

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 521**

51 Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02761016 .1**
- 96 Fecha de presentación: **26.06.2002**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1412750**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.2004**

54 Título: **Receptores gustativos del dulce hetero-oligoméricos t1r2 - t1r3, líneas celulares que expresan dichos receptores y uso de los mismos para la identificación de compuestos con sabor dulce**

30 Prioridad:
26.06.2001 US 300434 P 03.07.2001 US 897427
13.07.2001 US 304749 P 08.08.2001 US 310493 P
21.11.2001 US 331771 P 14.12.2001 US 339472 P
03.01.2002 US 35045 15.04.2002 US 372090 P
22.04.2002 US 374143 P 23.04.2002 US 374522 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2012

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

72 Inventor/es:
ZOLLER, Mark, T.;
LI, Xiaodong;
STASZEWSKI, Lena;
O'CONNELL, Shawn;
ZOZULYA, Sergey;
ADLER, Jon, Elliott;
XU, Hong y
ECHEVERRI, Fernando

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 388 521 T3

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).

DESCRIPCIÓN

Receptores gustativos del dulce hetero-oligoméricos t1r2 - t1r3, líneas celulares que expresan dichos receptores y uso de los mismos para la identificación de compuestos con sabor dulce.

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

La presente invención se refiere en parte al descubrimiento de que los receptores T1R se ensamblan para formar receptores gustativos funcionales. En particular, se ha descubierto que la coexpresión de T1R1 y T1R3 da como resultado un receptor gustativo que responde a estímulos del sabor umami, que incluye el glutamato de monosodio. Además, se ha descubierto que la coexpresión de los receptores T1R2 y T1R3 da como resultado un receptor gustativo que responde a estímulos de sabor dulce, que incluyen edulcorantes naturales y artificiales. Además, la presente descripción se refiere al uso de receptores gustativos hetero-oligoméricos que comprenden T1R1/T1R3 y T1R2/T1R3 en ensayos para identificar compuestos que responden respectivamente a estímulos de sabor umami y a estímulos de sabor dulce.

Además, la invención se refiere a la construcción de líneas celular que coexpresan de forma estable o transitoria una combinación de T1R2 y T1R3 en condiciones constitutivas o inducibles.

También se proporciona el uso de estas líneas celulares en ensayos basados en células para identificar compuestos moduladores del sabor umami y dulce, en particular ensayos de selección de alto rendimiento que detectan la actividad de receptores mediante el uso de la formación de imágenes fluorométricas.

Descripción de la técnica relacionada

20 El documento WO 02/064631 A, citable bajo el artículo 53(3) EPC, describe receptores gustativos T1R y genes que los codifican.

El sistema gustativo proporciona información sensorial acerca de la composición química del mundo exterior. Se cree que los mamíferos tienen al menos cinco modalidades gustativas básicas: dulce, amargo, ácido, salado, y umami. Véase, por ejemplo, Kawamura *et al.*, *Introduction to Umami: A Basic Taste* (1987); Kinnamon *et al.*, *Ann. Rev. Physiol.*, 54:715-731 (1992); Lindemann, *Physiol. Rev.*, 76:718-766 (1996); Stewart *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 272:1-26 (1997). Se cree que cada modalidad gustativa está mediada por un receptor o receptores de proteínas diferenciados que se expresan en las células receptoras gustativas que se encuentran en la superficie de la lengua (Lindemann, *Physiol. Rev.*, 76:718-716 (1996)). Los receptores gustativos que reconocen los estímulos de sabor amargo, dulce y umami pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR) (Hoon *et al.*, *Cell*, 96:451 (1999); Adler *et al.*, *Cell*, 100:693 (2000)). (Se cree que otras modalidades gustativas están mediadas por canales iónicos).

Los receptores acoplados a proteína G median en muchas otras funciones fisiológicas, tales como la función endocrina, la función exocrina, la frecuencia cardíaca, la lipólisis, y el metabolismo de carbohidratos. El análisis bioquímico y la clonación molecular de una serie de dichos receptores ha revelado muchos principios básicos con respecto a la función de estos receptores. Por ejemplo, la patente de EEUU nº 5.691.188 describe cómo tras la unión de un ligando a un GPCR, el receptor sufre un cambio conformacional que conduce a la activación de una proteína G heterotrímica promoviendo el desplazamiento del GDP unido por GTP sobre la superficie de la subunidad G α y la posterior disociación de la subunidad G α de las subunidades G β y G γ . Las subunidades G α libres y los complejos de G $\beta\gamma$ activan elementos aguas abajo de una diversidad de vías de transducción de señales.

Esta invención se refiere a la clase T1R de tres miembros de GPCR específicos del gusto. Previamente, se había establecido la hipótesis de que los receptores T1R actuaban como receptores gustativos del dulce (Hoon *et al.*, *Cell*, 96:541-551 (1999); Kitagawa *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 283:236-242 (2001); Max *et al.*, *Nat. Genet.*, 28:58-63 (2001); Montmayeur *et al.*, *Nat. Neurosci.*, 4:492-498 (2001); Sainz *et al.*, *J. Neurochem.*, 77:896-903 (2001)), y en fechas recientes, Nelson *et al.* (2001) han demostrado que T1R2 y T1R3 de rata actúan en combinación para reconocer los estímulos del sabor dulce. La presente invención se refiere al descubrimiento de que, tal como es el caso de T1R2/T1R3 de rata, T1R2 y T1R3 humanos actúan en combinación para reconocer los estímulos del sabor dulce. Además, la presente descripción se refiere al descubrimiento de que T1R1 y T1R3 humanos actúan en combinación para reconocer los estímulos de sabor umami. Por tanto, es probable que T1R2/T1R3 actúen como un receptor gustativo del dulce, y es probable que T1R1/T1R3 actúen como un receptor gustativo del umami en mamíferos. La explicación probable de la codependencia funcional de T1R1 y T1R3, y de la codependencia funcional de T1R2 y T1R3, es que, al igual que el receptor GABA B , relacionado desde el punto de vista estructural (Jones *et al.*, *Nature*, 396:5316-5322 (1998); Kaupmann *et al.*, *Nature*, 396:683-687 (1998); White *et al.*, *Nature*, 396:679-682 (1998); Kuner *et al.*, *Science*, 283:74-77 (1999)), los T1R actúan como complejos heterodiméricos.

La identificación de la caracterización de los receptores gustativos que actúan como receptores del dulce y del umami es significativa, puesto que facilitará el uso de estos receptores en ensayos para identificar compuestos que

modulen (potencien o bloqueen) el sabor dulce y umami. Estos compuestos serían útiles para mejorar el gusto y la palatabilidad de alimentos, bebidas, compuestos medicinales para el consumo humano o animal. En particular, un ensayo que utilice un receptor funcional del dulce permitiría la identificación de nuevos edulcorantes.

Sumario de la invención

5 La presente invención se refiere al descubrimiento de que diferentes combinaciones de T1R, cuando se coexpresan, producen receptores gustativos funcionales que responden a estímulos gustativos. En particular, la presente invención se refiere al descubrimiento de que la coexpresión de T1R2 y T1R3 produce un receptor gustativo hetero-oligomérico que responde a estímulos gustativos del dulce.

10 La presente invención también se refiere a líneas celulares que coexpresan T1R2 y T1R3, preferiblemente humanos. En realizaciones preferidas, estas líneas celulares expresarán cantidades elevadas de los receptores, de modo constitutivo o inducible. Estas líneas celulares incluyen células que expresan T1R2 y T1R3 de forma transitoria o estable.

15 Además, la presente invención proporciona ensayos, preferiblemente ensayos de selección de alto rendimiento, que utilizan el receptor gustativo T1R2/T1R3, preferiblemente ensayos de alto rendimiento basados en células, para identificar compuestos que modulen el sabor dulce o umami. La descripción también proporciona análisis que incluyen ensayos gustativos para confirmar que estos compuestos modulan el sabor dulce.

Objetos

Con este objetivo, es un objeto proporcionar una familia de receptores de mamífero acoplados a proteína G, denominados en la presente memoria T1R, que medie en la percepción gustativa.

20 Otro objeto es proporcionar fragmentos y variantes de dichos T1R que conserven la actividad, por ejemplo, que se activen y/o se unan a estímulos gustativos del dulce o del umami.

Otro objeto aún más es proporcionar secuencias de ácidos nucleicos o moléculas que codifiquen dichos T1R, fragmentos o variantes de los mismos.

25 Otro objeto más es proporcionar vectores de expresión que incluyan secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen dichos T1R, fragmentos o variantes de los mismos, que estén unidos operativamente al menos a una secuencia reguladora, tal como un promotor, un potenciador u otra secuencia implicada en la transcripción y/o la traducción de genes positiva o negativa y/o la exportación de proteínas.

30 Otro objeto más es proporcionar células humanas o no humanas, por ejemplo, células de mamífero, levadura, gusano o insecto, que expresen funcionalmente al menos uno de dichos T1R, o fragmentos o variantes de los mismos, y preferiblemente una combinación de los T1R o fragmentos o variantes de los mismos.

Otro objeto más es proporcionar polipéptidos o proteínas de fusión de T1R que incluyan al menos un fragmento de al menos uno de dichos T1R.

35 Otro objeto es proporcionar una molécula de ácido nucleico aislada que codifique un polipéptido de T1R, que comprenda una secuencia de ácido nucleico que sea al menos 50%, preferiblemente 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de ácido nucleico que tenga una de las secuencias de ácido nucleico de hT1R identificadas más adelante, y sus variantes modificadas de modo conservador.

40 Otro objeto adicional es proporcionar una molécula de ácido nucleico aislada que comprenda una secuencia de ácido nucleico que codifique un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que sea al menos del 35% al 50%, preferiblemente 60%, 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de una de las secuencias de aminoácidos de T1R identificadas más adelante, y sus variantes modificadas de modo conservador, en el que el fragmento tiene una longitud de al menos 20, preferiblemente, 40, 60, 80, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos. Opcionalmente, el fragmento puede ser un fragmento antigénico que se una a un anticuerpo anti-T1R.

45 Otro objeto aún es proporcionar un polipéptido aislado que comprenda una variante de dicho fragmento, en el que hay una variación como máximo de 10, preferiblemente de 5, 4, 3, 2 o 1 restos de aminoácidos.

Otro objeto es proporcionar combinaciones de T1R1/T1R3, en las que el T1R1 y/o T1R3 es una variante o un fragmento, y combinaciones de T1R2/T1R3, en las que T1R2 y/o T1R3 es una variante o un fragmento.

Otro objeto aún es proporcionar agonistas o antagonistas de dichos T1R, o sus fragmentos o variantes.

50 Otro objeto aún es proporcionar un péptido que interacciona con el dominio PDZ (denominado en la presente memoria PDZIP), que puede facilitar la expresión en la superficie de proteínas de la membrana plasmática integrales, específicamente GPCR, tales como los T1R. También es un objeto proporcionar vectores que incluyen el PDZIP, células hospedadoras que expresan dichos vectores, y métodos para utilizar el PDZIP para facilitar la

expresión en la superficie.

5 Un objeto preferido es proporcionar ensayos, en especial ensayos de alto rendimiento, para identificar compuestos moduladores del sabor, en particular compuestos moduladores del sabor dulce y del sabor umami. Preferiblemente, dichos ensayos utilizarán una combinación de los T1R, o sus fragmentos o variantes, o genes que codifican dichos T1R, o sus fragmentos o variantes, que se describen en la presente memoria. Más preferiblemente, dichas combinaciones comprenderán hT1R1/hT1R3 y hT1R2/hT1R3.

10 Un objeto especialmente preferido es la identificación de compuestos que modulan los receptores gustativos T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3, por ejemplo, que potencian la capacidad de estos receptores para responder a estímulos gustativos. Por ejemplo, tal como se describe a continuación, se ha descubierto que 5'-IMP o 5'-GMP potencian la sensibilidad del umami (T1R1/T1R3) al L-glutamato. Estos compuestos moduladores pueden potenciar la actividad de diferentes estímulos gustativos del dulce o del umami, y proporcionar sabores potenciados, y/o que se suscite el mismo sabor a una concentración reducida del compuesto particular que suscita el sabor dulce o umami, cuya actividad potencia un modulador gustativo identificado utilizando los ensayos de la presente invención.

15 Otro objeto aún es proporcionar ensayos preferidos para evaluar uno o más compuestos para un sabor que comprende: una etapa de poner en contacto dichos uno o más compuestos con al menos uno de los T1R, sus fragmentos o variantes descritos, preferiblemente combinaciones de T1R humanos.

20 Un objeto más específico es proporcionar un método para seleccionar uno o más compuestos por su capacidad para potenciar, imitar, bloquear y/o modular la percepción del sabor dulce en un mamífero, preferiblemente en un ser humano, que comprende una etapa de poner en contacto uno o más compuestos con una combinación de hT1R2 y hT1R3, o un complejo que comprende un fragmento, una quimera, o una variante de hT1R2 y/o hT1R3.

25 Otro objeto específico es proporcionar un método para seleccionar uno o más compuestos por su capacidad para potenciar, imitar, bloquear y/o modular la percepción del sabor, en especial la percepción del sabor umami en un mamífero, preferiblemente un ser humano, que comprende una etapa de poner en contacto dichos uno o más compuestos con una combinación de hT1R1 y hT1R3, o un complejo que comprende un fragmento, una quimera, o una variante de hT1R1 y hT1R3.

Otro objeto específico es producir células que coexpresan hT1R2 y hT1R3, o su fragmento, variante o quimera, para su uso para identificar compuestos que potencian, imitan, bloquean y/o modulan la percepción del sabor, en especial la percepción del sabor dulce.

30 Otro objeto específico es producir células que coexpresan hT1R1 y hT1R3, o su fragmento, variante o quimera, para su uso en ensayos para identificar compuestos que potencian, imitan, bloquean y/o modulan la percepción del sabor, en especial la percepción del sabor umami.

Otro objeto es producir animales no humanos que se han modificado genéticamente para que expresen o para que no expresen uno o más T1R.

35 Otro objeto aún es utilizar un compuesto identificado utilizando un ensayo que emplea T1R, o una combinación de éstos, como ingredientes aromatizantes en composiciones alimentarias y de bebidas. En particular, un objeto es utilizar un compuesto que interacciona con hT1R2 y/o hT1R3 como bloqueante, potenciador, modulador o imitador del sabor dulce, y un compuesto que interacciona con hT1R1 y/o hT1R3 como bloqueante, potenciador, modulador o imitador del sabor umami, en composiciones alimentarias y de bebidas.

40 Otro objeto es utilizar T1R, en particular T1R no humanos, para identificar compuestos que modulan el sabor de formulaciones de piensos para animales para su uso, por ejemplo, en piscicultura.

Un objeto preferido es proporcionar líneas celulares eucariotas, preferiblemente de mamífero o de insecto, que coexpresen de forma estable hT1R1/hT1R3 o hT1R2/hT1R3, preferiblemente líneas celulares HEK-293, que también expresen una proteína G, por ejemplo, G α 15 u otra proteína G que, cuando se expresa en asociación con T1R2/T1R3 o T1R1/T1R3, produce un receptor gustativo funcional.

45 Otro objeto preferido es proporcionar líneas celulares eucariotas, preferiblemente de mamífero o de insecto, que expresen de forma estable T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3, preferiblemente hT1R1/hT1R3 o hT1R2/hT1R3. En una realización preferida, dichas líneas celulares comprenderán células HEK-293 que expresen de forma estable G α 15 u otra proteína G que se asocia con T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3 para producir un receptor gustativo del dulce o umami funcional.

50 También es un objeto proporcionar ensayos, preferiblemente ensayos de alto rendimiento, que emplean HEK-293 u otras líneas celulares que expresen de forma estable o transitoria T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3, en condiciones constitutivas o inducibles, para identificar compuestos que modulen el sabor dulce o umami.

Otro objeto específico es identificar compuestos que potencian, imitan, bloquean y/o modulan el receptor gustativo del umami T1R1/T1R3, basándose en su capacidad para afectar la unión del lactisol (un inhibidor del sabor dulce) o

un compuesto relacionado desde el punto de vista estructural con el receptor gustativo T1R1/T1R3 (umami).

Por consiguiente, la presente invención proporciona un receptor gustativo formado al menos por un polipéptido de T1R2 y al menos un polipéptido de T1R3, en el que dicho receptor gustativo se une específicamente y/o se activa por un estímulo de sabor dulce, en el que dicho polipéptido de T1R2 se selecciona del grupo que consiste en:

5 (a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a la SEC ID N°: 6, un fragmento de este que tiene una longitud de al menos 40 aminoácidos, o un fragmento de una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la SEC ID N°: 6 y que tiene una longitud de al menos 20 aminoácidos;

(b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con el complemento inverso de la SEC ID N°: 10; y

10 (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con el complemento inverso de un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEC ID N°: 6;

y en el que dicho polipéptido de T1R3 se selecciona del grupo que consiste en:

(d) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a la SEC ID N°: 7, un fragmento de este que tiene una longitud de al menos 40 aminoácidos, o un fragmento de una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la SEC ID N°: 7 y que tiene una longitud de al menos 20 aminoácidos;

(e) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con el complemento inverso de la SEC ID N° :9; y

(f) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con el complemento inverso de un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEC ID N°: 7.

20 Además, la presente invención proporciona una composición que comprende el receptor descrito anteriormente, en el que al menos uno de los polipéptidos de T1R se acopa a aminoácidos que representan todo o parte de otro receptor acoplado a proteína G. Además, la presente invención proporciona una célula hospedadora que expresa el receptor. También se proporciona un vector de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica el receptor.

25 Además, la invención proporciona un método para identificar compuestos que modulan la percepción del sabor mediante la identificación de compuestos que se unen, activan, inhiben y/o modulan el receptor descrito anteriormente.

Breve descripción de las figuras

30 La figura 1 contiene un alineamiento de secuencias de T1R humano y de rata, del receptor detector de calcio humano, y del receptor de glutamato metabotrópico de rata.

La figura 2 contiene los resultados experimentales de una amplificación mediante RT-PCR que demuestran que hT1R2 y hT1R3 se expresan en el tejido gustativo.

35 La figura 3a-3b contiene datos funcionales (respuestas de calcio intracelular) producidos por diferentes estímulos de sabor dulce en células HEK que expresan de forma estable $G_{\alpha 15}$ que están transfectadas de modo transitorio con T1R2, T1R3, y T1R2/T1R3 humanos a diversas concentraciones de estímulos de sabor dulce (figura 3a); las respuestas a las dosis de T1R2/T1R3 humano para varios estímulos de sabor dulce (figura 3b); las respuestas de T1R2/T1R3 humano a la sacarosa en presencia de gurmarina, y las respuestas del receptor $\beta 2$ -adrenérgico endógeno al isoproterenol en presencia de gurmarina. La figura 3c contiene la respuesta normalizada a diferentes edulcorantes.

40 La figura 4 contiene las respuestas de calcio intracelular en células HEK que expresan de forma estable $G_{\alpha 15}$, transfectadas de modo transitorio con hT1R2/hT1R3, rT1R2/rT1R3, hT1R2/rT1R3 y rT1R2/hT1R3 en respuesta a sacarosa 350 mM, triptófano 25 mM, aspartamo 15 mM, y monelina al 0,05%.

45 La figura 5 contiene los resultados de un ensayo basado en un reactor de placas de fluorescencia, en el que células HEK que expresan de modo estable $G_{\alpha 15}$ se transfectaron de forma transitoria con hT1R2 y hT1R3, o sólo con hT1R3, y se pusieron en contacto con el tinte de calcio Fluo-4 y un estímulo de sabor dulce (ciclato 12,5 mM).

La figura 6 contiene curvas de respuesta a la dosis normalizadas que demuestran que hT1R2 y hT1R3 actúan en combinación como receptor del dulce humano, basándose en su interacción específica de la dosis con diversos estímulos dulces (trp, ciclato, sacarosa, neotamo, aspartamo, sacarina y Acek).

50 La figura 7 contiene información estructural relacionada con mGluR1 y T1R1 que demuestra que se observan restos clave de unión al ligando en estas moléculas.

5 La figura 8a-8c contiene datos funcionales que demuestran que células HEK que expresan de forma estable $G\alpha_{15}$, que están transfectadas de modo transitorio con T1R1/T1R3, responden al glutamato en un ensayo basado en el calcio intracelular. La figura 8a demuestra que el calcio intracelular aumenta en respuesta a concentraciones crecientes de glutamato; la figura 8b demuestra que el calcio intracelular responde a IMP (2 mM), glutamato (0,5 mM) e IMP 0,2 mM; y la figura 8c muestra las respuestas de T1R1/hT1R3 humano al glutamato en presencia y ausencia de IMP 0,2 mM.

Las figuras 9a-9b, respectivamente, contienen los resultados de un ensayo de tinción de inmunofluorescencia utilizando hT1R2 marcado con Myc, y un experimento FACS que demuestra que la incorporación del péptido PDZIP (SEC ID N°:6) potencia la expresión de un T1R (hT1R2) sobre la membrana plasmática.

10 La figura 10a a 10b contiene datos de formación de imágenes de calcio que demuestran que hT1R2/hT1R3 responde a diferentes estímulos dulces.

La figura 11 muestra las respuestas de líneas celulares que expresan de modo estable hT1R1/hT1R3 mediante la formación de imágenes de fluorescencia automática, a estímulos de sabor umami.

15 La figura 12 muestra las respuestas de una línea celular que expresa de modo estable hT1R2/hT1R3 mediante la formación de imágenes de fluorescencia automática, a estímulos de sabor dulce.

La figura 13 muestra las curvas de respuesta a la dosis determinadas utilizando la formación de imágenes de fluorescencia automática, para una línea celular que expresa de modo inducible el receptor gustativo T1R1/T1R3 humano para el L-glutamato en presencia y en ausencia de IMP 0,2 mM.

20 Las figuras 14 y 15 muestran la respuesta de una línea celular que expresa de modo inducible el receptor gustativo T1R1/T1R3 humano (clon I-17) a un panel de L-aminoácidos. En la figura 14, se ensayaron diferentes C-aminoácidos a 10 mM en presencia y en ausencia de IMP 1 mM. En la figura 15, se determinaron las respuestas a la dosis para aminoácidos activos en presencia de IMP 0,2 mM.

La figura 16 demuestra que el lactisol inhibe las actividades de receptor de T1R2/T1R3 humano y T1R1/T1R3 humano.

25 Descripción detallada de la Invención

Por tanto, la invención proporciona receptores gustativos funcionales, preferiblemente receptores gustativos humanos, que se producen mediante la coexpresión de una combinación de diferentes T1R, T1R2/T1R3, y sus correspondientes secuencias de ácidos nucleicos aisladas comprendidas en vectores de expresión que, tras la coexpresión, producen un receptor gustativo funcional, es decir, un receptor gustativo del dulce (T1R2/T1R3).

30 Tal como se ha indicado en la bibliografía, se conocen miembros de la familia de T1R de GPCR específicos de células gustativas, y se identifican en Hoon *et al.*, *Cell*, 96:541-551 (1999), y en los documentos WO 00/06592, WO 00/06593, y US 2003008344 (n° de serie U.S. 09/799.629).

35 Más en concreto, la invención se refiere a la coexpresión de los GPCR específicos de células gustativas T1R2/T1R3. Estos ácidos nucleicos y los receptores que codifican se denominan miembros de la familia "T1R" de GPCR específicos de células gustativas. En realizaciones concretas de la invención, los miembros de la familia T1R que se coexpresan incluirán: rT1R2, rT1R3, mT1R2, mT1R3, hT1R2, y hT1R3. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se cree que estos GPCR específicos de células gustativas son componentes de la vía de transducción del gusto, y están implicados en la detección del sabor de estímulos de sabor dulce.

40 En la presente memoria se establece que los miembros de la familia T1R actúan en combinación con otros miembros de la familia T1R para actuar como receptores gustativos del dulce y del umami. Tal como se describirá con más detalle a continuación en los ejemplos experimentales, se ha demostrado que células heterólogas que coexpresan hT1R2 y hT1R3 son selectivamente activadas por estímulos gustativos del dulce de una manera que refleja el gusto dulce humano. Por ejemplo, células HEK-293- $G\alpha_{15}$ que coexpresan hT1R2 y hT1R3 responden específicamente al ciclamato, sacarosa, aspartamo y sacarina, y las respuestas a las dosis para estos compuestos se correlacionan con los umbrales psicofísicos de detección del gusto. Por tanto, las células que coexpresan hT1R2 y hT1R3 pueden utilizarse en selecciones, preferiblemente selecciones de alto rendimiento, para identificar compuestos que imiten, modulen, bloqueen y/o potencien la sensación de sabor dulce.

45 Además, según apoyan los datos en los ejemplos experimentales, se ha demostrado que células que coexpresan hT1R1 y hT1R3 son selectivamente activadas por el glutamato (glutamato de monosodio) y por 5'-ribonucleótidos de una manera que refleja el gusto umami humano. Por ejemplo, células HEK-293- $G\alpha_{15}$ que coexpresan hT1R1 y hT1R3 responden específicamente al glutamato, y las respuestas a las dosis para esto compuesto con sabor umami se correlacionan con su umbral de detección del gusto psicofísico. Además, 5'-ribonucleótidos, tales como IMP, potencian la respuesta al glutamato del receptor T1R1/T1R3, una sinergia característica del sabor umami. Por tanto, las células que coexpresan hT1R1 y hT1R3 pueden utilizarse en selecciones, preferiblemente selecciones de alto rendimiento, para identificar compuestos que imiten, modulen, bloqueen y/o potencien la sensación de sabor umami.

Además, tal como muestran los datos experimentales en los ejemplos, se ha demostrado que células que coexpresan T1R1/T1R3 de forma estable e inducible responden selectivamente a los estímulos de sabor umami L-glutamato y L-aspartato, y sólo responden débilmente a otros L-aminoácidos y a concentraciones mucho mayores, lo cual proporciona más pruebas de que el receptor T1R1/T1R3 puede utilizarse en ensayos para identificar compuestos que modulen (potencien o bloqueen) los estímulos de sabor umami.

Además, según apoyan los datos experimentales en los ejemplos, se ha demostrado que líneas celulares que coexpresan T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3 respectivamente responden a estímulos de sabor umami o dulce y de una manera de respuesta a la dosis cuantitativa, que apoya aún más la conclusión de que los receptores T1R1/T1R3 y T1R2/T1R3 pueden utilizarse para identificar agonistas y antagonistas de receptores, por ejemplo, sustitutos de MSG, bloqueantes del sabor umami, nuevos edulcorantes artificiales y naturales, y bloqueantes del sabor dulce.

Además, según apoyan los datos en los ejemplos experimentales, se ha demostrado que el bloqueante del sabor dulce lactisol inhibe el receptor gustativo del dulce T1R2/T1R3 y el receptor gustativo del umami T1R1/T1R3. Esto sugiere que los ensayos que seleccionan compuestos que afectan a la unión del lactisol a T1R2/T1R3 o T1R1/T1R3 pueden utilizarse para identificar compuestos que potencien, imiten, modulen o bloqueen el sabor dulce o umami. El hecho de que el lactisol inhibe los receptores T1R1/T1R3 y T1R2/T1R3 sugiere que estos receptores pueden compartir una subunidad común a la que se une el lactisol y potencialmente otros moduladores del sabor. Por tanto, esto sugiere que algunos compuestos que potencian, imitan, modulan o bloquean el sabor dulce pueden tener un efecto similar sobre el sabor umami o viceversa.

Además, según apoyan los datos en los ejemplos experimentales, se ha demostrado que líneas celulares que coexpresan de modo estable T1R, es decir, T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3, cuando se ensayan mediante formación de imágenes de fluorescencia automáticas responden con mucha eficacia a diversos estímulos de sabor dulce y umami, es decir, a magnitudes sustancialmente mayores que las células transfectadas de modo transitorio. Por tanto, estas líneas celulares resultan especialmente adecuadas para su uso en ensayos de selección de alto rendimiento para identificar compuestos que modulen, bloqueen, imiten o potencien el sabor dulce o umami. Sin embargo, la invención también incluye ensayos que utilizan células que expresan de modo transitorio un receptor T1R2/T1R3.

Además, aunque la solicitud contiene datos que demuestran que algunos T1R actúan en combinación, en particular T1R1/T1R3 y T1R2/T1R3, y que estas combinaciones de receptores pueden utilizarse en ensayos, preferiblemente ensayos de alto rendimiento, debe advertirse que la presente solicitud también prevé ensayos que utilicen T1R1, T1R2 y T1R3 de modo individual o en combinación con otras proteínas, por ejemplo, otros GPCR.

Los compuestos identificados con ensayos de T1R pueden utilizarse para modular el sabor de alimentos y bebidas. Los ensayos adecuados descritos con más detalle a continuación incluyen, como ejemplo, ensayos de células completas y ensayos bioquímicos, incluyendo ensayos de unión directa utilizando uno de una combinación de diferentes receptores T1R, sus quimeras o fragmentos, en especial fragmentos que contienen dominios de unión al ligando N-terminales. Los ejemplos de ensayos apropiados para su uso en la invención se describen con más detalle a continuación y se conocen en el campo de los GPCR.

Los ensayos pueden diseñarse para cuantificar la unión de diferentes compuestos o mezclas de compuestos a receptores gustativos T1R o combinaciones de receptores gustativos T1R o receptores T1R expresados en combinación con otras proteínas heterólogas (que no sean T1R), por ejemplo, otros GPCR, o para cuantificar la activación de células que expresan receptores gustativos T1R. Esto puede efectuarse mediante la expresión estable o transitoria de receptores gustativos en células heterólogas, tales como células HEK-293, CHO y COS.

Los ensayos preferiblemente también utilizarán células que también expresen (preferiblemente de modo estable) una proteína G, tal como G α 15 o G α 16 u otras proteínas G promiscuas o variantes de proteína G, o una proteína G endógena. Además también pueden expresar proteínas G β y G γ .

El efecto de un compuesto sobre el gusto dulce o umami utilizando células o composiciones que expresen o contengan los receptores o las combinaciones de receptores identificados anteriormente puede determinarse por diversos medios, incluyendo el uso de tintes sensibles al calcio, tintes sensibles al voltaje, ensayos de AMPc, ensayos de unión directa utilizando ligandos marcados con fluorescencia o ligandos radiactivos, tales como ³H-glutamato, o ensayos transcripcionales (utilizando un indicador adecuado, tal como luciferasa o beta-lactamasas).

Los ensayos que pueden utilizarse con uno o más T1R según la descripción incluyen, como ejemplo, ensayos que utilicen una selección genética para células vivas; ensayos que utilicen células completas o fragmentos de membranas o proteínas de T1R purificadas; ensayos que utilicen segundos mensajeros, tales como AMPc e IP3, ensayos que detecten la translocación de la arrestina hacia la superficie celular, ensayos que detecten la pérdida de expresión del receptor sobre la superficie celular (internalización) por ligandos ensayados, ensayos de unión al ligando directos, ensayos de unión competitiva con inhibidores, ensayos que empleen una proteína traducida *in vitro*, ensayos que detecten cambios conformacionales tras la unión a un ligando (por ejemplo, según se evidencia mediante una proteólisis, fluorescencia, o RMN), ensayos de comportamiento que utilicen animales no humanos transgénicos que expresen un T1R o una combinación de T1R, tales como moscas, gusanos o ratones, o ensayos

que utilicen células infectadas con virus recombinantes que contienen genes de T1R.

También se consideran los análisis basados en la estructura, en los que se determina la estructura cristalina de rayos X de un T1R o de un fragmento de T1R (o una combinación de T1R, o una combinación de un T1R con otra proteína) y se utiliza para predecir, mediante técnicas de modelado molecular, los compuestos que se unirán y/o potenciarán, imitarán, bloquearán o modularán el receptor o la combinación de receptores T1R particular. Más en concreto, la descripción prevé la determinación de la estructura cristalina de T1R1/T1R3 (preferiblemente hT1R1/hT1R3) y/o T1R2/T1R3 (preferiblemente hT1R2/hT1R3), y el uso de dichas estructuras cristalinas en métodos de diseño basados en la estructura para identificar moléculas que modulen la actividad del receptor T1R.

