

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 610**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53	(2006.01)	A61K 38/00	(2006.01)
G01N 33/567	(2006.01)		
C12P 21/06	(2006.01)		
C12N 1/20	(2006.01)		
C12N 15/00	(2006.01)		
C12N 15/09	(2006.01)		
C12N 15/63	(2006.01)		
C12N 15/70	(2006.01)		
C12N 15/74	(2006.01)		
A01N 37/18	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2002 E 10180331 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2327985**

54 Título: **Receptores gustativos heterooligómeros T1R y líneas celulares que expresan dichos receptores y uso de los mismos para la identificación de compuestos con sabor**

30 Prioridad:

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.10.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ZOLLER, MARK T.;
LI, XIAODONG;
STASZEWSKI, LENA;
O'CONNELL, SHAWN;
ZOZULYA, SERGEY;
ADLER, JON ELLIOT;
XU, HONG y
ECHEVERRI, FERNANDO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 587 610 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptores gustativos heterooligómeros T1R y líneas celulares que expresan dichos receptores y uso de los mismos para la identificación de compuestos con sabor

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

La presente invención se refiere en parte al descubrimiento de que los receptores T1R se ensamblan para formar receptores gustativos funcionales. Particularmente, se ha descubierto que la coexpresión de T1R1 y T1R3 da como resultado un receptor gustativo que responde a estímulos gustativos umami, incluyendo el glutamato monosódico. Además, se ha descubierto que la coexpresión de los receptores T1R2 y T1R3 da como resultado un receptor gustativo que responde a estímulos gustativos dulces incluyendo edulcorantes naturales y artificiales.

Además, la presente descripción se refiere al uso de receptores gustativos heterooligómeros que comprenden T1R1/T1R3 y T1R2/T1R3 en ensayos para identificar compuestos que responden respectivamente a estímulos gustativos umami y estímulos gustativos dulces.

La descripción también se refiere a la construcción de líneas celulares que coexpresan establemente o transitoriamente una combinación de T1R1 y T1R3; o T1R2 y T1R3; bajo condiciones constitutivas o inducibles.

También se proporciona el uso de estas líneas celulares en ensayos basados en células para identificar compuestos moduladores del sabor umami y dulce, particularmente ensayos de cribado de alto rendimiento que detectan actividad receptora mediante el uso de obtención de imágenes fluorométrica.

Descripción de la especialidad relacionada

El sistema gustativo proporciona información sensorial acerca de la composición química del mundo exterior. Se cree que los mamíferos tienen al menos cinco modalidades gustativas básicas: dulce, amarga, agria, salada y umami. Véanse, p. ej., Kawamura y cols., *Introduction to Umami: A Basic Taste* (1987); Kinnamon y cols., *Ann. Rev. Physiol.*, 54:715-31 (1992); Lindemann, *Physiol. Rev.*, 76:718-66 (1996); Stewart y cols., *Am. J. Physiol.*, 272:1-26(1997). Se cree que cada modalidad gustativa está mediada por un receptor o receptores proteínicos distintos que se expresan en células receptoras gustativas sobre la superficie de la lengua (Lindemann, *Physiol. Rev.* 76:718-716 (1996)). Los receptores gustativos que reconocen estímulos gustativos amargo, dulce y umami pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR) (Hoon y cols., *Cell* 96:541 (1999); Adler y cols., *Cell* 100:693 (2000)). (Se cree que otras modalidades gustativas están mediadas por canales iónicos.)

Los receptores acoplados a proteína G median en muchas otras funciones fisiológicas, tales como la función endocrina, la función exocrina, el gasto cardíaco, la lipólisis y el metabolismo de los carbohidratos. El análisis bioquímico y la clonación molecular de un número de tales receptores ha revelado muchos principios básicos referentes a la función de estos receptores. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.691.188 describe cómo cuando un ligando se une a un GPCR, el receptor sufre un cambio de conformación que conduce a la activación de una proteína G heterotrímica al promover el desplazamiento de GDP unido por GTP sobre la superficie de la subunidad G α y la disociación posterior de la subunidad G α desde las subunidades G β y G γ . Las subunidades G α libres y los complejos de G $\beta\gamma$ activan elementos aguas abajo de una variedad de rutas de transducción de señales.

Esta invención se refiere a la clase de T1R de tres miembros de GPCR específicos del sabor. Previamente, se estableció como hipótesis que los receptores T1R funcionan como receptores gustativos del dulce (Hoon y cols., *Cell* 96:541-51 (1999); Kitagawa y cols., *Biochem Biophys Res. Commun.* 283:236-42(2001); Max y cols., *Nat. Genet.* 28:58-63 (2001); Montmayeur y cols., *Nat. Neurosci.* 4:492-8 (2001); Sainz y cols., *J. Neurochem.* 77:896-903 (2001)) y Nelson y cols. (2001) han demostrado recientemente que T1R2 y T1R3 de rata actúan en combinación para reconocer estímulos gustativos dulces. La presente invención se refiere al descubrimiento de que, como es el caso para T1R2/T1R3 de rata, T1R2 y T1R3 humanos actúan en combinación para reconocer estímulos gustativos dulces. La presente descripción también se refiere al descubrimiento de que T1R1 y T1R3 humanos actúan en combinación para reconocer estímulos gustativos umami. Por lo tanto, es probable que T1R2/T1R3 funcione como un receptor gustativo del dulce y es probable que T1R1/T1R3 funcione como un receptor gustativo del umami en mamíferos. La explicación probable de la codependencia funcional de T1R1 y T1R3 y la codependencia de funciones de T1R2 y T1R3 es que, como el receptor de GABA_B estructuralmente relacionado (Jones y cols., *Nature* 396: 5316-22 (1998); Kaupmann y cols., *Nature* 396: 683-7 (1998); White y cols., *Nature* 396:679-82 (1998); Kuner y cols., *Science* 283: 74-77 (1999)), los T1Rs funcionan como complejos heterodímeros.

La identificación de la caracterización de receptores gustativos que funcionan como receptores de dulce y umami es significativa ya que facilitará el uso de estos receptores en ensayos para identificar compuestos que modulan

(potencian o bloquean) el sabor dulce y umami. Estos compuestos serían útiles para mejorar el sabor y la palatabilidad de alimentos, bebidas, medicamentos para consumo por seres humanos o animales. Particularmente, un ensayo que utilice un receptor de dulce funcional permitiría la identificación de nuevos edulcorantes.

Sumario de la invención

5 La presente invención se refiere al descubrimiento de que diferentes combinaciones de T1Rs, cuando se coexpresan, producen receptores gustativos funcionales que responden a estímulos gustativos. Particularmente, la presente invención se refiere al descubrimiento de que la coexpresión de T1R2 T1R3 da como resultado un receptor gustativo heterooligómero que responde a estímulos gustativos dulces.

10 La presente descripción también se refiere a líneas celulares que coexpresan T1R1 y T1R3, preferiblemente humanos, o T1R2 y T1R3, preferiblemente humanos. En realizaciones preferidas, estas líneas celulares expresarán cantidades elevadas de los receptores, bien constitutivamente o bien induciblemente. Estas líneas celulares incluyen células que expresan transitoriamente o establemente T1R1 y T1R3 o T1R2 y T1R3.

15 Además, la presente descripción proporciona ensayos, preferiblemente ensayos de cribado de alto rendimiento, que utilizan el receptor gustativo T1R2/T1R3, o el receptor T1R1/T1R3, preferiblemente ensayos basados en células de alto rendimiento, para identificar compuestos que modulan el sabor dulce o umami. La descripción también proporciona ensayos que incluyen pruebas gustativas para confirmar que estos compuestos modulan el sabor dulce o umami.

20 Objetivos

A este fin, un objetivo es proporcionar una familia de receptores acoplados a proteína G de mamífero, denominados en la presente T1Rs, que median en la percepción del sabor.

25 Otro objetivo es proporcionar fragmentos y variantes de estos T1Rs que retengan la actividad, p. ej., que sean activados por y/o se unan a estímulos gustativos dulces o umami.

Otro objetivo más es proporcionar secuencias de ácido nucleico o moléculas que codifiquen tales T1Rs, fragmentos o variantes de los mismos.

30 Otro objetivo más es proporcionar vectores de expresión que incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican tales T1Rs, o fragmentos o variantes de los mismos, que están conectadas operativamente a al menos una secuencia reguladora tal como una secuencia promotora, potenciadora u otra implicada en la transcripción y/o la traducción génica positiva o negativa, y/o la exportación de proteínas.

35 Otro objetivo más es proporcionar células humanas o no humanas, p. ej., células de mamífero, levadura, gusano o insecto, que expresan funcionalmente al menos uno de tales T1Rs, o fragmentos o variantes de los mismos, y preferiblemente una combinación de T1Rs o fragmentos o variantes de los mismos.

40 Otro objetivo más es proporcionar proteínas o polipéptidos de fusión de T1R que incluyan al menos un fragmento de al menos uno de estos T1Rs.

45 Otro objetivo es proporcionar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de T1R que comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos 50%, preferiblemente 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de ácido nucleico que tiene una de las secuencias de ácido nucleico de hT1R identificadas posteriormente, y variantes modificadas conservativamente de las mismas.

50 Un objetivo adicional es proporcionar una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos de 35 a 50%, y preferiblemente 60%, 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de una de las secuencias de aminoácidos de T1R identificadas posteriormente y variantes modificadas conservativamente de las mismas, en donde el fragmento tiene una longitud de al menos 20, preferiblemente 40, 60, 80, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos. Opcionalmente, el fragmento puede ser un fragmento antigénico que se une a un anticuerpo anti-T1R.

55 Un objetivo adicional más es proporcionar un polipéptido aislado que comprende una variante de dicho fragmento, en donde hay una variación en como mucho 10, preferiblemente 5, 4, 3, 2 o 1 residuos de aminoácido.

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

Otro objetivo más es proporcionar agonistas o antagonistas de estos T1Rs, o fragmentos o variantes de los mismos.

5 Otro objetivo más es proporcionar un péptido que interactúa con el dominio PDZ (denominado en la presente PDZIP) que puede facilitar la expresión superficial de proteínas integrales de la membrana plasmática, específicamente GPCRs tales como los T1Rs. Además, un objetivo es proporcionar vectores que incluyan PDZIP, células hospedadoras que expresen tales vectores y métodos para usar PDZIP para facilitar la expresión superficial.

10 Un objetivo preferido es proporcionar ensayos, especialmente ensayos de alto rendimiento, para identificar compuestos moduladores del sabor, particularmente compuestos que modulan el sabor dulce y el sabor umami. Preferiblemente, tales ensayos utilizarán una combinación de T1Rs, o fragmentos o variantes de los mismos, o genes que codifican estos T1Rs, o fragmentos o variantes de los mismos, que se divulgan en la presente. Lo más preferiblemente, tales combinaciones comprenderán hT1R1/hT1R3 y hT1R2/hT1R3.

15 Un objetivo especialmente preferido es identificar compuestos que modulan los receptores gustativos T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3, p. ej., que potencian la capacidad de estos receptores para responder a estímulos gustativos. Por ejemplo, según se describe anteriormente, se ha descubierto que 5'-IMP o 5'-GMP potencian la sensibilidad del umami (T1R1/T1R3) a L-glutamato. Estos compuestos moduladores pueden potenciar la actividad de diferentes estímulos gustativos dulces o umami, y proporcionan sabores potenciados y/o el mismo sabor que se va a provocar a concentración reducida del compuesto particular que provoca el sabor dulce o umami cuya actividad es potenciada por un modulador gustativo identificado usando los presentes ensayos.

20 Un objetivo adicional más es proporcionar ensayos preferidos para evaluar un sabor de uno o más compuestos que comprende: una etapa de poner en contacto dichos uno o más compuestos con al menos uno de los T1Rs, fragmentos o variantes de los mismos divulgados, preferiblemente combinaciones de T1Rs humanos.

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

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

35 Otro objetivo específico es producir células que coexpresen hT1R2 y hT1R3, o un fragmento, una variante o una quimera de los mismos, para el uso en la identificación de compuestos que potencian, imitan, bloquean y/o modulan la percepción del sabor, especialmente la percepción del sabor dulce.

40 Otro objetivo específico es producir células que coexpresen hT1R1 y hT1R3 o un fragmento, una variante o una quimera de los mismos, para el uso en ensayos para identificar compuestos que potencian, imitan, bloquean y/o modulan la percepción del sabor, especialmente la percepción del sabor umami.

45 Otro objetivo es producir animales no humanos que se han modificado genéticamente para expresar o no expresar uno o más T1Rs.

50 Otro objetivo más es utilizar un compuesto identificado usando un ensayo que utiliza T1Rs, o una combinación de los mismos, como ingredientes aromáticos en composiciones de comida y bebida. En particular, un objetivo es utilizar un compuesto que interactúa con hT1R2 y/o hT1R3 como un bloqueador, potenciador, modulador o imitador del dulce y un compuesto que interactúa con hT1R1 y/o hT1R3 como un bloqueador, potenciador, modulador o imitador del umami en composiciones de comida y bebida.

55 Otro objetivo es usar T1Rs, en particular T1Rs no humanos, para identificar compuestos que modulan el sabor de formulaciones de pienso para el uso, p. ej., en piscicultura.

60 Un objetivo preferido es proporcionar líneas celulares eucarióticas, preferiblemente de mamífero o insecto, que coexpresen establemente hT1R1/hT1R3 o hT1R2/hT1R3, preferiblemente líneas celulares HEK-293, que también expresen una proteína G, p. ej., Gα15 u otra proteína G, que cuando se expresa en asociación con T1R2/T1R3 o T1R1/T1R3 produce un receptor gustativo funcional.

65 Otro objetivo preferido es proporcionar líneas celulares eucarióticas, preferiblemente células de mamífero o insecto, que expresen establemente T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3, preferiblemente hT1R1/hT1R3 o hT1R2/hT1R3. En una realización preferida estas células comprenderán células HEK-293 que expresan establemente Gα15 u otra proteína G que se asocia con T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3 para producir un receptor funcional del sabor umami o dulce.

Además, un objetivo es proporcionar ensayos, preferiblemente ensayos de alto rendimiento que usen HEK-293 u otras líneas celulares que expresen establemente o transitoriamente T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3, bajo condiciones constitutivas o inducibles para identificar compuestos que modulen el sabor umami o dulce.

5 Otro objetivo específico es identificar compuestos que potencien, imiten, bloqueen y/o modulen el receptor gustativo del umami T1R1/T1R3 basándose en su capacidad para afectar a la unión de lactisol (un inhibidor del sabor dulce) o un compuesto estructuralmente relacionado al receptor gustativo del (umami) T1R1/T1R3.

10 Según esto, la presente invención proporciona un método in vitro para identificar una célula que es potencialmente sensible a estímulos gustativos dulces, comprendiendo el método:

(a) detectar la expresión de un polipéptido de T1R2 y/o un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido de T1R2 mediante dicha célula, en donde dicho polipéptido de T1R2

15 (i) es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 10 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10; o

(ii) posee al menos 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de T1R2 de SEQ ID NO: 6;

y

(b) detectar la expresión de un polipéptido de T1R3 y/o un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido de T1R3 mediante dicha célula, en donde dicho polipéptido de T1R3

20 (i) es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 9 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 9; o

(ii) posee al menos 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de T1R3 de SEQ ID NO: 7.

