTTTTCGAGTCCGTGGTGCTGACCAAC
 CTGACTGGCAAGGTGTGGGTGCGCTCAGAAGCCTGGGCCCTCTCCAGGCAC
 ATCACTGGGGTGCCCGGGATCCAGCGCATTGGGATGGTGCTGGGCGTGCC
 CATCCAGAAGAGGGCTGTCCCTGGCCTGAAGGCGTTTGAAGAAGCCTATGC
 CCGGGCAGACAAGAAGGCCCTAGGCCTTGCCACAAGGGCTCCTGGTGACG
 CAGCAATCAGCTCTGCAGAGAATGCCAAGCTTTCATGGCACACACGATGCCC
 AAGCTCAAAGCCTTCTCCATGAGTTCTGCCTACAACGCATACCGGGCTGTGT
 ATGCGGTGGCCCATGGCCTCCACCAGCTCCTGGGCTGTGCCTCTGGAGCTT
 GTTCCAGGGGCGGAGTCTACCCCTGGCAGCTTTTGGAGCAGATCCACAAGG
 TGCATTTCTTCTACACAAGGACACTGTGGCGTTTAATGACAACAGAGATCCC
 CTCAGTAGCTATAACATAATTGCCTGGGACTGGAATGGACCCAAGTGGACCT
 TCACGGTCCTCGGTTCTCCACATGGTCTCCAGTTCAGCTAAACATAAATGA
 GACCAAAATCCAGTGGCACGGAAAGGACAACCAGGTGCCTAAGTCTGTGTG
 TTCCAGCGACTGTCTTGAAGGGCACCAAGCGAGTGGTTACGGGTTTCCATCAC

TGCTGCTTTGAGTGTGTGCCCTGTGGGGCTGGGACCTTCCTCAACAAGAGT
 GACCTCTACAGATGCCAGCCTTGTGGGAAAGAAGAGTGGGCACCTGAGGGA
 AGCCAGACCTGCTTCCCGCGCACTGTGGTGTGTTTTGGCTTTGCGTGAGCACA
 CCTCTTGGGTGCTGCTGGCAGCTAACACGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTTG
 GGACTGCTGGCCTGTTTGCCTGGCACCTAGACACCCCTGTGGTGAGGTCAG
 CAGGGGGCCGCTGTGCTTTCTTATGCTGGGCTCCCTGGCAGCAGGTAGTG
 GCAGCCTCTATGGCTTCTTTGGGGAACCCACAAGGCCTGCGTGCTTGCTAC
 GCCAGGCCCTCTTTGCCCTTGGTTTCACCATCTTCCTGTCCTGCCTGACAGT
 TCGCTCATTCCAATAATCATCATCTTCAAGTTTTCCACCAAGGTACCTACATT
 CTACCACGCCTGGGTCCAAAACACGGTGCTGGCCTGTTTGTGATGATCAGC
 TCAGCGGGCCAGCTGCTTATCTGTCTAACTTGGCTGGTGGTGTGGACCCAC
 TGCCTGCTAGGGAATACCAGCGCTTCCCCCATCTGGTGATGCTTGAGTGCAC
 AGAGACCAACTCCCTGGGCTTCATACTGGCCTTCCTCTACAATGGCCTCCTC
 TCCATCAGTGCCTTTGCCTGCAGCTACCTGGGTAAGGACTTGCCAGAGAACT
 ACAACGAGGCCAAATGTGTCACCTTCAGCCTGCTCTTCAACTTCGTGTCCTG
 GATCGCCTTCTTCACCACGGCCAGCGTCTACGACGGCAAGTACCTGCCTGC
 GGCCAACATGATGGCTGGGCTGAGCAGCCTGAGCAGCGGCTTCGGTGGGTA
 TTTTCTGCCTAAGTGCTACGTGATCCTCTGCCGCCAGACCTCAACAGCACA
 GAGCACTTCCAGGCCTCCATTCAGGACTACACGAGGCGCTGCGGCTCCACC
 TGA (SEC ID N°: 16)

Traducción conceptual de hT1R1 (SEC ID N° 17)