La invención incluye, en especial, ensayos bioquímicos realizados utilizando células, por ejemplo, células de mamífero, levadura, insecto u otras células heterólogas que expresen los receptores gustativos de la presente invención, preferiblemente receptores que comprendan los dominios N-terminales de T1R2 y/o T1R3. El efecto de un compuesto en estos ensayos puede determinarse utilizando ensayos de unión competitiva, por ejemplo, utilizando glutamato o IMP radiactivo, fluorescencia (por ejemplo, polarización de fluorescencia, FRET), o ensayos de unión de $GTP\gamma^{35}S$. Tal como se ha indicado, en una realización preferida, estos ensayos utilizarán líneas celulares que coexpresen de forma estable T1R2/T1R3 y una proteína G adecuada, tal como $G_{\alpha 15}$. Otras proteínas G apropiadas incluyen las proteínas G quiméricas y variantes descritas en el documento US 2002/0143151 (solicitudes de EEUU nº de serie 09/984.292 y 60/243.770).

Además, pueden construirse y expresarse receptores alterados que tengan propiedades mejoradas, por ejemplo, una expresión en la superficie potenciada o el acoplamiento a proteína G. Estas variantes de T1R pueden incorporarse en ensayos basados en células y bioquímicos.

Se prevé que los descubrimientos de la presente memoria que están relacionados con el T1R humano se extenderán a otras especies, por ejemplo, a roedores, cerdos, monos, perros y gatos, y quizás a otros no mamíferos, tales como peces. A este respecto, en el siguiente ejemplo 1 se identifican varios fragmentos de T1R de pez. Por tanto, la presente invención tiene aplicación en la selección de compuestos para su uso en formulaciones de pienso animal.

La invención también incluye la utilización de diferentes variantes alélicas de T1R2 y T1R3, y sus combinaciones, permitiendo con ello la identificación de compuestos que provoquen una sensación gustativa específica en individuos que expresen estas variantes alélicas, o compuestos que provocan sensaciones gustativas específicas en todos los individuos. Estos compuestos pueden utilizarse para fabricar alimentos que sean en general más sabrosos.

Los ácidos nucleicos que codifican T1R también proporcionan sondas valiosas para la identificación de células gustativas, puesto que los ácidos nucleicos se expresan específicamente en células gustativas. Por ejemplo, pueden emplearse sondas para polipéptidos y proteínas de T1R para identificar células gustativas presentes en las papilas foliadas, circunvaladas y fungiformes, así como células gustativas presentes en la franja del sabor, la cavidad oral, el epitelio gastrointestinal, y la epiglotis. En particular, pueden utilizarse los métodos para detectar T1R para identificar células gustativas sensibles a estímulos de sabor dulce y/o umami u otros estímulos de sabores que representen otras modalidades gustativas. Por ejemplo, a partir del trabajo presentado en la presente memoria, puede predecirse que células que expresen de forma estable o transitoria T1R2 y/o T1R3 responderán a estímulos de sabor umami. De forma similar, puede predecirse que células que expresen T1R1 y/o T1R3 responderán a estímulos de sabor umami. Los ácidos nucleicos que codifican las proteínas y los polipéptidos de T1R de la invención pueden aislarse a partir de una diversidad de fuentes, pueden modificarse genéticamente, amplificarse, sintetizarse y/o expresarse de modo recombinante según los métodos descritos en el documento WO 00/035374.

En los ejemplos se proporciona un listado de T1R2 y T1R3 que pueden expresarse según la invención. Sin embargo, debe enfatizarse que la invención incluye la expresión y el uso de otros T1R2 y T1R3 específicos o de fragmentos, variantes o quimeras construidos basándose en dichas secuencias de T1R y, en particular, los T1R de otras especies que tengan la longitud y el porcentaje de identidad de secuencia o la capacidad de hibridación requeridos.

Tal como se describe, un aspecto importante de la invención es la pluralidad de métodos de selección de moduladores, por ejemplo, activadores, inhibidores, estimulantes, potenciadores, agonistas y antagonistas, de estos GPCR específicos de células gustativas. Estos moduladores de la transducción del gusto son útiles para la modulación de las rutas de señalización del gusto. Estos métodos de selección pueden utilizarse para identificar agonistas y antagonistas de alta afinidad de la actividad de las células gustativas. Estos compuestos moduladores pueden entonces utilizarse en la industria alimentaria para adaptar el sabor, por ejemplo, para modular el sabor dulce de alimentos.

Esta invención rectifica la falta de comprensión previa con respecto al sabor dulce, puesto que identifica receptores T1R y combinaciones de receptores T1R específicos que median en la sensación del sabor dulce. Por tanto, en general, esta solicitud se refiere a los descubrimientos de los inventores con relación a la clase T1R de los receptores acoplados a proteína G específicos del gusto y su función específica en la percepción del sabor y la relación de estos descubrimientos con una mejor comprensión de la base molecular del gusto.

La base molecular del gusto dulce y del gusto umami (el sabor del glutamato de monosodio) es enigmática. En fechas recientes, se ha identificado una clase de tres miembros de receptores acoplados a proteína G específicos del gusto, denominada T1R. El solapamiento de los patrones de expresión de T1R y la demostración de que el receptor GABA_B, relacionado desde el punto de vista estructural, es heterodimérico, sugieren que los T1R actúan como receptores gustativos heterodiméricos. En los ejemplos que aparecen a continuación, los inventores de la presente memoria describen la coexpresión funcional de T1R1, T1R2 y T1R3 humanos en células heterólogas; las células que coexpresan T1R1 y T1R3 son activadas por estímulos de sabor umami; y las células que coexpresan T1R2 y T1R3 son activadas por estímulos de sabor dulce. La actividad T1R1/T1R3 y T1R2/T1R3 se correlaciona con los umbrales de detección psicofísicos. Además, se ha descubierto que el 5'-ribonucleótido IMP potencia la respuesta de T1R1/T1R3 al glutamato, una sinergia característica del sabor umami. Estos descubrimientos demuestran que los T1R específicos y, en particular, diferentes combinaciones de los T1R actúan como receptores gustativos del dulce y umami.

Se cree que la percepción humana del sabor amargo, dulce y umami está mediada por receptores acoplados a proteína G (Lindemann, B., *Physiol. Rev.*, 76:718-766 (1996)). En fechas recientes, la evaluación del genoma humano reveló la clase T2R de receptores gustativos del sabor amargo (Adler et al., *Cell*, 100:613-702 (2000); Chandrashekar et al., *Cell*, 100:703-711 (2000); Matsunami et al., *Nature*, 404:601-604 (2000)), pero los receptores gustativos para el sabor dulce y umami no se han identificado. Recientemente, se ha identificado otra clase de receptores gustativos candidatos, los T1R. Los T1R se identificaron en primer lugar secuenciación a gran escala de una biblioteca de ADNc derivada de tejido gustativo de rata, que identificó a T1R1, y posteriormente mediante PCR degenerada basada en T1R1, que condujo a la identificación de T1R2 (Hoon et al., *Cell*, 96:541-551 (1999)). En fechas recientes, los inventores de la presente invención y otros identificaron un tercer miembro -y posiblemente final- de la familia T1R, T1R3, en la base de datos del genoma humano (Kitagawa et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 283(1):236-242 (2001); Max et al., *Nat. Genet.*, 28(1):58-63 (2001); Sainz et al., *J. Neurochem.*, 77(3):896-903 (2001); Montmayeur et al., *Nat. Neurosci.*, 4, 492-498 (2001)). De forma reveladora, el T1R3 de rata mapea en un intervalo genómico que contiene *Sac*, un locus que influye en el gusto dulce en el ratón (Fuller et al., *J. Hered.*, 65:33-36 (1974); Li et al., *Mamm. Genome*, 12:13-16 (2001)). Por tanto, se predijo que T1R3 actuaría como un receptor gustativo del dulce. Recientes estudios de mapeo genético de alta resolución han reforzado la conexión entre T1R3 de ratón y *Sac* (Fuller T.C., *J. Hered.*, 65(1):33-36 (1974); Li et al., *Mamm. Genome*, 12(1):13-16 (2001)).

De forma interesante, todos los receptores de la familia C que se han expresado funcionalmente hasta la fecha -receptores de glutamato metabotrópicos, el receptor GABA_B, el receptor detector de calcio (Conigrave, A.D., Quinn, S.J. y Brown, E.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 4814-4819 (2000)), y un receptor olfativo de pez (Specia, D.J. et al., *Neuron*, 23, 487-498 (1999))- han demostrado ser activados por aminoácidos. Esta característica común plantea la posibilidad de que los T1R reconozcan aminoácidos, y que los T1R puedan estar implicados en la detección del glutamato además de los aminoácidos de sabor dulce. Como alternativa, se ha propuesto que una variante transcripcional del receptor de glutamato metabotrópico mGluR4 sea el receptor gustativo del umami debido a su expresión selectiva en el tejido gustativo de ratas, y la similitud del umbral de activación del receptor con el umbral de detección psicofísico del glutamato (Chaudhari et al., *Nat. Neurosci.*, 3:113-119 (2000)). Esta hipótesis es difícil de reconciliar con el nivel de expresión extremadamente bajo de la variante mGluR4 en tejido gustativo, y el gusto de glutamato más o menos inalterado de ratones con mGluR4 inactivado (Chaudhari y Roper, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 855:398-406 (1998)). Además, la variante gustativa es poco probable desde el punto de vista estructural, no sólo porque carece de la mayoría de los restos que forman el bolsillo de unión al glutamato del receptor de tipo silvestre, sino también porque carece de aproximadamente la mitad del dominio de unión al glutamato N-terminal globular (Kunishima et al., *Nature*, 407:971-977 (2000)).

Un análisis comparativo de los patrones de expresión de T1R en roedores ha demostrado que cada T1R2, y probablemente T1R1, se coexpresan con T1R3 (Hoon et al., *Cell*, 96:541-551 (1999); Kitagawa et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 283:236-242 (2001); Max et al., *Nat. Genet.*, 28:58-63 (2001); Montmayeur et al., *Nat. Neurosci.*, 4:492-498 (2001); Sainz et al., *J. Neurochem.*, 77:896-903 (2001)). Además, la dimerización está surgiendo como un tema común de los receptores de la familia C: el receptor de glutamato metabotrópico y el receptor detector de calcio son homodímeros (Romomano et al., *J. Biol. Chem.*, 271:28612-28616 (1996); Okamoto et al., *J. Biol. Chem.*, 273:13089-13096 (1998); Han et al., *J. Biol. Chem.*, 274:100008-100013 (1999); Bai et al., *J. Biol. Chem.*, 273:23605-23610 (1998)), y el receptor GABA_B, relacionado desde el punto de vista estructural, es heterodimérico (Jones et al., *Nature*, 396:674-679 (1998); Kaupmann et al., *Nature*, 396:683-687 (1998); White et al., *Nature*, 396:679-682 (1998); Kuner et al., *Science*, 283:74-77 (1999)). Los inventores de la presente invención han demostrado, mediante la coexpresión funcional de T1R en células heterólogas, que el T1R2 humano actúa en combinación con el T1R3 humano como receptor gustativo del dulce, y que el T1R1 humano actúa en combinación con el T1R3 humano como receptor gustativo del umami.

Los descubrimientos analizados en la presente memoria son especialmente significativos, puesto que previamente el desarrollo de edulcorantes artificiales mejorados se ha visto dificultado por la falta de ensayos del sabor dulce. En efecto, los cinco edulcorante artificiales comerciales que se emplean con más frecuencia, todos los cuales activan el hT1R2/hT1R3, se descubrieron de forma casual fortuita. De manera similar, no existen otros ensayos, aparte de los ensayos sensoriales, que son un proceso muy laborioso, para identificar compuestos que modulen el gusto umami. Estos problemas ahora se ven aliviados porque, según se establece mediante los resultados experimentales

analizados a continuación, se han identificado los receptores gustativos del dulce y del umami humanos, y se han desarrollado ensayos para estos receptores, en particular ensayos que emplean células que expresan de forma estable un receptor gustativo T1R funcional, es decir, el receptor gustativo del dulce o del umami.

5 Basándose en estos, la invención proporciona ensayos para detectar y caracterizar compuestos moduladores del sabor, en los que los miembros de la familia T1R actúan, al igual que lo hacen en la papila gustativa, como moléculas indicadoras para el efecto en el sabor dulce y umami de los compuestos moduladores del sabor. Se proporcionan en particular, y están dentro de la invención, ensayos para identificar compuestos que modulen, imiten, potencien y/o bloqueen el sabor dulce. Los métodos para ensayar la actividad de GPCR, y en especial compuestos que afectan a la actividad GPCR, son muy conocidos y son aplicables al miembro de la familia T1R de la presente
10 invención y sus combinaciones funcionales. Anteriormente se han identificado los ensayos adecuados.

En particular, los GPCR de la presente invención pueden utilizarse en ensayos, por ejemplo para medir los cambios en la unión de ligandos, la concentración iónica, el potencial de membrana, el flujo de corriente, el flujo de iones, la transcripción, las interacciones de ligando-receptor, las concentraciones de segundos mensajeros, *in vitro* e *in vivo*. En otra realización, los miembros de la familia T1R pueden expresarse de modo recombinante en células, y la modulación de la transducción del gusto a través de la actividad GPCR puede ensayarse midiendo los cambios en los niveles de Ca^{2+} y otros mensajeros intracelulares, tales como AMPc, GMPc, o IP_3 .
15

En ciertos ensayos, un dominio de un polipéptido de T1R, por ejemplo, un dominio extracelular, transmembrana o intracelular, se condensa con un polipéptido heterólogo, formando con ello un polipéptido quimérico, por ejemplo, una proteína quimérica con actividad GPCR. En particular se contempla el uso de fragmentos de T1R1, T1R2 o T1R3 que contengan el dominio de unión al ligando N-terminal. Estas proteínas son útiles, por ejemplo, en ensayos para identificar ligandos, agonistas, antagonistas u otros moduladores de receptores T1R. Por ejemplo, un polipéptido de T1R puede expresarse en una célula eucariota como un receptor quimérico con una secuencia de chaperona heteróloga que facilite el tráfico en la membrana plasmática, o la maduración y el transporte dirigido a través de la vía secretora. La secuencia heteróloga opcional puede ser un péptido que interactúe con el dominio PDZ, tal como un fragmento del PDZIP C-terminal (SEC ID N°:1). El PDZIP es una señal de exportación de ER que, según la presente descripción, se ha demostrado que facilita la expresión en la superficie de proteínas heterólogas, tales como los receptores T1R descritos en la presente memoria. Más en concreto, en un aspecto de la descripción, el PDZIP puede utilizarse para estimular el transporte dirigido de modo adecuado de proteínas de membrana problemáticas, tales como receptores olfativos, receptores gustativos T2R, y los receptores gustativos T1R descritos en la presente memoria.
20
25
30

Estos receptores T1R quiméricos pueden expresarse en cualquier célula eucariota, tales como células HEK-293. Preferiblemente, las células que contienen una proteína G, preferiblemente una proteína G promiscua, tal como $G_{\alpha 15}$ o $G_{\alpha 16}$ u otro tipo de proteína G promiscua capaz de conectar a una amplia gama de GPCR a una vía de señalización intracelular o a una proteína señalizadora, tal como fosfolipasa C. La activación de estos receptores quiméricos en estas células puede detectarse utilizando cualquier método convencional, tal como mediante la detección de cambios en el calcio intracelular mediante la detección de la fluorescencia dependiente de FURA-2 en la célula. Si las células hospedadoras preferidas no expresan una proteína G apropiada, pueden transfectarse con un gen que codifique una proteína G promiscua, tal como los descritos en los documentos US 2002028121 (solicitud de EEUU n° de serie 09/984.297, presentada el 29 de octubre de 2001) y US 20020143151 (solicitud de EEUU n° de serie 09/989.497, presentada el 21 de noviembre de 2001).
35
40

Otros métodos para ensayar moduladores de la transducción del gusto incluyen ensayos de unión a ligandos *in vitro* que emplean polipéptidos de T1R, porciones de estos, es decir, el dominio extracelular, la región transmembrana o sus combinaciones, o proteínas quiméricas que comprenden uno o más dominios de un miembro de la familia T1R; oocitos o células de cultivo de tejidos que expresan polipéptidos de T1R, fragmentos, o proteínas de fusión; la fosforilación y la desfosforilación de miembros de la familia T1R; proteína G que se une a GPCR; ensayos de unión a ligandos; cambios en el voltaje, el potencial de membrana y la conductancia; ensayos de flujo de iones; cambios en los segundos mensajeros intracelulares, tales como GMPc, AMPc e inositol trifosfato (IP_3); y cambios en los niveles de calcio intracelular.
45

Además, la descripción proporciona métodos para detectar la expresión de proteínas y ácidos nucleicos de T1R, que permiten la investigación de la regulación de la transducción del gusto y la identificación específica de células receptoras gustativas. Los miembros de la familia T1R también proporcionan sondas de ácidos nucleicos útiles para investigaciones de paternidad y forenses. 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 la franja del sabor y de la epiglotis. Los receptores T1R también pueden emplearse para generar anticuerpos monoclonales y policlonales útiles para identificar células receptoras gustativas.
50
55

Desde el punto de vista funcional, los polipéptidos de T1R comprenden una familia de receptores acoplados a proteína G 7-transmembrana relacionados, que se cree que están implicados en la transducción del gusto y que pueden interactuar con la proteína G para mediar en la transducción de señales gustativas (véase, por ejemplo, Fong, *Cell Signal*, 8:217 (1996); Baldwin, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6:180 (1994)). Desde el punto de vista estructural, las secuencias de nucleótidos de los miembros de la familia T1R codifican polipéptidos relacionados que comprenden
60

un dominio extracelular, dominios 7-transmembrana, y un dominio citoplásmico. Los genes de la familia T1R relacionados de otras especies comparten al menos aproximadamente 50%, y opcionalmente 60%, 70%, 80% o 90% de coincidencia en la secuencia de nucleótidos a través de una región de al menos aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, opcionalmente de 100, 200, 500 o más nucleótidos de longitud, con las secuencias de ácidos nucleicos de T1R descritas en los ejemplos de la presente memoria, o sus variantes modificadas de modo conservador, o codifican polipéptidos que comparten al menos aproximadamente 35% al 50%, y opcionalmente 60%, 70%, 80% o 90% de coincidencia en la secuencia de aminoácidos a lo largo de una región de al menos 25 aminoácidos de longitud, opcionalmente de 50 a 100 aminoácidos de longitud, con una secuencia de polipéptido de T1R descrita a continuación en los ejemplos, o sus variantes modificadas de modo conservador.

También se han identificado varios dominios o secuencias de aminoácidos consenso que son característicos de los miembros de la familia T1R. Por ejemplo, los miembros del familia T1R generalmente comprenden una secuencia que tiene al menos aproximadamente 50%, opcionalmente 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95-99% o más coincidencia con las secuencias consenso de T1R 1 y 2 (SEC ID N°:2 y 3, respectivamente). Por tanto, estos dominios conservados pueden utilizarse para identificar miembros de la familia T1R, mediante coincidencia, hibridación específica o amplificación, o unión específica por anticuerpos generados contra un dominio. Las secuencias consenso de T1R incluyen, como ejemplo, las siguientes secuencias:

Secuencia consenso de la familia T1R 1: **(SEC ID N°:2)**

(TR)C(FL)(RQP)R(RT)(SPV)(VERKT)FL(AE)(WL)(RHG)E

Secuencia consenso de la familia T1R 2: **(SEC ID N°:3)**

(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 de T1R descritos en la presente memoria, pero puede esperarse que los miembros de la familia T1R procedentes de otros organismos comprendan secuencias consenso que tengan aproximadamente 75% de coincidencia o más con las secuencias consenso incluidas descritas específicamente en la presente memoria.

Pueden emplearse regiones específicas de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de T1R para identificar variantes polimórficas, homólogos interespecíficos, y alelos de miembros de la familia T1R. Esta identificación puede realizarse *in vitro*, por ejemplo, bajo condiciones de hibridación rigurosas o PCR (por ejemplo, utilizando cebadores que codifiquen las secuencias consenso de T1R identificadas anteriormente), o utilizando la información de secuencia en un sistema informático para la comparación con otras secuencias de nucleótidos. Los diferentes alelos de los genes T1R dentro de una única población de una especie también serán útiles para determinar si las diferencias en las secuencias alélicas controlan las diferencias en la percepción del gusto entre los miembros de la población. Una amplificación de tipo PCR y las técnicas de clonación clásicas son útiles para aislar nuevos T1R, por ejemplo, cuando son suficientes cebadores degenerados para detectar genes relacionados entre especies.

Generalmente, puede realizarse la identificación de variantes polimórficas y alelos de los miembros de la familia T1R comparando una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 25 aminoácidos o más, por ejemplo, 50-100 aminoácidos. Una coincidencia de aminoácidos de aproximadamente al menos 35% al 50%, y opcionalmente 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95-99% o más generalmente demuestra que una proteína es una variante polimórfica, un homólogo interespecífico, o un alelo de un miembro de la familia T1R. Puede realizarse una comparación de secuencias utilizando cualquiera de los algoritmos de comparación de secuencias analizados a continuación. También pueden emplearse anticuerpos que se unan específicamente a polipéptidos de T1R o a regiones conservadas de estos, para identificar alelos, homólogos interespecíficos y variantes polimórficas.

Las variantes polimórficas, los homólogos interespecíficos y los alelos de los genes T1R pueden confirmarse estudiando la expresión específica de células gustativas del gen o proteína de supuestos T1R. Generalmente, los polipéptidos de T1R que tienen una secuencia de aminoácidos descrita en la presente memoria pueden utilizarse como control positivo en comparación con el polipéptido de T1R putativo, para demostrar la identificación de una variante polimórfica o de un alelo del miembro de la familia T1R. Se espera que las variantes polimórficas, los homólogos interespecíficos y los alelos conserven la estructura de 7-transmembrana de un receptor acoplado a proteína G. Para más detalles, véase el documento WO 00/06592, que describe miembros de la familia T1R relacionados, GPCR-B3, cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria como referencia de una manera coherente con esta descripción. En la presente memoria, los receptores GPCR-B3 se denominan rT1R1 y mT1R1. Además, véase el documento WO 00/06593, que también describe miembros de la familia T1R relacionados, GPCR-B4. Los receptores GPCR-B4 se denominan en la presente memoria rT1R2 y mT1R2. Tal como se ha analizado previamente, la descripción también incluye ensayos basados en la estructura que utilizan la estructura cristalina de rayos X de un T1R o de una combinación de T1R, por ejemplo, hT1R2/hT1R3 o hT1R1/hT1R3, para identificar moléculas que modulen la actividad del receptor T1R y, por tanto, que modulen el sabor dulce y/o umami.

La presente invención también proporciona ensayos, preferiblemente ensayos de alto rendimiento, para identificar moléculas que potencien, imiten, bloqueen y/o modulen los receptores T1R. En algunos ensayos, se emplea un

dominio concreto de un miembro de la familia T1R en combinación con un dominio concreto de otro miembro de la familia T1R, por ejemplo, una región o dominio extracelular, transmembrana o intracelular. En otras realizaciones, un dominio extracelular, una región transmembrana o una combinación de estos puede unirse a un sustrato sólido y emplearse, por ejemplo, para aislar ligandos, agonistas, antagonistas o cualquier otra molécula que pueda unirse a un polipéptido de T1R y/o modular su actividad.

Se prevé que diversas mutaciones y sustituciones conservadoras estén dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, está dentro del nivel de los expertos en la técnica la realización de sustituciones de aminoácidos empleando protocolos conocidos de tecnología de genes recombinantes que incluye PCR, clonación génica, mutagénesis de ADNc específica dirigida a sitio, transfección de células hospedadoras, y transcripción *in vitro*. Después, las variantes pueden seleccionarse para determinar su actividad.

Definiciones

Tal como se emplean en la presente memoria, los siguientes términos y expresiones tienen los significados atribuidos a ellos, a menos que se indique lo contrario.

Las "células gustativas" incluyen células neuroepiteliales que se organizan en grupos para formar papilas gustativas en la lengua, por ejemplo, células foliadas, fungiformes y circunvaladas (véase, por ejemplo, Roper *et al.*, *Ann. Rev. Neurosci.*, 12:329-353 (1989)). Las células gustativas también se encuentran en el paladar y otros tejidos, tales como el esófago y el estómago.

"T1R" se refiere a uno o más miembros de la familia de receptores acoplados a proteína G que se expresan en células gustativas, tales como células foliadas, fungiformes y circunvaladas, así como en células del paladar y del esófago (véase, por ejemplo, Hoon *et al.*, *Cell*, 96:541-551 (1999)). Los miembros de la familia también se denominan GPCR-B3 y TR1 en el documento WO 00/06592, así como GPCR-B4 y TR2 en el documento WO 00/06593. Las células receptoras gustativas también pueden identificarse basándose en la morfología (véase, por ejemplo, Roper, *supra*), o mediante la expresión de proteínas específicamente expresadas en las células gustativas. Los miembros de la familia T1R pueden tener la capacidad de actuar como receptores de la transducción del gusto dulce, o de distinguir entre diversas otras modalidades gustativas. Las secuencias de T1R representativas, que incluyen hT1R1, hT1R2 y hT1R3, se identifican a continuación en los ejemplos.

Los ácidos nucleicos de "T1R" codifican una familia de GPCR con regiones 7-transmembrana que tienen una "actividad de receptor acoplado a proteína G", por ejemplo, pueden unirse a proteínas G en respuesta a estímulos extracelulares y estimular la producción de segundos mensajeros, tales como IP3, AMPc, GMPc y Ca²⁺ mediante la estimulación de enzimas, tales como fosfolipasa C y adenilato ciclasa (para una descripción de la estructura y función de los GPCR véase, por ejemplo, Fong, *supra*, y Baldwin, *supra*). Una sola célula gustativa puede contener muchos polipéptidos de T1R diferenciados.

La expresión "familia T1R" por tanto se refiere a variantes polimórficas, alelos, mutantes, y homólogos interespecíficos que: (1) tienen al menos aproximadamente 35% al 50% de coincidencia en la secuencia de aminoácidos, opcionalmente aproximadamente 60%, 75%, 80%, 90%, 96%, 97%, 98% o 99% de coincidencia en la secuencia de aminoácidos, con un polipéptido de T1R, preferiblemente los identificados en el ejemplo 1, a través de una ventana de aproximadamente 25 aminoácidos, opcionalmente 50-100 aminoácidos; (2) se unen específicamente a anticuerpos generados contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en la secuencia del polipéptido de T1R descrita en el ejemplo 1 y sus variantes modificadas de modo conservador; (3) son codificados por una molécula de ácido nucleico que se hibrida específicamente (con un tamaño de al menos aproximadamente 100, opcionalmente al menos aproximadamente 500-1000 nucleótidos) bajo condiciones de hibridación rigurosas, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de ácidos nucleicos de T1R contenidas en el ejemplo 1, y sus variantes modificadas de modo conservador; o (4) comprenden una secuencia al menos aproximadamente 35% al 50% idéntica con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de T1R identificada en el ejemplo 1.

Desde el punto de vista topológico, ciertos GPCR quimiosensoriales tienen un "dominio N-terminal"; "dominios extracelulares"; "dominios transmembrana" que comprenden regiones 7-transmembrana, y los correspondientes bucles citoplásmicos y extracelulares; "dominios citoplásmicos", y un "dominio C-terminal" (véase, por ejemplo, Hoon *et al.*, *Cell*, 96:541-551 (1999); Buck y Axel, *Cell*, 65:175-187 (1991)). Estos dominios pueden identificarse estructuralmente utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como programas de análisis de secuencia que identifiquen dominios hidrófobos e hidrófilos (véase, por ejemplo, Stryer, *Biochemistry* (3^a ed., 1988); véase también cualquiera de una serie de programas de análisis de secuencias con base en Internet, tales como los que se encuentran en dot.imgen.bcm.tmc.edu). Estos dominios son útiles para fabricar proteínas quiméricas y para ensayos *in vitro* de la invención, por ejemplo, ensayos de unión a ligandos.

Por tanto, los "dominios extracelulares" se refieren a los dominios de polipéptidos de T1R que sobresalen de la membrana celular y están expuestos a la cara extracelular de la célula. Estos dominios en general incluyen el "dominio N-terminal" que está expuesto a la cara extracelular de la célula, y opcionalmente pueden incluir porciones

de los bucles extracelulares del dominio transmembrana que están expuestos 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.

5 La región del “dominio N-terminal” comienza en el N-terminal y se extiende hasta una región cercana al inicio del primer dominio transmembrana. Más en concreto, en una realización de la invención, este dominio comienza en el N-terminal y termina aproximadamente en el ácido glutámico conservado en la posición del aminoácido 563 más o menos aproximadamente 20 aminoácidos. Estos dominios extracelulares son útiles para los ensayos de unión a ligandos *in vitro*, tanto en fase soluble como en fase sólida. Además, las regiones transmembrana, descritas a continuación, también pueden unirse a ligandos en combinación con el dominio extracelular y, por tanto, también son
10 útiles para los ensayos de unión a ligandos *in vitro*.

El “dominio transmembrana”, que comprende las siete “regiones transmembrana”, se refiere al dominio de polipéptidos de T1R que se extiende a través de la membrana plasmática, y también puede incluir los correspondientes bucles citoplásmicos (intracelulares) y extracelulares. En una realización, esta región se
15 corresponde con el dominio de los miembros de la familia T1R que comienza aproximadamente en el ácido glutámico conservado en la posición del aminoácido 536 más o menos 20 aminoácidos, y termina aproximadamente en el resto tirosina conservado en la posición 812 más o menos aproximadamente 10 aminoácidos. Las siete regiones transmembrana y los bucles extracelulares e intracelulares pueden identificarse utilizando métodos convencionales, tal como se describe en Kyte y Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157:105-132 (1982), o en Stryer, *supra*.

Los “dominios citoplásmicos” se refieren a dominios de los polipéptidos T1R que afrontan la cara interna 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 final del último dominio transmembrana y el C-terminal de la proteína, y que normalmente está localizado dentro del citoplasma. En una realización, esta región comienza en el resto aminoácido tirosina conservado en la
25 posición 812 más o menos aproximadamente 10 aminoácidos y continúa hasta el C-terminal del polipéptido.

La expresión “región de unión al ligando” o “dominio de unión al ligando” se refiere a secuencias derivadas de un receptor gustativo, en particular un receptor gustativo que incorpora sustancialmente al menos el dominio extracelular del receptor. En una realización, el dominio extracelular de la región de unión al ligando puede incluir el dominio N-terminal y, opcionalmente, porciones del dominio transmembrana, como los bucles extracelulares del dominio transmembrana. La región de unión al ligando puede ser capaz de unirse a un ligando, y más en concreto, a un compuesto que potencia, imita, bloquea y/o modula el gusto, por ejemplo, el gusto dulce o umami.
30

El término “heteromultímero” o la expresión “complejo heteromultimérico” en el contexto de los receptores T1R o polipéptidos de T1R de la invención, se refiere a una asociación funcional de al menos un receptor T1R y otro receptor, generalmente otro polipéptido de un receptor T1R (o, como alternativa, otra entidad que no es un polipéptido de un receptor T1R). Para que sea más claro, la codependencia funcional de los T1R se describe en esta solicitud de una forma que refleja su posible función como complejos de receptor gustativo heterodiméricos.
35

La expresión “efectos funcionales” en el contexto de los ensayos para ensayar compuestos que modulen la transducción del gusto 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 ligandos, cambios en el flujo de iones, potencial de membrana, flujo de corriente, transcripción, unión de la proteína G, fosforilación o desfosforilación de GPCR, ensayos basados en cambios conformacionales, transducción de señales, interacciones receptor-ligando, concentraciones de segundos mensajeros (por ejemplo, AMPc, GMPc, IP3, o Ca²⁺ intracelular), *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*, y también incluye otros efectos fisiológicos, tales como aumentos o disminuciones en la liberación de neurotransmisores u hormonas.
40

La “determinación del efecto funcional” en el contexto de los ensayos significa un ensayo para un compuesto que aumente o que disminuya un parámetro que está directa o indirectamente bajo la influencia de un miembro de la familia T1R, por ejemplo, efectos funcionales, físicos y químicos. Estos efectos funcionales pueden medirse por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, cambios en las características espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice refractario), hidrodinámicas (por ejemplo, forma), cromatográficas, o de propiedades de solubilidad, fijación de parches, tintes sensibles al voltaje, corrientes de células completas, eflujo de radioisótopos, marcadores inducibles, expresión del gen T1R en oocitos; expresión de T1R en células de cultivos de tejidos; activación transcripcional de genes T1R; ensayos de unión a ligandos; cambios en el voltaje, el potencial de membrana y la conductancia; ensayos de flujo de iones; cambios en los segundos mensajeros intracelulares, tales como GMPc, AMPc e inositol trifosfato (IP3); cambios en los niveles de calcio intracelular; liberación de neurotransmisores, ensayos conformacionales, y similares.
45
50
55

Los “inhibidores”, “activadores” y “moduladores” de genes o proteínas de T1R se emplean para referirse a moléculas inhibitoras, activadoras o moduladoras identificadas utilizando ensayos *in vitro* e *in vivo* para la transducción del gusto, por ejemplo, ligandos, agonistas, antagonistas, y sus homólogos y miméticos.

