

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 485**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2009** **E 09166858 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015** **EP 2149606**

54 Título: **Moléculas de ácido nucleico y procedimientos para identificar moduladores de la actividad de GPR84**

30 Prioridad:

01.08.2008 US 184368

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

11.09.2015

73 Titular/es:

**INTERNATIONAL FLAVORS & FRAGRANCES
INC. (100.0%)
521 WEST 57TH STREET
NEW YORK, NY 10019, US**

72 Inventor/es:

**GRAVINA, STEPHEN ANTHONY;
MONTEZ, JASON M. y
WANG, HAILIN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 545 485 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

Moléculas de ácido nucleico y procedimientos para identificar moduladores de la actividad de GPR84

Antecedentes de la invención

La señalización del gusto se encuentra en todo el reino animal, desde simples metazoos hasta el más complejo de los vertebrados. Se cree que el sentido del gusto está mediado por receptores, es decir, receptores metabotrópicos o inotrópicos. Las células que expresan receptores del gusto, cuando se exponen a ciertos estímulos químicos, suscitan el sentido del gusto mediante despolarización para generar un potencial de acción, que desencadena el sentido. Por tanto, los receptores del gusto reconocen específicamente moléculas que provocan un sentido específico del gusto. Estas moléculas también se conocen en el presente documento como "estimulantes del gusto". Muchos receptores del gusto pertenecen a la superfamilia de receptores de 7 dominios transmembrana (Hoon, y col. (1999) Cell96:451; Adler, y col. (2000) Cell100:693), que también se conocen como receptores acoplados a proteína G (GPCR). Se cree que otros sabores están mediados por proteínas de canal.

El análisis bioquímico y la clonación molecular de varios de estos receptores ha revelado los principios básicos referentes a la función de estos receptores. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.691.188 describe el modo en que tras la unión de un ligando a un GPCR, el receptor supuestamente experimenta un cambio conformacional que conduce a la activación de la proteína G. Las proteínas G están compuestas por tres subunidades: una subunidad α de unión a nucleótido guanilo, una subunidad β , y una subunidad γ . Cuando está unido GDP, la proteína G existe como un heterotrímero, el complejo $G\alpha\beta\gamma$. Cuando está unido GTP, la subunidad α se disocia del heterotrímero, dejando un complejo $G\beta\gamma$. Cuando un complejo $G\alpha\beta\gamma$ se asocia de forma funcional con un receptor acoplado a proteína G activado en una membrana celular, se aumenta la tasa de intercambio de GTP por GDP unido y aumenta la tasa de disociación de la subunidad $G\alpha$ unida del complejo $G\alpha\beta\gamma$. La subunidad $G\alpha$ libre y el complejo $G\beta\gamma$ por tanto son capaces de transmitir una señal a elementos corriente abajo de una diversidad de vías de transducción de señales. Estos eventos forman la base para una multiplicidad de diferentes fenómenos de señalización celular, incluyendo, por ejemplo, los fenómenos de señalización que se identifican como percepciones sensoriales neurológicas tales como el gusto y/o el olfato.

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

Se sabe mucho acerca de la psicofísica y fisiología de la función celular del gusto. Por tanto, la identificación y aislamiento de nuevos receptores del gusto y moléculas de señalización del gusto podría permitir nuevos métodos de modulación química y genética de vías de transducción del gusto. Por ejemplo, la disponibilidad de moléculas receptoras y de canal permite la exploración de agonistas, antagonistas, agonistas inversos, y moduladores de alta afinidad de la actividad del gusto. Dichos compuestos moduladores del gusto podrían ser útiles en las industrias farmacéutica y alimentaria para mejorar el sabor de una diversidad de productos para el consumidor, o para bloquear sabores indeseables, por ejemplo, en ciertos agentes farmacéuticos.

Se conocen secuencias completas o parciales de diversos receptores quimiosensoriales humanos y de otros eucariotas. Véase, por ejemplo, Pilpel y Lancet (1999) Protein Science 8:969-977; Mombaerts (1999) Annu. Rev. Neurosci. 22:487-50; Wang, y col. (2006) J. Biol. Chem. M608019200. Véase también, la patente de EE.UU. n.º 5.874.243, el documento WO 92/17585, el documento WO 95/18140, el documento WO 97/17444, el documento WO 99/67282, y el documento WO 2007/027661. Además, se ha realizado la identificación de ligandos para receptores acoplados a proteína G tales como GPR84. Véase Wang, y col. (2006) *supra*; el documento WO 2007/027661; y la solicitud de patente de EE.UU. n.º 2007/0196867. Matsumara y col. (2007. Biomedical Research, 28, pág.49-55) describe la expresión de GPR en la papila gustativa de rata respecto a la percepción de ácido graso.

Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica las proteínas CD36, G_{q19} , y receptor 84 acoplado a proteína G (GPCR84). La presente invención también abarca vectores de expresión con expresión inducible o constitutiva de CD36, G_{q19} , y GPR84.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención se proporciona una célula huésped recombinante aislada transformada con un vector de expresión de la invención y que co-exprende las proteínas CD36, G_{q19} , y GPR84.

También se divulga un procedimiento para identificar un modulador de la actividad de GPR84. El procedimiento implica poner en contacto una célula huésped recombinante, que co-exprende las proteínas CD36, G_{q19} , y GPCR84, con un compuesto de ensayo y determinar el efecto funcional del compuesto de ensayo sobre la actividad de GPR84 identificando de ese modo un modulador de GPR84.