MLLCTARLVGLQLLISCCWAFACHSTESSPDFTLP GDYLLAGLFPLHSGCLQVRH
 RPEVTLCDRSCSFNEHGYHLFQAMRLGVEEINNSTALLPNITLGYQLYDVCSDSA
 NVYATLRVLSLPGQHHLQGDLLHYSPTVLAVIGPDSTNRAATTAALLSPFLVPM
 ISYAASSETLSVKRQYPSFLRTIPNDKYQVETMVLLLQKFGWTWISLVGSSDDYG
 QLGVALENQATGGQICIAFKDIMPFS AQVGDERMQCLMRHLAQAGATVVVVS
 SRQLARVFFESVVLTNLTGKVWVASEAWALSRHITGVPGIQRIGMVLGVAIQKRA
 VPGLKAFFEEAYARADKKAPRPCHKGSWCSSNQLCRECQAFMAHTMPKLFKAFS
 MSSAYNAYRAVYAVAHGLHQLLGACSGACSRGRVYPWQLLEQIHKVFLLHKD
 TVAFNDNRDPLSSYNIIAWDWNPKWTFTVLGSSTWSPVQLNINETKIQWHGK
 DNQVPKSVCSDDCLEGHQRVVTGFHHCCFECVPCGAGTFLNKSDLYRCQPCG
 KEEWAPEGSQTCFPRTVVFLALREHTSWVLLAANTLLLLLLLGTAGLFAWHLDT
 PVVRSAGGRCLFLMLGSLAAGSGSLYGFFGEPTRPACLLRQALFALGFTIFLSCL

TVRSFQLIIIFKFSTKVPTFYHAWVQNHGAGLFVMISSAAQLLICLTWL VVWTPLP
 AREYQRFPHLVMLECTETNSLGFILAFLYNGLLSISAFACSYLGKDLPENYNEAKC
 VTFSLLENFVSWIAFFTTASVYDGKYLPAANMMAGLSSLSSGFGGYFLPKCYVIL
 CRPDLNSTEHFQASIQDYTRRCGST (SEC ID N°: 17)

5 EJEMPLO 6 -hT1R2

- La cds predicha del ortólogo humano de un receptor gustativo de rata, denominado rT1R2, se proporciona a continuación como SEC ID N° 20. Las secuencias conceptualmente traducidas de hT1R2 también se describen en la presente memoria como SEC ID N° 21. De acuerdo con la presente invención, los dos primeros exones codificantes de hT1R2 se identificaron dentro de un PAC por transferencia de Southern. El exón 1 se aisló dentro de un fragmento de BamHI/BglII que se identificó en el experimento de Southern y el exón 2 se aisló dentro de un producto de PCR que abarca del exón 1 al exón 3. La comparación de los dos primeros exones codificantes con la secuencia de rT1R2 establecía que los dos exones codifican el extremo N-terminal del homólogo humano de rT1R2. Por ejemplo, la identidad de aminoácidos de dos en dos entre la secuencia N-terminal de rT1R2 codificada por los dos exones y las regiones correspondientes de rT1R2 tienen una identidad de aproximadamente el 72%, mientras que la secuencia anotada más relacionada en bancos de datos de secuencias de ADN públicos tiene una identidad de sólo aproximadamente el 48% con hT1R2

Cds predicha de hT1R2 (SEC ID N° 20)

ATGGGGCCCCAGGGCAAAGACCATCTGCTCCCTGTTCTTCCTCCTATGGGTCC
 TGGCTGAGCCGGCTGAGAACTCGGACTTCTACCTGCCTGGGGATTACCTCC
 TGGGTGGCCTCTTCTCCCTCCATGCCAACATGAAGGGCATTGTTACCTTAA
 CTCCTGCAGGTGCCCATGTGCAAGGAGTATGAAGTGAAGGTGATAGGCTAC
 AACCTCATGCAGGCCATGCGCTTCGCGGTGGAGGAGATCAACAATGACAGC
 AGCCTGCTGCCTGGTGTGCTGCTGGGCTATGAGATCGTGGATGTGTGCTAC
 ATCTCCAACAATGTCCAGCCGGTGCTCTACTTCCTGGCACACGAGGACAACC
 TCCTTCCCATCCAAGAGGACTACAGTAACTACATTTCCCGTGTGGTGGCTGT
 CATTGGCCCTGACAACTCCGAGTCTGTCATGACTGTGGCCAACTTCCTCTCC
 CTATTTCTCCTTCCACAGATCACCTACAGCGCCATCAGCGATGAGCTGCGAG
 ACAAGGTGCGCTTCCCGGCTTTGCTGCGTACCACACCCAGCGCCGACCACC
 ACGTCGAGGCCATGGTGCAGCTGATGCTGCACTTCCGCTGGAAGTGGATCA
 TTGTGCTGGTGAGCAGCGACACCTATGGCCGCGACAATGGCCAGCTGCTTG
 GCGAGCGCGTGGCCCGGCGCGACATCTGCATCGCCTTCCAGGAGACGCTG