Los inhibidores son compuestos que, por ejemplo, se unen, bloquean parcial o totalmente la estimulación, disminuyen, previenen, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan o infrarregulan la transducción del gusto, por ejemplo, antagonistas. Los activadores son compuestos que, por ejemplo, se unen, estimulan, aumentan, abren, activan, facilitan, potencian la activación, sensibilizan o sobrerregulan la transducción del gusto, 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, eberina y otros miembros de la familia de portadores hidrófobos); proteínas G; quinasas (por ejemplo, homólogos de rodopsina quinasa y quinasas del receptor beta-adrenérgico que están implicados 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 naturales y sintéticos, antagonistas, agonistas, moléculas químicas pequeñas, y similares. Estos ensayos para inhibidores y activadores incluyen, por ejemplo, expresar miembros de la familia T1R en células o membranas celulares, aplicar compuestos moduladores putativos, en presencia o en ausencia de estimulantes del gusto, por ejemplo, estimulantes del gusto dulce, y después determinar los efectos funcionales sobre la transducción del gusto, según se describió anteriormente. Las muestras o ensayos que comprenden miembros de la familia T1R que se tratan con un activador, inhibidor o modulador potencial se comparan con muestras control sin el inhibidor, activador o modulador para estudiar el grado de modulación. A las muestras de control positivo (por ejemplo, un estimulante del gusto dulce sin moduladores añadidos) se les asigna un valor de actividad T1R relativo del 100%.

A las muestras de control negativo (por ejemplo, tampón sin un estímulo gustativo añadido) se les asigna un valor de actividad T1R relativo del 0%. La inhibición de un T1R se logra cuando una mezcla de la muestra de control positivo y un modulador produce un valor de actividad T1R con relación al control positivo de aproximadamente 80%, opcionalmente 50% o 25-0%. La activación de un T1R por un solo modulador se logra cuando el valor de actividad T1R con relación a la muestra de control negativo es 10%, 25%, 50%, 75%, opcionalmente 100%, opcionalmente 150%, opcionalmente 200-500%, o 1000-3000% mayor.

Los términos y la expresión "purificado", "sustancialmente purificado" y "aislado", tal como se emplean en la presente memoria, se refieren al estado de estar exento de otros compuestos diferentes con los que el compuesto de la invención normalmente está asociado en su estado natural, de forma que el sujeto "purificado", "sustancialmente purificado" y "aislado" comprende al menos 0,5%, 1%, 5%, 10% o 20%, y lo más preferiblemente al menos 50% o 75% de la masa, en peso, de una muestra dada. En una realización preferida, estos términos y expresión se refieren al compuesto de la invención que comprende al menos 95% de la masa, en peso, de una muestra dada. Tal como se emplean en la presente memoria, los términos y la expresión "purificado", "sustancialmente purificado" y "aislado", cuando se refieren a un ácido nucleico o a una proteína, también se refieren a un estado de purificación o concentración diferente que el que se produce de modo natural en el cuerpo de un mamífero, en especial de un ser humano. Cualquier grado de purificación o concentración mayor que el que se produce de modo natural en el cuerpo de un mamífero, en especial 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 un mamífero, en especial de un ser humano, está dentro del significado de "aislado". El ácido nucleico o la proteína, o las clases de ácidos nucleicos o de proteínas descritos en la presente memoria, pueden estar aislados, o asociados de otra forma con estructuras o compuestos con los que normalmente no están asociados en la naturaleza, según una diversidad de métodos y procesos conocidos por los expertos en la técnica.

Las expresiones "ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" se refieren a un oligonucleótido de desoxirribonucleótidos o de ribonucleótidos en forma monocatenaria o bicatenaria. Las expresiones incluyen ácidos nucleicos, es decir, oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales. Las expresiones también incluyen estructuras de tipo ácido nucleico con esqueletos sintéticos (véase, 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. 660, eds. Baserga et al. (NYAS, 1992); Milligan, *J. Med. Chem.*, 36:1923-1937 (1993); *Antisense Research and Applications* (1993, CRC Press), documento WO 97/03211; documento 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 lo contrario, una secuencia de ácido nucleico concreta también incluye implícitamente sus variantes modificadas de modo conservador (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. De modo específico, las sustituciones de codones degenerados pueden lograrse generando, por ejemplo, secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados está sustituida con restos de bases mixtas y/o desoxiinosina (Batzer et al., *Nucleic Acids Res.*, 19:5018 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994)). La expresión "ácido nucleico" se utiliza de modo intercambiable con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido, y polinucleótido.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se emplean de modo intercambiable 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 correspondiente aminoácido natural, así como a polímeros de aminoácidos naturales y a polímeros de aminoácidos no naturales.

La expresión “dominio de translocación de membrana plasmática” o simplemente “dominio de translocación” significa un dominio polipeptídico que cuando se incorpora en una secuencia codificadora de un polipéptido puede “chaperonar” o “translocar” con más eficacia la proteína híbrida (“de fusión”) hacia la membrana plasmática celular que sin el dominio presente. Por ejemplo, un “dominio de translocación” puede derivarse del amino terminal del polipéptido del receptor de rodopsina bovino, un receptor 7-transmembrana. Sin embargo, puede utilizarse rodopsina procedente de cualquier mamífero, al igual que otras secuencias que facilitan la translocación. Por tanto, el dominio de translocación es particularmente eficaz para translocar proteínas de fusión 7-transmembrana hacia la membrana plasmática, y una proteína (por ejemplo, un polipéptido del receptor gustativo) que comprenda un dominio de translocación amino-terminal se transportará hacia la membrana plasmática de modo más eficaz que sin el dominio presente. Sin embargo, si el dominio N-terminal del polipéptido está activo tras la unión, tal como sucede con los receptores T1R de la presente invención, puede preferirse el uso de otros dominios de translocación. Por ejemplo, puede emplearse un péptido de interacción con el dominio PDZ, tal como se describe en la presente memoria.

El “dominio de translocación”, el “dominio de unión al ligando”, y las composiciones de receptores quiméricos descritos en la presente memoria también incluyen “análogos”, o “variantes conservadoras” y “miméticos” (“peptidomiméticos”) con unas estructuras y una actividad que se corresponden sustancialmente con las secuencias ejemplo. Así, la expresión “variante conservadora” o los términos “análogo” o “mimético” se refieren a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos modificada, de forma que el cambio o cambios no alteran sustancialmente la estructura y/o la actividad del polipéptido (la variante conservadora), según se define en la presente memoria. Estos incluyen variaciones modificadas de modo conservador 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 la sustitución de aminoácidos por restos que tienen propiedades similares (por ejemplo, ácidos, básicos, cargados positiva o negativamente, polares o no polares, etc.), de forma que incluso las sustituciones de aminoácidos críticos no alteran sustancialmente la estructura y/o la actividad.

Más en concreto, la expresión “variantes modificadas de modo conservador” se aplica a secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, las variantes modificadas de modo conservador se refieren a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o fundamentalmente 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. Así, en cada posición en que un codón especifica una alanina, el codón puede alterarse a cualquiera de los correspondientes codones descritos sin alterar el polipéptido codificado.

Estas variaciones en los ácidos nucleicos son “variaciones silenciosas”, que son un tipo de variaciones modificadas de modo conservador. Cada secuencia de ácido nucleico en la presente memoria, que codifique un polipéptido, también describe cualquier variación silenciosa posible del ácido nucleico. Los expertos en la técnica reconocerán que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codon para la metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para el triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico, que codifique un polipéptido, está implícita en cada secuencia descrita.

Las tablas de sustituciones conservadores que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, una ejemplo de guía para seleccionar sustituciones conservadoras incluye (el resto original seguido del ejemplo de sustitución): 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. Otro ejemplo de guía emplea los siguientes seis grupos, conteniendo cada uno los aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: 1) alanina (A), serina (S), treonina (T); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (I); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); y 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W) (véase también por ejemplo, Creighton, *Proteins*, W.H. Freeman and Company (1984); Schultz y Schimer, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag (1979)). Los expertos en la técnica apreciarán que las sustituciones identificadas anteriormente no son las únicas sustituciones conservadoras posibles. Por ejemplo, para algunos fines se pueden considerar todos los aminoácidos cargados como sustituciones conservadoras entre sí, tanto si son positivos como negativos. Además, las sustituciones, deleciones o adiciones individuales que alteran, añaden o delecionan un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en una secuencia codificada también pueden considerarse “variaciones modificados de modo conservador”.

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 al ligando, o receptores quiméricos de la invención. El mimético puede estar totalmente compuesto de análogos de aminoácidos no naturales, sintéticos, o puede ser una molécula química con parte de aminoácidos peptídicos naturales y con parte de análogos de aminoácidos no naturales. El mimético también puede incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservadoras de aminoácidos naturales, siempre que dichas sustituciones tampoco alteren sustancialmente la estructura y/o la actividad del mimético.

- Al igual que con los polipéptidos de la invención que son variantes conservadoras, la experimentación habitual determinará si un mimético está dentro del alcance de la descripción, es decir, que su estructura y/o su función no están sustancialmente alteradas. Las composiciones de miméticos de polipéptidos pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales no naturales, que generalmente pertenecen a tres grupos estructurales:
- 5 a) grupos de enlace de restos distintos de los enlaces amida naturales (“enlace peptídico”); b) restos no naturales en lugar de restos aminoácidos naturales; o c) restos que inducen una imitación estructural secundaria, es decir, para inducir o estabilizar una estructura secundaria, por ejemplo, una conformación en giro beta, giro gamma, lámina beta, alfa-hélice, y similares. Un polipéptido puede caracterizarse como un mimético cuando todos o parte de sus restos están unidos por medios químicos distintos de los enlaces peptídicos naturales. Los restos de los
- 10 peptidomiméticos individuales pueden estar unidos mediante enlaces peptídicos, otros enlaces químicos o medios de acoplamiento tales como, por ejemplo, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, maleimidias bifuncionales, N,N'-d ciclohexilcarbodiimida (DCC) o N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC). Los grupos conectores que pueden ser una alternativa al enlace de 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),
- 15 tetrazol (CN₄), tiazol, retroamida, tioamida, o éster (véase, por ejemplo, Spatola, *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, vol. 7, pp. 267-357, “Peptide Backbone Modifications”, Marcell Dekker, N.Y. (1983)). Un polipéptido también puede caracterizarse como un mimético porque contiene todos o algunos restos no naturales en lugar de restos aminoácidos naturales; los restos no naturales están bien descritos en la bibliografía científica y de patentes.
- 20 Un “marcador” o un “resto detectable” es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos, o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen ³²P, tintes fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas (por ejemplo, como se emplean habitualmente en un ELISA), biotina, digoxigenina, o haptenos y proteínas que pueden hacerse detectables, por ejemplo, incorporando un marcador radiactivo en el péptido, o utilizarse para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el péptido.
- 25 Un “oligonucleótido o sonda de ácido nucleico marcado” es aquel que está unido de modo covalente, a través de un conector o un enlace químico, o de modo no covalente, a través de enlaces iónicos, de van der Waals, electrostáticos o de hidrógeno, con un marcador, de forma que la presencia de la sonda puede detectarse mediante la detección de la presencia del marcador unido a la sonda.
- 30 Tal como se emplea 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 de apareamiento de bases complementarias, normalmente a través de la formación de enlaces de hidrógeno. Tal como se emplea en la presente memoria, una sonda puede incluir bases naturales (es decir, A, G, C o T) o modificadas (7-desazaguanosina, inosina, etc.). Además, las bases en una sonda pueden estar unidas mediante un enlace distinto de un enlace fosfodiéster, con la condición de que no interfiera en la hibridación. Así, por ejemplo, las sondas pueden ser ácidos nucleicos peptídicos en los que las bases
- 35 constituyentes están unidas por enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster. Los expertos en la técnica entenderán que las sondas pueden unirse a secuencias diana que carezcan de complementariedad completa con la secuencia de la sonda dependiendo de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Opcionalmente, las sondas se marcan directamente por ejemplo con isótopos, cromóforos, lumíforos, cromógenos, o se marcan indirectamente por ejemplo con biotina, a la cual puede unirse un complejo de estreptavidina después. Mediante el ensayo de la presencia o la ausencia de la sonda se puede detectar la presencia o la ausencia de la secuencia o subsecuencia seleccionada.
- 40 El término “heterólogo”, cuando se emplea en referencia a porciones 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 generalmente se produce de modo recombinante, y tiene dos o más secuencias procedentes de genes no relacionados dispuestos para fabricar un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor procedente de una fuente y una región codificadora procedente de otra fuente. De manera 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).
- 45 Un “promotor” se define como una serie de secuencias de ácidos nucleicos que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Tal como se emplea en la presente memoria, un promotor incluye las secuencias de ácidos nucleicos necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tal como es el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales, que pueden localizarse tan lejos como varias miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción. Un promotor
- 50 “constitutivo” es un promotor que es activo bajo la mayoría de las condiciones ambientales y del desarrollo.
- 55 Un promotor “inducible” es un promotor que es activo bajo regulación ambiental o del desarrollo. La expresión “unido operablemente” se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de la expresión del ácido nucleico (tal como un promotor, o una serie de sitios de unión de factores de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en el que la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.
- 60

Tal como se emplea en la presente memoria, "recombinante" se refiere a un polinucleótido sintetizado o manipulado de otro modo *in vitro* (por ejemplo, un "polinucleótido recombinante"), a métodos para utilizar los polinucleótidos recombinantes para producir productos génicos en células u otros sistemas biológicos, o a un polipéptido (una "proteína recombinante") codificado por un polinucleótido recombinante. Un "medio recombinante" también incluye el acoplamiento de ácidos nucleicos que tienen diversas regiones codificadoras o dominios o secuencias promotoras procedentes de diferentes fuentes en un vector o módulo de expresión para la expresión, por ejemplo, la expresión inducible o constitutiva de una proteína de fusión que comprende un dominio de translocación de la descripción y una secuencia de ácido nucleico amplificada utilizando un cebador de la descripción.

Tal como se emplea en la presente memoria, una "línea celular estable" se refiere a una línea celular que expresa de forma estable, es decir, a lo largo de un periodo prolongado, una secuencia de ácido nucleico heteróloga, es decir, un T1R o proteína G. En realizaciones preferidas, estas líneas celulares estables se producirán transfectando células apropiadas, generalmente células de mamífero, por ejemplo, células HEK-293, con un vector linealizado que contiene una construcción de expresión de T1R, es decir, T1R1, T1R2 y/o T1R3. Lo más preferiblemente, estas líneas celulares estables se producirán cotransfectando dos plásmidos linealizados que expresan hT1R1 y hT1R3, o hT1R2 y hT1R3, y un procedimiento de selección apropiado para generar líneas celulares que tienen estos genes integrados de forma estable en ellas. Lo más preferiblemente, la línea celular también expresa de forma estable una proteína G, tal como G_{α15}.

La expresión "se hibrida selectivamente (o específicamente) con" se refiere a la unión, la formación de dúplex o la hibridación de una molécula sólo con una secuencia nucleotídica concreta bajo condiciones de hibridación rigurosas cuando esta secuencia esté presente en una mezcla compleja (por ejemplo, ADN o ARN celular total o de biblioteca).

La expresión "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda se hibridará con su subsecuencia diana, generalmente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero con ninguna otra secuencia. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas que hibridan específicamente a temperaturas más altas. Una guía exhaustiva acerca de la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5-10 °C más bajas que el punto de fusión térmico (T_f) para la secuencia específica a un pH y fuerza iónica definidos. El T_f es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración de ácidos nucleicos definidos) en la que 50% de las sondas complementarias a la diana se hibridan con la secuencia diana en el equilibrio (puesto que las secuencias diana están presentes en exceso, en el T_f, 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio). Las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración salina es menor que aproximadamente 1,0 M de ion sodio, generalmente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de ion sodio (u otras sales), a un pH 7,0 a 8,3, y la temperatura es al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, mayores que 50 nucleótidos). También pueden lograrse condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Para una hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces el fondo, opcionalmente 10 veces la hibridación de fondo. Los ejemplos de condiciones rigurosas de hibridación pueden ser los siguientes: formamida al 50%, 5x SSC, y SDS al 1%, incubación a 42 °C, o 5x SSC, SDS al 1%, incubación a 65 °C, con lavado en 0,2x SSC, y SDS al 0,1% a 65 °C. Estas etapas de hibridación y lavado pueden realizarse durante, por ejemplo, 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 o más minutos.

Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí bajo condiciones rigurosas siguen estando sustancialmente relacionados si los polipéptidos que codifican están sustancialmente relacionados. Esto ocurre, por ejemplo, cuando una copia de un ácido nucleico se crea utilizando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético. En estos casos, los ácidos nucleicos generalmente se hibridan bajo condiciones de hibridación moderadamente rigurosas. Los ejemplos de "condiciones de hibridación moderadamente rigurosas" incluyen una hibridación en un tampón de formamida al 40%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37 °C, y un lavado en 1x SSC a 45 °C. Estas etapas de hibridación y lavado pueden realizarse durante, por ejemplo, 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 o más minutos. Una hibridación positiva es al menos el doble del fondo. Los expertos en la técnica reconocerán con facilidad que pueden utilizarse otras condiciones de hibridación y lavado para proporcionar condiciones de rigurosidad similar.

Un "anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende una región de marco procedente de un gen de inmunoglobulina, o sus fragmentos, 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.

Un ejemplo de unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos parejas idénticas de cadenas polipeptídicas, teniendo cada pareja una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). El N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del

reconocimiento del antígeno. Las expresiones “cadena ligera variable” (VL) y “cadena pesada variable” (VH) se refieren a las cadenas ligera y pesada, respectivamente.

5 Un “anticuerpo quimérico” es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de esta, está alterada, reemplazada o intercambiada de modo que el sitio de unión al antígeno (región variable) está unido a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor del crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de esta, está alterada, reemplazada o intercambiada con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada.

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

El término “inmunoensayo” es un ensayo que emplea un anticuerpo para que se una específicamente a un antígeno. Un inmunoensayo se caracteriza por el uso de las propiedades de unión específicas de un anticuerpo concreto para aislar, dirigirse a y/o cuantificar un antígeno.

15 La expresión “se une específicamente (o selectivamente)” con un anticuerpo, o “es específicamente (o selectivamente) inmunorreactivo con”, cuando se refiere a una proteína o a un péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinativa de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros compuestos biológicos. Así, bajo unas condiciones de inmunoensayo determinadas, los anticuerpos especificados se unen a una proteína concreta en 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 bajo estas condiciones puede requerir un anticuerpo que se selecciona por su especificidad por una proteína concreta. Por ejemplo, pueden seleccionarse anticuerpos policlonales generados contra un miembro de la familia T1R a partir de una especie específica, tal como rata, ratón o ser humano, para obtener sólo los anticuerpos policlonales que sean específicamente inmunorreactivos con el polipéptido de T1R o una porción inmunogénica de este, y no con otras proteínas, excepto por ortólogos o variantes polimórficas y alelos del polipéptido de T1R. Esta selección puede lograrse extrayendo los anticuerpos que presentan reacción cruzada con moléculas de T1R de otras especies u otras moléculas de T1R. También pueden seleccionarse anticuerpos que reconozcan sólo a miembros de la familia T1R de GPCR pero no a GPCR de otras familias.

30 Puede emplearse una diversidad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína concreta. Por ejemplo, pueden utilizarse habitualmente 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 y condiciones de inmunoensayos que pueden utilizarse para determinar la inmunorreactividad específica). Generalmente, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces la señal o ruido de fondo, y más generalmente más de 10 a 100 veces el fondo.

35 La expresión “se asocia selectivamente con” se refiere a la capacidad de un ácido nucleico para “hibridarse selectivamente” con otro según se definió anteriormente, o la capacidad de un anticuerpo para “unirse selectivamente (o específicamente)” a una proteína, tal como se definió anteriormente.

40 La expresión “vector de expresión” se refiere a cualquier sistema de expresión recombinante con el objetivo de expresar una secuencia de ácido nucleico de la invención *in vitro* o *in vivo*, de manera constitutiva o inducible, en cualquier célula, incluyendo células procariotas, de levadura, fúngicas, vegetales, de insecto o de mamífero. La expresión incluye sistemas de expresión lineales o circulares. La expresión incluye sistemas de expresión que permanecen episómicos 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 una expresión transitoria en una célula. La expresión incluye “módulos” de expresión recombinante, que contienen sólo los elementos mínimos necesarios para la transcripción del ácido nucleico recombinante.

Una “célula hospedadora” significa una célula que contiene un vector de expresión y que apoya 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 levadura, insecto, anfibio, gusano o mamífero, tales como células CHO, Hela, HEK-293 y similares, por ejemplo, células cultivadas, explantes, y células *in vivo*.

50 **Aislamiento y expresión de polipéptidos de T1R**

El aislamiento y la expresión de los polipéptidos de T1R de la invención puede realizarse como se describe a continuación. Pueden emplearse cebadores de PCR para la amplificación de ácidos nucleicos que codifican regiones de unión al ligando de receptores gustativos, y pueden generarse opcionalmente bibliotecas de estos ácidos nucleicos. Los vectores de expresión individuales o las bibliotecas de vectores de expresión pueden entonces utilizarse para infectar o transfectar células hospedadoras para la expresión funcional de estos ácidos nucleicos o bibliotecas. Estos genes y vectores pueden fabricarse y expresarse *in vitro* o *in vivo*. Los expertos en la técnica reconocerán que pueden obtenerse los fenotipos deseados para alterar y controlar la expresión de ácidos nucleicos

mediante la modulación de la expresión o de la actividad de los genes y ácidos nucleicos (por ejemplo, promotores, potenciadores y similares) dentro de los vectores de la invención. Puede usarse cualquiera de los métodos conocidos para aumentar o disminuir la expresión o la actividad. La invención puede practicarse junto con cualquier método o protocolo conocido en la técnica, que están bien descritos en la bibliografía científica y de patentes.

5 Las secuencias de ácidos nucleicos de la invención y otros ácidos nucleicos utilizados para practicar esta invención, tanto si son ARN, ADNc, ADN genómico, vectores, virus o sus híbridos, pueden aislarse a partir de una diversidad de fuentes, genéticamente modificadas, amplificadas y/o expresadas de modo recombinante. Puede emplearse cualquier sistema de expresión recombinante que incluye, además de células de mamífero, por ejemplo, sistemas bacterianos, de levaduras, de insecto o vegetales.

10 Como alternativa, estos ácidos nucleicos pueden sintetizarse *in vitro* mediante técnicas de síntesis química muy conocidas, según 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); Biommers, *Biochemistry*, 33:7886-7896 (1994); Narang, *Meth. Enzymol.*, 68:90 (1979); Brown, *Meth. Enzymol.*, 68:109 (1979); Beaucauge, *Tetra. Lett.*, 22:1859 (1981); patente de EEUU nº 4.458.066. Después pueden obtenerse fragmentos de ADN bicatenario sintetizando la hebra complementaria y reasociando las hebras entre sí bajo condiciones apropiadas, o añadiendo la hebra complementaria utilizando ADN polimerasa con una secuencia cebadora apropiada.

Las técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, para generar mutaciones en las secuencias, subclonación, marcaje de sondas, secuenciación, hibridación y similares, están bien descritas en la bibliografía científica y de patentes. Véase, por ejemplo, Sambrook, ed., *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (2ª ed.), vol. 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*, parte I, Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed., Elsevier, N.Y. (1993).

Los ácidos nucleicos, vectores, cápsidas, polipéptidos y similares pueden analizarse y cuantificarse mediante cualquiera de una serie de medios generales muy conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, métodos bioquímicos analíticos, tales como RMN, espectrofotometría, radiografía, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC), y cromatografía de hiperdifusión, diversos métodos inmunológicos, por ejemplo, reacciones de precipitina fluidas o en gel, inmunodifusión, inmunoelectroforesis, radioinmunoensayos (RIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos inmunofluorescentes, análisis de la transferencia Southern, análisis de la transferencia Northern, análisis de la transferencia por puntos, electroforesis en gel (por ejemplo, SDS-PAGE), RT-PCR, PCR cuantitativa, otros métodos de amplificación de señales, dianas o ácidos nucleicos, radiomarcaje, recuento de centelleo, y cromatografía de afinidad.

Pueden emplearse sondas oligonucleotídicas para amplificar fragmentos de ácidos nucleicos que codifiquen regiones de unión al ligando de receptores gustativos. Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria también pueden clonarse o medirse cuantitativamente utilizando técnicas de amplificación. Los métodos de amplificación también son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la reacción en cadena de 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 ligasa (LCR) (véase, por ejemplo, Wu, *Genomics*, 4:560 (1989); Landegren, *Science*, 241:1077 (1988); Barringer, *Gene*, 89:117 (1990)); amplificación de la transcripción (véase, por ejemplo, Kwoh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1173 (1989)); y replicación de secuencias autosostenida (véase, por ejemplo, Guatelli, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1874 (1990)); amplificación de Q-beta replicasa (véase, por ejemplo, Smith, *J. Clin. Microbiol.*, 35:1477-1491 (1997)); ensayo de amplificación de Q-beta replicasa automático (véase, por ejemplo, Burg, *Mol. Cell. Probes*, 10:257-271 (1996)); y otras técnicas mediadas por la ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario); véase también Berger, *Methods Enzymol.*, 152:307-316 (1987); Sambrook; Ausubel; patentes de EEUU nº 4.683.195 y 4.683.202; Sooknanan, *Biotechnology*, 13:563-564 (1995). Los cebadores pueden diseñarse para que conserven la secuencia original del receptor 7-transmembrana "donante". Como alternativa, los cebadores pueden codificar restos aminoácidos que sean sustituciones conservadoras (por ejemplo, un resto hidrófobo por un resto hidrófobo, véase el análisis anterior) o sustituciones funcionalmente benignas (por ejemplo, que no eviten la inserción en la membrana plasmática, ni provocar la ruptura por peptidasas, ni provocar el plegamiento anómalo del receptor y similares). Tras haberse amplificado, los ácidos nucleicos, de modo individual o en forma de biblioteca, pueden clonarse según métodos conocidos en la técnica, si se desea, en cualquiera de una diversidad de vectores utilizando métodos de biología molecular habituales; los métodos para clonar ácidos nucleicos amplificados *in vitro* se describen, por ejemplo, en la patente de EEUU nº 5.426.039.

Las parejas de cebadores pueden diseñarse para amplificar selectivamente regiones de unión al ligando de miembros de la familia T1R. Estas regiones pueden variar para diferentes ligandos o estimulantes del gusto. Así, lo que podría ser una región de unión mínima para un estimulante del gusto, puede ser demasiado limitante para un segundo estimulante del gusto. Por consiguiente, pueden amplificarse regiones de unión al ligando de diferentes tamaños que comprendan diferentes estructuras de dominios extracelulares.

Los paradigmas para diseñar parejas de cebadores degenerados son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede accederse al programa informático con una estrategia de cebadores oligonucleótidos híbridos degenerados-consenso (“COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer”, CODEHOP) en <http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>, y está conectado directamente con el sitio de alineamiento de múltiples secuencias BlockMaker para la predicción de cebadores híbridos y que comienza con un conjunto de secuencias de proteínas relacionadas, tales como regiones de unión al ligando de receptores gustativos (véase, por ejemplo, Rose, *Nucleic Acids Res.*, 26:1628-1635 (1998); Singh, *Biotechniques*, 24:318-319 (1998)).

Los medios para sintetizar parejas de cebadores oligonucleotídicos son muy conocidos en la técnica. Pueden utilizarse pares de bases “naturales” o pares de bases sintéticas. Por ejemplo, el uso de nucleobases artificiales ofrece una estrategia versátil para manipular secuencias de cebadores y genera una mezcla más compleja de productos de la amplificación. Diversas familias de nucleobases artificiales son capaces de asumir múltiples orientaciones de enlaces de hidrógeno a través de rotaciones de enlaces internos para proporcionar un medio para el reconocimiento molecular degenerado. La incorporación de estos análogos a una única posición de un cebador de PCR permite la generación de una biblioteca compleja de productos de la amplificación. Véase, por ejemplo, Hoops, *Nucleic Acids Res.*, 25:4866-4871 (1997). También pueden utilizarse moléculas no polares para imitar la forma de las bases del ADN naturales. Un análogo imitador de la forma sin enlaces de hidrógeno para la adenina puede replicarse de modo eficaz y selectivo frente a un análogo imitador de la forma no polar para la 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]oxazin-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 ejemplos de cebadores degenerados de la invención incorporan el análogo de nucleobase 5'-dimetoxitritil-N-benzoil-2'-desoxicidina, 3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]fosforamida (el término “P” en la secuencias, véase anteriormente). Este análogo de pirimidina se une mediante enlaces de hidrógeno a las purinas, incluyendo los restos A y G.

Los variantes polimórficas, alelos, y homólogos interespecíficos que son sustancialmente idénticos a un receptor gustativo descrito en la presente memoria pueden aislarse utilizando las sondas de ácidos nucleicos descritas anteriormente. Como alternativa, pueden emplearse bibliotecas de expresión para clonar polipéptidos de T1R y sus variantes polimórficas, alelos, y homólogos interespecíficos, mediante la detección de los homólogos expresados de forma inmunológica con antisuero o anticuerpos purificados generados contra un polipéptido de T1R, que también reconocen y se unen selectivamente al homólogo de T1R.

Los ácidos nucleicos que codifican regiones de unión al ligando de receptores gustativos pueden generarse mediante amplificación (por ejemplo, PCR) de las secuencias de ácidos nucleicos apropiadas utilizando parejas de cebadores degenerados. El ácido nucleico amplificado puede ser ADN genómico procedente de cualquier célula o tejido, o ARNm o ADN derivado de células que expresan receptores gustativos.

En una realización, pueden construirse secuencias que codifican proteínas híbridas comprenden ácidos nucleicos que codifican T1R condensados con secuencias de translocación. También se proporcionan T1R híbridos que comprenden los motivos de translocación y los dominios de unión al estimulante del gusto de otras familias de receptores quimiosensoriales, en particular receptores gustativos. Estas secuencias de ácidos nucleicos pueden estar operablemente unidas a elementos de control transcripcional o traduccional, 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 el ADN en ARN. En la constitución de módulos 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 otros elementos, por ejemplo, para la detección, la purificación de proteínas u otras aplicaciones. Los dominios que facilitan la detección y la purificación incluyen, por ejemplo, péptidos quelantes de metales, tales como extensiones de polihistidina, módulos de histidina-triptófano, u otros dominios que permitan la purificación sobre metales inmovilizados; proteína de unión a la maltosa; dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulinas inmovilizadas; o el dominio utilizado en el sistema de purificación por afinidad/extensión de FLAGS (Immunex Corp., Seattle, WA).