Descripción detallada de la invención

Se describen en el presente documento moléculas de ácido nucleico que codifican el receptor 84 acoplado a proteína G (GPR84), CD36 y G_q9, y el uso de las mismas en la identificación de ligandos para GPR84, por ejemplo, agonistas y antagonistas. GPR84 puede ser un receptor del gusto de grasas y puede usarse en ensayo de exploración para compuestos que imiten el sabor a grasa.

Como se usa en el presente documento, el término "aislado", cuando se refiere a una molécula de ácido nucleico se refiere a un estado de purificación o concentración diferente del que existe de forma natural. Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden aislarse o asociarse de otro modo con estructuras o compuestos a los que no están normalmente asociadas en la naturaleza, de acuerdo con una diversidad de procedimientos y procesos conocidos para los especialistas en la técnica.

GPR84 se ha identificado como un receptor para ácidos grasos libres de cadena media (Wang, y col. (2006) *supra*). La proteína GPR84 se encuentra en una diversidad de especies incluyendo el ser humano, ratón, rata, y similares y pueden usarse moléculas de ácido nucleico que codifican una cualquiera de estas proteínas de acuerdo con la presente invención. A este respecto, la presente invención abarca moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas GPR84 enumeradas en la Tabla 1.

TABLA 1

Fuente	N.º de acceso a GENBANK de secuencia de aminoácidos	SEC ID N.º	N.º de acceso a GENBANK de secuencia de ácido nucleico	SEC ID N.º	% de identidad*
<i>Homo sapiens</i>	NP_065103	1	NM_020370	2	100 %
<i>Mus musculus</i>	NP_109645	3	NM_030720	4	85,4 %
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_001102979	5	NM_001109509	6	83,8 %
<i>Bos taurus</i>	NP_001033657	7	NM_001038568	8	89,6 %

*% de identidad basado en la alineación con la proteína GPR84 humana.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una proteína GPR84 humana. En otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una proteína GPR84 humana de la SEC ID N.º 1. En realizaciones particulares, la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína GRP84 humana se expone en la SEC ID N.º 9.

Funcionalmente, las proteínas GPR84 divulgadas en el presente documento son miembros de una familia de receptores relacionados acoplados a proteína G de siete dominios transmembrana, que se cree que están implicados en la transducción del gusto. Estructuralmente, las secuencias de nucleótidos de los miembros de la familia de GPR84 pueden codificar proteínas relacionadas que incluyen un dominio extracelular, siete dominios transmembrana, y un dominio citoplasmático. Los miembros relacionados de la familia de GPR84 de otras especies comparten al menos aproximadamente el 60 %, 70 %, 80 %, o 90 % de identidad de secuencia proteica sobre una región de al menos aproximadamente 50 restos de aminoácido de longitud, opcionalmente 100, 200, 300, o más restos de aminoácido de longitud con las SEC ID N.º 1, 3, 5 o 7.

Pueden usarse regiones específicas de las secuencias de aminoácidos de GPR84 para identificar variantes polimórficas, homólogos entre especies, y alelos de miembros de la familia de GPR84. Esta identificación puede hacerse *in vitro*, por ejemplo, en condiciones rigurosas de hibridación o PCR (por ejemplo, usando cebadores que codifican secuencias consenso de GPR84), o usando la información de secuencia en un sistema informático para su comparación con otras secuencias de nucleótidos. También serán útiles diferentes alelos de genes de GPR84 dentro de una población de una única especie para determinar si diferencias en las secuencias alélicas se correlacionan con diferencias en la percepción del sabor entre miembros de la población. Las técnicas clásicas de amplificación tipo PCR y clonación son útiles para aislar ortólogos, por ejemplo, donde cebadores degenerados son suficientes para detectar genes relacionados entre especies, que típicamente tienen un nivel mayor de identidad relativa que miembros parálogos de la familia de GPR84 dentro de una única especie.

Típicamente, la identificación de variantes polimórficas y alelos de miembros de la familia de GPR84 puede hacerse comparando una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 25 aminoácidos o más, por ejemplo, 50-100 aminoácidos. Una identidad de aminoácidos de aproximadamente al menos el 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95-99 %, o mayor típicamente demuestra que una proteína es una variante polimórfica, un homólogo entre especies, o un alelo de un miembro de la familia de T1R. La comparación de secuencias puede realizarse usando cualquier

algoritmo convencional de comparación de secuencias. También pueden usarse anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos de GPR84 o una región conservada de los mismos para identificar alelos, homólogos entre especies, y variantes polimórficas.

Además de GRP84, la molécula de ácido nucleico de la invención codifica adicionalmente una proteína quimérica de unión a nucleótido guanina (proteína G) compuesta por la subunidad α_q de proteína G, en la que los nueve restos C-terminales se han remplazado por aquellos de la subunidad α_i de proteína G. Esta proteína G quimérica, llamada G_{qi9} , es conocida en la técnica y se ha descrito por Parmentier, y col. (1998) Mol. Pharmacol.53(4):778-86; Perroy, y col. ((2001) J. Biol. Chem.276: 45800-45805) por acoplar receptores a fosfolipasa C. A modo de ilustración, los nueve restos de aminoácido C-terminales de la subunidad Gq expuesta en el número de acceso a GENBANK NP_002063.2 (SEC ID N.º 10) están remplazados con los nueve restos de aminoácido C-terminales de la subunidad α_i de proteína G, es decir, Asn-Asn-Leu-Lys-Asp-Cys-Gly-Leu-Phe (SEC ID N.º 11). Aunque la subunidad Gq humana se emplea de forma deseable en la presente invención, también puede usarse subunidad Gq no humana. Por ejemplo, las subunidades Gq enumeradas en la Tabla 2 serían adecuadas para su uso en la presente invención.