CCCACACTGCAGCCCAACCAGAACATGACGTCAGAGGAGCGCCAGCGCCTG
 GTGACCATTGTGGACAAGCTGCAGCAGAGCACAGCGCGCGTCTGTGGTCTGTG
 TTCTCGCCCGACCTGACCCTGTACCACTTCTTCAATGAGGTGCTGCGCCAGA
 ACTTCACGGGGCGCCGTGTGGATCGCCTCCGAGTCCTGGGCCATCGACCCGG
 TCCTGCACAACCTCACGGAGCTGGGCCACTTGGGCACCTTCCTGGGCATCA
 CCATCCAGAGCGTGCCCATCCCGGGCTTCAGTGAGTTCCGCGAGTGGGGCC
 CACAGGCTGGGGCCGCCACCCCTCAGCAGGACCAGCCAGAGCTATACCTGCA
 ACCAGGAGTGCGACAACCTGCCTGAACGCCACCTTGTCTTCAACACCATTCT
 CAGGCTCTCTGGGGAGCGTGTCTGTCTACAGCGTGTACTCTGCGGTCTATGC
 TGTGGCCCATGCCCTGCACAGCCTCCTCGGCTGTGACAAAAGCACCTGCAC
 CAAGAGGGTGGTCTACCCCTGGCAGCTGCTTGAGGAGATCTGGAAGGTCAA
 CTTCACTCTCCTGGACCACCAAATCTTCTTCGACCCGCAAGGGGACGTGGCT
 CTGCACTTGAGATTGTCCAGTGGCAATGGGACCGGAGCCAGAATCCCTTC
 CAGAGCGTCGCCTCCTACTACCCCTGCAGCGACAGCTGAAGAACATCCAA
 GACATCTCCTGGCACACCGTCAACAACACGATCCCTATGTCCATGTGTTCCA
 AGAGGTGCCAGTCAGGGCAAAGAAGAAGCCTGTGGGCATCCACGTCTGCT
 GCTTCGAGTGCATCGACTGCCTTCCCGGCACCTTCCTCAACCACACTGAAGA
 TGAATATGAATGCCAGGCCTGCCCCGAATAACGAGTGGTCCTACCAGAGTGAG
 ACCTCCTGCTTCAAGCGGCAGCTGGTCTTCCTGGAATGGCATGAGGCACCC
 ACCATCGCTGTGGCCCTGCTGGCCGCCCTGGGCTTCCTCAGCACCCCTGGCC
 ATCCTGGTGATATTCTGGAGGCACTTCAGACACCCATAGTTCGCTCGGCTG
 GGGGCCCCATGTGCTTCCTGATGCTGACACTGCTGCTGGTGGCATACATGG
 TGGTCCCGGTGTACGTGGGGCCGCCAAGGTCTCCACCTGCCTCTGCCGCC
 AGGCCCTCTTCCCTCTGCTTCACAATTTGCATCTCCTGTATCGCCGTGCGT
 TCTTTCCAGATCGTCTGCGCCTTCAAGATGGCCAGCCGCTTCCACGCGCCT
 ACAGCTACTGGGTCCGCTACCAGGGGCCCTACGTCTCTATGGCATTATCAC
 GGTACTCAAATGGTCATTGTGGTAATTGGCATGCTGGCCACGGGCCTCAGT
 CCCACCACCCGTACTGACCCCGATGACCCCAAGATCACAATTGTCTCCTGTA
 ACCCCAACCTACCGCAACAGCCTGCTGTTCAACACCAGCCTGGACCTGCTGCT
 CTCAGTGGTGGGTTTCAGCTTCGCCTACATGGGCAAAGAGCTGCCACCAAC
 TACAACGAGGCCAAGTTCATCACCTCAGCATGACCTTCTATTTACCTCATC
 CGTCTCCCTCTGCACCTTCATGTCTGCCTACAGCGGGGTGCTGGTCACCATC
 GTGGACCTCTTGGTCACTGTGCTCAACCTCCTGGCCATCAGCCTGGGCTACT
 TCGGCCCCAAGTGCTACATGATCCTCTTCTACCCGGAGCGCAACACGCCCCG
 CCTACTTCAACAGCATGATCCAGGGCTACACCATGAGGAGGGACTAG (SEC
 ID N°: 20)

Traducción conceptual de hT1R2 (SEC ID N° 21)