La inclusión de secuencias conectoras escindibles, tales como factor Xa (véase, por ejemplo, Ottavi, *Biochimie*, 80:289-293 (1998)), motivo de reconocimiento de proteasas de 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 en la membrana plasmática eficaz) y el resto del polipéptido recién traducido, puede ser útil para facilitar la purificación. Por ejemplo, una construcción puede incluir un polipéptido que codifique una secuencia de ácido nucleico unida a seis restos histidina, seguido de una tiorredoxina, un sitio de ruptura de enteroquinasas (véase, por ejemplo, Williams, *Biochemistry*, 34:1787-1797 (1995)), y un dominio de translocación C-terminal. Los restos histidina facilitan la detección y la purificación, mientras que el sitio de ruptura de enteroquinasas proporciona un medio para purificar la proteína o proteínas deseadas a partir del resto de la proteína de fusión. La tecnología referente a los vectores que codifican proteínas de fusión y la aplicación de las proteínas de fusión están bien descritas en la bibliografía científica y de patentes (véase, por ejemplo, Kroll, *DNA Cell. Biol.*, 12:441-453 (1993)).

Los vectores de expresión, tanto como vectores de expresión individuales como en forma de bibliotecas de vectores de expresión, que comprenden secuencias que codifican un dominio de unión al ligando, pueden introducirse en un genoma o en el citoplasma o en el núcleo de una célula, y expresarse mediante una diversidad de técnicas convencionales, bien descritas en la bibliografía científica y de patentes (véase, por ejemplo, Roberts, *Nature*, 328:731 (1987); Berger, *supra*; Schneider, *Protein Expr. Purif.*, 6435:10 (1995); Sambrook; Tijssen; Ausubel. La información del producto suministrada por los fabricantes de reactivos biológicos y equipos experimentales también proporciona información con respecto a métodos biológicos conocidos. Los vectores pueden aislarse a partir de fuentes naturales, obtenerse a partir de fuentes tales como bibliotecas de la ATCC o del GenBank, o prepararse por métodos sintéticos o recombinantes.

Los ácidos nucleicos pueden expresarse utilizando módulos de expresión, vectores o virus, que se expresan de modo estable o transitorio en células (por ejemplo, sistemas de expresión episómicos). Pueden incorporarse marcadores de selección en los módulos de expresión y vectores para conferir un fenotipo seleccionable a secuencias y células transformadas. Por ejemplo, los marcadores de selección pueden codificar para el mantenimiento y la replicación episómicos, de modo que no sea necesaria la introducción en el genoma del hospedante. Por ejemplo, el marcador puede codificar la resistencia a antibióticos (por ejemplo, cloranfenicol, kanamicina, G418, blastidina, higromicina), o la resistencia a herbicidas (por ejemplo, clorosulfurona 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 los genes marcadores seleccionables que confieren resistencia a sustratos, tales como neomicina o higromicina, sólo pueden utilizarse en cultivos de tejidos, también se emplean genes quimiorresistentes como marcadores seleccionables *in vitro* e *in vivo*.

Una secuencia de ácido nucleico quimérica puede codificar un dominio de unión al ligando de T1R dentro de cualquier polipéptido 7-transmembrana. Debido a que los polipéptidos de receptores 7-transmembrana tienen secuencias primarias y estructuras secundarias y terciarias similares, los dominios estructurales (por ejemplo, dominio extracelular, dominios TM, dominio citoplásmico, etc.) pueden identificarse con facilidad mediante el análisis de la secuencia. Por ejemplo, la formación de modelos de homología, el análisis de Fourier, y la detección de la periodicidad helicoidal pueden identificar y caracterizar los siete dominios en una secuencia de receptor 7-transmembrana. Pueden emplearse los algoritmos de la transformada de Fourier rápida (FFT) para evaluar los periodos dominantes que caracterizan los perfiles de hidrofobicidad y variabilidad de las secuencias analizadas. La potenciación de la detección de la periodicidad y el índice de periodicidad de alfa-hélices puede realizarse, por ejemplo, como en Donnelly, *Protein Sci.*, 2:55-70 (1993). Otros algoritmos de alineamiento y formación de modelos son muy conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Peitsch, *Receptors Channels*, 4:161-164 (1996); Kyte y Doolittle, *J. Med. Bio.*, 157:105-132 (1982); Cronet, *Protein Eng.*, 6:59-64 (1993).

La presente invención también incluye no sólo el ADN y las proteínas que tienen las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos especificadas, sino también fragmentos de ADN, en particular fragmentos de, por ejemplo, 60, 80, 100, 150, 200 o 250 nucleótidos o más, así como fragmentos de proteínas de, por ejemplo, 20, 30, 50, 70, 100 o 150 aminoácidos o más, con la condición de que dichos fragmentos tengan el porcentaje de coincidencia de secuencia requerido. Opcionalmente, los fragmentos de ácidos nucleicos pueden codificar un polipéptido antigénico, que sea capaz de unirse a un anticuerpo generado contra un miembro de la familia T1R. Además, un fragmento de proteína de la invención 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 o 150 aminoácidos o más, de uno de al menos uno de los polipéptidos de T1R descritos en la presente memoria, acopladas a aminoácidos adicionales que representen todo o parte de otro GPCR, preferiblemente un miembro de la superfamilia 7-transmembrana. Estas quimeras puede formarse a partir de los receptores de la presente invención y de otro GPCR, o pueden formarse combinando dos o más de los receptores T1R de la presente invención. En una realización, un porte de la quimera se corresponde con o deriva del dominio extracelular de un polipéptido de T1R de la invención. En otra realización, un parte de la quimera se corresponde con o deriva del dominio extracelular y uno o más de los dominios transmembrana de un polipéptido de T1R descrito en la presente invención, y el resto de la parte o partes puede proceder de otro GPCR. Los receptores quiméricos son muy conocidos en la técnica, y las técnicas para crearlos y la selección y los límites de los dominios o fragmentos de receptores acoplados a proteína G para su incorporación en ellos también son muy conocidos. Así, este conocimiento de los expertos en la técnica puede utilizarse con facilidad para crear dichos receptores quiméricos. El uso de estos receptores quiméricos puede proporcionar, por ejemplo, una característica de selectividad gustativa de uno de los receptores específicamente descritos en la presente invención, acoplado con las características de transducción de señales de otro receptor, tal como un receptor conocido utilizado en los sistemas de ensayo de la técnica anterior.

Tal como se indicó anteriormente, estas quimeras, análogas al receptor T1R nativo, o a la asociación o combinación de receptores T1R nativos, se unirán y/o serán activadas por moléculas que normalmente afectan al gusto dulce o al gusto umami. Los receptores o combinaciones de receptores T1R quiméricos funcionales son moléculas que, cuando se expresan por sí solas o en combinación con otros T1R u otros GPCR (que a su vez pueden ser quiméricos), se unen o son activadas por estímulos de sabor, en particular estímulos de sabor dulce (T1R2/3) o

umami (T1R/3). Las moléculas que provocan el sabor dulce incluyen edulcorantes naturales y artificiales, tales como sacarosa, aspartamo, xilitol, ciclamato, etc. Las moléculas que provocan el sabor umami incluyen glutamato y análogos del glutamato, y otros compuestos que se unen al T1R1 y/o T1R3 nativos, tales como 5'-nucleótidos.

5 Por ejemplo, un dominio, tal como un dominio de unión al ligando, un dominio extracelular, un dominio transmembrana, un dominio citoplásmico, un dominio N-terminal, un dominio C-terminal, o cualquiera de sus combinaciones, puede unirse covalentemente a una proteína heteróloga. Por ejemplo, un dominio extracelular de T1R puede unirse a un dominio transmembrana de GPCR heterólogo, o un dominio extracelular de GPCR heterólogo puede unirse a un dominio transmembrana de T1R. Pueden elegirse otras proteínas heterólogas, por ejemplo, la proteína fluorescente verde.

10 También se encuentran dentro del alcance de la invención células hospedadoras para expresar los polipéptidos de T1R de la invención. Para obtener unos niveles altos de expresión de un ácido nucleico o gen clonado, tales como ADNc que codifican los T1R, los fragmentos o las variantes de la invención, los expertos en la técnica generalmente subclonan la secuencia del ácido nucleico 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 a ribosomas para el inicio de la traducción. Los promotores bacterianos adecuados son muy conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.* Sin embargo, pueden utilizarse sistemas de expresión eucariotas o bacterianos.

15 Puede emplearse cualquiera de los procedimientos conocidos para introducir secuencias de nucleótidos extrañas en células hospedadoras. Estos incluyen el uso de transfección con fosfato de calcio, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, liposomas, microinyección, vectores plasmáticos, vectores víricos y cualquiera de los otros métodos muy conocidos para introducir ADN genómico, ADNc, y ADN sintético clonados u otro material genético extraño en una célula hospedadora (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*). Sólo es necesario que el procedimiento de modificación genética concreto utilizado sea capaz de introducir con éxito al menos una molécula de ácido nucleico en la célula hospedadora que sea capaz de expresar el fragmento de T1R o variante de interés.

25 Después de introducir el vector de expresión en las células, las células transfectadas se cultivan bajo condiciones que favorecen la expresión del receptor, fragmento, o variante de interés, que entonces se recupera del cultivo utilizando técnicas convencionales. Los ejemplos de dichas técnicas son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 00/06593).

Detección de los polipéptidos de T1R

30 Además de la detección de los genes T1R y de la expresión génica utilizando la tecnología de hibridación de ácidos nucleicos, también se pueden emplear inmunoensayos para detectar T1R, por ejemplo, para identificar células receptoras gustativas, y variantes de miembros de la familia T1R. Los inmunoensayos pueden utilizarse para analizar de modo cualitativo o cuantitativo los T1R. Una visión de conjunto general de la tecnología aplicable puede encontrarse en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988).

35 1. Anticuerpos contra miembros de la familia T1R

Los métodos para producir anticuerpos monoclonales y policlonales que reaccionen específicamente con un miembro de la familia T1R son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow y Lane, *supra*; Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed., 1986); y Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975)). Estas técnicas incluyen la preparación de anticuerpos mediante la selección de anticuerpos a partir de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, así como la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales mediante la inmunización de conejos o ratones (véase, por ejemplo, Huse *et al.*, *Science*, 246:1275-1281 (1989); Ward *et al.*, *Nature*, 341:544-546 (1989)).

45 Puede utilizarse una serie de inmunógenos que comprenden T1R para producir anticuerpos específicamente reactivos con un miembro de la familia T1R. Por ejemplo, un polipéptido de T1R recombinante, o un fragmento antigénico de este, puede aislarse tal como se describe en la presente memoria. Las regiones antigénicas adecuadas incluyen, por ejemplo, las secuencias consenso que se emplean para identificar miembros de la familia T1R. Las proteínas recombinantes pueden expresarse en células eucariotas o procariotas según se describió anteriormente, y purificarse como se describe en general anteriormente. Una proteína recombinante es el

50 inmunógeno preferido para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales. Como alternativa, puede utilizarse como inmunógeno un péptido sintético derivado de las secuencias descritas en la presente memoria y conjugado con una proteína portadora. La proteína natural también puede utilizarse, en forma pura o impura. El producto entonces se inyecta en un animal capaz de producir anticuerpos. Pueden generarse anticuerpos monoclonales o policlonales, para su posterior uso en inmunoensayos para medir la proteína.

55 Los métodos para producir anticuerpos policlonales son muy conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una raza endogámica de ratones (por ejemplo, ratones BALB/C) o conejos puede inmunizarse con la proteína utilizando un adyuvante convencional, tal como adyuvante de Freund, y un protocolo de inmunización convencional.

La respuesta inmunológica del animal a la preparación del inmunógeno se controla realizando sangrados de ensayo y determinando el título de reactividad frente al T1R. Cuando se obtienen unos títulos debidamente altos del anticuerpo contra el inmunógeno, se recoge sangre del animal y se prepara el antisuero. Si se desea, puede realizarse un posterior fraccionamiento del suero para enriquecer en anticuerpos reactivos a la proteína (véase, Harlow y Lane, *supra*).

Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse mediante diversas técnicas familiares para los expertos en la técnica. Brevemente, células de bazo de un animal inmunizado con un antígeno deseado pueden immortalizarse, generalmente mediante una fusión con una célula de mieloma (véase, Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519 (1976)). Los métodos alternativos de immortalización incluyen la transformación con virus de Epstein-Barr, oncogenes, o retrovirus, u otros métodos muy conocidos en la técnica. Las colonias que surgen de células inmortalizadas individuales se seleccionan para la producción de anticuerpos con la especificidad y la afinidad deseadas por el antígeno, y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidos por estas células puede potenciarse mediante diversas técnicas, incluyendo la inyección en la cavidad peritoneal de un hospedante vertebrado. Como alternativa, se pueden aislar secuencias de ADN que codifiquen un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión de este, mediante la selección de una biblioteca de ADN procedente de células B humanas según el protocolo general esbozado por Huse *et al.*, *Science*, 246:1275-1281 (1989).

Los anticuerpos monoclonales y el suero policlonal se recogen y se titulan frente a la proteína inmunogénica en un inmunoensayo, por ejemplo, un inmunoensayo en fase sólida con el inmunógeno inmovilizado sobre un soporte sólido. Generalmente, se seleccionan los antisueros policlonales con un título de 104 o mayor, y se ensayan para determinar su reactividad cruzada con otros polipéptidos que no sean T1R, o incluso otros miembros de la familia T1R u otras proteínas relacionadas procedentes de otros organismos, utilizando un inmunoensayo de unión competitiva. Los antisueros policlonales y los anticuerpos monoclonales específicos normalmente 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.

Cuando estén disponibles anticuerpos específicos de miembros de la familia T1R, pueden detectarse proteínas de T1R individuales y fragmentos de proteínas de T1R mediante una diversidad de métodos de inmunoensayo. Para un análisis de procedimientos inmunológicos y de inmunoensayo, 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 analizan a fondo en *Enzyme Immunoassay* (Maggio, ed., 1980); y Harlow y Lane, *supra*.

2. Ensayos de unión inmunológicos

Las proteínas de T1R, los fragmentos y las variantes pueden detectarse y/o cuantificarse utilizando cualquiera de una serie de ensayos de unión inmunológicos muy reconocidos (véanse, por ejemplo, las patentes de EEUU 4.366.241, 5.376.110, 4.517.288, y 4.837.168). Para un análisis de los inmunoensayos generales, 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) generalmente emplean un anticuerpo que se une específicamente con una proteína o un antígeno elegido (en este caso, un miembro de la familia T1R, o una subsecuencia antigénica de este). El anticuerpo (por ejemplo, anti-T1R) puede producirse mediante cualquiera de una serie de medios muy conocidos por los expertos en la técnica y según se describió anteriormente.

Los inmunoensayos a menudo emplean un agente marcador para unirse específicamente y marcar el complejo formado por el anticuerpo y el antígeno. El agente marcador puede ser en sí mismo uno de los restos que comprende el complejo de anticuerpo/antígeno. Así, el agente marcador puede ser un polipéptido de T1R marcado o un anticuerpo anti-T1R marcado. Como alternativa, el agente marcador puede ser un tercer resto, tal como un anticuerpo secundario, que se une específicamente al complejo de anticuerpo/T1R (un anticuerpo secundario generalmente es específico de anticuerpos de la especie de la cual se deriva el primer anticuerpo). Otras proteínas capaces de unirse específicamente a regiones constantes de inmunoglobulinas, tales como la proteína A o la proteína G, también pueden utilizarse como agente marcador. Estas proteínas muestran una fuerte reactividad no inmunogénica con las regiones constantes de inmunoglobulinas procedentes de una diversidad de especies (véase, por ejemplo, Kronval *et al.*, *J. Immunol.*, 111:1401-1406 (1973); Akerstrom *et al.*, *J. Immunol.*, 135:2589-2542 (1985)). El agente marcador puede modificarse con un resto detectable, tal como biotina, al cual puede unirse específicamente otra molécula, tal como estreptavidina. Una diversidad de restos detectables son muy conocidos por los expertos en la técnica.

A lo largo de 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, el antígeno, el volumen de disolución, las concentraciones y similares. Habitualmente, los ensayos se realizarán a temperatura ambiente, aunque pueden realizarse a lo largo de un intervalo de temperaturas, tales como de 10 °C a 40 °C.

A. Formatos de ensayo no competitivos

Los inmunoensayos para detectar un polipéptido de 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 "sandwich" preferido, por ejemplo, los anticuerpos anti-T1R pueden unirse directamente a un sustrato sólido sobre el cual se inmovilizan. Estos anticuerpos inmovilizados entonces capturan el polipéptido de T1R presente en la muestra de ensayo. Al polipéptido de T1R así inmovilizado entonces se une un agente marcador, tal como un segundo anticuerpo de T1R que porta un marcador. Como alternativa, el segundo anticuerpo puede carecer de marcador pero, a su vez, puede ser unido por un tercer anticuerpo marcado específico de los anticuerpos de la especie de la cual se deriva el segundo anticuerpo. El segundo o tercer anticuerpo generalmente está modificado con un resto detectable, tal como biotina, al cual se une específicamente otra molécula, por ejemplo estreptavidina, para proporcionar un resto detectable.

B. Formatos de ensayo competitivos

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

Un ensayo de inhibición de hapteno es otro ensayo competitivo preferido. En este ensayo, el polipéptido de T1R conocido se inmoviliza sobre un sustrato sólido. Una cantidad conocida de anticuerpo anti-T1R se añade a la muestra, y la muestra entonces se pone en contacto con el T1R inmovilizado. La cantidad de anticuerpo anti-T1R unido al polipéptido de T1R inmovilizado conocido es inversamente proporcional a la cantidad de polipéptido de T1R presente en la muestra. De nuevo, la cantidad de anticuerpo inmovilizado puede detectarse detectando la fracción inmovilizada del anticuerpo o la fracción del anticuerpo que permanece en disolución. La detección puede ser directa, en la que el anticuerpo está marcado, o indirecta, por la adición posterior de un resto marcado que se une específicamente con el anticuerpo tal como se describió anteriormente.

C. Determinaciones de la reactividad cruzada

También pueden emplearse inmunoensayos en 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 sobre un soporte sólido. Se añaden proteínas (por ejemplo, polipéptidos de T1R u homólogos) al ensayo que compiten por la unión del antisuero al antígeno inmovilizado. La capacidad de las proteínas añadidas para competir por la unión del antisuero a la proteína inmovilizada se compara con la capacidad del polipéptido de T1R codificado por las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la presente memoria para competir con sí mismo. Se calcula el porcentaje de reactividad cruzada para las anteriores proteínas, utilizando cálculos convencionales. Los antisueros con menos del 10% de reactividad cruzada con cada una de las proteínas añadidas listadas anteriormente se seleccionan y se reúnen. Los anticuerpos de reactividad cruzada se retiran opcionalmente de los antisueros reunidos mediante inmunoabsorción con las proteínas consideradas añadidas, por ejemplo, homólogos con una relación distante. Además, en las determinaciones de la reactividad cruzada pueden emplearse péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos que representan motivos conservados que se utilizan para identificar miembros de la familia T1R.

Los antisueros inmunoabsorbidos y reunidos entonces se emplean en un inmunoensayo de unión competitiva según se describió anteriormente para comparar una segunda proteína, de la cual se cree que quizás es un alelo o una variante polimórfico de un miembro de la familia T1R, con la proteína del inmunógeno (es decir, un polipéptido de T1R codificado por las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la presente memoria). Para realizar esta comparación, las dos proteínas se ensayan cada una a una amplia gama de concentraciones, y se determina la cantidad de cada proteína requerida para inhibir 50% de la unión de los antisueros a la proteína inmovilizada. Si la cantidad de la segunda proteína requerida para inhibir 50% de la unión es menor que 10 veces la cantidad de la proteína codificada por las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la presente memoria requerida para inhibir 50% de la unión, entonces se dice que la segunda proteína se une específicamente a los anticuerpos policlonales generados contra un inmunógeno de T1R.

Los anticuerpos generados contra motivos conservados de T1R también pueden utilizarse para preparar anticuerpos que se unen específicamente sólo a GPCR de la familia T1R, pero no a GPCR de otras familias.

Pueden prepararse anticuerpos policlonales que se unen específicamente a un miembro particular de la familia T1R sustrayendo los anticuerpos de reactividad cruzada utilizando otros miembros de la familia T1R. Pueden prepararse

anticuerpos policlonales específicos de especie de una manera similar. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos específicos de T1R1 humano sustrayendo los anticuerpos que tengan reactividad cruzada con secuencias ortólogas, por ejemplo, T1R1 de rata o T1R1 de ratón.

D. Otros formatos de ensayo

- 5 Se emplea un análisis de la transferencia Western (inmunotransferencia) para detectar y cuantificar la presencia del polipéptido de T1R en la muestra. La técnica en general comprende separar las proteínas de la muestra mediante electroforesis en gel basándose en el peso molecular, transferir las proteínas separadas a un soporte sólido adecuado (tal como un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nailon, o un filtro de nailon derivatizado), e incubar la muestra con los anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido de T1R. Los anticuerpos antipolipéptido de T1R se unen específicamente al polipéptido de T1R sobre el soporte sólido. Estos anticuerpos pueden marcarse directamente o, como alternativa, pueden ser detectados posteriormente utilizando anticuerpos marcados (por ejemplo, anticuerpos anti-ratón de oveja marcados) que se unen específicamente a los anticuerpos anti-T1R.

- 10 Otros formatos de ensayo incluyen inmunoensayos de liposomas (LIA), que emplean liposomas diseñados para unirse a moléculas específicas (por ejemplo, anticuerpos) y liberan marcadores o reactivos encapsulados. Los compuestos químicos liberados entonces se detectan según técnicas convencionales (véase, Monroe *et al.*, *Amer. Clin. Prod. Rev.*, 5:34-41 (1986)).

E. Reducción de la unión no específica

- 20 Los expertos en la técnica apreciarán que a menudo resulta deseable minimizar la unión no específica en los inmunoensayos. En particular, cuando el ensayo implica un antígeno o un anticuerpo inmovilizado sobre un sustrato sólido, resulta deseable minimizar la cantidad de unión no específica al sustrato. Los medios para reducir dicha unión no específica son muy conocidos por los expertos en la técnica. Generalmente, esta técnica implica revestir el sustrato superficie con una composición proteica. En particular, se emplean muchas composiciones de proteínas, tales como albúmina de suero bovina (BSA), leche en polvo desnatada, y gelatina, siendo la leche en polvo la más preferida.

25 F. Marcadores

- El marcador o grupo detectable concreto utilizado en el ensayo no es un aspecto crítico de la invención, con la condición de que no interfiera significativamente con la unión específica del anticuerpo utilizado en el ensayo. El grupo detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Estos marcadores detectables han tenido un extenso desarrollo en el campo de los inmunoensayos y, en general, casi cualquier marcador útil en dichos métodos puede aplicarse a la presente invención. Por tanto, un marcador es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inorgánicos, eléctricos, ópticos, o químicos. Los marcadores útiles en la presente invención incluyen esferas magnéticas (por ejemplo, DYNABEADSTM), tintes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo de Texas, rodamina, y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{14}C , ^{35}S), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y otras que se emplean habitualmente en un ELISA), y marcadores colorimétricos, tales como oro coloidal o esferas de vidrio o plástico coloreadas (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

- 40 El marcador puede estar acoplado directa o indirectamente al componente deseado del ensayo según métodos muy conocidos en la técnica. Tal como se indicó anteriormente, puede emplearse una amplia variedad de marcadores, dependiendo la elección del marcador de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con el compuesto, requisitos de estabilidad, instrumentos disponibles, y previsiones de eliminación.

- Los marcadores no radiactivos a menudo se unen por medios indirectos. En general, una molécula de ligando (por ejemplo, biotina) se une covalentemente a la molécula. El ligando entonces se une a otra molécula (por ejemplo, estreptavidina), que es inherentemente detectable o que está unida covalentemente a un sistema señalizador, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente, o un compuesto quimioluminiscente. Los ligandos y sus dianas pueden utilizarse en cualquier combinación adecuada con anticuerpos que reconozcan un polipéptido de T1R, o anticuerpos secundarios que reconozcan los anti-T1R.

- 50 Las moléculas también pueden conjugarse directamente con compuestos generadores de señales, por ejemplo, mediante conjugación con una enzima o un fluoróforo. Las enzimas de interés como marcadores son principalmente hidrolasas, en particular fosfatasas, esterasas y glicosidasas, u oxidotasas, en particular peroxidatasas. Los compuestos fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, etc. Los compuestos quimioluminiscentes incluyen luciferina, y 2,3-dihidroftalazindionas, por ejemplo, luminol. Para un análisis de diversos sistemas productores de señales o de marcadores que pueden utilizarse véase la patente de EEUU nº 4.391.904.

- 55 Los medios para detectar marcadores son muy conocidos por los expertos en la técnica. Así, por ejemplo, cuando el marcador es un marcador radiactivo, los medios para la detección incluyen un contador de centelleo o una película fotográfica, como en una autorradiografía. Cuando el marcador es un marcador fluorescente, puede detectarse excitando el fluorocromo con la longitud de onda de luz apropiada y detectando la fluorescencia resultante. La

fluorescencia puede detectarse por medios visuales, por medio de una película fotográfica, mediante el uso de detectores electrónicos, tales como dispositivos acoplados a carga (CCD) o fotomultiplicadores, y similares. De manera similar, los marcadores enzimáticos pueden detectarse proporcionando los sustratos apropiados para la enzima y detectando el producto de la reacción resultante. Por último, los marcadores colorimétricos pueden detectarse simplemente observando el color asociado al marcador. Así, en diversos ensayos con bastoncillos, el oro conjugado a menudo aparece como rosa, mientras que en diversas esferas conjugadas aparece el color de la esfera.

Algunos formatos de ensayo no requieren el uso de componentes marcados. Por ejemplo, pueden emplearse ensayos de aglutinación para detectar la presencia de los anticuerpos diana. En este caso, las partículas revestidas con antígeno son aglutinadas por muestras que comprenden los anticuerpos diana. En este formato, no es necesario que ninguno de los componentes esté marcado, y la presencia del anticuerpo diana se detecta mediante una simple inspección visual.

Detección de moduladores

Las composiciones y los métodos para determinar si un compuesto de ensayo se une específicamente con un receptor T1R de la invención, *in vitro* e *in vivo*, se describen a continuación. Muchos aspectos de la fisiología celular pueden controlarse para evaluar el efecto de la unión del ligando a un polipéptido de T1R de la invención. Estos ensayos pueden realizarse sobre células intactas que expresen un receptor quimiosensorial, sobre células permeabilizadas, o sobre fracciones de membranas producidas por métodos convencionales o proteínas sintetizadas *de novo in vitro*.

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

Las proteínas o los polipéptidos de T1R del ensayo preferiblemente se seleccionarán de un polipéptido que tenga la secuencia del polipéptido de T1R seleccionada de las descritas en el ejemplo 1, o sus fragmentos o variantes modificadas de modo conservador. Opcionalmente, los fragmentos y variantes pueden ser fragmentos y variantes antigénicos que se unen a un anticuerpo anti-T1R. Opcionalmente, los fragmentos y variantes pueden unirse o activarse por edulcorantes o estimulantes del gusto umami.

Como alternativa, las proteínas o los polipéptidos de T1R del ensayo puede derivarse de una célula hospedadora eucariota, y pueden incluir una subsecuencia de aminoácidos que tenga una coincidencia de secuencia de aminoácidos con los polipéptidos de T1R descritos en el ejemplo 1, o sus fragmentos o variantes modificadas de modo conservador. En general, la coincidencia de la secuencia de aminoácidos será al menos 35% a 50%, u opcionalmente 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. Opcionalmente, las proteínas o los polipéptidos de T1R de los ensayos pueden comprender un dominio de una proteína de T1R, tal como un dominio extracelular, un dominio transmembrana, un dominio citoplásmico, un dominio de unión al ligando y similares. Además, tal como se describió anteriormente, la proteína de T1R, o un dominio de esta, puede unirse covalentemente a una proteína heteróloga para crear una proteína quimérica utilizada en los ensayos descritos en la presente memoria.

Los moduladores de la actividad del receptor T1R se ensayan utilizando proteínas o polipéptidos de T1R según se describió anteriormente, tanto recombinantes como naturales. Las proteínas o los polipéptidos de T1R pueden aislarse, coexpresarse en una célula, coexpresarse en una membrana derivada de una célula, coexpresarse en un tejido o en un animal, tanto recombinantes como naturales. Por ejemplo, pueden emplearse cortes de lengua, células disociadas de una lengua, células transformadas, o membranas. La modulación puede ensayarse utilizando uno de los ensayos *in vitro* o *in vivo* descritos en la presente memoria.

Por ejemplo, según se describe en los ejemplos experimentales siguientes, se ha descubierto que ciertos 5¹-nucleótidos, por ejemplo, 5¹-IMP o 5¹-GMP, potencian la actividad del L-glutamato para activar el receptor gustativo del umami, o bloquean la activación de receptor gustativo del umami por estímulos de sabor umami, tales como L-glutamato y L-aspartato.

1. Ensayos de unión *in vitro*

La transducción del gusto también puede estudiarse *in vitro* con reacciones en estado sólido o soluble, utilizando los polipéptidos de T1R de la invención. En una realización concreta, los dominios de unión al ligando de T1R pueden utilizarse *in vitro* en reacciones en estado sólido o soluble para ensayar la unión de ligandos.

Por ejemplo, se predice que el dominio N-terminal de T1R estará implicado en la unión al ligando. Más en concreto, los T1R pertenecen a una subfamilia de GPCR que se caracterizan por unos segmentos N-terminales extracelulares grandes, de aproximadamente 600 aminoácidos. Se cree que estos segmentos N-terminales forman los dominios de

unión al ligando y, por tanto, son útiles en ensayos bioquímicos para identificar agonistas y antagonistas de T1R. Es posible que el dominio de unión al ligando pueda estar formado por porciones adicionales del dominio extracelular, tales como los bucles extracelulares del dominio transmembrana.

5 Se han empleado ensayos de unión *in vitro* 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 desplazar un ligando marcado de modo radiactivo o fluorescente, medir los cambios en la fluorescencia intrínseca o los cambios en la susceptibilidad proteolítica, etc.

10 La unión del ligando con un complejo heteromultimérico de polipéptidos de T1R de la invención puede ensayarse en disolución, en una membrana de bicapa, opcionalmente unida a una fase sólida, en una monocapa lipídica, o en vesículas. Puede ensayarse la unión de un modulador utilizando, por ejemplo, cambios en las características espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice refractivo), hidrodinámicas (por ejemplo, forma), cromatográficas, o propiedades de solubilidad.

15 En otra realización de la invención, puede utilizarse un ensayo de $GTP\gamma^{35}S$. Tal como se describió anteriormente, tras la activación de un GPCR, la subunidad $G\alpha$ del complejo de la proteína G se estimula para que intercambie el GDP unido por GTP. La estimulación mediada por ligandos de la actividad de intercambio de la proteína G puede medirse en un ensayo bioquímico que mide la unión de $GTP\gamma^{35}S$ marcado de modo radiactivo añadido, a la proteína G en presencia de un ligando putativo. Generalmente, las membranas que contienen el receptor quimiosensorial de interés se mezclan con un complejo de proteínas G. Se añaden al ensayo inhibidores y/o activadores potenciales y $GTP\gamma^{35}S$, y se mide la unión de $GTP\gamma^{35}S$ a la proteína G. La unión puede medirse mediante un recuento de centelleo líquido o mediante cualquier otro medio conocido en la técnica, incluyendo ensayos de proximidad de centelleo (SPA). En otros formatos de ensayos, pueden utilizarse $GTP\gamma S$ marcados de modo fluorescente.

