

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 681**

51 Int. Cl.:

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2001 E 10180329 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 2298802**

54 Título: **Dominios de receptores gustativos T1R3 y genes que los codifican**

30 Prioridad:

07.03.2000 US 187546 P
07.04.2000 US 195536 P
23.06.2000 US 214213 P
06.06.2000 US 209840 P
17.08.2000 US 226448 P
03.01.2001 US 259227 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2013

73 Titular/es:

SENOMYX, INC. (100.0%)
4767 Nexus Centre Drive
San Diego, CA 92121, US

72 Inventor/es:

ALDER, JON ELLIOT;
ZOZULYA, SERGEY;
O'CONNELL, SHAWN M;
LI, XIAODONG y
STASZEWSKI, LENA

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 396 681 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

Dominios de receptores gustativos T1R3 y genes que los codifican

5 **Antecedentes de la Invención****Campo de la Invención**

10 La invención se refiere a receptores quimiosensoriales de mamíferos recientemente identificados acoplados a proteína G, a la familia de dichos receptores y a los genes y ADNc que codifica dichos receptores. Más particularmente, la invención se refiere a receptores quimiosensoriales de mamíferos recientemente identificados acoplados a proteína G activos en la señalización del gusto, a una familia de dichos receptores, a los genes y ADNc que codifica dichos receptores y a métodos de uso de dichos receptores, genes y ADNc en el análisis y descubrimiento de moduladores gustativos.

15 **Descripción de la Técnica Relacionada**

El sistema gustativo proporciona información sensorial acerca de la composición química del mundo exterior. La transducción gustativa es una de las formas más sofisticadas de sensación activada por productos químicos en los animales. Hasta ahora, los medios mediante los cuales se producen las sensaciones gustativas continúan sin entenderse bien. Véase, por ejemplo, Margolskee, *BioEssays*, 15: 645-50 (1993); Avenet *et al.*, *J. Membrane Biol.*, 112:1-8 (1989). La señalización gustativa se encuentra en todo el reino animal, desde los simples metazoos a los vertebrados más complejos. Se cree que en la sensación gustativa participan distintas rutas de señalización. Se cree que los receptores median estas rutas, es decir, receptores metabotrópicos o ionotrópicos. Las células que expresan receptores gustativos, cuando se exponen a determinados estímulos químicos, producen la sensación gustativa mediante despolarización para generar un potencial de acción, que se piensa que desencadena la sensación. Se piensa que este hecho desencadena la liberación de neurotransmisores en la sinapsis neuronal aferente gustativa, iniciando de esta manera la señalización a través de las rutas neuronales que median la percepción gustativa. Véase, por ejemplo, Roper, *Ann. Rev. Neurosci.*, 12: 329-53 (1989).

30 Así pues, los receptores gustativos reconocen específicamente moléculas que provocan la sensación específica gustativa. Estas moléculas también se denominan en este documento "sustancias gustativas". Muchos receptores gustativos pertenecen a la superfamilia de receptores de 7 dominios transmembrana (Hoon *et al.*, *Cell* 96: 541 (1999); Adler *et al.*, *Cell* 100: 693 (2000)), también conocidos como receptores acoplados a proteína G (GPCR). Se piensa que las proteínas de canal median otros gustos. Los receptores acoplados a proteína G controlan muchas funciones fisiológicas, tales como la función endocrina, la función exocrina, la frecuencia cardíaca, la lipólisis, el metabolismo de hidratos de carbono y la señalización transmembrana. El análisis bioquímico y la clonación molecular de varios de dichos receptores han revelado muchos principios básicos con respecto a la función de estos receptores.

40 Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.691.188 describe cómo tras la unión del GPCR a un ligando, presumiblemente el receptor experimenta un cambio conformacional lo que conduce a la activación de la proteína G. Las proteínas G están formadas por tres subunidades: una subunidad α unida a un nucleótido guanilo, una subunidad β y una subunidad γ . Las proteínas G alternan entre dos formas, dependiendo de si en la subunidad α está unido GDP o GTP. Cuando está unido el GDP, la proteína G existe como un heterotrímero: el complejo $G\alpha\beta\gamma$. Cuando está unido el GTP, la subunidad α se disocia del heterotrímero, dando un complejo $G\beta\gamma$. Cuando un complejo $G\alpha\beta\gamma$ se asocia operativamente con un receptor activado acoplado a proteína G en una membrana celular, la velocidad de intercambio del GTP para unirse al GDP aumenta y la velocidad de disociación del enlace de la subunidad $G\alpha$ del complejo $G\alpha\beta\gamma$ aumenta. La subunidad $G\alpha$ libre y el complejo $G\beta\gamma$ son por tanto capaces de transmitir una señal a elementos aguas abajo de una diversidad de rutas de transducción de señal. Estos acontecimientos constituyen la base de una multiplicidad de fenómenos de diferente señalización celular, que incluyen por ejemplo, el fenómeno de señalización que se identifica como percepciones sensoriales neurológicas tales como el gusto y/o el olfato.

55 Se piensa que los mamíferos tienen cinco modalidades gustativas básicas: dulce, amargo, ácido, salado y umami (el sabor del glutamato monosódico). Véase, por ejemplo, Kawamura *et al.*, *Introduction to Umami: A Basic Taste* (1987); Kinnamon *et al.*, *Ann. Rev. Physiol.*, 54: 715-31 (1992); Lindemann, *Physiol. Rev.*, 76: 718-66 (1996); Stewart *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 272: 1-26 (1997). Numerosos estudios fisiológicos en animales han demostrado que las células receptoras gustativas pueden responder de manera selectiva a diferentes estímulos químicos. Véase, por ejemplo, Akabas *et al.*, *Science*, 242: 1047-50 (1988); Gilbertson *et al.*, *J. Gen. Physiol.*, 100: 803-24 (1992); Bernhardt *et al.*, *J. Physiol.*, 490: 325-36 (1996); Cummings *et al.*, *J. Neurophysiol.*, 75: 1256-63 (1996).

65 En mamíferos, las células receptoras gustativas se agrupan en botones gustativos que están distribuidos en diferentes papilas en el epitelio de la lengua. Las papilas circunvaladas, localizadas en la parte más posterior de la lengua, contienen de cientos a miles de botones gustativos. A diferencia, las papilas foliadas, localizadas en el borde

lateral posterior de la lengua, contienen de decenas a cientos de botones gustativos. Adicionalmente, las papilas fungiformes, localizadas en la parte delantera de la lengua, contienen únicamente un solo o algunos botones gustativos.

5 Cada botón gustativo, dependiendo de la especie, contiene de 50-150 células, incluyendo células precursoras, células de soporte y células receptoras gustativas. Véase, por ejemplo, Lindemann, *Pysiol. Rev.*, 76: 718-66 (1996). Las células receptoras se enervan en su base por terminaciones nerviosas aferentes que transmiten información a los centros gustativos del córtex a través de la sinapsis en el tronco cerebral y el tálamo. Para comprender la función, regulación y percepción del sentido del gusto, es importante aclarar los mecanismos de señalización de las
10 células gustativas y el procesamiento de la información.

Aunque se sabe mucho sobre la psicofísica y la fisiología de la función de las células gustativas, se sabe muy poco sobre las moléculas y las rutas que median su respuesta de señalización sensorial. La identificación y el aislamiento de nuevos receptores gustativos y de moléculas señalizadoras gustativas podrían permitir nuevos métodos de modulación química y genética de las rutas de transducción gustativa. Por ejemplo, la disponibilidad de moléculas receptoras y de canal podría permitir la identificación de agonistas, antagonistas, agonistas inversos y moduladores de actividad gustativa de elevada afinidad. Dichos componentes de modulación gustativa podrían ser útiles en la industria farmacéutica y alimentaria para mejorar el gusto de una diversidad de productos de consumo o para bloquear gustos indeseables, por ejemplo, en determinados compuestos farmacéuticos.

20 Actualmente se conocen las secuencias completas o parciales de numerosos receptores quimiosensoriales en seres humanos y otros eucariotas. Véase, por ejemplo, Pilpel, Y. y Lancet, D., *Protein Science*, 8: 969-977 (1999); Mombaerts, P., *Annu. Rev. Neurosci.*, 22: 487-500 (1999). Véanse también, los documentos EPO867508A2, US 5874243, WO 92/17585, WO 95/18140, WO 97/17444, WO 99/67282. Debido a la complejidad de las interacciones receptor-ligando, y más particularmente de las interacciones receptor-sustancia gustativa, existe una carencia de información sobre el reconocimiento ligando-receptor. En parte, la presente invención aborda la necesidad de entender mejor las interacciones entre los receptores quimiosensoriales y los estímulos químicos. La presente invención también proporciona, entre otras cosas, nuevos receptores quimiosensoriales y métodos para utilizar dichos receptores, y los genes y los ADNc que codifican dichos receptores, para identificar moléculas que puedan usarse para modular la transducción quimiosensorial, tal como la sensación gustativa.

Sumario de la Invención

35 La invención se refiere a una nueva familia de receptores acoplados a proteína G, y a los genes y a los ADNc que codifican dichos receptores. Se piensa que los receptores intervienen principalmente en la transducción del gusto dulce, pero también pueden intervenir en las señales de transducción de otras modalidades gustativas.

40 La presente invención proporciona una secuencia aislada de ácido nucleico que codifica la región extracelular o transmembrana de un polipéptido receptor gustativo T1R3 regional transmembrana extracelular que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con el polipéptido contenido en la SEC ID N°: 4 o 14, un vector que contiene la secuencia de ácido nucleico y una célula hospedadora transformada o transfectada con la secuencia aislada de ácido nucleico o con el vector.

45 Adicionalmente, la presente invención proporciona un polipéptido T1R3 aislado codificado por la secuencia aislada de ácido nucleico de la invención.

Además, la presente invención proporciona un ensayo para identificar un compuesto que modula la transducción gustativa que comprende:

- 50 (i) poner en contacto un polipéptido T1R3 de acuerdo con la invención con un supuesto compuesto modulador gustativo y;
(ii) detectar si dicho compuesto se une específicamente a dicho polipéptido T1R3.

55 Se proporcionan métodos para representar la percepción del gusto y/o para predecir la percepción del gusto en un mamífero, incluyendo un ser humano. Preferiblemente, dichos métodos pueden realizarse usando los receptores y genes que codifican dichos receptores descritos en este documento.

60 Con esta finalidad, un objeto de la descripción es proporcionar una nueva familia de receptores acoplados a proteína G en mamíferos, en este documento denominados T1R, activos en la percepción gustativa. Otro objeto de la invención es proporcionar fragmentos y variantes de dichos T1R que conservan actividad de unión a sustancias gustativas.

Otro objeto de la descripción es proporcionar secuencias de ácido nucleico o moléculas que codifican dichos T1R, fragmentos o variantes de los mismos.

65 Otro objeto más de la descripción es proporcionar vectores de expresión que incluyen secuencias de ácidos

nucleicos que codifican dichos T1R, o fragmentos o variantes de los mismos, que están unidos operativamente a al menos una secuencia reguladora tal como un promotor, potenciador u otra secuencia implicada en la transcripción y/o traducción génica positiva o negativa.

5 Es aún otro objeto de la descripción proporcionar células humanas o no humanas que expresen funcionalmente al menos uno de dichos T1R, o fragmentos o variantes de los mismos.

Es aún otro objeto de la descripción proporcionar proteínas o polipéptidos de fusión a T1R que incluyan al menos un fragmento de al menos uno de dichos T1R.

10 Otro objeto de la descripción es proporcionar una molécula aislada de ácido nucleico que codifique un polipéptido de T1R que comprenda una secuencia de ácido nucleico que sea idéntica al menos el 50%, preferiblemente el 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en: las SEC ID N°: 1, 2, 3, 9, 11, 13, 15, 16, 20 y variantes de las mismas modificadas de manera conservativa.

15 Es aún otro objeto de la descripción proporcionar una molécula aislada de ácido nucleico que comprenda una secuencia de ácido nucleico que codifique un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos idéntica al menos del 35 al 50% y preferiblemente al 60%, 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: las SEC ID N°: 4, 10, 12, 14, 17 y variantes de las mismas modificadas de manera conservativa, en la que el fragmento tiene al menos una longitud de 20, preferiblemente 40, 60, 80, 100, 150, 200 ó 250 aminoácidos. Opcionalmente, el fragmento puede ser un fragmento antigénico que se une a un anticuerpo anti-T1R.

20 Es aún otro objeto de la descripción proporcionar un polipéptido aislado que comprenda una variante de dicho fragmento, en la que exista una variación de al menos 10, preferiblemente 5, 4, 3, 2 ó 1 resto aminoacídico.

Es aún otro objeto de la descripción proporcionar agonistas o antagonistas de dichos T1R o fragmentos o variantes de los mismos.

30 Es aún otro objeto de la descripción proporcionar métodos para representar la percepción del gusto y/o para predecir la percepción del gusto en un mamífero, incluyendo un ser humano. Preferiblemente, dichos métodos pueden realizarse mediante el uso de los T1R, o fragmentos o variantes de los mismos y los genes que codifican dichos T1R, o fragmentos o variantes de los mismos, descritos en este documento.

35 Es aún otro objeto de la descripción proporcionar nuevas moléculas o combinaciones de moléculas que provoquen una percepción gustativa predeterminada en un mamífero. Dichas moléculas o composiciones pueden generarse determinando un valor de percepción gustativa en un mamífero para una molécula o combinaciones de moléculas conocidas; determinando un valor de percepción gustativa en un mamífero para una o más moléculas o combinaciones de moléculas desconocidas; comparando el valor de la percepción gustativa en un mamífero para una o más composiciones desconocidas con respecto al valor de la percepción gustativa en un mamífero para una o más composiciones conocidas; seleccionando una molécula o combinación de moléculas que provoquen una percepción gustativa predeterminada en un mamífero; y combinando dos o más moléculas o combinaciones de moléculas desconocidas para formar una molécula o combinación de moléculas que provoquen una percepción gustativa predeterminada en un mamífero. La etapa de combinación produce una sola molécula o una combinación de moléculas que provocan una percepción gustativa predeterminada en un mamífero.

40 Es aún otro objeto de la descripción proporcionar un método de identificación de uno o más compuestos para determinar la presencia de un gusto detectable por un mamífero, que comprenda: una etapa de poner en contacto dicho uno o más compuestos con al menos uno de los T1R fragmentos o variantes de los mismos descritos en este documento, en el que preferiblemente el mamífero sea un ser humano.

45 Es otro objeto de la descripción proporcionar un método para estimular un gusto, que comprenda las etapas de: para cada uno de una pluralidad de los T1R, o fragmentos o variantes de los mismos descritos en este documento, preferiblemente los T1R de seres humanos, determinar el grado en el que el T1R interacciona con la sustancia gustativa; y combinar una pluralidad de compuestos, teniendo cada uno una interacción previamente determinada con uno o más de los T1R, en cantidades que juntos proporcionen un perfil de estimulación del receptor que imite el perfil para el gusto. La interacción de una sustancia gustativa con un T1R puede determinarse usando cualquiera de los ensayos de unión o indicadores descritos en este documento. La pluralidad de compuestos puede después combinarse para formar una mezcla. Si se desea, uno o más de la pluralidad de los compuestos puede combinarse de manera covalente. Los compuestos combinados estimulan sustancialmente a todos, o al menos al 50%, 60%, 70%, 75%, 80% o al 90%, los receptores que estimula sustancialmente la sustancia gustativa.

60 En otro aspecto más se proporciona un método en el que se ensaya una pluralidad de compuestos convencionales frente a una pluralidad de los T1R, o fragmentos o variantes de los mismos, para determinar el grado en el que interacciona cada uno de los T1R con cada compuesto convencional, generando de esta manera un perfil de estimulación del receptor para cada compuesto convencional. Estos perfiles de estimulación del receptor pueden

almacenarse en una base de datos relacional o en un medio de almacenamiento de datos. El método puede comprender adicionalmente proporcionar un perfil de estimulación del receptor deseado para un gusto; comparar el perfil de estimulación del receptor deseado con la base de datos relacional; y determinar una o más combinaciones de compuestos convencionales que más se ajusten al perfil de estimulación del receptor deseado. El método puede comprender adicionalmente combinar compuestos convencionales en una o más de las combinaciones determinadas para estimular el gusto.

Otro objeto de la descripción es proporcionar un método para representar la percepción gustativa de una sustancia gustativa particular en un mamífero, que comprende las etapas de: proporcionar valores X_1 a X_n representativos de la estimulación cuantitativa de cada uno de los n T1R de dicho vertebrado, en el que n es superior o igual a 2; y generar, a partir de dichos valores, una representación cuantitativa de la percepción gustativa. Los T1R pueden ser en un receptor gustativo descrito en este documento o fragmentos o variantes de los mismos, la representación puede constituir un punto o un volumen en el espacio n dimensional, puede constituir un gráfico o un espectro y puede constituir una matriz o representaciones cuantitativas. Además, la etapa de proporcionar puede comprender poner en contacto una pluralidad de los T1R o fragmentos o variantes de los mismos producidos de manera recombinante, con una composición del ensayo y medir cuantitativamente la interacción de dicha composición con dichos receptores.

Otro objeto más de la descripción es proporcionar un método para predecir la percepción gustativa en un mamífero generada por una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen la percepción gustativa desconocida en un mamífero, que comprende las etapas de: proporcionar valores X_1 a X_n representativos de la estimulación cuantitativa de cada uno de los n T1R de dicho vertebrado, en el que n es superior o igual a 1; para una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen la percepción gustativa conocida en un mamífero, y generar a partir de dichos valores una representación cuantitativa de la percepción gustativa en un mamífero para una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen la percepción gustativa conocida en un mamífero, proporcionar valores X_1 a X_n representativos de la estimulación cuantitativa para cada uno de los n T1R de dicho vertebrado, en el que n es superior o igual a 2; para una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen la percepción gustativa desconocida en un mamífero; y generar a partir de dichos valores una representación cuantitativa de la percepción gustativa en un mamífero para una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen la percepción gustativa desconocida en un mamífero y predecir la percepción gustativa en un mamífero generada por una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen la percepción gustativa desconocida en un mamífero comparando la representación cuantitativa de la percepción gustativa en un mamífero para una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen la percepción gustativa desconocida en un mamífero con respecto a la representación cuantitativa de la percepción gustativa en un mamífero para una o más moléculas o combinaciones de moléculas que produce la percepción gustativa desconocida en un mamífero. Los T1R usados en este método pueden incluir un receptor gustativo o fragmento o variante del mismo, descrito en este documento.

Breve Descripción de los Dibujos

La **Figura 1** es una criosección de lengua congelada de ratones que muestra la expresión del gen T1R3 en los botones gustativos de las papilas circunvaladas de ratones por hibridación *in situ*. Las células receptoras gustativas seleccionadas que expresan T1R3 se marcan con flechas.

Descripción Detalla de la Invención

La descripción proporciona de esta manera moléculas aisladas de ácido nucleico que codifican receptores acoplados a proteínas G ("GPCR") específicos de células gustativas y los polipéptidos que codifican. Estas moléculas de ácido nucleico y los polipéptidos que codifican son miembros de la familia T1R de los GPCR específicos de células gustativas. Los miembros de la familia T1R de los GPCR específicos de células gustativas se identifican en Hoon *et al.*, *Cell*, 96: 541-551 (1999), y en los documentos WO 00/06592 y WO 00/06593.

Más particularmente, la descripción proporciona ácidos nucleicos que codifican una nueva familia de GPCR específicos de células gustativas. Estos ácidos nucleicos y los receptores que codifican se denominan como miembros de la familia "T1R" de los GPCR específicos de células gustativas. En realizaciones particulares, los miembros de la familia T1R incluyen rT1R3, mT1R3, hT1R3 y hT1R1. Aunque sin desear ceñirse a una teoría, se cree que estos GPCR específicos de células gustativas son componentes de la ruta de transducción gustativa y pueden participar en la detección gustativa de sustancias dulces y/u otras modalidades gustativas.

Además, se cree que los miembros de la familia T1R pueden actuar en combinación con otros miembros de la familia T1R, con otros GPCR específicos de células gustativas o con una combinación de los mismos, para efectuar de esta manera la transducción gustativa quimiosensorial. Por ejemplo, se cree que T1R1 y T1R3 pueden coexpresarse dentro del mismo tipo celular receptor gustativo y los dos receptores pueden interactuar físicamente para formar un receptor gustativo heterodimérico. Como alternativa, T1R1 y T1R3 pueden unirse independientemente al mismo tipo de ligando y su unión combinada puede dar lugar a una sensación gustativa específica percibida.

- Estos ácidos nucleicos proporcionan sondas valiosas para la identificación de células gustativas, ya que los ácidos nucleicos se expresan específicamente en las células gustativas. Por ejemplo, pueden usarse sondas para polipéptidos y proteínas T1R para identificar células gustativas presentes en las papilas foliadas, circunvaladas y fusiformes, así como células gustativas presentes en la geschmackstreifen (franja del sabor), en la cavidad oral, el epitelio gastrointestinal y en la epiglotis. Pueden servir como herramientas para la generación de mapas topográficos gustativos que aclaren la relación entre las células gustativas de la lengua y las neuronas sensoriales gustativas que conducen a los centros gustativos en el cerebro. En particular, pueden usarse métodos de detección de los T1R para identificar células gustativas sensibles a sustancias gustativas dulces u otras modalidades específicas de sustancias gustativas. Además, los ácidos nucleicos y las proteínas que codifican pueden usarse como sondas para analizar comportamientos inducidos por el gusto. También, puede usarse la locación cromosómica de los genes que codifican los T1R humanos para identificar enfermedades, mutaciones y rasgos causados por y asociados con los miembros de la familia de T1R.
- Los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos y las proteínas T1R de la invención pueden aislarse a partir de una diversidad de fuentes, modificación genética, amplificación, síntesis y/o expresión recombinante de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO 00/035374.
- La invención también proporciona métodos de selección para moduladores, por ejemplo, activadores, inhibidores, estimuladores, potenciadores, agonistas y antagonistas de estos nuevos GPCR específicos de células gustativas. Dichos moduladores de la transducción gustativa son útiles para la modulación farmacológica, química y genética de las rutas de señalización del gusto. Estos métodos de selección pueden usarse para identificar antagonistas y agonistas de afinidad elevada de la actividad celular gustativa. Estos compuestos moduladores pueden usarse por tanto en la industria alimentaria y farmacéutica para personalizar el gusto, por ejemplo, para modular el gusto dulce de los alimentos o fármacos.
- Por tanto, la invención proporciona ensayos para detectar y caracterizar la modulación gustativa, donde los miembros de la familia T1R actúan como moléculas indicadoras directas o indirectas del efecto de moduladores en la transducción gustativa. Los GPCR pueden usarse en ensayos para, por ejemplo, medir cambios en la unión a ligando, concentración iónica, potencial de membrana, flujo de corriente, flujo iónico, transcripción, transducción de señal, interacciones receptor con ligando, concentraciones del segundo mensajero, *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*. En una realización, los miembros de la familia de T1R pueden usarse como indicadores indirectos mediante la unión a una segunda molécula informadora tal como una proteína fluorescente verde (véase, por ejemplo, Mistili & Spector, *Nature Biotechnology*, 15: 961-964 (1997)). En otra realización, los miembros de la familia T1R pueden expresarse de manera recombinante en células y la modulación de la transducción del gusto por medio de la actividad GPCR puede ensayarse midiendo cambios en los niveles del Ca^{2+} y otros mensajeros intracelulares tales como AMPc, GMPc o IP3.
- En determinadas realizaciones, un dominio de un polipéptido T1R, por ejemplo, un dominio extracelular, transmembrana o intracelular, se fusiona a un polipéptido heterólogo, formando de esta manera un polipéptido quimérico, por ejemplo, un polipéptido quimérico con actividad GPCR. Dichos polipéptidos quiméricos son útiles en ensayos, por ejemplo, para identificar ligandos, agonistas, antagonistas u otros moduladores de un polipéptido T1R. Además, dichos polipéptidos quiméricos son útiles para crear nuevos receptores gustativos con nueva especificidad de unión a ligando, modos de regulación, rutas de transducción de señal u otras dichas propiedades, o para crear nuevos receptores gustativos con nuevas combinaciones de especificidad de unión a ligando, modos de regulación, rutas de transducción de señal, etc.
- En una realización, un polipéptido T1R se expresa en una célula eucariota como un receptor quimérico con una secuencia chaperona, heteróloga que facilita el tránsito a la membrana plasmática o la maduración y direccionamiento a través de la ruta secretora. La secuencia heteróloga opcional puede ser una secuencia de rodopsina, tal como un fragmento N-terminal de una rodopsina. Dichos receptores T1R quiméricos pueden expresarse en cualquier célula eucariota, tal como en las células HEK-293. Preferiblemente, las células comprenden una proteína G, por ejemplo $G_{\alpha 15}$ o $G_{\alpha 16}$ u otro tipo de proteína G promiscua capaz de emparejarse con un amplio intervalo de GPCR quimiosensoriales con una ruta de señalización intracelular o con una proteína de señalización tal como una fosfolipasa C. La activación de dichos receptores quiméricos en dichas células puede detectarse usando cualquier método convencional, tal como detectando cambios en el calcio intracelular detectando 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.
- Los métodos de ensayo para moduladores de la transducción gustativa incluyen ensayos de unión a ligando *in vitro* usando: polipéptidos T1R, partes de los mismos, es decir, el dominio extracelular, la región transmembrana o combinaciones de estos, o proteínas quiméricas que comprenden uno o más dominios de un miembro de la familia T1R; oocitos o células de cultivo tisular que expresan polipéptidos T1R, fragmentos o proteínas de fusión; fosforilación y desfosforilación de los miembros de la familia T1R; unión de la proteína G a los GPCR; ensayos de unión a ligando; cambios de voltaje, potencial de membrana y conductancia; ensayos de flujo iónico; cambios en los segundos mensajeros intracelulares tales como GMPc, CAMP y trifosfato inositol (IP3); cambios en los niveles de

calcio intracelular y liberación neurotransmisora.

Además, la descripción proporciona métodos para detectar la expresión de ácidos nucleicos y proteínas T1R, que permiten la investigación de la regulación de la transducción gustativa y la identificación específica de las células receptoras gustativas. Los miembros de la familia T1R también proporcionan sondas útiles de ácidos nucleicos para investigaciones forenses y de paternidad. Los genes T1R también son útiles como sondas de ácidos nucleicos para identificar células receptoras gustativas, tales como células receptoras gustativas en las papilas foliadas, fungiformes, circunvaladas, en la franja del sabor (geschmackstreifen) y en la epiglotis. Los receptores T1R también pueden usarse para generar anticuerpos monoclonales y policlonales útiles para la identificación de células receptoras gustativas. Las células receptoras gustativas pueden identificarse usando técnicas tales como transcripción inversa y amplificación de ARNm, aislamiento de ARN total o poli A+ARN, transferencia de northern, transferencia puntual, hibridación *in situ*, protección ARNasa, digestión S1, sondeo por micro matriz del ADN, transferencias de western y similares.

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

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

Secuencia Consenso 1 de la Familia T1R 1: (SEC ID N°: 18)

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

Secuencia Consenso 2 de la Familia T1R 1: (SEC ID N°: 19)

(LQ)P(EGT)(NCR)YN(RE)A(RK)(CGF)(VLI)T(FL)(AS)(ML)

Estas secuencias consenso se incluyen en las descubiertas en los polipéptidos T1R descritos en este documento, pero puede esperarse que los miembros de la familia T1R de otros organismos comprendan secuencias consenso que tengan aproximadamente una identidad del 75% o más con respecto a las secuencias consenso incluidas descritas específicamente en este documento.

Para identificar variantes polimórficas, homólogos interespecie y alelos de los miembros de la familia T1R pueden usarse regiones específicas de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de T1R. Esta identificación puede realizarse *in vitro*, por ejemplo, en condiciones de hibridación rigurosas o PCR (por ejemplo, usando cebadores que codifiquen las secuencias consenso T1R identificadas anteriormente) o usando la información de secuencia de un sistema informático para realizar la comparación con otras secuencias de nucleótidos. Los alelos de genes T1R diferentes en una población de especie única también será útil para determinar si las diferencias en las secuencias alélicas se correlacionan con respecto a las diferencias en la percepción gustativa entre miembros de la población. La amplificación clásica de tipo PCR y las técnicas de clonación son útiles para aislar ortólogos, por ejemplo, cuando los cebadores degenerados son suficientes para detectar genes relacionados a través de especies, los cuales típicamente tienen un mayor nivel de identidad relativa con respecto a los miembros parálogos de la familia T1R dentro de una sola especie.

Por ejemplo, para amplificar y clonar genes T1R3 de genomas de diferentes mamíferos pueden usarse cebadores degenerados SAP0077 (SEC ID N° 5) SAP0079 (SEC ID N° 6). A diferencia, los genes de una sola especie que están relacionados con T1R3 se identifican mejor usando un modelo de secuencia de reconocimiento por ordenador para buscar secuencias relacionadas. Típicamente, la identificación de variantes polimórficas y alelos de los

miembros de familia T1R puede realizarse comparando una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 25 aminoácidos o más, por ejemplo, de 50-100 aminoácidos. La identidad de aminoácidos de aproximadamente al menos del 35 al 50%, y opcionalmente el 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95-99% o superior demuestra típicamente que una proteína es una variante polimórfica, un homólogo interespecie o un alelo de un miembro de la familia T1R. La comparación de secuencias puede realizarse usando cualquiera de los algoritmos de comparación de secuencias descritos a continuación. Los anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos T1R o a una región conservada de los mismos pueden usarse para identificar alelos, homólogos interespecie y variantes polimórficas.

Las variantes polimórficas, los homólogos interespecie y los alelos de los genes T1R pueden confirmarse examinando la expresión específica de la célula gustativa de un supuesto polipéptido T1R. Típicamente, los polipéptidos T1R que tienen una secuencia de aminoácidos descrita en este documento pueden usarse como un control positivo en comparación con el supuesto polipéptido T1R para demostrar la identificación de una variante polimórfica o alelo del miembro de la familia T1R. Se espera que las variantes polimórficas, alelos y homólogos interespecie conserven la estructura de siete dominios transmembrana de un receptor acoplado a proteína G. Para detalles adicionales, véase el documento WO 00/06592, que describe miembros de la familia de T1R relacionados, GPCR-B3s, cuyo contenido se incorpora por referencia en el presente documento de manera coherente con la presente descripción. En este documento los receptores GPCR-B3 reciben el nombre de rT1R1 y mT1R1. Adicionalmente, véase el documento WO 00/06593 que también describe miembros de la familia T1R relacionados, GPCR-B4s, cuyo contenido se incorpora por referencia en el presente documento de manera coherente con la presente descripción. En este documento los receptores GPCR-B4 reciben el nombre de como rT1R2 y mT1R2.

La información de la secuencia de aminoácidos y de nucleótidos para los miembros de la familia T1R también puede usarse para construir modelos de polipéptidos específicos de células gustativas en un sistema informatizado. Estos modelos pueden usarse posteriormente para identificar compuestos que pueden activar o inhibir proteínas receptoras de T1R. Dichos compuestos que modulan la actividad de los miembros de la familia T1R pueden usarse después para investigar la función de los genes y receptores de T1R en la transducción gustativa.

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

En otro aspecto de la descripción, se proporciona un nuevo gen GPCR humano de la familia T1R, denominado hT1R3. El gen hT1R3 se identificó a partir de la base de datos de la secuencia genómica humana incluyendo la división HTGS del GenBank. En las SEC ID N°: 1-4 se proporcionan los nucleótidos y la secuencia de aminoácidos traducida conceptualmente para hT1R3. El receptor de hT1R3 se identificó en el clon genómico BAC parcialmente secuenciado RP5-890O3 (número de acceso de la base de datos AL139287) debido a su similitud de secuencia con el receptor gustativo candidato de rata rT1R1 (número de acceso AF127389). Como referencia, la identidad por parejas entre las secuencias de proteínas del predicho hT1R3 y rT1R1 es aproximadamente del 34%. Las comparaciones de las secuencias con miembros adicionales de la Familia C de GPCR (que incluye los receptores sensibles a calcio, supuestos receptores de feromonas V2R, receptores de GABA-B, receptores gustativos del pescado y receptores de glutamato metabotrópicos) indican que probablemente hT1R3 pertenece al subgrupo de la Familia C definido por T1R1 y un segundo receptor gustativo candidato de rata (rT1R2, número de acceso AF127390).

También se proporciona el ortólogo humano, denominado hT1R1, de un receptor gustativo de rata, denominado rT1R1. Los productos génicos de rT1R1 y hT1R1 tienen una identidad aproximada del 74%. Se ha descrito el gen de ratón, mT1R1 véase Hoon *et al.*, *Cell*, 96: 541-551 (2000) y mapea en un intervalo cromosómico homólogo al intervalo que contiene hT1R1. Las secuencias de nucleótidos y hT1R1 traducidas conceptualmente se describen en este documento como las SEC ID N°: 15 y 16, respectivamente.

Aunque sin desear ligarse a una teoría particular, se supone que la familia de receptores T1R participa en la transducción del gusto dulce debido al enlace de mT1R3 con el locus *Sac*, un locus en el extremo distal del cromosoma cuatro que influye en el gusto dulce. También se ha indicado que el T1R3 humano se localiza en 1p36.2-1p36.33, una región que presenta sintenia conservada con el intervalo de ratón que contiene *Sac* y T1R1. Sin embargo, los receptores de tipo T1R pueden mediar otras modalidades gustativas, tales como amargo, umami, ácido y salado.

Dentro del alcance de la invención se prevén diversas mutaciones y sustituciones conservativas. Por ejemplo, estaría dentro del nivel del experto en la materia realizar sustituciones de aminoácidos usando protocolos conocidos de tecnología genética recombinante incluyendo PCR, clonación de genes, mutagénesis de ADNc dirigida a sitio, transfección de células hospedadoras y transcripción *in vitro*. Las variantes podrían después seleccionarse para determinar la actividad funcional del GPCR específica de las células gustativas.

A. Identificación y Caracterización de Polipéptidos T1R

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas y polipéptidos T1R de la invención pueden identificarse por supuesta traducción de las secuencias que codifican los ácidos nucleicos. Estas diversas secuencias de aminoácidos y las secuencias que codifican los ácidos nucleicos pueden compararse una con otras o con otras secuencias de acuerdo con varios métodos.

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

Una "ventana de comparación", como se usa en este documento, incluye la referencia para un segmento de una cualquiera de varias posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste de 20 a 600, habitualmente aproximadamente de 50 a aproximadamente 200, más habitualmente aproximadamente de 100 a aproximadamente 150 en la que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que dos secuencias estén alineadas óptimamente. Los métodos de alineamiento de secuencias para comparar se conocen en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencias para comparar puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), mediante el método de similitud de búsqueda de Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante el alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds. 1995 suplemento)).