MGPRAKTICSLFFLLWVLAEP AENSDFYLP GDYLLGGLFSLHANMKGIVHLNFLQ
 VPMCKEYEVKVIGYNLMQAMRFAVEEINNDSSLLPGVLLGYEIVDVCYISNNVQP
 VLYFLAHEDNLLPIQEDYSNYISR VVAVIGPDNSESVMTVANFLSLFLLPQITYSAI
 SDEL RDKVRFPALLRTPSADHHVEAMVQLMLHFRWNWIIVLVSSD TYGRDNGQ
 LLGERVARRDICIAFQETLPTLQPNQNM TSEERQRLVTIVDKLQQSTARVVVFS
 PDLTLYHFFNEVLRQNFTGAVWIAS ESWAIDPVLHNLTELGH LGTFLGITIQSVPIP
 GFSEFREWGPGQAGPPPLSRTSQSYTCNQEC DNCLNATLSFNTILRLSGERVVYS
 VYSAVYAVAHALHSLLGCDKSTCTKR VVYPWQLLEEIWKNFTLLDHQIFFDPQG
 DVALHLEIVQWQWDRSQNP FQSVASYYP LQRQLKNIQDISWHTVNN TIPMSMC
 SKRCQSGQKKKPVGIHVCCFECIDCLPGTFLN HTEDEYECQACPNNEWSYQSE
 TSCFKRQLVFLEWHEAPTIAVALLAALGFLSTLAILVIFWRHFQTPIVRSAGGPMC
 FLMLTLLL VAYMVVPVYVGPVKVSTCLCRQALFPLCFTICISCI AVRSFQIVCAFKM
 ASRFPRAYSYWVRYQGPYVSMAFITVLK MVIVVIGMLATGLSPTTRTDPDDPKITI
 VSCNP NYRNSLLFNTSLDLLLSVVGFSFAYMGKELPTNYNEAKFITLSMTFYFTSS
 VSLCTFMSAYS GVLVTIVDLLVTVLNLLAISLGYFGPKCYMILFYPERNTPAYFNS
 MIQGYTMRRD (SEC ID N°: 21)

5 **Ejemplo 7**Procedimientos para la expresión heteróloga de T1R en células heterólogas

Se cultivó un derivado de HEK-293 (Chandrasekar y col., Cell 188 (6): 703-11 (2000)) que expresaba de forma estable $G\alpha_{15}$ y se mantuvo a 37°C en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco BRL) complementado con FBS al 10%, MEM con aminoácidos no esenciales (Gibco BRL) y blasticidina 3 $\mu\text{g/ml}$. Para los experimentos de formación de imágenes de calcio, las células se sembraron primero en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos (aproximadamente 0,1 millones de células por pocillo) y se transfectaron por lipofección con Mirus TransIt-293 (PanVera). Para minimizar la desensibilización inducida por glutamato e inducida por glucosa, se reemplazó el DMEM complementado con DMEM bajo en glucosa/GlutaMax (Gibco BRL) aproximadamente 24 horas después de la transfección. 24 horas después, las células se cargaron con el colorante de calcio Fluo-4 (Molecular Probes), 3 μM en tampón PBS de Dulbecco (DPBS, Gibco BRL) durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Después del reemplazo con 250 μl de DPBS, se realizó la estimulación a temperatura ambiente por adición de 200 μl de DPBS complementado con estímulos gustativos. Se controló la movilización de calcio en un microscopio Axiovert S100 TV (Zeiss) usando el programa informático Imaging Workbench 4.0 (Axon). Las respuestas de T1R1/T1R3 y de T1R2/T1R3 eran sorprendentemente transitorias —los aumentos de calcio rara vez persistían más de 15 segundos— y asincrónicas. Por lo tanto, el número de células que responden era relativamente constante a lo largo del tiempo; por lo tanto, las respuestas celulares se cuantificaron por recuento manual del número de células que responden en un momento fijo, típicamente 30 segundos después de la adición del estímulo.

25 **Ejemplo 8**Funciones de T1R2/T1R3 humano como un receptor del sabor dulce

30 Células HEK que expresaban de forma estable $G\alpha_{15}$ se transfectaron de forma transitoria con T1R2, T1R3 y T1R2/T1R3 humanos y se ensayaron para aumentos en el calcio intracelular en respuesta a concentraciones crecientes de sacarosa (Figura 1 (a)). Además, se determinaron las respuestas a la dosis de T1R2/T1R3 para varios estímulos gustativos dulces (Figura 1(b)). El porcentaje máximo de células que responden era diferente para diferentes edulcorantes, que variaba del 10 al 30%. Para una mayor claridad, las respuestas a la dosis se normalizaron para el porcentaje máximo de células que responden. Los valores en la Figura 1 representan la media $\pm$ e. t. de cuatro respuestas independientes. Los círculos del eje X señalan los umbrales psicofísicos de detección

determinados por ensayo del sabor. La gurmarina (dilución 50 completa de un extracto acuoso de *Gymnema sylvestre* 10 g/l filtrado) inhibía la respuesta de T1R2/T1R3 a sacarosa 250 mM, pero no la respuesta del receptor β 2-adrenérgico endógeno a isoproterenol 20 μ M (Figura 1(b)). La Figura 1(c) contiene la respuesta normalizada de líneas celulares que coexpresan T1R2/T1R3 a diferentes edulcorantes (sacarosa, aspartamo, triptófano y sacarina).