La presente invención también proporciona un método in vitro para cribar con respecto a un compuesto que bloquee o active putativamente la señalización del sabor dulce, comprendiendo el método las etapas de:

25 (a) poner en contacto células con uno o más compuestos, en donde dichas células expresan un receptor gustativo T1R2/T1R3 heterooligómero; y

30 (b) detectar si dichos uno o más compuestos se unen específicamente a dicho receptor gustativo T1R2/T1R3 heterooligómero y/o activan específicamente dicho receptor gustativo T1R2/T1R3 heterooligómero y, basándose en ello, identificar dichos uno o más compuestos como compuestos que bloquean o activan putativamente la señalización del sabor dulce,

en donde dicho receptor gustativo T1R2/T1R3 heterooligómero expresado por dichas células comprende al menos un polipéptido de T1R2 que

(i) es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 10 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10; o

35 (ii) posee al menos 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de T1R2 de SEQ ID NO: 6;

y en donde dicho receptor gustativo T1R2/T1R3 heterooligómero expresado por dichas células comprende al menos un polipéptido de T1R3 que

(i) es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 9 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 9; o

40 (ii) posee al menos 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de T1R3 de SEQ ID NO: 7.

Más aún, la presente invención proporciona un método *in vitro* para cribar con respecto a un compuesto que modula putativamente la señalización del sabor dulce, comprendiendo el método las etapas de:

(a) poner en contacto células con uno o más compuestos, en donde dichas células expresan un receptor gustativo T1R2/T1R3 heterooligómero; y

5 (b) detectar si dichos uno o más compuestos afectan a la unión de otro compuesto a dicho receptor gustativo T1R2/T1R3 heterooligómero y/o modulan la activación de dicho receptor gustativo T1R2/T1R3 heterooligómero mediante otro compuesto y, basándose en ello, identificar dichos uno o más compuestos como compuesto que modulan putativamente la señalización del sabor dulce,

10 en donde dicho receptor gustativo T1R2/T1R3 heterooligómero expresado por dichas células comprende al menos un polipéptido de T1R2 que

(i) es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 10 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10; o

(ii) posee al menos 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de T1R2 de SEQ ID NO: 6; y

15 en donde dicho receptor gustativo T1R2/T1R3 heterooligómero expresado por dichas células comprende al menos un polipéptido de T1R3 que

(i) es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 9 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 9; o

(ii) posee al menos 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de T1R3 de SEQ ID NO: 7.

Breve descripción de las figuras

20 La Figura 1 contiene un alineamiento de secuencias de T1Rs de ser humano y rata, receptor de sensibilización al calcio humano y receptor de glutamato metabotrópico de rata.

La Figura 2 contiene resultados experimentales de amplificación de RT-PCR que muestran que hT1R2 y hT1R3 se expresan en tejido gustativo.

25 Las Figuras 3a - 3b contienen datos funcionales (respuestas de calcio intracelular) provocados por diferentes estímulos gustativos dulces en células HEK que expresan establemente $G\alpha_{15}$ que son transfectadas transitoriamente con T1R2, T1R3 y T1R2/T1R3 de ser humano a diversas concentraciones de estímulos gustativos dulces (Figura 3a); respuestas a la dosis de T1R2/T1R3 de ser humano para diversos estímulos gustativos dulces (Figura 3b); respuestas de T1R2/T1R3 de ser humano a sacarosa en presencia de gurmarina, y respuestas de receptores β 2-adrenérgicos endógenos a isoproterenol en presencia de gurmarina. La Figura 3c contiene la respuesta normalizada a diferentes edulcorantes.

30

La Figura 4 contienen respuestas de calcio intracelular en células HEK que expresan establemente $G\alpha_{15}$, transfectadas transitoriamente con hT1R2/hT1R3, rT1R2/rT1R3, hT1R2/rT1R3 y rT1R2/hT1R3 en respuesta a sacarosa 350 mM, triptófano 25 mM, aspartamo 15 mM y monelina al 0,05%.

35 La Figura 5 contiene los resultados de un ensayo basado en reactor de placa de fluorescencia en el que células HEK que expresaban establemente $G\alpha_{15}$ se transfectaron transitoriamente con hT1R2 y hT1R3 o hT1R3 solo y se ponen en contacto el colorante de calcio Fluo-4 y un estímulo del sabor dulce (ciclamarato 12,5 mM).

La Figura 6 contiene curvas de respuesta a la dosis normalizadas que muestran que hT1R2 y hT1R3 funcionan en combinación como el receptor humano del dulce sobre su interacción específica de la dosis con diversos estímulos dulces (trp, ciclamarato, sacarosa, neotamo, aspartamo, sacarina y Acek).

40 La Figura 7 contiene información estructural relativa a mGluR1 y T1R1 que los residuos que se unen a ligandos clave se observan en estas moléculas.

La Figura 8a-8c contiene datos funcionales que muestran que células HEK que expresan establemente $G\alpha_{15}$ que son transfectadas transitoriamente con T1R1/T1R3 responden a glutamato en un ensayo basado en calcio

intracelular. La Figura 8a muestra que el calcio intracelular se incrementa en respuesta a una concentración de glutamato creciente; la Figura 8b muestra que el calcio intracelular responde a IMP (2 mM), glutamato (0,5 mM) e IMP 0,2 mM; y la Figura 8c muestra respuestas de T1R1/T1R3 de ser humano para glutamato en presencia y ausencia de IMP 0,2 mM.

5 Las Figuras 9a-9b contienen respectivamente los resultados de un ensayo de tinción inmunofluorescente que usa hT1R2 marcado con Myc y un experimento de FACS que muestra que la incorporación del péptido PDZIP (SEQ ID No: 1) potenciaba la expresión de un T1R (hT1R2) sobre la membrana plasmática.

Las Figuras 10a a 10b contienen datos de obtención de imágenes de calcio que demuestran que h1TR2/hT1R3 responden a diferentes estímulos dulces.

10 La Figura 11 muestra las respuestas de líneas celulares que expresan establemente hT1R1/hT1R3 mediante obtención de imágenes de fluorescencia automatizada a estímulos gustativos umami.

La Figura 12 muestra las respuestas de una línea celular que expresa establemente hT1R2/hT1R3 mediante obtención de imágenes de fluorescencia automatizada a estímulos gustativos dulces.

15 La Figura 13 muestra curvas de respuesta a la dosis determinadas usando obtención de imágenes de fluorescencia automatizada para una línea celular que expresa induciblemente el receptor gustativo T1R1/T1R3 humano para L-glutamato en presencia y ausencia de IMP 0,2 mM.

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

La Figura 16 muestra que el lactisol inhibe las actividades receptoras de T1R2/T1R3 humano y T1R1/T1R3 humano.

Descripción detallada de la invención

Se describen en la presente receptores gustativos funcionales, preferiblemente receptores gustativos humanos, que se producen mediante la coexpresión de una combinación de diferentes T1Rs, preferiblemente T1R1/T1R3 o
25 T1R2/T1R3, y las correspondientes secuencias de ácido nucleico aisladas o fragmentos, quimeras o variantes de las mismas que durante la coexpresión den como resultado un receptor gustativo funcional, es decir, un receptor gustativo del dulce (T1R2/T1R3) o un receptor gustativo del umami (T1R1/T1R3).

Como se ha presentado en la bibliografía, miembros de la familia T1R de GPCRs específicos para células gustativas se conocen y se identifican en Hoon y cols., *Cell*, 96:541-551 (1999), y los documentos WO 00/06592, WO 00/06593 y US2003008344 (Nº de Serie de EE. UU. 09/799.629).

Más particularmente, la descripción se refiere a la coexpresión de diferentes GPCRs específicos de células gustativas. Estos ácidos nucleicos y los receptores que codifican se denominan miembros de la familia "T1R" de GPCRs específicos de células gustativas. En realizaciones particulares de la invención, los miembros de la familia
35 T1R que se coexpresan incluirán rT1R1, rT1R2, rT1R3, mT1R1, mT1R2, mT1R3, hT1R1, hT1R2 y hT1R3. Aunque sin querer limitarse a una teoría, se cree que estos GPCRs específicos de células gustativas son componentes de la ruta de transducción del sabor, y están implicados en la detección de sabor de estímulos gustativos dulces y umami y/o otros estímulos gustativos que representan otras modalidades gustativas.

Se establece en la presente que los miembros de la familia T1R actúan en combinación con otros miembros de la familia T1R para funcionar como receptores de sabor dulce y umami. Según se divulga con más detalle posteriormente en los ejemplos experimentales, se ha demostrado que las células heterólogas que coexpresan hT1R2 y hT1R3 son activadas selectivamente por estímulos gustativos dulces de un modo que simula el sabor dulce
45 en seres humanos. Por ejemplo, células HEK-293-Gα15 que coexpresan hT1R2 y hT1R3 responden específicamente a ciclamato, sacarosa, aspartamo y sacarina, y las respuestas a la dosis para estos compuestos se correlacionan con los umbrales de detección de sabor psicofísicos. Por lo tanto, las células que coexpresan hT1R2 y hT1R3 se pueden usar en cribados, preferiblemente cribados de alto rendimiento, para identificar compuestos que imitan, modulan, bloquean y/o potencian la sensación gustativa dulce.

Además, según se apoya por datos en los ejemplos experimentales, se ha observado que las células que coexpresan hT1R1 y hT1R3 son activadas selectivamente por glutamato (glutamato monosódico) y 5'-ribonucleótidos de un modo que simula el sabor umami en seres humanos. Por ejemplo, células HEK-293-Gα15 que coexpresan hT1R1 y hT1R3 responden específicamente a glutamato y la respuesta a dosis para este compuesto
50

con sabor umami se correlaciona con su umbral de detección de sabor psicofísico. Por otra parte, 5'-ribonucleótidos tales como IMP potencian la respuesta a glutamato del receptor T1R1/T1R3, una característica sinérgica del sabor umami. Por lo tanto, las células que coexpresan hT1R1 y hT1R3 se pueden usar en cribados, preferiblemente cribados de alto rendimiento, para identificar compuestos que imitan, modulan, bloquean y/o potencian la sensación de sabor umami.

Adicionalmente, según se muestra mediante los datos experimentales de los ejemplos, se ha observado que las células que coexpresan establemente e induciblemente T1R1/T1R3 responden selectivamente a los estímulos gustativos umami L-glutamato y L-aspartato y responden sólo débilmente a otros L-aminoácidos, y en concentraciones muy superiores, proporcionando una evidencia adicional de que el receptor T1R1/T1R3 se puede usar en ensayos para identificar compuestos que modulan (potencian o bloquean) estímulos gustativos umami.

Además, según se apoya por datos experimentales en los ejemplos, se ha observado que las líneas celulares que coexpresan T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3, respectivamente, responden a estímulos gustativos umami o dulces y de un modo reactivo a la dosis cuantitativo que apoya adicionalmente la conclusión de que el receptor T1R1/T1R3 y T1R2/T1R3 se puede usar para identificar agonistas y antagonistas de receptores, p. ej., sustitutos de MSG, bloqueadores de umami, nuevos edulcorantes artificiales y naturales y bloqueadores del dulce.

Además, según se apoya por datos en los ejemplos experimentales, se ha observado que el bloqueador del sabor dulce lactisol inhibe tanto el receptor de dulce T1R2/T1R3 como el receptor gustativo del umami T1R1/T1R3. Esto sugiere que se pueden usar ensayos que criben con respecto a compuestos que afecten a la unión de lactisol a T1R2/T1R3 o T1R1/T1R3 para identificar compuestos que potencien, imiten, modulen o bloqueen el sabor dulce o umami. El hecho de que el lactisol inhiba los receptores tanto T1R1/T1R3 como T1R2/T1R3 sugiere que estos receptores pueden compartir una subunidad común a la que se une el lactisol y potencialmente otros moduladores gustativos. Por lo tanto, esto sugiere que algunos compuestos que potencian, imitan, modulan o bloquean el sabor dulce pueden tener un efecto similar sobre el sabor umami o viceversa.

Adicionalmente, según se apoya por datos en los ejemplos experimentales, se ha demostrado que las líneas celulares que coexpresan establemente T1Rs, es decir T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3, cuando se ensayan mediante obtención de imágenes de fluorescencia automatizada responden muy eficazmente a diversos estímulos gustativos dulces y umami, es decir en magnitudes sustancialmente mayores que las células transfectadas transitoriamente. Así, estas líneas celulares son especialmente idóneas para el uso en ensayos de cribado de alto rendimiento para identificar compuestos que modulan, bloquean, imitan o potencian el sabor dulce o umami. Sin embargo, también se describen ensayos que utilizan células que expresan transitoriamente un T1R o una combinación de los mismos.

Por otra parte, aunque la descripción y las Figuras contienen datos que demuestran que algunos T1Rs actúan en combinación, particularmente T1R1/T1R3 y T1R2/T1R3, y que estas combinaciones de receptores se pueden usar en ensayos, preferiblemente ensayos de alto rendimiento, se debe apuntar que la descripción también prevé ensayos que utilizan T1R1, T1R2 y T1R3 solos o en combinación con otras proteínas, p. ej., otros GPCRs.

Los compuestos identificados con ensayos de T1R se pueden usar para modular el sabor de alimentos y bebidas. Ensayos adecuados descritos con más detalle posteriormente incluyen a modo de ejemplo ensayos con células enteras y ensayos bioquímicos, incluyendo ensayos de unión directa que usan uno de una combinación de diferentes receptores T1R, quimeras o fragmentos de los mismos, especialmente fragmentos que contienen dominios de unión a ligando N-terminales. Ejemplos de ensayos apropiados para el uso en la invención se describe con mayor detalle posteriormente y se conocen en el campo de los GPCR.

Se pueden diseñar ensayos que cuantifican la unión de diferentes compuestos o mezclas de compuestos a receptores gustativos T1R o combinaciones de receptores gustativos T1R o receptores T1R expresados en combinación con otras proteínas heterólogas (no T1R), p. ej. otros GPCRs, o que cuantifican la activación de células que expresan receptores gustativos T1R. Esto se puede efectuar expresando establemente o transitoriamente receptores gustativos en células heterólogas tales como células HEK-293, CHO y COS.

Los ensayos usarán preferiblemente células que también expresan (preferiblemente establemente) una proteína G tal como G α 15 o G α 16 u otras proteínas G promiscuas o variantes de proteína G, o una proteína G endógena. Además, también se pueden expresar en las mismas proteínas G β y G γ .

El efecto de un compuesto sobre el sabor dulce o umami usando células o composiciones que expresan o contienen los receptores o las combinaciones de receptores identificados anteriormente se puede determinar mediante diversos medios incluyendo el uso de colorantes sensibles al calcio, colorantes sensibles al voltaje, ensayos de cAMP, ensayos de unión directa que usando ligandos marcados fluorescentemente o ligandos radiactivos tales como 3 H-glutamato, o ensayos de transcripción (usando un informador adecuado tal como luciferasa o β -lactamasa).

Ensayos que se pueden utilizar con uno o más T1Rs incluyen, a modo de ejemplo, ensayos que utilizan una selección genética para células vivas; ensayos que utilizan células enteras o fragmentos de membrana o proteínas de T1R purificadas; ensayos que utilizan segundos mensajeros tales como cAMP e IP3, ensayos que detectan la

translocación de arrestina a la superficie celular, ensayos que detectan la pérdida de expresión del receptor sobre la superficie celular (internalización) mediante ligandos probados, ensayos de unión directa a ligandos, ensayos de unión competitiva con inhibidores, ensayos que usan proteína traducida in vitro, ensayos que detectan cambios de conformación con la unión de un ligando (p. ej., según se evidencia mediante proteínólisis, fluorescencia o NMR), ensayos conductuales que utilizan animales no humanos transgénicos que expresan un T1R o una combinación de T1R, tales como moscas, gusanos o ratones, ensayos que utilizan células infectadas con virus recombinantes que contienen genes de T1R.