Un ejemplo preferido de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo de BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402 (1977) y Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990), respectivamente. El programa informático para realizar análisis BLAST se encuentra disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar en primer lugar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema, que corresponden o satisfacen alguna puntuación T umbral de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de palabras cercanas (Altschul et al., *Nuc. Acids Res.* 21: 3389-3402 (1977) y Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990)). Estos aciertos iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar las búsquedas para encontrar los HSP que los contienen. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda incrementarse la puntuación de alineamiento acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos de coincidencia; siempre >0) y N (puntuación de castigo para restos no coincidentes; siempre <0). Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X desde su máximo valor conseguido; la puntuación acumulativa llega a cero o a un valor menor, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3, y expectativa (E) de 10 y alineamientos de matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henifokk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915 (1989)) (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas.

Otro ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea un alineamiento de secuencia múltiple a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineamientos progresivos, emparejados para demostrar la relación y el porcentaje de identidad de secuencia. También representa un denominado "árbol" o "dendrograma" que muestra la relación de agrupamiento usada para crear el alineamiento (véase, por ejemplo, la Figura 2). PILEUP usa una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng & Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35: 351-360 (1987). El método usado es similar al método descrito por Higgins & Sharp, *CABIOS* 5: 151-153 (1989). El programa puede alinear hasta 300 secuencias, cada una de ellas con una longitud máxima de 5000 nucleótidos o aminoácidos. El procedimiento de alineamiento múltiple comienza con el alineamiento emparejado de dos secuencias más similares, que producen un agrupamiento de dos secuencias alineadas. Este agrupamiento se alinea después con la siguiente secuencia más relacionada o agrupamiento de secuencias alineadas. Dos grupos de secuencias se alinean mediante una extensión simple del alineamiento emparejado de dos secuencias individuales. El alineamiento final se

consigue mediante una serie de alineamientos emparejados progresivos. El programa se realiza designando secuencias específicas y sus coordinados de aminoácidos o nucleótidos para regiones de comparación de secuencia y designando los parámetros del programa. Usando PILEUP, se compara una secuencia de referencia con otras secuencias de ensayo para determinar el porcentaje de identidad de secuencia relacionada usando los siguientes parámetros: peso del hueco por defecto (3.00), peso de longitud de hueco por defecto (0,10) y huecos terminales ponderados. PILEUP puede obtenerse del paquete informático de análisis de secuencia GCG, por ejemplo, versión 7.0 (Deveraux *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 12: 387-395 (1984)) codificada por los genes obtenidos por la traducción conceptual de los marcos de lectura abiertos correspondientes. La comparación de estas secuencias de proteínas con todas las proteínas conocidas en las bases de datos de secuencias públicas usando el algoritmo BLASTP reveló su fuerte homología con los miembros de la familia T1R, teniendo cada una de las secuencias de la familia T1R una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente del 35 al 50%, y preferiblemente al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65% y más preferiblemente al menos el 70% con al menos un miembro conocido de la familia.

15 B. Definiciones

Como se usa en este documento, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen a menos que se indique otra cosa.

20 Las "células gustativas" incluyen células neuroepiteliales que se organizan en grupos para formar botones gustativos de 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.

25 "T1R" se refiere a uno o más miembros de una familia de receptores acoplados a proteína G que se expresan en las células gustativas tales como células foliadas, fungiformes y circunvaladas, así como en células del paladar, y esófago (véase, por ejemplo, Hoon *et al.*, *Cell*, 96:541-551 (1999)). Los miembros de esta familia también se denominan como GPCR-B3 y TR1 en el documento WO 00/06592 así como GPCR-B4 y TR2 en el documento WO 00/06593. Los GPCR-B3 en este documento también se denominan rT1R1 y los GPCR-B4 se denominan rT1R2.

30 Las células receptoras gustativas también pueden identificarse en base a la morfología (véase por ejemplo Roper, *anteriormente*) o mediante la expresión de proteínas expresadas específicamente en las células gustativas. Los miembros de la familia T1R pueden tener la capacidad de actuar como receptores para la transducción del gusto dulce o para distinguir entre otras diversas modalidades gustativas.

35 Los ácidos nucleicos "T1R" codifican una familia de los GPCR con siete regiones transmembrana que tienen "actividad receptora acoplada a proteína G", por ejemplo, pueden unirse a proteínas G en respuesta al estímulo extracelular y promover la producción de mensajeros segundos tales como IP3, AMPc, CMPc y Ca²⁺ mediante la estimulación de enzimas tales como fosfolipasa C y adenilato ciclasa (para una descripción de la estructura y función de las GPCR, véase, por ejemplo, Fong, *anteriormente*, y Baldwin, *anteriormente*). Una sola célula gustativa puede contener muchos polipéptidos T1R distintos.

40 El término familia "T1R" por lo tanto se refiere a variantes, alelos, mutantes polimórficos y homólogos interespecie que: (1) tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente del 35 al 50%, opcionalmente aproximadamente una identidad de secuencia de aminoácidos de 60, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ó 99% con las SEC ID N°: 4, 10, 12, 14 ó 17, sobre una ventana de aproximadamente 25 aminoácidos, opcionalmente 50-100 aminoácidos; (2) se unen específicamente a anticuerpos provocados frente un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 4, 10, 12, 14, 17 y variantes de las mismas modificadas de manera conservativa; (3) los codifica una molécula de ácido nucleico que se hibrida específicamente (con un tamaño de al menos aproximadamente 100, opcionalmente al menos aproximadamente 500-1000 nucleótidos) en condiciones de hibridación rigurosas a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 1, 2, 3, 9, 11, 13, 15, 16, 20 y variantes de las mismas modificadas de manera conservativa; (4) comprenden una secuencia con una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente del 35 al 50% seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 4, 10, 12, 14 ó 17; ó (5) se amplifican mediante cebadores que se hibridan específicamente en condiciones de hibridación rigurosas con la misma secuencia que los conjuntos de cebadores degenerados que codifican las SEC ID N°: 7, 8 y variantes de las mismas modificadas de manera conservativa.

60 Topológicamente, determinados GPCR quimiosensoriales tienen un "dominio N-terminal", "dominios extracelulares"; "dominios transmembrana" que comprenden siete regiones 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 & Axel, *Cell*, 65:175-187 (1991)). Estos dominios pueden identificarse estructuralmente usando métodos conocidos por los expertos en la materia, tal como programas de análisis de secuencia que identifican dominios hidrófobos e hidrófilos (véase, por ejemplo Stryer, *Biochemistry*, (3rd ed. 1988); véase también cualquiera de los números de Internet en base a programas de análisis de secuencia, tales como los encontrados en dot.imgen.bcm.tmc.edu). Dichos dominios son útiles para preparar proteínas quiméricas y para ensayos *in vitro* de la invención, por ejemplo, ensayos de unión a ligando.

“Dominios extracelulares” se refiere por lo tanto a los dominios de los polipéptidos T1R que sobresalen de la membrana celular y quedan expuestos en la superficie extracelular de la célula. Dichos dominios generalmente incluyen el “dominio N-terminal” que se expone en la superficie extracelular de la célula, y opcionalmente puede incluir partes de los bucles extracelulares del dominio transmembrana que se exponen en la superficie extracelular de la célula, es decir, los bucles entre regiones transmembrana 2 y 3, entre regiones transmembrana 4 y 5 y entre regiones transmembrana 6 y 7.

La región “dominio N-terminal” comienza en el extremo N y se extiende hasta una región cerca del inicio del dominio transmembrana. Más particularmente, en una realización de la invención, este dominio comienza en el extremo N y acaba aproximadamente en el ácido glutámico conservado en la posición aminoacídica 563 más o menos aproximadamente 20 aminoácidos. La región correspondiente a los aminoácidos 1-580 de la SEC ID 40 es una realización particular de un dominio extracelular que se prolonga ligeramente dentro del dominio transmembrana. Estos dominios extracelulares son útiles para realizar ensayos *in vitro* de unión a ligando, tanto en fase soluble como sólida. Además, las regiones transmembrana, descritas a continuación, también pueden unirse a cualquier ligando en combinación con el dominio extracelular y por lo tanto son útiles para realizar ensayos *in vitro* de unión a ligando.

El “dominio transmembrana”, que comprende las siete “regiones transmembrana”, se refiere al dominio de los polipéptidos T1R que están dentro de la membrana plasmática y también puede incluir los bucles citoplásmicos (intracelulares) y extracelulares correspondientes. En una realización, esta región corresponde al dominio de los miembros de la familia de T1R que comienza aproximadamente en el resto del ácido glutámico conservado en la posición aminoacídica 563 más o menos 20 aminoácidos y acaba aproximadamente en el resto aminoacídico conservado de tirosina conservada en la posición 812 más o menos aproximadamente 10 aminoácidos. Las siete regiones transmembrana y los bucles extracelulares y citoplásmicos pueden identificarse usando métodos convencionales, como se describe en Kyte & Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157:105-32 (1982)), o en Stryer, *anteriormente*.

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

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

La frase “efectos funcionales” en el contexto de ensayos para ensayar compuestos que modulan miembros de la familia T1R que intervienen en la traducción gustativa incluye la determinación de cualquier parámetro que está directa o indirectamente bajo la influencia del receptor, por ejemplo, efectos funcionales, físicos y químicos. Esto incluye la unión a ligando, cambios en el flujo iónico, potencial de membrana, flujo de corriente, transcripción, unión a proteína G, fosforilación o desfosforilación del GPCR, señal de transducción, interacciones ligando-receptor, concentraciones del segundo mensajero (*por ejemplo*, AMPc, GMPc, IP3 o Ca²⁺ intracelular), *in vitro*, *in vivo*, y *ex vivo* y también incluye otros efectos fisiológicos que aumentan o disminuyen la liberación del neurotransmisor u hormona.

En el contexto de los ensayos por “determinación del efecto funcional” se refiere a ensayos para un compuesto que aumentan o disminuyen un parámetro que está directa o indirectamente bajo la influencia de un miembro de la familia de T1R, *por ejemplo*, efectos funcionales, físicos y químicos. Dichos efectos funcionales pueden medirse por cualquiera de los medios conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, cambios en las características espectroscópicas (*por ejemplo*, fluorescencia, absorbancia, índice refractivo), propiedades hidrodinámicas (*por ejemplo*, forma), cromatográficas o de solubilidad, pinzamiento zonal, colorantes potenciométricos, corrientes de célula entera, salida de radioisótopo, marcadores inducibles, expresión génica de T1R en oocitos; expresión de T1R en células de cultivo tisular; activación transcripcional de genes de T1R; ensayos de unión a ligando; cambios de tensión, potencial de membrana y conductancia; ensayos de flujo iónico; cambios en segundos mensajeros intracelulares tales como AMPc, GMPc y trifosfato inositol (IP3); cambios en los niveles de calcio intracelular; liberación neurotransmisora y similares.

Los términos “inhibidores”, “activadores”, y “moduladores” de genes o proteínas de T1R se usan de manera intercambiable para referirse a moléculas inhibitoras, activadoras o moduladoras identificadas usando ensayos *in vitro* e *in vivo* para la transducción gustativa, por ejemplo, ligandos, agonistas, antagonistas y sus homólogos y miméticos. Los inhibidores son compuestos que, por ejemplo, se unen a, estimulan en bloque total o parcialmente,

disminuyen, impiden, retardan la activación, inactivan, desensibilizan o regulan disminuyendo la transducción gustativa, por ejemplo, antagonistas. Los activadores son compuestos que, por ejemplo, se unen a, estimulan, aumentan, abren, activan, facilitan, potencian la activación, sensibilizan o regulan aumentando la transducción gustativa, por ejemplo, agonistas. Los moduladores incluyen compuestos que, por ejemplo, modifican la interacción de un receptor con: proteínas extracelulares que se unen a activadores o inhibidores (*por ejemplo* eberina y otros miembros de la familia portadora hidrófoba); proteínas G; quinasas (por ejemplo, homólogos de rodopsina quinasa y quinasas del receptor beta adrenérgico implicadas en la desactivación y desensibilización de un receptor); y arrestinas, que también desactivan y desensibilizan receptores. Los moduladores pueden incluir versiones modificadas genéticamente de miembros de la familia de T1R, por ejemplo, con actividad modificada, así como ligandos, antagonistas, agonistas de origen natural y sintéticos, pequeñas moléculas químicas y similares. Dichos ensayos para inhibidores y activadores incluyen, por ejemplo, la expresión de miembros de la familia de T1R en células o membranas celulares, la aplicación de supuestos compuestos moduladores en presencia o ausencia de sustancias gustativas, por ejemplo, sustancias gustativas dulces y después determinar los efectos funcionales en la transducción gustativa, como se ha descrito anteriormente. Las muestras o los ensayos que comprenden los miembros de la familia T1R que se tratan con un activador, inhibidor o modulador potencial se comparan con muestras de control sin el inhibidor, activador o modulador para examinar el grado de modulación. A las muestras de control (no tratadas con moduladores) se les asigna un valor de actividad T1R relativo del 100%. La inhibición de un T1R se consigue cuando el valor de actividad de T1R con respecto al control es de aproximadamente el 80%, opcionalmente el 50% o del 25-0%. La activación de un T1R se consigue cuando el valor de actividad de T1R con respecto al control es el 110%, opcionalmente el 150%, opcionalmente el 200-500% o superior a 1.000-3.000%.

Las expresiones “purificado”, “sustancialmente purificado”, y “aislado” como se usa en este documento se refiere al estado de estar libre de otros compuestos diferentes con los que el compuesto de la invención está normalmente asociado en su estado natural, de manera que el objeto “purificado”, “sustancialmente purificado”, y “aislado” comprende al menos el 0,5%, 1 %, 5%, 10% o 20%, y más preferiblemente al menos el 50% o el 75% de la masa, por peso, de una muestra determinada. En una realización preferida, estas expresiones se refieren al compuesto de la invención que comprende al menos el 95% de la masa, por peso, de una muestra determinada. Como se usa en este documento, las expresiones “purificado”, “sustancialmente purificado”, y “aislado”, cuando se refieren a un ácido nucleico o proteína, de ácidos nucleicos o proteínas, también se refiere a un estado de purificación o concentración diferente al que ocurre de manera natural en el mamífero, especialmente en el cuerpo humano. Cualquier grado de purificación o concentración superior al que ocurre de manera natural en el mamífero, especialmente el cuerpo humano, incluyendo (1) la purificación de otras estructuras o compuestos asociados o (2) la asociación con estructuras o compuestos con los que no se encuentra normalmente asociado en el mamífero, especialmente el cuerpo humano, se encuentra dentro del significado de “aislado”. De acuerdo con una diversidad de métodos y procesos conocidos por los expertos en la materia, el ácido nucleico o proteína o clases de ácidos nucleicos o proteínas, descritos en este documento, pueden aislarse o asociarse de otra manera con estructuras o compuestos con los que normalmente no están asociados de manera natural.

Como se usa en este documento, el término “aislado”, cuando se refiere a un ácido nucleico o polipéptido se refiere a un estado de purificación o concentración diferente al que ocurre de manera natural en el mamífero, especialmente en el cuerpo humano. Cualquier grado de purificación o concentración superior al que ocurre de manera natural en el cuerpo, incluyendo (1) la purificación de otras estructuras o compuestos asociados de origen natural o (2) la asociación con estructuras o compuestos con los que no se encuentra normalmente asociado en el cuerpo está dentro del significado de “aislado” como se usa en este documento. De acuerdo con una diversidad de métodos y procesos conocidos por los expertos en la materia, los ácidos nucleicos o polipéptidos descritos en este documento pueden aislarse o asociarse de otra manera con estructuras o compuestos con los que normalmente no están asociados de manera natural.

Como se usa en este documento, los términos “amplificar” y “amplificación” se refieren al uso de cualquier metodología de amplificación adecuada para generar o detectar ácidos nucleicos expresados de manera natural o recombinante, como se describe con detalle, a continuación. Por ejemplo, la invención proporciona métodos y reactivos (*por ejemplo*, pares de cebadores oligonucleotídicos degenerados específicos) para amplificar (*por ejemplo*, por reacción en cadena de la polimerasa, PCR) ácidos nucleicos (por ejemplo, ADNc) recombinantes o expresados de manera natural (*por ejemplo* ARNm o genómico) de la invención (*por ejemplo* secuencias de la invención de unión a sustancias gustativas) *in vivo* o *in vitro*.

La expresión “receptor 7-transmembrana” significa un polipéptido que pertenece a una superfamilia de proteínas transmembrana que tienen siete dominios que incluye siete veces la membrana plasmática (por tanto, los siete dominios se denominan dominios “transmembrana” o “TM” de TM I a TM VII). Cada una de las familias de receptores olfativos y de determinados receptores gustativos pertenece a esta superfamilia. Los polipéptidos del receptor 7-transmembrana tienen estructuras primarias secundarias y terciarias similares y características, como se describe con detalle a continuación.

El término “biblioteca” significa una preparación que es una mezcla de diferentes moléculas polipeptídicas o de ácidos nucleicos, tales como la biblioteca de dominios de unión a ligando del receptor gustativo particularmente quimiosensorial, generada por la amplificación de ácidos nucleicos con pares de cebadores degenerados o una

colección de vectores aislada que incorpora los dominios de unión a ligando amplificados o una mezcla de células transfectadas aleatoriamente cada una de ellas con al menos un vector que codifica un receptor gustativo.

La expresión “ácido nucleico” o “secuencia de ácido nucleico” se refiere a un oligonucleótido desoxirribonucleótido o ribonucleótido en forma de cadena monocatenaria o bicatenaria. El término incluye ácidos nucleicos, es decir, oligonucleótidos, que contienen análogos de nucleótidos naturales conocidos. El término también incluye estructuras similares a ácidos nucleicos con esqueletos sintéticos (véase por ejemplo, *Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach*, ed. F. Eckstein, Oxford Univ. Press (1991); *Antisense Strategic Annals of the N.Y. Academy of Sciences*, Vol. 600, Eds. Baserga *et al* (NYAS 1992) Milligan *J. Med, Chem.* 36:1923-1937 (1993); *Antisense Research and Applications* (1993, CRC Press), WO 97/03211; WO 96739154; 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 otra cosa, una secuencia particular de ácido nucleico también incluye implícitamente variantes de la misma modificada de manera conservativa (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la decencia explícitamente indicada. Específicamente, pueden conseguirse sustituciones de codones degenerados generando, por ejemplo, secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados se sustituye por restos desoxiinosina y/o bases mezcladas (Bateer *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolizn *et al.*, *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994)). El término ácido nucleico se usa de manera intercambiable con genes, ADNc, ARNm, oligonucleótidos y polinucleótidos.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan de manera intercambiable en este documento para referirse a un polímero de restos aminoacídicos. Los términos se refieren a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos aminoacídicos es un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural.

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

El “dominio de translocación”, “dominio de unión a ligando” y composiciones de receptores quiméricos como se describe en este documento también incluyen “análogos”, o “variantes conservativas” y “miméticos” (“péptido miméticos”) con estructuras y actividad que sustancialmente corresponden a las secuencias ejemplares. Por tanto, las expresiones “variante conservativa” o “análogo” o “mimético” se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos modificada, de manera que el cambio (o los cambios) no modifican sustancialmente la estructura y/o actividad del polipéptido (de las variantes conservativas), como se define en este documento. Esto incluye variaciones de una secuencia de aminoácidos modificada de manera conservativa, es decir sustituciones, adiciones o deleciones de aquellos restos aminoacídicos que no son críticos para 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 polar, etc.) de manera que las sustituciones de aminoácidos incluso críticos no modifica sustancialmente la estructura y/o la actividad.

Más particularmente, las “variantes modificadas de manera conservativa” se aplican tanto a las secuencias de aminoácidos como a las de los ácidos nucleicos. Con respecto a las secuencias de ácido nucleico en particular, las variantes modificadas de manera conservativa se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en las que el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, para secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína determinada.

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

Dichas variaciones de los ácidos nucleicos son “variaciones silenciosas”, que son una especie de variaciones modificadas de manera conservativa. En este documento cada secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto en la materia reconocerá que en un ácido nucleico cada codon (excepto AUG, que generalmente es el único codon para la

metionina y TGG, que generalmente es el único codon para el triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

5 En la técnica se conocen bien las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos de funcionalidad similar. Por ejemplo, una directriz ejemplar para seleccionar sustituciones conservativas incluye (restos originales seguido de sustituciones ejemplares): ala/gly o ser, arg/lys; asn/gln o his; asp/glu; cys/ser; gln/asn; gly/asp; gly/ala o pro; his/asn o gln; ile/leu o val; leu/ile o val; lys/arg o gln o glu; met/leu o tyr o ile; phe/met o leu o tyr; ser/thr; thr/ser; trp/tyr; tyr/trp o phe; val/ile o leu. Una directriz ejemplar alternativa usa los seis grupos siguientes, conteniendo cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas con respecto al otro: 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); 10 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 and Schimer, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag (1979)). Un experto en la materia apreciará que las sustituciones indicadas anteriormente no son las sustituciones conservativas únicamente posibles. Por ejemplo, para algunos propósitos, se puede considerar a todos los aminoácidos cargados como sustituciones conservativas para los demás tanto si son positivos como negativos. Además, las sustituciones, deleciones o adiciones individuales que modifican, añaden o eliminan un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en una secuencia codificada también pueden considerarse “variaciones modificadas de manera conservativa”.

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

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

50 Un “marcador” o un “resto detectable” es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen ³²P, colorantes fluorescentes, reactivos de densidad electrónica, enzimas (*por ejemplo*, como las comúnmente usadas en un ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos y proteínas que pueden hacerse detectables, *por ejemplo*, incorporando una radiomarca en el polipéptido o usarse para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el péptido.

55 Un “oligonucleótido o sonda de ácidos nucleicos marcado” es uno que se une, de manera covalente, mediante un conector o un enlace químico, o de manera no covalente, mediante enlaces iónicos, van der Waals, electrostáticos o hidrógeno a una etiqueta de manera que la presencia de la sonda puede detectarse detectando la presencia del marcador unido a la sonda.

60 Como se usa en este documento un “oligonucleótido o sonda de ácidos nucleicos” se define como un ácido nucleico capaz de unirse a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria mediante uno o más tipos de enlaces químicos, normalmente mediante pares de bases complementarias, normalmente mediante la formación de enlaces de hidrógeno. Como se usa en este documento, una sonda puede incluir bases naturales (es decir, A, G, C o T) o modificadas (7-deazaguanosina, inosina, etc.). Además, en una sonda las bases pueden unirse mediante un enlace distinto a un enlace fosfodiéster, siempre que no interfiera con la hibridación. Por tanto, por ejemplo, las sondas pueden ser ácidos nucleicos peptídicos en los que las bases constituyentes están unidas por enlaces peptídicos en

lugar de por enlaces fosfodiéster. Un experto en la técnica entenderá que las sondas pueden unirse a secuencias diana que carecen de complementariedad completa con la secuencia de la sonda dependiendo de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Las sondas opcionalmente se marcan directamente con isótopos, cromóforos, luminóforos, cromógenos o se marcan indirectamente tal como con biotina a la cual posteriormente puede unirse un complejo de estreptavidina. Ensayando la presencia o la ausencia de la sonda, se puede detectar la presencia o ausencia de la secuencia o subsecuencia seleccionada.

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

Un “promotor” se define como un conjunto de secuencias de ácido nucleico que dirigen la transcripción del ácido nucleico. Como se usa en este documento, un promotor incluye secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tales como, en el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos represores o potenciadores distales, que pueden situarse tanto como a varios miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción. Un promotor “constitutivo” es un promotor que es activo en la mayoría de las condiciones ambientales y de desarrollo. Un promotor “inducible” es un promotor que es activo bajo regulación ambiental o de desarrollo. La expresión “unido operativamente” se refiere a una unión funcional entre una secuencia de control de expresión de un ácido nucleico (tal como un promotor o conjunto de sitios de unión al factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en el que la secuencia de control de expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

Como se usa en este documento, “recombinante” se refiere a un polinucleótido sintetizado o de otra manera manipulado *in vitro* (por ejemplo “polinucleótido recombinante”), a métodos de uso de polinucleótidos recombinantes para producir productos génicos en células u otros sistemas biológicos, o a un polipéptido (“proteína recombinante”) codificado por un polinucleótido recombinante. Los “medios recombinantes” también incluyen el ligamiento de ácidos nucleicos que tienen diversas regiones codificantes o dominios o secuencias promotoras de diferentes fuentes en un casete o vector de expresión para la expresión de, por ejemplo, la expresión inducible o constitutiva de una proteína de fusión que comprende un dominio de translocación de la invención y una secuencia de ácidos nucleicos amplificada usando un cebador de la invención.

La frase “se hibrida selectivamente (o específicamente) a” se refiere a la unión, duplexado o hibridación de una molécula únicamente a una secuencia de nucleótidos particular en condiciones rigurosas de hibridación cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, ADN o ARN celular total o biblioteca).

La frase “condiciones rigurosas de hibridación” se refiere a condiciones en las que una sonda hibridará con su secuencia diana, típicamente en una mezcla compleja de ácido nucleico pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas elevadas. En Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridisation with Nucleic Probes, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993), se encuentra una guía exhaustiva sobre hibridación de ácidos nucleicos. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser de aproximadamente 5-10°C inferiores al punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definida. El T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos) en la que el 50% de las sondas complementarias a la diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio (ya que, a T_m , están presentes secuencias diana en exceso, el 50% de las sondas se ocupan en equilibrio). Las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor de aproximadamente 1,0 M de ión sodio, típicamente aproximadamente de 0,01 a 1,0 M de concentración de ión sodio (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente de 30°C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, superiores a 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también pueden conseguirse con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces el fondo, opcionalmente 10 veces el fondo de hibridación. Las condiciones de hibridación rigurosas ejemplares pueden ser las siguientes: formamida al 50%, SSC 5x y SDS al 1%, incubando a 42°C, o, SSC 5x, SDS al 1%, incubando a 65°C, con lavado en SSC 0,2x y SDS al 0,1% a 65°C. Dichas hibridaciones y etapas de lavado pueden realizarse durante, por ejemplo, 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 minutos o más.

Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí en condiciones rigurosas se encuentran aún sustancialmente relacionados si los polipéptidos que los codifican se encuentran sustancialmente relacionados. Esto se produce, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la degeneración máxima de codones permitida por el código genético. En dichos casos, los ácidos nucleicos típicamente se hibridan en condiciones de hibridación moderadamente rigurosas. Las “condiciones de hibridación moderadamente rigurosas” ejemplares incluyen una hibridación en un tampón de formamida al 40%, NaCl 1 M, SDS 1% a 37°C y un lavado en SSC 1X a 45°. Dichas

etapas de hibridación y de lavado pueden realizarse, por ejemplo, durante 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60, minutos o más. Una hibridación positiva es al menos el doble del nivel de fondo. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente que para proporcionar condiciones de rigurosidad similares pueden utilizarse condiciones de hibridación y lavado alternativas.

5 “Anticuerpo” se refiere a un polipéptido que comprende una región flanqueante de un gen o de inmunoglobulina o fragmentos del mismo que se une y reconoce específicamente a un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen genes de la región constante de kappa, lambda, alfa, gama, delta, épsilon y mu, así como los miles de genes de la región variable de la inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda.
10 Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

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

20 Un “anticuerpo quimérico” es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una parte de la misma, se modifica, se sustituye o se intercambia de manera que el sitio de unión al antígeno (región variable) está unido a una región constante de una clase diferente o modificada, especie y/o función efectora o una molécula totalmente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una parte de la misma, se modifica, se sustituye o se intercambia por una región variable que tiene una especificidad antigénica modificada o diferente.
25

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

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

35 La frase “se une específicamente (o selectivamente)” a un anticuerpo o, “específicamente (o selectivamente) inmunoreactivo con”, cuando se refiere a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que determina la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas u otros agentes biológicos. Por tanto, en las condiciones de inmunoensayo indicadas, los anticuerpos específicos se unen a una proteína particular al menos dos veces el fondo y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo en dichas condiciones puede necesitar que se seleccione un anticuerpo para
40 determinar su especificidad para una proteína en particular. Por ejemplo, pueden seleccionarse anticuerpos policlonales provocados para un miembro de la familia de T1R a partir de especies específicas tales como rata, ratón o ser humano para obtener únicamente aquellos anticuerpos policlonales que inmunoreaccionen específicamente con el polipéptido T1R o una parte inmunogénica del mismo y no con otras proteínas, excepto para ortólogos o variantes polimórficas y alelos del polipéptido T1R. Esta selección puede conseguirse sustrayendo anticuerpos que reaccionan en cruzado con moléculas T1R de otras especies u otras moléculas T1R. Los anticuerpos también
45 pueden seleccionarse para que reconozcan únicamente los miembros de la familia GPCR de T1R pero no a los GPCR de otras familias. Puede usarse una diversidad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos que inmunoreaccionen específicamente con una proteína en particular. Por ejemplo, rutinariamente se usan inmunoensayos ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos que inmunoreaccionan específicamente con una
50 proteína (véase, por ejemplo., Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, (1988), para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que pueden usarse para determinar la inmunoreactividad específica). Típicamente una reacción específica o selectiva será al menos dos veces la señal o interferencia de fondo y más típicamente más de 10 a 100 veces el fondo.

55 La frase “se asocia selectivamente con” se refiere a la capacidad de un ácido nucleico para “hibridarse de manera selectiva” con otro como se define anteriormente, o la capacidad de un anticuerpo para “unirse selectivamente (o específicamente)” a una proteína, como se define anteriormente.

60 La expresión “vector de expresión” se refiere a cualquier sistema de expresión recombinante con el propósito 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 procariontas, levaduras, hongos, plantas, insectos o mamíferos. El término incluye sistemas de expresión lineal o circular. El término incluye sistemas de expresión que permanecen episomales o se integran en el genoma de la célula. Los sistemas de expresión pueden tener la capacidad de auto replicarse o no, es decir, conducir únicamente la expresión transitoria en una célula. El término incluye “casetes” de expresión
65 recombinante” que contienen únicamente los elementos mínimos necesarios para la transcripción del ácido nucleico recombinante.

Por "célula hospedadora" se refiere a una célula que contiene un vector de expresión y da soporte a la replicación o expresión del vector de expresión. Las células hospedadoras pueden ser células procariotas, tales como *E. coli* o células eucariotas tales como células de levadura, de insectos, de anfibios, o células de mamíferos tales como células CHO, HeLa, HEK-293 y similares, por ejemplo, células cultivadas, explantes.

C. Aislamiento y Expresión de Polipéptidos T1R

El aislamiento y expresión de los T1R, o fragmentos o variantes de los mismos de la invención pueden realizarse como se describe a continuación. Para la amplificación de ácidos nucleicos que codifican regiones de unión a ligando del receptor gustativo pueden usarse cebadores de PCR y opcionalmente pueden generarse genotecas de estos ácidos nucleicos. Después pueden usarse vectores de expresión individuales o genotecas de vectores de expresión para infectar o transfectar células hospedadoras para la expresión funcional de estos ácidos nucleicos o genotecas. Estos genes y vectores pueden prepararse y expresarse *in vitro* o *in vivo*. Un experto en la materia reconocerá que pueden obtenerse fenotipos deseados para modificar y controlar la expresión de los ácidos nucleicos modulando la expresión o actividad de los genes y ácidos nucleicos (por ejemplo, promotores, potenciadores y similares) en los vectores de la invención. Puede usarse cualquiera de los métodos conocidos descritos para aumentar o disminuir la expresión o la actividad. La invención puede llevarse a la práctica junto con cualquier método o protocolo conocido en la técnica, que se describa bien en la bibliografía científica y de patentes.

Las secuencias de ácidos nucleicos de la invención y otros ácidos nucleicos usados para llevar a la práctica esta invención, ya sea ARN, ADNc, ADN genómico, vectores, virus o híbridos de los mismos, pueden aislarse de una diversidad de fuentes, modificarse por ingeniería genética, amplificarse y/o expresarse de manera recombinante. Puede usarse cualquier sistema de expresión recombinante, incluyendo, además de células de mamíferos, por ejemplo, bacterias, levaduras, insectos o sistemas vegetales.

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

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

Los ácidos nucleicos, vectores, cápsides, polipéptidos y similares pueden analizarse y cuantificarse por cualquiera de los diversos medios generales bien conocidos por los expertos en la materia. Estos incluyen, por ejemplo, métodos bioquímicos analíticos tales como NMR, espectrofotometría, radiografía, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía por hiperdifusión, diversos métodos inmunológicos, por ejemplo, reacciones de precipitinas en gel o en líquido, inmunodifusión, inmunoelectroforesis, radioinmunoensayos (RIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos inmuno-fluorescentes, análisis de Southern, análisis de Northern, análisis de transferencia en mancha, electroforesis en gel (por ejemplo, SDS-PAGE), RT-PCR, PCR cuantitativa, otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos o dianas o señales, radiomarcaje, recuento por centelleo y cromatografía de afinidad.

Pueden usarse cebadores de oligonucleótidos para amplificar fragmentos de ácidos nucleicos que codifican regiones de unión a ligando del receptor gustativo. Los ácidos nucleicos descritos en este documento también pueden clonarse o medirse cuantitativamente usando técnicas de amplificación. Los métodos de amplificación se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, ensayos de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa, PCR (*PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*, ed. Innis. Academia Press, N.Y. (1990) y *Strategies PCR*, ed. Innis, Academic Press, Inc., N.Y. (1995), reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase por ejemplo, Wu, *Genomics* 4:560 (1989); Landegren, *Science* 241:1077 (1988); Barringer, *Gene* 89:117 (1990)); amplificación mediante transcripción (véase, por ejemplo, Kwok, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173 (1989)); y replicación de secuencia auto sostenida (véase, por ejemplo, Guatelli, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874 (1990)); amplificación de la replicasa Q Beta (véase, por ejemplo, Smith, *J. Clin. Microbiol.* 35:1477-1491 (1997)); ensayo de la replicasa Q-beta automatizado (véase, por ejemplo, Burg, *Mol. Cell Probes* 10:257-271 (1996)) y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario); véase también Berger, *Methods Enzymol* 152: 307-316 (1987); Sambrook; Ausubel; y las Patentes de Estados Unidos N° 4.683.195 y 4.683.202; Sookninan,

Biotechnology 13: 563-564 (1995). Los cebadores pueden diseñarse para conservar la secuencia original del receptor 7-transmembrana "donante". De manera alternativa, los cebadores pueden codificar restos aminoacídicos que son sustituciones conservativas (por ejemplo, restos hidrófobos para hidrófobos, véase el argumento anterior) o sustituciones benignas funcionales (por ejemplo no impiden la inserción en la membrana plasmática, ni causan la escisión por peptidasas, ni causan plegamiento anómalo del receptor y similares). Una vez amplificados, los ácidos nucleicos tanto individuales como genotecas, pueden clonarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, si se desea, en cualquiera de una diversidad de vectores usando métodos biológicos moleculares rutinarios; en la Patente de Estados Unidos N° 5.426.039 se describen, por ejemplo, métodos para la clonación *in vitro* de ácidos nucleicos amplificados.

Los pares de cebadores pueden diseñarse para amplificar selectivamente regiones de unión a ligando de los miembros de la familia de T1R. Estas regiones pueden variar para diferentes ligandos o sustancias gustativas. Por tanto, lo que puede ser una región de unión mínima para una sustancia gustativa puede ser demasiado restrictiva para una segunda sustancia gustativa. Por consiguiente, pueden amplificarse regiones de unión a ligando de diferentes tamaños que comprenden diferentes estructuras de dominio extracelulares.