EJEMPLO 9

T1R2/T1R3 de rata también funciona como un receptor del sabor dulce

Células HEK que expresaban de forma estable $G_{\alpha 15}$ se transfectaron de forma transitoria con hT1R2/hT1R3, rT1R2/rT1R3, hT1R2/rT1R3 y rT1R2/hT1R3. Después, estas células transfectadas se ensayaron para calcio intracelular aumentado en respuesta a sacarosa 350 mM, triptófano 25 mM, aspartamo 15 mM y 0,05 de monelina. Los resultados con sacarosa y aspartamo están contenidos en la Figura 2 e indican que rT1 R2/rT1 R3 también funciona como un receptor del sabor dulce. Además, estos resultados sugieren que T1 R2 puede controlar la especificidad de ligando de T1 R2/T1 R3.

EJEMPLO 10

Funciones de T1R1/T1R3 humano como receptores del sabor umami

Células HEK que expresaban de forma estable $G_{\alpha 15}$ se transfectaron de forma transitoria con T1R1, T1R3 y T1R1/T1R3 humanos y se ensayaron para aumentos en el calcio intracelular en respuesta a concentraciones crecientes de glutamato (Figura 3(a) y glutamato 0,5 mM), IMP 0,2 mM y glutamato 0,5 mM más IMP 0,2 mM (Figura 3 (b)). Las respuestas a la dosis de T1R1/T1R3 humanos se determinaron para el glutamato en presencia y ausencia de IMP 0,2 mM (Figura 3(c)). Los porcentajes máximos de células que responden eran de aproximadamente el 5% para el glutamato y de aproximadamente el 10% para el glutamato más IMP. Para una mayor claridad, las respuestas a la dosis se normalizaron para el porcentaje máximo de células que responden. Los valores representan la media $\pm$ e. t. de cuatro respuestas independientes. Los círculos del eje X señalan los umbrales de detección del sabor determinados por ensayo del sabor.

EJEMPLO 11

PDZIP como una secuencia de exportación

La secuencia PDZIP de seis restos (SVSTVV (SEC ID N°: 22)) se fusionó con el extremo C-terminal de hT1R2 y el receptor quimérico (es decir, hT1R2-PDZIP) se transfectó en una célula hospedadora HEK-293. Después, la expresión superficial de hT1R2 se controló usando inmunofluorescencia y datos de exploración de FACS. Como se muestra en las Figuras 6A y 6B, la inclusión de la secuencia PDZIP aumentó la expresión superficial de hT1R2-PDZIP con respecto a hT1R2.

Secuencia PKZIP

SVSTVV (SEC ID N°: 22)

Más específicamente, la Figura 4A muestra una tinción de inmunofluorescencia de hT1R2 marcado con myc que demuestra que PDZIP aumenta significativamente la cantidad de proteína hT1R2 en la membrana plasmática. La Figura 4B muestra datos de análisis de FACS que demuestran el mismo resultado. Las células que expresan hT1R2 marcado con myc se indican mediante la línea de puntos y las células que expresan hT1R2-PDZIP marcado con myc se indican mediante la línea continua.

Ejemplo 12

Generación de líneas celulares que coexpresan de forma estable T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3

Se generaron líneas celulares humanas que coexpresaban de forma estable T1R2/T1R3 humanos o T1R1/T1R3 humanos por transfección de vectores derivados de PEAK10 linealizados (Edge Biosystems) que contenían vectores derivados de pCDNA3.1/ZEO (Invitrogen) que contenían construcción de expresión de hT1R1 o hT1R2, respectivamente (plásmido SAV2485 para T1R1, SAV2486 para T1R2) y hT1R3 (plásmido SXV550 para T1R3) en una línea celular que expresaba $G_{\alpha 15}$. En concreto, se produjeron líneas celulares estables de T1R2/T1R3 por cotransfección de SAV2486 y SXV550 linealizados en la línea celular HEK-293 de Aurora Bioscience que expresa de forma estable $G_{\alpha 15}$. Se produjeron líneas celulares estables de T1R1/T1R3 por cotransfección de SAV2485 y SXV550 linealizados en la misma línea celular HEK-293 que expresaba de forma estable $G_{\alpha 15}$. Después de las transfecciones con SAV2485/SCV550 y SAV2486/SXV550 se seleccionaron las colonias resistentes a puromicina y resistentes a zeocina, se expandieron y se ensayaron por formación de imágenes de calcio para respuestas a estímulos de sabores dulce o umami. Las células se seleccionaron en puromicina 0,0005 mg/ml (CALBIOCHEM) y