TABLA 2

Fuente	N.º de acceso a GENBANK de secuencia de aminoácidos	SEC ID N.º	N.º de acceso a GENBANK de secuencia de ácido nucleico	SEC ID N.º	% de identidad*
<i>Homo sapiens</i>	NP_002063	10	NM_002072	12	100 %
<i>Mus musculus</i>	NP_032165	13	NM_008139	14	99,7 %
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_112298	15	NM_031036	16	99,4 %

*% de identidad basado en la alineación con la subunidad proteica Gq humana.

Las subunidades G_q de uso de acuerdo con la presente invención comparte de forma deseable aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia proteica sobre una región de al menos aproximadamente 50 restos de aminoácido de longitud, opcionalmente 100, 200, 300, o más restos de aminoácido de longitud con la SEC ID N.º 10, 13, o 15. Como se describe para GPR84, pueden identificarse secuencias relacionadas usando una diversidad de procedimientos convencionales, usando condiciones rigurosas de hibridación o reactividad cruzada de anticuerpos.

Se incluyen adicionalmente en la molécula de ácido nucleico de la presente invención secuencias que codifican CD36. Se ha sugerido que GPR120 y CD36 forman una vía independiente para la recepción de ácidos grasos(Matsumura, y col. (2007) Biomed. Res. 28:49-55). Además, se contempla que CD36 también funciona junto con GPR84 en el transporte de ácidos grasos y la percepción de lípidos de la dieta. Por tanto, la presente invención abarca la co-expresión de CD36 con GPR84 y G_{qi9} . Aunque la CD36 humana se emplea de forma deseable en la presente invención, también puede usarse CD36 no humana. Por ejemplos, las proteínas CD36 enumeradas en la Tabla 3 serían adecuadas para su uso en la presente invención.

TABLA 3

Fuente	N.º de acceso a GENBANK de secuencia de aminoácidos	SEC ID N.º	N.º de acceso a GENBANK de secuencia de ácido nucleico	SEC ID N.º	% de identidad*
<i>Homo sapiens</i>	NP_001001547	17	NM_001001547	18	100 %
<i>Mus musculus</i>	NP_031669	19	NM_007643	20	86,4 %
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_113749	21	NM_031561	22	87,9 %

*% de identidad basado en la alineación con la proteína CD36 humana.

En la medida en que las proteínas CD36 divulgadas en el presente documento funcionan como transportadores de ácidos grasos, la presente invención abarca otras proteínas CD36 que comparten al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia proteica sobre una región de al menos aproximadamente 50 restos de aminoácido de longitud, opcionalmente 100, 200, 300, o más restos de aminoácido de longitud con la SEC ID N.º 17, 19, o 21.

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la invención pueden identificarse por traducción putativa de las secuencias de ácido nucleico codificantes. Estas diversas secuencias de aminoácidos y las secuencias de ácido nucleico codificantes pueden compararse unas con otras o con otras secuencias de acuerdo con varios

procedimientos.

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

Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, incluye referencias a un segmento de una cualquiera de las varias posiciones contiguas, por ejemplo, de 20 a 600, habitualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 o de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia de la misma cantidad de posiciones contiguas después de alinear de forma óptima las dos secuencias. Los procedimientos de alineación de secuencias para su comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de secuencias para su comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48:443), mediante el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman ((1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (1995) Ausubel, y col., eds. suplemento).

Un ejemplo preferido de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia es el algoritmo BLAST y el algoritmo BLAST 2.0, que se describen por Latched, y col. (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, y Altschul, y col. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible al público a través del National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencia de alta valoración (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que se ajusta a o satisface algún valor umbral T de valoración positiva cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se menciona como el umbral del valor de la palabra vecina (Altschul, y col. (1990) *supra*; Altschul y col. (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402). Estos aciertos iniciales de palabra vecina actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contengan. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde se pueda aumentar el valor acumulativo de alineación. Los valores acumulativos se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (valor de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre >0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de valores para calcular el valor acumulativo. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: el valor acumulativo de alineación disminuye en la cantidad X de su valor máximo conseguido; el valor acumulativo llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos de valoración negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T, y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=4 y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como defecto una longitud de palabra de 3, y una expectativa (E) de 10 y la matriz de valores BLOSUM62 (véase, Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915), alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, Nz=4, y una comparación de ambas hebras.

Otro ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de secuencias múltiples a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineaciones progresivas por pares para mostrar la relación y el porcentaje de identidad de secuencia. También se representa el llamado "árbol" o "dendograma" que muestra las relaciones de agrupamiento usadas para crear la alineación. PILEUP usa una simplificación del procedimiento de alineación progresiva de Feng y Doolittle ((1987) J. Mol. Evol. 35:351-360). El procedimiento usado es similar al procedimiento descrito por Higgins y Sharp ((1989) CABIOS 5:151-153). El programa puede alinear hasta 300 secuencias, cada una de una longitud máxima de 5.000 nucleótidos o aminoácidos. El procedimiento de alineación múltiple empieza con la alineación por pares de las dos secuencias más similares, produciendo un grupo de dos secuencias alineadas. Este grupo después se alinea con la siguiente secuencia o grupo de secuencias alineadas más relacionadas. Se alinean dos grupos de secuencias por simple extensión de la alineación por pares de dos secuencias individuales. La alineación final se consigue mediante una serie de alineaciones progresivas por pares. El programa se ejecuta designando secuencias específicas y sus coordenadas 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 la relación del porcentaje de identidad de secuencia usando los siguientes parámetros: peso de hueco por defecto (3,00), peso de longitud de hueco por defecto (0,10), y huecos finales ponderados. PILEUP puede obtenerse del paquete de software de análisis de secuencia GCG (Devereaux, y col. (1984) Nuc. Acids Res. 12:387-395).