En la técnica se conocen bien paradigmas para diseñar pares de cebadores degenerados. Por ejemplo, está disponible un programa informático de estrategia (CODEHOP) Cebador Oligonucleotídico Híbrido DEgenerado COnsenso como <http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>, y que está directamente vinculado con el sitio de alineamiento de secuencias múltiples BlockMaker para predecir el cebador híbrido comenzando con una serie de secuencias de proteínas relacionadas, como las regiones de unión a ligando de receptores gustativos conocidos (véase, por ejemplo, Rose, *Nucleic Acids Res.* 26:1628-1635 (1998); Singh, *Biotechniques* 24:318-319 (1998)).

En la técnica se conocen medios para sinterizar pares de cebadores oligonucleotídicos. Pueden usarse pares de bases "naturales" o sintéticos. Por ejemplo, el uso de nucleobases artificiales ofrece un enfoque versátil para manipular secuencias de cebadores y generar una mezcla más compleja de productos de amplificación. Diversas familias de nucleobases artificiales son capaces de adoptar orientaciones de enlaces de hidrógeno múltiples mediante rotaciones de enlaces internos para proporcionar medios de reconocimiento moleculares degenerados. La incorporación de estos análogos en una sola posición de un cebador PCR permite la generación de una genoteca compleja de productos de amplificación. Véase, por ejemplo, Hoops, *Nucleic Acids Res.* 25: 4866-4871 (1997). También pueden usarse moléculas no polares para mimetizar la forma de las bases naturales del ADN. Una forma de enlace no hidrógeno que imita a la adenina puede replicarse de manera eficaz y selectiva frente a una forma no polar que imita 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]oxaizina-7-ona o la base de purina N6-metoxi-2,6-diaminopurina (véase, por ejemplo, Hill, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:4258-4263 (1998)). Los cebadores degenerados ejemplares de la invención incorporan el análogo nucleobase 5'-Dimetoxitritil-N-benzoil-2'-desoxi-Citidina,3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (para la expresión "P" en las secuencias, véase anteriormente). Estos enlaces de hidrógeno análogos a la pirimidina con purinas incluyen restos A y G.

Las variantes polimórficas, alelos y homólogos interespecie que son sustancialmente idénticos a un receptor gustativo descrito en este documento pueden aislarse usando las sondas de ácidos nucleicos descritas anteriormente. De manera alternativa, para clonar polipéptidos de T1R y variantes polimórficas, alelos y homólogos interespecie de los mismos pueden usarse genotecas de expresión mediante la detección de homólogos expresados inmunológicamente con antisuero o anticuerpos purificados preparados contra un polipéptido de T1R, que también reconoce y se une selectivamente al homólogo de T1R.

Los ácidos nucleicos que codifican regiones de unión a ligando de receptores gustativos pueden generarse por amplificación (por ejemplo, PCR) de secuencias de ácidos nucleicos apropiadas usando pares de cebadores degenerados. El ácido nucleico amplificado puede ser ADN genómico de cualquier célula o tejido o ARNm o ADNc procedente de células que expresan el receptor gustativo.

En una realización, pueden construirse secuencias codificantes de proteínas híbridas que comprenden ácidos nucleicos que codifican los T1R fusionados a secuencias de translocación. También se proporcionan T1R híbridos que comprenden los motivos de translocación y dominios de unión a sustancias gustativas de otras familias de receptores quimiosensoriales, particularmente receptores gustativos. Estas secuencias de ácidos nucleicos pueden unirse operativamente a elementos de control transcripcionales o traduccionales, por ejemplo, secuencias de iniciación de la transcripción y traducción, promotoras y potenciadoras, secuencias de terminación de la transcripción y traducción, secuencias de poliadenilación y otras secuencias útiles para la transcripción del ADN en ARN. En la construcción de casetes, vectores y transgénicos de expresión recombinante 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- o N-terminales. Adicionalmente, las proteínas de fusión pueden comprender elementos adicionales, por ejemplo, para la detección, purificación de proteínas u otras aplicaciones. Los dominios que facilitan la detección y purificación incluyen, por ejemplo, péptidos quelantes metálicos tales como colas de polihistidina, módulos de histidina-triptófano u otros dominios que permiten la purificación en metales inmovilizados; proteínas de unión a maltosa; dominios de proteína

A que permiten la purificación en inmunoglobulinas inmovilizadas; o el dominio utilizado en el sistema de purificación por afinidad /extensión con FLAGS (Immunex Corp, Seattle WA).

La inclusión de secuencias conectoras de escisión tales como el Factor Xa (véase, por ejemplo, Ottavi, *Biochimie* 80: 289-293 (1998)), el motivo de reconocimiento de subtilina proteasa (véase, por ejemplo, Polyak, *Protein Eng.* 10:615-619 (1997)); enteroquinasa (Invitrogen, San Diego, CA), y similares, entre el dominio de translocación (para la expresión eficaz en la membrana plasmática) y el resto del polipéptido recién traducido puede ser útil para facilitar la purificación. Por ejemplo, una construcción puede incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido unida a seis restos de histidina seguido por una tiorredoxina, un sitio de escisión enteroquinasa (véase, por ejemplo, Williams, *Biochemistry* 34:1797-1797 (1995)), y un dominio de translocación C-terminal. Los restos de histidina posibilitan la detección y purificación mientras que el sitio de escisión enteroquinasa proporciona un medio para purificar la proteína (o proteínas) deseada del resto de la proteína de fusión. En la bibliografía científica y de patentes, véase, por ejemplo, Kroll, *DNA Cell. Biol.* 12: 441-53 (1993) se describe bien la tecnología perteneciente a vectores que codifican proteínas de fusión y la aplicación de proteínas de fusión.

Los vectores de expresión, tanto vectores de expresión individuales como bibliotecas de vectores de expresión, que comprenden el dominio de unión a ligando que codifica secuencias pueden introducirse en un genoma o en el citoplasma o un núcleo de una célula y expresarse mediante una diversidad de técnicas convencionales, bien descritas en la literatura científica y de patentes. Véase, por ejemplo, Roberts, *Nature* 328:731 (1987); Berger *supra*; Schneider, *Protein Expr. Purif.* 6435:10 (1995); Sambrook; Tijssen; Ausubel. Con respecto a métodos biológicos conocidos, la información de los productos de los fabricantes de reactivos biológicos y equipo experimental también proporciona información. Los vectores pueden aislarse de fuentes naturales, obtenidas de fuentes tales como bibliotecas de la ATCC o del GenBank, o prepararse por métodos sintéticos o recombinantes.

Los ácidos nucleicos pueden expresarse en casetes y vectores o virus de expresión, que se expresan en las células de manera estable o transitoria (por ejemplo, sistemas de expresión episomal). Pueden incorporarse marcadores de selección en los casetes y vectores de expresión para conferir un fenotipo seleccionable en células y secuencias transformadas. Por ejemplo, los marcadores de selección pueden codificar el mantenimiento y replicación episomal de manera que no es necesaria la integración en el genoma hospedador. Por ejemplo, el marcador puede codificar resistencia a antibióticos (por ejemplo, cloranfenicol, kanamicina, G18, bleomicina, higromicina) o resistencia a herbicidas (por ejemplo, clorosulfuron o Basta) para permitir la selección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN que se desea (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 de selección confieren resistencia a sustratos de tipo neomicina o higromicina solamente pueden utilizarse en cultivos de tejido, también pueden usarse genes quimioresistentes como marcadores de selección *in vitro* e *in vivo*.

Una secuencia quimérica de ácido nucleico puede codificar un dominio de unión a ligando de T1R dentro de cualquier polipéptido 7-transmembrana. Como los polipéptidos del receptor 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 fácilmente mediante análisis de secuencia. Por ejemplo, el modelado por homología, el análisis de Fourier y la detección de la periodicidad helicoidal pueden identificar y caracterizar los siete dominios con una secuencia del receptor 7-transmembrana. Pueden usarse algoritmos de Transformación Rápida de Fourier (FFT) para evaluar los periodos dominantes que caracterizan perfiles de la hidrofobicidad y variabilidad de las secuencias analizadas. El aumento de detección de periodicidad y el índice de periodicidad helicoidal alpha se puede hacer por, por ejemplo, Donnelly, *Protein Sci.* 2:55-70 (1993). En la técnica se conocen bien otros algoritmos de alineamiento y modelado, véase, por ejemplo, Peitsch, *Receptors Channels*: 4:161-164 (1996); Kyte & Doolittle, *J. Md. Bio.*, 157:105-135 (1982); Cronet, *Protein Eng.* 6:59-64 (1993) (homology and "discover modeling"); <http://bioinfo.weizmann.ac.il/>.

La presente descripción también incluye no solamente el ADN y las proteínas que tienen las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos específicas, sino también fragmentos de ADN, particularmente fragmentos de, por ejemplo, 40, 60, 80, 100, 150, 200, ó 250 nucleótidos, o más, así como fragmentos de proteínas de, por ejemplo, 10, 20, 30, 50, 70, 10, ó 150 aminoácidos, o más. Opcionalmente, los fragmentos de ácido nucleico pueden codificar un polipéptido antigénico que puede unirse a un anticuerpo provocado contra un miembro de la familia de T1R. Adicionalmente, un fragmento de proteína puede ser opcionalmente un fragmento antigénico que puede unirse a un anticuerpo provocado contra un miembro de la familia de 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 este documento, acoplados a aminoácidos adicionales que representan todo o parte de otro GPCR, preferiblemente un miembro de la superfamilia 7 transmembrana. Estas quimeras pueden prepararse de los presentes receptores y otro GPCR, o pueden prepararse combinando dos o más de los presentes receptores. En una realización, una parte de la quimera corresponde a, o procede del dominio extracelular de un polipéptido de T1R de la invención. En otra realización, una parte de la quimera corresponde a, o procede del dominio extracelular y uno o más de los dominios transmembrana de un polipéptido de T1R descrito en este documento, y la parte o partes restantes pueden proceder de otro GPCR. En la técnica se conocen bien los receptores quiméricos y también se conocen bien las técnicas para crearlos y la

selección y límites de dominios o fragmentos de receptores acoplados a proteína G para incorporarlos en su interior. Por tanto, este conocimiento de los expertos en la materia puede usarse fácilmente para crear dichos receptores quiméricos. El uso de dichos receptores quiméricos puede proporcionar, por ejemplo, una selección gustativa característica de uno de los receptores especialmente descrito en este documento, acoplado con la transducción de señal característica de otro receptor, tal como un receptor bien conocido usado en sistemas de ensayo de la técnica anterior.

Por ejemplo, un dominio tal como un dominio de unión a ligando, un dominio extracelular, un dominio transmembrana, un dominio citoplasmático, un dominio N-terminal, un dominio C-terminal o cualquier combinación de los mismos, 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. Otras proteínas heterólogas de elección pueden incluir, por ejemplo, proteína verde fluorescente, β -gal, receptor de glutamato, y la presecuencia de rodopsina.

También se describen células hospedadoras para la expresión de los T1R, o variantes. Para obtener niveles de expresión elevados de un gen o ácido nucleico clonado, tal como los ADNc que codifican los T1R, o variantes, un especialista típicamente subclona la secuencia de ácido nucleico de interés en un vector de expresión que contiene un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un terminador de la transcripción/traducción, y para un ácido nucleico que codifica una proteína, un sitio de unión al ribosoma para iniciar la traducción. En la técnica se conocen bien promotores bacterianos adecuados y se describen, *por ejemplo*, en Sambrook *et al.* Sin embargo, pueden usarse sistemas de expresión eucariotas o bacterianos.

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

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

D. Detección de polipéptidos de T1R

Además de la detección de genes de T1R y expresión de genes usando tecnología de hibridación de ácidos nucleicos, también pueden usarse inmunoensayos para detectar los T1R, por ejemplo, para identificar células receptoras gustativas y variantes de los miembros de la familia de T1R. Pueden usarse inmunoensayos para analizar cuantitativamente o cualitativamente los TR1. Una visión de conjunto de la tecnología que puede aplicarse puede encontrarse en Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988).

1. Anticuerpos para miembros de la familia de T1R

Los expertos en la materia conocen métodos de producción de anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan específicamente con un miembro de la familia de T1R (*véase*, por ejemplo, Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow & Lane, *anteriormente*; Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2d ed. 1986); y Kohler & Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975)). Dichas técnicas incluyen la preparación de anticuerpos por selección de anticuerpos de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, así como la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales inmunizando conejos o ratones (*véase*, por ejemplo, Huse *et al.*, *Science*, 246:1275-1281 (1989); Ward *et al.* *Nature*, 341:544-546 (1989)).

Pueden usarse varios inmunógenos que comprenden T1R para producir anticuerpos reactivos específicamente con un miembro de la familia de T1R. Por ejemplo, un polipéptido de T1R recombinante, o un fragmento antigénico del mismo, puede aislarse como se ha descrito en este documento. Las regiones antigénicas adecuadas incluyen, *por ejemplo*, las secuencias consenso que se usan para identificar miembros de la familia de T1R. Las proteínas recombinantes pueden expresarse en celular eucariotas o procariotas como se ha descrito anteriormente, y purificarse como se ha descrito anteriormente en general. La proteína recombinante es el inmunógeno preferido para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales. Como alternativa, puede usarse un inmunógeno un péptido sintético procedente de las secuencias descritas en este documento y conjugarse con una proteína transportadora. Las proteínas de origen natural también pueden usarse tanto en forma pura como impura. El producto se inyecta luego en un animal que puede producir anticuerpos. Pueden generarse anticuerpos monoclonales o policlonales, para usar posteriormente en inmunoensayos para cuantificar la proteína.

Los expertos en la materia conocen métodos de producción de anticuerpos policlonales. Por ejemplo, una cepa endogámica de ratones o conejos se inmuniza con la proteína usando un adyuvante convencional, tal como adyuvante de Freund, y un protocolo de inmunización convencional. La respuesta inmune del animal frente a la preparación inmunógena se controla tomando extracciones de sangre de ensayo y determinando el título de la reactividad para el T1R. Cuando se obtienen apropiadamente títulos elevados de anticuerpo para el inmunógeno, se extrae la sangre del animal y se prepara antisuero. Si se desea se puede hacer un fraccionamiento adicional del antisuero para enriquecer la reactividad de los anticuerpos para la proteína (véase Harlow & Lane, *anteriormente*).

Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse mediante diversas técnicas familiares para los expertos en la técnica. En resumen, pueden inmortalizarse células esplénicas de un animal inmunizado con un antígeno deseado, comúnmente por fusión con una celular de mieloma (véase Kohler & Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519 (1976)). Los métodos alternativos de inmortalización incluyen la transformación con Virus de Epstein Barr, oncogenes o retrovirus, u otros métodos bien conocidos en la técnica. Las colonias que proceden de células inmortalizadas sencillas se exploran para la producción de anticuerpos de especificidad y afinidad deseada para el antígeno, y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producido por dichas células puede potenciarse mediante diversas técnicas, incluyendo la inyección en la cavidad peritoneal de un hospedador vertebrado. Como alternativa, pueden aislarse secuencias de ADN que codifican un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión del mismo mediante la exploración de una genoteca de ADN de células B humanas de acuerdo con el protocolo general descrito 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 inmunógena en un inmunoensayo, por ejemplo, un inmunoensayo en fase sólida con el inmunógeno inmovilizado en un soporte sólido. Típicamente, el antisuero policlonal con una titulación de 104 o superior se selecciona y se ensaya para su reactividad cruzada frente a polipéptidos no T1R, o incluso con otros miembros de la familia de T1R u otras proteínas relacionadas de otros organismos, usando un inmunoensayo de unión competitivo. El antisuero policlonal específico y los anticuerpos monoclonales habitualmente se unirán con una Kd de al menos aproximadamente 0,1 mM, más habitualmente al menos aproximadamente 1 pM, opcionalmente al menos aproximadamente 0,1 pM o mejor, y opcionalmente 0,01 pM o mejor.

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

2. Ensayos de unión inmunológicos

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

Con frecuencia los inmunoensayos también usan un agente de marcaje que se une específicamente a y marcan el complejo formado por el anticuerpo y el antígeno. El agente de marcaje puede ser por sí mismo uno de los restos que comprenden el complejo anticuerpo/antígeno. Por tanto, el agente de marcaje puede ser un polipéptido de T1R marcado o un anticuerpo anti-T1R marcado. Como alternativa, el agente de marcaje puede ser un tercer resto, tal como un anticuerpo secundario, que se une específicamente al complejo anticuerpo/T1R (un anticuerpo secundario es típicamente específico para anticuerpos de las especies de las que procede el primer anticuerpo). Otras proteínas que pueden unirse específicamente a regiones constantes de inmunoglobulina, tales como proteína A o proteína G también pueden usarse como agentes de marcaje. Estas proteínas muestran una fuerte reactividad no inmunogénica con regiones constantes de inmunoglobulina 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 de marcaje puede modificarse con un resto detectable, tal como biotina, al que puede unirse específicamente otra molécula, tal como estreptavidina. En la técnica los expertos en la materia conocen una diversidad de restos detectables.

En el transcurso de los ensayos, pueden necesitarse etapas de incubación y/o de 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 del ensayo, antígeno, volumen de la solución, concentraciones, y similar. Habitualmente, los ensayos se llevarán a cabo a temperatura ambiente, aunque pueden realizarse en un intervalo de temperaturas, tal como de 10 °C a 40 °C.

a. Formatos de ensayo no-competitivo

Los inmunoensayos para detectar un polipéptido de T1R en una muestra, pueden ser competitivos y no competitivos. Los inmunoensayos no competitivos son ensayos en los que la cantidad de antígeno se mide directamente. En un ensayo de tipo "sándwich" preferido, por ejemplo, los anticuerpos anti-T1R pueden unirse directamente a un sustrato sólido sobre el que se encuentran inmovilizados. Estos anticuerpos inmovilizados capturan luego el polipéptido de T1R presente en una muestra de ensayo. El polipéptido de T1R inmovilizado de esta manera se une después mediante un agente de marcaje, tal como un segundo anticuerpo de T1R que lleva una etiqueta. Como alternativa, el segundo anticuerpo puede no estar marcado, pero a su vez, puede unirse por un tercer anticuerpo marcado específico para anticuerpos de la especie de la que procede el segundo anticuerpo. El segundo o tercer anticuerpo se modifica típicamente 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 ensayos competitivos

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

Otro ensayo competitivo preferido es el ensayo de inhibición con haptenos. En este ensayo el polipéptido de T1R conocido se inmoviliza en un sustrato sólido. A la muestra se le añade una cantidad conocida de anticuerpo anti-T1R y después la muestra se pone en contacto con el T1R inmovilizado. La cantidad de anticuerpo anti-T1R unida 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 solución. La detección puede ser directa cuando se marca el anticuerpo o indirecta añadiendo posteriormente un resto marcado que se une específicamente al anticuerpo como se ha descrito anteriormente.

c. Determinaciones de reactividad cruzada

También pueden usarse inmunoensayos en el formato de unión competitiva para determinaciones de reactividad cruzada. Por ejemplo, una proteína codificada, al menos parcialmente, por las secuencias de ácido nucleico descritas en este documento puede inmovilizarse en un soporte sólido. Las proteínas (por ejemplo, polipéptidos de T1R y homólogos) se añaden al ensayo que compite por la unión del antisuero para el 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 ácido nucleico descritas en este documento para competir con el mismo. El porcentaje de reactividad-cruzada para las proteínas anteriores se calcula, usando cálculos convencionales. Los antisueros con menos del 10% de reactividad cruzada con cada una de las proteínas añadidas enumeradas anteriormente se seleccionan y se agrupan. Los anticuerpos de reacción cruzada se eliminan opcionalmente del antisuero agrupado por inmuoabsorción con las proteínas consideradas añadidas, por ejemplo, homólogos relacionados vagamente. Además, en determinaciones de reactividad cruzada pueden usarse péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos que representan motivos conservados que se usan para identificar miembros de la familia de T1R.

El antisuero inmuoabsorbido y agrupado se usa después en un inmunoensayo de unión competitiva como se ha descrito anteriormente para comparar una segunda proteína, que se piensa que tal vez es un alelo o variante polimórfica de un miembro de la familia de T1R, para la proteína inmunógena (es decir, polipéptido de T1R codificado por las secuencias de ácido nucleico descritas en este documento). Para hacer esta comparación, cada una de las dos proteínas se ensaya en un amplio intervalo de concentraciones y se determina la cantidad de cada proteína necesaria para inhibir el 50% de la unión del antisuero a la proteína inmovilizada. Si la cantidad de la segunda proteína necesaria para inhibir el 50% de la unión 10 veces menor que la cantidad de la proteína codificada por secuencias de ácido nucleico descritas en este documento necesaria para inhibir al 50% de la unión, entonces la segunda proteína se dice que se une específicamente a los anticuerpos policlonales generados para un inmunógeno de T1R.

Los anticuerpos provocados frente a motivos conservados de T1R también pueden usarse para preparar anticuerpos que se unen específicamente únicamente a los GPCR de la familia de T1R, pero no a los GPCR de otras familias.

Los anticuerpos policlonales que se unen específicamente a un miembro particular de la familia de T1R pueden prepararse sustrayendo anticuerpos de reactividad cruzada usando otros medios de la familia de T1R. De manera similar, pueden prepararse anticuerpos policlonales específicos de especie. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos específicos para T1R1 humano sustrayendo anticuerpos presentan reactividad cruzada con secuencias ortólogas, por ejemplo, T1R1 de rata o T1R1 de ratón.

d. Otros formatos de ensayo

Los análisis de transferencia de Western (inmunotransferencia) se usan para detectar y cuantificar la presencia del polipéptido de T1R en la muestra. La técnica generalmente comprende separar proteínas de la muestra por 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 nylon, o filtros derivatizados de nylon), e incubar la muestra con el anticuerpo que se unen específicamente al polipéptido de T1R. Los anticuerpos del polipéptido anti-T1R se unen específicamente al polipéptido de T1R en el soporte sólido. Estos anticuerpos pueden marcarse directamente o de manera alternativa pueden detectarse posteriormente usando anticuerpos marcados (por ejemplo, anticuerpos de oveja anti-ratón marcados) que se unen específicamente a los anticuerpos anti-T1R.

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

e. Reducción de unión no específica

Un experto en la materia apreciará que a menudo es deseable minimizar la unión no específica en inmunoensayos. Particularmente, cuando el inmunoensayo implica un antígeno o anticuerpo inmovilizado en un sustrato sólido es deseable minimizar la cantidad de unión no específica al sustrato. Los expertos en la materia conocen bien medios de reducción de dicha unión no específica. Típicamente, esta técnica implica recubrir el sustrato con una composición proteica. En particular, las composiciones de proteína tales como albúmina de suero bovina (BSA), leche el polvo desgrasada, y gelatina se usan ampliamente siendo la leche en polvo la más preferida.

f. Marcadores

La marca o grupo detectable en particular usado en el ensayo no es un aspecto decisivo de la invención, siempre que no interfiera significativamente con la unión específica del anticuerpo usado en el ensayo. El grupo detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Dichos marcadores detectables se han desarrollado bien en el campo de inmunoensayos y, en general, la mayoría de cualquier marcador útil en dichos métodos puede aplicarse para la presente invención. Por tanto, un marcador es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles en la presente invención incluyen perlas magnéticas (por ejemplo, DYNABEADSTM), colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina y similares), radiomarcadores (por ejemplo, 3H, 125I, 3sS, 14C, o ³²P), encimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras habitualmente usadas en un ELISA), y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o azúcar coloreado o perlas de plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

El marcador puede acoplarse directa o indirectamente al componente del ensayo deseado de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Como se ha indicado anteriormente, puede usarse una amplia diversidad de marcadores, dependiendo la selección del marcador de la sensibilidad necesaria, la fácil conjugación con el compuesto, los requisitos de estabilidad, la instrumentación disponible y los suministros de eliminación.

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

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

Los expertos en la técnica conocen bien medios de marcadores de detección. Por tanto, por ejemplo, cuando el

marcador es un marcador radioactivo, los medios para la detección incluyen un contador de centelleo o película fotográfica como en auto radiografía. Cuando el marcador es un marcador fluorescente, este puede detectarse excitando el fluorocromo con la longitud de onda de luz apropiada y detectando la fluorescencia resultante. La fluorescencia puede detectarse visualmente, por medio de películas fotográficas, mediante el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos acoplados de 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 reacción resultante. Por último pueden detectarse marcadores colorimétricos simples observando simplemente el color asociado al marcador. De esta manera, en diversos ensayos de varilla, el oro conjugado con frecuencia presenta el color rosa, mientras que diversas perlas conjugadas presentan el color de la perla.

Algunos formatos de ensayo no necesitan usar componentes marcados. Por ejemplo, pueden usarse ensayos de aglutinación para detectar la presencia de los anticuerpos diana. En este caso, las muestras que comprenden los anticuerpos diana aglutinan las partículas recubiertas con antígeno. En este formato, ninguno componente necesita marcarse y la presencia del anticuerpo diana se detecta por simple inspección visual.

E. Detección de Moduladores

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

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

Los polipéptidos o proteínas de T1R del ensayo se seleccionaran típicamente de un polipéptido que tiene una secuencia de las SEC ID N°: 4, 10, 12, 14, 17, o fragmentos o variantes de las mismas modificadas de manera conservativa. Opcionalmente, los fragmentos y variantes pueden ser fragmentos antigénicos y variantes que se unen a un anticuerpo anti-T1R.

Como alternativa, las proteínas o polipéptidos T1R del ensayo pueden proceder de una célula hospedadora eucariota y pueden incluir una subsecuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos con las SEC ID NOS: 4, 10, 12, 14, 17, o fragmentos o variantes modificadas de las mismas modificadas de manera conservativa. Generalmente, la identidad de la secuencia de aminoácidos será al menos del 35 al 50%, u opcionalmente el 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99%. Opcionalmente, las proteínas o polipéptidos de T1R de los ensayos pueden comprender un dominio de una proteína de T1R, tal como un dominio extracelular, región transmembrana, dominio transmembrana, dominio citoplásmico, dominio de unión a ligando y similares. Adicionalmente, como se ha descrito anteriormente, la proteína de T1R o un dominio de la misma pueden unirse covalentemente a una proteína heteróloga para crear una proteína quimérica usada en los ensayos descrito anteriormente.

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

1. Ensayos de unión *in vitro*

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

Por ejemplo, se predice que el dominio N-terminal de T1R está implicado en la unión a ligando. Más particularmente, los T1R que pertenecen a una subfamilia de GPCR que se caracteriza por segmentos N-terminal extracelulares grandes, aproximadamente de 600 aminoácidos. Se piensa que estos segmentos N-terminal forman, al menos en parte, los dominios de unión a ligando y por lo tanto son útiles en ensayos bioquímicos para identificar agonistas y antagonistas de T1R. El dominio de unión a ligando también puede contener partes adicionales del dominio

extracelular, tales como los bucles extracelulares del dominio transmembrana. Se han usado ensayos similares con otros GPCR que están relacionados con los T1R, tales como los receptores de glutamato metabotrópico (véase, por ejemplo, Han y Hampson, *J. Bio. Chem.* 274:10008-10013 (1999)). Estos ensayos pueden implicar desplazar un ligando marcado radiactivamente o fluorescentemente, medir cambios de la fluorescencia intrínseca o cambios de la susceptibilidad proteolítica, etc.

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

También puede examinarse las interacciones proteína G-receptor. Por ejemplo, puede examinarse la unión de la proteína G al receptor, o su liberación del receptor. Más particularmente, en la ausencia de GTP, un activador conducirá a la formación de un complejo estrecho de una proteína G (las tres subunidades) con el receptor. Como se ha indicado anteriormente, este complejo puede detectarse de diversas maneras. Un ensayo de este tipo puede modificarse para buscar inhibidores, por ejemplo, añadiendo un activador para el receptor y la proteína G en ausencia de GTP, que forma un complejo estrecho y después explorar los inhibidores examinando la disociación del complejo receptor-proteína G. En presencia de GTP, la liberación de la subunidad alfa de la proteína G de las otras dos subunidades de la proteína G sirve como un criterio de activación. Una proteína G activada o inhibida modificará a su vez las propiedades de las enzimas, canales y otras proteínas efectoras diana.

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

2. Ensayos de Polarización de la Fluorescencia

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

Cuando una molécula marcada fluorescentemente se excita con luz plana polarizada, emite luz que tiene un grado de polarización que es inversamente proporcional a su rotación molecular. Las moléculas grandes marcadas fluorescentemente 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 fluorescentemente rotan rápidamente durante el estado excitado y la polarización cambia significativamente entre la excitación y emisión. Por lo tanto, las moléculas pequeñas tienen valores de polarización bajos y las moléculas grandes tienen valores de polarización altos. Por ejemplo, un oligonucleótido monocatenario marcado con fluoresceína tiene un valor de polarización relativamente bajo pero cuando se hibrida a una cadena complementaria, tiene un valor de polarización mayor. Cuando se usa FP para detectar y controlar la unión de la sustancia gustativa que puede activar o inhibir los receptores quimiosensoriales de la invención, pueden usarse sustancias gustativas marcadas con fluorescencia o sustancias gustativas auto-fluorescentes.

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

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

En la que Int_{\parallel} es la intensidad de 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. P es la proporción de las intensidades de luz y es un número adimensional. Junto con estos ensayos puede usarse, por ejemplo, el sistema Beacon® y Beacon 2000™. Dichos sistemas típicamente expresan la polarización en unidades de minipolarización (1 Unidad de Polarización = 1000 Unidades mP).

La relación entre la rotación molecular y el tamaño se describe mediante la ecuación de Perrin y se remite al lector a Jolly, M. E. (1991) in Journal of Analytical Toxicology, pp. 236-240, que proporciona una detallada explicación de esta ecuación. Brevemente, la ecuación de Perrin enuncia 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 se relaciona con la viscosidad (η), temperatura absoluta (T), volumen molecular (V), y la constante de gas (R) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Tiempo de Relajación Rotacional} = \frac{3\eta V}{RT}$$

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

3. Ensayos de alto rendimiento en estado sólido y soluble

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

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

La molécula de interés puede unirse al componente en estado sólido, directamente o indirectamente, mediante enlace covalente o no covalente, por ejemplo mediante una etiqueta. La etiqueta puede ser cualquiera de una diversidad de componentes. En general, una molécula que se une a la etiqueta (un agente de unión a etiqueta) se fija a un soporte sólido y la molécula de interés etiquetada (por ejemplo, la molécula de transducción gustativa de interés) se une al soporte sólido por interacción de la etiqueta y el agente de unión a la etiqueta.

Pueden usarse varias etiquetas y de agentes de unión a etiquetas, en base a interacciones moleculares conocidas bien descritas en la bibliografía. Por ejemplo, cuando una etiqueta tiene un agente de unión natural, por ejemplo, biotina, proteína A o proteína G, puede usarse junto con agentes de unión a etiqueta apropiados (avidina, estreptavidina, neutravidina, la región Fc de una inmunoglobulina, etc.). También se encuentran ampliamente disponibles anticuerpos para moléculas con agentes de unión naturales tales como biotina y agentes de unión a etiquetas (véase, SIGMA Immunochemicals 1998 catálogo SIGMA, St. Louis MO).

De manera similar, cualquier compuesto hapténico o antigénico puede usarse en combinación con un anticuerpo apropiado para formar un par de agentes de unión etiqueta/etiqueta. En el mercado se encuentran disponibles cientos de anticuerpos específicos y en la bibliografía se describe cualquiera de los anticuerpos adicionales. Por ejemplo, en una configuración común, la etiqueta es un primer anticuerpo y el agente de unión a etiqueta es un segundo anticuerpo que reconoce al primer anticuerpo. Además de las interacciones antígeno-anticuerpo, las interacciones receptor-ligando también son apropiadas como pares de agente de unión a etiqueta y etiqueta. Por ejemplo, agonistas y antagonistas de receptores de la membrana celular (por ejemplo, interacciones receptor-ligando celulares tales como transferina, c-kit, ligandos del receptor viral, aceptores de citocina, receptores de

quimioquina, receptores de interleuquina, receptores y anticuerpos de inmunoglobulina, la familia cadherina, la familia integrina, la familia selectina y similares; véase, por ejemplo Pigott y Power, *The Adhesion Molecular Facts Book I* (1993)). De manera similar, toxinas y venenos, epítopes virales, hormonas (por ejemplo, opiatos, esteroides, etc.), receptores intracelulares (por ejemplo, que median los efectos de diversos ligandos pequeños, que incluyen esteroides, hormona tiroidea, retinoides y vitaminas D; péptidos), fármacos, lectinas, azúcares, ácidos nucleicos (configuraciones poliméricas lineales y cíclicas), oligosacáridos, proteínas, fosfolípidos y anticuerpos pueden todos interactuar con diversos receptores celulares.

También pueden formar una etiqueta o un agente de unión a etiqueta apropiado polímeros sintéticos, tales como poliuretanos, poliésteres, policarbonatos, poliureas, poliamidas, polietileniminas, sulfuro de poliarileno, polisiloxanos, poliimidias, y poliacetatos. Muchos otros pares de agentes de unión etiqueta/etiqueta también son útiles en sistemas de ensayo descritos en este documento, como sería evidente para un experto en la materia después de revisar esta descripción.

Los conectores comunes tales como péptidos, poliéteres y similares también pueden servir como etiquetas e incluyen secuencias polipeptídicas, tales como secuencias poli gly de entre aproximadamente 5 y 200 aminoácidos. Los especialistas en la técnica conocen dichos conectores flexibles. Por ejemplo, conectores poli(etilenglicol) están disponibles de Shearwater Polymers, Inc. Huntsville, Alabama. Estos conectores opcionalmente tiene enlaces amida, enlaces sulfidrido o enlaces heterofuncionales.

Los agentes de unión a etiquetas se fijan a sustratos sólidos usando diversos métodos actualmente disponibles. Los sustratos sólidos comúnmente se derivatizan o funcionalizan exponiendo toda o una parte del sustrato a un reactivo químico que fija un grupo químico a la superficie que reacciona con una parte del agente de unión a etiqueta. Por ejemplo, grupos que son adecuados para unirse a una parte de cadena larga incluirían aminas, hidroxilo, tiol y grupos carboxilos. Los aminoalquilsilanos e hidroxialquilsilanos pueden usarse para funcionalizar una diversidad de superficies, tales como superficies vítreas. La construcción de matrices biopoliméricas de fase sólida se describe bien en la bibliografía. Véase, *por ejemplo*, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2154 (1963) (que describe la síntesis en fase sólida de, *por ejemplo*, péptidos); Geysen *et al.*, *J. Immun. Meth.*, 102: 259-274 (1987) (que describe la síntesis de componentes en fase sólida en salientes poliacrílicos (pins)); Frank & Doring, *Tetrahedron*, 44: 60316040 (1988) (que describe la síntesis de diversas secuencias peptídicas en 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). Los enfoques no químicos para fijar agentes de unión de etiquetas a sustratos incluyen otros métodos habituales, tales como calor, reticulación por radiación UV y similares.