2. Ensayos de polarización de fluorescencia

25 En otra realización, pueden emplearse ensayos basados en la polarización de fluorescencia ("FP") para detectar y controlar la unión del ligando. La polarización de 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 fluorescencia son homogéneos porque no requieren una etapa de separación, tal como centrifugación, filtración, cromatografía, precipitación, o electroforesis. Estos ensayos se realizan a tiempo real, directamente en disolución, y no requieren una fase inmovilizada.

30 Los valores de polarización puede medirse repetidamente y después de la adición de reactivos, puesto que la medición de la polarización es rápida y no destruye la muestra. En general, esta técnica puede utilizarse para medir los valores de polarización de fluoróforos desde niveles picomolares a micromolares. Esta sección describe cómo puede emplearse la polarización de fluorescencia de una manera simple y cuantitativa para medir la unión de ligandos a los polipéptidos de T1R de la invención.

35 Cuando una molécula marcada de modo fluorescente se excita con una luz polarizada en un plano, emite luz que tiene un grado de polarización que es inversamente proporcional a su rotación molecular. Las moléculas grandes marcadas con fluorescencia permanecen relativamente estacionarias 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 con fluorescencia rotan con rapidez durante el estado excitado, y la polarización cambia significativamente entre la excitación y la emisión. Por tanto, las moléculas pequeñas tienen bajos valores de polarización, y las moléculas grandes tienen altos valores de polarización. Por ejemplo, un oligonucleótido monocatenario marcado con fluoresceína tiene un valor de polarización relativamente bajo, pero cuando se hibrida con una hebra complementaria tiene un valor de polarización mayor. Cuando se emplea la FP para detectar y controlar la unión del estimulante del gusto, que puede activar o inhibir los receptores quimiosensoriales de la invención, pueden emplearse estimulantes del gusto marcados con fluorescencia o estimulantes del gusto autofluorescentes.

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

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

50 en la que Π es la intensidad de la emisión de luz paralela al plano de luz de excitación, e Int_{\perp} es la intensidad de la emisión de luz perpendicular al plano de luz de excitación. Siendo P, una proporción de intensidades de luz, un número adimensional. Por ejemplo, junto con estos ensayos puede utilizarse el sistema Beacon® y Beacon 2000™. Estos sistemas generalmente expresan la polarización en unidades de milipolarización (1 unidad de polarización = 100 unidades mP).

55 La relación entre la rotación molecular y el tamaño se describe mediante la ecuación de Perrin, y se hace referencia al lector a la cita de Jolley, M.E. (1991), en *Journal of Analytical Toxicology*, págs. 236-240, que ofrece una explicación a fondo de esta ecuación. En resumen, la ecuación de Perrin expone que la polarización es directamente

proporcional al tiempo de relajación rotacional, el tiempo que tarda una molécula en rotar 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 gas (R) mediante la siguiente ecuación:

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

5

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

10

15 A. Ensayos de alto rendimiento en estado sólido y solubles

En otra realización, la invención proporciona ensayos solubles que emplean un complejo de polipéptidos de T1R hetero-oligomérico; o una célula o un tejido que coexpresa polipéptidos de T1R. Preferiblemente, la célula comprenderá una línea celular que coexpresa de forma estable un receptor gustativo T1R2/T1R3 (dulce) funcional. En otra realización, la invención proporciona ensayos *in vitro* basados en una fase sólida en un formato de alto rendimiento, en los que los polipéptidos de T1R, o una célula o un tejido que expresa los polipéptidos de T1R, se une a un sustrato en fase sólida o a un compuesto estimulante del gusto, y se pone en contacto con un receptor T1R, y la unión se detecta utilizando un marcador apropiado o un anticuerpo generado contra el receptor T1R.

20

En los ensayos de alto rendimiento de la invención, es posible seleccionar hasta varios miles de moduladores o ligandos diferentes en un único día. En particular, cada pocillo de una placa de microtitulación puede utilizarse para ejecutar un ensayo distinto 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 ensayarse con un único modulador. Así, una única placa de microtitulación convencional puede ensayar aproximadamente 100 (por ejemplo, 96) moduladores. Si se emplean placas de 1536 pocillos, entonces una única placa puede ensayar con facilidad 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 ensayos de selección de hasta aproximadamente 6.000-20.000 compuestos diferentes utilizando los sistemas integrados de la invención. En fechas más recientes, se han desarrollado estrategias de microfluidos para la manipulación de reactivos.

25

30

La molécula de interés puede unirse al componente en estado sólido de modo directo o indirecto, 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 una al marcador (un ligante del marcador) se fija a un soporte sólido, y la molécula marcada de interés (por ejemplo, la molécula de transducción del gusto de interés) se fija al soporte sólido mediante la interacción del marcador y el ligante del marcador.

35

Basándose en interacciones moleculares conocidas, bien descritas en la bibliografía, puede emplearse una serie de marcadores y ligantes de marcadores. Por ejemplo, cuando un marcador tiene un ligante natural, por ejemplo, biotina, proteína A, o proteína G, puede utilizarse junto con los ligantes de marcadores apropiados (avidina, estreptavidina, neutravidina, la región Fc de una inmunoglobulina, etc.). También están ampliamente disponibles anticuerpos contra moléculas con ligantes naturales, tales como biotina, y los ligantes de marcadores apropiados (véase, SIGMA Immunochemicals, catálogo de 1998 de SIGMA, St. Louis, MO).

40

De forma similar, cualquier compuesto hapténico o antigénico puede utilizarse en combinación con un anticuerpo apropiado para formar una pareja de marcador/ligante del marcador. Miles de anticuerpos específicos están disponibles en el mercado, y en la bibliografía se describen muchos otros anticuerpos. Por ejemplo, en una configuración habitual, el marcador es un primer anticuerpo y el ligante del marcador es un segundo anticuerpo que reconoce al primer anticuerpo. Además de las interacciones anticuerpo-antígeno, las interacciones de receptor-ligando también son apropiadas como parejas de marcadores y ligante de marcador, por ejemplo, agonistas y antagonistas de receptores de la membrana celular (por ejemplo, interacciones de receptores celulares-ligandos, tales como transferrina, c-kit, ligandos de receptores víricos, receptores de citoquinas, receptores de quimioquinas, la familia de cadhereínas, la familia de integrinas, la familia de selectinas, y similares; véase, por ejemplo, Pigott y Power, The Adhesion Molecule Facts Book I (1993)). De manera similar, toxinas y venenos, epitopos víricos, hormonas (por ejemplo, opiáceas, esteroideas, etc.), receptores intracelulares (por ejemplo, que intervienen en los efectos de diversos ligandos pequeños, incluyendo esteroides, hormona tiroidea, retinoides y vitamina D; péptidos), fármacos, lectinas, azúcares, ácidos nucleicos (en configuración de polímero lineal y cíclico), oligosacáridos, proteínas, fosfolípidos y anticuerpos pueden todos interactuar con diversos receptores celulares.

45

50

55

Los polímeros sintéticos, tales como poliuretanos, poliésteres, policarbonatos, poliureas, poliamidas, polietileniminas, poliarilensulfuros, polisiloxanos, poliimidias, y poliacetatos, también pueden formar un marcador o un ligante de marcador apropiado. Muchas otras parejas de marcador/ligante de marcador también son útiles en los sistemas de ensayo descritos en la presente memoria, tal como será evidente para los expertos en la técnica tras el análisis de esta descripción.

Los conectores habituales, tales como péptidos, poliéteres y similares, también pueden actuar como marcadores, e incluyen secuencias polipeptídicas, tales como secuencias de poli-gly de entre aproximadamente 5 y 200 aminoácidos. Estos conectores flexibles son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, están disponibles conectores de polietilenglicol en Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Alabama. Estos conectores opcionalmente tienen enlaces amida, enlaces sulfhidrilo, o enlaces heterofuncionales.

Los ligantes de marcadores se fijan a sustratos sólidos utilizando cualquiera de una diversidad de métodos disponibles en la actualidad. Los sustratos sólidos habitualmente se derivatizan o se funcionalizan exponiendo todo o una parte del sustrato a un reactivo químico que fija un grupo químico sobre la superficie, que es reactivo con una parte del ligante del marcador. Por ejemplo, grupos que son adecuados para su unión a una parte de cadena más larga incluirán grupos amina, hidroxilo, tiol, y carboxilo. Pueden utilizarse aminoalquilsilanos e hidroxialquilsilanos para funcionalizar una diversidad de superficies, tales como superficies de vidrio. Lo esencial de dichas matrices de biopolímeros en fase sólida está bien descrito en la bibliografía; véase, por ejemplo, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963) (que describe la síntesis en fase sólida, por ejemplo, de péptidos); Geysen *et al.*, *J. Immun. Meth.*, 102:259-274 (1987) (que describe la síntesis de componentes en fase sólida sobre varillas); Frank y Doring, *Tetrahedron*, 44:6031-6040 (1988) (que describe la síntesis de diversas secuencias peptídicas sobre discos de celulosa); Fodor *et al.*, *Science*, 251:767-777 (1991); Sheldon *et al.*, *Clinical Chemistry*, 39(4):718-719 (1993); y Kozal *et al.*, *Nature Medicine*, 2(7):753-759 (1996) (todos describen matrices de biopolímeros fijados a sustratos sólidos). Las estrategias no químicas para fijar ligantes de marcadores a sustratos incluyen otros métodos habituales, tales como calor, reticulación mediante radiación UV, y similares.

3. Ensayos basados en células

En una realización de tratamiento preferida, una combinación de proteínas o polipéptidos de T1R se coexpresa de forma transitoria o estable en una célula eucariota en una forma no modificada o como receptores quiméricos, variantes o truncados con, o preferiblemente sin, una secuencia de chaperona heteróloga que facilita su maduración y que actúa para el transporte dirigido a través de la vía secretora. Estos polipéptidos de T1R pueden expresarse en cualquier célula eucariota, tal como células HEK-293. Preferiblemente, las células comprenden una proteína G funcional, por ejemplo, Gα15 o la proteína G quimérica previamente identificada, u otra proteína G que sea capaz de acoplar el receptor quimérico a una vía de señalización intracelular o a una proteína de señalización, tal como fosfolipasa C. Además, preferiblemente se producirá una célula que coexpresa de forma estable T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3, puesto que se ha descubierto que dichas células (tal como se muestra en los ejemplos experimentales) muestran respuestas potenciadas a estímulos de sabor (con relación a células que expresan de forma transitoria la misma combinación de T1R). La activación de los receptores T1R en dichas células puede detectarse utilizando cualquier método convencional, tal como detectando cambios en el calcio intracelular mediante la detección de la fluorescencia dependiente de Fluo-4 en la célula. Este ensayo es la base de los descubrimientos experimentales presentados en esta solicitud.

Los receptores GPCR activados a menudo son sustratos para quinasas que fosforilan la cola C-terminal del receptor (y probablemente también otros sitios). Así, los activadores estimularán la transferencia de ³²P desde ATP radiomarcado al receptor, que puede ensayarse con un contador de centelleo. La fosforilación de la cola C-terminal estimulará la unión de proteínas de tipo arrestina e interferirá con la unión de las proteínas G. Para un análisis general de la transducción de señales en GPCR y de los métodos para ensayar la transducción de señales véase, por ejemplo, *Methods in Enzymology*, vols. 237 y 238 (1994) y volumen 96 (1983); Bourne *et al.*, *Nature*, 10:349:117-127 (1991), Bourne *et al.*, *Nature*, 348:125-132 (1990); Pitcher *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.*, 67:653-692 (1998).

La modulación de T1R puede ensayarse comparando la respuesta de polipéptidos de T1R tratados con un modulador de T1R putativo con la respuesta de una muestra control no tratada o una muestra que contiene un control "positivo" conocido. Estos moduladores de T1R putativos pueden incluir moléculas que inhiban o activen la actividad del polipéptido de T1R. En una realización, a las muestras control (no tratadas con activadores o inhibidores) se les asigna un valor de actividad T1R relativo de 100. La inhibición de un polipéptido de T1R se logra cuando el valor de actividad T1R con relación al control es de aproximadamente 90%, opcionalmente 50%, opcionalmente 25-0%. La activación de un polipéptido de T1R se logra cuando el valor de actividad T1R con relación al control es del 110%, opcionalmente 150%, 200-500%, o 1000-2000%.

Los cambios en el flujo de iones pueden evaluarse determinando los cambios en la polarización iónica (es decir, el potencial eléctrico) de la célula o la membrana que expresa un polipéptido de T1R. Un medio para determinar los cambios en la polarización celular es midiendo los cambios en la corriente (midiendo con ello los cambios en la polarización) con técnicas de fijación de voltaje y de fijación de parche (véase, por ejemplo, el modo "fijado a células", el modo "de fuera adentro", y el modo de "célula completa", por ejemplo, Ackerman *et al.*, *New Engl. J. Med.*, 336:1575-1595 (1997)). Las corrientes de células completas se determinan de modo conveniente utilizando el

patrón. Otros ensayos conocidos incluyen: ensayos de flujo de iones radiomarcados y ensayos de fluorescencia que emplean tintes sensibles al voltaje (véase, por ejemplo, Vestergarrd-Bogind *et al.*, *J. Membrane Biol.*, 88:67-75 (1988); Gonzales y Tsien, *Chem. Biol.*, 4:269-277 (1997); Daniel *et al.*, *J. Pharmacol. Meth.*, 25:185-193 (1991); Holevinsky *et al.*, *J. Membrane Biology*, 137:59-70 (1994)).

- 5 Los efectos de los compuestos de ensayo sobre la función de los polipéptidos pueden medirse estudiando cualquiera de los parámetros descritos anteriormente. Cualquier cambio fisiológico adecuado que afecte a la actividad GPCR puede emplearse para evaluar la influencia de un compuesto de ensayo sobre los polipéptidos de esta invención. Cuando se determinan las consecuencias funcionales utilizando células intactas o animales, también se puede medir una diversidad de efectos, tales como la liberación de transmisores, la liberación de hormonas, los cambios transcripcionales frente a marcadores genéticos conocidos y no caracterizados (por ejemplo, transferencias Northern), cambios en el metabolismo celular, tales como el crecimiento celular o cambios en el pH, y cambios en los segundos mensajeros intracelulares, tales como Ca^{2+} , IP3, GMPc, o AMPc.

- 15 Los ensayos preferidos para GPCR incluyen células que se cargan con tintes sensibles a iones o a voltaje para indicar la actividad del receptor. Los ensayos para determinar la actividad de dichos receptores también pueden utilizar agonistas y antagonistas de otros receptores acoplados a proteína G como controles para evaluar la actividad de los compuestos ensayados. En ensayos para identificar compuestos moduladores (por ejemplo, agonistas, antagonistas), los cambios en el nivel de iones en el citoplasma o el voltaje de membrana se controlarán utilizando un indicador fluorescente sensible a iones o de voltaje de membrana, respectivamente. Entre los indicadores sensibles a iones y las sondas de voltaje que pueden emplearse se encuentran los descritos en el catálogo de 1997 de Molecular Probes. Para receptores acoplados a proteína G, pueden utilizarse proteínas promiscuas, tales como $G\alpha 15$ y $G\alpha 16$ en el ensayo elegido (Wilkie *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:10049-10053 (1991)).

- 25 La activación del receptor inicia posteriores acontecimientos intracelulares, por ejemplo, un aumento en los segundos mensajeros. La activación de algunos receptores acoplados a proteína G estimula la formación de trifosfato inositol (IP3) a través de la hidrólisis mediada por fosfolipasa C de fosfatidilinositol (Berridge e Irvine, *Nature*, 312:315-321 (1984)). IP3, a su vez, estimula la liberación de las reservas de ion calcio intracelulares. Así, un cambio en los niveles de ion calcio citoplásmicos, o un cambio en los niveles de los segundos mensajeros, tales como IP3, puede utilizarse para evaluar la función del receptor acoplado a proteína G. Las células que expresan dichos receptores acoplados a proteína G pueden mostrar unos mayores niveles de calcio citoplásmico como resultado de la contribución de la liberación de calcio desde las reservas intracelulares y la entrada de calcio extracelular a través de canales iónicos en la membrana plasmática.

- 35 En una realización preferida, la actividad del polipéptido de T1R se mide mediante la coexpresión estable o transitoria de genes T1R, preferiblemente estable, en una célula heteróloga con una proteína G promiscua que une el receptor a una vía de transducción de señales de fosfolipasa C (véase Offermanns y Simon, *J. Biol. Chem.*, 270:15175-15180 (1995)). En una realización preferida, la línea celular es HEK-293 (que normalmente no expresa genes T1R) y la proteína G promiscua es $G\alpha 15$ (Offermanns y Simon, *supra*). La modulación de la transducción del gusto se ensaya midiendo los cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelulares, que cambian en respuesta a la modulación de la vía de transducción de señales de T1R a través de la administración de una molécula que se asocia con los polipéptidos de T1R. Los cambios en los niveles de Ca^{2+} se miden opcionalmente utilizando tintes indicadores de Ca^{2+} fluorescentes y formación de imágenes fluorométricas.

- 40 En otra realización, la hidrólisis del fosfatidilinositol (PI) puede analizarse según la patente de EEUU 5.436.128.

- 45 Brevemente, 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 una cromatografía de intercambio iónico y se cuantifican mediante recuento de centelleo. La estimulación del plegamiento se determina calculando la proporción de cpm en presencia de un agonista, a cpm en presencia de un tampón control. De manera similar, la inhibición del plegamiento se determina calculando la proporción de cpm en presencia de un antagonista, a cpm en presencia de un tampón control (que puede o no contener un agonista).

- 50 Otros ensayos de receptores pueden implicar la determinación del nivel de nucleótidos cíclicos intracelular, por ejemplo, AMPc o GMPc. En los casos en que la activación del receptor resulta en una disminución de los niveles de nucleótidos cíclicos, puede ser preferible exponer las células a agentes que aumenten los niveles de nucleótidos cíclicos intracelulares, por ejemplo, forskolina, antes de añadir un compuesto activador del receptor a las células en el ensayo. En una realización, los cambios en AMPc o GMPc intracelulares pueden medirse utilizando inmunoensayos. El método descrito en Offermanns y Simon, *J. Bio. Chem.*, 270:15175-15180 (1995) puede utilizarse para determinar el nivel de AMPc. Además, el método descrito en Felley-Bosco *et al.*, *Am. J. Resp. Cell and Mol. Biol.*, 11:159-164 (1994) puede utilizarse para determinar el nivel de GMPc. Además, un kit de ensayo para medir AMPc y/o GMPc se describe en la patente de EEUU 4.115.538.

En otra realización, los niveles de transcripción pueden medirse para evaluar los efectos de un compuesto de ensayo sobre la transducción de señales. Una célula hospedadora que contiene polipéptidos de T1R de interés se pone en contacto con un compuesto de ensayo durante un tiempo suficiente para que se realice cualquier

interacción, y después se mide el nivel de expresión génica. La cantidad de tiempo para que se produzcan dichas interacciones puede determinarse empíricamente, tal como estableciendo un desarrollo en el tiempo y midiendo el nivel de transcripción como una función del tiempo. La cantidad de transcripción puede medirse utilizando cualquier método conocido por los expertos en la técnica por ser adecuado. Por ejemplo, la expresión del ARNm de la proteína de interés puede detectarse utilizando transferencias Northern, o sus productos polipeptídicos pueden identificarse utilizando inmunoensayos. Como alternativa, pueden emplearse ensayos basados en la transcripción que utilizan genes indicadores según se describe en la patente de EEUU 5.436.128. Los genes indicadores pueden ser, por ejemplo, cloranfenicol acetiltransferasa, luciferasa, beta-galactosidasa, beta-lactamasa, y fosfatasa alcalina. Además, la proteína de interés puede utilizarse como un indicador indirecto mediante la unión a un segundo indicador, tal como la proteína fluorescente verde (véase, por ejemplo, Mistili y Spector, *Nature Biotechnology*, 15:961-964 (1997)).

La cantidad de transcripción entonces se compara con la cantidad de transcripción en la misma célula en ausencia del compuesto de ensayo, o puede compararse con la cantidad de transcripción en una célula sustancialmente idéntica que carece del polipéptido o polipéptidos de T1R de interés. Una célula sustancialmente idéntica puede derivarse de las mismas células a partir de las cuales se preparó la célula recombinante pero que no ha sido modificada por la introducción de ADN heterólogo. Cualquier diferencia en la cantidad de transcripción indica que el compuesto de ensayo tiene alterada de alguna manera la actividad de los polipéptidos de T1R de interés.

4. Animales no humanos transgénicos que expresan receptores quimiosensoriales

También pueden utilizarse animales no humanos que expresen una combinación de secuencias de receptores gustativos T1R para los ensayos de receptores. Esta expresión puede utilizarse para determinar si un compuesto de ensayo se une específicamente a un complejo de receptor transmembrana gustativo de mamífero *in vivo* poniendo en contacto un animal no humano transfectado de forma estable o transitoria con ácidos nucleicos que codifican receptores quimiosensoriales, o las regiones de unión al ligando de estos, con un compuesto de ensayo, y determinando si el animal reacciona con el compuesto de ensayo mediante la unión específica al complejo de polipéptidos del receptor.

Los animales transfectados o infectados con los vectores de la invención son particularmente útiles para ensayos para identificar y caracterizar estímulos de sabor que pueden unirse a un receptor específico o a conjuntos de receptores. Estos animales infectados con un vector que expresan secuencias de receptor gustativo humano pueden utilizarse para la selección *in vivo* de estímulos de sabor y su efecto sobre, por ejemplo, la fisiología celular (por ejemplo, sobre neuronas gustativas), sobre el SNC, o el comportamiento. Como alternativa, líneas celulares estables que expresen un T1R o una combinación de T1R pueden utilizarse como donantes de transferencia de ácidos nucleicos a animales transgénicos clonados producidos que expresen de forma estable un T1R o una combinación de T1R concretos. Los métodos para utilizar la transferencia de ácidos nucleicos para producir animales clonados que expresen un ADN heterólogo deseado son el tema de varias patentes de EEUU otorgadas a la Universidad de Massachusetts (registradas por Advanced Cell Technology, Inc.) y Roslin Institute (registradas por Geron Corp.).

Los medios para infectar/expresar los ácidos nucleicos y los vectores, de modo individual o en forma de bibliotecas, son muy conocidos en la técnica. Una diversidad de parámetros de células individuales, de órganos o de animales completos puede medirse mediante una diversidad de medios. Las secuencias de T1R de la invención pueden coexpresarse, por ejemplo, en tejidos gustativos de animales mediante el transporte con un agente infeccioso, por ejemplo, un vector de expresión de adenovirus.

Los genes de receptores gustativos endógenos pueden permanecer funcionales y su actividad de tipo silvestre (nativa) aún puede estar presente. En otras situaciones, cuando sea deseable que toda la actividad de receptores gustativos sea producida por el receptor híbrido exógeno introducido, se prefiere el uso de una línea inactivada. Los métodos para la constitución de animales transgénicos no humanos, en particular de ratones transgénicos, y la selección y la preparación de construcciones recombinantes para generar células transformadas, son muy conocidos en la técnica.

La constitución de una célula y animal "inactivado" ("*knockout*") se basa en la premisa de que el nivel de expresión de un gen concreto en una célula de mamífero puede disminuir o abrogarse completamente mediante la introducción en el genoma de una nueva secuencia de ADN que actúe para interrumpir alguna porción de la secuencia de ADN del gen que se quiere reprimir. Además, puede utilizarse una "inserción de trampa de genes" para alterar un gen del hospedador, y pueden emplearse células precursoras embrionarias (ES) de ratón para producir animales transgénicos inactivados (véase, por ejemplo, Holzschu, *Transgenic Res.*, 6:97-106 (1997)). La inserción de la secuencia exógena se realiza generalmente mediante recombinación homóloga entre secuencias de ácidos nucleicos complementarias. La secuencia exógena es alguna porción del gen diana que se va a modificar, tal como una secuencia exónica, intrónica o reguladora de la transcripción, o cualquier secuencia genómica que sea capaz de afectar al nivel de expresión del gen diana, o sus combinaciones. La localización de genes mediante recombinación homóloga en células precursoras embrionarias pluripotenciales permite modificar con precisión la secuencia genómica de interés. Cualquier técnica puede utilizarse para crear, seleccionar, propagar un animal inactivado, por ejemplo, véase 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 EEUU nº 5.616.491; 5.464.764; 4.631.153; 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.

5 Los ácidos nucleicos de la invención también pueden utilizarse como reactivos para producir células humanas "inactivadas" y su progenie. De modo similar, los ácidos nucleicos de la invención también pueden emplearse como reactivos para producir "inactivaciones" en ratones. Las secuencias del gen T1R humano o de rata pueden sustituir al T1R ortólogo en el genoma de ratón. De esta manera, se produce un ratón que expresa un T1R humano o de rata. Este ratón entonces puede utilizarse para analizar la función de T1R humanos o de rata, y para identificar ligandos para dichos T1R.

a. Moduladores

10 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, un ácido nucleico o un lípido. Ejemplos de los mismos incluyen 5'-IMP y 5'-GMP. Esencialmente, puede utilizarse cualquier compuesto químico como ligando o modulador potencial en los ensayos de la invención, aunque se ensayan con más frecuencia compuestos que son solubles en disoluciones acuosas. Pueden diseñarse ensayos para seleccionar grandes bibliotecas químicas automatizando las etapas de ensayo y proporcionando compuestos a partir de cualquier fuente conveniente; estos ensayos generalmente se realizan en paralelo (por ejemplo, en formatos de microtitulación o sobre placas de microtitulación en ensayos robóticos). Se apreciará que pueden sintetizarse bibliotecas químicas mediante una de muchas reacciones químicas (por ejemplo, química patentada por Senomyx). Además, 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.

25 En una realización preferida, los métodos de selección de alto rendimiento implican proporcionar una biblioteca peptídica o química combinatoria que contenga un gran número de compuestos que potencialmente afecten al gusto (compuestos moduladores o ligandos potenciales). Dichas "bibliotecas químicas combinatorias" o "bibliotecas de ligandos" entonces se seleccionan en uno o más ensayos, según se describe en la presente memoria, para identificar aquellos miembros de la biblioteca (en particular subclases o especies químicas) que muestren la actividad característica deseada. Los compuestos identificados de esta manera pueden servir como "compuestos de partida" convencionales, o pueden utilizarse ellos mismos como moduladores del gusto potenciales o reales.

30 Preferiblemente, estas bibliotecas se seleccionarán frente a células o líneas celulares que expresen de forma estable T1R2/T1R3 y preferiblemente una proteína G adecuada, por ejemplo, G_{α15}. Tal como se muestra en los ejemplos siguientes, estas líneas celulares estables muestran respuestas muy pronunciadas a estímulos de sabor, por ejemplo, estímulos de sabor umami o dulce. Sin embargo, también pueden utilizarse células y líneas celulares que expresen de forma transitoria T1R2/T1R3 en estos ensayos.

35 Una biblioteca química combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generados mediante síntesis química o síntesis biológica, combinando una serie de "componentes básicos" químicos, tales como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca química combinatoria lineal, tal como una biblioteca polipeptídica, se forma combinando un conjunto de componentes básicos químicos (aminoácidos) en cualquier forma posible para una longitud del compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipeptídico). Pueden sintetizarse de miles a millones de compuestos químicos mediante dicha mezcla combinatoria de componentes básicos químicos.

40 La preparación y la selección de bibliotecas químicas combinatorias es muy conocida por los expertos en la técnica. Dichas bibliotecas químicas combinatorias incluyen, pero sin limitación, bibliotecas peptídicas (véase, por ejemplo, la patente de EEUU nº 5.010.175; Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 37:487-493 (1991); y Houghton *et al.*, *Nature*, 354:84-88 (1991)). También pueden utilizarse otras químicas para generar bibliotecas de diversidad química. Estas químicas incluyen, pero no se limitan a: peptoides (por ejemplo, publicación PCT nº WO 91/19735), péptidos codificados (por ejemplo, publicación PCT WO 93/20242), biooligómeros aleatorios (por ejemplo, publicación PCT WO 92/00091), benzodiazepinas (por ejemplo, patente de EEUU nº 5.288.514), diversómeros, tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6909-6913 (1993)), polipéptidos vinílogos (Hagihara *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 114:6568 (1992)), peptidomiméticos no peptídicos con armazón de glucosa (Hirschmann *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 114:9217-9218 (1992)), síntesis orgánica análoga de bibliotecas de compuestos pequeños (Chen *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 116:2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho *et al.*, *Science*, 261:1303 (1993)), peptidilfosfonatos (Campbell *et al.*, *J. Org. Chem.*, 59:658 (1994)), bibliotecas de de ácidos nucleicos (Ausubel, Berger y Sambrook, todos ellos citados anteriormente), bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (patente de EEUU n 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (Vaughn *et al.*, *Nature Biotechnology*, 14(3):309-314 (1996); y documento PCT/US96/10287), bibliotecas de carbohidratos (Liang *et al.*, *Science*, 274:1520-1522 (1996)); y patente de EEUU 5.593.853), bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (benzodiazepinas, Baum, *C&EN*, 18 de enero, p. 33 (1993)); tiazolidinonas y metatiazanonas (patente de EEUU 5.549.974); pirrolidinas (patentes de EEUU 5.525.735 y 5.519.134); compuestos de morfolino (patente de EEUU 5.506.337); benzodiazepinas (documento 5.288.514) y similares.

Los dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias están disponibles en el mercado (véase, por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS (Advanced Chem Tech, Louisville, KY), Symphony (Rainin, Woburn, MA), 433A (Applied Biosystems, Foster City, CA), 9050 Plus (Millipore, Bedford, MA)). Además, numerosas bibliotecas combinatorias están en sí mismas disponibles en el mercado (véase, por ejemplo, ComGenex, Princeton, NJ; Tripos, Inc., St. Louis, MO; 3D Pharmaceuticals, Exton, PA; Martek Biosciences, Columbia, MD; etc.).

En un aspecto de la descripción, los moduladores de T1R puede utilizarse en cualquier producto alimentario, producto de pastelería, composición farmacéutica o ingrediente de estos para así modular el sabor del producto, composición o ingrediente de una manera deseada. Por ejemplo, pueden añadirse moduladores de T1R que potencian la sensación de sabor dulce para edulcorar un producto o composición; pueden añadirse moduladores de T1R que potencian la sensación de sabor umami a alimentos para aumentar el gusto sabroso. Como alternativa, pueden utilizarse antagonistas de T1R para bloquear el sabor dulce y/o umami.

b. Kits

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

Los ensayos de ácidos nucleicos para detectar la presencia de ADN y ARN de un miembro de la familia T1R en una muestra incluyen numerosas técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como análisis de la transferencia Southern, análisis de la transferencia Northern, transferencias por puntos, protección de ARNasa, análisis de 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 modo que se encuentre disponible para la hibridación dentro de la célula, mientras que se conserva la morfología celular para la posterior interpretación y análisis. Los siguientes artículos proporcionan una visión de conjunto de la técnica de la hibridación *in situ*: Singer *et al.*, *Biotechniques*, 4:230-250 (1986); Haase *et al.*, *Methods in Virology*, vol. VII, pp. 189-226 (1984); y *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (Names *et al.*, eds., 1987). Además, un polipéptido de T1R puede detectarse con las diversas técnicas de inmunoensayo descritas anteriormente. La muestra de ensayo generalmente se compara con un control positivo (por ejemplo, una muestra que expresa un polipéptido de T1R recombinante) y un control negativo.

La presente descripción también proporciona kits para seleccionar moduladores de miembros de la familia T1R. Estos kits pueden prepararse a partir de materiales y reactivos disponibles con facilidad. Por ejemplo, estos kits pueden comprender uno o más de los siguientes materiales: ácidos nucleicos o proteínas de T1R, tubos de reacción, e instrucciones para ensayar la actividad T1R. Opcionalmente, el kit contiene un receptor T1R biológicamente activo, o una línea celular que expresa de forma estable o transitoria un receptor gustativo que contiene T1R biológicamente activo. Una amplia variedad de kits y componentes pueden prepararse según la presente descripción dependiendo del usuario previsto del kit y de las necesidades concretas del usuario.