También se consideran análisis basados en la estructura en los que la estructura cristalina por rayos X de un T1R o fragmento de T1R (o combinación de T1Rs, o una combinación de un T1R con otra proteína) se determina y se utiliza para predecir mediante técnicas de modelado molecular compuestos que se unirán a y/o potenciarán, imitarán, bloquearán o modularán el receptor o la combinación de receptores T1R particular. Más particularmente, la descripción prevé la determinación de la estructura cristalina de T1R1/T1R3 (preferiblemente hT1R1/hT1R3) y/o T1R2/T1R3 (preferiblemente hT1R2/hT1R3) y el uso de estas estructuras cristalinas en métodos de diseño basados en la estructura para identificar moléculas que modulan la actividad del receptor T1R.

La descripción incluye especialmente ensayos bioquímicos efectuados usando células, p. ej., células de mamífero, levadura, insecto u otras heterólogas que expresan uno o más receptores T1R de longitud completa o fragmentos, preferiblemente dominios N-terminales de T1R1, T1R2 y/o T1R3. El efecto de un compuesto en estos ensayos se puede determinar usando ensayos de unión competitiva, p. ej., usando glutamato o IMP radiactivos, fluorescencia (p. ej., polarización de fluorescencia, FRET), o ensayos de unión de GTPy ³⁵S. Según se apunta, en una realización preferida, estos ensayos utilizarán líneas celulares que coexpresan establemente T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3 y una proteína G adecuada, tal como G_{α15}. Otras proteínas G apropiadas incluyen las proteínas G quiméricas y variantes divulgadas en el documento US2002/0128433 (Solicitudes de EE. UU. N° de Serie 09/984.292 y 60/243.770).

Más aún, se pueden construir y expresar receptores alterados que tienen propiedades mejoradas, p. ej., expresión superficial o acoplamiento a proteína G potenciados. Estas variantes de T1R se pueden incorporar en ensayos basados en células y bioquímicos.

Se prevé que los presentes descubrimientos relativos a T1Rs humanos se extiendan a otras especies, p. ej., roedores, cerdos, monos, perros y gatos, y quizás incluso no mamíferos tales como peces. A este respecto, varios fragmentos de T1R de pez se identifican posteriormente en el Ejemplo 1. Por lo tanto, los métodos descritos en la presente tienen aplicación en el cribado de compuestos para el uso en formulaciones de pienso.

Se pueden utilizar diferentes variantes alélicas de diversos T1Rs y combinaciones de los mismos, permitiendo de ese modo la identificación de compuestos que provocan una sensación gustativa específica en individuos que expresan las variantes alélicas o los compuestos que provocan sensaciones gustativas específicas en todos los individuos. Estos compuestos se pueden usar para elaborar alimentos más generalmente sabrosos.

Los ácidos nucleicos que codifican T1R también proporcionan sondas valiosas para la identificación de células gustativas, ya que los ácidos nucleicos se expresan específicamente en células gustativas. Por ejemplo, se pueden usar sondas para polipéptido y proteínas de T1R para identificar células gustativas presentes en las papilas foliada, circunvalada y fungiforme, así como células gustativas presentes en las papilas gustativas, la cavidad oral, el epitelio gastrointestinal y la epiglotis. En particular, se pueden usar métodos para detectar T1Rs para identificar células gustativas sensibles a estímulos gustativos dulces y/o umami u otros estímulos gustativos que representan otras modalidades gustativas. Por ejemplo, se predeciría a partir del presente trabajo que las células que expresan establemente o transitoriamente T1R2 y/o T1R3 son reactivas a estímulos gustativos dulces. De forma similar, se predeciría que las células que expresan T1R1 y/o T1R3 son reactivas a estímulos gustativos umami. Los ácidos nucleicos que codifican las proteínas y los polipéptidos de T1R de la invención se pueden aislar de una variedad de fuentes, manipularse genéticamente, amplificarse, sintetizarse y/o expresarse recombinantemente según los métodos divulgados en el documento WO 00/035374.

Una lista de T1R2s y T1R3s que se pueden expresar se proporcionan en los Ejemplos. Sin embargo, se debe poner énfasis en que la invención abarca la expresión y el uso de otros T1R2s y T1R3s específicos o fragmentos, variantes o quimeras construidos basándose en estas secuencias de T1R, y particularmente T1Rs de las otras especies que tienen el grado de identidad de secuencia requerido o codificados por una secuencia de ácido nucleico que tiene el grado de identidad de secuencia requerido.

Según se divulga, un aspecto importante es la pluralidad de métodos de cribado para moduladores, p. ej., activadores, inhibidores, estimuladores, potenciadores, agonistas y antagonistas, de estos GPCRs específicos de células gustativas. Tales moduladores de la transducción gustativa son útiles para la modulación de rutas de señalización gustativas. Estos métodos de cribado se pueden usar para identificar agonistas y antagonistas de alta afinidad de la actividad de células gustativas. Estos compuestos moduladores se pueden usar a continuación en la industria alimentaria para adaptar el sabor, p. ej., para modular los sabores dulce y/o umami de alimentos.

La descripción rectifica la falta previa de comprensión relativa al sabor dulce y umami ya que identifica T1Rs y combinaciones de receptores T1R específicos que median en la sensación gustativa dulce y umami. Por lo tanto, en general, esta solicitud se refiere a los descubrimientos de los inventores relativos a la clase T1R de receptores acoplados a proteína G específicos del sabor y su función específica en la percepción del sabor y la relación de estos descubrimientos con una mejor comprensión de la base molecular del sabor.

La base molecular del sabor dulce y el sabor umami - el sabor del glutamato monosódico - es enigmática. Recientemente, se identificó una clase de tres miembros de receptores acoplados a proteína G específicos del sabor, denominados T1Rs. El solapamiento de los patrones de expresión de T1R y la demostración de que el receptor de GABA_B estructuralmente relacionado es heterodímero sugieren que los T1Rs funcionan como receptores gustativos heterodímeros. En los ejemplos posteriores, los presentes inventores describen la coexpresión funcional de T1R1, T1R2 y T1R3 humanos en células heterólogas; células que coexpresan T1R1 y T1R3 son activadas por estímulos gustativos umami; células que coexpresan T1R2 y T1R3 son activadas por estímulos gustativos dulces. La actividad de T1R1/T1R3 y T1R2/T1R3 se correlacionaba como umbrales de detección psicofísicos. Además, se encontró que el 5'-ribonucleótido IMP potencia la respuesta de T1R1/T1R3 a glutamato, una característica sinérgica del sabor umami. Estos hallazgos demuestran que T1Rs específicos y particularmente diferentes combinaciones de los T1Rs funcionan como receptores gustativos del dulce y el umami.

Se cree que la percepción humana del amargo, el dulce y el umami está mediada por receptores acoplados a proteína G (Lindemann, B., *Physiol. Res.* 76:718-66 (1996)). Recientemente, la evaluación del genoma humano reveló la clase T2R de receptores gustativos del amargo (Adler y cols., *Cell* 100:613-702 (2000); Chandrasegkar y cols., *Cell* 100:703-11 (2000); Matsunami y cols., *Nature* 404: 601-604 (2000)) pero no se han identificado los receptores para el sabor dulce y umami. Recientemente, se identificó otra clase de posibles receptores gustativos, los T1Rs. Los T1Rs se identificaron en primer lugar mediante la secuenciación a gran escala de una biblioteca de ADNc sustractiva derivada de tejido gustativo de rata, que identificaba T1R1, y posteriormente mediante PCR degenerada basada en T1R1, que conducía a la identificación de T1R2 (Hoon y cols., *Cell* 96:541-551 (1999)). Recientemente, los presentes inventores y otros identificaron un tercer miembro y posiblemente final de la familia T1R, T1R3, en el banco de datos del genoma humano (Kitagawa y cols., *Biochem Biophys. Res Commun.* 283(1): 236-42 (2001); Max y cols., *Nat. Genet.* 28(1): 58-63 (2001); Sainz y cols., *J. Neurochem.* 77(3): 896-903 (2001); Montmayeur y cols., *Nat. Neurosci.* 4, 492-8. (2001)). De forma reveladora, el T1R3 de ratón se correlaciona cartográficamente con un intervalo genómico que contiene *Sac*, un locus que influye en el sabor dulce en el ratón (Fuller y cols., *J. Hered.* 65:33-6 (1974); Li y cols., *Mamm. Genome* 12:13-16 (2001)). Por lo tanto, se predijo que T1R3 funciona como un receptor gustativo del dulce. Recientes estudios de cartografía genética de alta resolución han reforzado la conexión entre T1R3 de ratón y *Sac* (Fuller T.C., *J. Hered.* 65(1):33-36 (1974); Li y cols., *Mammal. Genome* 12(1): 13-16 (2001)).

De forma interesante, se ha observado que todos los receptores de la familia C que se han expresado funcionalmente hasta ahora - receptores de glutamato metabotrópicos, el receptor de GABA_B, el receptor sensible al calcio (Conigrave, A. D., Quinn, S. J. & Brown, E. M., *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4814-9. (2000)) y un receptor olfativo de pez (Specia, D. J. y cols., *Neuron* 23, 487-98. (1999)) - son activados por aminoácidos. Esta característica común aumenta la posibilidad de que los T1Rs reconozcan aminoácidos, y que los T1Rs puedan estar implicados en la detección de glutamato además de aminoácidos de sabor dulce. Alternativamente, se ha propuesto que una variante transcripcional del receptor de glutamato metabotrópico mGluR4 es el receptor gustativo del umami debido a su expresión selectiva en tejido gustativo de rata, y la similitud del umbral de activación del receptor con el umbral de detección psicofísico del glutamato (Chaudhari y cols., *Nat. Neurosci.* 3:113-119 (2000)). Esta hipótesis es difícil de conciliar con el nivel de expresión excesivamente bajo de la variante mGluR4 en tejido gustativo, y el sabor de glutamato más o menos inalterados de ratones con inactivación de mGluR4 (Chaudhari y Roper, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 855:398-406 (1998)). Por otra parte, la variante gustativa es estructuralmente inverosímil, careciendo no solo de la mayoría de los residuos que forman el bolsillo que se une a glutamato del receptor silvestre, sino también de aproximadamente la mitad del dominio de unión a glutamato N-terminal globular (Kunishima y cols., *Nature* 407:971-7 (2000)).

El análisis comparativo de patrones de expresión de T1R en roedores ha demostrado que T1R2 y posiblemente T1R1 se coexpresan cada uno con T1R3 (Hoon y cols., *Cell* 96:541-51 (1999); Kitagawa y cols., *Biochem Biophys. Res. Commun.* 283:236-242 (2001); Max y cols., *Nat. Genet.* 28:58-63.(2001); Montmayeur y cols., *Nat. Neurosci* 4:492-8 (2001); Sainz y cols., *J. Neurochem* 77:896-903 (2001)). Por otra parte, la dimerización está surgiendo como un tema común de los receptores de la familia C: el receptor de glutamato metabotrópico y el sensible al calcio son homodímeros (Romomano y cols., *J. Biol. Chem.* 271:28612-6 (1996); Okamoto y cols., *J. Biol. Chem.* 273: 13089-96 (1998); Han y cols., *J. Biol. Chem.* 274:100008-13 (1999); Bai y cols., *J. Biol. Chem.* 273:23605-10 (1998)), y el receptor de GABA_B relacionado estructuralmente es heterodímero (Jones y cols., *Nature* 396:674-9 (1998); Kaupmann y cols., *Nature* 396:683-687 (1998); White y cols., *Nature* 396: 679-682 (1998); Kuner y cols., *Science* 283:74-77 (1999)). Los presentes inventores han demostrado mediante coexpresión funcional de T1Rs en células heterólogas que el T1R2 humano funciona en combinación con T1R3 humano como un receptor gustativo del dulce y que el T1R1 humano funciona en combinación con T1R3 humano como un receptor gustativo del umami.

Los descubrimientos analizados en la presente son especialmente significativos, ya que previamente el desarrollo de edulcorantes artificiales mejorados ha estado obstaculizado por la falta de ensayos para el sabor dulce. En efecto, los cinco edulcorantes artificiales comercialmente usados, todos los cuales activan hT1R2/hT1R3, fueron descubiertos fortuitamente. De forma similar, aparte de la prueba sensorial, un procedimiento laborioso, no existe un ensayo para identificar compuestos que modulen el sabor umami. Estos problemas se alivian ahora debido a que, según se establece por los resultados experimentales analizados posteriormente, se han identificado los receptores humano del dulce y el umami, y se han desarrollado ensayos para estos receptores, particularmente ensayos que usan células que expresan establemente un receptor gustativo T1R funcional, es decir el receptor del dulce o el umami.

Basándose en esto, la descripción proporciona ensayos para detectar y caracterizar compuestos moduladores del sabor, en los que los miembros de la familia T1R actúan, como lo hacen en la papila gustativa, como moléculas informadoras para el efecto sobre el sabor dulce y umami de compuestos moduladores del sabor. Particularmente, se proporcionan ensayos para identificar compuestos que modulen, imiten, potencien y/o bloqueen individualmente los sabores dulce y umami. Métodos para ensayar la actividad de GPCRs, y especialmente compuestos que afectan a la actividad de GPCR, son muy conocidos y son aplicables al miembro de la familia T1R de la presente invención y combinaciones funcionales del mismo. Ensayos adecuados se han identificado anteriormente.

En particular, los GPCRs en cuestión se pueden usar en ensayos para, p. ej., mediar cambios en la unión a ligandos, la concentración iónica, el potencial de membrana, el flujo de corriente, el flujo iónico, la transcripción, las interacciones receptor-ligando, las concentraciones de segundo mensajero, in vitro. En otra realización, los miembros de la familia T1R se pueden expresar recombinantemente en células, y la modulación de la transducción del sabor a través de la actividad de GPCR se puede ensayar al medir cambios en los niveles de Ca^{2+} y otros mensajes intracelulares tales como cAMP, cGMP o IP_3 .

En ciertos ensayos, un dominio de un polipéptido de T1R, p. ej., un dominio extracelular, transmembranario o intracelular, se fusiona a un polipéptido heterólogo, formando de ese modo un polipéptido quimérico, p. ej., una proteína quimérica con actividad de GPCR. Se contempla particularmente el uso de fragmentos de T1R1, T1R2 o T1R3 que contienen el dominio de unión a ligando N-terminal. Estas proteínas son útiles, p. ej., en ensayos para identificar ligandos, agonistas, antagonistas u otros moduladores de receptores T1R. Por ejemplo, un polipéptido de T1R se puede expresar en una célula eucariótica como un receptor quimérico con una secuencia de chaperona heteróloga que facilita la circulación por la membrana plasmática, o la maduración y la dirección a través de la ruta secretora. La secuencia heteróloga opcional puede ser un péptido que interactúa con el dominio PDZ, tal como un fragmento de PDZIP C-terminal (**SEQ ID NO 1**). PDZIP es una señal de exportación del ER, que, según la presente descripción, se ha mostrado que facilita la expresión superficial de proteínas heterólogas tales como los receptores T1R descritos en la presente. Más particularmente, en un aspecto de la descripción, PDZIP se puede usar para promover la dirección apropiada de proteínas membranaarias problemáticas tales como receptores olfativos, receptores gustativos T2R y los receptores gustativos T1R descritos en la presente.