Como se muestra en el presente documento, la comparación de las secuencias proteicas humanas de la invención

con todas las proteínas conocidas en las bases de datos públicas de secuencias usando el algoritmo BLASTP reveló una fuerte homología con otras proteínas GPR84, de subunidades Gq y CD36 que tenían al menos aproximadamente un 80 % de identidad de aminoácidos con las secuencias humanas.

Como alternativa a las comparaciones directas de secuencias de aminoácidos o ácido nucleico, pueden identificarse proteínas GPR84, de subunidad Gq y CD36 adecuadas por hibridación de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico analizadas en las Tablas 1-3, o sondas de las mismas) en condiciones rigurosas de hibridación con ácidos nucleicos de otras especies (por ejemplo, secuencias genómicas o de ADNc). La expresión "condiciones rigurosas de hibridación" se refiere a condiciones en las que hibridará una sonda con su subsecuencia diana, típicamente en una mezcla compleja de ácido nucleico, pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas mayores. Una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays". En general, se seleccionan condiciones rigurosas para que sean aproximadamente 5-10 °C inferiores al punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (a fuerza iónica, pH, y concentración nucleica definidos) a la que el 50 % de las sondas complementarias a la diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio (como las secuencias diana están presentes en exceso, a T_m , el 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones rigurosas serán aquellas en que la concentración salina es menor de aproximadamente 1,0 M de iones sodio, típicamente una concentración de iones sodio (u otras sales) aproximadamente 0,01 a 1,0 M a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, mayores de 50 nucleótidos). También pueden conseguirse condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces la hibridación de fondo, opcionalmente 10 veces la hibridación de fondo. Condiciones rigurosas de hibridación ejemplares pueden ser las siguientes: formamida al 50 %, SSC 5X, y SDS al 1 % con incubación a 42 °C (o SSC 5X, SDS al 1 % con incubación a 65 °C) con un 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, o más minutos.

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

Como queda claro a partir de la presente divulgación, las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas GPR84, de subunidad Gq y CD36 de la invención pueden aislarse de una diversidad de fuentes, modificarse por ingeniería genética, amplificarse, sintetizarse, y/o expresarse de forma recombinante de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. El aislamiento y expresión de las proteínas de la presente invención puede realizarse como se describe a continuación. Pueden usarse cebadores de PCR para la amplificación de ácidos nucleicos que codifican proteínas GPR84, de subunidad Gq y CD36, y pueden generarse opcionalmente bibliotecas de estos ácidos nucleicos y explorarse para la identificación de una molécula adecuada de ácido nucleico para expresión proteica. Los procedimientos de amplificación son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa, PCR (PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications (1990) ed. Innis, Academic Press, NY, y PCR Strategies (1995) ed. Innis, Academic Press, Inc., NY); reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase, por ejemplo, Wu (1989) *Genomics* 4:560; Landegren (1988) *Science* 241:1077; Barringer (1990) *Gene* 89:117); amplificación por transcripción (véase, por ejemplo, Kwoh (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173); replicación de secuencia auto-sostenida (véase, por ejemplo, Guatelli (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874); amplificación por replicasa Q Beta (véase, por ejemplo, Smith (1997) *J. Clin. Microbiol.* 35:1477-1491); ensayo de amplificación automatizada por replicasa Q-beta (véase, por ejemplo, Burg (1996) *Mol. Cell. Probes* 10:257-271) y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA; Cangene, Mississauga, Ontario). Pueden diseñarse cebadores que retengan la secuencia original de la proteína de interés. Como alternativa, los cebadores pueden codificar restos de aminoácido que sin sustituciones conservativas (por ejemplo, de un resto hidrófobo por otro hidrófobo) o sustituciones funcionalmente favorables (por ejemplo, que no evitan la inserción en la membrana plasmática, causan escisión por peptidasa, causan plegamiento anormal del receptor, y similares). Una vez amplificados, los ácidos nucleicos, individualmente o como bibliotecas, pueden clonarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. De hecho, las técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, para generar mutaciones en secuencias, subclonación, sondas de marcaje, secuenciación, hibridación y similares están bien descritas en la bibliografía científica y la documentación de patentes. Véase, por ejemplo, Sambrook, ed. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (2ª ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, y *Current Protocols in Molecular Biology* (1997) Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York.

Como alternativa a la amplificación y/o clonación, los ácidos nucleicos de la invención pueden sintetizarse *in vitro* por técnicas bien conocidas de síntesis química, como se describe en, por ejemplo, Carruthers (1982) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47:411-418; Adams (1983) Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109. Después pueden obtenerse fragmentos de ADN bicatenario sintetizando la hebra complementaria e hibridando las hebras juntas en condiciones apropiadas, o añadiendo la hebra complementaria usando ADN polimerasa con una secuencia cebadora apropiada.

Una vez obtenidos, los ácidos nucleicos que codifican las proteínas GPR84, de subunidad Gq y CD36 se introducen en un vector de expresión para expresión de proteínas recombinantes. Dependiendo del uso pretendido (por ejemplo, en ensayos fenotípicos o de unión a ligando), puede usarse cualquier sistema de vector de expresión incluyendo, además de células de mamífero, por ejemplo, sistemas bacterianos, de levaduras, insectos, o plantas. Como se usa en el presente documento, la expresión "vector de expresión" se refiere a cualquier sistema de expresión recombinante con el fin de expresar una molécula de ácido nucleico de la invención, de forma constitutiva o inducible, en cualquier célula, incluyendo células procariotas, de levadura, fúngicas, vegetales, de insecto o de mamífero. La expresión incluye sistemas lineales o circulares de expresión. La expresión incluye sistemas de expresión que permanecen de forma episómica o se integran en el genoma de la célula huésped. Los sistemas de expresión pueden tener la capacidad de auto-replicarse o no, es decir, de dirigir solamente su expresión transitoria en una célula. La expresión incluye casetes recombinantes de expresión que contienen solamente los elementos mínimos necesarios para la transcripción del ácido nucleico recombinante.