4. Ensayos basados en ordenador

Otro ensayo para compuestos que modulan la actividad del polipéptido de T1R implica el diseño de los compuestos ayudados por ordenador, en los que se usa un sistema informático para generar una estructura tridimensional de un polipéptido de T1R en base a la información estructural codificada por su secuencia de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de entrada interactúa directa y activamente con un algoritmo preestablecido en un programa informático para producir modelos estructurales secundarios, terciarios y cuaternarios de la proteína. Los modelos de la estructura de la proteína se examinan después para identificar regiones de la estructura que tienen la capacidad de unirse, por ejemplo, ligandos. Estas regiones se usan después para identificar ligandos que se unen a la proteína.

El modelo estructural tridimensional de la proteína se genera introduciendo en el sistema informático secuencias de aminoácidos de la proteína de al menos 10 restos aminoacídicos o secuencias del ácido nucleico correspondientes que codifican un polipéptido de T1R. La secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de T1R o la secuencia de aminoácidos de estos, puede ser cualquier secuencia descrita en este documento y versiones conservativamente modificadas de estas.

La secuencia de aminoácidos representa la secuencia o subsecuencia primaria de la proteína, que codifica la información estructural de la proteína. Al menos 10 restos de la secuencia de aminoácidos (o una secuencia de nucleótidos que codifica 10 aminoácidos) se introducen en el sistema informático desde el teclado del ordenador, sustratos legibles que incluyen, pero sin limitación, medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo disquetes magnéticos, cintas, cartuchos y microplacas), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM), información distribuida por sitios de internet y por RAM. El modelo estructural tridimensional de la proteína después se genera por la interacción de la secuencia de aminoácidos y el sistema informático, usando programas informáticos conocidos por los expertos en la materia.

La secuencia de aminoácidos representa una estructura primaria que codifica la información necesaria para formar la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína de interés. El programa informático busca determinados parámetros codificados por la secuencia primaria para generar el modelo estructural. Estos parámetros se denominan "términos de energía" y principalmente incluyen potenciales electrostáticos, potenciales hidrófobos, superficies accesibles disolventes y unión a hidrógeno. Los términos de energía secundarios incluyen

potenciales de van der Waals. Las moléculas biológicas forman las estructuras que minimizan los términos de energía de un modo acumulativo. El programa informático usa por lo tanto estos términos codificados por la estructura primaria o secuencia de aminoácidos para crear el modelo estructural secundario.

5 La estructura terciaria de la proteína codificada por la estructura secundaria se forma después basándose en los términos de energía de la estructura secundaria. El usuario en este punto puede introducir variables adicionales tales como si la proteína es de unión a membrana o soluble, su localización en el cuerpo, y su localización celular, *por ejemplo*, citoplásmica, superficie o núcleo. Estas variables junto con los términos de energía de la estructura secundaria se usan para formar el modelo de la estructura terciaria. En el modelado de la estructura terciaria, el programa informático compara caras hidrófobas de la estructura secundaria con iguales y caras hidrófilas de la estructura secundaria con iguales.

15 Una vez que se ha generado la estructura, las regiones potenciales de unión a ligando se identifican por el sistema informatizado. Las estructuras tridimensionales para ligandos potenciales se generan introduciendo las secuencias de aminoácidos o de nucleótidos o fórmulas químicas de compuestos, como se ha descrito anteriormente. La estructura tridimensional del ligando potencial después se compara con la del polipéptido de T1R para identificar ligandos que se unen a la proteína. La afinidad de unión entre la proteína y los ligandos se determina usando términos de energía para determinar los ligandos que tienen una probabilidad mejorada de unión a la proteína.

20 Los sistemas informáticos también se usan para explorar mutaciones, variantes polimórficas, alelos y homólogos interespecie de genes de T1R. Dichas mutaciones pueden asociarse con estados de enfermedades o rasgos genéticos. Como se ha descrito anteriormente, también puede usarse GeneChip™ y tecnología relacionada para explorar mutaciones, variantes polimórficas, alelos y homólogos interespecie. Una vez que las variantes se han identificado, puede usarse un ensayo de diagnóstico para identificar pacientes que tienen dichos genes mutados. La identificación de los genes de T1R mutados implica la recepción de la entrada de un primer ácido nucleico o secuencia de aminoácidos de un gen de T1R o versiones modificadas conservativamente del mismo. La secuencia se introduce en el sistema informático como se ha descrito anteriormente. La primera secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos después se compara con una segunda secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos que sustancialmente es idéntica a la primera secuencia. La segunda secuencia se introduce en el sistema informático de la manera descrita anteriormente. Una vez comparadas las secuencias primera y segunda, se identifican las diferencias de nucleótidos o aminoácidos entre las secuencias. Dichas secuencias pueden representar diferencias alélicas en diversos genes de T1R y mutaciones asociadas con estados de enfermedades y rasgos genéticos.

5. Ensayos de unión basados en células

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

45 Los receptores GPCR activados se convierten en sustratos para quinasas que fosforilan la cola C terminal de receptor (y posiblemente también otros sitios). Por tanto, los activadores promoverán la transferencia de 32P de GTP marcado con gamma al receptor, que puede ensayarse con un contador de centelleo. La fosforilación de la cola C terminal promoverá la unión de proteínas de tipo arrestina e interferirán con la unión de proteínas G. La ruta quinasa/arrestina desempeña un papel clave en la desensibilización de muchos receptores GPCR. Por ejemplo, compuestos que modulan la duración de un receptor gustativo que permanece activo podría ser útil como un medio para prolongar un gusto deseado o eliminar un gusto indeseado. Para una revisión general de la señal de la transducción de señal de GPCR y métodos de ensayo de la transducción de señal, véase, *Methods in Enzymology*, vols. 237 y 238 (1994) y volumen 96 (1983); Bourne *et al.*, *Nature*, 10: 349-117-27 (1991); Bourne *et al.*, *Nature*, 348: 125-32 (1990); Pitcher *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.*, 67: 653-92 (1998).

55 La modulación de T1R puede ensayarse comparando la respuesta de un polipéptido de T1R tratado con un supuesto modulador de T1R para determinar la respuesta de una muestra de control no tratada. Dichos supuestos moduladores de T1R pueden incluir sustancias gustativas que pueden inhibir o activar la actividad del polipéptido de T1R. En una realización, se asigna a las muestras de control (no tratadas con activadores o inhibidores) un valor de actividad T1R relativo de 100. La inhibición de un polipéptido de T1R se consigue cuando el valor de actividad T1R con respecto al control es aproximadamente del 90%, opcionalmente del 50%, opcionalmente del 25-0%. La activación de un polipéptido de T1R se consigue cuando el valor relativo de la actividad T1R con respecto al control es del 110%, opcionalmente del 150%, 200-500% o 1000-2000%.

65 Pueden ensayarse cambios en el flujo iónico determinando cambios de polarización iónica (es decir, potencial eléctrico) de la célula o membrana que expresa un polipéptido de T1R. Un medio para determinar cambios en la

polarización celular es midiendo cambios en la corriente (midiendo por lo tanto cambios en la polarización) con técnicas de pinzamiento de voltaje y pinzamiento zonal (véase, por ejemplo, el modo "célula adjunta", el modo "dentro-fuera" y el modo "célula completa", por ejemplo, Ackerman *et al.*, *New Engl. J. Med.* 336:1575-1595 (1997)). Las corrientes en célula completa se determinan convenientemente usando el patrón. Otros ensayos conocidos incluyen: ensayos de flujo iónico radiomarcados y ensayos de fluorescencia que usan colorantes sensibles a voltaje (véase, por ejemplo, Vestergarrd-Bogind *et al.*, *J. Membrana Biol.*, 88: 67-75 (1988); Gonzales & Tsien, *Chem. Biol.*, 4: 269277 (1997); Daniel *et al.*, *J. Pharmacol. Meth.*, 25: 185-193 (1991); Holevinsky *et al.*, *J. Membrana Biology*, 137: 59-70 (1994)). Generalmente, los compuestos a ensayar están presentes en el intervalo de 1 pM a 100 mM.

Los efectos de los compuestos de ensayo después de la función de los polipéptidos pueden medirse examinando cualquiera de los parámetros descritos anteriormente. Cualquier cambio fisiológico adecuado que incida sobre la actividad de GPCR puede usarse para evaluar la influencia de un compuesto de ensayo en los polipéptidos de esta invención. Cuando las consecuencias funcionales se determinan usando células o animales intactos, puede medirse también una diversidad de efectos tales como liberación del trasmisor, liberación hormonal, cambios transcripcionales para marcadores conocidos y no caracterizados (por ejemplo transferencias de northern), cambios en el metabolismo celular tales como crecimiento celular o cambios de pH y cambios en los mensajeros segundos intracelulares tales como Ca^{2+} , IP₃, GMP_c o AMPc.

Los ensayos preferidos para los GPCR incluyen células cargadas con iones o colorantes sensibles a voltaje para revelar actividad receptora. Los ensayos para determinar la actividad de dichos receptores también pueden usar agonistas y antagonistas conocidos de otros receptores acoplados a proteína G como controles negativos o positivos 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 potencial de membrana se controlarán usando un indicador sensible a iones o fluorescente de potencial de membrana, respectivamente. Entre los indicadores sensibles a iones y sondas de potencial que pueden emplearse se encuentran los descritos en el Catálogo Molecular Probes 1997. Para receptores acoplados a proteína G, en el ensayo de elección pueden usarse proteínas G promiscuas tales como G α 15 y G α 16 (Wilkie *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, 88: 10049-10053 (1991)). Dichas proteínas G promiscuas permiten el acoplamiento de un amplio intervalo de receptores.

La activación de receptor típicamente inicia acontecimientos intracelulares posteriores, *por ejemplo*, aumentos en los mensajeros segundos tales como IP₃, que liberan reservas intracelulares de iones calcio. La activación de algunos receptores acoplados a proteína G estimula la formación de trifosfato inositol (IP₃) mediante la hidrólisis de fosfatidilinositol mediada por fosfolipasa C (Berridge & Irving, *Nature*, 312: 315-21 (1984)). IP₃ a su vez estimula la liberación de reservas de iones calcio intracelular. Por tanto, para ensayar la función del receptor acoplado a proteína G puede usarse un cambio en los niveles de iones calcio citoplásmico o un cambio en los niveles de mensajeros segundos tales como IP₃. Las células que expresan dichos receptores acoplados a proteína G pueden mostrar niveles de calcio citoplásmico aumentados como resultado de la contribución de reservas intracelulares y mediante la activación de canales iónicos, en cuyo caso puede ser deseable aunque no necesario realizar dichos ensayos en tampones sin calcio, opcionalmente complementados con un agente quelante tal como EGTA, para distinguir la respuesta de la fluorescencia resultante de la liberación del calcio a partir de reservas internas.

Otros ensayos pueden implicar determinar la actividad de receptores que, cuando se activan, dan lugar a un cambio en el nivel de nucleótidos cíclicos intracelulares, por ejemplo, AMPc o GMPc, activando o inhibiendo enzimas tales como adenilato ciclasa. Existen canales de iones regulados por nucleótidos cíclicos, por ejemplo, canales de las células bastón fotorreceptoras y canales de las neuronas olfativas que son permeables a cationes tras la activación mediante la unión de AMPc o GMPc (véase, por ejemplo, Altenhofen *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, 88: 9868-9872 (1991) y Dhallan *et al.*, *Nature*, 347:184-187 (1990)). En casos en los que la activación del receptor da lugar a una disminución de los niveles de nucleótidos cíclicos, puede ser preferible exponer las células a agentes que aumentan los niveles de nucleótidos cíclicos intracelulares, *por ejemplo*, forsfocolina, antes de añadir un compuesto activador-receptor a las células en el ensayo. Para este tipo de ensayo pueden prepararse células por co-transfección de una célula hospedadora con ADN que codifica un canal iónico regulado por nucleótidos cíclicos, fosfatasa GPCR y ADN que codifica un receptor (por ejemplo, determinados receptores de glutamato, receptores de acetilcolina muscarínicos, receptores de dopamina, receptores de serotonina y similares), que, cuando se activan, causan un cambio en los niveles de nucleótidos cíclicos en el citoplasma.

En una realización preferida, la actividad del polipéptido de T1R se mide mediante la expresión de un gen de T1R en una célula heteróloga con una proteína G promiscua que une el receptor a una ruta de transducción de señal de fosfolipasa C (véase Offermanns & Simon, *J. Biol. Chem.*, 270: 15175-15180 (1995)). Opcionalmente la línea celular es HEK-293 (que no expresa naturalmente genes de T1R) y la proteína G promiscua es G α 15 (Offermanns & Simon, *anteriormente*). La modulación de la transducción gustativa se ensaya midiendo cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelular, que cambian como respuesta a la modulación de la ruta de transducción de señal de T1R mediante la administración de una molécula que se asocia con un polipéptido de T1R. Los cambios en los niveles de Ca^{2+} se miden opcionalmente usando colorantes indicadores de Ca^{2+} fluorescente y formación de imágenes fluorométricas.

En una realización, los cambios en el AMPc o GMPc intracelular pueden medirse usando inmunoensayos. El método

descrito en Offermanns & Simon, *J. Bio. Chem.*, 270: 15175-15180 (1995), puede usarse para determinar el nivel de AMPc. También, el método descrito en Felley-Bosco *et al.*, *Am. J. Resp. Cell and Mol. Biol.*, 11: 159-164 (1994), puede usarse para determinar el nivel de GMPc. Además, en la Patente de Estados Unidos 4.115.538 se describe un kit de ensayo para medir AMPc y/o GMPc.

En otra realización, la hidrólisis del fosfatidilinositol (PI) puede analizarse de acuerdo con la Patente de Estados Unidos 5.436.128. En resumen, el ensayo supone el marcaje de células con 3H-mioinositol durante 48 horas o más. Las células marcadas se tratan con un compuesto de ensayo durante 1 hora. Se produce la lisis de las células tratadas y se realiza la extracción en agua-metanol-cloroformo después de separar los fosfatos inositol por cromatografía de intercambio iónico y se cuantifica por recuento del centelleo. La estimulación del plegamiento se determina calculando la proporción de cpm en presencia de agonista, respecto a cpm en presencia del control tampón. Del mismo modo, la inhibición del plegamiento se determina calculando la proporción de cpm en presencia de antagonista, con respecto a cpm en presencia del control tampón (que puede contener o no un agonista).

En otra realización, los niveles de transcripción pueden medirse para evaluar los efectos de un compuesto del ensayo en la transducción de señal. Una célula hospedadora que contiene un polipéptido de T1R de interés se pone en contacto con un compuesto del ensayo durante un tiempo suficiente para efectuar cualquier interacción, y después se mide el nivel de expresión del gen. La cantidad de tiempo para efectuar dichas interacciones puede determinarse empíricamente, tal como dejando transcurrir un tiempo y midiendo el nivel de transcripción como una función de tiempo. La cantidad de transcripción puede medirse usando cualquier método que sea adecuado conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, la expresión de ARNm de la proteína de interés puede detectarse usando transferencias de northern o sus productos polipeptídicos pueden identificarse usando inmunoensayos. Como alternativa, pueden usarse ensayos basados en transcripción que usan genes indicadores como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.436.128.

Los genes indicadores pueden ser, por ejemplo, cloramfenicol acetiltransferasa, luciferasa, 3-galactosidasa y fosfatasa alcalina. Adicionalmente, la proteína de interés puede usarse como un indicador indirecto mediante la unión a un segundo indicador tal como proteína verde fluorescente (véase, por ejemplo Mistili & Spector, *Nature Biotechnology*, 15: 961-964 (1997)).

La cantidad de transcripción después se compara con la cantidad de transcripción en la misma célula en ausencia del compuesto del ensayo o puede compararse con la cantidad de transcripción en una célula sustancialmente idéntica que carece del polipéptido de T1R de interés. Una célula sustancialmente idéntica puede obtenerse a partir de las mismas células de las que se han preparado las células recombinantes pero que no se han modificado mediante la introducción de ADN heterólogo. Cualquier diferencia en la cantidad de transcripción indica que el compuesto del ensayo de alguna manera tiene modificada la actividad del polipéptido de T1R de interés.

6. Animales transgénicos no humanos que expresan receptores quimiosensoriales

Animales no humanos que expresan una o más secuencias receptoras quimiosensoriales de la invención, también puede usarse para ensayos de receptor. Dicha expresión puede usarse para determinar si un compuesto del ensayo se une específicamente a un polipéptido gustativo del receptor transmembrana en mamíferos *in vivo* poniendo en contacto un animal no humano transfectado de manera estable o transitoria con un ácido nucleico que codifica un receptor quimiosensorial o una región de unión a ligando del mismo con un compuesto del ensayo y determinando si el animal reacciona al compuesto del ensayo uniendo específicamente el polipéptido al receptor.

Los animales transfectados o infectados con los vectores de la invención son particularmente útiles para los ensayos para identificar y caracterizar ligandos/sustancias gustativas que pueden unirse a un receptor específico o conjunto de receptores. Dichos animales infectados por vectores que expresan secuencias receptoras quimiosensoriales pueden usarse para explorar *in vivo* sustancias gustativas y su efecto en, *por ejemplo*, la fisiología celular (*por ejemplo*, en neuronas gustativas), en el SNC, o comportamiento.

En la técnica se conocen bien medios para infectar/expresar los vectores y ácidos nucleicos, individualmente o como bibliotecas. Mediante diversos medios, pueden medirse diversos parámetros en células individuales, órganos o en animales completos. Por ejemplo, las secuencias de T1R de la invención pueden expresarse en tejidos gustativos animales mediante administración con un agente de infección, por ejemplo un vector de expresión adenovirus.

Los genes endógenos del receptor quimiosensorial pueden permanecer funcionales y pueden presentar aún actividad de tipo silvestre (nativo). En otras situaciones, cuando se desea que toda la actividad del receptor quimiosensorial sea por el receptor híbrido exógeno introducido, se prefiere el uso de una línea desactivada (knockout). En la técnica se conocen bien métodos para la construcción de animales transgénicos no humanos, particularmente ratones transgénicos y la selección y preparación de construcciones recombinantes para generar células transformadas.

La construcción de una célula y animal "knockout" se basa en la premisa de que el nivel de expresión de un gen en particular en una célula de mamífero puede disminuirse o anularse completamente introduciendo el genoma una nueva secuencia de ADN que sirve para interrumpir alguna parte de la secuencia de ADN del gen a suprimir. También puede usarse la "inserción atrapa genes" para alterar un gen hospedador y células madre embrionarias (ES) de ratón pueden usarse para producir animales transgénicos knockout (véase, por ejemplo, Holzschu, *Transgenic Res* 6: 97-106 (1997)). La inserción del exógeno es típicamente por recombinación homóloga entre secuencias de ácido nucleico complementario. La secuencia exógena es alguna parte del gen diana a modificar, tales como secuencias exónicas, intrónicas o reguladoras de la transcripción, o cualquier secuencia genómica que es estable para afectar el nivel de la expresión del gen diana; o una combinación de los mismos. La dirección de los genes mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias pluripotenciales permiten modificar de manera precisa la secuencia genómica de interés. Cualquier técnica puede usarse para crear, explorar, propagar, un animal knockout, por ejemplo, véase Bijvoet, *Hum. Mot. Genet* 7: 53-62 (1998); Moreadith, *J. Mot. 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); las Patentes de Estados Unidos N° 5.616.491; 5.464.764; 5.631.153; 5.487.992; 5.627.059; 5.272.071; WO 91/09955; WO93/09222; WO 96/29411; WO 95/31560; WO 91/12650.

Los ácidos nucleicos de la invención también pueden usarse como reactivos para producir células humanas "knockout" y su progenie. Del mismo modo, los ácidos nucleicos de la invención también pueden usarse como reactivos para producir "knock-ins" en ratones. Las secuencias de genes de T1R de rata o de ser humano pueden reemplazar la T1R ortóloga en el genoma del ratón. De esta manera, se produce un ratón que expresa un T1R de rata o de ser humano. Este ratón después puede usarse para analizar la función de los T1R de rata o de ser humano y para identificar ligandos para dichos T1R.

F. Moduladores

Los compuestos ensayados como moduladores de un miembro de la familia de T1R pueden ser cualquier compuesto químico pequeño, o una entidad biológica, tal como una proteína, azúcar, ácido nucleico o lípido. De manera alternativa, los moduladores pueden ser versiones modificadas genéticamente de un gen de T1R. Típicamente, los compuestos del ensayo serán moléculas químicas y péptidos pequeños. Esencialmente en los ensayos de la invención, puede usarse cualquier compuesto químico como un modulador o ligando potencial, sin embargo en la mayoría de los casos se usan compuestos que pueden disolverse en soluciones acuosas u orgánicas (especialmente basadas en DMSO). Los ensayos se diseñan para explorar grandes bibliotecas químicas automatizando las etapas del ensayo y proporcionando compuestos de cualquier fuente conveniente para ensayar, que se procesan típicamente en paralelo (por ejemplo, en formatos de microtitulación o en placas de microtitulación en ensayos informatizados). Deberá apreciarse que existen muchos proveedores de compuestos químicos, incluyendo Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Switzerland) y similares.

En una realización preferida, los métodos de exploración de alto rendimiento implican proporcionar una biblioteca peptídica o química combinatoria que contiene una gran cantidad de compuestos terapéuticos potenciales (moduladores o compuestos ligando potenciales). Dichas "bibliotecas combinatorias químicas" o "bibliotecas de ligandos" se exploran después en uno o más ensayos, como se describe en este documento, para identificar aquellos miembros de la biblioteca (especies o subclases químicas particulares) que presentan una actividad característica deseada. Los compuestos identificados de esta manera pueden servir como "compuestos candidatos" convencionales o ellos mismos pueden usarse como agentes terapéuticos potenciales o verdaderos.

Una biblioteca química combinatoria es una colección de varios compuestos químicos generados por síntesis química o biológica, combinando una cantidad de "bloques de construcción" químicos tales como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca química combinatoria lineal tal como una biblioteca polipeptídica se forma combinando una serie de bloques de construcción químicos (aminoácidos) de cualquier manera posible para una longitud determinada de un compuesto (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipeptídico). Mediante dicha mezcla combinatoria de bloques de construcción químicos pueden sintetizarse millones de compuestos químicos.

La preparación y exploración de bibliotecas químicas combinatorias se conoce bien por los expertos en la técnica. Dichas bibliotecas químicas combinatorias incluyen, pero sin limitación, bibliotecas peptídicas (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.010.175, Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 37: 487-493 (1991) y Houghton *et al*, *Nature*, 354: 84-88 (1991)). También pueden usarse otros productos químicos para generar bibliotecas de diversidad química. Dichos productos químicos incluyen, pero sin limitación: peptoides (por ejemplo, Publicación PCT N° WO 91/19735), péptidos codificados (por ejemplo, Publicación PCT N° WO 93/20242), bio-oligómeros aleatorios (por ejemplo, Publicación PCT N° WO 92/00091), benzodiazepinas (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.288.514), diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs *et al*, *Proa Nat Acad. Set*, 90: 6909-6913 (1993)), polipéptidos vinilógos (Hagihara *et al*, *J. Amer. Chew. Soc.*, 114: 6568 (1992)), peptidomiméticos no peptídicos con armazón de glucosa (Hirschmann *et al*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 114: 9217-9218 (1992)), síntesis orgánica de análogos de bibliotecas de pequeños compuestos (Chen *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 116: 2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho *et al.*, *Science*, 261: 1303 (1993)), peptidil fosfonatos (Campbell *et al*, *J. Org. Chem.*, 59: 658 (1994)), bibliotecas de ácidos nucleicos (Ausubel, Berger y Sambrook, todos *anteriormente*),

5 bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (Patente de Estados Unidos 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (Vaughn *et al.*, *Nature Biotechnology*, 14(3): 309-314(1996) y PCT/US96/10287), bibliotecas de hidratos de carbono (Liang *et al.*, *Science*, 274; 1520-1522 (1996) y Patente de Estados Unidos 5.593.853), bibliotecas de pequeñas moléculas orgánicas (benzodiacepinas, Baum, *C&EN*, 18 enero, pág. 33 (1993); tiazolidinonas y metatiazanonas, Patente de Estados Unidos 5.549.974; pirrolidinas, Patentes de Estados Unidos 5.525.735 y 5.519.134; compuestos morfolino, Patente de Estados Unidos 5.506.337; benzodiacepinas, 5.288.514 y similares).

10 Los dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias se encuentran disponibles (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 se encuentran ellas mismas disponibles en el mercado (véase, *por ejemplo*, ComGenex, Princeton, NJ; Tripos, Inc., St. Louis, MO; 3D Pharmaceuticals, Bxton, PA; Martek Biosciences; Columbia, MD; *etc*).

15 En un aspecto de la descripción, los moduladores de T1R pueden usarse en cualquier producto alimentario, dulces, composiciones farmacéuticas o ingredientes de los mismos para modular por lo tanto el gusto del producto, la composición o los ingredientes de una manera deseada. Por ejemplo, a un producto o composición edulcorante pueden añadirse moduladores de T1R que potencian la sensación gustativa dulce, al mismo tiempo que para mejorar el gusto de un producto o composición pueden añadirse moduladores de T1R que bloquean sensaciones gustativas no deseables.

20 G. Métodos para Representar y Predecir la Percepción del Gusto

25 La descripción también proporciona preferiblemente métodos para representar la percepción del gusto y/o para predecir la percepción del gusto en un mamífero, incluyendo en un ser humano. Preferiblemente, dichos métodos pueden realizarse usando los receptores y genes que codifican dichos polipéptidos de T1R descritos en este documento.

30 También se describe un método de exploración de uno o más compuestos para determinar la presencia de un gusto detectable por un mamífero, que comprende: poner en contacto dicho uno o mas compuestos con los receptores descritos, preferiblemente en el que el animal es un ser humano. También se describe un método para representar la percepción gustativa de un gusto particular en un ser humano, que comprende las etapas de proporcionar valores X_1 a X_n representativos de la estimulación cuantitativa de cada uno de los n receptores quimiosensoriales de dicho vertebrado, en el que n es superior o igual a 2; y generar a partir de dichos valores una representación cuantitativa de la percepción gustativa. Los receptores quimiosensoriales pueden ser un receptor quimiosensorial descrito en este documento, la representación puede constituir un punto o un volumen en el espacio n -dimensional, puede constituir un gráfico o un espectro y puede constituir una matriz de representaciones cuantitativas. La etapa de proporcionar valores también puede comprender poner en contacto una pluralidad de receptores quimiosensoriales producidos de manera recombinante con una composición del ensayo y medir cuantitativamente la interacción de dicha composición con dichos receptores.

40 También se describe un método para predecir la percepción gustativa en un mamífero generado por una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen una percepción gustativa desconocida en un mamífero, que comprende las etapas de: proporcionar valores X_1 a X_n representativos de la estimulación cuantitativa de cada uno de los n receptores quimiosensoriales de dicho vertebrado, en el que n es superior o igual a 2, para una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen la percepción gustativa conocida en un mamífero; y generar a partir de dichos valores una representación cuantitativa de la percepción gustativa en un mamífero para la una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen la percepción gustativa conocida en un mamífero, proporcionando valores X_1 a X_n representativos de la estimulación cuantitativa de cada uno de los n receptores quimiosensoriales de dicho vertebrado, en el que n es superior o igual a 2, para una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen la percepción gustativa desconocida en un mamífero; y generar a partir de dichos valores una representación cuantitativa de la recepción gustativa en un mamífero para la una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen una percepción gustativa desconocida en un mamífero y predecir la percepción gustativa en un mamífero generada por una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen la percepción gustativa desconocida en un mamífero comparando la representación cuantitativa de la percepción gustativa en un mamífero para la una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen la percepción gustativa desconocida en un mamífero para la representación cuantitativa de la percepción gustativa en un mamífero para la una o más moléculas o combinaciones de moléculas que producen la percepción gustativa conocida en un mamífero. Los receptores quimiosensoriales usados en este método pueden incluir un receptor quimiosensorial descrito en este documento.

60 En otra realización, se generan nuevas moléculas o combinaciones de moléculas que provocan una percepción gustativa predeterminada en un mamífero determinando un valor de percepción gustativa en un mamífero para una molécula o combinaciones de moléculas desconocidas como se ha descrito anteriormente; se determina un valor de percepción gustativa en un mamífero para una o más moléculas o combinaciones de moléculas desconocidas como se ha descrito anteriormente; se compara el valor de percepción gustativa en un mamífero para una o más composiciones desconocidas con respecto al valor de percepción gustativa en un mamífero para una o más

composiciones conocidas; se selecciona una molécula o combinaciones de moléculas que provocan una percepción gustativa predeterminada en un mamífero; y se combinan dos o más moléculas o combinaciones de moléculas desconocidas para formar una molécula o combinación de moléculas que provocan una percepción gustativa predeterminada en un mamífero. La etapa de combinación produce una sola molécula simple o una combinación de moléculas que provocan una percepción de gustativa predeterminada en un animal.

En otra realización, se proporciona un método para estimular un gusto, que comprende las etapas de: para cada uno de una pluralidad de receptores quimiosensoriales clonados, preferiblemente receptores humanos, determinar el grado en el que interacciona el receptor con la sustancia gustativa, y combinar una pluralidad de compuestos, cada uno con una interacción previamente determinada con uno o más de los receptores, en cantidades que juntos proporcionan un perfil de estimulación sobre el receptor que mimetiza el perfil de la sustancia gustativa. La interacción de una sustancia gustativa con un receptor quimiosensorial puede determinarse usando cualquiera de los ensayos de unión o indicadores descritos en este documento. La pluralidad de compuestos puede después combinarse para formar una mezcla. Si se desea, uno o más de la pluralidad de los compuestos pueden combinarse covalentemente. Los compuestos combinados sustancialmente estimulan al menos el 75%, 80% o el 90% de los receptores que estimula sustancialmente la sustancia gustativa.

En otra realización preferida, se ensaya una pluralidad de compuestos convencionales frente a una pluralidad de receptores quimiosensoriales para determinar el grado al cual cada uno de los receptores interacciona con cada compuesto convencional, generando por lo tanto un perfil de estimulación sobre el receptor para cada compuesto convencional. Estos perfiles de estimulación de los receptores pueden después almacenarse en una base de datos relacional en un medio de almacenaje de datos. El método puede comprender adicionalmente proporcionar un perfil de estimulación sobre el receptor deseado para un gusto; comparar el perfil de estimulación sobre el receptor deseado con la base de datos relacional; y determinar una o más combinaciones de compuestos convencionales que más estrechamente coinciden con el perfil de estimulación sobre el receptor deseado. El método puede comprender adicionalmente combinar compuestos convencionales en una o más de las combinaciones determinadas para estimular el gusto.

H. Kits

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

Los expertos en la técnica conocen bien numerosas técnicas de ensayos de ácidos nucleicos para determinar la presencia de ADN y ARN para un miembro de la familia de T1R en una muestra, tales como análisis de Southern, análisis de Northern, transferencias de mancha, protección de ARNasa, análisis 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 manera que queda disponible para la hibridación con la célula conservando al mismo tiempo la morfología celular para interpretación y análisis posteriores. Los siguientes artículos proporcionan una visión de conjunto de la técnica de hibridación *in situ*: Singer *et al.*, *Biotechniques*, 4: 230250 (1986); Haase *et al.*, *Methods in Virology*, vol. VII págs. 189-226 (1984); y *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (Names *et al.*, eds. 1987). Adicionalmente, con las diversas técnicas de inmunoensayo descritas anteriormente puede detectarse un polipéptido de T1R. La muestra del ensayo se compara típicamente con un control positivo (*por ejemplo*, una muestra que expresa un polipéptido de T1R recombinante) y con un control negativo.

La presente descripción también proporciona kits para explorar moduladores de miembros de la familia de T1R. Dichos kits pueden prepararse a partir de materiales y reactivos fácilmente disponibles. *Por ejemplo*, dichos kits pueden comprender cualquiera o más de los siguientes materiales: ácidos nucleicos o proteínas de T1R, tubos de reacción, e instrucciones para ensayar la actividad de T1R. Opcionalmente, el kit contiene un receptor de T1R biológicamente reactivo. De acuerdo con la presente invención, puede prepararse una amplia diversidad de kits y componentes, dependiendo del uso destinado para el kit y de los requisitos particulares del usuario.

Ejemplos

En las secuencias de proteínas representadas en este documento, el código X de una letra o Xaa se refiere a cualquiera de los veinte restos aminoacídicos comunes. En las secuencias de ADN presentadas en este documento, los códigos N o n de una letra se refieren a cualquiera de las cuatro bases de nucleótidos A, T, C, o G.

Ejemplo 1-hT1R3

A continuación se proporciona ADN genómico de hT1R3 como SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2 con secuencias codificantes (cfs) predichas mostradas en negrita. La ruptura entre los cóntigos 5' y 3' se muestra como puntos

suspensivos ('.....'). Las cds predichas de hT1R3 se describen en la SEC ID N° 3. Por último, se proporciona una secuencia preferida, predicha de aminoácidos de hT1R3 como SEC ID N° 4, usando el código de una letra para los aminoácidos.