Ejemplos

Estos ejemplos sólo pretenden ser ilustrativos.

En las secuencias de proteínas presentadas en la presente memoria, el código de una letra X o Xaa se refiere a cualquiera de los veinte restos aminoácidos habituales. En las secuencias de ADN presentadas en la presente memoria, el código de una letra N o n se refiere a cualquiera de las cuatro bases nucleotídicas habituales, A, T, C o G.

Ejemplo 1: Producción de construcciones de expresión de hT1R sin intrones

Las construcciones de expresión de hT1R sin intrones se clonaron mediante una combinación de métodos basados en ADNc y basados en ADN genómico. Para generar la construcción de expresión de hT1R1 de longitud completa, se combinaron dos exones codificadores 5' identificados en un intervalo de hT1R1 clonado (nº de registro AL159177) mediante solapamiento de PCR, y después se unieron a un clon de ADNc de testículo 5'-truncado. La construcción de expresión hT1R2 se generó a partir de un intervalo genómico de hT1R2 parcialmente secuenciado. Se identificaron dos exones 5' de hT1R2 que faltaban mediante la selección de bibliotecas al azar del intervalo genómico clonado utilizando sondas derivadas de la correspondiente secuencia codificadora de rata. Los exones codificadores entonces se combinaron mediante solapamiento de PCR para producir la construcción de expresión de longitud completa. La construcción de expresión de hT1R3 se generó mediante solapamiento de PCR a partir de un intervalo genómico de hT1R3 secuenciado (nº de registro AL139287). Se aisló el T1R3 de rata a partir de una biblioteca de ADNc derivada de tejido gustativo de rata utilizando un fragmento de exón de rT1R3 generado mediante una PCR degenerada basada en hT1R3. El ADNc de hT1R1 parcial, el ADNc de rT1R2, y las secuencias genómicas de hT1R2 parciales se obtuvieron del doctor Charles Zuker (Universidad de California, San Diego).

Las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos para las secuencias clonadas de T1R identificadas anteriormente, así como otras secuencias de T1R de longitud completa y parciales se indican a continuación:

SEC ID N°:4

Secuencia de aminoácidos de rT1R3

MPGLAILGLSLAAFLLELGMGSSSLCLSQQFKAQGDYILGGLFPLGTTEEATLNQRTQPNGI
 LCTRFSPGLFLAMAMKMAVEEINNGSALLPGLRLGYDLFDTCEPVVMTMKPSLMFMAKV
 GSQSI AAYCNYTQYQPRVLAVIGPHSSELALITGKFFSFFLMPQVSYASMDRLSDRETF
 PSFFRTVPSDRVQLQAVVTLQNF SWNWVAALGSDDDYGREGLSIFSGLANSRGICIAHE
 GLVPQHDTSGQQLGKVVDVLRQVNQSKVQVVVLFASARAVYSLFSYSILHDLSPKVWVAS
 ESWLTSDLVMTLPNIARVGTVLGFLQRGALLPEF SHYVETRLALAADPTFCASLKAELDL
 EERVMGPRCSQCDYIMLQNLSSGLMQNLSAGQLHHQIFATYAAVYSVAQALHNTLQCNVS
 HCHTSEPVQPWQLLENMYNMSFRARDLTLQFDAKGSVDMEYDLKMWWQSPTPVLHTVGT
 FNGTLQLQHSKMYWPGNQVPVSQCSRQCKDGQVRRVKGFHSCCYDCVDCCKAGSYRKHPPD
 FTCTPCGKDQWSPEKSTTCLPRRPKFLAWGEPAVLSLLLLLCLVLGLTLAALGLFVHYWD
 SPLVQASGGSLFCFGLICLGLFCLSVLLFPGRPRSASCLAQQPMAHLPLTGCLSTLFLQA
 AEIFVESELPLSWANWLC SYLRGPWAWLVLLATLVEAALCAWYLMAFPPEVVTDWQVLP
 TEVLEHCRMRSWVSLGLVHITNAVLAFLCFLGTFLVQSQPGRYNRARGLTFAMLAYFIIW
 VSFVPLL ANVQVAYQPAVQMGAILFCALGILATFHLPKCYVLLWLPELNTQEFFLGRSPK
 EASDGN SGSSEATRHSSE

SEC ID N°:5

Secuencia de aminoácidos de hT1R1

MLLCTARLVGLQLLISCCWAFACHSTESSPDFTLPGDYLLAGLFPLHSGCLQVRHRPEVT
 LCDRSCSFNEHGYHLFQAMRLGVEEINNSTALLPNIITLGYQLYDVCSDSANVYATLRVLS
 LPGQHHEI ELQGDLLHYSPTVLAVIGPDSTNRAATTAALLSPFLVPMISYAASSETLSVKR
 QYPSFLRTIPNDKYQVETMVLLLQKFGWTWISLVGSSDDYQGLGVQALENQTGQGICIA
 FKDIMPFSAQVGDERMQCLMRHLAQAGATVVVVVFSSRQLARVFFESVVLTNLTGKVWVAS
 EAWALSRHITGVPGIQRIGMVLGVAIQKRAVPGLKAFEEAYARADKKAPRPCHKGSSWSS
 NQLCRECQAFMAHTMPKLKAFSSMAYNAYRAVYVAHGLHQLLGCASGACSRGRVYPWQ
 LLEQIHKVHFLHKTVAFNDRDPLSSYNI IAWDWNPKWTFVTLGSSTWSPVQLNINE
 TKIQWHGKDNQVPKSVCSDDCLEGHQRVVTGFHHCCFECVPCGAGTFLNKS DLYRCQPCG
 KEEWAPEGSQTCFPRTVVFLALREHTSWVLLAANTLLLLLLLLLGTAGLFAWHLDTPVVRS
 GGRLCFLMLGSLAAGSGSLYGFGEPTRPCALLRQALFALGFTIFLSCLTVRSFQLIIIF
 KFSTKVPTFYHAWVQNHGAGLFVMISSAAQLLI CLTWLVVWTPLPAREYQRFPHLVMLEC
 TETNSLGFILAFLYNGLLSISAFACSYLGKDLPENYNEAKCVTFSLLFNFVSWIAFFTAA

SVYDGTKYLPAANMMAGLSSLSGFGGYFLPKCYVILCRPDLNSTEHFQASIQDYTRRCGS
T

SEC ID Nº:6

Secuencia de aminoácidos de hT1R2

MGPRAKTICSLFFLLWVLAEPAENSDFYLPGDYLLGGLFSLHANMKGIVHLNFLQVPMCK
EYEVKVI GYNLMQAMRFAVEEINNDSSLLPGVLLGYEIVDVCYISNNVQPVLVFLAHEDN
LLPIQEDYSNYISRVVAVIGPDNSESVMTVANFLSLFLLPQITYSAISDEL RDKVRF PAL
LRTTPSADHHVEAMVQLMLHFRWNWIIVLVSSD TYGRDNGQLLGERVARRDICI AFQETL
PTLQPNQNM TSEERQLVTIVDKLQQSTARVVVVFSPDLTLYHFFNEVLRQNFTGAVWIA
SESWAIDPVLHNLTELGH LGTFLGITIQSVPIPGFSEFREWGPQAGPPPLSRTS QS YTCN
QECDNCLNATLSFN TILRLSGERVVYSVYSAVYVAHALHSLLGCDKSTCTKR VVYPWQL
LEEIWKNVFTLLDHQIFFDPQGDVALHLEIVQWQWDRSQNP FQSVASYYP LQRQLKNIQD
ISWHTVMNTI PMSMCSKRCQSGQKKKPVGIHVCCFECIDCLPGTFLNHTED EYECQACPN
NEWSYQSETSCFKRQLVFLEWHEPTIAVALLAALGFLSTLAILVIFWRHFQTPIVRSAG
GPMCFLMLTLLLVA YMVVPVYVGGPKVSTCLCRQALFPLCFTICISCI AVR SFQIVCAFK
MASRFPRAYSYWVRYQGPYVSM AFITVLKMVIVVIGMLATGLSPTTRTDPDDPKITIVSC
NPNYRNSLLFN TSLDLLSVVGFSFAYMGKELPTNYNEAKFITLSMTFYFTSSVSLCTFM
SAYSGVLVTIVDLLVTVLNLLAISLGYFGPKCYMILFYPERNTPAYFNSMIQGYTMRRD

SEC ID Nº:7

Secuencia de aminoácidos de hT1R3

MLGPAVLGLSLWALLHPGTGAPLCLSQQLRMKGDYVLGGLFPLGEAEEAGLRSRTRPSSP
VCTRFSSNGLLWALAMKMAVEEINNKS DLLPGLRLGYDLFDTCEP VVAMKPSLMFLAKA
GSRDIAAYCNYTQYQPRVLAVIGPHSSELAMVTGKFFSFFLMPQVSYGASME LLSARETF
PSFFRTVPSDRVQLTAAAE LLQEF GWNWVAALGSDDEYGRQGLSIF SALAAARGICIAHE
GLVPLPRADDSRLGKVQDVLHQVNQSSVQVLLFASVHAAHALFNYSISSRLSPKVWVAS
EAWLTSDLVMGLPGMAQMGTVLGFLQRGAQLHEFPQYVKTHLALATDPAFC SALGEREQG
LEEDVVGQRCPQCDCITLQNVSAGLNHHQTF SVYAAVYSVAQALHNTLQCNASGCPAQDP
VKPQQLLENMYNLT FHVGGPLRFDSSGNVDM EYDLKLWVWQGSVPRLHDVGRFNGLR T

ERLKIRWHTSDNQKPVSRCSRQCQEGQVRRVKGFHSCCYDCVDCEAGSYRQNPDDIACTF
CGQDEWSPERSTRCFRRRSRFLAWGEPAVLLLLLLLLSLALGLVLAALGLFVHHRDSPLVQ
ASGGPLACFGLVCLGLVCLSVLLFPGQPS PARCLAQQPLSHLPLTGCLSTLFLQAAEIFV
ESELPLSWADRLSGCLRGPWAWLVVLLAMLVEVALCTWYLVAFPPPEVVTDWHMLPTEALV
HCRTRSWVSFGLAHATNATLAFCLCFLGTFLVRSQPGRYNRARGLTFAMLAYFITWVSFVP
LLANVQVVLRPAVQMGALLLCVGLGILAAFHLPRCYLLMRQPGLNTPPEFFLGGGPGDAQGO
NDGNTGNQKHE

SEC ID Nº:8

Secuencia del ácido nucleico de hT1R1

ATGCTGCTCTGCACGGCTCGCCTGGTCGGCCTGCAGCTTCTCATTTCCTGCTGCTGGGCC
TTTGCCCTGCCATAGCACGGAGTCTTCTCCTGACTTCACCCTCCCCGGAGATTACCTCCTG
GCAGGCCTGTTCCCTCTCCATTCTGGCTGTCTGCAGGTGAGGCACAGACCCGAGGTGACC
CTGTGTGACAGGTCTTGTAGCTTCAATGAGCATGGCTACCACCTCTTCCAGGCTATGCGG
CTTGGGGTTGAGGAGATAAACTCCACGGCCCTGCTGCCAACATCACCTGGGGTAC
CAGCTGTATGATGTGTGTTCTGACTCTGCCAATGTGTATGCCACGCTGAGAGTGCTCTCC
CTGCCAGGGCAACACCACATAGAGCTCCAAGGAGACCTTCTCCACTATTCCCCTACGGTG
CTGGCAGTGATTGGGCCTGACAGACCAACCGTGCTGCCACCACAGCCGCCCTGCTGAGC
CCTTTCCTGGTGCCCATGATTAGCTATGCGGCCAGCAGCGAGACGCTCAGCGTGAAGCGG
CAGTATCCCTCTTTCCTGCGCACCATCCCCAATGACAAGTACCAGGTGGAGACCATGGTG
CTGCTGCTGCAGAAGTTCGGGTGGACCTGGATCTCTCTGGTTGGCAGCAGTGACGACTAT
GGGCAGCTAGGGGTGCAGGCACTGGAGAACAGGCCACTGGTCAGGGGATCTGCATTGCT
TTCAAGGACATCATGCCCTTCTCTGCCAGGTGGGCGATGAGAGGATGCAGTGCCTCATG
CGCCACCTGGCCCAGGCCGGGGCCACCGTTCGTGGTTGTTTTTCCAGCCGGCAGTTGGCC
AGGGTGTTTTTCGAGTCCGTGGTGCTGACCAACCTGACTGGCAAGGTGTGGGTGCGCTCA
GAAGCCTGGGCCCTCTCCAGGCACATCACTGGGGTGCCCGGGATCCAGCGCATTGGGATG
GTGCTGGGCGTGGCCATCCAGAAGAGGGCTGTCCCTGGCCTGAAGGCGTTTGAAGAAGCC
TATGCCCGGGCAGACAAGAAGGCCCTAGGCCTTGCCACAAGGGCTCCTGGTGCAGCAGC
AATCAGCTCTGCAGAGAATGCCAAGCTTTCATGGCACACACGATGCCCAAGCTCAAAGCC
TTCTCCATGAGTTCTGCCTACAACGCATAACGGGCTGTGTATGCGGTGGCCCATGGCCTC

CACCAGCTCCTGGGCTGTGCCTCTGGAGCTTGTTCAGGGGCCGAGTCTACCCCTGGCAG
CTTTTGGAGCAGATCCACAAGGTGCATTTCTTCTACACAAGGACACTGTGGCGTTTAAAT
GACAACAGAGATCCCCTCAGTAGCTATAACATAATTGCCTGGGACTGGAATGGACCCAAG
TGGACCTTCACGGTCCTCGGTTCTCCACATGGTCTCCAGTTCAGCTAAACATAAATGAG
ACCAAAATCCAGTGGCACGGAAAGGACAACCAGGTGCCTAAGTCTGTGTGTTCCAGCGAC
TGTCTTGAAGGGCACCAGCGAGTGGTTACGGGTTTCCATCACTGCTGCTTTGAGTGTGTG
CCCTGTGGGGCTGGGACCTTCTCAACAAGAGTGACCTCTACAGATGCCAGCCTTGTGGG
AAAGAAGAGTGGGCACCTGAGGGAAGCCAGACCTGCTTCCCGCGCACTGTGGTGTTTTTG
GCTTTGCGTGAGCACACCTCTTGGGTGCTGCTGGCAGCTAACACGCTGCTGCTGCTGCTG
CTGCTTGGGACTGCTGGCCTGTTTGCTGGCACCTAGACACCCCTGTGGTGAGGTCAGCA
GGGGGCCGCTGTGCTTTCTTATGCTGGGCTCCCTGGCAGCAGGTAGTGGCAGCCTCTAT
GGTTCTTTGGGGAACCCACAAGGCCTGCGTGCTTGCTACGCCAGGCCCTCTTTGCCCTT
GGTTTCACCATCTTCCTGTCCTGCCTGACAGTTCGCTCATTCCAATAATCATCATCTTC
AAGTTTTCCACCAAGGTACCTACATTCTACCACGCCTGGGTCCAAAACCACGGTGCTGGC
CTGTTTGTGATGATCAGCTCAGCGGCCCAGCTGCTTATCTGTCTAACTTGGCTGGTGGTG
TGGACCCCACTGCCTGCTAGGGAATACCAGCGCTTCCCCATCTGGTGATGCTTGAGTGC
ACAGAGACCAACTCCCTGGGCTTCATACTGGCCTTCTCTACAATGGCTCCTCTCCATC
AGTGCCTTTGCCTGCAGCTACCTGGGTAAGGACTTGCCAGAGAACTACAACGAGGCCAAA
TGTGTCACCTTCAGCCTGCTCTTCAACTTCGTGTCCTGGATCGCCTTCTTCACCACGGCC
AGCGTCTACGACGGCAAGTACCTGCCTGCGGCCAACATGATGGCTGGGCTGAGCAGCCTG
AGCAGCGGCTTCGGTGGGTATTTTCTGCCTAAGTGCTACGTGATCCTCTGCCGCCAGAC
CTCAACAGCACAGAGCACTTCCAGGCCTCCATTCCAGGACTACACGAGGCGCTGCGGCTCC
ACCTGA

SEC ID Nº:9

Secuencia del ácido nucleico de hT1R3

ATGCTGGGCCCTGCTGTCTGCTGGGCCTCAGCCTCTGGGCTCTCCTGCACCCTGGGACGGGG
GCCCCATTGTGCCTGTCACAGCAACTTAGGATGAAGGGGGACTACGTGCTGGGGGGGCTG
TTCCCCCTGGGCGAGGCCGAGGAGGCTGGCCTCCGCAGCCGGACACGGCCCAGCAGCCCT
GTGTGCACCAGGTTCTCCTCAAACGGCCTGCTCTGGGCACTGGCCATGAAAATGGCCGTG

GAGGAGATCAACAACAAGTCGGATCTGCTGCCCGGGCTGCGCCTGGGCTACGACCTCTTT
GATACGTGCTCGGAGCCTGTGGTGGCCATGAAGCCCAGCCTCATGTTCTGGCCAAGGCA
GGCAGCCGCGACATCGCCGCTACTGCAACTACACGCAGTACCAGCCCCGTGTGCTGGCT
GTCATCGGGCCCCACTCGTCAGAGCTCGCCATGGTCACCGGCAAGTTCTTCAGCTTCTTC
CTCATGCCCCAagtcagCTACGGTGCTAGCATGGAGCTGCTGAGCGCCCGGGAGACCTTC
CCCTCCTTCTTCGACCCGTGCCAGCGACCGTGTGCAGCTGACGGCCGCCGCGGAGCTG
CTGCAGGAGTTGGCTGGAAC TGGGTGGCCGCCCTGGGCAGCGACGACGAGTACGGCCGG
CAGGGCCTGAGCATCTTCTCGGCCCTGGCCGCGGCACGCGGCATCTGCATCGCGCACGAG
GGCCTGGTGCCGCTGCCCCGTGCCGATGACTCGCGGCTGGGGAAGGTGCAGGACGTCCTG
CACCAGGTGAACCAGAGCAGCGTGCAGGTGGTGTGCTGTTTCGCCTCCGTGCACGCCGCC
CACGCCCTCTTCAACTACAGCATCAGCAGCAGGCTCTCGCCCAAGGTGTGGGTGGCCAGC
GAGGCCTGGCTGACCTCTGACCTGGTCATGGGGCTGCCCGGCATGGCCAGATGGGCACG
GTGCTTGGCTTCTCCAGAGGGGTGCCAGCTGCACGAGTTCCCCAGTACGTGAAGACG
CACCTGGCCCTGGCCACCGACCCGGCCTTCTGCTCTGCCCTGGGCGAGAGGGAGCAGGGT
CTGGAGGAGGACGTGGTGGGCCAGCGCTGCCCGCAGTGTGACTGCATCACGCTGCAGAAC
GTGAGCGCAGGGCTAAATCACCACCAGACGTTCTCTGTCTACGCAGCTGTGTATAGCGTG
GCCAGGCCCTGCACAACACTCTTCAGTGCAACGCCTCAGGCTGCCCGCGCAGGACCCC
GTGAAGCCCTGGCAGCTCCTGGAGAACATGTACAACCTGACCTTCACGTGGGCGGGCTG
CCGCTGCGGTTTCGACAGCAGCGGAAACGTGGACATGGAGTACGACCTGAAGCTGTGGGTG
TGGCAGGGCTCAGTGCCAGGCTCCACGACGTGGGCAGGTTCAACGGCAGCCTCAGGACA
GAGCGCCTGAAGATCCGCTGGCACACGTCTGACAACCAGAAGCCCGTGTCCCGGTGCTCG
CGGCAGTGCCAGGAGGGCCAGGTGCGCCGGGTCAAGGGGTTCCACTCCTGCTGCTACGAC
TGTGTGGACTGCGAGGCGGGCAGCTACCGGCAAAACCCAGACGACATCGCCTGCACCTTT
TGTGGCCAGGATGAGTGGTCCCCGGAGCGAAGCACACGCTGCTTCCGCCGACAGGCTCGG
TTCTTGGCATGGGGCGAGCCGGCTGTGCTGCTGCTGCTCCTGCTGCTGAGCCTGGCGCTG
GGCCTTGTGCTGGCTGCTTTGGGGCTGTTTCGTTACCATCGGGACAGCCCACTGGTTTCAG
GCCTCGGGGGGGCCCCTGGCCTGCTTTGGCCTGGTGTGCCTGGGCCTGGTCTGCCTCAGC
GTCCTCCTGTTCCCTGGCCAGCCAGCCCTGCCCGATGCCTGGCCAGCAGCCCTTGTCC
CACCTCCCGCTCACGGGCTGCCTGAGCACACTCTTCTGCAGGCGGCCGAGATCTTCGTG
GAGTCAGAACTGCCTCTGAGCTGGGCAGACCGGCTGAGTGGCTGCCTGCGGGGGCCCTGG

GCCTGGCTGGTGGTGGCTGCTGGCCATGCTGGTGGAGGTCGCACTGTGCACCTGGTACCTG
GTGGCCTTCCCGCCGGAGGTGGTGACGGACTGGCACATGCTGCCACGGAGGCGCTGGTG
CACTGCCGCACACGCTCCTGGGTGAGCTTCGGCCTAGCGCACGCCACCAATGCCACGCTG
GCCTTTCTCTGCTTCCCTGGGCACTTTCCTGGTGCAGGAGCCAGCCGGGCTGCTACAACCGT
GCCCCTGGCCTCACCTTTGCCATGCTGGCCTACTTCATCACCTGGGTCTCCTTTGTGCC
CTCCTGGCCAATGTGCAGGTGGTCTCAGGCCCGCCGTGCAGATGGGCGCCCTCCTGCTC
TGTGTCTGGGCATCCTGGCTGCCTTCCACCTGCCAGGTGTTACCTGCTCATGCGGCAG
CCAGGGCTCAACACCCCGAGTTCTTCTGGGAGGGGCCCTGGGGATGCCAAGGCCAG
AATGACGGGAACACAGGAAATCAGGGGAAACATGAGTGA

SEC ID Nº:10

Secuencia del ácido nucleico de hT1R2

ATGGGGCCAGGGCAAAGACCATCTGCTCCCTGTTCTTCCCTCCTATGGGTCTGGCTGAG
CCGGCTGAGAACTCGGACTTCTACCTGCCTGGGGATTACCTCCTGGGTGGCCTCTTCTCC
CTCCATGCCAACATGAAGGGCATTGTTACCTTAACTTCTGCAGGTGCCATGTGCAAG
GAGTATGAAGTGAAGGTGATAGGCTACAACCTCATGCAGGCCATGCGCTTCGCGGTGGAG
GAGATCAACAATGACAGCAGCCTGCTGCCTGGTGTGCTGCTGGGCTATGAGATCGTGGAT
GTGTGCTACATCTCCAACAATGTCCAGCCGGTGTCTACTTCTGGCACACGAGGACAAC
CTCCTTCCCATCCAAGAGGACTACAGTAACTACATTTCCCGTGTGGTGGCTGTCATTGGC
CCTGACAACCTCCGAGTCTGTCTGACTGTGGCCAACTTCTCTCCCTATTTCTCCTTCCA
CAGATCACCTACAGCGCCATCAGCGATGAGCTGCGAGACAAGGTGCGCTTCCCGGCTTTG
CTGCGTACCACACCAGCGCCGACCACCAGTCGAGGCCATGGTGCAGCTGATGCTGCAC
TTCCGCTGGAAGTGGATCATTGTGCTGGTGGAGCAGCGACACCTATGGCCGCGACAATGGC
AGCTGCTTGGCGAGCGCGTGGCCCGCGCGACATCTGCATCGCCTTCCAGGAGACGCTGC
CCACACTGCAGCCCAACCAGAACATGACGTCAGAGGAGCGCCAGCGCCTGGTGACCATTG
TGGACAAGCTGCAGCAGAGCACAGCGCGCTCGTGGTCTGTTCTCGCCCGACCTGACCC
TGTACCACTTCTTCAATGAGGTGCTGCGCCAGAACTTCAAGGGCGCCGTGTGGATCGCCT
CCGAGTCTGGGCCATCGACCCGGTCTGCACAACCTCACGGAGCTGGGCCACTTGGGCA
CCTTCTGGGCATCACCATCCAGAGCGTGCCATCCCGGGCTTCAGTGAGTTCCGCGAGT
GGGGCCACAGGCTGGGCCGCCACCCCTCAGCAGGACCAGCCAGAGCTATACTGCAACC

AGGAGTGCGACAACCTGCCTGAACGCCACCTTGTCTTCAACACCATTCTCAGGCTCTCTG
GGGAGCGTGTTCGTCTACAGCGTGTACTCTGCGGTCTATGCTGTGGCCCATGCCCTGCACA
GCCTCCTCGGCTGTGACAAAAGCACCTGCACCAAGAGGGTGGTCTACCCCTGGCAGCTGC
TTGAGGAGATCTGGAAGGTCAACTTCACTCTCCTGGACCACCAAATCTTCTTCGACCCGC
AAGGGGACGTGGCTCTGCACTTGGAGATTGTCCAGTGGCAATGGGACCGGAGCCAGAATC
CCTTCCAGAGCGTCGCCTCCTACTACCCCTGCAGCGACAGCTGAAGAACATCCAAGACA
TCTCCTGGCACACCGTCAACAACACGATCCCTATGTCCATGTGTTCCAAGAGGTGCCAGT
CAGGGCAAAGAAGAAGCCTGTGGGCATCCACGTCTGCTGCTTCGAGTGCATCGACTGCC
TTCCCGGCACCTTCTCAACCACACTGAAGATGAATATGAATGCCAGGCCTGCCCGAATA
ACGAGTGGTCCTACCAGAGTGAGACCTCCTGCTTCAAGCGGCAGCTGGTCTTCTGGAAT
GGCATGAGGCACCCACCATCGCTGTGGCCCTGCTGGCCGCCCTGGGCTTCTCAGCACCC
TGGCCATCCTGGTGATATTCTGGAGGCACTTCCAGACACCCATAGTTCGCTCGGCTGGGG
GCCCCATGTGCTTCTGATGCTGACACTGCTGCTGGTGGCATAACATGGTGGTCCCGGTGT
ACGTGGGGCCGCCAAGGTCTCCACCTGCCTCTGCCGCCAGGCCCTCTTCCCTCTGCT
TCACAATTTGCATCTCCTGTATCGCCGTGCGTTCTTTCCAGATCGTCTGCGCCTTCAAGA
TGGCCAGCCGCTTCCCACGCGCCTACAGCTACTGGGTCCGCTACCAGGGGCCCTACGTCT
CTATGGCATTATACCGTACTCAAAATGGTCATTGTGGTAATTGGCATGCTGGCCACGG
GCCTCAGTCCCACCACCCGTACTGACCCCGATGACCCCAAGATCACAATTGTCTCCTGTA
ACCCCAACTACCGCAACAGCCTGCTGTTCAACACCAGCCTGGACCTGCTGCTCTCAGTGG
TGGGTTTTCAGCTTCGCCTACATGGGCAAAGAGCTGCCACCAACTACAACGAGGCCAAGT
TCATCACCCCTCAGCATGACCTTCTATTTACCTCATCCGTCTCCCTCTGCACCTTCATGT
CTGCCTACAGCGGGGTGCTGGTCACCATCGTGGACCTCTTGGTCACTGTGCTCAACCTCC
TGGCCATCAGCCTGGGCTACTTCGGCCCCAAGTGCTACATGATCCTCTTCTACCCGGAGC
GCAACACGCCCGCCTACTTCAACAGCATGATCCAGGGCTACACCATGAGGAGGGACTAG

SEC ID N°:11

Secuencia del ácido nucleico de rT1R3

ATGCCGGGTTTGGCTATCTTGGGCCTCAGTCTGGCTGCTTTCTCCTGGAGCTTGGGATGGGG
TCCTCTTTGTGTCTGTACAGCAATTCAAGGCACAAGGGGACTATATATTTGGGTGGACTA
TTTCCCTGGGCACAACCTGAGGAGGCCACTCTCAACCAGAGAACACAGCCCAACGGCATC

CTATGTACCAGGTTCTCGCCCCTTGGTTTGTTCCTGGCCATGGCTATGAAGATGGCTGTA
GAGGAGATCAACAATGGATCTGCCTTGCTCCCTGGGCTGCGACTGGGCTATGACCTGTTT
GACACATGCTCAGAGCCAGTGGTCACCATGAAGCCCAGCCTCATGTTTCATGGCCAAGGTG
GGAAGTCAAAGCATTGCTGCCTACTGCAACTACACACAGTACCAACCCCGTGTGCTGGCT
GTCATTGGTCCCCACTCATCAGAGCTTGCCCTCATTACAGGCAAGTTCCTCAGCTTCTTC
CTCATGCCACAGGTCAGCTATAGTGCCAGCATGGATCGGCTAAGTGACCGGGAAACATTT
CCATCCTTCTTCCGCACAGTGCCCAGTGACCGGGTGCAGCTGCAGGCCGTTGTGACACTG
TTGCAGAATTTAGCTGGAAGTGGGTGGCTGCCTTAGGTAGTGATGATGACTATGGCCGG
GAAGGTCTGAGCATCTTTTCTGGTCTGGCCAACTCACGAGGTATCTGCATTGCACACGAG
GGCCTGGTGGCACAACATGACACTAGTGGCCAACAATTGGGCAAGGTGGTGGATGTGCTA
CGCCAAGTGAACCAAAGCAAAGTACAGGTGGTGGTGTGCTGTTTGCATCTGCCCGTGTGTC
TACTCCCTTTTTAGCTACAGCATCCTTCATGACCTCTCACCCAAGGTATGGGTGGCCAGT
GAGTCCTGGCTGACCTCTGACCTGGTCATGACACTTCCCAATATTGCCCGTGTGGGCACT
GTTCTTGGGTTTCTGCAGCGCGGTGCCCTACTGCCTGAATTTCCCATATATGTGGAGACT
CGCCTTGCCCTAGCTGCTGACCCAACATTCTGTGCCTCCCTGAAAGCTGAGTTGGATCTG
GAGGAGCGCGTGATGGGGCCACGCTGTTCAACAATGTGACTACATCATGCTACAGAACCCTG
TCATCTGGGCTGATGCAGAACCCTATCAGCTGGGCAGTTGCACCACCAAATATTTGCAACC
TATGCAGCTGTGTACAGTGTGGCTCAGGCCCTTCAACAACACCCTGCAGTGCAATGTCTCA
CATTGCCACACATCAGAGCCTGTTCAACCCTGGCAGCTCCTGGAGAACATGTACAATATG
AGTTTCCGTGCTCGAGACTTGACACTGCAGTTTGATGCCAAAGGGAGTGTAGACATGGAA
TATGACCTGAAGATGTGGGTGTGGCAGAGCCCTACACCTGTACTACATACTGTAGGCACC
TTCAACGGCACCCCTTCACTGCAGCACTCGAAAATGTATTGGCCAGGCAACCAGGTGCCA
GTCTCCAGTGCTCCCGGCAGTGCAAAGATGGCCAGGTGCGCAGAGTAAAGGGCTTTCAT
TCCTGCTGCTATGACTGTGTGGACTGCAAGGCAGGGAGCTACCGGAAGCATCCAGATGAC
TTCACCTGTACTCCATGTGGCAAGGATCAGTGGTCCCCAGAAAAAGCACAACCTGCTTA
CCTCGCAGGCCCAAGTTTCTGGCTTGGGGGGAGCCAGCTGTGCTGTCACTTCTCCTGCTG
CTTTGCCTGGTGTGGCCCTGACACTGGCTGCCCTGGGGCTCTTTGTCCACTACTGGGAC
AGCCCTCTTGTTCAGGCCTCAGGTGGGTCACTGTTCTGCTTTGGCCTGATCTGCCTAGGC
CTCTTCTGCCTCAGTGTCTTCTGTTCCAGGACGACCAGCTCTGCCAGCTGCCCTTGCC
CAACAACCAATGGCTCACCTCCCTCTCACAGGCTGCCTGAGCACACTCTTCTGCAAGCA

GCCGAGATCTTTGTGGAGTCTGAGCTGCCACTGAGTTGGGCAAACCTGGCTCTGCAGCTAC
 CTTCCGGGGCCCCTGGGCTTGGCTGGTGGTACTGCTGGCCACTCTTGTGGAGGCTGCACTA
 TGTGCCTGGTACTTGTATGGCTTTCCTCCAGAGGTGGTGACAGATTGGCAGGTGCTGCCC
 ACGGAGGTACTGGAACACTGCCGCATGCGTTCCTGGGTGAGCCTGGGCTTGGTGCACATC
 ACCAATGCAGTGTAGCTTTCCTCTGCTTTCCTGGGCACTTTCCTGGTACAGAGCCAGCCT
 GGTCGCTATAACCGTGCCCGTGGCCTCACCTTCGCCATGCTAGCTTATTTATCATCTGG
 GTCTCTTTTGTGCCCTCCTGGCTAATGTGCAGGTGGCCTACCAGCCAGCTGTGCAGATG
 GGTGCTATCTTATTCTGTGCCCTGGGCATCCTGGCCACCTTCACCTGCCCAAATGCTAT
 GTACTTCTGTGGCTGCCAGAGCTCAACACCCAGGAGTTCTTCCTGGGAAGGAGCCCCAAG
 GAAGCATCAGATGGGAATAGTGGTAGTAGTGAGGCAACTCGGGGACACAGTGAATGA

Además, se proporcionan las siguientes traducciones conceptuales, que corresponden al C-terminal de dos pares ortólogos de los T1R de pez, se derivados de fragmentos de secuencias genómicas no publicadas. El Fugu T1RA derivó del registro "armazón 164"; Fugu T1RB derivó del registro LCP61711; Tetradon T1RA derivó del registro AL226735; Tetradon T1RB derivó del registro AL222381. Las ambigüedades en las traducciones conceptuales ("X") resultan de ambigüedades en las secuencias de la base de datos.