Estos receptores T1R quiméricos se pueden expresar en cualquier célula eucariótica, tal como células HEK-293. Preferiblemente, las células contienen una G, preferiblemente una proteína G promiscua tal como $G_{\alpha 15}$ o $G_{\alpha 16}$ u otro tipo de proteína G promiscua capaz de conectar una amplia gama de GPCRs a una ruta de señalización intracelular o a una proteína de señalización tal como fosfolipasa C. La activación de tales receptores quiméricos en tales células se pueden detectar usando cualquier método estándar, tal como al detectar cambios en el calcio intracelular al detectar fluorescencia dependiente de FURA-2 en la célula. Si las células hospedadoras preferidas no expresan una proteína G apropiada, se pueden transfectar con un gen que codifica una proteína G promiscua, tal como los descritos en el documento US2002/0128433 (Solicitud de EE. UU. N° 60/243.770, Solicitud de EE. UU. N° de Serie 09/984.292, presentada el 29 de octubre de 2001) y el documento US2002/0143151 (Solicitud de EE. UU. N° de Serie 09/989.497 presentada el 21 de noviembre de 2001).

Métodos adicionales para ensayar moduladores de la transducción del sabor incluyen ensayos de unión a ligandos in vitro que usan: polipéptidos de T1R, porciones de los mismos, es decir, el dominio extracelular, la región transmembranaria, o combinaciones de los mismos, o proteínas quiméricas que comprenden uno o más dominios de un miembro de la familia T1R; ovocitos o células de cultivo tisular que expresan polipéptidos de T1R, fragmentos o proteínas de fusión; fosforilación y desfosforilación de miembros de la familia T1R; unión de proteína G a GPCRs; ensayos de unión a ligandos; voltaje, cambios del potencial de membrana y la conductancia; ensayos de flujo iónico; cambios en los segundos mensajeros intracelulares tales como cGMP, cAMP y trifosfato de inositol (IP_3); y cambios en los niveles de calcio intracelular.

La descripción también proporciona métodos para detectar la expresión de ácido nucleico y proteína de T1R, que permiten la investigación de la regulación de la transducción del sabor y la identificación específica de células receptoras gustativas. Los miembros de la familia T1R también proporcionan sondas de ácido nucleico útiles para investigaciones de paternidad y forenses. Los genes de T1R también son útiles como sondas de ácido nucleico para identificar células receptoras gustativas, tales como células receptoras gustativas de las papilas foliada, fungiforme, circunvalada, la papila gustativa y la epiglotis. Los receptores T1R también se pueden usar para generar anticuerpos monoclonales y policlonales útiles para identificar células receptoras gustativas.

Funcionalmente, los polipéptidos de T1R comprenden una familia de siete receptores acoplados a proteína G transmembranarios relacionados, que se cree que están implicados en la transducción del sabor y pueden interactuar con una proteína G para mediar en la transducción de señales gustativas (véanse, p. ej., Fong, Cell Signal, 8:217 (1996); Baldwin, Curr. Opin. Cell Biol., 6:180 (1994)). Estructuralmente, las secuencias nucleotídicas de los miembros de la familia T1R codifican polipéptidos relacionados que comprenden un dominio extracelular, siete dominios transmembranarios y un dominio citoplásmico. Genes de la familia T1R relacionados de otras especies comparten al menos aproximadamente 50%, y opcionalmente 60%, 70%, 80% o 90%, de identidad de secuencia nucleotídica 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 secuencias de ácido nucleico de T1R divulgadas en la presente en los Ejemplos, o variantes modificadas conservativamente de las mismas, o codifican polipéptidos que comparten al menos aproximadamente de 35 a 50%, y opcionalmente 60%, 70%, 80% o 90%, de identidad de secuencia se aminoácidos 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 una secuencia de polipéptido de T1R divulgada posteriormente en los Ejemplos o variantes modificadas conservativamente de la misma.

También se han identificado varias secuencias o dominios de aminoácidos de consenso 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 50%, opcionalmente 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95-99% o superior, de identidad con las secuencias de consenso de T1R 1 y 2 (SEQ ID NO. 2 y 3, respectivamente). Estos dominios conservados se pueden usar así para identificar miembros de la familia T1R, por identidad, hibridación específica o amplificación, o unión específica mediante anticuerpos producidos contra un dominio. Secuencias de consenso de T1R incluyen a modo de ejemplo las siguientes secuencias:

Secuencia de Consenso de la Familia T1R 1: **(SEQ ID NO: 2)**

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

Secuencia de Consenso de la Familia T1R 2: **(SEQ ID NO: 3)**

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

Estas secuencias de consenso son inclusivas de las encontradas en los polipéptidos de T1R descritos en la presente, pero se puede esperar que los miembros de la familia T1R procedentes de otros organismos comprendan secuencias de consenso que tienen aproximadamente 75% de identidad o más con las secuencias de consenso inclusivas descritas específicamente en la presente.

Regiones específicas de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de T1R se pueden usar para identificar variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de miembros de la familia T1R. Esta identificación se puede realizar in vitro, p. ej., bajo condiciones de hibridación restrictivas o PCR (p. ej., usando cebadores que codifican las secuencias de consenso de T1R identificadas anteriormente), o al usar la información de las secuencias en un sistema informático para comparación con otras secuencias de nucleótidos. Diferentes alelos de genes de T1R dentro de una población de una sola especie también serán útiles para determinar si las diferencias en las secuencias alélicas controlan las diferencias en la percepción gustativa entre miembros de la población. Técnicas clásicas de amplificación y clonación de tipo PCR son útiles para aislar nuevos T1Rs, por ejemplo, cuando los cebadores degenerados son suficientes para detectar genes relacionados entre especies.

Típicamente, la identificación de variantes polimórficas y alelos de miembros de la familia T1R se puede realizar al comparar una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 25 aminoácidos o más, p. ej., 50-100 aminoácidos. Una identidad de aminoácidos de aproximadamente al menos 35 a 50%, y opcionalmente 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95-99% o superior demuestra típicamente que una proteína es una variante polimórfica, un homólogo entre especies, o un alelo de un miembro de la familia T1R. La comparación de secuencias se puede realizar usando cualquiera de los algoritmos de comparación de secuencias analizados posteriormente. Anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos de T1R o una región conservada de los mismos también se pueden usar para identificar alelos, homólogos entre especies y variantes polimórficas.

Las variantes polimórficas, los homólogos entre especies y los alelos de genes de T1R se pueden conformar al examinar la expresión específica para células gustativas del gen o la proteína de T1R putativos. Típicamente, los polipéptidos de T1R que tienen una secuencia de aminoácidos divulgada en la presente se pueden usar como un control positivo en comparación con el polipéptido de T1R putativo para demostrar la identificación de una variante polimórfica o un alelo del miembro de la familia T1R. Se espera que las variantes polimórficas, los alelos y los homólogos entre especies retengan la estructura de siete dominios transmembranarios de un receptor acoplado a proteína G. Para más detalle, véase el documento WO 00/06592, que divulga miembros de la familia T1R relacionados, GPCR-B3s. Los receptores GPCR-B3 se denominan en la presente rT1R1 y mT1R1. Adicionalmente,

véase el documento WO 00/06593, que también divulga miembros de la familia T1R relacionados, GPCR-B4s. Los receptores GPCR-B4 se denominan en la presente rT1R2 y mT1R2. Según se analiza previamente, la descripción también incluye ensayos basados en la estructura que utilizan la estructura cristalina por rayos X de un T1R o una combinación de T1R, p. ej., hT1R2/hT1R3 o hT1R1/hT1R3, para identificar moléculas que modulan la actividad del receptor T1R, y de ese modo modulan el sabor dulce y/o umami.

La presente descripción también proporciona ensayos, preferiblemente ensayos de alto rendimiento, para identificar moléculas que potencien, imiten, bloqueen y/o modulen receptores T1R. En algunos ensayos, se usa un dominio particular de un miembro de la familia T1R en combinación con un dominio particular de otro miembro de la familia T1R, p. ej., un dominio o región extracelular, transmembranario o intracelular. En otras realizaciones, un dominio extracelular, una región transmembranaria o una combinación de los mismos se puede unir a un sustrato sólido, y se puede usar, p. ej., para aislar ligandos, agonistas, antagonistas, o cualesquiera otras moléculas que se puedan unir a y/o modular la actividad de un polipéptido de T1R.

Se prevé que diversas mutaciones y sustituciones conservativas estén dentro del alcance de la invención. A modo de ejemplo, está dentro del nivel de experiencia en la especialidad realizar sustituciones de aminoácidos usando protocolos conocidos de tecnología génica recombinante incluyendo PCR, clonación génica, mutagénesis dirigida a un sitio de ADNc, transfección de células hospedadoras y transcripción in vitro. Las variantes se podrían cribar a continuación con respecto a la actividad.

Definiciones

Según se usan en la presente, los siguientes términos tienen los significados atribuidos a ellos a menos que se especifique otra cosa.

"Células gustativas" incluyen células neuroepiteliales que se organizan en grupos para formar las papilas gustativas de la lengua, p. ej., células foliadas, fungiformes y circunvaladas (véase, p. ej., Roper y cols., *Ann. Rev. Neurosci.* 12:329-353 (1989)). También se encuentran células gustativas en el paladar y otros tejidos, tales como el esófago y el estómago.

"T1R" se refiere a uno o más miembros de una familia de receptores acoplados a proteína G que se expresan en células gustativas tales como células foliadas, fungiformes y circunvaladas, así como células del paladar y el esófago (véase, p. ej., Hoon y cols., *Cell*, 96:541-551 (1999)). Los miembros de esta familia también se denominan GPCR-B3 y TR1 en el documento WO 00/06592 así como GPCR-B4 y TR2 en el documento WO 00/06593. GPCR-B3 también se denomina en la presente rT1R1, y GPCR-B4 se denomina rT1R2. Las células receptoras gustativas también se pueden identificar basándose en la morfología (véase, p. ej., Roper, anteriormente), o por la expresión de proteínas expresadas específicamente en células gustativas. Los miembros de la familia T1R pueden tener la capacidad de actuar como receptores para la transducción del sabor dulce, o para distinguir entre varias otras modalidades gustativas. Secuencias de T1R representativas, incluyendo hT1R1, hT1R2 y hT1R3 se identifican posteriormente en los ejemplos.

Los ácidos nucleicos de "T1R" codifican una familia de GPCRs con siete regiones transmembranarias que tienen "actividad de receptor acoplado a proteína G", p. ej., se pueden unir a proteínas G en respuesta a estímulos extracelulares y promover la producción de segundos mensajeros tales como IP3, cAMP, cGMP y Ca^{2+} a través de la estimulación de enzimas tales como fosfolipasa C y adenilato ciclasa (para una descripción de la estructura y la función de GPCRs, véanse, p. ej., Fong, anteriormente, y Baldwin, anteriormente). Una sola célula gustativa puede contener muchos polipéptidos de T1R distintos.

Por lo tanto, el término familia "T1R" se refiere a variantes polimórficas, alelos, mutantes y homólogos entre especies que: (1) tienen al menos aproximadamente de 35 a 50% de identidad de secuencia de aminoácidos, opcionalmente aproximadamente 60, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido de T1R, preferiblemente los identificados en el Ejemplo 1, a lo largo de un margen de aproximadamente 25 aminoácidos, opcionalmente 50-100 aminoácidos; (2) se unen específicamente a anticuerpos producidos contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada preferiblemente del grupo que consiste en la secuencia del polipéptido de T1R divulgada en el Ejemplo 1 y variantes modificadas conservativamente de la misma; (3) son codificados por una molécula de ácido nucleico que se hibrida específicamente (con un tamaño de al menos aproximadamente 100, opcionalmente al menos aproximadamente 500-1000 nucleótidos) bajo condiciones de hibridación restrictivas a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de ácido nucleico de T1R contenidas en el Ejemplo 1, y variantes modificadas conservativamente de las mismas; o (4) comprenden una secuencia al menos de aproximadamente 35 a 50% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de T1R identificada en el Ejemplo 1.

Topológicamente, ciertos GPCRs quimiosensoriales tienen un "dominio N-terminal"; "dominios extracelulares"; "dominios transmembranarios" que comprenden siete regiones transmembranarias, y bucles citoplásmicos y extracelulares correspondientes; "dominios citoplásmicos" y un "dominio C-terminal" (véanse, p. ej., Hoon y cols.,

Cell, 96:541-551 (1999); Buck & Axel, *Cell*, 65:175-187 (1991)). Estos dominios se pueden identificar estructuralmente usando métodos conocidos por los expertos en la especialidad, tales como programas de análisis de secuencias que identifican dominios hidrófobos e hidrófilos (véase, p. ej., Stryer, *Biochemistry*, (3^a ed. 1988); véase también cualquiera de un número de programas de análisis de secuencias basados en Internet, tales como los encontrados en dot.imgen.bcm.tmc.edu). Tales dominios son útiles para elaborar proteínas quiméricas y para ensayos in vitro de la invención, p. ej., ensayos de unión a ligandos.

Por lo tanto, "dominios extracelulares" se refiere a los dominios de polipéptidos de T1R que sobresalen de la membrana celular y se exponen a la cara extracelular de la célula. Tales dominios incluyen generalmente el "dominio N-terminal" que se expone a la cara extracelular de la célula, y opcionalmente pueden incluir porciones de los bucles extracelulares del dominio transmembranario que se exponen a la cara extracelular de la célula, es decir, los bucles entre las regiones transmembranarias 2 y 3, entre las regiones transmembranarias 4 y 5, y entre las regiones transmembranarias 6 y 7.

La región del "dominio N-terminal" empieza en el extremo N y se extiende hasta una región cercana al principio del primer dominio transmembranario. Más particularmente, en una realización de la invención, este dominio empieza en el extremo N y termina aproximadamente en el ácido glutámico conservado en la posición del aminoácido 563 más o menos aproximadamente 20 aminoácidos. Estos dominios extracelulares son útiles para ensayos de unión a ligandos in vitro, en fase tanto soluble como sólida. Además, las regiones transmembranarias, descritas posteriormente, también se pueden unir al ligando en combinación con el dominio extracelular, y por lo tanto también son útiles para ensayos de unión a ligandos in vitro.

"Dominio transmembranario", que comprende las siete "regiones transmembranarias", se refiere al dominio de polipéptidos de T1R que está dentro de la membrana plasmática, y también puede incluir los correspondientes bucles citoplásmico (intracelular) y extracelular. En una realización, esta región corresponde al dominio de miembros de la familia T1R que empieza aproximadamente en el residuo de ácido glutámico conservado en la posición del aminoácido 563 más o menos 20 aminoácidos y termina aproximadamente en el residuo de aminoácido tirosina conservado en las posición 812 más o menos aproximadamente 10 aminoácidos. Las siete regiones transmembranarias y los bucles extracelular y citoplásmico se pueden identificar usando métodos estándar, según se describe en Kyte & Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157:105-32 (1982)), o en Stryer, anteriormente.