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

AGCCTGGCAGTGGCCTCAGGCAGAGTCTGACGCGCACAAACTTTCAGGCCAGGAAGCGA
 GGACACCACTGGGGCCCCAGGGTGTGGCAAGTGAGGATGGCAAGGGTTTTGCTAAACAAA
 TCCTCTGCCCCGCTCCCCGCCCCGGGCTCACTCCATGTGAGGCCCAAGTCGGGGCAGCCACC
 TGCCGTGCCTGTTGGAAGTTGCCTCTGCCATGCTGGGCCCTGCTGTCTGGGCCTCAGC
 CTCTGGGCTCTCCTGCACCCTGGGACGGGGGCCCATTTGTGCCTGTACAGCAACTT
 AGGATGAAGGGGGACTACGTGCTGGGGGGGCTGTTCCCCCTGGGCGAGGCCGAGGA
 GGCTGGCCTCCGCAGCCGGACACGGCCAGCAGCCCTGTGTGCACCAGGTACAGAGG
 TGGGACGGCCTGGGTCGGGGTCAGGGTGACCAGGTCTGGGGTGCTCCTGAGCTGGGGCCG
 AGGTGGCCATCTGCGGTTCTGTGTGGCCCCAGGTTCTCCTCAAACGGCCTGCTCTGGGC
 ACTGGCCATGAAAATGGCCGTGGAGGAGATCAACAACAAGTCGGATCTGCTGCCCGG
 GCTGCGCCTGGGCTACGACCTCTTTGATACGTGCTCGGAGCCTGTGGTGGCCATGAA
 GCCCAGCCTCATGTTCTGGCCAAGGCAGGCAGCCGCGACATCGCCGCTACTGCAA
 CTACACGCAGTACCAGCCCCGTGTGCTGGCTGTCATCGGGCCCCACTCGTCAGAGCT
 CGCCATGGTCAACGGCAAGTTCTTCAGCTTCTTCCTCATGCCCCAGTGGGGCGCCCC
 CACCATCACCCACCCCAACCAACCCCTGCCCGTGGGAGCCCCTTGTGTCAGGAGAATGC
 (SEC ID N°: 1)

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

.....TACATGCACCCACCCAGCCCTGCCCTGGGAGCCCTGTGTCAGAAGATGC
 TCTTGGCCTTGCAGGTCAGCTACGGTGCTAGCATGGAGCTGCTGAGCGCCCGGGAGAC
 CTTCCCTCCTTCTTCGACCCGTGCCAGCGACCGTGTGCAGCTGACGGCCGCCGC
 GGAGCTGCTGCAGGAGTTCGGCTGGAAGTGGGTGGCCGCCCTGGGCAGCGACGACG
 AGTACGGCCGGCAGGGCCTGAGCATTTCTCGGCCCTGGCCGCGGCACGCGGCATCT

GCATCGCGCACGAGGGCCTGGTGCCGCTGCCCCGTGCCGATGACTCGCGGCTGGGG
AAGGTGCAGGACGTCTTGACACCAGGTGAACCAGAGCAGCGTGCAAGTGGTGCTGCT
GTTTCGCCTCCGTGCACGCCGCCACGCCCTCTTCAACTACAGCATCAGCAGCAGGCT
CTCGCCCAAGGTGTGGGTGGCCAGCGAGGCCTGGCTGACCTCTGACCTGGTCATGGG
GCTGCCCCGCATGGCCAGATGGGCACGGTGCTTGGCTTCCTCCAGAGGGGTGCCCA
GCTGCACGAGTTCCCCCAGTACGTGAAGACGCACCTGGCCCTGGCCACCGACCCGGC
CTTCTGCTCTGCCCTGGGCGAGAGGGAGCAGGGTCTGGAGGAGGACGTGGTGGGCC
AGCGCTGCCCGCAGTGTGACTGCATCACGCTGCAGAACGTGAGCGCAGGGCTAAATC
ACCACCAGACGTTCTCTGTCTACGCAGCTGTGTATAGCGTGGCCCAGGCCCTGCACA
ACACTCTTCAAGTGAACGCCCTCAGGCTGCCCGCGCAGGACCCCGTGAAGCCCTGGC
AGGTGAGCCCGGAGATGGGGGTGTGCTGTCTCTGCATGTGCCAGGCCACCAGGCACG
GCCACCACGCCTGAGCTGGAGGTGGCTGGCGGCTCAGCCCCGTCCCCGCCCGCAGCTCC
TGGAGAACATGTACAACCTGACCTTCCACGTGGGCGGGCTGCCGCTGCGGTTTCGACA
GCAGCGGAAACGTGGACATGGAGTACGACCTGAAGCTGTGGGTGTGGCAGGGCTCA
GTGCCAGGCTCCACGACGTGGGCAGGTTCAACGGCAGCCTCAGGACAGAGCGCCT
GAAGATCCGCTGGCACACGTCTGACAACCAGGTGAGGTGAGGGTGGGTGTGCCAGGCG
TGCCCGTGGTAGCCCCCGCGGCAGGGCGCAGCCTGGGGGTGGGGGCCGTCCAGTCTCC
GTGGGCATGCCAGCCGAGCAGAGCCAGACCCAGGCCTGTGCCAGAAAGCCCGTGTCC
CGGTGCTCGCGCAGTGCCAGGAGGGCCAGGTGCGCCGGGTCAAGGGGTTCCACTC
CTGCTGCTACGACTGTGTGGACTGCGAGGCGGGCAGCTACCGGCAAAAACCCAGGTGA
GCCGCTTCCCGGCAGGCGGGGTGGGAACGCAGCAGGGGAGGGTCTTCCAAGTCTCTGA
CTCTGAGACCAGAGCCACAGGGTACAAGACGAACACCCAGCGCCCTTCTCTCTCTCACA
GACGACATCGCCTGCACCTTTTGTGGCCAGGATGAGTGGTCCCCGGAGCGAAGCACA
CGCTGCTTCCGCCGAGGTCTCGGTTCTGGCATGGGGCGAGCCGGCTGTGCTGCTG
CTGCTCTGCTGCTGAGCCTGGCGCTGGGCCTTGTGCTGGCTGCTTTGGGGCTGTT
GTTACCATCGGGACAGCCACTGGTTTCAAGCCTCGGGGGGGCCCTGGCCTGCTTT
GGCCTGGTGTGCCTGGGCCTGGTCTGCCTCAGCGTCTCCTGTTCCCTGGCCAGCCC
AGCCCTGCCCGATGCCTGGCCAGCAGCCCTTGTCCACCTCCCGCTCACGGGCTGC
CTGAGCACACTCTTCTGTCAGGCGGCCGAGATCTTCGTGGAGTCAGAACTGCCTCTG
AGCTGGGCGAGACCGGCTGAGTGGCTGCCTGCGGGGGCCCTGGGCCTGGCTGGTGGT
GCTGCTGGCCATGCTGGTGGAGGTGCACTGTGCACCTGGTACCTGGTGGCCTTCCC
GCCGGAGGTGGTACCGACTGGCACATGCTGCCACGGAGGCGCTGGTGCACCTGCC
GCACACGCTCCTGGGTCAGCTTCGGCCTAGCGCACGCCACCAATGCCACGCTGGCCT
TTCTCTGCTTCTGGGCACCTTCTGTTGCGGAGCCAGCCGGGCTGCTACAACCGTG
CCCGTGGCCTCACCTTGGCATGCTGGCCTACTTCATCACCTGGGTCTCCTTTGTGCC
CCTCCTGGCCAATGTGCAGGTGGTCTCAGGCCCGCCGTGCAGATGGGCGCCCTCCT
GCTCTGTGCTCCTGGGCATCCTGGCTGCCTTCCACCTGCCAGGTGTTACCTGCTCATG
CGGCGACAGGGCTCAACACCCCCGAGTTCCTTCTGGGAGGGGGCCCTGGGGATGC
CCAAGGCCAGAATGACGGGAACACAGGAAATCAGGGGAAACATGAGTGACCCAACCC

TGTGATCTCAGCCCCGGTGAACCCAGACTTAGCTGCGATCCCCCCAAGCCAGCAATGACC
CGTGTCTCGCTACAGAGACCCTCCCCTCTAGGTTCTGACCCCAGGTTGTCTCCTGACCCT
GACCCACAGTGAGCCCTAGGCCTGGAGCACGTGGACACCCCTGTGACCÁTC (SEC ID N°
2)

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

AGCCTGGCAGTGGCCTCAGGCAGAGTCTGACGCGCACAACTTTCAGGCCAGGAAGCGA
GGACACCACTGGGGCCCCAGGGTGTGGCAAGTGAGGATGGCAAGGGTTTTGCTAAACAAA
TCCTCTGCCCGCTCCCCGCCCGGGCTCACTCCATGTGAGGCCCCAGTCGGGGCAGCCACC
TGCCGTGCCTGTTGGAAGTTGCCTCTGCCATGCTGGGCCCTGCTGTCTGGGCCCTCAGC
CTCTGGGCTCTCCTGCACCCTGGGACGGGGGCCATTGTGCCTGTCACAGCAACTT
AGGATGAAGGGGGACTACGTGCTGGGGGGCTGTTCCCCCTGGGCGAGGCCGAGGA
GGCTGGCCTCCGCAGCCGGACACGGCCCAGCAGCCCTGTGTGCACCAGGTACAGAGG
TGGACGGCCTGGGTGCGGGTTCAGGGTGACCAGGTCTGGGGTGCTCCTGAGCTGGGGCCG
AGGTGGCCATCTGCGGTTCTGTGTGGCCCCAGGTTCTCCTCAAACGGCCTGCTCTGGGC
ACTGGCCATGAAAATGGCCGTGGAGGAGATCAACAACAAGTCGGATCTGCTGCCCGG
GCTGCGCCTGGGCTACGACCTCTTTGATACGTGCTCGGAGCCTGTGGTGGCCATGAA
GCCAGCCTCATGTTCTGGCCAAGGCAGGCAGCCGCGACATCGCCGCCTACTGCAA
CTACACGCAGTACCAGCCCCGTGTGCTGGCTGTCATCGGGCCCACTCGTCAGAGCT
CGCCATGGTCAACGGCAAGTTCTTCAGCTTCTTCTCATGCCCCAGTGGGGCGCCCC
CACCATCACCCACCCCAACCAACCCCTGCCCGTGGGAGCCCTTGTGTCAGGAGAATGC
TACATGCACCCACCCAGCCCTGCCCTGGGAGCCCTGTGTGAGAAGATGCTCTTGGCCTTG
CAGGTCAGCTACGGTGTAGCATGGAGCTGCTGAGCGCCCGGGAGACCTTCCCCTCC
TTCTTCGCGACCGTGCCAGCGACCGTGTGACGCTGACGGCCGCGCGGAGCTGCTG
CAGGAGTTCGGCTGGAACCTGGGTGGCCGCCCTGGGCAGCGACGACGAGTACGGCCG
GCAGGGCCTGAGCATCTTCTCGGCCCTGGCCGCGGCACGCGGCATCTGCATCGCGCA
CGAGGGCCTGGTGCCGCTGCCCGTGCCGATGACTCGCGGCTGGGGAAGGTGCAGG
ACGTCCTGCACCAGGTGAACCAGAGCAGCGTGCAGGTGGTGTGCTGCTGTTCCCTCCG
TGCACGCCGCCACGCCCTCTTCAACTACAGCATCAGCAGCAGGCTCTCGCCCAAGG
TGTGGGTGGCCAGCGAGGCCTGGCTGACCTCTGACCTGGTCATGGGGCTGCCCGGA
TGGCCAGATGGGCACGGTGTGCTTGGCTTCTCCAGAGGGGTGCCAGCTGCACGAGT
TCCCCAGTACGTGAAGACGCACCTGGCCCTGGCCACCGACCCGGCCTTCTGCTCTG
CCCTGGGGCAGAGGGAGCAGGGTCTGGAGGAGGACGTGGTGGGCCAGCGCTGCCCG
CAGTGTGACTGCATCACGCTGCAGAACGTGAGCGCAGGGCTAAATCACCACCAGACG
TTCTCTGTCTACGCAGCTGTGTATAGCGTGGCCAGGCCCTGCACAACACTCTTTCAGT
GCAACGCCTCAGGCTGCCCGCGCAGGACCCCGTGAAGCCCTGGCAGGTGAGCCCGG
GAGATGGGGGTGTGCTGTCTCTGCATGTGCCAGGCCACCGCACGGCCACACGCCT
GAGCTGGAGGTGGCTGGCGGCTCAGCCCCGTCCCCCGCCGAGCTCCTGGAGAACATGT
ACAACCTGACCTTCCACGTGGGCGGGCTGCCGCTGCGGTTTCGACAGCAGCGGAAACG
TGGACATGGAGTACGACCTGAAGCTGTGGGTGTGGCAGGGCTCAGTGCCACAGGCTCC

ACGACGTGGGCAGGTTCAACGGCAGCCTCAGGACAGAGCGCCTGAAGATCCGCTGG
CACACGTCTGACAACCAGGTGAGGTGAGGGTGGGTGTGCCAGGCGTGCCCGTGGTAGCC
CCCGCGGCAGGGCGCAGCCTGGGGGTGGGGGCCGTTCCAGTCTCCCGTGGGCATGCCAG
CCGAGCAGAGCCAGACCCAGGCCTGTGCGCAGAAAGCCCGTGTCCCGGTGCTCGCGGC
AGTGCCAGGAGGGCCAGGTGCGCCGGGTCAAGGGGTTCCACTCCTGCTGCTACGACT
GTGTGGA CTGCGAGGCGGGCAGCTACCGGCAAAACCCAGGTGAGCCGCTTCCCGCA
GGCGGGGTGGAAACGCAGCAGGGGAGGGTCTGCCAAGTCTGACTCTGAGACCAGAGC
CCACAGGGTACAAGACGAACCCAGCGCCCTTCTCCTCTCTCACAGACGACATCGCCTG
CACCTTTTGTGGCCAGGATGAGTGGTCCCGGAGCGAAGCACACGCTGCTTCCGCCG
CAGGTCTCGGTTCTGGCATGGGGCGAGCCGGCTGTGCTGCTGCTGCTCCTGCTGCT
GAGCCTGGCGCTGGGCCCTGTGCTGGCTGCTTTGGGGCTGTTCGTTACCATCGGGA
CAGCCCACTGGTTCAGGCCTCGGGGGGGCCCTGGCCTGCTTTGGCCTGGTGTGCCT
GGGCCTGGTCTGCCTCAGCGTCTCCTGTTCCCTGGCCAGCCAGCCCTGCCCGATG
CCTGGCCCAGCAGCCCTTGTCCACCTCCCGCTCACGGGCTGCCTGAGCACACTCTT
CCTGCAGGCGGCCGAGATCTTCGTGGAGTCAGAACTGCCTCTGAGCTGGGCAGACCG
GCTGAGTGGCTGCCTGCGGGGGCCCTGGGCCTGGCTGGTGGTGTGCTGCTGGCCATGCT
GGTGGAGGTGCACTGTGCACCTGGTACCTGGTGGCCTTCCCGCCGGAGGTGGTGAC
GGACTGGCACATGCTGCCCACGGAGGCGCTGGTGCCTGCCGCACACGCTCCTGGGT
CAGCTTCGGCCTAGCGCACGCCACCAATGCCACGCTGGCCTTTCTCTGCTTCTGGG
CACTTTCCTGGTGGGAGCCAGCCGGGCTGCTACAACCGTGCCCGTGGCCTCACCTT
TGCCATGCTGGCCTACTTCATCACCTGGGTCTCCTTTGTGCCCTCCTGGCCAATGTG
CAGGTGGTCTCAGGCCCGCCGTGCAGATGGGCGCCCTCCTGCTCTGTGCTCCTGGGC
ATCCTGGCTGCCCTCCACCTGCCAGGTGTTACCTGCTCATGCGGCAGCCAGGGCTC
AACACCCCGAGTTCTTCTGGGAGGGGGCCCTGGGGATGCCAAGGCCAGAATGAC
GGAAACACAGGAAATCAGGGGAAACATGAGTGACCCAACCTGTGATCTCAGCCCGG
TGAACCCAGACTTAGCTGCGATCCCCCAAGCCAGCAATGACCCGTGTCTCGCTACAGAG
ACCTCCCGCTCTAGGTTCTGACCCCAAGTTGTCTCCTGACCCGACCCACAGTGAGCC
TAGGCCTGGAGCACGTGGACACCCCTGTGACCATC (SEC ID N° 20)

Cds predichas de hT1R3 (SEC ID N° 3)

ATGCTGGGCCCTGCTGTCTGGGCCTCAGCCTCTGGGCTCTCCTGCAACCTGGGACGGGGG
CCCCATTGTGCCTGTCACAGCAACTTAGGATGAAGGGGGACTACGTGCTGGGGGGGCTGT
TCCCCCTGGGCGAGGCCGAGGAGGCTGGCCTCCGCAGCCGGACACGGCCCAGCAGCCCTG
TGTGCACCAAGTTCTCCTCAAACGGCCTGCTCTGGGCACTGGCCATGAAAATGGCCGTGGA
GGAGATCAACAACAAGTCGGATCTGCTGCCCCGGGCTGCGCCTGGGCTACGACCTCTTGAT
ACGTGCTCGGAGCCTGTGGTGGCCATGAAGCCCAGCCTCATGTTCTGGCCAAGGCAGGC
AGCCGCGACATCGCCGCTACTGCAACTACACGCAGTACCAGCCCGTGTGCTGGCTGTCA
TCGGGCCCCACTCGTCAGAGCTCGCCATGGTACCAGGCAAGTTCTCAGCTTCTTCTCAT
GCCCCACTACGGTGTAGCATGGAGCTGCTGAGCGCCCGGGAGACCTTCCCTCCTTCTTC
CGCACCGTGCCAGCGACCGTGTGCAGCTGACGGCCCGCGGAGCTGCTGCAGGAGTTC

GGCTGGA ACTGGGTGGCCGCCCTGGGCAGCGACGACGAGTACGGCCGGCAGGGCCTGAGC
 ATCTTCTCGGCCCTGGCCGGGCACGCGGCATCTGCATCGCGCACGAGGGCCTGGTGCCGC
 TGCCCCGTGCCGATGACTCGCGGCTGGGGAAGGTGCAGGACGTCCTGCACCAGGTGAACC
 AGAGCAGCGTGCAGGTGGTGTCTGTTTCGCTCCGTGCACGCCGCCACGCCCTCTCAA
 CTACAGCATCAGCAGCAGGCTCTCGCCCAAGGTGTGGGTGGCCAGCGAGGCCTGGCTGAC
 CTCTGACCTGGTCATGGGGCTGCCCGCATGGCCCAGATGGGCACGGTGTCTGGCTTCTCT
 CAGAGGGGTGCCAGCTGCACGAGTTCGCCAGTACGTGAAGACGCACCTGGCCCTGGCC
 ACCGACCCGGCCTTCTGCTCTGCCCTGGGCGAGAGGGAGCAGGGTCTGGAGGAGGACGTG
 GTGGGCCAGCGCTGCCCGCAGTGTGACTGCATCACGCTGCAGAACGTGAGCGCAGGGCTA
 AATCACCACCAGACGTTCTCTGTCTACGCAGCTGTGTATAGCGTGGCCAGGCCCTGCACA
 ACACTCTTCAAGTGAACGCCTCAGGCTGCCCGCGCAGGACCCCGTGAAGCCCTGGCAGCT
 CCTGGAGAACATGTACAACCTGACCTTCCACGTGGGCGGGCTGCCGCTGCGGTTTCGACAGC
 AGCGGAAACGTGGACATGGAGTACGACCTGAAGCTGTGGGTGTGGCAGGGCTCAGTGCCC
 AGGCTCCACGACGTGGGCAGGTTCAACGGCAGCCTCAGGACAGAGCGCCTGAAGATCCGC
 TGGCACACGTCTGACAACCAGAAGCCCGTGTCCCGGTGCTCGCGGCAGTGCCAGGAGGGC
 CAGGTGCGCCGGGTCAAGGGGTTCCACTCCTGCTGCTACGACTGTGTGGACTGCGAGGCG
 GGCAGCTACCGGCAAAACCCAGACGACATCGCCTGCACCTTTTGTGGCCAGGATGAGTGG
 TCCCCGGAGCGAAGCACACGCTGCTTCCGCCGACGGTCTCGGTTCTTGGCATGGGGCGAGC
 CGGCTGTGCTGCTGCTGCTCCTGCTGCTGAGCCTGGCGCTGGGCCTTGTGCTGGCTGCTTT
 GGGGCTGTTTCGTTACCATCGGGACAGCCACTGGTTCAGGCCCTCGGGGGGGCCCTGGCC
 TGCTTTGGCCTGGTGTGCCTGGGCCTGGTCTGCCTCAGCGTCCTCCTGTTCCCTGGCCAGCC
 CAGCCCTGCCGATGCCTGGCCAGCAGCCCTTGTCCACCTCCCGCTCACGGGCTGCCTG
 AGCACACTCTTCTGCAGGCGGCCGAGATCTTCGTGGAGTCAGAACTGCCTCTGAGCTGGG
 CAGACCGGCTGAGTGGCTGCCTGCGGGGGCCCTGGGCCTGGCTGGTGGTGTCTGCTGGCCA
 TGCTGGTGGAGGTGCACTGTGCACCTGGTACCTGGTGGCCTTCCCGCCGGAGGTGGTGAC
 GGACTGGCACAATGCTGCCACGGAGGCGCTGGTGCCTGCGCACACGCTCCTGGGTGAG
 CTTCGGCCTAGCGCACGCCACCAATGCCACGCTGGCCTTTCTCTGCTTCTGGGCACTTCC
 TGGTGCAGGAGCCAGCCGGGCTGCTACAACCGTGCCCGTGGCCTCACCTTTGCCATGCTGGC
 CTACTTCATCACCTGGGTCTCCTTTGTGCCCTCCTGGCCAATGTGCAGGTGGTCTCAGGC
 CCGCCGTGCAGATGGGCGCCCTCCTGCTCTGTGCTGCTGGGCATCCTGGCTGCCTTCCACCT
 GCCCAGGTGTTACCTGCTCATGCGGCAGCCAGGGCTCAACACCCCGAGTTCTTCTGGGA
 GGGGGCCCTGGGGATGCCCAAGGCCAGAATGACGGGAA CACAGGAAATCAGGGGAAACA
 TGAGTGA (SEC ID N° 3)

Traducción conceptual de hT1R3 (SEC ID N° 4)

MLGPAVLGLSLWALLHPGTGAPLCLSQQLRMKGDYVVLGGLFPLGEABEAGLSRTRPSSPVCT
 RFSSNGLLWALAMKMAVEEINNKSDDLPLGLRLGYDLFDTCSEPVVAMKPSLMFLAKAGSRDI
 AAYCNYTQYQPRVLAVIGPHSSELAMVTGKFFSFFLMPHYGASMELLSARETFPSFFRTVPSDR
 VQLTAAABELLQEFGWNVVAALGSDDEYGRQGLSIFSAALAAARGICIAHEGLVPLPRADDSRLG

KVQDVLHQVNQSSVQVLLFASVHAAHALFNYSISSRLSPKVWVASEAWLTSDLVMGLPGM
 AQMGTVLGFLQRGAQLHEFPQYVKTHLALATDPAFCSALGEREQGLEEDVVGQRCPQCDCIT
 LQNVSAAGLNHHQTFSVYAAVYSVAQALHNTLQCNASGCPAQDPVKPWQLLENMYNLTTFHVG
 GLPLRFDSSGNVDMEDLKLWVWQGSVPRLDVGRFNGSLRTERLKIRWHTSDNQKPVSRCS
 RQCQEGQVRRVKGFHSCCYDCVDCCEAGSYRQNPDDIACTFCGQDEWSPERSTRCFRRRSRFLA
 WGEPAVLLLLLLLSLALGLVLAALGLFVHHRDSPLVQA'SGGPLACFGLVCLGLVCLSVLLFPG
 QPSPARCLAQQPLSHLPLTGCLSTLFLQAAEIFVESELPLSWADRLSGCLRGPWAWLVVLLAML
 VEVALCTWYLVAFPEVVTDWHMLPTEALVHCRTRSWVSFGLAHATNATLAFLCFLGTFLVR
 SQPGCYNRARGLTFAMLAYFITWVSFVPLLANVQVVLPAVQMGALLLCVLGILAAFHLPYCY
 LLMRQPLNTPBFLLGGGPGDAQQGNDGNTGNQKHE (SEC ID N° 4)

5

Ejemplo 2 – rT1R3 y mT1R3

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

10

15

20

Orientación sentido en el segmento T1R3 de SAV115 de ratón (secuencia correspondiente al cebador degenerado eliminado) (SEC ID N° 9)

GTGCTGCTACTCCTCCTGCTGCTTTGCTGGTCTAGCACTGGCTGCTCTGGGGCT
 CTCTGTCCACCACTGGGACAGCCCTCTGTCCAGGCCTCAGGCGGCTCACAGTTCTGCTTT
 GGCCTGATCTGCCTAGGCCTCTTCTGCCTCAGTGTCTTCTGTTCCCAGGACGGCCAAGCTC
 TGCCAGCTGCCTTGCAACAACAACCAATGGCTCACCTCCCTCTCACAGGCTGCCTGAGCACA
 CTCTTCTGCAAGCAGCTGAGACCTTTGTGGAGTCTGAGCTGCCACTGAGCTGGGCAAAC
 GGCTATGCAGCTACCTTCGGGACTCTGGCCTGCTAGTGGTACTGTTGGCCACTTTTGTGGA

 GGCAGCACTATGTGCCTGGTATTTGACCGCTTACCAGAAGTGGTGACAGACTGGTCAGTG
 CTGCCACAGAGGTA CTGGAGCACTGCCACGTGCGTTCTGGGTCAA CCTGGGCTTGGTGC
 ACATACCAATGCAATGGTAGCTTTTCTCTGCTTTCTGGGCACTTTCCTGGTACAAGACCA
 G (SEC ID N° 9)

Traducción conceptual, segmento mT1R3 (SEC ID N° 10)

VLSLLLLLCLVLGLALAAALGLSVHHWDSPLVQASGGSQFCFGLICLGLFCLSVLLFPGRPSSASC
 LAQQPMAHLPLTGCLSTLFLQAAETVFESELPLSWANWLCSYLRDSGLLVVLLATFVEAALCA
 WYLTASPEVVTDWSVLPTEVLEHCHVRSWVNLGLVHITNAMVAFLCFLGTFLVQDQ (SEC ID
 N° 10)

**Orientación sentido en el segmento T1R3 de SAV118 de rata (secuencia correspondiente al cebador
 degenerado eliminado) (SEC ID N° 11)**

GTGCTGTCACTTCTCCTGCTGCTTTGCCCTGGTGGCCTGACACTGGCTGCCCTGGGGC
 TCTTTGTCCACTACTGGGACAGCCCTCTGTTCAGGCCTCAGGTGGGTCACTGTTCTGCTTT
 GGCCTGATCTGCCTAGGCCTCTTCTGCCTCAGTGTCTTCTGTCCCAGGACGACCACGCTC
 TGCCAGCTGCCTTGCCCAACAACCAATGGCTCACCTCCCTCTCACAGGCTGCCTGAGCACA
 CTCTTCTGCAAGCAGCCGAGATCTTTGTGGAGTCTGAGCTGCCACTGAGTTGGGCAAACCT
 GGCTCTGCAGCTACCTTCGGGGCCCCTGGGCTTGGCTGGTGGTACTGCTGGCCACTCTTGT
 GGAGGCTGCACTATGTGCCTGGTACTTGATGGCTTCCCTCCAGAGGTGGTGACAGATTGG
 CAGGTGCTGCCACGGAGGTACTGGAACACTGCCGCATGCGTTCCTGGGTGAGCCTGGGCT
 TGGTGACATCACCAATGCAGGGGTAGCTTTCCTCTGCTTCTGGGCACTTTCCTGGTACA
 AAGCCAG (SEC ID N° 11)

5

Traducción conceptual, segmento rT1R3 (SEC ID N° 12)

VLSLLLLLCLVLGLTLAALGLFVHYWDSPLVQASGGSLFCFGLICLGLFCLSVLLFPGRPRSASC
 LAQQPMAHLPLTGCLSTLFLQAAEIFVESELPLSWANWLCSYLRGPWAWLVLLATLVEAAL
 CAWYLMFAFPPEVVTDWQVLPTEVLEHCRMRSWVSLGLVHITNAGVAFLCFLGTFLVQSQ
 (SEC ID N° 12)

10

Ejemplo 3 – Clonación de rT1R3

Los fragmentos mT1R3 y rT1R3 identificados anteriormente como las SEC ID N° 9 y 11 se usaron para explorar una
 genoteca de ADNc procedente de tejido gustativo de rata. Se secuenció un clon positivo y se descubrió que contenía
 la secuencia de rT1R3 de longitud completa mostrada anteriormente como SEC ID N° 13. La comparación de
 secuencias de las secuencias parciales de mT1R3 y rT1R3 y la secuencia de hT1R3 de longitud completa estableció
 que este ADNc representa el homólogo del hT1R3. Por ejemplo, la identidad de pares de aminoácidos entre rT1R3 y
 hT1R3 es aproximadamente del 72%, mientras que la secuencia comentada más afín en el banco de datos público
 de secuencias de ADN tiene una identidad de aproximadamente el 33% con rT1R3.

15

20

Cds predichas de rT1R3 (SEC ID N° 13)

ATGCCGGGTTTGGCTATCTTGGGCCTCAGTCTGGCTGCTTTCCTGGAGCTTGGGATGGGGT
 CCTCTTTGTGTCTGTACAGCAATTCAAGGCACAAGGGGACTATATATTGGGTGGACTATT
 TCCCCTGGGCACAACTGAGGAGGCCACTCTCAACCAGAGAAACACAGCCCAACGGCATCCT
 ATGTACCAGGTTCTCGCCCCTTGGTTTGTTCCTGGCCATGGCTATGAAGATGGCTGTAGAG
 GAGATCAACAATGGATCTGCCTTGCTCCCTGGGCTGCGACTGGGCTATGACCTGTTTGACA
 CATGCTCAGAGCCAGTGGTCACCATGAAGCCCAGCCTCATGTTTCATGGCCAAGGTGGGAA
 GTCAAAGCATTGCTGCCTACTGCAACTACACACAGTACCAACCCCGTGTGCTGGCTGTCAT
 TGGTCCCCACTCATCAGAGCTTGCCTCATTACAGGCAAGTTCTTCAGCTTCTTCCTCATGC
 CACAGGTCAGCTATAGTGCCAGCATGGATCGGCTAAGTGACCGGGAACATTTCCATCCTT
 CTTCCGCACAGTGCCAGTGACCGGGTGCAGCTGCAGGCCGTTGTGACACTGTTGCAGAAT
 TTCAGCTGGAACCTGGGTGGCTGCCCTAGGTAGTGATGACTATGGCCGGGAAGGTCTG
 AGCATCTTTTCTGGTCTGGCCAACTCACGAGGTATCTGCATTGCACACGAGGGCCTGGTGC
 CACAACATGACACTAGTGGCCAACAATTGGGCAAGGTGGTGGATGTGCTACGCCAAGTGA
 ACCAAAGCAAAGTACAGGTGGTGGTGTGTTGCATCTGCCCGTGTGCTACTCCCTTTT
 TAGCTACAGCATCCTTCATGACCTCTCACCCAAGGTATGGGTGGCCAGTGAGTCCTGGCTG
 ACCTCTGACCTGGTCATGACACTTCCCAATATTGCCCGTGTGGGCACTGTTCTTGGGTTTCT
 GCAGCGCGGTGCCCTACTGCCTGAATTTTCCATTATGTGGAGACTCGCCTTGCCCTAGCT
 GCTGACCCAACATTCTGTGCCTCCCTGAAAGCTGAGTTGGATCTGGAGGAGCGCGTGATGG
 GGCCACGCTGTTCACAATGTGACTACATCATGCTACAGAACCTGTCATCTGGGCTGATGCA
 GAACCTATCAGCTGGGCAGTTGCACCACCAATATTTGCAACCTATGCAGCTGTGTACAGT
 GTGGCTCAGGCCCTTCAACAACCCTGCAGTGCAATGTCTCACATTGCCACACATCAGAGC
 CTGTTCAACCCTGGCAGCTCCTGGAGAACATGTACAATATGAGTTTCCGTGCTCGAGACTT
 GACACTGCAGTTTGATGCCAAAAGGAGTGTAGACATGGAATATGACCTGAAGATGTGGGT
 GTGGCAGAGCCCTACACCTGTACTACATACTGTAGGCACCTTCAACGGCACCCCTTCAGCTG
 CAGCACTCGAAAATGTATTGGCCAGGCAACCAGGTGCCAGTCTCCAGTGCTCCCGGCAGT
 GCAAAGATGGCCAGGTGCGCAGAGTAAAGGGCTTTCATTCTGCTGCTATGACTGTGTGG
 ACTGCAAGGCAGGGAGCTACCGGAAGCATCCAGATGACTTCACTGTACTCCATGTGGCA
 AGGATCAGTGGTCCCCAGAAAAAGCACAACCTGCTTACCTCGCAGGCCCAAAGTTTCTGGC
 TTGGGGGAGCCAGCTGTGCTGTCACTTCTCCTGCTGCTTTGCCTGGTGTGGGCCTGACA
 CTGGCTGCCCTGGGGCTCTTGTCCACTACTGGGACAGCCCTCTGTTTCAGGCCCTCAGGTG
 GGTCAGTGTCTGCTTTGGCCTGATCTGCCTAGGCCTCTTCTGCCTCAGTGTCTTCTGTTT
 CCAGGACGACCAGCTCTGCCAGCTGCCTTGCCCAACAACCAATGGCTCACCTCCCTCTCA
 CAGGCTGCCTGAGCACACTCTTCTGCAAGCAGCCGAGATCTTTGTGGAGTCTGAGCTGCC

ACTGAGTTGGGCAAACCTGGCTCTGCAGCTACCTTCGGGGCCCCTGGGCTTGGCTGGTGGTA
 CTGCTGGCCACTCTTGTGGAGGCTGCACTATGTGCCTGGTACTTGATGGCTTTCCCTCCAG
 AGGTGGTGACAGATTGGCAGGTGCTGCCACGGAGGTAAGTGAACACTGCCGCATGCGTT
 CCTGGGTGAGCCTGGGCTTGGTGCACATCAACAATGCAAGTGTAGCTTTCCCTCTGCTTTCTG
 GGCACCTTTCCTGGTACAGAGCCAGCCTGGTGCCTATAACCGTGCCCGTGGCCTCACCTTCG
 CCATGCTAGCTTATTTTCATCATCTGGGTCTCTTTTGTGCCCTCCTGGCTAATGTGCAGGTG
 GCCTACCAGCCAGCTGTGCAGATGGGTGCTATCTTATTCTGTGCCCTGGGCATCCTGGCCA
 CCTCCACCTGCCAAAATGCTATGTACTTCTGTGGCTGCCAGAGCTCAACACCCAGGAGTT
 CTTCCTGGGAAAGGAGCCCCAAGGAAGCATCAGATGGGAATAGTGGTAGTAGTGAGGCAAC
 TCGGGGACACAGTGAATGA (SEC ID N° 13)

Traducción conceptual de rT1R3 (SEC ID N° 14)

MPGLAILGLSLAAFLLELGMGSSLCLSQQFKAQGDYILGGLPPLGTTEEATLNQRTQPNGILCTRF
 SPLGLFLAMAMKMAVEEINNGSALLPGLRLGYDLFDTCSEPVVMTKPSLMFMAKVGSQSIAA
 YCNYTQYQPRVLA VIGPHSSELALITGKFFSFFLMPQVSYASMDRLSDRETFPSFFRTVPSDRV
 QLQAVVTLQNFSSWNWVAALGSDDDYGREGLSIFSGLANSRGICIAHEGLVPQHDTSGQQLG
 KVVVDVLRQVNQSKVQVVVLFASARAVYSLFSYSILHDLSPKVWVASESWLTSDLVMTLPNIA
 RVGTVLGLRQRGALLPEFSHYVETRLALAADPTFCASLKABLDLEERVMGPRCSQCDYIMLQN
 LSSGLMQNLSAGQLHHQIFATYAAVYSVAQALHNTLQCNVSHCHTSEPVQPWQLLENMYNM
 SFRARDLTLQFDAQGSVDMBYDLKMVWVWQSPTPLHTVGTFTNGTLQLQHSKMYWPGNQVP
 VSQCSRQCKDGQVRRVKGFHSCCYDCVDCKAGSYRKHPPDDFTCTPCGKDQWSPEKSTTCLPR
 RPKFLAWGEPAVLSLLLLLCLVLGLTLAALGLFVHYWDSPLVQASGGSLFCFGLICLGLFCLSV
 LLFPGRPRSASCLAQQPMAHLPLTGCLSTLFLQAAEIFVESELPLSWANWLC SYLRGPWAWLV
 VLLATLVEAALCAWYLMAFPPEVVDWQVLPTEVLEHCRMRSWVSLGLVHITNAVLAFLCFL
 GTFLVQSQPGRYNRARGLTFAMLAYFIWVSFVPLLANVQVAYQPAVQMGAIFCALGILATF
 HLPKCYVLLWLPELNTQEFLGRSPKEASDGNSGSSEATRHHSE (SEC ID N° 14)

Ejemplo 4 – Expresión de mT1R3

- 5 El fragmento de T1R3 de ratón descrito anteriormente contenido en SAV115 se amplificó por PCR usando cebadores directo M13 e inverso M13 y después se purificó en gel. El molde de ADN de T1R3 se dispuso en una reacción *in vitro* marcada para la transcripción donde se incorporó UTP marcado con Digoxigenina en una sonda de ARNc antisentido. Esta sonda se hibridó con tejido gustativo de ratón adulto contenido en las papilas circunvaladas. La hibridación y la detección de T1R3 *in situ* se realizaron siguiendo el protocolo de Schaeren-Wiemers *et al*,
 10 *Histochemistry*, 100: 431-400 (1993). En resumen, se seccionó lengua de ratón recién congelada a 14 µm y se preparó para la hibridación. Durante 14 horas a 72°C se hibridaron 200 ng/ml de la sonda antisentido de T1R3 marcada con Digoxigenina. La posthibridación consistió en un lavado de SCC 2x a 72°C. La detección de Digoxigenina se realizó incubando con dilución de anticuerpo anti-DIG conjugado con fosfatasa alcalina 1:5000 seguido de una reacción de 12 horas de la fosfatasa en NBT/BCIP. La Figura 1 muestra la expresión del gen de
 15 T1R3 en botones gustativos de papilas circunvaladas de ratón.