5

SEC ID Nº:12

T1RA Fugu

PSPFRDIVSYPDKI ILGCFMNLKTSSVSFVLLLLLCLLCFIFSYMGKDLPKNYNEAKAIT
 FLLLLLILTWIIFTTASLLYQGYIHSNLALAVLSSIYSFLLWYFLPKCYIIIFQPQKNT
 QKYFQGLIQDYTKTISQ

SEC ID Nº:13

10 **T1RA Tetradon**

FAVNYNTPVRSAGGPMCFILGCLSLCSISVFFYFERPTEAFCLIRFMPFLLFYAVCLA
 CFAVRSFQIVIFKIAAKFPRVHSWWMKYHGQWLVISMTFVLQAVVIVIGFSSNPPLPYX
 XFVSYPDKI ILGCDVNLNMASTSFLLLLLCLLCTFSYMGKDLPKNYNEAKAITFCLLL
 LILTWIIFATAFMLYHGKYIHTLNALAVLSSAYCFLLWYFLPKCYIIIFQPHKNTQKYFQ
 LS

SEC ID Nº:14

T1RB Fugu

KKQGPEVDIFIVSVTILCISVLGVAVGPPEPSQDLDFYMDSIVLECSNTLSPGSFIELCY
 VCVLSVLCFFFSYMGKDLPANINEAKCVTFSLMVYMISWISFFTVYLI SRGPFTVAAYVC
 ATLVSVLAFFGGYFLPKIYIIVLKPQMNTTAHFQNCIQMYTMSKQ

SEC ID N°:15

T1RB Tetradon

APKSSQRXLRRTRLXLEWDHPMSVALLFFLVCLLMTSSSAVILLNINTPVAKSAGGXT
 CXLKLAALTAAMSSXCHFQPSPLASKLKPQFTFSFTVCLACNRCALATGHLHFXRIV
 ALPPAYNXWAKNHGPXATIFIASAAILCVLCLRVAVGPPQPSQBLBFXNTNSIXLXXSNTL
 SPGSFVELCNVSLLSAVCFVFSXMGKBLPANYNEAKCVTFSLMVNXISWISFFTVY

5 Además, el número de registro y las citas bibliográficas con relación a los T1R de ratón y de rata y sus variantes alélicas en el dominio público se indican a continuación:

10 rT1R1 (n° de registro AAD18069) (Hoon *et al.*, *Cell*, 96(4):541-551 (1999)); rT1R2 (n° de registro AAD18070) (Hoon *et al.*, *Cell*, 96(4):541-559 (1999)); mT1R1 (n° de registro AAK39437); mT1R2 (n° de registro AAK39438); mT1R3 (n° de registro AAK55537) (Max *et al.*, *Nat. Genet.*, 28(1):58-63 (2001)); rT1R1 (n° de registro AAK7092) (Li *et al.*, *Mamm. Genome*, 12(1):13-16 (2001)); mT1R1 (n° de registro NP114073); mT1R1 (n° de registro AAK07091) (Li *et al.*, *Mamm. Genome*, 12(1):13-16 (2001)); rT1R2 (n° de registro AAD18070) (Hoon *et al.*, *Cell*, 96(4):541-551 (1999)); mT1R2 (n° de registro NP114079); mT1R3 (n° de registro AAK39436); mT1R3 (n° de registro BAB47181) (Kitagawa *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 283(1):236-242 (2001)); mT1R3 (n° de registro NP114078); mT1R3 (n° de registro AAK55536) (Max *et al.*, *Nat. Genet.*, 28(1):58-63 (2001)); y mT1R3 (n° de registro AAK01937).

Ejemplo 2: Alineamiento de secuencias de T1R humano y de rata

15 Se alinearon secuencias de T1R clonadas seleccionadas de las identificadas anteriormente frente a los correspondientes T1R de rata. Tal como se muestra en la figura 1, T1R1 humano, T1R2 humano y T1R3 humano y T1R3 de rata se alinearon con los T1R previamente descritos (rT1R1 que tiene el n° de registro AAD18069, y rT1R2 que tiene el n° de registro AAD18070), el receptor de glutamato metabotrópico mGluR1 de rata (n° de registro P23385), y el receptor detector de calcio humano (n° de registro P41180). Para que la comparación sea más fácil, los C-terminales de los receptores mGluR1 y de calcio se truncaron. Los siete segmentos transmembrana potenciales se encuadran en azul. Los restos que se ponen en contacto con el carbutilato de la cadena lateral del glutamato en la estructura cristalina de mGluR1 se encuadran en rojo, y los restos que se ponen en contacto con el resto α -aminoácido del glutamato se encuadran en verde. Los restos de cisteína del receptor mGluR1 y del receptor detector de calcio implicados en la formación de enlaces disulfuro entre subunidades se rodean con un círculo morado. Estas cisteínas no se conservan en T1R1 y T1R2, sino que están localizadas en una región degradada del alineamiento que contiene un resto de cisteína de T1R3 potencialmente análogo, también rodeado con un círculo.

20

25

Ejemplo 3: Demostración mediante RT-PCR de que hT1R2 y hT1R3 se expresan en tejido gustativo

Tal como se muestra en la figura 2, hT1R2 y hT1R3 se expresan en tejido gustativo: la expresión de ambos genes puede detectarse mediante RT-PCR de papilas circunvaladas humanas resecadas.

30 Ejemplo 4: Métodos para la expresión heteróloga de los T1R en células heterólogas

Un derivado de HEK-293 (Chandrashekar *et al.*, *Cell*, 100(6):703-711 (2000)), que expresa de forma estable $G\alpha_{15}$, se cultivó y se mantuvo a 37 °C en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco BRL) complementado con FBS al 10%, MEM de aminoácidos no esenciales (Gibco BRL) y blasticidina 3 μ g/ml. Para los experimentos de formación de imágenes de calcio, las células primero se sembraron sobre placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos (aproximadamente 0,1 millón de células por pocillo), y se transfectaron mediante lipofección con Mirus Transit-293 (PanVera). Para minimizar la desensibilización inducida por glutamato e inducida por glucosa, el DMEM complementado se sustituyó por DMEM con bajo contenido en glucosa/GlutaMAX (Gibco BRL) aproximadamente 24 horas después de la transfección. Veinticuatro horas después, las células se cargaron con el tinte de calcio Fluo-4 (Molecular Probes), 3 μ M en tampón PBS de Dulbecco (DPBS, Gibco BRL), durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Después de la sustitución con 250 μ l de DPBS se realizó la estimulación a temperatura ambiente mediante la adición de 200 μ l de DPBS complementado con estímulos de sabor. La movilización del calcio se controló con un microscopio Axiovert S100 TV (Zeiss) utilizando el programa informático Imaging Workbench 4.0 (Axon). Las respuestas de T1R1/T1R3 y T1R2/T1R3 fueron sorprendentemente transitorias (el aumento en el calcio raramente persistió más de 15 segundos) y asíncronas. Por tanto, el número de células que responden es relativamente constante a lo largo del tiempo; por tanto, las respuestas celulares se cuantificaron mediante un recuento manual del número de células que responden en un momento fijado, generalmente 30 segundos después de la adición del estímulo.

35

40

45

Ejemplo 5: Funciones de T1R2/T1R3 humano como receptor gustativo del dulce

Células HEK que expresan de forma estable $G_{\alpha 15}$ se transfectaron de forma transitoria con T1R2, T1R3 y T1R2/T1R3 humanos, y se ensayaron para detectar el aumento en el calcio intracelular en respuesta a concentraciones crecientes de sacarosa (figura 3(a)). Además, se determinaron las respuestas a las dosis de T1R2/T1R3 para varios estímulos de sabor dulce (figura 3(b)). El porcentaje máximo de células que responden es diferente para diferentes edulcorantes, y varía del 10-30%. Para aumentar la claridad, las respuestas a las dosis se normalizaron al porcentaje máximo de células que responden. Los valores en la figura 3 representan la media \pm e.e. de cuatro respuestas independientes. Los círculos en el eje de abscisas marcan los umbrales de detección psicofísicos determinados mediante el ensayo del sabor. La gurmarina (dilución en 50 veces de un extracto acuoso de *Gymnema sylvestre* 10 g/l filtrado) inhibe 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 3(b)). La figura 3(c) contiene la respuesta normalizada de las líneas celulares que coexpresan T1R2/T1R3 a diferentes edulcorantes (sacarosa, aspartamo, D-triptófano y sacarina).

Ejemplo 6: T1R2/T1R3 de rata también actúa como receptor gustativo del dulce

Células HEK que expresan de forma estable $G_{\alpha 15}$ se transfectaron de forma transitoria con hT1R2/hT1R3, rT1R2/rT1R3, hT1R2/rT1R3, y rT1R2/hT1R3. Estas células transfectadas entonces se ensayaron para determinar el aumento en el calcio intracelular en respuesta a sacarosa 350 mM, triptófano 25 mM, aspartamo 15 mM, y 0,05% de monelina. Los resultados con sacarosa y aspartamo aparecen en la figura 4, e indican que rT1R2/rT1R3 también actúa como receptor gustativo del dulce. Además, estos resultados sugieren que T1R2 puede controlar la especificidad de ligando de T1R2/T1R3.

Ejemplo 7: Respuestas de T1R2/T1R3 utilizando un ensayo basado en la fluorescencia automático

Células HEK que expresan de forma estable $G_{\alpha 15}$ se transfectaron de forma transitoria con hT1R2 y hT1R3. Estas células se cargaron con el tinte de calcio Fluo-4, y sus respuestas a un edulcorante se midieron utilizando un lector de placas de fluorescencia. La figura 5 contiene las respuestas de ciclamato (12,5 mM) para células que expresan hT1R2/hT1R3 y para células que expresan sólo hT1R3 (J19-22). Los resultados de fluorescencia obtenidos indican que las respuestas a estos estímulos de sabor sólo se producen en las células que expresan hT1R2/hT1R3. La figura 6 contiene las curvas de respuesta a la dosis normalizadas, cuyos resultados demuestran que hT1R2 y hT1R3 actúan juntos como un receptor gustativo humano basándose en su interacción específica de la dosis con diversos estímulos dulces. En particular, la figura 6 contiene las respuestas a las dosis para la sacarosa, triptófano y diversos otros edulcorantes disponibles en el mercado. Estos resultados indican que T1R2/T1R3 es un receptor gustativo del dulce humano, puesto que el orden de rango y los valores umbral obtenidos en el ensayo se parecen mucho a los valores para el gusto dulce humano.

Ejemplo 8: Los restos de unión al ligando de mGluR1 se conservan en T1R1

Tal como se muestra en la figura 6, los restos clave de unión al ligando de mGluR1 se conservan en T1R1. Se muestra la interacción del glutamato con mGluR1 destacándose varios restos clave según el mismo esquema de color que en la figura 1.

Ejemplo 9: T1R1/T1R3 humano actúa como receptor gustativo del umami

Células HEK que expresan de forma estable $G_{\alpha 15}$ se transfectaron de forma transitoria con T1R1, T1R3 y T1R1/T1R3 humanos, y se ensayaron para detectar el aumento en el calcio intracelular en respuesta a concentraciones crecientes de glutamato (figura 8(a)), y a glutamato 0,5 mM, a IMP 0,2 mM, y a glutamato 0,5 mM más IMP 0,2 mM (figura 8(b)). Se determinaron las respuestas a las dosis de T1R1/T1R3 humano para el glutamato en presencia y en ausencia de IMP 0,2 mM (figura 8(c)). Los porcentajes máximos de células que responden fueron de aproximadamente 5% para el glutamato y de aproximadamente 10% para el glutamato más IMP. Para aumentar la claridad, las respuestas a las dosis se normalizaron al porcentaje máximo de células que responden. Los valores representan la media \pm e.e. de cuatro respuestas independientes. Los círculos en el eje de abscisas marcan los umbrales de detección determinados mediante el ensayo del sabor.

Ejemplo 10: EL PDZIP como una secuencia de exportación

La secuencia de seis restos PDZIP (SVSTW (SEC ID N°:1)) se condensó con el C-terminal de hT1R2, y el receptor quimérico (es decir, hT1R2-PDZIP) se transfectó en una célula hospedadora HEK-293. Entonces se controló la expresión en la superficie de hT1R2 utilizando los datos de inmunofluorescencia y de barrido FACS. Tal como se muestra en las figuras 9A y 9B, la inclusión de la secuencia PDZIP aumenta la expresión en la superficie de hT1R2-PDZIP con relación a hT1R2. De forma más específica, la figura 9A muestra una tinción de inmunofluorescencia de hT1R2 marcado con myc que demuestra que el PDZIP aumenta significativamente la cantidad de la proteína de hT1R2 sobre la membrana plasmática. La figura 6B ofrece los datos del análisis FACS que muestran el mismo resultado: las células que expresan hT1R2 marcado con myc se indican con la línea discontinua, y las células que expresan hT1R2-PDZIP marcado con myc se indican con la línea continua. En particular, la figura 10A muestra

células hospedadoras estables $G_{\alpha 15}$ no transfectadas en tampón HBS, la figura 10B muestra células hospedadoras estables $G_{\alpha 15}$ transfectadas con hT1R2-PDZIP en la agrupación de edulcorantes nº 5 (sacarina, ciclamato de sodio, acesulfamo K, y aspartamo, 20 mM cada uno en tampón HBS), la figura 10C muestra células hospedadoras estables $G_{\alpha 15}$ transfectadas con T1R3-PDZIP en la agrupación de edulcorantes nº 5, y la figura 10D muestra células hospedadoras estables $G_{\alpha 15}$ cotransfectadas con hT1R2-PDZIP/hT1R3-PDZIP en la agrupación de edulcorantes nº 5. Además, las figuras 10E-10H muestran la respuesta dependiente de la dosis de células hospedadoras estables $G_{\alpha 15}$ cotransfectadas con hT1R2/hT1R3 frente a sacarosa (E: 0 mM en tampón HBS; F: 30 mM; G: 60 mM; y H: 250 mM). Las figuras 10I-10L muestran las respuestas de células hospedadoras estables $G_{\alpha 15}$ cotransfectadas con hT1R2/hT1R3 frente a edulcorantes individuales (I: aspartamo (1,5 mM); J: acesulfamo K (1 mM); K: neotamo (20 mM); L: ciclamato de sodio (20 mM)). Según se demuestra mediante las imágenes de calcio de la figura 10, se requieren a ambos hT1R2 y hT1R3 para las actividades activadas por el estímulo dulce.

Ejemplo 11: Generación de líneas celulares que coexpresan de forma estable T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3

Se generaron líneas celulares humanas que coexpresan de forma estable T1R2/T1R3 humano o T1R1/T1R3 humano mediante la transfección de vectores derivados de PEAK10 linealizados (Edge Biosystems) y vectores derivados de pCDNA 3.1/ZEO (Invitrogen), que contienen respectivamente una construcción de expresión de hT1R1 o hT1R2 (plásmido SAV2485 para T1R1, SAV2486 para T1R2) y hT1R3 (plásmido SXV550 para T1R3) en una línea celular que expresa $G_{\alpha 15}$. De forma específica, se produjeron líneas celulares estables T1R2/T1R3 cotransfectando SAV2486 y SXV550 linealizados en una línea celular HEK-293 de Aurora Bioscience que expresa de forma estable $G_{\alpha 15}$. Se produjeron líneas celulares estables T1R1/T1R3 cotransfectando SAV2485 y SXV550 linealizados en la misma línea celular HEK-293 que expresa de forma estable $G_{\alpha 15}$. Tras las transfecciones con SAV2485/SXV550 y SAV2486/SXV550, se seleccionaron las colonias resistentes a puromicina y resistentes a zeocina, se expandieron y se ensayaron mediante la formación de imágenes de calcio para las respuestas a estímulos de sabor 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 con bajo contenido 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 de sabor dulce se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia. Para la formación de imágenes fluorimétricas automáticas con un instrumento VIPR-II (Aurora Biosciences), las células estables T1R2/T1R3 primero se sembraron sobre placas de 96 pocillos (aproximadamente 100.000 células por pocillo). Veinticuatro horas después las células se cargaron con el tinte de calcio Fluo-3-AM (Molecular Probes), 0,005 mM en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la sustitución con 70 μ l de PBS se realizó la estimulación a temperatura ambiente mediante la adición de 70 μ l de PBS complementado con estímulos de sabor. Las respuestas de fluorescencia (480 nm de excitación y 535 nm de emisión) de 20 a 30 segundos tras la adición del compuesto se promediaron, se corrigieron para la fluorescencia de fondo medida antes de la adición del compuesto, y se normalizaron a la respuesta a ionomicina 0,001 mM (CALBIOCHEM), un iónoforo del calcio.

Después se observó que cuando estas líneas celulares se exponen a estímulos dulces o umami, en los clones activos generalmente 80-100% de células responden a los estímulos de sabor. De forma inesperada, la magnitud de las respuestas celulares individuales fue notablemente mayor que la de las células transfectadas de forma transitoria.

Basándose en esta observación, los inventores ensayaron la actividad de líneas celulares estables T1R mediante la formación de imágenes de fluorescencia automática utilizando el instrumento VIPR de Aurora Biosciences según se describió anteriormente. Las respuestas de dos líneas celulares T1R1/T1R3 y de una línea celular T1R2/T1R3 se muestran en la figura 11 y la figura 12, respectivamente.

De forma notable, la combinación de un número creciente de células que responden y magnitudes de respuesta crecientes produjo un aumento en más de 10 veces de la actividad con relación a las células transfectadas de modo transitorio (como comparación, el porcentaje de respuesta a la ionomicina de células transfectadas de modo transitorio con T1R2/T1R3 es de aproximadamente 5% bajo condiciones óptimas). Además, las respuestas a las dosis obtenidas para T1R2/T1R3 y T1R1/T1R3 humanos expresados de forma estable se correlacionan con los umbrales de detección del gusto humanos. La robusta actividad T1R de estas líneas celulares estables sugiere que son muy adecuadas para su uso en la selección de alto rendimiento de bibliotecas químicas para identificar compuestos, por ejemplo, moléculas pequeñas, que modulen al receptor gustativo del dulce o del umami y que, por tanto, modulen, potencien, bloqueen o imiten el sabor dulce o umami.

Ejemplo 12: Generación de líneas celulares que coexpresan T1R1/T1R3 de forma inducible y que responden selectivamente a estímulos de sabor umami

Líneas celulares HEK-293 T1R1/T1R3 que expresan de forma estable el receptor gustativo del umami muestra una robusta actividad mejorada con relación a células transfectadas de modo transitorio. Sin embargo, una desventaja es que pueden perder actividad con rapidez durante la propagación celular.

Además, estos descubrimientos apoyan la hipótesis de los inventores de que (i) T1R1/T1R3 es el receptor gustativo del umami, y (ii) las líneas celulares que expresan de forma robusta T1R1/T1R3, preferiblemente las líneas celulares

T1R1/T1R3 estables y/o inducibles, pueden utilizarse en ensayos, preferiblemente para la selección de alto rendimiento de bibliotecas químicas para identificar nuevos moduladores del sabor umami. Pueden utilizarse moduladores que potencien el sabor umami.

5 Para solucionar la inestabilidad de las líneas celulares estables T1R1/T1R3, las células HEK-G_{α15} se han modificado para que expresen de modo inducible T1R1/T1R3 empleando el sistema GeneSwitch (Invitrogen). Los vectores de expresión resistentes a zeocina derivados de pGene para T1R1 y T1R3 (plásmido SXV603 para T1R1 y SXV611 para T1R3) y un vector derivado de pSwitch resistente a puomicina que porta la proteína GeneSwitch (plásmido SXV628) se linealizaron y se cotransfectaron en la línea celular HEK-G_{α15}. Las colonias resistentes a zeocina y puomicina se seleccionaron, se expandieron, se indujeron con cantidades variables de mifepristona, y se ensayaron mediante la formación de imágenes de calcio para las respuestas a estímulos de sabor umami.

10 La expresión inducible de T1R1/T1R3 resulta en una actividad robusta. Por ejemplo, aproximadamente 80% de las células inducidas, pero sólo aproximadamente 10% de las células transfectadas de modo transitorio, responden al L-glutamato. Más en concreto, los vectores de expresión resistentes a zeocina derivados de pGene que expresan T1R1 humano y T1R3 humano, y un vector derivado de pSwitch resistente a puomicina que porta la proteína GeneSwitch se linealizaron y se cotransfectaron en células HEK-G_{α15}. Las células se seleccionaron en puomicina 0,5 µg/ml (CALBIOCHEM) y zeocina 100 µg/ml (Invitrogen) a 37 °C en medio de Eagle modificado por Dulbecco complementado con GlutaMAX (FBS dializado al 10%, y basticidina 3 µg/ml). Las colonias resistentes se expandieron, y se determinaron sus respuestas a estímulos de sabor umami tras la inducción con mifepristona 10⁻¹⁰ M mediante microscopía de fluorescencia siguiendo los métodos de Li *et al.*, PNAS, 99(7):4692-4696 (2002).

20 Para la formación de imágenes fluorométricas automáticas en un instrumento FLIPR (Molecular Device), las células de un clon (denominado clon I-17) se sembraron en placas de 96 pocillos (aproximadamente 80.000 células por pocillo) en presencia de mifepristona 10⁻¹⁰ M y se incubaron durante 48 horas. Las células entonces se cargaron con el tinte de calcio Fluo-4-AM (Molecular Probes), 3 µM en PBS durante 1,5 horas a temperatura ambiente.

25 Después de la sustitución con 50 µl de PBS se realizó la estimulación a temperatura ambiente mediante la adición de 50 µl de PBS complementado con diferentes estímulos. En contraste con los anteriores sistemas de expresión transitoria del receptor de umami T1R1/T1R3, que precisan la cuantificación de la actividad del receptor T1R1/T1R3 mediante el recuento individual de las células que responden (Li *et al.*, PNAS, 99(7):4692-4696 (2002)) (debido a la baja actividad del receptor en ellas), este sistema de expresión inducible produce un clon I-17 que tiene una actividad sustancialmente mayor que permite cuantificar la actividad del receptor mediante la determinación del aumento máximo en la fluorescencia (480 nm de excitación y 535 nm de emisión) sumado a partir de todos los campos de imágenes de células. La máxima fluorescencia de cuatro determinaciones independientes se promedió, se corrigió para la fluorescencia de fondo medida antes de la adición del compuesto y se normalizó a la respuesta frente a ionomicina 0,002 mM (CALBIOCHEM).

30 Estos resultados están contenidos en la figura 13. En particular, la figura 13 contiene una curva de dosis-respuesta determinada para el L-glutamato en presencia y en ausencia de IMP 0,2 mM. En la figura, cada valor representa la media de la fluorescencia máxima sumada (corregida para la fluorescencia de fondo) para cuatro determinaciones independientes. Estas curvas de respuesta a la dosis corresponden a las determinadas para células transfectadas de modo transitorio con T1R1/T1R3.

35 La selectividad del receptor del gusto umami T1R1/T1R3 también se evaluó mediante una selección con diferentes L-aminoácidos. Los resultados obtenidos indican que T1R1/T1R3 es activado selectivamente por los L-aminoácidos de sabor umami (L-glutamato y L-aspartato).

40 Los resultados de experimentos en los que se obtuvieron las respuestas del clon I-17 cuando se ensaya en presencia de diferentes L-aminoácidos aparecen en la figura 14 y la figura 15. La figura 14 muestra los resultados de un experimento en el que la línea celular I-17 se puso en contacto con diferentes L-aminoácidos a una concentración de 10 mM en presencia y en ausencia de IMP 1 mM.

45 La figura 15 contiene una curva de dosis-respuesta para aminoácidos activos determinada en presencia de IMP 0,2 mM. Cada valor representa la media de cuatro determinaciones independientes.

50 Los resultados obtenidos en estos experimentos apoyan la especificidad y la selectividad del receptor gustativo del umami por estímulos de sabor umami. Mientras que los estímulos de sabor L-glutamato y L-aspartato activan significativamente el receptor T1R1/T1R3 a diferentes concentraciones (véanse las figuras 14 y 15), los otros L-aminoácidos que activan el receptor T1R1/T1R3 humano sólo activan el receptor débilmente y a concentraciones mucho mayores.

55 Por tanto, estos resultados apoyan la selectividad del receptor T1R1/T1R3 por los estímulos de sabor umami y la idoneidad de este sistema de expresión estable inducible para su uso en ensayos de alto rendimiento utilizando instrumentos de formación de imágenes fluorométricas automáticos para identificar compuestos que activen el receptor del gusto umami, por ejemplo L-glutamato y L-aspartato, o que potencien la actividad del L-glutamato para activar el receptor gustativo del umami, por ejemplo 5'-IMP o 5'-GMP, o que bloqueen la activación del receptor

gustativo del umami por estímulos de sabor umami, tales como L-glutamato y L-aspartato.

Los compuestos identificados utilizando estos ensayos tienen una aplicación potencial como aromatizantes en composiciones alimentarias y de bebidas para imitar o bloquear los estímulos de sabor umami.

5 **Ejemplo 13: El lactisol inhibe las actividades del receptor T1R2/T1R3 y T1R1/T1R3 humanos, y el sabor dulce y umami**

10 Se creía que el lactisol, un ácido aralquilcarboxílico, era un inhibidor selectivo del sabor dulce (véase, por ejemplo, Lindley (1986), patente de EEUU 4.567.053; y Schiffman *et al.*, *Chem. Senses*, 24:439-447 (1999)). Se midieron las respuestas de células HEK-G_{α15} transfectadas de modo transitorio con T1R2/T1R3 a sacarosa 150 mM en presencia de concentraciones variables de lactisol. El lactisol inhibe la actividad de T1R2/T1R3 humano con una CI₅₀ de 24 μM.

15 El receptor gustativo del umami T1R1/T1R3 y del dulce T1R2/T1R3 pueden compartir una subunidad común. Por tanto, se ha llegado a la teoría de que el lactisol, que inhibe el receptor gustativo del dulce T1R2/T1R3, puede tener un efecto similar sobre el receptor gustativo del umami T1R1/T1R3. Los inventores de la presente invención ensayaron el efecto del lactisol sobre la respuesta del T1R1/T1R3 humano al L-glutamato 10 mM. Al igual que con el receptor gustativo del dulce T1R2/T1R3, el lactisol también inhibe al T1R1/T1R3 con una CI₅₀ de 165 μM. Es probable que la inhibición por el lactisol refleje un antagonismo en los receptores T1R en lugar, por ejemplo, de una inhibición no específica de la señalización mediada por G_{α15}, porque la respuesta de receptores de acetilcolina muscarínicos no fue inhibida por el lactisol.

20 Después, los inventores de la presente invención evaluaron el efecto del lactisol sobre el gusto umami humano. Se determinaron los umbrales de sabor en presencia de lactisol 1 y 2 mM para el estímulo de sabor umami L-glutamato con o sin IMP 0,2 mM, los estímulos de sabor dulce sacarosa y D-triptófano, y el estímulo de sabor salado cloruro de sodio, siguiendo los métodos de Schiffman *et al.* (*Chem. Senses*, 24:439-447 (1989)). Concentraciones milimolares de lactisol aumentaron drásticamente los umbrales de detección para los estímulos de sabor dulce y umami, pero no para los estímulos de sabor salado. Estos resultados aparecen en la figura 16.

25 Para concluir, (i) estos descubrimientos también apoyan la hipótesis de los inventores de que T1R1/T1R3 es el único receptor gustativo del umami, y (ii) que los receptores T1R1/T1R3 y T1R2/T1R3 pueden compartir un dominio de unión al lactisol relacionado desde el punto de vista estructural.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un receptor gustativo que comprende al menos un polipéptido de T1R2 y al menos un polipéptido de T1R3, en el que dicho receptor gustativo se une específicamente a y/o se activa por un estímulo de sabor dulce, en el que dicho polipéptido de T1R2 se selecciona del grupo que consiste en:
- 5 (a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a la SEC ID N°: 6, un fragmento de este que tiene una longitud de al menos 40 aminoácidos, o un fragmento de una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la SEC ID N°: 6 y que tiene una longitud de al menos 20 aminoácidos;
- (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que, en condiciones de hibridación rigurosas, se hibrida con el complemento inverso de la SEC ID N°: 10; y
- 10 (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que, en condiciones de hibridación rigurosas, se hibrida con el complemento inverso de un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEC ID N°: 6;
- y en el que dicho polipéptido de T1R3 se selecciona del grupo que consiste en:
- (d) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a la SEC ID N°: 7, un fragmento de este que tiene una longitud de al menos 40 aminoácidos, o un fragmento de una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la SEC ID N°: 7 y que tiene una longitud de al menos 20 aminoácidos;
- 15 (e) un polipéptido codificado por un polinucleótido que, en condiciones de hibridación rigurosas, se hibrida con el complemento inverso de la SEC ID N°: 9; y
- (f) un polipéptido codificado por un polinucleótido que, en condiciones de hibridación rigurosas, se hibrida con el complemento inverso de un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEC ID N°: 7.
- 20 2.- El receptor de la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido de T1R2 y dicho polipéptido de T1R3 derivan de la misma especie o de especies diferentes.
- 3.- El receptor de la reivindicación 1, en el que el polipéptido de T1R2 y/o el polipéptido de T1R3 derivan de un mamífero, un pez, un reptil, un anfibio o un ave, y se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en hT1R2, hT1R3, rT1R2, rT1R3, mT1R2, mT1R3.
- 25 4.- El receptor de la reivindicación 1, en el que al menos uno de los polipéptidos de T1R está acoplado a aminoácidos que representan todo o parte de otro receptor acoplado a proteína G.
- 5.- El receptor de la reivindicación 4, en el que todo o parte de otro receptor acoplado a proteína G comprende un dominio extracelular, transmembrana o intracelular.
- 6.- Una composición que contiene un receptor según la reivindicación 4 o la reivindicación 5.
- 30 7.- Un vector de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica el receptor gustativo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que está unido operativamente a al menos una secuencia reguladora.
- 8.- Una célula hospedadora que comprende un vector de expresión según la reivindicación 7, que expresa un receptor según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 35 9.- La célula hospedadora de la reivindicación 8, que se selecciona del grupo que consiste en una célula HEK-293, una célula COS, una célula CHO, y oocitos de *Xenopus*.
- 10.- La célula hospedadora de la reivindicación 8, que expresa, de forma estable o transitoria, dicho receptor, y que además expresa opcionalmente una proteína G, preferiblemente una proteína G promiscua.
- 40 11.- Un método para identificar compuestos que modulan la percepción del gusto mediante la identificación de compuestos que se unen a, activan, inhiben y/o modulan un receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 12.- El método de la reivindicación 11, en el que el receptor se expresa *in vitro* en una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10.
- 13.- El método de la reivindicación 12, en el que dicho compuesto se identifica por su efecto sobre la internalización de receptores, la fosforilación de receptores, o la translocación de la arrestina.
- 45 14.- El método de la reivindicación 11, en el que dicho compuesto se identifica por su efecto sobre la activación de la proteína G por dicho receptor, la conformación del receptor, los cambios en la concentración intracelular de un segundo mensajero, el potencial de membrana celular, ensayos de transcripción con genes indicadores, o la concentración de calcio intracelular.