"Dominios citoplásmicos" se refiere a los dominios de polipéptidos de T1R que dan al interior de la célula, p. ej., el "dominio C-terminal" y los bucles intracelulares del dominio transmembranario, p. ej., el bucle intracelular entre las regiones transmembranarias 1 y 2, el bucle intracelular entre las regiones transmembranarias 3 y 4 y el bucle intracelular entre las regiones transmembranarias 5 y 6. "Dominio C-terminal" se refiere a la región que abarca el extremo del último dominio transmembranario y el extremo C de la proteína, y que normalmente está situada dentro del citoplasma. En una realización, esta región empieza en el residuo de aminoácido tirosina conservado en la posición 812 más o menos aproximadamente 10 aminoácidos y continúa hasta el extremo C del polipéptido.

El término "región de unión a ligando" o "dominio de unión a ligando" se refiere a secuencias derivadas de un receptor gustativo, particularmente un receptor gustativo que incorpora sustancialmente 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, porciones del dominio transmembranario, tales como los bucles extracelulares del dominio transmembranario. La región de unión a ligando puede ser capaz de unirse a un ligando y, más particularmente, un compuesto que potencie, imite, bloquee y/o module el sabor, p. ej., el sabor dulce o umami.

La expresión "heteromultímero" o "complejo heteromultímero" en el contexto de los receptores T1R o los polipéptidos de la invención se refiere a una asociación funcional de al menos un receptor T1R y otro receptor, típicamente otro polipéptido de receptor T1R (o, alternativamente, otro polipéptido que no es de receptor T1R). Por claridad, la codependencia funcional de los T1Rs se describe en esta solicitud relegando su posible función como complejos de receptores gustativos heterodímeros.

La expresión "efectos funcionales", en el contexto de ensayos para probar compuestos que modulen la transducción del sabor mediada por miembros de la familia T1R incluye la determinación de cualquier parámetro que esté indirectamente o directamente bajo la influencia del receptor, p. ej., efectos funcionales, físicos y químicos. Incluye unión a ligandos, cambios en el flujo iónico, el potencial de membrana, el flujo de corriente, la transcripción, la unión a proteína G, la fosforilación o desfosforilación de GPCR, ensayos basados en cambios de conformación, la transducción de señales, interacciones receptor-ligando, concentraciones de segundo mensajero (p. ej., cAMP, cGMP, IP3 o Ca²⁺ intracelular), in vitro, y también incluye otros efectos fisiológicos tales como incrementos o disminuciones de la liberación de neurotransmisores u hormonas.

Por "determinar el efecto funcional", en el contexto de ensayos, se entiende ensayos para un compuesto que incremente o disminuya un parámetro que está indirectamente o directamente bajo la influencia de un miembro de la familia T1R, p. ej., efectos funcionales, físicos y químicos. Estos efectos funcionales se pueden medir por medios conocidos por los expertos en la especialidad, p. ej., cambios en las características espectroscópicas (p. ej., fluorescencia, absorbencia, índice de refracción), propiedades hidrodinámicas (p. ej., conformación), cromatográficas

o de solubilidad, pinzamiento zonal, colorantes sensibles al voltaje, corrientes en células enteras, flujo de radioisótopos, marcadores inducibles, expresión de genes de T1R de ovocitos; expresión de T1R en células de cultivo tisular; activación transcripcional de genes de T1R; ensayos de unión a ligandos; cambios de voltaje, potencial de membrana y conductancia; ensayos de flujo iónico; cambios en segundos mensajeros intracelulares tales como cAMP, cGMP y trifosfato de inositol (IP3); cambios en niveles de calcio intracelular; liberación de neurotransmisores, ensayos de conformación y similares.

Se usan "inhibidores", "activadores" y "moduladores" de genes o proteínas de T1R para referirse a moléculas inhibitoras, activadoras o moduladoras identificadas usando ensayos in vitro para la transducción del sabor, p. ej., ligandos, agonistas, antagonistas y sus homólogos y miméticos.

Los inhibidores son compuestos que, p. ej., se unen a, bloquean parcialmente o totalmente la estimulación, disminuyen, evitan, retardar la activación, inactivan, desensibilizan o regulan a la baja la transducción del sabor, p. ej., antagonistas. Los activadores son compuestos que, p. ej., se unen a, estimulan, incrementan, abren, activan, facilitan, potencian la activación, sensibilizan o regulan al alza la transducción del sabor, p. ej., agonistas. Los moduladores incluyen compuestos que, p. ej., alteran la interacción de un receptor con: proteínas extracelulares que se unen a activadores o inhibidores (p. ej., eberina y otros miembros de la familia de portadores hidrófobos); proteínas G; cinasas (p. ej., homólogos de rodopsina cinasa y cinasas receptoras β -adrenérgicas que están implicadas en la desactivación y la desensibilización de un receptor); y arrestinas, que también desactivan y desensibilizan receptores. Los moduladores pueden incluir versiones genéticamente modificadas de miembros de la familia T1R, p. ej., con actividad alterada, así como ligandos, antagonistas, agonistas, moléculas químicas pequeñas y similares de origen natural y sintéticos. Tales ensayos para inhibidores y activadores incluyen, p. ej., expresar miembros de la familia T1R en células o membranas celulares, aplicar compuestos moduladores putativos, en presencia o ausencia de saborizantes, p. ej., saborizantes dulces, y a continuación determinar los efectos funcionales sobre la transducción del sabor, según se describe anteriormente. Muestras o ensayos que comprenden miembros de la familia T1R que son tratados con un activador, inhibidor o modulador potencial se comparan con muestras de control sin e inhibidor, activador o modulador para examinar el grado de modulación. A las muestras de control positivo (p. ej. un saborizante sin moduladores añadidos) se les asigna un valor de actividad de T1R relativo de 100%.

A las muestras de control negativo (p. ej. tampón sin un estímulo gustativo añadido) se les asigna un valor de actividad de T1R relativo de 0%. La inhibición de un T1R se alcanza cuando una mezcla de la muestra de control positivo y un modulador da como resultado que el valor de actividad de T1R relativo al control positivo es aproximadamente 80%, opcionalmente 50% o 25-0%. La activación de un T1R por un modulador solo se alcanza cuando la actividad de T1R relativa a la muestra de control positivo es 10%, 25%, 50%, 75%, opcionalmente 100%, opcionalmente 150%, opcionalmente 200-500%, o 1.000-3.000% superior.

Los términos "purificado", "sustancialmente purificado" y "aislado", según se usan en la presente, se refieren 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 modo que el sujeto "purificado" "sustancialmente purificado" y "aislado" comprende al menos 0,5%, 1%, 5%, 10% o 20% y lo más preferiblemente al menos 50% o 75% de la masa, en peso, de una muestra dada. En una realización preferida, estos términos se refieren al compuesto de la invención que comprende al menos 95% de la masa, en peso, de una muestra dada. Según se usan en la presente, los términos "purificado", "sustancialmente purificado" y "aislado", cuando se refieren a un ácido nucleico o una proteína, también se refiere a un estado de purificación o concentración diferente del que se presenta naturalmente en el cuerpo del mamífero, especialmente el ser humano. Cualquier grado de purificación o concentración mayor que el que se presenta naturalmente en el cuerpo del mamífero, especialmente el ser humano, incluyendo (1) la purificación a partir de otras estructuras o compuestos o (2) la asociación con estructuras o compuestos a los que no está asociado normalmente en el cuerpo del mamífero, especialmente el ser humano, está dentro del significado de "aislado". El ácido nucleico o la proteína o las clases de ácidos nucleicos o proteínas, descritos en la presente, se pueden aislar, o asociarse de otro modo con estructuras o compuestos a los que normalmente no están asociados en la naturaleza, según una variedad de métodos y procedimientos conocidos por los expertos en la especialidad.

El término "ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" se refiere a un oligonucleótido desoxirribonucleotídico o ribonucleotídico en forma bien de una sola hebra o bien de doble hebra. El término abarca ácidos nucleicos, es decir, oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales. El término también abarca estructuras similares a ácidos nucleicos con esqueletos sintéticos (véanse, p. ej., *Oligonucleotides and Analogues*, a Practical Approach, ed. F. Eckstein, Oxford Univ. Press (1991); *Antisense Strategies*, Annals of the N.Y. Academy of Sciences, Vol. 600, Eds. Baserga y cols. (NYAS 1992); Milligan *J. Med. Chem.* 36:1923-1937 (1993); *Antisense Research and Applications* (1993, CRC Press), documento WO 97/03211; el documento WO 96/39154; *Mata, Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144:189-197 (1997); Strauss-Soukup, *Biochemistry* 36:8692-8698 (1997); Samstag, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 6:153-156 (1996)).

A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas conservativamente de la misma (p. ej., sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como las secuencias indicadas explícitamente. Específicamente, se pueden alcanzar

sustituciones de codones degenerados al generar, p. ej., secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionado se sustituye por residuos de bases mixtas y/o desoxiinosina (Batzer y cols., *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka y cols., *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolini y cols., *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994)). El término ácido nucleico se usa intercambiamente con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan intercambiamente en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácido es un mimético químico artificial de un aminoácido presente en la naturaleza, así como polímeros de aminoácidos presentes en la naturaleza y un polímero de aminoácidos no presente en la naturaleza.

El término "dominio de translocación de la membrana plasmática" o simplemente "dominio de translocación" significa un dominio polipeptídico que, cuando se incorpora en una secuencia codificante de polipéptido, puede "chaperonar" o "translocar" con mayor eficacia la proteína híbrida ("de fusión") a la membrana plasmática celular que sin el dominio. A modo de ejemplo, un "dominio de translocación" se puede derivar del extremo amino del polipéptido receptor de rodopsina bovino, un receptor 7-transmembranario. Sin embargo, se puede usar rodopsina de cualquier mamífero, como también otras secuencias que faciliten la translocación. Así, el dominio de translocación es particularmente eficaz para translocar proteínas de fusión 7-transmembranarias a la membrana plasmática, y una proteína (p. ej., polipéptido receptor gustativo) que comprende un dominio de translocación aminoterminal se transportará a la membrana plasmática más eficazmente que sin el dominio. Sin embargo, si el dominio N-terminal del polipéptido es activo en la unión, como con los receptores T1R de la presente invención, se puede preferir el uso de otros dominios de translocación. A modo de ejemplo, se puede usar un péptido que interactúa con el dominio PDZ.

El "dominio de translocación", "dominio de unión a ligando" y las composiciones de receptores quiméricos descritos en la presente también incluyen "análogos" o "variantes conservativas" y "miméticos" ("peptidomiméticos") con estructuras y actividad que corresponden sustancialmente a las secuencias ejemplares. Así, los términos "variante conservativa" o "análogo" o "mimético" se refieren a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos modificada, de modo que el cambio o los cambios no alteren sustancialmente la estructura y/o la actividad del polipéptido (de las variantes conservativas), según se define en la presente. Estas incluyen variaciones modificadas conservativamente de una secuencia de aminoácidos, es decir, sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos de los residuos que no sean críticos para la actividad proteínica, o sustitución de aminoácidos por residuos que tienen propiedades similares (p. ej., ácidos, básicos, cargados positivamente o negativamente, polares o no polares, etc.) de modo que las sustituciones de aminoácidos incluso críticos no altere la estructura y/o la actividad.

Más particularmente, "variantes modificadas conservativamente" se aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, variantes modificadas conservativamente se refiere a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o sustancialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada.

A modo de ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Así, en cualquier posición en la que una alanina es especificada por un codón, el codón se puede alterar hasta cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado.

Estas variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas conservativamente. Cualquier secuencia de ácido nucleico de la presente, que codifique un polipéptido, también describe cualquier posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es normalmente el único codón para la metionina, y TGG, que es normalmente el único codón para el triptófano) se puede modificar para dar una molécula funcionalmente idéntica. Según esto, cualquier variación silenciosa de un ácido nucleico, que codifica un polipéptido, está implícita en cada secuencia descrita.

Se conocen bien en la técnicas tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Por ejemplo, una directriz ejemplar para seleccionar sustituciones conservativas incluye (residuo original seguido por sustitución ejemplar): ala/gly o ser; arg/lys; asn/gln o his; asp/glu; cys/ser; gln/asn; gly/asp; gly/ala o pro; his/asn o gln; ile/leu o val; leu/ile o val; lys/arg o gln o glu; met/leu o tyr o ile; phe/met o leu o tyr; ser/thr; thr/ser; trp/tyr; tyr/trp o phe; val/ile o leu. Una directriz alternativa usa los seis grupos siguientes, conteniendo cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas de otro: 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (I); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); (véanse, además, p. ej., Creighton, *Proteins*, W.H. Freeman and Company (1984); Schultz and Schimer, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag (1979)). Un experto en la especialidad apreciará que las sustituciones identificadas anteriormente no son las únicas sustituciones conservativas posibles. Por ejemplo, para algunos propósitos, se pueden considerar todos los

aminoácidos cargados como sustituciones conservativas entre sí ya sean positivos o negativos. Además, las sustituciones, eliminaciones o adicionales individuales que alteran, añaden o eliminan un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en una secuencia codificada también se pueden considerar "variaciones modificadas conservativamente."

5 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, p. ej., dominios de translocación, dominios de unión a ligando o receptores quiméricos de la invención. El mimético bien puede estar totalmente compuesto por análogos no naturales sintéticos de aminoácidos, o bien puede ser una molécula quimérica de aminoácidos de péptidos parcialmente naturales y análogos parcialmente no naturales de aminoácidos. El mimético también puede incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservativas de aminoácidos naturales con tal de que tales sustituciones tampoco alteren sustancialmente la estructura y/o la actividad del mimético.

15 Como con polipéptidos de la invención que son variantes conservativas, la experimentación habitual determinará si un mimético está dentro del alcance de la descripción, es decir, que su estructura y/o función no está sustancialmente alterada. Las composiciones de miméticos polipeptídicos pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales no naturales, que son típicamente de tres grupos estructurales: a) grupos de conexión de residuos distintos de las conexiones de enlace amida natural ("enlace peptídico"); b) residuos no naturales en lugar de los residuos de aminoácido presentes en la naturaleza; o c) residuos que inducen mimetismo estructural secundario, es decir, para inducir o estabilizar una estructura secundaria, p. ej., giro β , giro γ , lámina β , conformación de hélice α y similares. Un polipéptido se puede caracterizar como un mimético cuando todos o algunos de sus residuos están ligados por medios químicos distintos a los enlaces peptídicos naturales. Los residuos peptidomiméticos individuales pueden estar ligados por enlaces peptídicos, otros enlaces químicos o medios de acoplamiento, tales como, p. ej., glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, maleimidias bifuncionales, N,N'-dicitclohexilcarbodiimida (DCC) o N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC). Grupos de conexión que pueden ser una alternativa a las conexiones por enlace amida tradicional ("enlace peptídico") incluyen, p. ej., cetometileno (p. ej., -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, p. ej., Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, pp 267-357, "Peptide Backbone Modifications," Marcell Dekker, NY (1983)). Un polipéptido también se puede caracterizar como un mimético al contener todos o algunos residuos no naturales en lugar de residuos de aminoácido presentes en la naturaleza; los residuos no naturales se describen bien en la bibliografía científica y de patentes.

35 Un "marcador" o un "resto detectable" es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunquímicos o químicos. Por ejemplo, marcadores útiles incluyen ³²P, colorantes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (p. ej., como las usadas comúnmente en un ELISA), biotina, digoxigenina, o haptenos y proteínas que se pueden hacer detectables, p. ej., al incorporar un radiomarcador en el péptido, o se pueden usar para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el péptido.