Ejemplo 5-hT1R1

- 20 A continuación se proporciona, como SEC ID N° 15, el ortólogo humano (n° de acceso a la base de datos AL1S9177) de un receptor gustativo de rata, denominado rT1R1. Las cds predichas se indican en negrita y algunos intervalos de la secuencia intrónica se representan como series de N. Los nucleótidos y las secuencias de hT1R1 traducidas conceptualmente también se describen en este documento como SEC ID N° 16 y 17, respectivamente.

ADN genómico de hT1R1 (SEC ID N° 15)

GAGAATCTCGCGAGATCCCGTCCGGTCCGCCCGCTGCCCTCCCAGCTGCCGAAAAGAGGG
GCCTCCGAGCCGCGGGCGCCCTCTGCCGGCAACCTCCGGAAGCACACTAGGAGGTTCCAG
CCGATCTGGTTCGAGGGGCTCCACGGAGGACTCCATTTACGTTACGCAAATTCCTACCCCA
GCCGGCCGGAGAGAGAAAAGCCAGAAACCTCGCGACCAGCCATGGGCCACCTCTCCGGAAA
AACACCGGGATATTTTTTTCTCCTGCAGAAAAAGCTTTAGGATTGGCAGTTTAAACAAAA
CATGTCTATTTGCATACCTTCGGTTTGCATGCATTTGTTTCGAAAGTGAGCAACCCTGGGTA
ACAAGGCGAAAAGTATATGACAATTTGCTCAGAATCTTAATGTCAGAAAACCTGGAGACTGG
GGCAGGGGGGTGTCGACTCAAAGCTGTGTCTCATTTAGTAAACTGAGGCCAGGTAAAAA
GTTCTGAAACCTCGCAACACCCGGAGAAATTGTGTTCCAGCCTCCCACCTCGCCCCAAAAT
GCCAGAGCTCCTTTTCTAAGCCAGGTGAAGTCACAGAGCGTGGACAGAACCACAAACCGT
CCAGAGGAAGGGTCACTGGGTGCCACCTGGTTTGCATCTGTGCCTTCGTCTGCCAGTTC
CTGAGTGGGACCGCAGGCCCGGAATGTCAAGGCAAACAGTCCTGCTTCAGCCACTGGGCT
CCAGTCCCACCCCTTTTGGGGCCTGAAGTTAGGAAGCATCCGGCAGCTGCCTTCTATTTA
AGCAACTGGCCTCCTTAGAGGCCACTCCTTGGCCATGCCAGGCGGGGCATCTGGCCAGCA
TGCTGCTCTGCACGGCTCGCCTGGTCCGCTGCAGCTTCTCATTTCCTGCTGCTGGG
CCTTTGCCTGCCATAGCACGGAGTCTTCTCCTGACTTCACCCTCCCCGGAGATTACCT
CCTGGCAGGCCTGTTCCCTCTCCATTCTGGCTGTCTGCAGGTGAGGCACAGACCCGA
GGTGACCCTGTGTGACAGGTGAGTGAGGGGCCAGCAGAGCCACACTTAGTGGGACCCCT
GGCTATAGGGCCCCTCTGGCTGCCATCCTCCAAACAGGACCTTGCCTCTGCCTTTGCCCTT
GAACTGTCCCAGGCCTTGTTTCATCAATCCACTTGCCACCTAAGTGCTGGCTAGACCTTCCT
AGACACTTCGGCCAGTTTCCAATTATTTACCCTTGCTGTTAGAATGTNNNNNNNNNNNNNN
NNAAATTCCTTAAACTAAATTTCTC
ACTTTCTCTCTCTCTCTGGAAAAACTGACTAATGTAGCAGGTTTCTCTGCTCCAGGACTTC

AGGACCTTTTCGATGCTAATAAGTTTCTCCATCAGGGCCAGCTTGTTCCTCCTACTGAGCTT
 GAGAGCCCTTGTGAAGTTGTGGTTTGGGGGACTGGACCGATGACCTCAAAGGTTCCCTTT
 GCTCCCAAGCCTCAGAGTCTAGGAGGCCAGAGGGTCTCAGCAGGCCTTTGTCCTTCTCAGC
 TGTCTCTACTGGCTTTCTCCACAGGCTTGTAGCTTCAATGAGCATGGCTACCACCTCT
 TCCAGGCTATGCGGCTTGGGGTTGAGGAGATAAACTCCACGGCCCTGCTGCCCA
 ACATCACCTGGGGTACCAGCTGTATGATGTGTGTTCTGACTCTGCCAATGTGTATGC
 CACGCTGAGAGTGTCTCCCTGCCAGGGCAACACCACATAGAGCTCCAAGGAGACCT
 TCTCCACTATTCCCCTACGGTGTGGCAGTGATTGGGCCTGACAGCACCAACCGTGC
 TGCCACCACAGCCGCCCTGCTGAGCCCTTTCTGGTGCCCATGGTAAGCTGGAGCCCTC
 AGACCTTTGCCCATCTCCCTCAGGCAAGTCTGGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGCCACCATGCCCGGCTAATTTTTTTGTATTTTAG
 TAGAGACGGGGTTTACCGTGTAGCCAGGCTGGTCGAAACTCTAACCTCGTGATCCAC
 CCACCTCGGCCTCCCAATGTGCTGGGATTACAGGTGTGAGCCACTGCACCCGGCCATAATG
 TATTAATATAATAAAATAATTATACAACCTACCATAATGTAGAATCAGTGGGAGCCCTGAG
 CTGTTTTTCTACAACCTAGATGGTCCCATCTGGGGGTGATGGGAGACAGTGACAGATCATC
 AGACATTAGATTCTCATAAGTAGCGTGCAACCCAGATCCCTCGCATGTGCAGTTCACAGTA
 GGGTCAAGCTCCTACAAGAATCTGATGCTGCTGCTGATCTGACAGGAGGGGAGCAGCTG
 TAAATACAGATGAAGCTTCGCTTACTCACCAGCTGCTCACCTCCTCCTGTGAGGCCCGGTT
 CCTAACAGGCCACTGACCTAATTCTGCCCTGACCTACACATGCTTCTCTTCTCCTTGCAA
 ACTGCCCTCAGTGGAAGTCCCTGAAGGTCCCCAAACACACGGGACTATTTCACTCCTATGC
 AGGTTTTGTCTCCTTTGCTTGAATGCATCCCCTCACCCCTTGTCCCCAGGCAGATTCCCAC
 CCTCCCCCAGAACCTGCCCAAGTGGAGCCTTCGCAGGTGATTTGTCAGTTTCACAGGCTG
 AGGGGTGCTCTCCTGGTCTCCCCGGCTCCCTGTATCCCCACCCAGCACAGGGCCAGGCA
 CTGGGGGGGCTTCAAGTGGAGACTGAAATGGCTGAACGGGACCTCCCATAGATTAGCTAT
 GCGGCCAGCAGCGAGACGCTCAGCGTGAAGCGGCAGTATCCCTCTTTCTGCGCACCC
 ATCCCCAATGACAAGTACCAGGTGGAGACCATGGTGTGCTGCTGCTGCAGAAGTTCGGG
 TGGACCTGGATCTCTCTGGTTGGCAGCAGTGACGACTATGGGCAGCTAGGGGTGCAG
 GCACTGGAGAACCAGGCCACTGGTCAGGGGATCTGCATTGCTTTCAAGGACATCATG
 CCCTTCTCTGCCAGGTGGGCGATGAGAGGATGCAGTGCCTCATGCGCCACCTGGCC
 CAGGCCGGGGCCACCGTGGTGGTTGTTTTTCCAGCCGGCAGTTGGCCAGGGTGT
 TTCGAGTCCGTGGTGTGACCAACCTGACTGGCAAGGTGTGGGTGCGCTCAGAAGCC
 TGGGCCCTCTCAGGCACATCACTGGGGTGCCCGGGATCCAGCGCATTGGGATGGTG
 CTGGGCGTGGCCATCCAGAAGAGGGCTGTCCCTGGCCTGAAGGCGTTTGAAGAAGCC
 TATGCCCGGGCAGACAAGAAGGCCCTAGGCCTTGCCACAAGGGCTCCTGGTGCAGC
 AGCAATCAGCTCTGCAGAGAATGCCAAGCTTTCATGGCACACAGATGCCCAAGCTC
 AAAGCCTTCTCCATGAGTTCTGCCTACAACGCATACCGGGCTGTGTATGCGGTGGCC
 CATGGCCTCCACCAGCTCCTGGGCTGTGCTCTGGAGCTTGTTCAGGGGGCCGATC
 TACCCCTGGCAGGTAAAGAGAGCCCACCCAGCACCTCCTGTGAGGAGAACAGCCAATCC
 TGAGATGAGCAGAGTGGGCACTCTCCGGTCACTCTAAATGCCAAGGGGGATAAATGCCAC

TAACTTGAGGTTTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGAGACAGTCTGGCTCTGTCACCCA
 GGCTGCAGTGTAGTGATGCGATCTCGGCTCTCTGCAACTTCCACCTCCTGGGTTCAAGTGA
 TTCTCTGCCTCGGCCCTCTGAGTAGCTGGGATTACAGGCACCCACCACCATGCCTGGATA
 ATTTTTCTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGATAGAGTCTCGCTCTGTTGCCAGGCTGGAATGC
 AGTGGTGCATCTTGGCTCACTGTGAGCTCCGCCTCCAGGTTCACTCCATTCCCCTGCCTC
 AGCCTCCCAAGTAGGTGGGACTACGGGCGCCCGCCACCACGCCAGCTAATTTTTTTTTGTA
 TTTTGAGTAGAGACGGGGTTTACCATGTTAGCCAGGATGGTCTCAATCTCTGACCTTGT
 CATCCGCCACCTCGTCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCGCACCCGGC
 CTAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGATGGGGTTTACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGAAC
 TCCTGGCATCAAGTGATCCTCCTGCTTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCATTAG
 CTCTCTTCTCTTAGACAGATCTTCTCTCTGATCCTTGCCTTCTCTCACCCACTGTGTCTTG
 AAGTGTCAAGTGATAAGATCCAGGGCTAAAAGTGTCTGTAAAGGAGTGTGTTGTTAGAGGC
 CTCTCTCAGGAGGTTGGTGGGGAAGATTGAGGGGCTTCCTAAGAAGGAAGGGACGAGAC
 CTTCCTGATGGGCTGAAACCACCAGGACGAAACCAGGAAGGCCCCAGGCCCTTGCTTCT
 GGGACCATGTGGGTCTGTGCTGTCTGTGGTGGCTTCATGATACGCGTTTCTTTCAGCTTTT
 GGAGCAGATCCACAAGGTGCATTTCTTCTACACAAGGACACTGTGGCGTTTAATGA
 CAACAGAGATCCCCTCAGTAGCTATAACATAATTGCCTGGGACTGGAATGGACCCAA
 GTGGACCTTACGGTCTCGGTTCCCTCCACATGGTCTCCAGTTCAGCTAAACATAAAT
 GAGACCAAATCCAGTGGCACGGAAAGGACAACCAGGTAATGGGGATGTGGCTACTCA
 CCATGTAAGTGGCTTATGGGCAACCTAGAGCCTGGGGGTGATGCTGACACAGTGTACAGG
 GAGCAGGAGGGGGGCCCCAGGGGTCCAGCTGCCACCACTCTACCCATCCTGGCCAGGGAA
 GCAGGGAAGACACTCCGTAGGCGAGTGTGCAGATGCCCTGGGGCGGAAGTTCACACGAOC
 AGGGGCCCTGCCCTGGGAGTGAGCCCTGAGGGCAGATGCACAGAGATTCTGTTTTCTGTT
 CACATGTGAGCTGTCTTTGACTTGGGCCCTACGTGTGGCCCCTCTGGCTTCTTACAGGT
 GCCTAAGTCTGTGTGTTCCAGCGACTGTCTTGAAGGGCACCCAGCGAGTGGTTACGGG
 TTTCCATCACTGCTGCTTTGAGTGTGTGCCCTGTGGGGCTGGGACCTTCTCAACAAG
 AGTGGTGAAGTGGGCAATGGAGCAGGCGAGCTACCCAGCACTCCCGGGGGCTGCACGGTGG
 AGGGAGGGCCTCCCTTGGGCCCATGTGCCCTGCCCCAGAACCAAGGCCAGTCACTGGG
 CTGCCAGTTAGCTTCAGGTTGGAGGACACCTGCTACCAGACAGAATTCTGATCAAGAGAAT
 CAGCCACTGGGTGCGGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGCGGG
 TGGATCACTTGAGGTGCGGAGTTTCGAGACCAGCCTGGCCAACATGGTCAAACCCCATCTCT
 ACCAAAAATATAAAAAATTAGCTGGGTGTGGTGGCGCGTGCCTGTAATCCCAGCTACTCG
 GGAGGCTGAGGCAGGAGAATCACTTGAACCCAGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCCAAGA
 TGCATTCCAGCCTGGACCAAAAGCGAGAATTCGTCCCCCAAAAAAAGAAAGGAGGCCG
 GCGCGGTGGCTCACACCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGTGGGTGGATCACC
 TGAGGTCAGGAGTTCGAGACCAGCCTGACCAACATGGTCAAACCCATCTCTACTAAAAA
 TACAAAAAAGTTAGCCGGGCGTTGTGGCGTGTGCCCTGTAATTCAGCTACTCGGGAGGCT
 GAGGCAGGAGAATTGCTTGAACCCGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCCAAGATTGCACCA
 TTGCACTCCAGCCTGGGCGACAAGAGAAAAACTCTGTCTCAAAAAAAGAAAGAAAGAA

AGAATTAGCCAACTGAAAGCCTTAGACTGAGGTGTGTCCTCTGTTAGAGAGCTGTCATCAC
 AACTCCTACAAAAGCAGTCGTATCCTGAATTC AACCTCTTTCTCTAAATGAATATAGCTAT
 TGTTCCTTTGTGCCCTCTTGTCCTACTGTCCCTTCTGTTGCCCATGCCAAAGACAGCTAGC
 TCCTTGAACAGCTTGGCCTGAATACAGATACTAGCGTGTCTGCAGCAGAGAAAAAACAG
 CATTOCCCATCCAGAAATGCAAGGTCAA GAACAGAGAGCAAATTAGGTAGCTAAGGACTC
 AGGTCCTTAGTTGCTGTCCAGGGGCCACATTCCTTCCCTTTCACCATCTCTGTAGGGACAGG
 AATACTTCCCTTCTGTCTCAGAGGGTCAAGACTCAGAGAAAACCACAGAGCAGCAGCTCA
 GGAAAGTGGTTCATG GAAATGCTGGCAAGAGAGAGGGGTTACAATGCOCTCCCTTGGGAG
 CAGGCTGCTCCCATCAGATCGTAACCTCTCTGCTATGTGGGCAGAGCTACCAGGTTAA GGT
 CCTCCCTAGGGTTTGCAA AACCCCTCATGGGATCATGAGCCATACAGAAACCACCTGTGTGT
 CTCCAGAGTCTGTAATTAACACAGGCATTTTGAGGAAATGCGTGGCCTCAGGCCCCACTCC
 CGGCTACCCCATCCCACTATGCCTAGTATAGTCTAGCTGCCCTGGTACAATTCTCCCA GT
 ATCTTGCAGGCCCTATTTCCTATTCCTACTCTGCTCATCTGGCTCTCAGGAACCTTCTTGG
 CCTTCCCTTTCAGACCTCTACAGATGCCAGCCTTGTGGGAAAGAAGAGTGGGCACCTG
 AGGGAAGCCAGACCTGCTTCCCGCGCACTGTGGTGT TTTTGGCTTTGCGTGAGCACA
 CCTCTTGGGTGCTGCTGGCAGCTAACACGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGGACTG
 CTGGCCTGTTTGCCTGGCACCTAGACACCCCTGTGGTGAGGTCAGCAGGGGGCCGCC
 TGTGCTTTCTTATGCTGGGCTCCCTGGCAGCAGGTAGTGGCAGCCTCTATGGCTTCTT
 TGGGGAACCCACAAGGCCTGCGTGCTTACGCCAGGCCCTCTTTGCCCTTGGTTT
 CACCATCTTCTGTCTGCTGACAGTTCGCTCATTCCA ACTAATCATCATCTTCAAG
 TTTTCCACCAAGGTACCTACATTCTACCACGCTGGGTCCAAAACCACGGTGCTGGCC
 TGTTTGTGATGATCAGCTCAGCGGCCAGCTGCTTATCTGTCTAACTTGGCTGGTGGT
 GTGGACCCCACTGCCTGCTAGGGAATACCAGCGCTTCCCCATCTGGTGATGCTTGA
 GTGCACAGAGACCAACTCCCTGGGCTTACTACTGGCCTTCTCTACAATGGCCTCTC
 TCCATCAGTGCTTTGCTGCAGCTACCTGGGTAAGGACTTGCCAGAGA ACTACAAC
 GAGGCCAAATGTGTCACTTCAGCCTGCTCTTCAACTTCGTGTCTTGGATCGCCTTCT
 TCACCACGGCCAGCGTCTACGACGGCAAGTACCTGCCTGCGGCCAACATGATGGCTG
 GGCTGAGCAGCCTGAGCAGCGGCTTCGGTGGGTATTTTCTGCCTAAGTGCTACGTGA
 TCCTCTGCCGCCAGACCTCAACAGCACAGAGCACTTCCAGGCCTCCATT CAGGACT
 ACACGAGGGCGCTGCGGCTCCACCTGACCAGTGGGT CAGCAGGCACGGCTGGCAGCCTC
 TCTGCCCTGAGGGT CGAAGGTGAGCAGGCCGGGGTGTCCGGGAGGTCTTTGGGCA TCG
 CGGTCTGGGGTTGGGACGTGTAAGCGCCTGGGAGAGCCTAGACCAGGCTCCGGGCTGCCA
 ATAAAGAAGTGAATGCGTATCTGGTCTCCTGTCTGTGGGAGAGTGTGAGGTGTAACGGAT
 TCAAGTCTGAACCCAGAGCCTGGAAAAGGCTGACCGCCAGATTGACGTTGCTAGGCAAC
 TCCGGAGGGGGGCCAGCGCCAAAAGAA CAGGGCGAGGCCTCGTCCCGCATCCCATTTGG
 CCGTCTCTGCGGGGCCCGCCCTGCGGGCCGAGCTAGAAGCTCTACGCTTCCGAGGCG
 CACCTCCTGGCCTGCACGCTTTGACGT (SEC ID N° 15)

Cds predichas hT1R1 (SEC ID N° 16)

ATGCTGCTCTGCACGGCTCGCCTGGTCCGCCTGCAGCTTCTCATTTCCTGCTGCTGGGCCTT
 TGCTGCCATAGCACGGAGTCTTCTCCTGACTTCACCCCTCCCCGGAGATTACCTCCTGGCA
 GGCTGTCCCTCTCCATTCTGGCTGTCTGCAGGTGAGGCACAGAOCAGAGGTGACCCCTGT
 GTGACAGGTCTTGTAGCTTCAATGAGCATGGCTACCACTCTTCCAGGCTATGCGGCTTGG
 GTTGAGGAGATAAACAACTOCACGGCCCTGCTGCCAACATCAACCCTGGGGTACCAAGCT
 GTATGATGTGTGTTCTGACTCTGCCAATGTGTATGCCACGCTGAGAGTGCTCTCCCTGCCA
 GGGCAACACCATAGAGCTCCAAGGAGACCTTCTCCACTATTCCCCTACGGTGCTGGCAG
 TGATTGGCCCTGACAGCACCAACCGTGCTGCCACCACAGCCGOCCTGCTGAGCCCTTTCCT
 GGTGCCCATGATTAGCTATGCGGCCAGCAGCGAGACGCTCAGCGTGAAGCGGCAGTATCC
 CTCTTTCCTGCGCACCATCCCCAATGACAAGTACCAGGTGGAGACCATGGTGCTGCTGCTG
 CAGAAGTTCGGGTGGACCTGGATCTCTCTGGTTGGCAGCAGTGACGACTATGGGCAGCTA
 GGGGTGCAGGCACCTGGAGAACCAGGCCACTGGTCAGGGGATCTGCATTGCTTTCAAGGAC
 ATCATGCCCTTCTCTGCCAGGTGGGCCGATGAGAGGATGCAGTGCCCTCATGCGCCACCTGG
 CCCAGGCCGGGCCACCGTCGTGTTGTTTTTCCAGCCGGCAGTTGGCCAGGGTGTTTTT
 CGAGTCCGTGGTGTGCTGACCAACCTGACTGGCAAGGTGTGGGTCCGCTCAGAAGCCTGGGC
 CCTCTCCAGGCACATCACTGGGGTGCCCGGGATCCAGCGCATTGGGATGGTGCTGGGCCT
 GGCATCCAGAAGAGGGCTGTCCCTGGCCTGAAGGCGTTTGAAGAAGCCTATGCCCGGGC
 AGACAAGAAGGCCOCTAGGCCTTGCCACAAGGGCTCCTGGTGCAGCAGCAATCAGCTCTG
 CAGAGAATGCCAAGCTTTCATGGCACACAGATGCCCAAGCTCAAAGCCTTCTCCATGAGT
 TCTGCCTACAACGCATACCGGGCTGTGTATGCCGTGGCCATGGCCCTOCACCAGCTCCTGG
 GCTGTGCCTCTGGAGCTTGTTCAGGGGCCGAGTCTACCCOCTGGCAGCTTTTGDAGCAGAT
 CCACAAGGTGCATTTCTTCTACACAAGGACACTGTGGCGTTAATGACAACAGAGATCCC
 CTCAGTAGCTATAACATAATTGCCTGGGACTGGAATGGACCCAAGTGGACCTTCACGGTCC
 TCGGTTCCCTCCACATGGTCTCCAGTTCAGCTAAACATAAATGAGACCAAAATCCAGTGGCA
 CGGAAAGGACAACCAAGGTGCCAAGTCTGTGTGTTCACCGACTGTCTTGAAGGGCACCA
 GCGAGTGGTTACGGGTTTCCATCACTGCTGCTTTGAGTGTGTGCCCTGTGGGGCTGGGACC
 TTCTCAACAAGAGTGACCTCTACAGATGCCAGCCTTGTGGGAAAGAAGAGTGGGCACCT
 GAGGGAAAGCCAGACCTGCTTCCCGGCACCTGTGGTGTTTTTGGCTTTGCGTGAGCACAOC
 CTTGGGTGCTGCTGGCAGCTAACAOCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGGACTGCTGGCCT
 GTTGGCTGGCACCTAGACACCCCTGTGGTGAGGTGAGCAGGGGGCCGCTGTGCTTTCTT
 ATGCTGGGCTCCCTGGCAGCAGGTAGTGGCAGCCTCTATGGCTTCTTTGGGGAACCCACAA
 GGCTGCGTGCTTGCTACGCCAGGCCCTCTTTGCCCTTGGTTTACCATCTTCCGTCCCTGC
 CTGACAGTTGCTCATTTCCAATAATCATCATCTTCAAGTTTCCACCAAGGTACCTACATT
 CTACCACGCTGGGTCCAAAACCAGGTGCTGGCCTGTTTGTGATGATCAGCTCAGCGGCC
 CAGCTGCTTATCTGTCTAACTTGGCTGGTGGTGTGGACCCCACTGCCTGCTAGGGAATACC
 AGCGCTTCCCCCATCTGGTGTGCTTGTGAGTGCACAGAGACCAACTCCCTGGGCTTCATACT
 GGCCTTCCCTCTACAATGGCCTCCTCTCCATCAGTGCCTTTGCCCTGCAGCTACCTGGGTAAG
 GACTTGCCAGAGAACTACAACGAGGCCAAATGTGTCACCTTCAGCCTGCTCTTCAACTTCG

TGTCCTGGATOGCCTTCTTCAACCACGGCCAGCGTCTACGACGGCAAGTACCTGCCTGCGGC
CAACATGATGGCTGGGCTGAGCAGCCTGAGCAGCGCCTTCGGTGGGTATTTTCTGCTAAG
TGCTACGTGATCCTCTGCCGCCAGACCTCAACAGCACAGAGCACTTCCAGGCTCCATTC
AGGACTACACGAGGCGCTGCGGCTCCACCTGA (SEC ID N° 16)

Traducción conceptual de hT1R1 (SEC ID N° 17)

MLLCTARLVGLQLLISCCWAFACHSTESSPDTLPDYLGLFPLHSGCLQVRHRFEVTLCDR
SCSFNBHGYHLFQAMRLGVEEINNSTALLPNTLGYQLYDVCSDSANVYATLRVLSLPGQHIE
LQODLLHYSPTVLA VIGPDSTNRAATTAALLSPFLVPMISYAASSETLSVKRQYPSFLRTIPNDK
YQVETMVL LLQKFGWTWISLVGSSDDYQQLGVQALENQTGQGICIAFKDIMPSAQVGDER
MQCLMRHLAQA GATVVVVFSRQLARVFFESVVLTNLTGKVWVASEAWALSRHTGVPGIQR
IGMVLGVAIQKRAVPGLKAFBEAYARADKKAPRPCCHKGSWCSSNQLCRECQAFMAHTMPKL
KAFSMSSAYNAYRAVYAVAHGLHQLLGCASGACSRGRVYPWQLLEQIHKVHFLHKTVAF
NDNRDPLSSYNLAWDWNGPKWTFVLSSTWSPVQLNINETKIQWHGKDNQVPKSVCSDDC
LEGHQRVVTFHFHCCFECVPCGAGTFLNKSDLYRCQPOGKBEWAPEGSQTCFPRTVVFLALRE
HTSWVLLAANTLLLLLLGTAGLFAWHLDTPVVRSAGGRLCFLMLGSLAAGSGSLYGFFGEBT
RPACLLRQALFALGFTIFLSCLTVRSFQLIHFKPKSTKVPTFYHAWVQNHGAGL FVMISSAAQLLI
CLTWLVVWTPLPARBYQRFPHLVMLECTETNSLOFILAFLYNGLLSISAFACSYLGKDLPENYN
BAKCVTFSLIFNFVSWIAFFTASVYDGKYLPAANMMAGLSSLSSGFGGYFLPKCYVILCRPIDL
NSTEHFQASIQDYTRRCGST (SEC ID N° 17)

5

LISTA DE SECUENCIAS

<110> SENOMYX, INC.

<120> RECEPTORES GUSTATIVOS DE T1R Y GENES QUE LOS CODIFICAN

5

<130> 301586.EP3/JND/CJS

<140>

<141> 07-03-2001

10

<150> 60/187.546

<151> 07-03-2000

15

<150> 60/195.536

<151> 07-04-2000

<150> 60/209.840

<151> 06-06-2000

20

<150> 60/214.213

<151> 23-06-2000

<150> 60/226.448

<151> 17-08-2000

25

<150> 60/259.227

<151> 03-01-2001

<160> 20

30

<170> PatentIn ver. 2.1

<210> 1

<211> 876

35

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

agcctggcag tggcctcagg cagagtctga cgcgcacaaa ctttcaggcc caggaagcga 60
ggacaccact ggggccccag ggtgtggcaa gtgaggatgg caagggtttt gctaaacaaa 120
tcctctgccc gctccccgcc ccgggctcac tccatgtgag gccccagtcg gggcagccac 180
ctgccgtgcc tgttgggaagt tgcctctgcc atgctgggcc ctgctgtcct gggcctcagc 240
ctctgggctc tcctgcaccc tgggacgggg gccccattgt gcctgtcaca gcaacttagg 300
atgaaggggg actacgtgct gggggggctg ttccccctgg gcgaggccga ggaggctggc 360
ctccgcagcc ggacacggcc cagcagccct gtgtgcacca ggtacagagg tgggacggcc 420
tgggtcgggg tcagggtgac caggtctggg gtgctcctga gctggggccg aggtggccat 480
ctgcggttct gtgtggcccc aggttctcct caaacggcct gctctgggca ctggccatga 540
aaatggccgt ggaggagatc aacaacaagt cggatctgct gcccgggctg cgcttgggct 600
acgacctctt tgatacgtgc tcggagcctg tgggtggccat gaagccagc ctcatgttcc 660
tggccaaggc aggcagccgc gacatcggc cctactgcaa ctacacgcag taccagcccc 720
gtgtgctggc tgtcatcggg ccccactcgt cggcatctgc catggtcacc ggcaagttct 780
tcagcttctt cctcatgccc cagtggggcg cccccacca tcacccacc ccaaccaacc 840
cctgccccgt gggagcccct tgtgtcagga gaatgc 876
    
```

40

<210>2

<211>2687

<212>ADN

<213> Homo sapiens

45

<400> 2

```

tacatgcacc ccaccagcc ctgccctggg agccctgtgt cagaagatgc tcttggcctt 60
gcaggtcagc tacggtgcta gcatggagct gctgagcgcc cgggagacct tcccctcctt 120
cttcgcgacc gtgcccagcg accgtgtgca gctgacggcc gccgaggagc tgctgcagga 180
gttcggctgg aactgggtgg ccgcccctgg cagcgacgac gagtacggcc ggcagggcct 240
gagcatcttc tcggccctgg ccgcgacag cggcatctgc atcgcgcaeg agggcctggt 300
gccgctgccc cgtgccgatg actcgcggct ggggaagggt caggacgtcc tgcaccaggt 360
    
```

gaaccagagc	agcgtgcagg	tgggtgctgct	gttcgectcc	gtgcacgccg	cccacgccct	420
cttcaactac	agcatcagca	gcaggctctc	gcccagggtg	tgggtggcca	gcgaggcctg	480
gctgacctct	gacctggtca	tggggctgcc	cgcatggcc	cagatgggca	cggtgcttgg	540
cttcctccag	aggggtgccc	agctgcacga	gttccccag	tacgtgaaga	cgcacctggc	600
cctggccacc	gacccggcct	tctgctctgc	cctgggcgag	agggagcagg	gtctggagga	660
ggacgtggtg	ggccagcgct	gcccgcagtg	tgactgcatac	acgctgcaga	acgtgagcgc	720
agggctaaat	caccaccaga	cgttctctgt	ctacgcagct	gtgtatagcg	tggcccaggc	780
cctgcacaac	actcttcagt	gcaacgcctc	aggctgcccc	gcgaggacc	ccgtgaagcc	840
ctggcaggtg	agccccggag	atgggggtgt	gctgtcctct	gcatgtgcc	aggccaccag	900
gcacggccac	cacgcctgag	ctggagggtg	ctggcgctc	agccccgtcc	cccgcccgca	960
gctcctggag	aacatgtaca	acctgacctt	ccacgtgggc	gggctgccgc	tgcggttcga	1020
cagcagcggg	aacgtggaca	tggagtacga	cctgaagctg	tgggtgtggc	agggctcagt	1080
gcccaggctc	cacgacgtgg	gcaggttcaa	cggcagctc	aggacagagc	gcctgaagat	1140
ccgtgggac	acgtctgaca	accaggtag	gtgagggtgg	gtgtgccagg	gctgccgtg	1200
gtagcccccg	cggcagggcg	cagcctgggg	gtgggggccc	ttccagtctc	ccgtgggcat	1260
gcccagccga	gcagagccag	accccaggcc	tgtgcgcaga	agccccgtgtc	ccggtgctcg	1320
cggcagtgcc	aggaggccca	ggtgcgcccg	gtcaaggggt	tccactcctg	ctgctacgac	1380
tgtgagcgg	gcgagggcgg	cagctaccgg	caaaaaccag	gtgagccgcc	ttccccggag	1440
gcgggggtgg	gaacgcagca	ggggagggtc	ctgcaagtc	ctgactctga	gaccagagcc	1500
cacagggtag	aagacgaaca	cccagcgcct	ttctctctc	tcacagacga	catcgctctg	1560
accttttgtg	gccaggatga	gtggtccccg	gagcgaagca	cacgctgctt	ccgccgcagg	1620
tctcgtgtcc	tggcatgggg	cgagccggct	gtgctgctgc	tgctcctgct	gctgagcctg	1680
gcgctgggcc	ttgtgctggc	tgctttgggg	ctgttctgtc	accatcggga	cagccccactg	1740
gttcaggcct	cgggggggcc	cctggcctgc	tttggcctgg	tggtcctggg	cctggtctgc	1800
ctcagcgtcc	tctgttccc	tggccagccc	agcctgccc	gatgcctggc	ccagcagccc	1860
ttgtcccacc	ccccgctcac	gggctgcctg	agcacactct	tcctgcaggg	ggccgagatc	1920
ttcgtggagt	cagaactgcc	tctgagctgg	gcagaccggc	tgagtggctg	cctgcggggg	1980
ccctgggctc	ggctgggtgt	gctgctggcc	atgctgggtg	aggtgcact	gtgcacctgg	2040
tacctgggtg	ccttcccgc	ggagggtggg	acggactggc	acatgctgcc	cacggaggcg	2100
ctggtgcact	gccgcacag	ctcctgggtc	agcttcggcc	tagegcacgc	caccaatgac	2160
acgctggcct	ttctctgctt	cctgggcact	ttctgggtgc	ggagccagcc	gggtgctcac	2220
aacctgcccc	gtggcctcac	ccttggccatg	ctggcctact	tcatacactg	ggctcctttt	2280
gtgccccctc	tggccaatgt	gcagggtggc	ctcaggcccc	ccgtgcagat	ggggcgcctc	2340
ctgctctgtg	tcttgggcat	cctggctgcc	ttccacctgc	ccagggtgta	cctgctcatg	2400
cggcagctag	ggctcaacac	ccccgagtc	ttcctgggag	ggggccctgg	ggaatgcccc	2460
ggccagaatg	acgggaacac	aggaaatcag	gggaaacatg	agtgacccaa	ccctgtgatc	2520
tcagccccgg	tgaaccacga	cttagctgcg	atcccccca	agccagcaat	gacccgtgtc	2580
tcgctacaga	gacctcccg	ctctaggttc	tgacccagg	ttgtctctg	accctgacct	2640
cacagtgagc	cctaggcctg	gagcacgtgg	acacccctgt	gaccatc		2687

- <210> 3
- <211> 2553
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

5

<400> 3						
atgctgggccc	ctgctgtcct	gggcctcagc	ctctgggctc	tcctgcaccc	tgggacgggg	60
gccccattgt	gcctgtcaca	gcaacttagg	atgaaggggg	actacgtgct	gggggggctg	120
ttccccctgg	gcgaggccga	ggaggctggc	ctccgcagcc	ggacacggcc	cagcagccct	180
gtgtgcacca	ggttctctct	aaacggcctg	ctctggggac	tggccatgaa	aatggccgtg	240
gaggagatca	acaacaagtc	ggatctgtg	cccgggctgc	gcctgggcta	cgacctcttt	300
gatacgtgct	cggagcctgt	ggtggccatg	aagcccagcc	tcattgttctt	ggccaaggca	360
ggcagccggc	acatcgccgc	ctactgcaac	tacacgcagt	accagccccg	tgtgctggct	420
gtcatcgggc	cccactcgtc	agagctcgcc	atggctaccg	gcaagtcttt	cagcttcttc	480
ctcatgcccc	actacgggtg	tagcatggag	ctgctgagcg	cccgggagac	cttccccctc	540
ttcttccgca	ccgtgcccag	cgaccgtgtg	cagctgacgg	ccgccgcgga	gctgctgacg	600
gagttcggtc	ggaactgggt	ggccgccttg	ggcagcgacg	acgagtacgg	ccggcagggc	660
ctgagcater	tctcggccct	ggccgcggca	cgcgccatct	gcatcgcgca	cgagggcctg	720
gtgcccgtgc	cccgtgccga	tgactcgcgg	ctggggaagg	tgcaggacgt	cctgcaccag	780
gtgaaccaga	gcagcgtgca	ggtgggtgct	ctgttcgctt	ccgtgcacgc	cgcccagccc	840
ctcttcaact	acagcatcag	cagcaggtc	tcgcccaagg	tgtgggtggc	cagcgaggcc	900
tggctgacct	ctgacctggt	catggggctg	cccggcatgg	cccagatggg	cacgggtcct	960
ggcttccctc	agaggggtgc	ccagctgcac	gagttcccc	agtacgtgaa	gacgcacctg	1020
gccctggcca	ccgacccggc	cttctgctct	gccctgggcg	agagggagca	gggtctggag	1080
gaggaactgg	tggccagcgg	ctgcccagcg	tgtactgca	tcacgctgca	gaactgtgagc	1140
gcagggctaa	atcaccacca	cagcttctct	gtctactcag	ctgtgtatag	cggtggccag	1200
gccctgcaca	acactcttca	gtgcaacgcc	tcaggctgcc	ccgcgcagga	ccccgtgaag	1260