zeocina 0,1 mg/ml (Invitrogen) a 37°C en DMEM bajo en glucosa complementado con GlutaMAX, FBS dializado al 10% y blasticidina 0,003 mg/ml. Las colonias resistentes se expandieron y sus respuestas a estímulos gustativos dulces se evaluaron por microscopía de fluorescencia. Para la formación automática de imágenes fluorimétricas en un instrumento VIPR-II (Aurora Biosciences), se sembraron células estables de T1R2/T1R3 primero en placas de 96 pocillos (aproximadamente 15.000 células por pocillo). Veinticuatro horas después, las células se cargaron con el colorante de calcio fluo-3-AM (Molecular Probes), 0,005 mM en PBS, durante una hora a temperatura ambiente. Después del reemplazo con 70 ml de PBS, se realizó la estimulación a temperatura ambiente por adición de 70 ml de PBS complementado con estímulo gustativo. Se calculó la media de las respuestas de fluorescencia (excitación a 480 nm y emisión a 535 nm) de 20 a 30 segundos después de la adición del compuesto, se corrigió para fluorescencia de fondo medida antes de la adición del compuesto y se normalizaron para la respuesta a ionomicina 0,001 mM (CALBIOCHEM), un ionóforo del calcio.

Después, se observó que cuando estas líneas celulares se ponían en contacto con sabor dulce o umami, para clones activos, típicamente el 80-100% de las células respondían al estímulo gustativo. Inesperadamente, la magnitud de las respuestas celulares individuales era notablemente mayor que la de las células transfectadas de forma transitoria.

En base a esta observación, los inventores ensayaron la actividad de líneas celulares estables para T1R mediante formación automática de imágenes de fluorescencia usando un instrumento VIPR de Aurora Bioscience, como se ha descrito anteriormente. Las respuestas de dos líneas celulares de T1R1/T1R3 y T1R2/T1R3 se muestran en la Figura 5 y en la Figura 6, respectivamente.

Increíblemente, la combinación de números aumentados de células que responden y magnitudes de respuesta aumentadas dio como resultado un aumento de más de 10 veces en la actividad con respecto a las células transfectadas de forma transitoria. (A modo de comparación, el porcentaje de respuesta a ionomicina para las células transfectadas de forma transitoria con T1R2/T1R3 era de aproximadamente el 5% en condiciones óptimas). Además, las respuestas a la dosis obtenidas para T1R2/T1R3 y T1R1/T1R3 humanos expresados de forma estable se correlacionaban con los umbrales de detección del sabor humanos. La fuerte actividad de T1R de estas líneas celulares estables sugiere que están bien adaptadas para el uso en la exploración de alto rendimiento de bibliotecas químicas para identificar compuestos, por ejemplo, pequeñas moléculas que modulen los receptores del sabor dulce o umami y que, por lo tanto, modulen, potencien, bloqueen o mimeticen el sabor dulce o umami.

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la región extracelular del polipéptido T1R2 en la SEC ID N°: 21 y la región transmembrana de un polipéptido GPCR diferente o una secuencia de ácido nucleico aislada que
5 codifica la región transmembrana del polipéptido T1R2 en la SEC ID N°: 21 y la región extracelular de un polipéptido GPCR diferente.
2. Un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1.
- 10 3. Una célula que expresa una secuencia de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1.
4. Un polipéptido aislado o recombinante codificado por una secuencia de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1.
- 15 5. Un ensayo para identificar un compuesto que modula la transducción del sabor que comprende:
 - (i) poner en contacto un polipéptido T1R2, de acuerdo con la reivindicación 4, con un supuesto compuesto modulador del sabor y
 - (ii) detectar si dicho compuesto se une específicamente a, o modula la actividad de, dicho polipéptido T1R2.
- 20 6. El ensayo de la reivindicación 5, en el que dicho polipéptido T1R2 se expresa con otro polipéptido GPCR.