Para conseguir la expresión de proteínas recombinantes, es deseable que los ácidos nucleicos de la invención estén unidos de forma funcional a elementos de control de la transcripción o la traducción, por ejemplo, secuencias de inicio de la transcripción y la traducción, promotores y potenciadores, terminadores de la transcripción y la traducción, secuencias de poliadenilación, y otras secuencias útiles para transcribir ADN en ARN. En la construcción de moléculas y vectores de ácido nucleico recombinante, un promotor puede unirse de forma funcional a una o más moléculas de ácido nucleico de la invención para dirigir la expresión del ácido nucleico deseado en todas las células o tejidos o un subconjunto de los mismos. Un "promotor" se define como una serie de ácidos nucleicos que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, un promotor incluye secuencias necesarias de ácido nucleico 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 potenciadores o represores distales, que pueden estar localizados tanto como a varios miles de pares de bases desde el sitio de inicio de la transcripción. En realizaciones particulares, se emplean promotores constitutivos o inducibles. Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo en la mayoría de condiciones ambientales y de desarrollo. Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen, aunque sin limitación, el promotor de P-actina y el promotor de CMV. Un promotor "inducible" es un promotor que es activo bajo regulación ambiental o de desarrollo. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, aunque sin limitación, el promotor de c-fos humana, promotores inducibles por esteroides tales como un promotor inducible por glucocorticoides, y promotores inducibles por molécula pequeña tales como el promotor regulado por tetraciclina. En los promotores de la invención la expresión "unido de forma funcional" se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de la expresión del ácido nucleico (tal como un promotor, o serie de sitios de unión a factores de transcripción) y una segunda molécula de ácido nucleico, en la que la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, las moléculas de ácido nucleico que codifican GPR84, CD36 y G_{q19} se introducen, en tándem, en un vector de expresión para su expresión como proteínas individuales en una célula huésped. En otras realizaciones, las moléculas de ácido nucleico que codifican GPR84, CD36 y G_{q19} se introducen cada una en diferentes vectores de expresión para su co-expresión en una célula huésped. En otras realizaciones más, se emplean dos vectores de expresión con diversas combinaciones de moléculas de ácido nucleico que codifican GPR84, CD36 y G_{q19} (por ejemplo, un vector de expresión alberga ácidos nucleicos de GPR84 y G_{q19} y el otro vector de expresión alberga ácidos nucleicos de CD36). Además, se contempla adicionalmente que las proteínas de la presente invención pueden expresarse como proteínas de fusión, por ejemplo, una proteína de fusión GPR84-G_{q19}.

Cuando las moléculas de ácido nucleico que codifican GPR84, CD36 y G_{q19} se introducen en tándem en un vector de expresión para la co-expresión de proteínas individuales en una célula huésped, algunas realizaciones abarcan el uso de un promotor para regular la expresión de las tres proteínas. A este respecto, se contempla que las moléculas de ácido nucleico que codifican GPR84, CD36 y G_{q19} estén separadas entre sí por sitios internos de entrada del ribosoma (IRES). Los elementos IRES se conocen a partir de genes de virus y mamíferos (Martínez-Salas (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 10:458-64), y también se han identificado en exploraciones de oligonucleótidos sintéticos pequeños (Venkatesan y Dasgupta (2001) Mol. Cell. Biol. 21:2826-37.). Se han analizado los IRES del virus de la encefalomiocarditis en detalle (Mizuguchi, y col. (2000) Mol. Ther. 1:376-82). Un IRES es un elemento codificado en el ADN que produce una estructura en el ARN transcrito en que pueden unirse los ribosomas eucariotas e iniciar la traducción. Un IRES permite producir dos o más proteínas desde una única molécula de ARN (la primera proteína se traduce por ribosomas que se unen al ARN en la estructura de capuchón de su extremo 5', (Martínez-Salas (1999) *supra*).

Como alternativa, otras realizaciones abarcan la introducción en tándem de moléculas de ácido nucleico que codifican GPR84, CD36 y G_{q19} en un vector de expresión, en el que la secuencia codificante para cada proteína tiene sus propias secuencias reguladoras. A este respecto, realizaciones específicas de la invención incluyen una molécula de ácido nucleico que contiene, en orden, las siguientes secuencias: promotor¹ -> secuencia codificante de CD36 -> señal de poliA -> promotor² -> secuencia codificante de G_{q19} -> señal de poliA -> promotor³ -> secuencia codificante de GPR84 -> señal de poliA, en la que el promotor¹⁻³ puede ser el mismo o diferente, o inducible o constitutivo.