```

ccctggcagc tcctggagaa catgtacaac ctgaccttcc acgtgggagg gctgccgctg 1320
cggttcgaca gcagcggaaa cgtggacatg gagtacgacc tgaagctgtg ggtgtggcag 1380
ggctcagtgc ccaggctcca cgacgtgggc aggttcaacg gcagcctcag gacagagcgc 1440
ctgaagatcc gctggcacac gtctgacaac cagaagcccg tgtcccggtg ctccggcag 1500
tgccaggagg gccagggtcg ccgggtcaag gggttccact cctgtgtgta cgactgtgtg 1560
gactgctagg cgggagccta ccggcaaaac ccagacgaca tcgcctgcac cttttgtggc 1620
caggatgagt ggtccccgga gcgaagcaca cgctgcttcc gccgcaggtc tcggttcctg 1680
gcatggggcg agccggctgt gctgctgctg ctctgtgtgc tgagcctggc gctgggcctt 1740
gtgtggctg ctttggggct gttcgttcac catcgggaca gccactgggt tcaggcctcg 1800
ggggggcccc tggcctgctt tggcctggtg tgcttgggpc tggctgtcct cagcgtcctc 1860
ctgttccctg gccagcccag ccctgcccga tgcttggccc agcagccctt gtcccacctc 1920
ccgctcacgg gctgcctgag cacactcttc ctgcaggcgg ccgagatctt cgtggagtca 1980
gaactgcctc tgagctgggc agaccggctg agtggctgcc tgcggggggc ctgggcctgg 2040
ctgggtgtgc tgcctggcat gctgcactgt gcactggta cctgggtggc 2100
ttcccgcctg aggtgggtgac ggactggcac atgtgtccca cggaggcgtc gctgcactgc 2160
cgcacacgct cctgggtcag ctccggccta gcgcacgcca ccaatgccac gctggccttt 2220
ctctgcttcc tgggcacttt cctgggtgcg agccagcgg gctgtctaaa ccgtgccctg 2280
ggcctcacct ttgccatgct ggcctacttc atcacctggg tctcctttgt gccctcctg 2340
gccaatgtgc aggtggctct caggcccgcc gtgcagatgg gcgccctcct gctctgtgtc 2400
ctgggcatcc tggctgcctt ccacctgccc aggtgttacc tgctcatgcg gcagccaggg 2460
ctcaacaccc ccgagttctt cctgggaggg ggccctgggg atgcccaagg ccagaatgac 2520
ggaaacacag gaaatcaggg gaaacatgag tga 2553

```

<210> 4
 <211> 850
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 4

```

Met Leu Gly Pro Ala Val Leu Gly Leu Ser Leu Trp Ala Leu Leu His
 1           5           10
Pro Gly Thr Gly Ala Pro Leu Cys Leu Ser Gln Gln Leu Arg Met Lys
          20           25           30
Gly Asp Tyr Val Leu Gly Gly Leu Phe Pro Leu Gly Glu Ala Glu Glu
          35           40           45
Ala Gly Leu Arg Ser Arg Thr Arg Pro Ser Ser Pro Val Cys Thr Arg
 50           55           60
Phe Ser Ser Asn Gly Leu Leu Trp Ala Leu Ala Met Lys Met Ala Val
 65           70           75
Glu Glu Ile Asn Asn Lys Ser Asp Leu Leu Pro Gly Leu Arg Leu Gly
          85           90           95
Tyr Asp Leu Phe Asp Thr Cys Ser Glu Pro Val Val Ala Met Lys Pro
          100          105          110
Ser Leu Met Phe Leu Ala Lys Ala Gly Ser Arg Asp Ile Ala Ala Tyr
          115          120          125
Cys Asn Tyr Thr Gln Tyr Gln Pro Arg Val Leu Ala Val Ile Gly Pro
          130          135          140
His Ser Ser Glu Leu Ala Met Val Thr Gly Lys Phe Phe Ser Phe Phe
          145          150          155          160
Leu Met Pro His Tyr Gly Ala Ser Met Glu Leu Leu Ser Ala Arg Glu
          165          170          175
Thr Phe Pro Ser Phe Phe Arg Thr Val Pro Ser Asp Arg Val Gln Leu
          180          185          190
Thr Ala Ala Ala Glu Leu Leu Gln Glu Phe Gly Trp Asn Trp Val Ala
          195          200          205

```

Ala Leu Gly Ser Asp Asp Glu Tyr Gly Arg Gln Gly Leu Ser Ile Phe
 210 215 220

Ser Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Ile Cys Ile Ala His Glu Gly Leu
 225 230 235 240

Val Pro Leu Pro Arg Ala Asp Asp Ser Arg Leu Gly Lys Val Gln Asp
 245 250 255

Val Leu His Gln Val Asn Gln Ser Ser Val Gln Val Val Leu Leu Phe
 260 265 270

Ala Ser Val His Ala Ala His Ala Leu Phe Asn Tyr Ser Ile Ser Ser
 275 280 285

Arg Leu Ser Pro Lys Val Trp Val Ala Ser Glu Ala Trp Leu Thr Ser
 290 295 300

Asp Leu Val Met Gly Leu Pro Gly Met Ala Gln Met Gly Thr Val Leu
 305 310 315 320

Gly Phe Leu Gln Arg Gly Ala Gln Leu His Glu Phe Pro Gln Tyr Val
 325 330 335

Lys Thr His Leu Ala Leu Ala Thr Asp Pro Ala Phe Cys Ser Ala Leu
 340 345 350

Gly Glu Arg Glu Gln Gly Leu Glu Glu Asp Val Val Gly Gln Arg Cys
 355 360 365

Pro Gln Cys Asp Cys Ile Thr Leu Gln Asn Val Ser Ala Gly Leu Asn
 370 375 380

His His Gln Thr Phe Ser Val Tyr Ala Ala Val Tyr Ser Val Ala Gln
 385 390 395 400

Ala Leu His Asn Thr Leu Gln Cys Asn Ala Ser Gly Cys Pro Ala Gln
 405 410 415

Asp Pro Val Lys Pro Trp Gln Leu Leu Glu Asn Met Tyr Asn Leu Thr
 420 425 430

Phe His Val Gly Gly Leu Pro Leu Arg Phe Asp Ser Ser Gly Asn Val
 435 440 445

Asp Met Glu Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Val Trp Gln Gly Ser Val Pro
 450 455 460

Arg Leu His Asp Val Gly Arg Phe Asn Gly Ser Leu Arg Thr Glu Arg
 465 470 475 480

Leu Lys Ile Arg Trp His Thr Ser Asp Asn Gln Lys Pro Val Ser Arg
 485 490 495

Cys Ser Arg Gln Cys Gln Glu Gly Gln Val Arg Arg Val Lys Gly Phe
 500 505 510

His Ser Cys Cys Tyr Asp Cys Val Asp Cys Glu Ala Gly Ser Tyr Arg
 515 520 525

Gln Asn Pro Asp Asp Ile Ala Cys Thr Phe Cys Gly Gln Asp Glu Trp
 530 535 540

Ser Pro Glu Arg Ser Thr Arg Cys Phe Arg Arg Arg Ser Arg Phe Leu
 545 550 555 560

Ala Trp Gly Glu Pro Ala Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu

				565					570					575			
Ala	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Phe	Val	His	His	Arg		
			580					585					590				
Asp	Ser	Pro	Leu	Val	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Ala	Cys	Phe	Gly		
		595					600					605					
Leu	Val	Cys	Leu	Gly	Leu	Val	Cys	Leu	Ser	Val	Leu	Leu	Phe	Pro	Gly		
	610					615					620						
Gln	Pro	Ser	Pro	Ala	Arg	Cys	Leu	Ala	Gln	Gln	Pro	Leu	Ser	His	Leu		
625					630					635					640		
Pro	Leu	Thr	Gly	Cys	Leu	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	Gln	Ala	Ala	Glu	Ile		
				645					650					655			
Phe	Val	Glu	Ser	Glu	Leu	Pro	Leu	Ser	Trp	Ala	Asp	Arg	Leu	Ser	Gly		
			660					665					670				
Cys	Leu	Arg	Gly	Pro	Trp	Ala	Trp	Leu	Val	Val	Leu	Leu	Ala	Met	Leu		
		675					680					685					
Val	Glu	Val	Ala	Leu	Cys	Thr	Trp	Tyr	Leu	Val	Ala	Phe	Pro	Pro	Glu		
	690					695					700						
Val	Val	Thr	Asp	Trp	His	Met	Leu	Pro	Thr	Glu	Ala	Leu	Val	His	Cys		
705					710					715					720		
Arg	Thr	Arg	Ser	Trp	Val	Ser	Phe	Gly	Leu	Ala	His	Ala	Thr	Asn	Ala		
				725					730					735			
Thr	Leu	Ala	Phe	Leu	Cys	Phe	Leu	Gly	Thr	Phe	Leu	Val	Arg	Ser	Gln		
			740					745					750				
Pro	Gly	Cys	Tyr	Asn	Arg	Ala	Arg	Gly	Leu	Thr	Phe	Ala	Met	Leu	Ala		
		755					760					765					
Tyr	Phe	Ile	Thr	Trp	Val	Ser	Phe	Val	Pro	Leu	Leu	Ala	Asn	Val	Gln		
	770					775					780						
Val	Val	Leu	Arg	Pro	Ala	Val	Gln	Met	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu	Cys	Val		
785					790					795					800		
Leu	Gly	Ile	Leu	Ala	Ala	Phe	His	Leu	Pro	Arg	Cys	Tyr	Leu	Leu	Met		
				805					810					815			
Arg	Gln	Pro	Gly	Leu	Asn	Thr	Pro	Glu	Phe	Phe	Leu	Gly	Gly	Gly	Pro		
			820					825					830				
Gly	Asp	Ala	Gln	Gly	Gln	Asn	Asp	Gly	Asn	Thr	Gly	Asn	Gln	Gly	Lys		
		835					840					845					

His Glu
850

<210> 5

<211> 23

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de LA secuencia artificial: Cebador degenerado

<220>

10 <221> base modificada

<222> (3)

<223> a, t, c, o g

<220>

15 <221> base modificada

<222> (9)

<223> a, t, c, o g

<220>
 <221> base modificada
 <222> (12)
 5 <223> a, t, c, o g

<220>
 <221> base modificada
 <222> (18)
 10 <223> a, t, c, o g

<400> 5
cgnttytng cntgggnga rcc 23
 <210> 6
 15 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebadores degenerados

<220>
 <221> base modificada
 <222> (3)
 25 <223> a, t, c, o g

<220>
 <221> base modificada
 <222> (6)
 30 <223> a, t, c, o g

<220>
 <221> base modificada
 <222> (18)
 35 <223> a, t, c, o g

<220>
 <221> base modificada
 <222> (21)
 40 <223> a, t, c, o g

<400> 6
cgngcncgrt trtarcanc cc 23
 <210> 7
 45 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
Arg Phe Leu Ala Trp Gly Glu Pro Ala
 50 **1 5**

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55

<400> 8
Pro Gly Cys Tyr Asn Arg Ala Arg
 60 **1 5**

<210> 9
 <211> 552
 <212> ADN
 <213> Murine sp.
 <400> 9

```

gtgctgtcac tctctctgct gctttgcctg gtgctgggtc tagcactggc tgctctgggg 60
ctctctgtcc accactggga cagccctctt gtcaggcct caggcggctc acagttctgc 120
tttggcctga tctgcctagg cctcttctgc ctcagtgtcc ttctgttccc aggacggcca 180
agctctgcca gctgccttgc acaacaacca atggctcacc tccctctcac aggctgcctg 240
agcacactct tcttgcaagc agctgagacc tttgtggagt ctgagctgcc actgagctgg 300
gcaaaactggc tatgcagcta ccttcgggac tctggcctgc tagtggtact gttggccact 360
tttgtggagg cagcactatg tgcttgggat ttgaccgctt caccagaagt ggtgacagac 420
tggtcagtgc tgcccacaga ggtactggag cactgcccag tgcgttctct ggtcaacctg 480
ggcttgggtc acatcaccaa tgcaatggta gcttttctct gctttctggg cactttctctg 540
gtacaagacc ag                                     552
    
```

<210> 10
 <211> 184
 <212> PRT
 5 <213> Murine sp.

<400> 10

```

Val 1 Leu Ser Leu Leu 5 Leu Leu Leu Cys 10 Leu Val Leu Gly Leu Ala Leu 15
Ala Ala Leu Gly 20 Leu Ser Val His His 25 Trp Asp Ser Pro Leu Val Gln 30
Ala Ser Gly 35 Gly Ser Gln Phe Cys 40 Phe Gly Leu Ile Cys 45 Leu Gly Leu
Phe Cys 50 Leu Ser Val Leu Leu Phe Pro Gly Arg Pro Ser Ser Ala Ser
Cys 65 Leu Ala Gln Gln 70 Pro Met Ala His Leu Pro 75 Leu Thr Gly Cys Leu 80
Ser Thr Leu Phe 85 Gln Ala Ala Glu Thr Phe Val Glu Ser Glu 95 Leu
Pro Leu Ser Trp 100 Ala Asn Trp Leu Cys Ser Tyr Leu Arg Asp Ser Gly 110
Leu Leu Val Val Leu Leu Ala Thr Phe Val Glu Ala Ala Leu Cys Ala 125
Trp Tyr 130 Leu Thr Ala Ser 135 Glu Val Val Thr Asp Trp Ser Val Leu 140
Pro Thr Glu Val Leu Glu His Cys His Val Arg Ser Trp Val Asn Leu 160
Gly Leu Val His Ile Thr Asn Ala Met Val Ala Phe Leu Cys Phe Leu 175
Gly Thr Phe Leu Val Gln Asp Gln 180
    
```

<210> 11
 10 <211> 558
 <212>ADN
 <213> Rattus sp.

<400>11

```

gtgctgtcac tctctctgct gctttgcctg gtgctgggcc tgacactggc tgccctgggg 60
ctctttgtcc actactggga cagccctctt gttcaggcct cagggtgggtc actgttctgc 120
tttggcctga tctgcctagg cctcttctgc ctcagtgtcc ttctgttccc aggacgacca 180
cgctctgcca gctgccttgc ccaacaacca atggctcacc tccctctcac aggctgcctg 240
agcacactct tcttgcaagc agccgagatc tttgtggagt ctgagctgcc actgagttgg 300
gcaaaactggc tctgcagcta ccttcggggc ccttgggctt ggctgggtgg actgctggcc 360
actcttgtgg aggctgcact atgtgcctgg tacttgatgg ctttccctcc agaggtgggtg 420
acagattggc aggtgctgcc cacggaggta ctggaacact gccgcatgcg ttcttgggtc 480
agcctgggct tgggtgcacat caccaatgca ggggtagett tctctgctt tctgggcact 540
ttctgtgtac aaagccag                                     558
    
```

15 <210>12
 <211>186

<212> PRT
 <213>Rattus sp.

<400>12

```

Val  Leu Ser  Leu  Leu  Leu  Leu  Leu  Cys  Leu  Val  Leu  Gly  Leu  Thr  Leu
 1      5      10      15
Ala  Ala  Leu  Gly  Leu  Phe  Val  His  Tyr  Trp  Asp  Ser  Pro  Leu  Val  Gln
 20      25      30
Ala  Ser  Gly  Gly  Ser  Leu  Phe  Cys  Phe  Gly  Leu  Ile  Cys  Leu  Gly  Leu
 35      40      45
Phe  Cys  Leu  Ser  Val  Leu  Leu  Phe  Pro  Gly  Arg  Pro  Arg  Ser  Ala  Ser
 50      55      60
Cys  Leu  Ala  Gln  Gln  Pro  Met  Ala  His  Leu  Pro  Leu  Thr  Gly  Cys  Leu
 65      70      75
Ser  Thr  Leu  Phe  Leu  Gln  Ala  Ala  Glu  Ile  Phe  Val  Glu  Ser  Glu  Leu
 85      90      95
Pro  Leu  Ser  Trp  Ala  Asn  Trp  Leu  Cys  Ser  Tyr  Leu  Arg  Gly  Pro  Trp
 100     105     110
Ala  Trp  Leu  Val  Val  Leu  Leu  Ala  Thr  Leu  Val  Glu  Ala  Ala  Leu  Cys
 115     120     125
Ala  Trp  Tyr  Leu  Met  Ala  Phe  Pro  Pro  Glu  Val  Val  Thr  Asp  Trp  Gln
 130     135     140
Val  Leu  Pro  Thr  Glu  Val  Leu  Glu  His  Cys  Arg  Met  Arg  Ser  Trp  Val
 145     150     155
Ser  Leu  Gly  Leu  Val  His  Ile  Thr  Asn  Ala  Gly  Val  Ala  Phe  Leu  Cys
 165     170     175
Phe  Leu  Gly  Thr  Phe  Leu  Val  Gln  Ser  Gln
 180     185
    
```

5

<210>13
 <211>2577
 <212>ADN
 <213>Rattus sp.

10

<400>13

atgccggggtt tggctatctt gggcctcagt ctggctgctt tcttgagct tgggatggg 60


```

tctctttgt gtctgtcaca gcaattcaag gcacaagggg actatatatt ggggtggacta 120
tttcccctgg gcacaactga ggaggccact ctcaaccaga gaacacagcc caacggcatc 180
ctatgtacca ggttctcgcc ccttggtttg ttcttgcca tggctatgaa gatggctgta 240
gaggagatca acaatggatc tgccttgctc cctgggtgc gactgggcta tgacctgrrt 300
gacacatgct cagagccagt ggtcaccatg aagcccagcc tcatgttcat ggccaaggtg 360
ggaagtcaaa gcattgctgc ctactgcaac tacacacagt accaaccctg tgtgctggct 420
gtcattggtc cccacitac c agagcttgc ctcattacag gcaagttctt cagcttcttc 480
ctcatgccac aggtcagcta tagtgccagc atggatcggc taagtgaccg ggaaacattt 540
ccatccttct tccgcacagt gccagtgac cgggtgcagc tgcaggccgt tgtgacactg 600
ttgcagaatt tcagctggaa ctgggtggct gccttaggta gtgatgatga ctatggccgg 660
gaaggctctga gcatcttttc tggcttgccc aactcacgag gtatctgcat tgcacacgag 720
ggcctgggtg cacaacatga cactagtggc caacaattgg gcaaggtggg ggatgtgcta 780
cgccaagtga accaaagcaa agtacaggtg gtggtgctgt ttgcatctgc ccgtgctgtc 840
tactcccttt tttagctacag catccttcat gacctctcac ccaaggtatg ggtggcact 900
gagtcctggc tgacctctga cctggctatg acacttccca atattgcccg tgtgggact 960
gttcttgggt ttctgcagcg cgggtgccct ctgctgaat tttcccatta tgtggagact 1020
cgccttggcc tagctgctga cccaacattc tgtgctccc tgaaagctga gtggatctg 1080
gaggagcggc tgatggggcc acgctgttca caatgtgact acatcatgct acagaacctg 1140
tcactctggc tgatgcagaa cctatcagct gggcagttgc accaccaaat atttgcaacc 1200
tatgcagctg tgtacagtgt ggctcaggcc ctccacaaca ccctgcagtg caatgtctca 1260
cattgccaca catcagagcc tgttcaacct tggcagctcc tggagaacat gtacaatatg 1320
agtttccgtg ctcgagactt gacactgcag tttagtgcca aagggaggtt agacatggaa 1380
tatgacctga agatgtgggt gtggcagagc cctacacctg tactacatac ttagggcacc 1440
ttcaacggca cccttcagct gcagcactcg aaaatgtatt ggccaggcaa ccagggtgcca 1500
gtctcccagt gctcccggca gtgcaaatg ggcagggtgc gcagagtaaa gggcttcat 1560
tcctgctgt atgactgtgt ggactgcaag gcagggagct accggaagca tccagatgac 1620
ttcacctgta tcccattgg caaggatcag tggtccccag aaaaaagcac aactgctta 1680
cctcgcaggc ccaagtttct ggcttggggg gagccagctg tctgttact tctcctgctg 1740
cttgcctgg tcttgggctt gacactggct gccctggggc tcttgtcca ctactgggac 1800
agcctcttg ttcaggcttc aggtgggtca ctgttctgct ttggcctgat ctgcctaggc 1860
ctctctgccc tcagtgtcct tctgttccca ggacgaccac gctctgccag ctgccttggc 1920
caacaaccaa tggctcacct cctctcaca ggctgcctga gcacactctt cctgcaagca 1980
gccgagatct ttgtggagtc tgagctgcca ctgagttggg caaactggct ctgcagctac 2040
cttcggggcc cctgggcttg gctgggtgta ctgctggcca ctcttgtgga ggctgacta 2100
tgtcctgggt acttgatggc ttctcctcca gaggtgggtg cagattggca ggtgctgccc 2160
acggaggtac tggaacactg ccgcatgct tcttgggtca gcctgggctt ggtgcacatc 2220
accaatgcag tgttagcttt cctctgcttt ctgggcactt tcctggtaca gagccagcct 2280
ggtcgctata accgtgcccg tggcctcacc ttcgccatgc tagcttattt catcatctgg 2340
gtctcttttg tgcctctctt ggctaattgt caggtggcct accagccagc tgtgcagatg 2400
gggtctatct tattctgtgc cctgggcact ctggccacct tccacctgcc caaatgctat 2460
gtacttctgt ggctgcaga gctcaacacc caggagtct tcttgggaag gagccccaag 2520
gaagcatcag atgggaatag tggtagtagt gaggcaactc ggggacacag tgaatga 2577

```

<210> 14
 <211> 858
 <212> PRT
 5 <213> Rattus sp.

<400> 14