Figura 1. Funciones de T1R2/T1R3 humano como un receptor del sabor dulce

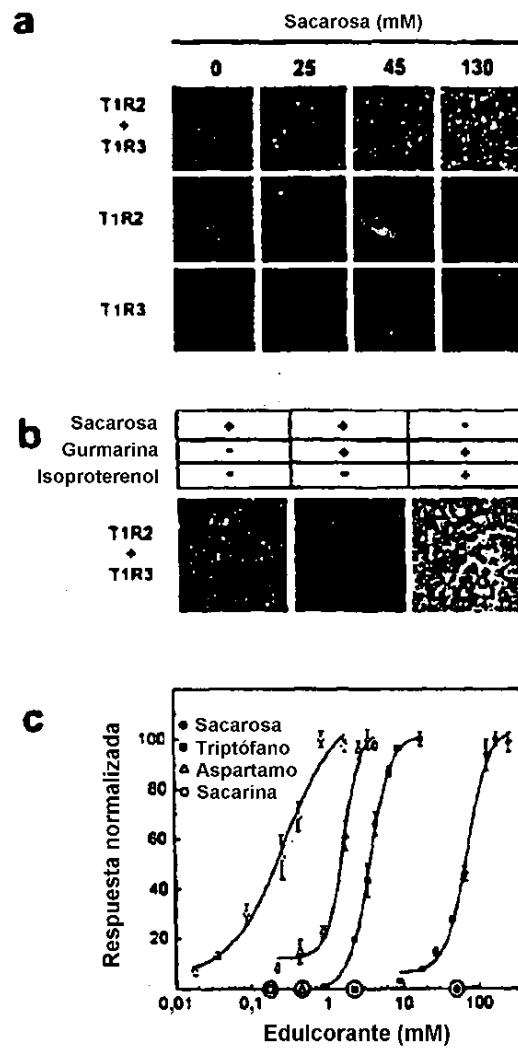


Figura 2. T1R2 puede controlar la especificidad de ligando de T1R2/T1R3

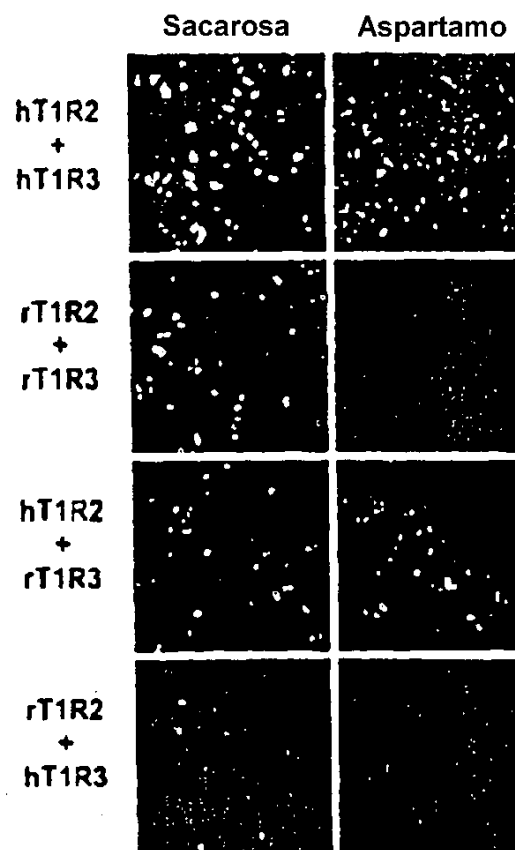
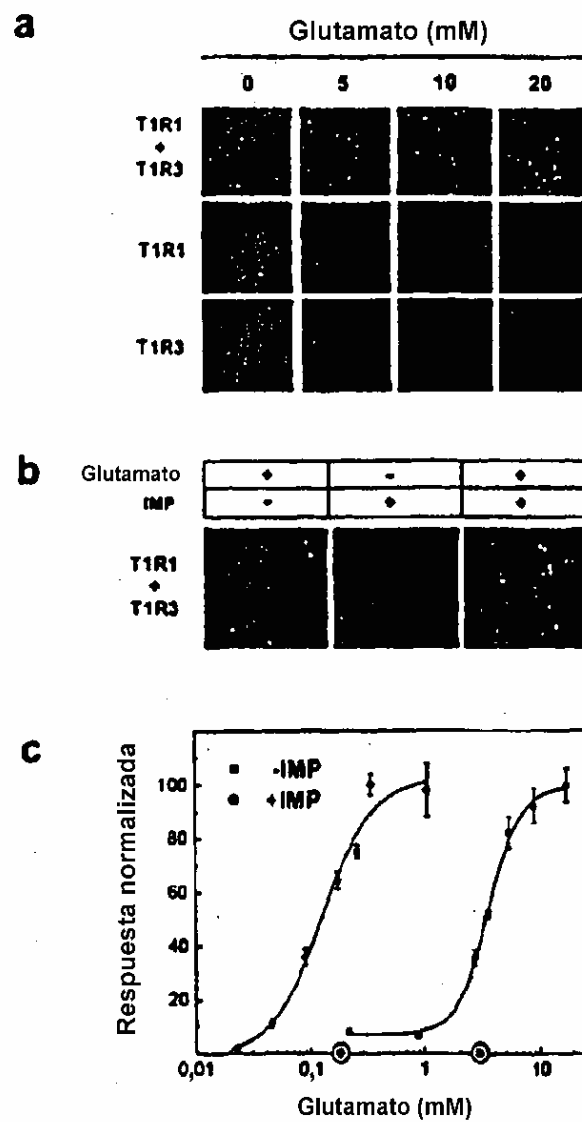