40 Una "sonda de ácido nucleico u oligonucleótido marcado" es uno que esté unido, bien covalentemente, a través de un conector o un enlace químico, o bien no covalentemente, a través de enlaces iónicos, de van der Waals, electrostáticos o de hidrógeno a un marcador de modo que la presencia de la sonda se pueda detectar al detectar la presencia del marcador unido a la sonda.

45 Según se usa en la presente, una "sonda de ácido nucleico u oligonucleótido" se define como un ácido nucleico capaz de unirse a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos, habitualmente a través de apareamiento de bases complementarias, habitualmente a través de la formación de enlaces de hidrógeno. Según se usa en la presente, una sonda puede incluir bases naturales (es decir, A, G, C o T) o modificadas (7-desazaguanosina, inosina, etc.). Además, las bases en una sonda se pueden ligar mediante una conexión diferente a un enlace fosfodiéster, con tal de que no interfiera con la hibridación. Así, por ejemplo, las sondas pueden ser ácidos nucleicos peptídicos en los que las bases constituyentes están ligadas por enlaces peptídicos en lugar de conexiones fosfodiéster. Se entenderá por un experto en la especialidad que las sondas se pueden unir a secuencias diana que carecen completamente de complementariedad con la secuencia de la sonda dependiendo de la restricción de las condiciones de hibridación. Opcionalmente, las sondas se marcan directamente, tal como con isótopos, cromóforos, lumíforos, cromógenos o se marcan indirectamente, tal como con biotina a la que se puede unir más tarde un complejo de estreptavidina. Al ensayar la presencia o ausencia de la sonda, se puede detectar la presencia o ausencia de la secuencia o subsecuencia seleccionada.

60 El término "heterólogo", cuando se usa con referencia a porciones de un ácido nucleico, indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. A modo de ejemplo, el ácido nucleico típicamente se produce recombinantemente, teniendo dos o más secuencias procedentes de genes no relacionados dispuestas para formar un nuevo ácido nucleico funcional, p. ej., un promotor procedente de una fuente y una región codificante procedente de otra fuente. De forma similar, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (p. ej., una proteína de fusión).

65

Un "promotor" se define como una serie de secuencias de ácido nucleico que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Según se usa en la presente, un promotor incluye secuencias de ácido nucleico necesarias cercanas al sitio de comienzo 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 situados tanto como varios miles de pares de bases desde el sitio de comienzo de la transcripción. Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo bajo la mayoría de las condiciones medioambientales y experimentales.

Un promotor "inducible" es un promotor que es activo bajo la regulación medioambiental y experimental. el término "conectado operativamente" se refiere a una conexión funcional entre una secuencia de control de la expresión de un ácido nucleico (tal como un promotor, o una disposición de sitios de unión a factores de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

Según se usa en la presente, "recombinante" se refiere a un polinucleótido sintetizado o manipulado de otro modo in vitro (p. ej., "polinucleótido recombinante"), a métodos para usar polinucleótidos recombinantes para producir productos génicos en células u otros sistemas biológicos, o a un polipéptido ("proteína recombinante") codificado por un polinucleótido recombinante. "Medios recombinantes" también abarca de ligación de ácidos nucleicos que tienen diversas regiones o dominios codificantes o secuencias promotoras procedentes de diferentes fuentes en un casete o vector de expresión para la expresión de, p. ej., la expresión inducible o constitutiva de, una proteína de fusión que comprende un dominio de translocación de la descripción y una secuencia de ácido nucleico amplificada usando un cebador de la descripción.

Según se usa en la presente, una "línea celular estable" se refiere a una línea celular que establemente, es decir a lo largo de un período prolongado, expresa una secuencia nucleica heteróloga, es decir un T1R o proteína G. En realizaciones preferidas, tales líneas celulares estables se producirán al transfectar células apropiadas, típicamente células de mamífero, p. ej. células HEK-293, con un vector linealizado que contiene una construcción de expresión de T1R, es decir T1R1, T1R2 y/o T1R3. Lo más preferiblemente, estas líneas celulares estables se producirán al cotransfectar dos plásmidos linealizados que expresan hT1R1 y hT1R3 o hT1R2 y hT1R3 y un procedimiento de selección apropiado para generar líneas celulares que tienen estos genes integrados establemente en las mismas. Lo más preferiblemente, la línea celular también expresará establemente una proteína G tal como G α_{15} .

La expresión "se hibrida selectivamente (o específicamente) a" se refiere a la unión, la duplicación o la hibridación de una molécula solo a una secuencia de nucleótidos particular bajo condiciones de hibridación restrictivas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (p. ej., ADN o ARN celular total o de biblioteca).

La expresión "condiciones de hibridación restrictivas" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda se hibridará a su subsecuencia diana, típicamente en una mezcla compleja de ácido nucleico, pero no a otras secuencias. Las condiciones restrictivas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas superiores. Una guía intensiva para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Generalmente, las condiciones restrictivas se seleccionan para que sean aproximadamente 5-10°C inferiores que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una intensidad iónica y un pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo la intensidad iónica, el pH y la concentración de ácido nucleico definidos) a la que 50% de las sondas complementarias a la diana se hibridan a la secuencia diana en el equilibrio (como las secuencias diana están presentes en exceso, a T_m, 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio). Se elegirán condiciones restrictivas en las que la concentración de sal sea menor de aproximadamente 1,0 M de ion sodio, típicamente aproximadamente de 0,01 a 1,0 M de concentración de ion sodio (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura sea al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (p. ej., de 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (p. ej., más de 50 nucleótidos). Las condiciones restrictivas también se pueden alcanzar con la adición de agentes desestabilizadores tales como formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces el fondo, opcionalmente 10 veces la hibridación de fondo. Condiciones de hibridación restrictivas ejemplares pueden ser como sigue: 50% de formamida, 5 x SSC y 1% de SDS, incubar a 42°C, o 5 x SSC, 1% de SDS, incubar a 65°C, con lavado en 0,2 x SSC, y 0,1% de SDS a 65°C. Estas hibridaciones y etapas de lavado se pueden llevar a cabo durante, p. ej., 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 o más minutos.

Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí bajo condiciones restrictivas todavía están sustancialmente relacionados si los polipéptidos que codifican están sustancialmente relacionados. Esto se produce, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético. En estos casos, los ácidos nucleicos se hibridan típicamente bajo condiciones de hibridación moderadamente restrictivas. "Condiciones de hibridación moderadamente restrictivas" ejemplares incluyen una hibridación en un tampón de 40% de formamida, NaCl 1 M, 1% de SDS a 37°C, y un lavado en 1 X SSC a 45°C. Estas hibridaciones y etapas de lavado se pueden llevar a cabo durante, p. ej., 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 o más minutos. Una hibridación positiva es al menos dos veces el fondo. Los expertos normales apreciarán fácilmente que se pueden utilizar condiciones de hibridación y lavado alternativas para proporcionar condiciones de restricción similar.

"Anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende una región de armazón procedente de un gen de inmunoglobulina o fragmentos del mismo que se une específicamente y reconoce un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de las regiones constantes κ , λ , α , γ , δ , ϵ y μ , así como los genes de las regiones variables de inmunoglobulina en miríada. Las cadenas ligeras se clasifican bien como κ o bien como λ . Las cadenas pesadas se clasifican como μ , α , δ o ϵ , que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) ejemplar comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "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.

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, está alterada, reemplazada o intercambiada de modo que el sitio de unión a antígeno (región variable) esté conectado a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o una molécula totalmente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, p. ej., una enzima, una toxina, una hormona, un factor de crecimiento, un fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, está alterada, reemplazada o intercambiada por una región variable que tiene una especificidad antigénica diferente o alterada.

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

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

La expresión "se une específicamente (o selectivamente)" a un anticuerpo o "inmunorreactivo específicamente (o selectivamente) con", cuando se refiere a una proteína o un péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteína y otros materiales biológicos. Así, bajo condiciones de inmunoensayo señaladas, los anticuerpos especificados se unen a una proteína particular al menos dos veces el fondo y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo bajo tales condiciones puede requerir un anticuerpo que se seleccione por su especificidad para una proteína particular. Por ejemplo, se pueden seleccionar anticuerpos policlonales producidos para un miembro de la familia T1R de especies específicas tales como rata, ratón o ser humano para obtener solo los anticuerpos policlonales que son específicamente inmunorreactivos con el polipéptido de T1R o una porción inmunogénica del mismo y no con otras proteínas, excepto para ortólogos o variantes polimórficas y alelos del polipéptido de T1R. Esta selección se puede alcanzar restando anticuerpos que reaccionan cruzadamente con moléculas de T1R de otras especies u otras moléculas de T1R. También se pueden seleccionar anticuerpos que reconocen solo miembros de la familia GPCR de T1R pero no GPCRs de otras familias.

Se puede usar una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se usan habitualmente inmunoensayos de ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (véase, p. ej., Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, (1988), para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que se pueden usar para determinar la inmunorreactividad específica). Típicamente, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces la señal o el ruido de fondo y más típicamente más de 10 a 100 veces el fondo.

La expresión "se asocia selectivamente con" se refiere a la capacidad de un ácido nucleico para "hibridarse selectivamente" con otro según se define anteriormente, o la capacidad de un anticuerpo para "unirse selectivamente (o específicamente) a una proteína, según se define anteriormente.

El término "vector de expresión" se refiere a un sistema de expresión recombinante con el propósito de expresar una secuencia de ácido nucleico de la invención in vitro o in vivo, constitutivamente o induciblemente, en cualquier célula, incluyendo una célula procariótica, de levadura, fúngica, vegetal, de insecto o de mamífero. El término incluye sistemas de expresión lineales o circulares. El término incluye sistemas de expresión que permanecen episómicos o se integran en el genoma de la célula hospedadora. Los sistemas de expresión pueden tener la capacidad de autorreplicarse o no, es decir, conduce solo la expresión transitoria en una célula. El término incluye "casetes" de expresión recombinantes que contienen solo los elementos mínimos necesarios para la transcripción del ácido nucleico recombinante.

Por "célula hospedadora" se entiende una célula que contiene un vector de expresión y apoya la replicación o la expresión del vector de expresión. Las células hospedadoras pueden ser células procarióticas tales como *E. coli*, o

células eucarióticas tales como células de levadura, insecto, anfibio, gusano o mamífero tales como CHO, Hela, HEK-293 y similares, p. ej., células cultivadas, explantes y células in vivo.

Aislamiento y expresión de polipéptidos de T1R

5 El aislamiento y la expresión de los T1Rs, o fragmentos o variantes de los mismos, se puede realizar como se describe posteriormente. Se pueden usar cebadores de PCR para la amplificación de ácidos nucleicos que codifican regiones de unión a ligandos receptores gustativos, y opcionalmente se pueden generar bibliotecas de estos ácidos nucleicos. A continuación, se pueden usar vectores de expresión individuales o bibliotecas de vectores de expresión para infectar o transfectar células hospedadoras para la expresión funcional de estos ácidos nucleicos o bibliotecas. Estos genes y vectores se pueden elaborar y expresar in vitro o in vivo. Un experto apreciará que se pueden obtener fenotipos deseados para alterar y controlar la expresión de ácidos nucleicos al modular la expresión o la actividad de los genes y ácidos nucleicos (p. ej., promotores, potenciadores y similares) dentro de los vectores de la invención. Se pueden usar cualesquiera de los métodos conocidos descritos para incrementar o disminuir la expresión o la actividad. Los métodos descritos en la presente se pueden poner en práctica junto con cualquier método o protocolo conocido en la especialidad, que se describen en la bibliografía científica y de patentes.

15 Las secuencias de ácido nucleico descritas en la presente y otros ácidos nucleicos usados para poner en práctica esta invención, ya sean ARN, ADNc, ADN genómico, vectores, virus o híbridos de los mismos, pueden aislarse de una variedad de fuentes, manipularse genéticamente, amplificarse y/o expresarse recombinantemente. Se puede usar cualquier sistema de expresión recombinante, incluyendo, además de células de mamífero, p. ej., sistemas bacterianos, de levadura, de insecto o vegetales.

25 Alternativamente, estos ácidos nucleicos se pueden sintetizar in vitro mediante técnicas de síntesis química muy conocidas, según se describe, p. ej., 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 EE. UU. N° 4.458.066. A continuación, se pueden obtener fragmentos de ADN de doble hebra bien al sintetizar la hebra complementaria y reasociar las hebras entre sí bajo condiciones apropiadas, o al añadir la hebra complementaria usando ADN polimerasa con una secuencia cebadora apropiada.

30 TÉCNICAS para la manipulación de ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, para generar mutaciones en secuencias, subclonar, marcar sondas, secuenciación, hibridación y similares son bien descritas en la bibliografía científica y de patentes. Véase, p. ej., Sambrook, ed., Molecular Cloning: a Laboratory manual (2ª ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Parte I, Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

40 Ácidos nucleicos, vectores, cápsides, polipéptidos y similares se pueden analizar y cuantificar mediante cualquiera de un número de medios generales muy conocidos por los expertos en la especialidad. Estos incluyen, p. ej., métodos bioquímicos analíticos tales como NMR, espectrofotometría, radiografía, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía de hiperdifusión, diversos métodos inmunológicos, p. ej., reacciones con precipitina fluida o en gel, inmunodifusión, inmunoelectroforesis, radioinmunoensayos (RIAs), ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISAs), ensayos inmunofluorescentes, análisis Southern, análisis Northern, análisis por transferencia de puntos, electroforesis en gel (p. ej., 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.

50 Se pueden usar cebadores oligonucleotídicos para amplificar fragmentos de ácidos nucleicos que codifican regiones de unión a ligandos receptores gustativos. Los ácidos nucleicos descritos en la presente también se pueden clonar o medir cuantitativamente usando técnicas de amplificación. Los métodos de amplificación también son conocidos en la especialidad e incluyen, p. ej., la reacción en cadena de la polimerasa, PCR (PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications, ed. Innis. Academic Press, N.Y. (1990) y PCR Strategies, ed. Innis, Academic Press, Inc., N.Y. (1995), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase, p. ej., Wu, Genomics 4:560 (1989); Landegren, Science 241:1077, (1988); Barringer, Gene 89:117 (1990)); amplificación por transcripción (véase, p. ej., Kwok, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173 (1989)); y replicación de secuencias autosostenida (véase, p. ej., Guatelli, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874 (1990)); amplificación con Q β replicasa (véase, p. ej., Smith, J. Clin. Microbiol. 35:1477-1491 (1997)); ensayo de amplificación con Q- β replicasa automatizado (véase, p. ej., Burg, Mol. Cell. Probes 10:257-271 (1996)) y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa (p. ej., NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario); véanse también Berger, Methods Enzymol. 152:307-316 (1987); Sambrook; Ausubel; las Patentes de EE. UU. N° 4.683.195 y 4.683.202; Sooknanan, Biotechnology 13:563-564 (1995). Los cebadores se pueden diseñar para retener la secuencia original del receptor 7-membranario "donante". Alternativamente, los cebadores pueden codificar residuos de aminoácido que son sustituciones conservativas (p. ej., residuo hidrófobo por hidrófobo, véase el análisis anterior) o sustituciones funcionalmente benignas (p. ej., no evitan la inserción en la membrana plasmática, provocan escisión

por peptidasa, provocan un plegamiento anormal del receptor, y similares). Una vez amplificados, los ácidos nucleicos, bien individualmente o como bibliotecas, se pueden clonar según métodos conocidos en la especialidad, si se desea, en cualquiera de una variedad de vectores usando métodos biológicos moleculares habituales; métodos para clonar in vitro ácidos nucleicos amplificados se describen, p. ej., en la Pat. EE. UU. N° 5.426.039.