15.- El método de la reivindicación 12, en el que dicho compuesto agoniza o antagoniza al receptor T1R2/T1R3.

16.- El método de la reivindicación 15, en el que la célula expresa de modo inducible el receptor, y en el que el método se utiliza para seleccionar un compuesto que compite con IMP, GMP o sus análogos por la unión con el receptor gustativo del dulce T1R2/T1R3.

5 17.- El método de la reivindicación 15, que es un ensayo de selección de alto rendimiento que emplea instrumentación automática de formación de imágenes fluorométricas.

18.- El método de la reivindicación 11, en el que dicho compuesto se identifica por su efecto sobre un animal no humano que expresa los receptores T1R transgénicos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

Figura 1: Catálogo de los T1R de ser humano y de rata

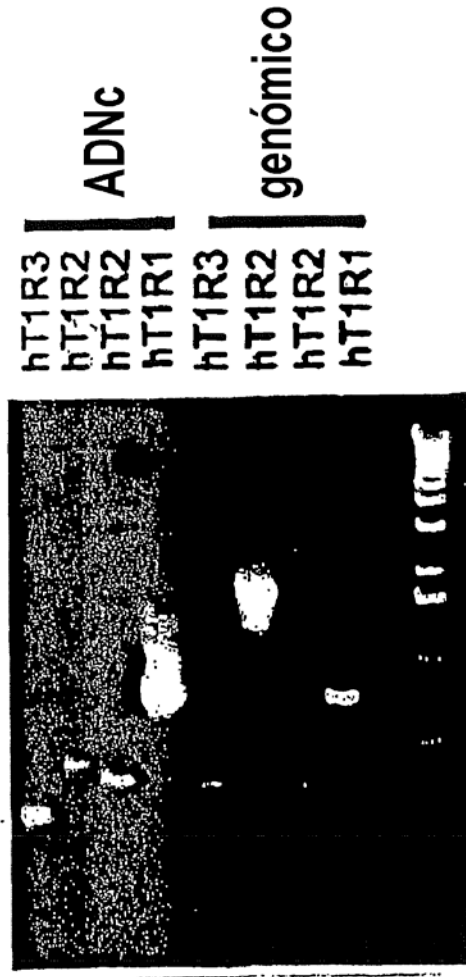


Figura 2: El hT1R2 y el hT1R3 se expresan en el epitelio de lengua humana. Los productos de la amplificación específicos de ADNc pueden amplificarse a partir de ADNc preparado de papilas circunvaladas humanas resecadas.

Figura 3: El T1R2/T1R3 humano actúa como un receptor gustativo del dulce

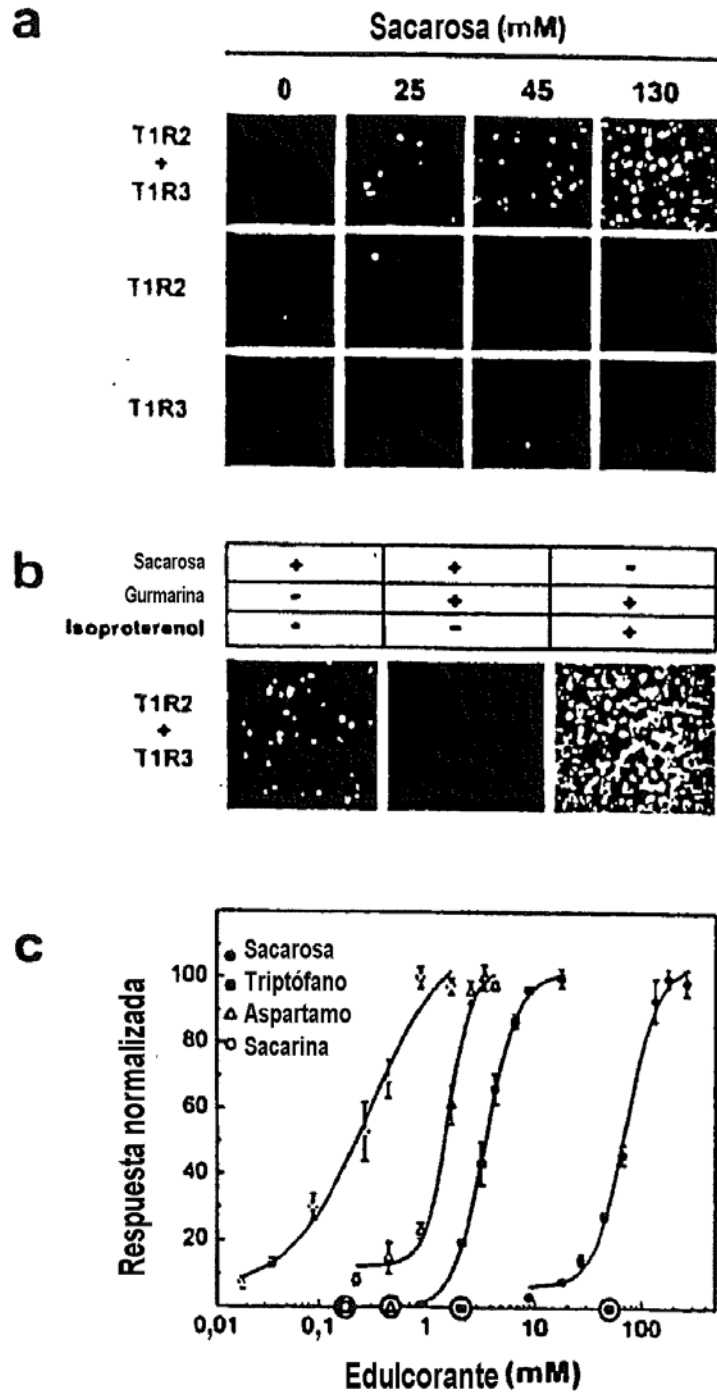
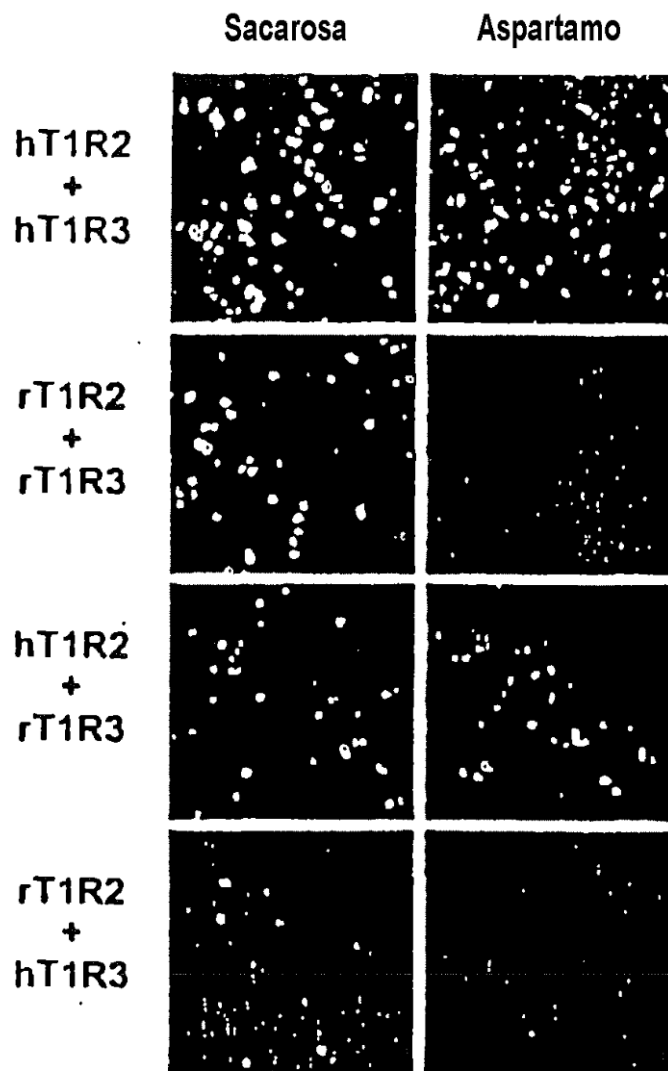


Figura 4: El T1R2 puede controlar la especificidad del ligando de T1R2/T1R3



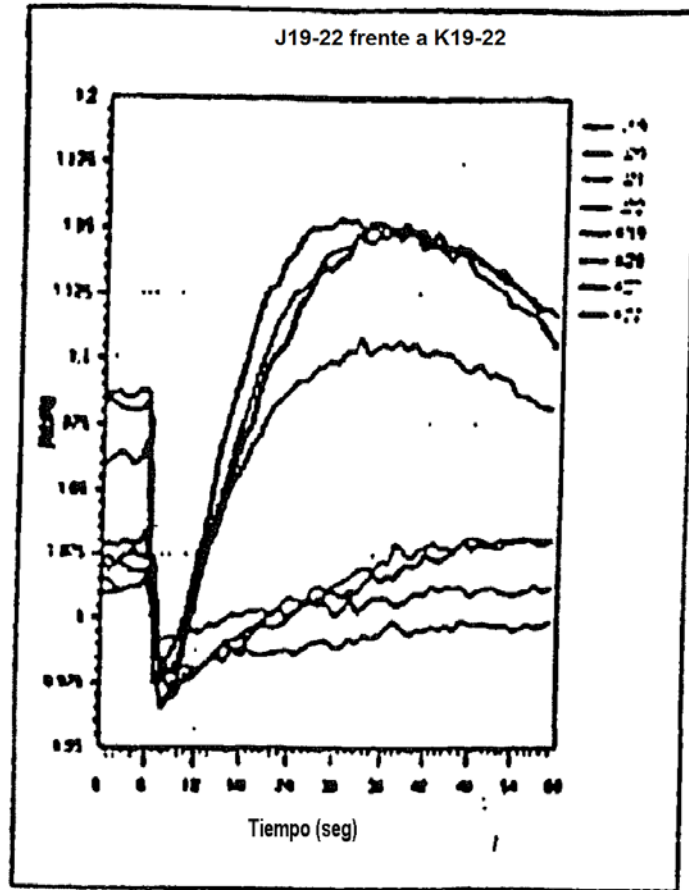


Figura 5

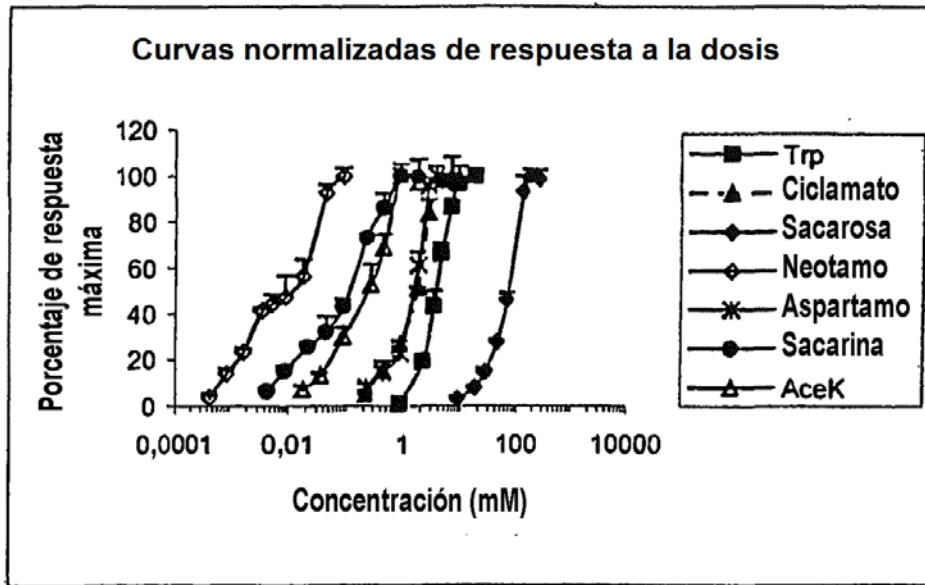
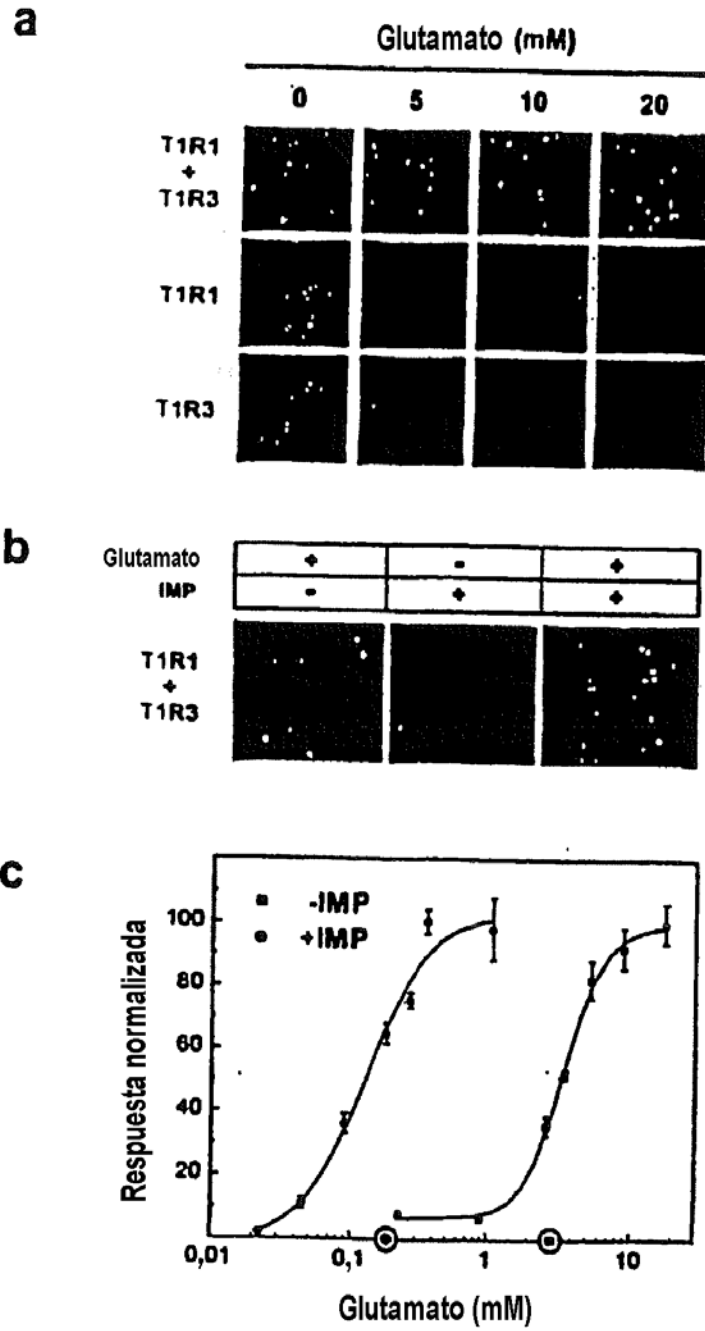


Figura 6

Figura 7: Los restos clave de unión al ligando de mGluR1 se conservan en el T1R1



Figura 8: El T1R1/T1R3 humano actúa como un receptor gustativo del umami



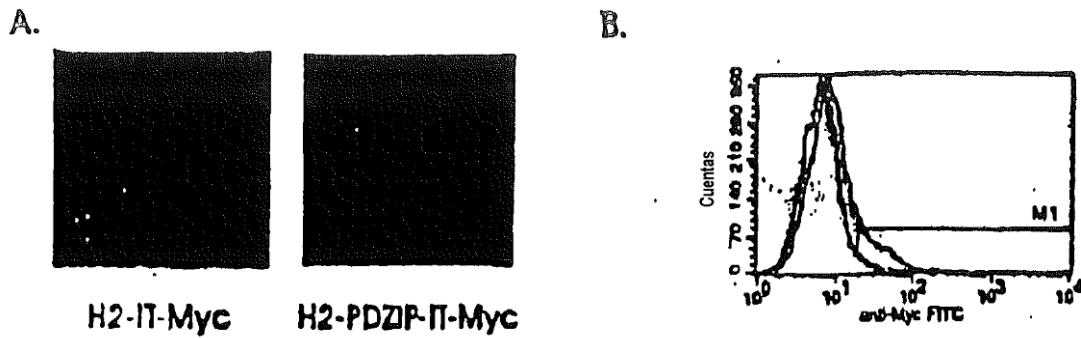


Figura 9: El PDZIP facilita la expresión del T1R2 humano en la superficie.

A. La tinción de inmunofluorescencia del hT1R2 marcado con Myc indica que el PDZIP aumenta significativamente la cantidad de proteína de T1R2 humana sobre la membrana plasmática.

B. Los datos del análisis FACS demuestran el mismo resultado. T1R2 humano marcado con Myc: línea verde;

C. T1R2 humano marcado con Myc con PDZIP: línea negra.

Figura 10: Los datos de formación de imágenes de calcio demuestran las respuestas de hT1R2/hT1R3 a una serie de estímulos dulces

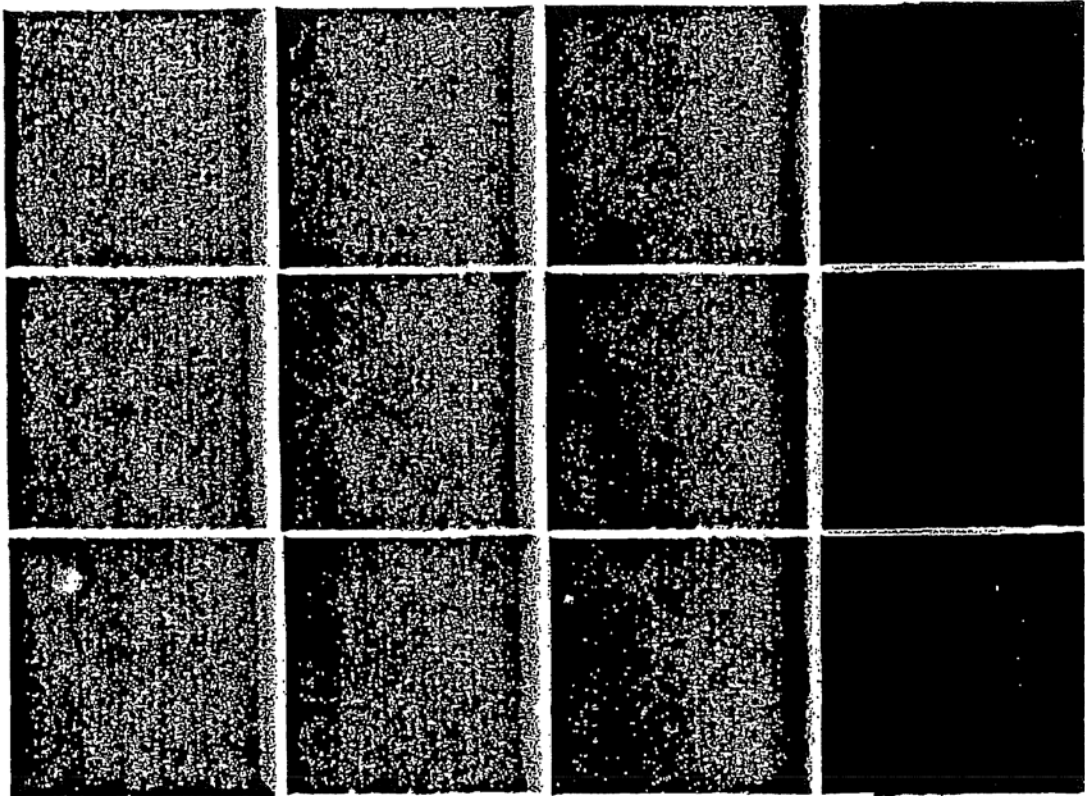


Figura 11

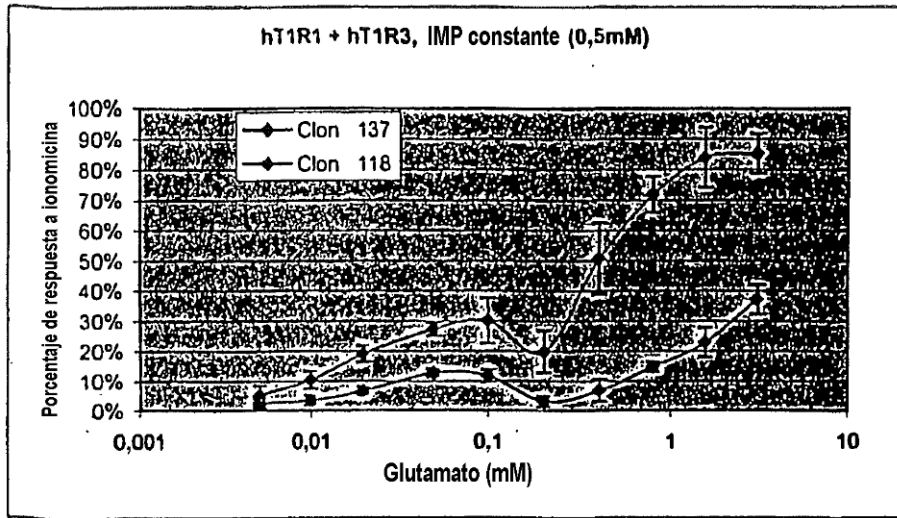
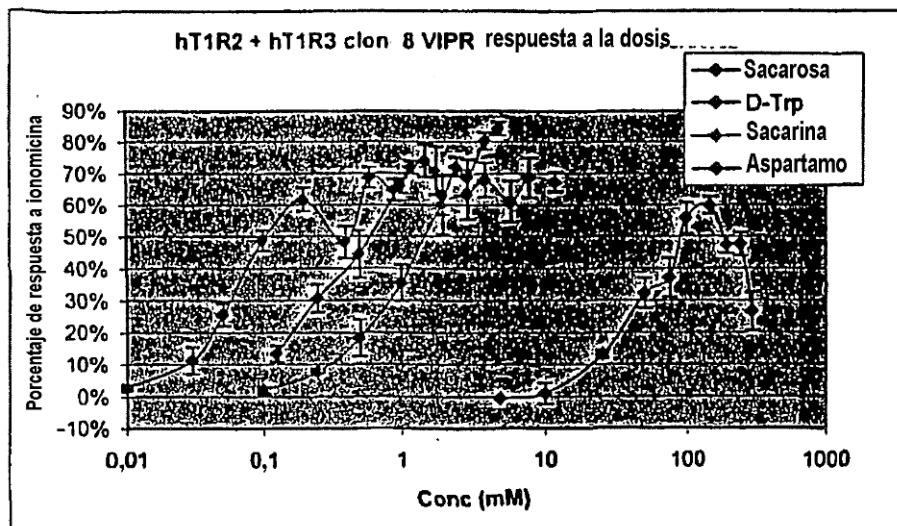
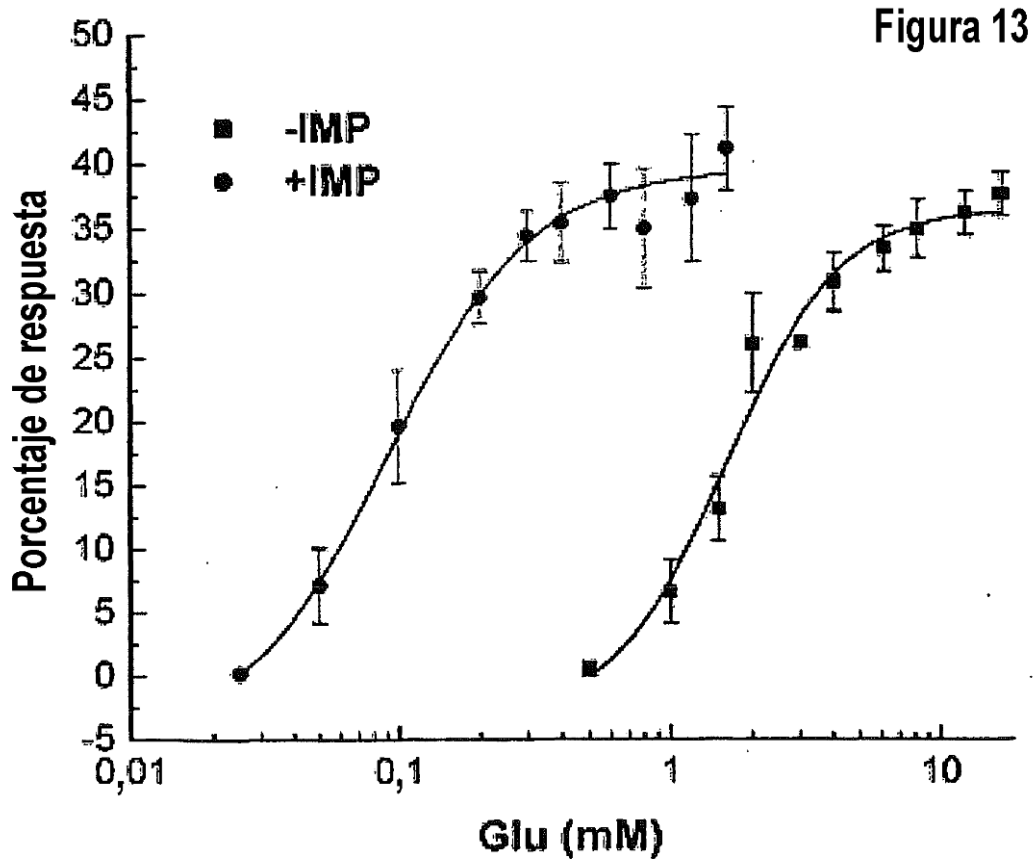


Figura 12





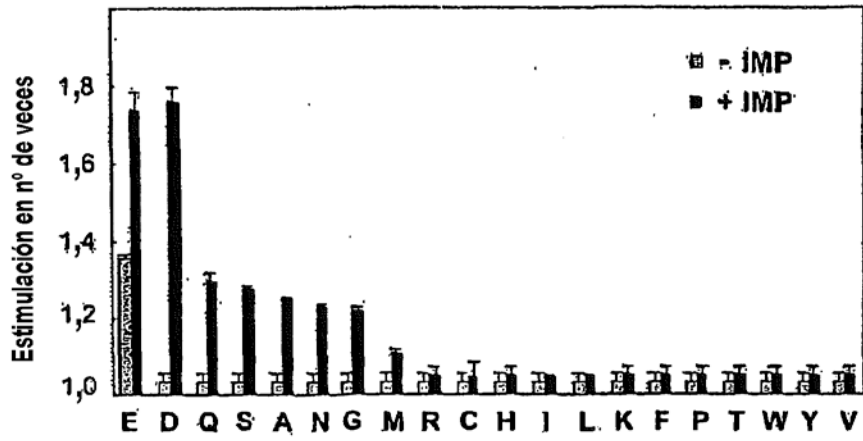


Figura 14

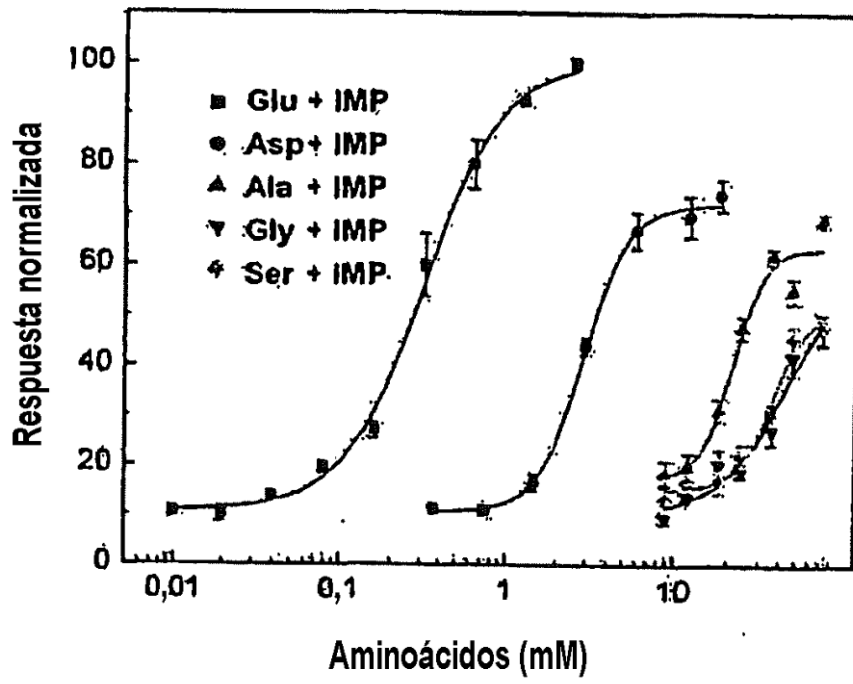
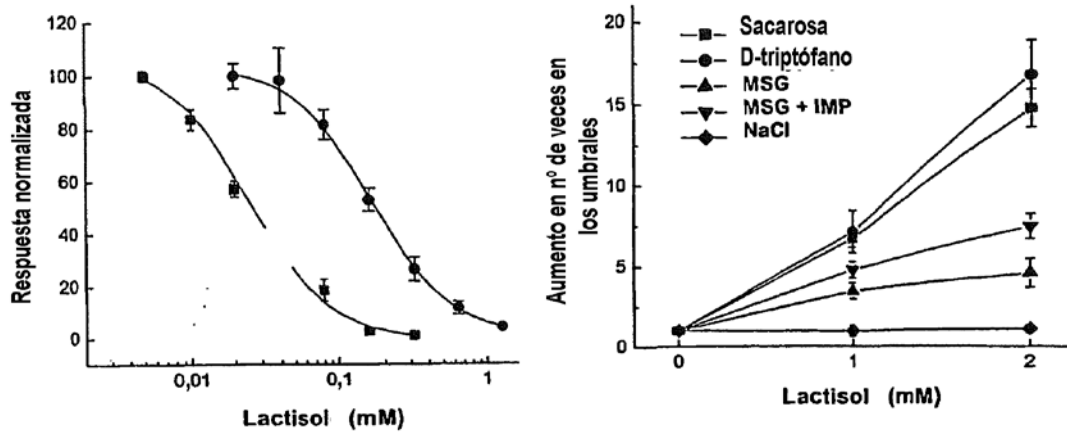


Figura 15



5 **Figura 16:** El lactisol inhibe los receptores del dulce T1R2/T1R3 y del umami T1R1/T1R3 y el sabor
 dulce y umami. (Panel izquierdo) se muestran las respuestas de células HEK- $G_{\alpha 15}$ transfectadas de forma
 transitoria con T1R1/T1R3 (círculos) a L-glutamato 10 mM, y células HEK- $G_{\alpha 15}$ transfectadas de forma
 transitoria con T1R2/T1R3 (cuadrados) a sacarosa 150 mM, en presencia de concentraciones variables de
 lactisol. (Panel derecho) se muestran los aumentos en nº de veces en los umbrales de detección del gusto
 10 en presencia de lactisol 1 y 2 mM para los estímulos de sabor dulce, sacarosa y D-triptófano, los estímulos
 de sabor umami, L-glutamato (MSG) y L-glutamato más IMP 0,2 mM, y cloruro de sodio. Los umbrales de
 detección se determinaron siguiendo el método de Schiffman *et al.*