Figura 3. Funciones de T1R1/T1R3 humano como un receptor del sabor umami



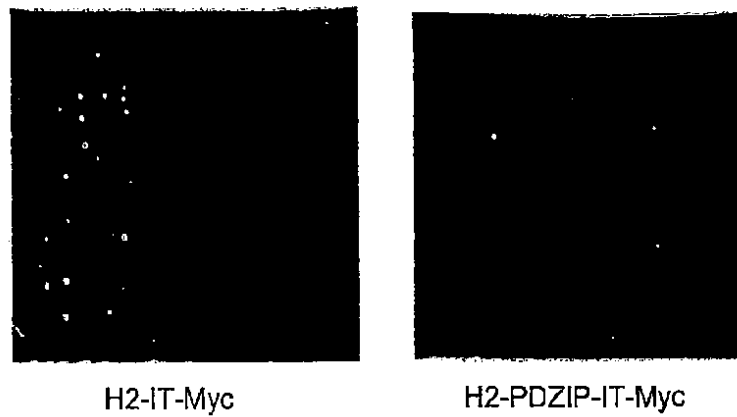


FIG. 4A

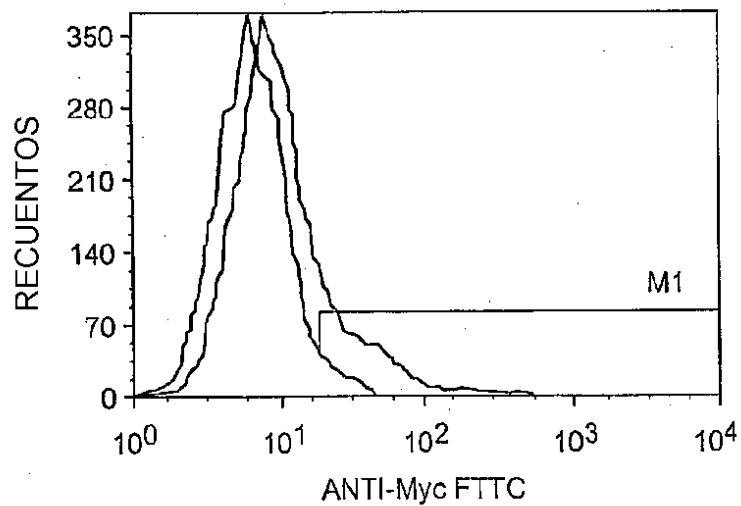


FIG. 4B

Figura 4. PDZIP facilita la expresión superficial de T1R2 humano.

- A. La tinción de inmunofluorescencia de hT1R2 marcado con Myc indica que PDZIP aumenta significativamente la cantidad de proteína T1R2 humana en la membrana plasmática.
- B. Datos de análisis de FACS que demuestran el mismo resultado. T1R2 humano marcado con Myc: línea verde. T1R2 humano marcado con Myc con PDZIP: línea negra

Figura 5

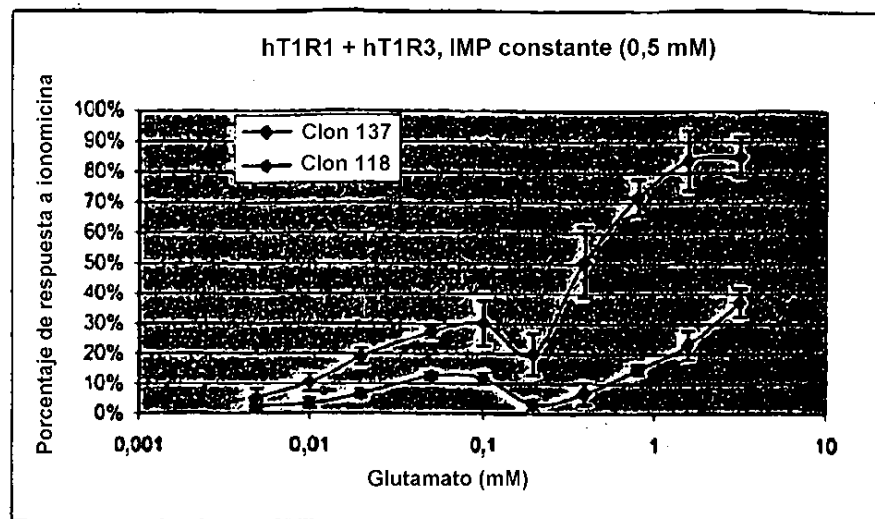


Figura 6