```

Met Pro Gly Leu Ala Ile Leu Gly Leu Ser Leu Ala Ala Phe Leu Glu
 1           5           10           15
Leu Gly Met Gly Ser Ser Leu Cys Leu Ser Gln Gln Phe Lys Ala Gln
           20           25           30
Gly Asp Tyr Ile Leu Gly Gly Leu Phe Pro Leu Gly Thr Thr Glu Glu
           35           40           45
Ala Thr Leu Asn Gln Arg Thr Gln Pro Asn Gly Ile Leu Cys Thr Arg
           50           55           60
Phe Ser Pro Leu Gly Leu Phe Leu Ala Met Ala Met Lys Met Ala Val
           65           70           75           80
Glu Glu Ile Asn Asn Gly Ser Ala Leu Leu Pro Gly Leu Arg Leu Gly
           85           90           95

```

Tyr Asp Leu Phe Asp Thr Cys Ser Glu Pro Val Val Thr Met Lys Pro
 100 105 110
 Ser Leu Met Phe Met Ala Lys Val Gly Ser Gln Ser Ile Ala Ala Tyr
 115 120 125
 Cys Asn Tyr Thr Gln Tyr Gln Pro Arg Val Leu Ala Val Ile Gly Pro
 130 135 140
 His Ser Ser Glu Leu Ala Leu Ile Thr Gly Lys Phe Phe Ser Phe Phe
 145 150 155 160
 Leu Met Pro Gln Val Ser Tyr Ser Ala Ser Met Asp Arg Leu Ser Asp
 165 170 175
 Arg Glu Thr Phe Pro Ser Phe Phe Arg Thr Val Pro Ser Asp Arg Val
 180 185 190
 Gln Leu Gln Ala Val Val Thr Leu Leu Gln Asn Phe Ser Trp Asn Trp
 195 200 205
 Val Ala Ala Leu Gly Ser Asp Asp Asp Tyr Gly Arg Glu Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ile Phe Ser Gly Leu Ala Asn Ser Arg Gly Ile Cys Ile Ala His Glu
 225 230 235 240
 Gly Leu Val Pro Gln His Asp Thr Ser Gly Gln Gln Leu Gly Lys Val
 245 250 255
 Val Asp Val Leu Arg Gln Val Asn Gln Ser Lys Val Gln Val Val Val
 260 265 270
 Leu Phe Ala Ser Ala Arg Ala Val Tyr Ser Leu Phe Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Leu His Asp Leu Ser Pro Lys Val Trp Val Ala Ser Glu Ser Trp Leu
 290 295 300
 Thr Ser Asp Leu Val Met Thr Leu Pro Asn Ile Ala Arg Val Gly Thr
 305 310 315 320
 Val Leu Gly Phe Leu Gln Arg Gly Ala Leu Leu Pro Glu Phe Ser His
 325 330 335
 Tyr Val Glu Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ala Asp Pro Thr Phe Cys Ala
 340 345 350
 Ser Leu Lys Ala Glu Leu Asp Leu Glu Glu Arg Val Met Gly Pro Arg
 355 360 365
 Cys Ser Gln Cys Asp Tyr Ile Met Leu Gln Asn Leu Ser Ser Gly Leu
 370 375 380
 Met Gln Asn Leu Ser Ala Gly Gln Leu His His Gln Ile Phe Ala Thr
 385 390 395 400
 Tyr Ala Ala Val Tyr Ser Val Ala Gln Ala Leu His Asn Thr Leu Gln
 405 410 415
 Cys Asn Val Ser His Cys His Thr Ser Glu Pro Val Gln Pro Trp Gln
 420 425 430
 Leu Leu Glu Asn Met Tyr Asn Met Ser Phe Arg Ala Arg Asp Leu Thr
 435 440 445
 Leu Gln Phe Asp Ala Lys Gly Ser Val Asp Met Glu Tyr Asp Leu Lys
 450 455 460

Met Trp Val Trp Gln Ser Pro Thr Pro Val Leu His Thr Val Gly Thr
465 470 475 480
Phe Asn Gly Thr Leu Gln Leu Gln His Ser Lys Met Tyr Trp Pro Gly
485 490 495
Asn Gln Val Pro Val Ser Gln Cys Ser Arg Gln Cys Lys Asp Gly Gln
500 505 510
Val Arg Arg Val Lys Gly Phe His Ser Cys Cys Tyr Asp Cys Val Asp
515 520 525
Cys Lys Ala Gly Ser Tyr Arg Lys His Pro Asp Asp Phe Thr Cys Thr
530 535 540
Pro Cys Gly Lys Asp Gln Trp Ser Pro Glu Lys Ser Thr Thr Cys Leu
545 550 555 560
Pro Arg Arg Pro Lys Phe Leu Ala Trp Gly Glu Pro Ala Val Leu Ser
565 570 575
Leu Leu Leu Leu Cys Leu Val Leu Gly Leu Thr Leu Ala Ala Leu
580 585 590
Gly Leu Phe Val His Tyr Trp Asp Ser Pro Leu Val Gln Ala Ser Gly
595 600 605
Gly Ser Leu Phe Cys Phe Gly Leu Ile Cys Leu Gly Leu Phe Cys Leu
610 615 620
Ser Val Leu Leu Phe Pro Gly Arg Pro Arg Ser Ala Ser Cys Leu Ala
625 630 635 640
Gln Gln Pro Met Ala His Leu Pro Leu Thr Gly Cys Leu Ser Thr Leu
645 650 655
Phe Leu Gln Ala Ala Glu Ile Phe Val Glu Ser Glu Leu Pro Leu Ser
660 665 670
Trp Ala Asn Trp Leu Cys Ser Tyr Leu Arg Gly Pro Trp Ala Trp Leu
675 680 685
Val Val Leu Leu Ala Thr Leu Val Glu Ala Ala Leu Cys Ala Trp Tyr
690 695 700
Leu Met Ala Phe Pro Pro Glu Val Val Thr Asp Trp Gln Val Leu Pro
705 710 715 720
Thr Glu Val Leu Glu His Cys Arg Met Arg Ser Trp Val Ser Leu Gly
725 730 735
Leu Val His Ile Thr Asn Ala Val Leu Ala Phe Leu Cys Phe Leu Gly
740 745 750
Thr Phe Leu Val Gln Ser Gln Pro Gly Arg Tyr Asn Arg Ala Arg Gly
755 760 765
Leu Thr Phe Ala Met Leu Ala Tyr Phe Ile Ile Trp Val Ser Phe Val
770 775 780
Pro Leu Leu Ala Asn Val Gln Val Ala Tyr Gln Pro Ala Val Gln Met
785 790 795 800
Gly Ala Ile Leu Phe Cys Ala Leu Gly Ile Leu Ala Thr Phe His Leu
805 810 815
Pro Lys Cys Tyr Val Leu Leu Trp Leu Pro Glu Leu Asn Thr Gln Glu

820
825
830

Phe Phe Leu Gly Arg Ser Pro Lys Glu Ala Ser Asp Gly Asn Ser Gly
835
840
845

Ser Ser Glu Ala Thr Arg Gly His Ser Glu
850
855

<210> 15
 <211> 8194
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> base modificada
 <222> (1251)..(1300)
 10 <223>a, t, c o g

<220>
 <221> base modificada
 <222>(1951)..(2000)
 15 <223>a, t, c o g

<400>15

gagaatctcg	cgagatcccg	tcggtccgcc	ccgctgccct	cccagctgcc	gaaaagaggg	60
gcctccgagc	cgccggcgcc	ctctgcccgc	aacctccgga	agcacactag	gaggttccag	120
ccgatctggt	cgaggggctc	cacggaggac	tccatttacg	ttacgcaaat	tccctacccc	180
agccggccgg	agagagaaag	ccagaaacct	cgcgaccagc	catgggccac	ctctccggaa	240
aaacaccggg	atattttttt	tctcctgcag	aaaaagcttt	aggattggca	gtttaaacia	300
aacatgtcta	tttgataacc	ttcggtttgc	atgcatttgt	ttcgaagtga	gcaaccctgg	360
gtaacaaggc	gaaagtatat	gacaatttgc	tcagaatctt	aatgtcagaa	aactggagac	420
tggggcaggg	gggtgtcgac	tcaaagctgt	gtctcattta	gtaaactgag	gcccaggtaa	480
aaagtctetga	aacctcgcaa	cacccggaga	aattgtgttc	cagcctccca	cctcgcacca	540
aaatgccaga	gctccttttc	taagccaggt	gaagtcacag	agcgtggaca	gaaccacaaa	600
ccgtccagag	gaagggtcac	tgggtgccac	ctggtttgca	tctgtgcctt	cgctcctgcc	660
agttcctgag	tgggaccgca	ggcccggaat	gtcaaggcaa	acagtcctgc	ttcagccact	720
gggtccaggt	cccacccctt	ttgggggctc	gaagttagga	agcatccggc	agctgccttc	780
tatttaagca	actggcctcc	ttagaggcca	ctccttgccc	atgccaggcg	cgggcatctg	840
gccagcatgc	tgctctgcac	ggctcgcctg	gtcggcctgc	agcttctcat	ttcctgctgc	900
tgggcttttg	cctgccatag	cacggagtct	tctcctgact	tcaccctccc	cgagatttac	960
ctcctggcag	gcctgttccc	tctccattct	ggctgtctgc	agggtgaggca	cagacccgag	1020
gtgacctgtg	gtgacaggtg	agtgaggggc	cagcagagcc	acacttagtg	ggacccctgg	1080
ctatagggcc	gctctggctg	ccatcctcca	aacaggacct	tgcctctgcc	tttgcccttt	1140
gaactgtccc	caggccttgt	tcataaatcc	acttgccacc	taagtgtctg	ctagaccttc	1200
ctagacactt	cgccagtttt	ccaattattt	cacccttgct	gttagaatgt	nnnnnnnnnn	1260
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	aattccttaa	actaaatttc	1320
tcactttctc	tctctctctg	gaaaacactg	actaatgtag	caggtttctc	tgtctcagga	1380
cttcaggacc	ttttcgtatc	taataagttt	ctccatcagg	gccagcttgt	tcctcctact	1440
gagcttgaga	gcccttgttg	aagttgtggt	ttgggggact	ggaccgatga	cctcaaaggt	1500
tccctttgct	cccagcctc	agagtctagg	aggccagagg	gtctcagcag	gcctttgtcc	1560
ttctcagctc	tctcttactg	gctttctcca	caggtcttgt	agcttcaatg	agcatggcta	1620
ccacctcttc	caggctatgc	ggcttggggt	tgaggagata	aacaactcca	cgccctgctc	1680
gcccacatc	accctggggg	accagctgta	tgatgtgtgt	tctgactctg	ccaatgtgta	1740
tgccacgctg	agagtgtctt	ccctgccagg	gcaacaccac	atagagctcc	aaggagacct	1800
tctccactat	tcccctacgg	tgctggcagt	gattgggcct	gacagcacca	accgtgtctc	1860
caccacagcc	gccctgctga	gccctttcct	ggtgcccctg	gtaagctgga	gctcagacc	1920
tttgcccatc	tcccttcagg	caagtctggg	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1980
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	gccacatgct	ccggctaatt	ttttgtattt	tttagtagag	2040
acgggggttc	accgtgttag	ccaggctggt	cgcaaacctc	taacctctgt	atccaccctc	2100
ctcggcctcc	caatgtgctg	ggattacagg	tgtgagccac	tgcaccgggc	cataatgtat	2160
taatataata	aaataattat	acaactcacc	ataatgtaga	atcagtggga	gcccctgagct	2220
tgttttccta	caactagatg	gtcccatctg	gggggtgatg	gagacagtga	cagatcatca	2280
gacattagat	tctcataagt	agcgtgcaac	ccagatccct	cgcatgtgca	gttcacagta	2340
gggttcaagc	tcctacaaga	atctgatgct	gctgtctgac	tgacaggagg	ggagcagctg	2400
taaatacaga	tgaagcttct	cttactcacc	agctgtctac	ctcctcctgt	gaggccgggt	2460
tcctaacagg	ccactgacct	aacttctgcc	ctgacctaca	catgtctctc	ttcttctctg	2520
caaactgcct	ccagtggag	tccttgaagg	tcccaaaaca	cacgggacta	tttcaactct	2580

atgcaggttt	tgtctccttt	gcttggaaag	catccctca	ccccttgctc	ccaggcagat	2640
tcccacccct	ccccagaac	ctgccccagt	ggagccttcg	caggtgattt	gtcagtttca	2700
caggtctgagg	ggtgctctcc	tggctctccc	ggctccctgt	atccccacac	ccagcacagg	2760
gccaggcact	gggggggctt	tcagtggaga	ctgaaatggc	tgaacgggac	ctcccataga	2820
ttagctatgc	ggccagcagc	gagacgctca	gcgtgaagcg	gcagtatccc	tctttcctgc	2880
gcaccatccc	caatgacaag	taccaggtgg	agaccatggt	gctgctgctg	cagaagttcg	2940
ggtggacctg	gatctctctg	gttggcagca	gtgacgacta	tgggcagcta	ggggtgcagg	3000
cactggagaa	ccaggccact	ggtcagggga	tctgcattgc	tttcaaggac	atcatgccct	3060
tctctgccc	ggtgggcgat	gagaggatgc	agtgcctcat	gcgccacctg	gcccaggccg	3120
gggccaccgt	cgtgggtggt	ttttccagcc	ggcagttggc	caggggtggt	tcagagtcag	3180
tgggtgctgac	caacctgact	ggcaagggtg	gggtgcctc	agaagcctgg	gccctctcca	3240
ggcacatcac	tggggtgccc	gggatccagc	gcattgggat	ggtgctgggc	gtggccatcc	3300
agaagagggc	tgtccctggc	ctgaaggcgt	ttgaagaagc	ctatgcccg	gcagacaaga	3360
aggccccctag	cccttgccac	aagggtcct	ggtgcagcag	caatcagctc	ctcagagtcg	3420
gccaagcttt	catggcacac	acgatgccca	agctcaaagc	cttctccatg	agttctgcct	3480
acaacgcata	ccgggctgtg	tatgCGgtgg	cccattggct	ccaccagctc	ctgggctgtg	3540
cctctggagc	ttgttccagg	ggcggagtct	acccctggca	ggtaaagag	cccccccag	3600
cacctggagc	cagggagaac	agccaatcct	gagatggagc	gagtgggac	gttccggcca	3660
ctctaaatgc	caaggggat	aaatgccact	aatctgaggt	ttttgtttt	tctttttttt	3720
gttttttgag	acagtctggc	tctgtcacc	aggctgcagt	gtagtgatgc	gatctcggct	3780
ctctgcaact	tccacctctt	gggttcaagt	gattctcttg	cctcggcctc	ctgagtagct	3840
gggattacag	gcaccaccac	ccatgcctgg	ataatttttc	ttttttttt	ttttttttt	3900
agatagagtc	tcgctctggt	gcccaggctg	gcaatgcagt	gtgcgatctt	ggctcactgt	3960
gagctccgcc	tcccagggtc	actccattcc	cctgcctcag	cctcccaagt	agggtgggact	4020
acggggcgccc	gccaccacgc	ccagctaatt	ttttttgtat	tttgagtaga	gacgggggtt	4080
caccatgtta	gccaggatgg	tctcaatctc	ctgacctgt	catccgccc	cctcgtctc	4140
ccaaagtgtc	gggattacag	gcgtgagcca	ctgcaccggg	ctaattttt	gtatttttag	4200
tagagatggg	gtttcaccat	gttgccagg	ctggctcga	actcctggca	tcaagtgatc	4260
ctcctgcttc	ggcctcccaa	agtgtcggga	ttacaggcat	tagctctctt	ctcttagaca	4320
gatctttctc	tctgatcctt	gccttctctc	accactgtg	tcttggaaag	gtcaagtgat	4380
aagatccagg	gctaaaactg	tctgtaaaag	agtgtttgtt	agaggccttc	tctcaggagg	4440
ttggtgggga	agattgaggg	gcttccctaag	aaggaaagga	cgagacctc	ctgatgggct	4500
gaaaccacca	ggacggaaac	ccaggaaggc	cccaggccct	tgcttctggg	accatgtggg	4560
tctgtgtgt	ctgtgggtgg	ttcatgatac	gcgtttcttt	cagcttttgg	agcagatcca	4620
caaggtgctat	ttcctctac	acaaggacac	gttggcgctt	aatgacaaca	gagatccctt	4680
cagtagctat	aacataattg	ctgggactg	gaatggacc	aaagtggacct	tcacggctct	4740
cggttccctc	acatggtctc	cagttcagct	aaacataaat	gagaccaaaa	tccagtggca	4800
cggaaggac	aaccaggtaa	tggggatgtg	gctactcacc	atgtaactgg	cttatgggca	4860
acctagagcc	tgggggtgat	gctgacacag	tgtacagga	gcaggagggg	ggccccagg	4920
gtccagctgc	cccactctta	cccactctgg	ccaggaagc	agggaaagca	ctccgtaggc	4980
gagtggtcag	atgccctggg	gcggaagttc	acacgaccag	gggcccctgc	ctgggagtga	5040
gccctgaggg	cagatgcaca	gagattctgt	tttctgttcc	acatgtgagc	tgtcctttga	5100
cttgggcccc	tacgtgtggc	ccctctggct	tcttacaggt	gcctaagtct	gtgtgttcca	5160
gcgactgtct	tgaagggcac	cagcaggtgg	ttcagggttt	ccatcactgc	ctctttgagt	5220
gtgtgccctg	tggggctggg	accttctca	acaagagtgg	tgagtgggca	atggagcagg	5280
cgagctacc	agcactcccg	ggggctgcac	ggtggaggg	gggctccct	tgggccccat	5340
gtgccctgca	ccayaaccac	ggcccagtca	ctgggctgcc	agtttagctc	aggttggagg	5400
acacctgtcc	ccagacagaa	ttctgatcaa	gagaatcagc	cactgggtgc	ggtggctcat	5460
gcctgtaate	ccagcacttt	gggaggctga	ggcaggtgga	tcacttgagg	tcgggagctc	5520
gagaccagcc	tggccaacat	ggtgaaacc	catctctacc	aaaaatataa	aaaattagct	5580
gggtgtggtg	gcgctgctt	gtaatcccag	ctactcggga	ggctgaggca	ggagaatcac	5640
ttgaaccagc	gaggcggagg	ttgcagttag	ccaagatgca	ttccagcctg	gaccacaag	5700
cgagaattcg	tcccccaaa	aaaagaaagg	aggccgggcg	cggtggtca	cacctgtaat	5760
cccagcactt	tgggaggccg	agggtgggtg	atcacctgag	gtcaggagtt	cgagaccagc	5820
ctgaccaaca	tgggtgaaacc	ccatctctac	taaaaataca	aaaaaagtta	gccgggctgt	5880
gtggcgtgtg	cctgtaattc	cagctactcg	ggaggtgag	gcaggagaat	tgcttgaacc	5940
cgggagggcg	aggttgcagt	gagccaagat	tgaccattg	cactccagcc	tgggcgacaa	6000
gagaaaaact	ctgtctcaaa	aaaaaagaaa	gaaagaaaga	attagccaac	tgaaagcctt	6060
agactgaggt	gtgtcctctg	ttagagagct	gtcatcaca	ctctacaaa	agcagtcgta	6120
tcttgaattc	aacctctttc	tctaaatgaa	tatagctatt	gttccctttg	tgccctcttg	6180
tctactgtc	cctctgttg	ccatgcca	agacagctag	ctccttgaac	agcttggctt	6240
gaatacagat	actagcgtgt	ctgcagcaga	gaaaaaaaca	gcattcccc	tcagaaatg	6300
caaggtcaag	aacagagagc	aaattaggta	gctaaggact	caggtcctta	gttgggtgtc	6360
aggggccaca	ttctttcctt	tcaccatctc	tgtagggaca	ggaatacttc	ccttctgtcc	6420
tcagagggtc	aggactcaga	gaaaccacag	agcagcagct	caggaaagtg	gttcatggaa	6480
atgctggcaa	gagagagggg	ttacaatgcc	ctcccttggg	agcaggctgc	tcccatgaga	6540
tcgtaacctc	tctggtatgt	gggcagagct	accaggttaa	ggctctccct	agggtttgca	6600
aaaccctcat	gggatcatga	gccatacaga	accgacctgt	gtgtctccag	agtctgtaat	6660

taacacaggc	atTTtgagga	aatgcgtggc	ctcaggcccc	actccccggct	acccccatcc	6720
cactatgcct	agtatagTct	agctgcctcg	gtacaattct	cccagtatct	tgcaggcccc	6780
tatttccfat	tctactctg	ctcatctggc	tctcaggaac	cttcttggcc	ttcccttca	6840
gacctctaca	gatgccagcc	ttgtgggaaa	gaagagtggg	cacctgaggg	aagccagacc	6900
tgcttcccg	gcactgtggt	gttttggct	ttgcgtgagc	acacctctg	ggtgctgctg	6960
gcagctaaaca	cgctgctgct	gctgctgctg	cttgggactg	ctggcctggt	tgcttggcac	7020
ctagacacc	ctgtggtgag	gtcagcaggg	ggccgcctgt	gctttcttat	gctgggctcc	7080
ctggcagcag	gtagtggcag	cctctatggc	ttctttgggg	aaccacaag	gcctgcgtgc	7140
ttgctacgc	aggccctctt	tgcccttggg	ttcaccatct	tcctgtcctg	cctgacagt	7200
cgctcatccc	aactaatcat	catcttcaag	ttttccaaca	aggtacctac	attctaccac	7260
gcctgggtcc	aaaaccacgg	tgctggcctg	tttgtgatga	tcagctcagc	ggcccagctg	7320
cttatctgtc	taacttggct	ggtgggtgtg	acccccactgc	ctgctagggg	ataccagcgc	7380
ttcccccat	tggtgatgct	tgagtgcaca	gagaccaact	ccctgggctt	catactggcc	7440
ttcctctaca	atggcctcct	ctccatcagt	gcctttgeet	gcagctacct	gggtaaaggac	7500
ttgccagaga	actacaacga	ggccaaatgt	gtcaccttca	gcctgctctt	caactctgtg	7560
tcctggatcg	ccrtcttcac	cacggccagc	gtctacgacg	gcaagtacct	gcctgcggcc	7620
aacatgatgg	ctgggctgag	cagcctgagc	agcggcttcg	gtgggtatct	tcctgcctaag	7680
tgctacgtga	tcctctgccc	cccagacctc	aacagcacag	agcacttcca	ggcctccatt	7740
caggactaca	cgaggcgtcg	cgctcccacc	tgaccagtgg	gtcagcaggg	acggctggca	7800
gccttctctg	ccctgagggg	cgaaggtcga	gcaggccggg	ggtgtccggg	aggtctttgg	7860
gcatcgcggt	ctgggggtgg	gacgtgtaag	cgctggggag	agcctagacc	aggtccgggg	7920
ctgccaataa	agaagtgaag	tgcttatctg	gtctctgtc	gtgggagagt	gtgaggtgta	7980
acggattcaa	gtctgaacct	agagcctgga	aaaggctgac	gcctcagatt	gacgttgcta	8040
ggcaactccg	gaggcgggcc	cagcgccaaa	agaacagggc	gaggcgctct	ccccgcatcc	8100
cattggccgt	tctctgcggg	gccccgcctt	cgggggccgg	agctagaagc	tctacgcttc	8160
cgaggcgcac	ctcctggcct	gcacgctttg	acgt			8194

- <210>16
- <211>2526
- <212>ADN
- <213>Homo sapiens

5

<400>16						
atgctgctct	gcacggctcg	cctggctcggc	ctgcagcttc	tcatttctctg	ctgctggggcc	60
tttgctgccc	atagcacgga	gtcttctcct	gacttcaccc	tccccggaga	ttacctctctg	120
gcaggcctgt	tcctcttcca	ttctggctgt	ctgcaggtga	ggcacagacc	cgaggtgacc	180
ctgtgtgaca	ggtcttgtag	cttcaatgag	catggctacc	acctcttcca	ggctatgcgg	240
cttgggggtg	aggagataaaa	caactccacg	gccttctgtc	ccaacatcac	cctggggtag	300
cagctgtatg	atgtgtgttc	tgactctgcc	aatgtgtatg	ccacgctgag	agtgtctctcc	360
ctgccagggc	aacaccacat	agagctccaa	ggagaccttc	tccactattc	ccctacggtg	420
ctggcagtg	ttgggcttga	cagcaccaac	cgtgtgcca	ccacagctgc	cctgctgagc	480
ctttctctgg	tgcccatgat	tagctatgct	gccagcagcg	agacgctcag	cgtaagcgg	540
cagtatccct	ctttcctgcg	caccatcccc	aatgacaagt	accaggtgga	gaccatggcg	600
ctgctgctgc	agaagttcgg	gtggacctgg	atctctctgg	ttggcagcag	tgacgactat	660
gggcagctag	gggtgcaggg	actggagaac	caggccactg	gtcaggggat	ctgcattgct	720
ttcaaggaca	tcatgcccct	ctctgcccag	gtgggcgatg	agaggatgca	gtgcctcatg	780
cgccacctgg	ccagggccgg	ggcaccgctc	gtgggtgttt	tttccagccg	gacgttggcc	840
aggggtgttt	tcgagtcctg	ggtgctgacc	aacctgactg	gcaaggtgtg	ggtcgcctca	900
gaagcctggg	ccctctccag	gcacatcact	gggggtgccc	ggatccagcg	cattgggatg	960
gtgctggggc	tgccatcca	gaagaggctt	gtccctggcc	tgaaggcgtt	tgaagaagcc	1020
tatgcccggg	cagacaagaa	ggcccctagg	ccttgccaca	agggctcctg	gtgcagcagc	1080
aatcagctct	gcagagaatg	ccaagctttc	atggcacaca	cgatgcccaa	gctcaaagcc	1140
ttctccatga	gttctgccta	caacgcatac	cgggctgtgt	atgcggtggc	ccatggcctc	1200
caccagctcc	tgggctgtgc	ctctggagct	tgttccaggg	gccgagtcta	cccctggcag	1260
cttttggagc	agatccaca	ggtgcatttc	cttctacaca	aggacactgt	ggcgtttaat	1320
gacaacagag	atccccctcag	tagctataac	ataattgcct	gggactggaa	tggaccaag	1380
tggaccttca	cggtcctcgg	ttcctccaca	tggtctccag	ttcagctaaa	cataaatgag	1440
accaaaatcc	agtggcacgg	aaaggacaac	caggtgccta	agtctgtgtg	ttccagcgac	1500
tgtcttgaag	ggcaccagcg	agtggttacg	ggtttccatc	actgtgctt	tgagtgtgtg	1560
ccctgtgggg	ctgggacctt	cctcaacaag	agtgacctct	acagatgcca	gccttgggg	1620
aaagaagagt	gggcacctga	gggaagccag	acctgcttcc	cgcgactgt	ggtgtttttg	1680
gctttgcgtg	agcacacctc	ttgggtgctg	ctggcagcta	acacgctgct	gctgctgctg	1740
ctgcttggga	gtgctggcct	gtttgcttgg	cacctagaca	cccctgtggg	gaggtcagca	1800
ggggccggcc	tgtgttttct	tgtctgggg	tccttggcag	caggtagtgg	cagcttctat	1860
ggcttctttg	gggaaccac	aaggcctgg	tgcttgcctc	gccaggccct	ctttgcccct	1920
ggtttcaaca	tcttctgtc	ctgcctgaca	gttcgctcat	tccaactaat	catcatcttc	1980
aagttttcca	ccaaggtacc	tacattctac	cacgcctggg	tccaaaacca	cggtgctggc	2040

ES 2 396 681 T3

```

ctgtttgtga tgatcagctc agcggcccag ctgcttatct gtctaacttg gctgggtggtg 2100
tggacccacac tgcctgctag ggaataccag cgcttcccc atctggtgat gcttgagtg 2160
acagagacca actccctggg cttcatactg gccttcctct acaatggcct cctctccatc 2220
agtgcctttg cctgcagcta cctgggtaag gacttgccag agaactataa cgaggccaaa 2280
tgtgtcacct tcagcctgct cttcaacttc gtgtcctgga tcgccttctt caccacggcc 2340
agcgtctacg acggcaagta cctgcctgcg gccaacatga tggctgggct gactagcctg 2400
agcagcggct tcggtgggta ttttctgcct aagtgtctacg tgatcctctg ccgccagac 2460
ctcaacagca cagagcactt ccaggcctcc attcaggact acacgaggcg ctgctggctcc 2520
acctga

```

<210>17

<211>841

<212>PRT

5 <213>Homo sapiens

<400>17

```

Met Leu Leu Cys Thr Ala Arg Leu Val Gly Leu Gln Leu Leu Ile Ser
 1          5          10
Cys Cys Trp Ala Phe Ala Cys His Ser Thr Glu Ser Ser Pro Asp Phe
 20          25
Thr Leu Pro Gly Asp Tyr Leu Leu Ala Gly Leu Phe Pro Leu His Ser
 35          40          45
Gly Cys Leu Gln Val Arg His Arg Pro Glu Val Thr Leu Cys Asp Arg
 50          55          60
Ser Cys Ser Phe Asn Glu His Gly Tyr His Leu Phe Gln Ala Met Arg
 65          70          75          80
Leu Gly Val Glu Glu Ile Asn Asn Ser Thr Ala Leu Leu Pro Asn Ile
 85          90          95
Thr Leu Gly Tyr Gln Leu Tyr Asp Val Cys Ser Asp Ser Ala Asn Val
100          105          110
Tyr Ala Thr Leu Arg Val Leu Ser Leu Pro Gly Gln His His Ile Glu
115          120          125
Leu Gln Gly Asp Leu Leu His Tyr Ser Pro Thr Val Leu Ala Val Ile
130          135          140
Gly Pro Asp Ser Thr Asn Arg Ala Ala Thr Thr Ala Ala Leu Leu Ser
145          150          155          160
Pro Phe Leu Val Pro Met Ile Ser Tyr Ala Ala Ser Ser Glu Thr Leu
165          170          175
Ser Val Lys Arg Gln Tyr Pro Ser Phe Leu Arg Thr Ile Pro Asn Asp
180          185          190
Lys Tyr Gln Val Glu Thr Met Val Leu Leu Leu Gln Lys Phe Gly Trp
195          200          205
Thr Trp Ile Ser Leu Val Gly Ser Ser Asp Asp Tyr Gly Gln Leu Gly
210          215          220
Val Gln Ala Leu Glu Asn Gln Ala Thr Gly Gln Gly Ile Cys Ile Ala
225          230          235
Phe Lys Asp Ile Met Pro Phe Ser Ala Gln Val Gly Asp Glu Arg Met
245          250          255
Gln Cys Leu Met Arg His Leu Ala Gln Ala Gly Ala Thr Val Val Val
260          265          270

```

Val Phe Ser Ser Arg Gln Leu Ala Arg Val Phe Phe Glu Ser Val Val
 275 280 285
 Leu Thr Asn Leu Thr Gly Lys Val Trp Val Ala Ser Glu Ala Trp Ala
 290 295 300
 Leu Ser Arg His Ile Thr Gly Val Pro Gly Ile Gln Arg Ile Gly Met
 305 310 315 320
 Val Leu Gly Val Ala Ile Gln Lys Arg Ala Val Pro Gly Leu Lys Ala
 325 330 335
 Phe Glu Glu Ala Tyr Ala Arg Ala Asp Lys Lys Ala Pro Arg Pro Cys
 340 345 350
 His Lys Gly Ser Trp Cys Ser Ser Asn Gln Leu Cys Arg Glu Cys Gln
 355 360 365
 Ala Phe Met Ala His Thr Met Pro Lys Leu Lys Ala Phe Ser Met Ser
 370 375 380
 Ser Ala Tyr Asn Ala Tyr Arg Ala Val Tyr Ala Val Ala His Gly Leu
 385 390 395 400
 His Gln Leu Leu Gly Cys Ala Ser Gly Ala Cys Ser Arg Gly Arg Val
 405 410 415
 Tyr Pro Trp Gln Leu Leu Glu Gln Ile His Lys Val His Phe Leu Leu
 420 425 430
 His Lys Asp Thr Val Ala Phe Asn Asp Asn Arg Asp Pro Leu Ser Ser
 435 440 445
 Tyr Asn Ile Ile Ala Trp Asp Trp Asn Gly Pro Lys Trp Thr Phe Thr
 450 455 460
 Val Leu Gly Ser Ser Thr Trp Ser Pro Val Gln Leu Asn Ile Asn Glu
 465 470 475 480
 Thr Lys Ile Gln Trp His Gly Lys Asp Asn Gln Val Pro Lys Ser Val
 485 490 495
 Cys Ser Ser Asp Cys Leu Glu Gly His Gln Arg Val Val Thr Gly Phe
 500 505 510
 His His Cys Cys Phe Glu Cys Val Pro Cys Gly Ala Gly Thr Phe Leu
 515 520 525
 Asn Lys Ser Asp Leu Tyr Arg Cys Gln Pro Cys Gly Lys Glu Glu Trp
 530 535 540
 Ala Pro Glu Gly Ser Gln Thr Cys Phe Pro Arg Thr Val Val Phe Leu
 545 550 555 560
 Ala Leu Arg Glu His Thr Ser Trp Val Leu Leu Ala Ala Asn Thr Leu
 565 570 575
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Gly Leu Phe Ala Trp His Leu
 580 585 590
 Asp Thr Pro Val Val Arg Ser Ala Gly Gly Arg Leu Cys Phe Leu Met
 595 600 605
 Leu Gly Ser Leu Ala Ala Gly Ser Gly Ser Leu Tyr Gly Phe Phe Gly
 610 615 620
 Glu Pro Thr Arg Pro Ala Cys Leu Leu Arg Gln Ala Leu Phe Ala Leu
 625 630 635 640

Gly Phe Thr Ile Phe Leu Ser Cys Leu Thr Val Arg Ser Phe Gln Leu
645 650
Ile Ile Ile Phe Lys Phe Ser Thr Lys Val Pro Thr Phe Tyr His Ala
660 665 670
Trp Val Gln Asn His Gly Ala Gly Leu Phe Val Met Ile Ser Ser Ala
675 680 685
Ala Gln Leu Leu Ile Cys Leu Thr Trp Leu Val Val Trp Thr Pro Leu
690 700
Pro Ala Arg Glu Tyr Gln Arg Phe Pro His Leu Val Met Leu Glu Cys
705 710 715 720
Thr Glu Thr Asn Ser Leu Gly Phe Ile Leu Ala Phe Leu Tyr Asn Gly
725 730 735
Leu Leu Ser Ile Ser Ala Phe Ala Cys Ser Tyr Leu Gly Lys Asp Leu
740 745
Pro Glu Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Cys Val Thr Phe Ser Leu Leu Phe
755 760 765
Asn Phe Val Ser Trp Ile Ala Phe Phe Thr Thr Ala Ser Val Tyr Asp
770 775 780
Gly Lys Tyr Leu Pro Ala Ala Asn Met Met Ala Gly Leu Ser Ser Leu
785 790 795 800
Ser Ser Gly Phe Gly Gly Tyr Phe Leu Pro Lys Cys Tyr Val Ile Leu
805 810 815
Cys Arg Pro Asp Leu Asn Ser Thr Glu His Phe Gln Ala Ser Ile Gln
820 825 830
Asp Tyr Thr Arg Arg Cys Gly Ser Thr
835 840

<210>18

<211>14

<212>PRT

5 <213>Secuencia artificial

<220>

<223>Descripción de secuencia artificial: Secuencia consenso de la familia de T1R

10 <220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

<223> t o r

15 <220>

<221> MOD_RES

<222> (3)

<223> f o l

20 <220>

<221>MOD_RES

<222> (4)

<223> r, q o p

25 <220>

<221>MOD_RES

<222> (6)

<223> r o t

30 <220>

<221> MOD_RES

<222> (7)

<223> s, p o v

<220>
 <221> MOD_RES
 5 <222> (8)
 <223> v, e, r, k o t

<220>
 <221>MOD_RES
 10 <222> (11)
 <223> a o e

<220>
 <221> MOD_RES
 15 <222> (12)
 <223> w o l

<220>
 <221> MOD_RES
 20 <222> (13)
 <223> r, h o g

<400> 18
Xaa Cys Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Phe Leu Xaa Xaa Xaa Glu
 1 5 10

25 <210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia consenso de la familia de T1R

<220>
 <221> MOD_RES
 35 <222> (1)
 <223> l o q

<220>
 <221>MOD_RES
 40 <222> (3)
 <223> e, g o t

<220>
 <221> MOD_RES
 45 <222> (4)
 <223> n, r o c

<220>
 <221>MOD_RES
 50 <222> (7)
 <223> r o e

<220>
 <221> MOD_RES
 55 <222> (9)
 <223> r o k

<220>
 <221> MOD_RES
 60 <222> (10)
 <223> c, g o f

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (11)
 <223> v, l o i

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)
 <223> f o l

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)
 <223> a o s

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)
 <223> m o l

<400> 19
Xaa Pro Xaa Xaa Tyr Asn Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

20 <210> 20
 <211> 3563
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25 <400> 20
agcctggcag tggcctcagg cagagtctga cgcgcacaaa ctttcaggcc caggaagcga 60
ggacaccact ggggccccag ggtgtggcaa gtgaggatgg caagggtttt gctaaacaaa 120
tcctctgccc gctccccgcc ccgggctcac tccatgtgag gccccagtcg ggccagccac 180
ctgccgtgcc tgttggaaagt tgcctctgcc atgctgggcc ctgctgtcct gggcctcagc 240
ctctgggctc tcctgcaccc tgggacgggg gccccattgt gcctgtcaca gcaacttagg 300
atgaaggggg actacgtgct gggggggctg ttccccctgg gcgaggccga ggaggctggc 360
ctcgcgagcc ggacacggcc cagcagccct gtgtgcacca ggtacagagg tgggacggcc 420
tgggtcgggg tcaggggtgac caggtctggg gtgctcctga gctggggccg aggtggccat 480
ctgcggtctc gtgtggcccc aggttctcct caaacggcct gctctgggca ctggccatga 540
aaatggccgt ggaggagatc aacaacaagt cggatctgct gccgggctg cgctggggct 600
acgacctctt tgatacgtgc tcggagcctg tgggtggccat gaagccctagc ctcatgttcc 660
tggccaaggc aggcagccgc gacatcgccg cctactgcaa ctacacgcag taccagcccc 720
gtgtgctggc tgtcatcggg cccactcgt cagagctcgc catggtcacc ggcaagttct 780
tcagcttctt cctcatgccc cagtggggcg cccccacca tcaccaccc ccaaccaacc 840
cctgccccgt gggagcccc tgtgtcagga gaatgttaca tgcacccac ccagccctgc 900
cctgggagcc ctgtgtcaga agatgtctct ggccttgag gtcagctac gtgctagcat 960
ggagctgtg agcggcccgg agaccttccc ctcttcttc cgcaccgtgc ccagcgaccg 1020
tgtgcagctg acggccggcg cggagctgct gcaggagttc ggctggaact ggggtggccg 1080
cctgggcagc gacgacgagt acggccggca gggcctgagc atcttctcgg ccctggccgc 1140
ggcacgccc atctgcatcg cgcacgaggg cctgggtgcc ctgccccgtg ccgatgactc 1200
gcggtcgggg aaggtgcagg acgtcctgca ccaggtgaac cagagcagcg tgcaggtggt 1260
gctgtgtttc gctctcgtgc acgccgccc cgccctcttc aactacagca tcagcagcag 1320
gctctcggcc aaggtgtggg tggccagcga ggcctggctg acctctgacc tggctatggg 1380
gctgccccgc atggcccaga tgggcacggt gcttggcttc ctccagaggg gtgcccagct 1440
gcacgagttc cccagtacg tgaagacgca cctggcctg gccaccgacc cggccttctg 1500
ctctgccctg ggcgagaggg agcagggctt ggaggaggac gtgggtggcc agcgtgccc 1560
gcagtgtgac tgcatacgc tgcagaacgt gagcgcaggg ctaaatacc accagacgtt 1620
ctctgtctac gcagctgtgt atagcgtggc ccaggccctg cacaacactc ttcagtgcaa 1680
cgcctcaggc tgccccgcgc agggacccctg gaagccctgg caggtgagcc cgggagatgg 1740
gggtgtgctg tcctctgcat gtgcccaggc caccaggcac ggccaccagc cctgagctgg 1800
aggtggctgg cggctcagcc ccgtcccccg cccgcagctc ctggagaaca tgtacaacct 1860
gaccttccac gtgggcggggc tgccgctgcg gttcagacagc agcggaaacg tggacatgga 1920
gtacgacctg aagctgtggg tgtggcaggg ctcagtgccc aggtccacg acgtgggcag 1980
gttcaacggc agcctcagga cagagcgcct gaagatccgc tggcacacgt ctgacaacca 2040

ggtgaggtga	gggtgggtgt	gccaggcgtg	cccgtggtag	ccccgcggc	agggcgagc	2100
ctgggggtgg	gggccgttcc	agtctcccgt	gggcatgcc	agccgagcag	agccagacc	2160
caggcctgtg	cgcagaagcc	cgtgtcccgg	tgctcgcggc	agtgccagga	gggccaggtg	2220
cgccgggtca	aggggttcca	ctcctgctgc	tacgactgtg	tggactgca	ggcgggcagc	2280
taccggcaaa	accaggtga	gccgccttcc	cggcaggcgg	gggtgggaac	gcagcagggg	2340
agggctctgc	caagtcttga	ctctgagacc	agagcccaca	gggtacaaga	cgaa caccca	2400
gcgcccttct	cctctctcac	agacgacatc	gcctgcacct	tttgtggcca	ggatgagtgg	2460
tccccggagc	gaagcacacg	ctgcttccgc	cgcaggctctc	ggttcctggc	atggggcgag	2520
ccggctgtgc	tgctgctgct	cctgctgctg	agcctggcgc	tgggccttgt	gctggctgct	2580
ttggggctgt	tcgttcacca	tcgggacagc	ccactggttc	aggcctcggg	ggggcccctg	2640
gcctgctttg	gcctgggtgtg	cctgggcctg	gtctgcctca	gcgtcctcct	gttcccctggc	2700
cagcccagcc	ctgcccgatg	cctggcccag	cagcccttgt	cccacctccc	gctcacgggc	2760
tgccctgagca	cactcttccct	gcaggcggcc	gagatcttctg	tggagtcaga	actgcctctg	2820
agctgggcag	accggctgag	tggctgcctg	cgggggccct	gggcctggct	ggtggtgctg	2880
ctggccatgc	tggtggaggt	cgactgtgc	acctggtacc	tggtggcctt	cccgccggag	2940
gtggtgacgg	actggcacat	gctgcccacg	gaggcgctgg	tgactgcccg	cacacgctcc	3000
tgggtcagct	tcggcctagc	gcacgccacc	aatgccacgc	tggcctttct	ctgcttccctg	3060
ggcactttcc	tggtgcggag	ccagccgggc	tgctacaacc	gtgcccgtag	cctcaectt	3120
gccatgctgg	cctacttcat	cacctgggtc	tcctttgtgc	ccctcctggc	caatgtgtag	3180
gtggctctca	ggcccgccgt	gcagatgggc	gccctcctgc	tctgtgtcct	gggeatectg	3240
gctgccttcc	acctgcccag	gtgttacctg	ctcatgcggc	agccagggct	caacaccccc	3300
gagttcttcc	tgggaggggg	ccctggggat	gcccaggcc	agaatgacgg	gaacacagga	3360
aatcagggga	aacatgagtg	acccaacct	gtgatctcag	ccccggtgaa	cccagactta	3420
gctgcgatcc	cccccaagcc	agcaatgacc	cgtgtctcgc	tacagagacc	ctcccgtctt	3480
aggttctgac	cccaggttgt	ctcctgaccc	tgaccccaca	gtgagcccta	ggcctggagc	3540
acgtggacac	ccctgtgacc	atc				3563

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una secuencia aislada de ácido nucleico que codifica la región extracelular o transmembrana de un polipéptido del receptor gustativo T1R3 que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% con el polipéptido T1R3 en la SEC ID N°: 4 o 14.
2. La secuencia aislada de ácido nucleico de la reivindicación 1 que adicionalmente codifica la región transmembrana de otro polipéptido GPCR.
- 10 3. La secuencia aislada de ácido nucleico de la reivindicación 1 que adicionalmente codifica la región extracelular de otro polipéptido GPCR.
4. La secuencia aislada de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que está unida operativamente a un promotor regulable o a un promotor constitutivo.
- 15 5. Un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en vectores de mamíferos, vectores de insectos, vectores bacterianos, vectores de levaduras, vectores retrovirales, vectores bacteriófagos, plásmidos lineales o circulares, moléculas de ácido nucleico que son capaces de integrarse en el genoma de una célula deseada.
- 20 6. Una célula hospedadora que se ha transformado o transfectado *ex vivo* con una secuencia aislada de ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4 o un vector de acuerdo con la reivindicación 5, que se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en células procariontas, células de mamífero, células de levadura, células de insecto, células de anfibio, células vegetales y células fúngicas.
- 25 7. La célula hospedadora de la reivindicación 6 que es una célula humana.
8. La célula hospedadora de la reivindicación 6 que se selecciona del grupo que consiste en *E. coli*, células CHO, células HeLa y células HEK-293.
- 30 9. La célula hospedadora de la reivindicación 6 que es una célula cultivada o un explante.
10. Un polipéptido T1R3 aislado, codificado por la secuencia aislada de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3.
- 35 11. Un ensayo *in vitro* para identificar un compuesto que modula la transducción gustativa que comprende:
- 40 (i) poner en contacto un polipéptido T1R3 de acuerdo con la reivindicación 10 con un supuesto compuesto modulador gustativo; y
(ii) detectar si dicho compuesto se une específicamente a dicho polipéptido T1R3.
12. El ensayo de la reivindicación 11 en el que dicho polipéptido T1R3 se expresa en una célula o en una membrana celular.
- 45 13. El ensayo de la reivindicación 11 en el que dicho polipéptido T1R3 está comprendido en un soporte de fase sólida.
14. El ensayo de la reivindicación 11 en el que dicho polipéptido T1R3 está en una solución.
- 50 15. El ensayo de la reivindicación 11 en el que dicho polipéptido T1R3 está unido a un polipéptido verde fluorescente.

FIG. 1