Los pares de cebadores se pueden diseñar para amplificar selectivamente regiones de unión a ligando de los miembros de la familia T1R. Estas regiones pueden variar para diferentes ligandos o saborizantes. Así, lo que puede ser una región de unión mínima para un saborizante, puede ser demasiado limitativa para un segundo saborizante. Según esto, se pueden amplificar regiones de unión a ligando de diferentes tamaños que comprenden diferentes estructuras de dominios extracelulares.

Se conocen bien en la especialidad paradigmas para diseñar pares de cebadores degenerados. Por ejemplo, un programa informático de la estrategia COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer (CODEHOP) es accesible como <http://blocks.fhrc.org/codehop.html>, y se puede acceder directamente desde el sitio de alineación de múltiples secuencias BlockMaker para la predicción de cebadores híbridos que comienzan con un conjunto de secuencias proteínicas relacionadas, como regiones de unión a ligando receptor gustativo (véanse, p. ej., Rose, *Nucleic Acids Res.* 26:1628-1635 (1998); Singh, *Biotechniques* 24:318-319 (1998)).

Medios para sintetizar pares de cebadores oligonucleotídicos son muy conocidos en la especialidad. Se pueden usar pares de bases "naturales" o pares de bases sintéticas. Por ejemplo, el uso de nucleobases artificiales ofrece un enfoque versátil para manipular una secuencia cebadora y generar una mezcla más compleja de productos de amplificación. Diversas familias de nucleobases artificiales son capaces de asumir múltiples orientaciones de los enlaces de hidrógeno a través de rotaciones de enlaces internos para proporcionar un medio para el reconocimiento molecular degenerado. La incorporación de estos análogos a una única posición de un cebador de PCR permite la generación de una biblioteca compleja de productos de amplificación. Véase, por ejemplo, Hoops, *Nucleic Acids Res.*, 25:4866-4871 (1997). También pueden utilizarse moléculas no polares para imitar la forma de las bases de ADN naturales. Un mimético de la forma sin enlaces de hidrógeno para la adenina puede replicarse eficazmente y selectivamente frente a un mimético de la forma no polar para la timina (véase, por ejemplo, Morales, *Nat. Struct. Biol.*, 5:950-954 (1998)). Por ejemplo, dos bases degeneradas pueden ser la base de pirimidina 6H, 8H-3,4-dihidropirimido[4,5-c][1, 2]oxazin-7-ona o la base de purina N6-metoxi-2, 6-diaminopurina (véase, por ejemplo, Hill, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:4258-4263 (1998)). Cebadores degenerados ejemplares de la invención incorporan el análogo de nucleobase 5'-dimetoxitritil-N-benzoil-2'-desoxicidina, 3'-[(2-cianoetil) - (N,N-diisopropil)]fosforamidita (el término "P" en la secuencias, véase anteriormente). Este análogo de pirimidina se une mediante enlaces de hidrógeno a purinas, incluyendo los residuos A y G.

Las variantes polimórficas, los alelos y los homólogos entre especies que son sustancialmente idénticos a un receptor gustativo descrito en la presente se pueden aislar usando las sondas de ácido nucleico descritas anteriormente. Alternativamente, se pueden usar bibliotecas de expresión para clonar polipéptidos de T1R y variantes polimórficas alelos, y homólogos entre especies de los mismos, al detectar los homólogos expresados inmunológicamente con antisueros o anticuerpos purificados generados contra un polipéptido de T1R, que también reconocen y se unen selectivamente al homólogo de T1R.

Ácidos nucleicos que codifican regiones de unión a ligando de receptores gustativos se pueden generar mediante amplificación (p. ej., PCR) de secuencias de ácido nucleico apropiadas usando pares de cebadores degenerados. El ácido nucleico amplificado puede ser ADN genómico de cualquier célula o tejido o ARNm o ADNc derivados de células que expresan receptores gustativos.

En una realización, se pueden construir secuencias que codifican proteínas híbridas que comprenden ácidos nucleicos que codifican T1Rs fusionados a secuencias de translocación. También se proporcionan T1Rs híbridos que comprenden los motivos de translocación y dominios de unión a saborizante de otras familias de receptores quimiosensoriales, particularmente receptores gustativos. Estas secuencias de ácido nucleico se pueden conectar operativamente a elementos de control de la transcripción y la traducción, p. ej., 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. Al constituir casetes de expresión recombinante, vectores y transgénicos, se puede emplear un fragmento promotor para dirigir la expresión del ácido nucleico deseado en todas las células o tejidos deseados.

En otra realización, las proteínas de fusión pueden incluir secuencias de translocación C-terminales o N-terminales. Las proteínas de fusión también pueden comprender elementos adicionales, p. ej., para la detección, purificación de proteínas u otras aplicaciones. Dominios que facilitan la detección y la purificación incluyen, p. ej., péptidos queladores de metales tales como tramos de polihistidina, módulos de histidina-triptófano, u otros dominios que permiten la purificación sobre metales inmovilizados; proteína que se une a maltosa; dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada; o el dominio utilizado en el sistema de extensión/purificación por afinidad FLAGS (Immunex Corp., Seattle, WA).

La inclusión de secuencias conectoras escindible tales como Factor Xa (véase, p. ej., Ottavi, *Biochimie* 80:289-293 (1998)), motivo de reconocimiento de la proteasa subtilisina (véase, p. ej., Polyak, *Protein Eng.* 10:615-619 (1997)); enterocinasa (Invitrogen, San Diego, CA) y similares, entre el dominio de translocación (para una expresión eficaz en la membrana plasmática) y el resto del polipéptido recién traducido puede ser útil para facilitar la purificación. Por ejemplo, una construcción puede incluir un polipéptido que codifica una secuencia de ácido nucleico conectada a seis residuos de histidina seguido por una tiorredoxina, un sitio de escisión de enterocinasa (véase, p. ej., Williams, *Biochemistry* 34:1787-1797 (1995)) y un dominio de translocación C-terminal. Los residuos de histidina facilitan la detección y la purificación mientras que el sitio de escisión de enterocinasa proporciona un medio para purificar la proteína o proteínas deseadas de la proteína de fusión restante. Tecnología relativa a vectores que codifican proteínas de fusión y la aplicación de proteínas de fusión se describen a fondo en la bibliografía científica y de patentes, véase, p. ej., Kroll, *DNA Cell. Biol.* 12:441-53 (1993).

Vectores de expresión, bien como vectores de expresión individuales o bien como bibliotecas de vectores de expresión, que comprenden las secuencias que codifican dominios de unión a ligando se pueden introducir en un genoma o en el citoplasma o un núcleo de una célula y se pueden expresar mediante una variedad de técnicas convencionales, descritas a fondo en la bibliografía científica y de patentes. Véanse, p. ej., Roberts, *Nature* 328:731 (1987); Berger *supra*; Schneider, *Protein Expr. Purif.* 6435:10 (1995); Sambrook; Tijssen; Ausubel. La información de los productos de fabricantes de reactivos biológicos y equipos experimentales también proporciona información relativa a métodos biológicos conocidos. Los vectores pueden aislarse de fuentes naturales, obtenerse de fuentes tales como las bibliotecas ATCC o GenBank o prepararse mediante métodos sintéticos o recombinantes.

Los ácidos nucleicos se pueden expresar usando casetes de expresión, vectores o virus que se expresan establemente o transitoriamente en células (p. ej., sistemas de expresión episómicos). Se pueden incorporar marcadores de selección en casetes de expresión y vectores para conferir un fenotipo seleccionable a células y secuencias transformadas. Por ejemplo, los marcadores de selección pueden codificar el mantenimiento y la replicación episómicos de modo que no se requiera la integración en el genoma del hospedador. Por ejemplo, el marcador puede codificar resistencia a antibióticos (p. ej., cloranfenicol, kanamicina, G418, blasticidina, higromicina) o resistencia a herbicidas (p. ej., clorosulfurona o Basta) para permitir la selección de las células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véanse, p. ej., Blondelet-Rouault, *Gene* 190:315-317 (1997); Aubrecht, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281:992-997 (1997)). Debido a que los genes marcadores seleccionables que confieren resistencia a sustratos como neomicina o higromicina solo se pueden utilizar en cultivo tisular, los genes de quimiorresistencia también se usa como marcadores seleccionables *in vitro* e *in vivo*.

Una secuencia de ácido nucleico quimérica puede codificar un dominio de unión a ligando de T1R dentro de cualquier polipéptido 7-transmembranario. Debido a que los polipéptidos de receptores 7-transmembranarios tienen secuencias primarias y estructuras secundarias y terciarias similares, los dominios estructurales (p. ej., dominio extracelular, dominios TM, dominio citoplásmico, etc.) se pueden identificar 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 de receptor 7-transmembranario. Se pueden usar algoritmos de transformada de Fourier rápida (FFT) para evaluar los períodos dominantes que caracterizan perfiles de la hidrofobia y la variabilidad de secuencias analizadas. La potenciación de la detección de la periodicidad y el índice de periodicidad helicoidal α se pueden realizar como, p. ej., en Donnelly, *Protein Sci.* 2:55-70 (1993). Otros algoritmos de alineación y modelado son muy conocidos en la especialidad, véanse, p. ej., Peitsch, *Receptors Channels* 4:161-164 (1996); Kyte & Doolittle, *J. Med. Bio.*, 157:105-132 (1982); Cronet, *Protein Eng.* 6:59-64 (1993).

La presente descripción también incluye no solo el ADN y las proteínas que tienen las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos especificadas, sino también fragmentos de ADN, particularmente fragmentos de, p. ej., 40, 60, 80, 100, 150, 200 o 250 nucleótidos, o más, así como fragmentos proteínicos de, p. ej., 10, 20, 30, 50, 70, 100 o 150 aminoácidos, o más. Opcionalmente, los fragmentos de ácido nucleico pueden codificar un polipéptido antigénico, que es capaz de unirse a un anticuerpo producido contra un miembro de la familia T1R. Además, un fragmento proteínico de la invención puede ser opcionalmente un fragmento antigénico, que es capaz de unirse a un anticuerpo producido contra un miembro de la familia T1R.

También se contemplan proteínas quiméricas, que comprenden al menos 10, 20, 30, 50, 70, 100 o 150 aminoácidos, o más, de uno de al menos uno de los polipéptidos de T1R descritos en la presente, acoplados a aminoácidos adicionales que representan la totalidad o parte de otro GPCR, preferiblemente un miembro de la superfamilia 7 transmembranaria. Estas quimeras se pueden elaborar a partir de los presentes receptores y otro GPCR, o se pueden elaborar al combinar dos o más de los presentes receptores T1R. En una realización, una porción de la quimera corresponde a o se deriva del dominio extracelular de un polipéptido de T1R. En otra realización, una porción de la quimera corresponde a o se deriva del dominio extracelular y uno o más de los dominios transmembranarios de un polipéptido de T1R descritos en la presente y la porción o porciones restantes pueden venir de otro GPCR. Los receptores quiméricos son muy conocidos en la especialidad, y las técnicas para crearlos y la selección y los límites de los dominios o fragmentos de receptores acoplados a proteína G para la incorporación en los mismos también son muy conocidas. Así, este conocimiento de los expertos en la especialidad se puede usar fácilmente para crear estos receptores quimérico. El uso de estos receptores quiméricos puede proporcionar, por ejemplo, una característica de sensibilidad gustativa de uno de los receptores específicamente divulgados en la

presente, acoplada con las características de transducción de señales de otro receptor, tal como un receptor bien conocido usado en sistemas de ensayo de la especialidad anterior.

Según se apunta anteriormente, tales quimeras, análogos del receptor T1R natural o combinación o asociación de receptores T1R naturales se unirán a y/o serán activados por moléculas que normalmente afectan al sabor dulce o el sabor umami. Receptores o combinaciones de receptores T1R quiméricos funcionales son moléculas que cuando se expresan solas o en combinación con otros T1Rs u otros GPCRs (que pueden ser ellos mismos quiméricos) se unen a o que son activados por estímulos gustativos, particularmente estímulos gustativos dulces (T1R2/3) o umami (T1R1/3). Moléculas que provocan el sabor dulce incluyen edulcorantes naturales y artificiales tales como sacarosa, aspartamo, xilitol, ciclamato y otros. Moléculas que provocan el sabor umami incluyen glutamato y análogos de glutamato y otros compuestos que se unen a T1R1 y/o T1R3 naturales, tales como 5'-nucleótidos.

Por ejemplo, un dominio tal como un dominio de unión a ligando, un dominio extracelular, un dominio transmembranario, un dominio citoplásmico, un dominio N-terminal, un dominio C-terminal o cualquier combinación de los mismos, se puede conectar covalentemente a una proteína heteróloga. A modo de ejemplo, un dominio extracelular de T1R se puede conectar a un dominio transmembranario de GPCR heterólogo, o un dominio extracelular de GPCR heterólogo se puede conectar a un dominio transmembranario de T1R. Se pueden usar otras proteínas heterólogas de elección; p. ej., proteína fluorescente verde.

También están dentro del alcance de la descripción células hospedadoras para expresar los T1Rs, fragmentos, quimeras o variantes. Para obtener altos niveles de expresión de un gen o ácido nucleico clonado, tal como ADNcs que codifican los T1Rs, fragmentos o variantes, un experto 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, si es para un ácido nucleico que codifica una proteína, un sitio de unión del ribosoma para el inicio de la traducción. Promotores bacterianos adecuados son bien conocidos en la especialidad y se describen, p. ej., en Sambrook y cols. Sin embargo, se pueden usar sistemas de expresión bacterianos o eucarióticos.

Se puede usar cualquiera de los procedimientos bien conocidos para introducir secuencias nucleotídicas extrañas en células hospedadoras. Estos incluyen el uso de transfección con fosfato cálcico, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, liposomas, microinyección, vectores plasmáticos, vectores virales y cualquiera de los otros métodos bien conocidos para introducir ADN genómico, ADNc, ADN sintético clonados u otro material genético extraño en una célula hospedadora (véase, p. ej., Sambrook y cols.). Sólo es necesario que el procedimiento de manipulación genética particular usado sea capaz de introducir satisfactoriamente al menos una molécula de ácido nucleico en la célula hospedadora capaz de expresar el T1R, el fragmento o la variante de interés.

Después de que el vector de expresión se introduzca en las células, las células transfectadas se cultivan bajo condiciones que favorecen la expresión del receptor, el fragmento o la variante de interés, que a continuación se recupera del cultivo usando técnicas estándar. Ejemplos de estas técnicas son bien conocidos en la especialidad. Véase, p. ej., el documento WO 00/06593.

40 Detección de polipéptidos de T1R

Además de la detección de genes de T1R y la expresión génica usando tecnología de hibridación de ácidos nucleicos, también se pueden usar inmunoensayos para detectar T1Rs, p. ej., para identificar células receptoras gustativas, y variantes de miembros de la familia T1R. Los inmunoensayos se pueden usar para analizar cualitativamente o cuantitativamente los T1Rs. Una visión general de la tecnología aplicable se puede encontrar en Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988).