Los vectores de expresión, como vectores de expresión individuales para co-expresar las proteínas GPR84, CD36 o G_{q19}, o como un vector de expresión que alberga ácidos nucleicos que codifican las proteínas GPR84, CD36 y G_{q19}, pueden introducirse en un genoma o en el citoplasma o el núcleo de una célula huésped y expresarse mediante una diversidad de técnicas convencionales bien descritas en la bibliografía científica y la documentación de patentes. Véase, por ejemplo, Roberts, (1987) Nature 328:731; y Sambrook, ed. (1989) *supra*. La información del producto de fabricantes de reactivos biológicos y equipos experimentales también proporciona información respecto a procedimientos biológicos conocidos. Los vectores pueden aislarse de fuentes naturales, obtenerse de dichas fuentes como bibliotecas de ATCC o GENBANK, o prepararse por procedimientos sintéticos o recombinantes.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden expresarse en casetes o vectores de expresión (incluyendo plásmidos y virus) que se mantienen de forma estable o transitoria en las células (por ejemplo, sistemas episómicos de expresión). Pueden incorporarse marcadores de selección en los casetes y vectores de expresión para conferir un fenotipo de selección a las células y secuencias transformadas. Por ejemplo, los marcadores de selección pueden codificar mantenimiento y replicación episómica de modo que no se requiera integración en el genoma del huésped. Por ejemplo, el marcador puede codificar resistencia a antibióticos (por ejemplo, cloranfenicol, kanamicina, G418, bleomicina, higromicina) o resistencia a herbicidas (por ejemplo, clorosulfuron) para permitir la selección de aquellas células transformadas con las secuencias deseadas de ADN (véase, por ejemplo, Blondelet-Rouault (1997) Gene 190:315-317; Aubrecht (1997) J. Pharmacol. Exp. Ther. 281:992-997).

También dentro del alcance de la invención están las células huésped recombinantes para co-expresar las proteínas de la invención. Se dice que las proteínas de la invención se "co-expresan" porque la célula huésped, cuando se transforma con ácidos nucleicos que codifican proteínas GPR84, CD36 o G_{q19}, transcribe y traduce proteínas GPR84, CD36 o G_{q19}. Por "célula huésped" se entiende una célula que contiene un vector de expresión y soporta la replicación o expresión del vector de expresión. Las células huésped pueden ser células procariotas tales como *E. coli*, o células eucariotas tales como células de levadura, insecto, anfibio, o mamífero tales como CHO, HeLa, HEK-293, y similares, por ejemplo, células cultivadas, explantes, y células *in vivo*.

Como se indica, la célula huésped puede ser de mamífero o no de mamífero, con preferencia dada a células huésped de mamífero. Puede usarse cualquiera de los procedimientos bien conocidos para introducir el vector o vectores de expresión de la invención en células huésped. Estos incluyen el uso de transfección con fosfato de calcio, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, liposomas, microinyección, vectores plasmáticos, vectores virales y cualquiera de los demás procedimientos bien conocidos para introducir ADN genómico clonado, ADNc, ADN sintético u otro material genético foráneo en una célula huésped (véase, por ejemplo, Sambrook y col. *supra*). Después de introducir el vector de expresión en las células huésped, las células transfectadas se cultivan en condiciones que favorecen la expresión de las proteínas de la invención. Las células huésped de la invención que co-expresan las proteínas GPR84, CD36 o G_{q19} de partir de uno o más vectores de expresión encuentran aplicación en el análisis del transporte de ácidos grasos y la percepción de lípidos de la dieta así como en procedimientos para identificar agentes que modulan la actividad de GPR84.

También se describen procedimientos para explorar moduladores, por ejemplo, activadores, inhibidores, estimuladores, potenciadores, agonistas, y antagonistas, de la actividad de GPR84. Dichos moduladores de la actividad de GPR84 son útiles para modulación farmacológica, química, y genética de las vías de señalización del gusto. Estos procedimientos de exploración pueden usarse para identificar agonistas y antagonistas de alta afinidad de la actividad celular del gusto. Estos compuestos moduladores entonces pueden usarse en las industrias alimentaria y farmacéutica para modificar el sabor, por ejemplo, para modular los sabores de los alimentos.

"Inhibidores", "activadores", y "moduladores" de la actividad de GPR84 se usan de forma intercambiable para hacer referencia a moléculas inhibitoras, activadoras, o moduladoras identificadas usando ensayos de la invención. Los inhibidores son compuestos que, por ejemplo, se unen a, bloquean parcial o totalmente la estimulación de, disminuyen, evitan, retardan al activación de, inactivan, insensibilizan, o regulan negativamente la actividad de GPR84, por ejemplo, antagonistas. Los activadores son compuestos que, por ejemplo, se unen a, estimulan, aumentan, abren, activan, facilitan, potencian la activación de, sensibilizan, o regulan positivamente la actividad de GPR84, por ejemplo, agonistas. Los moduladores también incluyen compuestos que, por ejemplo, alteran la interacción de un receptor con proteínas extracelulares que se unen a activadores o inhibidores, proteínas G, o quinasas. Dichos ensayos para inhibidores y activadores incluyen, por ejemplo, expresar GPR84, CD36 y G_{q19} en células o membranas celulares, aplicar compuestos moduladores putativos y después determinar los efectos funcionales sobre la transducción del gusto. Los resultados de ensayos con activadores, inhibidores o moduladores potenciales se comparan con muestras de control sin el inhibidor, activador, o modulador para examinar el grado de modulación de la actividad de GPR84. A las muestras de control (no tratadas con moduladores) se les asignan un

valor de actividad relativa de GPR84 del 100 %. La inhibición de un GPR84 se consigue cuando el valor de actividad de GPR84 respecto al control es de aproximadamente el 80 %, opcionalmente el 50 % o el 25-0 %. La activación de un GPR84 se consigue cuando el valor de actividad de GPR84 respecto al control es del 110 %, opcionalmente el 150 %, opcionalmente el 200-500 %, o 1000-3000 % mayor.

Pueden proporcionarse ensayos para detectar y caracterizar la modulación del gusto, en los que se usa GPR84 como molécula indicadora para determinar el efecto funcional de moduladores sobre la transducción del gusto de ácido grasos. La expresión "efecto o efectos funcionales" en el contexto de ensayos para ensayar compuestos que modulan la actividad de GPR84 incluye la determinación de cualquier parámetro que esté indirecta o directamente bajo la influencia del receptor, por ejemplo, efectos funcionales, físicos y químicos. Incluye la unión al ligando, cambios en el flujo de iones, potencial de membrana, flujo de corriente, transcripción, unión a proteína G, fosforilación o desfosforilación de GPCR, transducción de señales, interacciones receptor-ligando, concentraciones de segundo mensajero (por ejemplo, AMPc, GMPc, IP₃, o Ca²⁺ intracelular).

Por "determinación del efecto funcional" en el contexto de ensayos en el presente documento se entiende ensayos para un compuesto que aumente o disminuya un parámetro que está indirecta o directamente bajo la influencia de GPR84, por ejemplo, efectos funcionales, físicos y químicos. Dichos efectos funcionales pueden medirse por cualquier medio conocido para los especialistas en la técnica, por ejemplo, cambios en las características espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice de refracción), hidrodinámica (por ejemplo, forma), propiedades cromatográficas, o de solubilidad; pinzamiento zonal; colorantes sensibles a voltaje; corrientes de células completas; flujo de salida de radioisótopos; marcadores inducibles; ensayos de unión a ligando; cambios de voltaje, potencial de membrana y conductancia; ensayos de flujo de iones; cambios en los segundos mensajeros intracelulares tales como AMPc, GMPc, e inositol trifosfato (IP₃); cambios en los niveles de calcio intracelular; y similares.

Los receptores del gusto se unen a estimulantes del gusto e inician la transducción de estímulos químicos en señales eléctricas. Una proteína G activada o inhibida a su vez alterará las propiedades de enzimas, canales, y otras proteínas efectoras diana. Algunos ejemplos son la activación de GMPc fosfodiesterasa por transducina en el sistema visual, adenilato ciclasa por la proteína G estimuladora, fosfolipasa C por G_q y otras proteínas G afines, y la modulación de diversos canales por G_i y otras proteínas G. También pueden examinarse las consecuencias corriente abajo tales como la generación de diacil glicerol e IP₃ por fosfolipasa C, y a su vez, para la movilización de calcio por IP₃. Por consiguiente, la activación de GPR84 puede detectarse usando el control de cambios en el calcio intracelular detectando fluorescencia dependiente de FURA-2 en la célula huésped.

Los receptores GPCR activados se convierten en sustratos para quinasas que fosforilan la cola C-terminal del receptor (y posiblemente otros sitios también). Por tanto, los activadores pueden promover la transferencia de ³²P desde GTP gamma-marcado al receptor, que puede ensayarse con un contador de centelleo. La fosforilación de la cola C-terminal promoverá la unión de proteínas tipo arrestina e impedirá la unión de proteínas G. La vía de quinasa/arrestina desempeña una tarea clave en la insensibilización de muchos receptores GPCR. Por ejemplo, compuestos que modulan la duración que un receptor del gusto permanece activo serían útiles como medios para prolongar un sabor deseado o cortar uno desagradable. Para una revisión general de la transducción de señales de GPCR y procedimientos para ensayar la transducción de señales, véase, por ejemplo, *Methods in Enzymology*, vol. 237 y 238 (1994) y el volumen 96 (1983); Bourne, y col. (1991) *Nature* 10:349:117-27; Bourne, y col. (1990) *Nature* 348:125-32; Pitcher, y col. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* 67:653-92.

Como se indica, pueden realizarse ensayos de flujo de iones para determinar si un compuesto modulaba la actividad de GPR84. Pueden evaluarse cambios en el flujo de iones determinando cambios en la polarización iónica (es decir, el potencial eléctrico) de la célula o membrana que expresa una proteína GPR84. Un medio para determinar cambios en la polarización celular es midiendo cambios en la corriente (midiendo de este modo cambios en la polarización) con técnicas de pinzamiento por voltaje y pinzamiento zonal (véase, por ejemplo, Ackerman, y col. (1997) *New Engl. J. Med.* 336:1575-1595). Las corrientes de células completas se determinan convenientemente usando un patrón. Otros ensayos conocidos incluyen: ensayos de flujo de iones radiomarcados y ensayos de fluorescencia usando colorantes sensibles a voltaje (véase, por ejemplo, Vestergaard-Bogind, y col. (1988) *J. Membrane Biol.* 88:67-75; Gonzales y Tsien (1997) *Chem. Biol.* 4:269-277; Daniel, y col. (1991) *J. Pharmacol. Meth.* 25:185-193; Hlevinsky, y col. (1994) *J. Membrane Biology* 137:59-70). Generalmente, los compuestos a ensayar están presentes en el intervalo de 1 pM a 100 mM.

Los efectos de los compuestos de ensayo sobre la función de GPR84 pueden medirse examinando cualquiera de los parámetros descritos anteriormente. Puede usarse cualquier cambio fisiológico adecuado que afecte a la actividad de GPCR para evaluar la influencia de un compuesto de ensayo sobre GPR84. Cuando se determinan las consecuencias funcionales usando células intactas o animales, también puede medirse una diversidad de efectos tales como liberación de transmisores, liberación de hormonas, cambios transcripcionales a marcadores genéticos tanto conocidos como no caracterizados (por ejemplo, transferencias de northern), cambios en el metabolismo celular tales como crecimiento celular o cambios de pH, y cambios en segundos mensajeros intracelulares tales como Ca²⁺, IP₃, GMPc, o AMPc.

Los ensayos preferidos para GPCR incluyen células que se cargan con colorantes sensibles a iones o voltaje para

indicar actividad del receptor. Los ensayos para determinar la actividad de dichos receptores también pueden usarse agonistas y antagonistas conocidos para otros receptores acoplados a proteína G como controles negativos o positivos para evaluar la actividad de compuestos ensayados. En ensayos para identificar compuestos moduladores (por ejemplo, agonistas, antagonistas), se controlarán los cambios en el nivel de iones en el voltaje del citoplasma o la membrana usando un indicador fluorescente sensible a iones o de voltaje de membrana, respectivamente. Entre los indicadores sensibles a iones y las sondas de voltaje que pueden emplearse están los divulgados en el Molecular Probes 1997 Catalog.

Otros ensayos pueden implicar la determinación de la actividad de receptores que, cuando se activan, provocan un cambio en el nivel de nucleótidos cíclicos intracelulares, por ejemplo, AMPc o GMPc, activando o inhibiendo enzimas tales como la adenilato ciclasa. Existen canales de iones abiertos por nucleótido cíclico, por ejemplo, canales de células fotorreceptoras de bastones y canales de neuronas olfativas que son permeables a cationes tras su activación por unión de AMPc o GMPc (véase, por ejemplo, Altenhofen, y col. (1991) Proc. Natl Acad. Sci. USA 88:9868-9872 y Dhallan, y col. (1990) Nature 347:184-187). En casos donde la activación del receptor provoca una disminución en los niveles de nucleótido cíclico, puede ser preferible exponer las células a agentes que aumentan los niveles intracelulares de nucleótido cíclico, por ejemplo, forskolina, antes de la adición de un compuesto activador del receptor a las células en el ensayo. Las células para este tipo de ensayo pueden prepararse por co-transfección de una célula huésped con ADN que codifica un canal de iones abierto por nucleótido cíclico, GPCR fosfatasa y ADN que codifica un receptor (por ejemplo, ciertos receptores de glutamato, receptores muscarínicos de acetilcolina, receptores de dopamina, receptores de serotonina, y similares) que, cuando se activa, causa un cambio en los niveles de nucleótido cíclico en el citoplasma.

Además, puede usarse la captación de ácidos grasos marcados de forma fluorescente mediante CD36 como una indicación de actividad. Dicho ensayo está disponible en el mercado de fuentes tales como Molecular Devices (Sunnyvale, CA) para su uso con FLIPR.

También pueden usarse animales no humanos que expresan GPR84, para ensayos de receptor. Dicha expresión puede usarse para determinar si un compuesto de ensayo se une específicamente a un polipéptido de mamífero del receptor transmembrana del gusto *in vivo* poniendo en contacto un animal no humano transfectado de forma estable o transitoria con una molécula de ácido nucleico de la invención con un compuesto de ensayo y determinando si el animal reacciona al compuesto de ensayo mediante unión específica al polipéptido del receptor.

Los animales transfectados o infectados con los vectores de la invención son particularmente útiles para ensayos para identificar y caracterizar estimulantes del gusto/ligandos que pueden unirse a un receptor específico o conjuntos de receptores. Dichos animales infectados con vector que expresan secuencias humanas de receptor quimiosensorial pueden usarse para exploración *in vivo* de estimulantes del gusto y su efecto sobre, por ejemplo, la fisiología celular (por ejemplo, sobre neuronas del gusto), sobre el SNC, o el comportamiento.

Los medios para infectar/expresar ácidos nucleicos y vectores son bien conocidos en la técnica. Puede medirse una diversidad de parámetros de células individuales, órganos, o animales completos mediante una diversidad de medios. La molécula de ácido nucleico de la invención puede expresarse, por ejemplo, en tejidos animales del gusto mediante su suministro con un agente de infección, por ejemplo, vector de expresión de adenovirus.

Los compuestos ensayados como moduladores de GPR84 pueden ser cualquier compuesto químico pequeño, o una entidad biológica, tal como una proteína, ácido nucleico o lípido. Típicamente, los compuestos de ensayo serán moléculas químicas pequeñas y péptidos. Puede usarse esencialmente cualquier compuesto químico como modulador o ligando potencial en los ensayos de la invención, aunque normalmente 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 de ensayo y proporcionando compuestos de cualquier fuente conveniente para los ensayos, que se ejecutan típicamente en paralelo (por ejemplo, en formatos de microtitulación sobre placas de microtitulación en ensayos robóticos). Se apreciará que existen muchos proveedores de compuestos químicos, incluyendo Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Suiza) y similares.

Los procedimientos de exploración de alto rendimiento implican proporcionar una biblioteca química o peptídica combinatoria que contiene una gran cantidad de compuestos terapéuticos potenciales (compuestos moduladores o de ligando potenciales). Dichas bibliotecas después se exploran en uno o más ensayos, como se describe en el presente documento, para identificar aquellos miembros de la biblioteca (especies o subclases químicas particulares) que presentan una actividad característica deseada. Los compuestos así identificados pueden servir como "compuestos principales" convencionales o pueden usarse en sí mismos como agentes terapéuticos potenciales o reales. Los moduladores de GPR84 identificados pueden usarse en cualquier producto alimenticio, artículo de confitería, composición farmacéutica, o ingrediente de los mismos para modular de ese modo el sabor del producto, composición, o ingrediente de un modo deseado.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislado que codifica las proteínas CD36, G_qi9, y receptor 84 acoplado a proteína G (GPR84).
2. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.
- 5 3. El vector de expresión de la reivindicación 2, en el que la expresión de CD36, G_qi9, y GPR84 es inducible.
4. El vector de expresión de la reivindicación 2, en el que la expresión de CD36, G_qi9, y GPR84 es constitutiva.
5. Una célula huésped aislada transformada con el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 2 y que co-expresa las proteínas CD36, G_qi9, y GPR84.