1. Anticuerpos para miembros de la familia T1R

Métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan específicamente con un miembro de la familia T1R son conocidos por los expertos en la especialidad (véase, p. ej., Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow & Lane, *supra*; Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2d ed. 1986); and Kohler & Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975)). Estas técnicas incluyen la preparación de anticuerpos mediante la selección de anticuerpos de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en un fago o vectores similares, así como la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales al inmunizar conejos o ratones (véanse, p. ej., Huse y cols., *Science*, 246:1275-1281 (1989); Ward y cols., *Nature*, 341:544-546 (1989)).

Un número de inmunógenos que comprenden T1R se puede usar para producir anticuerpos específicamente reactivos con un miembro de la familia T1R. Por ejemplo, un polipéptido de T1R recombinante, o un fragmento antigénico del mismo, se puede aislar según se describe en la presente. Regiones antigénicas adecuadas incluyen, p. ej., las secuencias de consenso que se usan para identificar miembros de la familia T1R. Proteínas recombinantes pueden expresarse en células eucarióticas o procaríóticas según se describe anteriormente, y purificarse según se describe generalmente anteriormente. Una proteína recombinante es el inmunógeno preferido para la producción de

anticuerpos es o policlonales. Alternativamente, un péptido sintético derivado de las secuencias divulgadas en la presente y conjugado a una proteína portadora se puede usar como inmunógeno. Una proteína presente en la naturaleza se puede usar en forma bien pura o bien impura. A continuación, el producto se inyecta en un animal capaz de producir anticuerpos. Se pueden generar anticuerpos bien monoclonal o bien policlonales, para el uso posterior en inmunoensayos para medir la proteína.

Métodos de producción de anticuerpos policlonales son conocidos por los expertos en la especialidad. Por ejemplo, una cepa endogámica de ratones (p. ej., ratones BALB/C) o conejos se inmuniza con la proteína usando un adyuvante estándar, tal como adyuvante de Freund, y un protocolo de inmunización estándar. La respuesta inmunitaria del animal al inmunógeno se verifica tomando sangrados de prueba y determinando el título de reactividad al T1R. Cuando se obtienen título apropiadamente altos para el inmunógeno, se recoge sangre del animal y se preparan antisueros. Si se desea, se puede realizar la fraccionación adicional de los anticuerpos para enriquecer anticuerpos reactivos a la proteína (véase Harlow & Lane, anteriormente).

Se pueden obtener anticuerpos monoclonales mediante diversas técnicas familiares para los expertos en la especialidad. En resumen, esplenocitos procedentes de un animal inmunizado con un antígeno deseado se pueden inmortalizar, comúnmente mediante fusión con una célula de mieloma (véase Kohler & Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519 (1976)). Métodos alternativos de inmortalización incluyen la transformación con virus de Epstein Barr, oncogenes o retrovirus, u otros métodos muy conocidos en la especialidad. Colonias que surgen de células inmortalizadas individuales se criban para la producción de anticuerpos de la especificidad y la afinidad deseada para el antígeno, y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producido por tales células se puede potenciar mediante diversas técnicas, incluyendo la inyección en la cavidad peritoneal de un hospedador vertebrado. Alternativamente, se pueden aislar secuencias de ADN que codifican un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión del mismo al cribar una biblioteca de ADN procedente de células B humanas según el protocolo general esbozado por Huse y cols., *Science*, 246:1275-1281 (1989).

Anticuerpos monoclonales y sueros policlonales se recogen y se titulan contra la proteína inmunogénica en un inmunoensayo, por ejemplo, un inmunoensayo en fase sólida con el inmunógeno inmovilizado sobre un soporte sólido. Típicamente, antisueros policlonales con un título de 104 o más se seleccionan y se prueban con respecto a su reactividad cruzada contra polipéptidos que no son de T1R, o incluso otros miembros de la familia T1R u otras proteínas relacionadas procedentes de otros organismos, usando un inmunoensayo de unión competitivo. Antisueros policlonales y anticuerpos policlonales específicos se unirán habitualmente 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 anticuerpos específicos para miembros de la familia T1R, se pueden detectar proteínas de T1R individuales y fragmentos proteínicos mediante una variedad de métodos de inmunoensayo. Para una revisión de procedimientos inmunológicos y de inmunoensayo, véase *Basic and Clinical Immunology* (Stites & Terr eds., 7ª ed. 1991). Por otra parte, los inmunoensayos de la presente invención se pueden realizar en cualquiera de varias configuraciones, que se revisan a fondo en *Enzyme Immunoassay* (Maggio, ed., 1980); y Harlow & Lane, anteriormente.

2. Ensayos inmunológicos de unión

Proteínas, fragmentos y variantes de T1R se pueden detectar y/o cuantificar usando cualquiera de un número de ensayos inmunológicos de unión muy reconocidos (véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. 4.366.241, 4.376.110, 4.517.288 y 4.837.168). Para una revisión de los inmunoensayos generales, véanse además *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology*, volumen 37 (Asai, ed. 1993); *Basic and Clinical Immunology* (Stites & Terr, eds., 7ª ed. 1991). Los ensayos inmunológicos de unión (o inmunoensayos) usan típicamente un anticuerpo que se une específicamente a una proteína o antígeno de elección (en este caso, un miembro de la familia T1R o una secuencia antigénica del mismo). El anticuerpo (p. ej., anti-T1R) se puede producir mediante cualquiera de un número de medios bien conocidos por los expertos en la especialidad y según se describe anteriormente.

Los inmunoensayos también usan a menudo un agente de marcaje para unirse específicamente a y marcar el complejo formado por el anticuerpo y el antígeno. El propio agente de marcaje puede ser una de los restos que comprenden el complejo anticuerpo/antígeno. Así, el agente de marcaje puede ser un polipéptido de T1R marcado o un anticuerpo anti-T1R marcado. Alternativamente, 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 típicamente es específico para anticuerpos de la especie de la que se deriva el primer anticuerpo). Otras proteínas capaces de unirse específicamente a regiones constantes de inmunoglobulina, tales como proteína A o proteína G, también se pueden usar como el agente marcador. Estas proteínas exhiben una fuerte reactividad no inmunogénica con regiones constantes de inmunoglobulina procedentes de una variedad de especies (véanse, p. ej., Kronval y cols., *J. Immunol.*, 111:1401-1406 (1973); Akerstrom y cols., *J. Immunol.*, 135:2589-2542 (1985)). El agente de marcaje se puede modificar con un resto detectable, tal como biotina, al que se puede unir específicamente otra

molécula, tal como estreptavidina. Una variedad de restos detectables es muy conocida por los expertos en la especialidad.

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

10 A. Formatos de ensayo no competitivos

Los inmunoensayos para detectar un polipéptido de T1R en una muestra pueden ser bien competitivos o bien 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 se pueden unir directamente a un sustrato sólido sobre el que están inmovilizados. Estos anticuerpo inmovilizados capturan a 15 continuación el polipéptido de T1R presente en la muestra. El polipéptido de T1R así inmovilizado se une a continuación a un agente de marcaje, tal como un segundo anticuerpo de T1R que porta un marcador. Alternativamente, el segundo anticuerpo puede carecer de un marcador, pero, a su vez, puede estar unido a un tercer anticuerpo marcado específico para anticuerpos de la especie de la que se deriva el segundo anticuerpo. El segundo o tercer anticuerpo típicamente está modificado con un resto detectable, tal como biotina, a que se une 20 específicamente otra molécula, p. ej., estreptavidina, para proporcionar un resto detectable.

B. Formatos de ensayo competitivos

En ensayos competitivos, la cantidad de f polipéptido de T1R presente en la muestra se mide indirectamente al medir la cantidad de un polipéptido de T1R conocido añadido (exógeno) desplazado (separado por competencia) de 25 un anticuerpo anti-T1R por el polipéptido de T1R desconocido presente en una muestra. En un ensayo competitivo, una cantidad conocida de polipéptido de T1R se añade a una muestra y la muestra se pone en contacto a continuación con un anticuerpo que se une específicamente al T1R. La cantidad de polipéptido de T1R exógeno unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de polipéptido de T1R presente en la muestra. En una realización particularmente preferida, el anticuerpo está inmovilizado sobre un sustrato sólido. La cantidad de polipéptido de T1R unida al anticuerpo se puede determinar bien midiendo la cantidad de polipéptido de T1R 30 presente en un complejo de T1R/anticuerpo, o bien alternativamente al medir la cantidad de proteína no complejada restante. La cantidad de polipéptido de T1R se puede detectar al proporcionar una molécula de T1R marcada.

Un ensayo de inhibición hapténico es otro ensayo competitivo preferido. En este ensayo, el polipéptido de T1R conocido se inmoviliza sobre un sustrato sólido. Una cantidad conocida de anticuerpo anti-T1R se añade a la 35 muestra, y la muestra se pone en contacto a continuación con el T1R inmovilizado. La cantidad de anticuerpo anti-T1R unido a 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 se puede detectar al detectar bien la fracción inmovilizada de anticuerpo o bien la fracción del anticuerpo que permanece que solución. La detección puede ser directa cuando el anticuerpo está marcado o indirecta mediante la adición posterior de un resto marcado 40 que se une específicamente al anticuerpo según se describe anteriormente.

C. Determinación de reactividad cruzada

También se pueden usar inmunoensayos en el formato de unión competitiva para determinaciones de la reactividad cruzada. Por ejemplo, una proteína al menos parcialmente codificada por las secuencias de ácido nucleico divulgadas en la presente se puede inmovilizar a un soporte sólido. Se añaden al ensayo proteínas (p. ej., 45 polipéptidos y homólogos de T1R) que compiten por la unión de los antisueros al antígeno inmovilizado. La capacidad de las proteínas añadidas para competir por la unión de los antisueros a la proteína inmovilizada se compara con la capacidad del polipéptido de T1R codificado por las secuencias de ácido nucleico divulgadas en la presente para competir consigo mismo. El porcentaje de reactividad cruzada para las proteínas anteriores se calcula usando cálculos estándar. Los antisueros con menos de 10% de reactividad cruzada con cada una de las proteínas añadidas listadas anteriormente se seleccionan y se reúnen. Los anticuerpos que reaccionan cruzadamente se 50 retiran opcionalmente de los antisueros reunidos mediante inmunoabsorción con las proteínas consideradas añadidas, p. ej., homólogos relacionados distantemente. Además, los péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos que representan motivos conservados que se usan para identificar miembros de la familia T1R se pueden usar en determinaciones de la reactividad cruzada. 55

Los antisueros inmunoabsorbidos y reunidos se usan a continuación en un inmunoensayo de unión competitivo según se describe anteriormente para comparar una segunda proteína, que se piensa que quizás sea un alelo o una variante polimórfica de un miembro de la familia T1R, con la proteína del inmunógeno (es decir, polipéptido de T1R

codificado por las secuencias de ácido nucleico divulgadas en la presente). A fin de hacer esta comparación, cada una de las dos proteínas se ensayan a una amplia gama de concentraciones y se determina la cantidad de cada proteína requerida para inhibir 50% de la unión de los antisueros a la proteína inmovilizada. Si la cantidad de la segunda proteína requerida para inhibir 50% de la unión es menos de 10 veces la cantidad de la proteína codificada por las secuencias de ácido nucleico divulgadas en la presente requerida para inhibir 50% de la unión, entonces se dice que la segunda proteína se une específicamente a los anticuerpos policlonales generados para un inmunógeno de T1R.

También se pueden usar anticuerpos producidos contra motivos conservados de T1R para preparar anticuerpos que se unen específicamente solo a GPCRs de la familia T1R, pero no a GPCRs de otras familias.

Se pueden elaborar anticuerpos policlonales que se unen específicamente a un miembro particular de la familia T1R al sustraer anticuerpos reactivos cruzadamente usando otros miembros de la familia T1R. Se pueden elaborar de un modo similar anticuerpos policlonales específicos de una especie. Por ejemplo, se pueden elaborar anticuerpos específicos para T1R1 humano al sustraer anticuerpos que son reactivos cruzadamente con secuencias ortólogas, p. ej., T1R1 de rata o T1R1 de ratón.

D. Otros formatos de ensayo

El análisis por transferencia Western (inmunotransferencia) se usa para detectar y cuantificar la presencia de polipéptido de T1R en la muestra. La técnica comprende generalmente separar proteína de muestra mediante electroforesis en gel basándose en el peso molecular, transferir las proteínas separadas a un soporte sólido adecuado (tal como un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nailon o un filtro de nailon derivado) e incubar la muestra con los anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido de T1R. Los anticuerpos anti-polipéptido de T1R se unen específicamente al polipéptido de T1R sobre el soporte sólido. Estos anticuerpos se pueden marcar directamente o alternativamente se pueden detectar posteriormente usando anticuerpos marcados (p. ej., anticuerpos ovinos contra inmunoglobulinas de ratón) que se unen específicamente a los anticuerpos anti-T1R.

Otros formatos de ensayo incluyen inmunoensayos liposómicos (LIA) que usan liposomas diseñados para unirse a moléculas específicas (p. ej., anticuerpos) y liberar reactivos o marcadores encapsulados. Los productos químicos liberados se detectan a continuación según técnicas estándar (véase Monroe y cols., *Amer. Clin. Prod. Rev.*, 5:34-41 (1986)).

E. Reducción de la unión no específica

Un experto en la técnica apreciará que a menudo es deseable minimizar la unión no específica en inmunoensayos. Particularmente, cuando el ensayo implica un antígeno anticuerpo inmovilizado sobre un sustrato sólido, es deseable minimizar la cantidad de unión no específica al sustrato. Medios para reducir esta unión no específica son muy conocidos por los expertos en la especialidad. Típicamente, esta técnica implica revestir el sustrato con una composición proteínica. En particular, composiciones proteínicas tales como albúmina de suero bovino (BSA), leche en polvo desnatada y gelatina se usan ampliamente, siendo la más preferida la leche en polvo.

F. Marcadores

El marcador o grupo detectable particular usado en el ensayo no es un aspecto crítico, con tal de 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. Tales marcadores detectables se han desarrollado en el campo de los inmunoensayos y, en general, se puede aplicar casi cualquier marcador en tales métodos. Así, un marcador es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos ópticos o químicos. Marcadores útiles incluyen cuentas magnéticas (p. ej., DYNABEADSTM), colorantes fluorescentes (p. ej., isotiocianato de fluoresceína, rojo de Texas, rodamina y similares), radiomarcadores (p. ej., ^3H , ^{125}I , ^{14}C , ^{35}S), enzimas (p. ej., peroxidasa de rábano picante, fosfatos alcalinos y otros usados comúnmente en un ELISA) y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o cuentas de vidrio o plástico coloreadas (p. ej., poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

El marcador se puede acoplar directamente o indirectamente al componente deseado del ensayo según métodos conocidos en la especialidad. Según se indica anteriormente, se puede usar una gran variedad de marcadores, dependiendo la elección del marcador de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con el compuesto, los requisitos de estabilidad, la instrumentación disponible y las previsiones de eliminación.

Los marcadores no radiactivos a menudo se ligan por medios indirectos. Generalmente, una molécula de ligando (p. ej., biotina) se une covalentemente a la molécula. A continuación, el ligando se une a otra molécula (p. ej., de estreptavidina), que bien es inherentemente detectable o bien se une covalentemente a un sistema señalizador, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente. Los ligandos y sus

diana se pueden usar en cualquier combinación adecuada con anticuerpos que reconocen un polipéptido de T1R, o anticuerpos secundarios que reconocen anti-T1R.

Las moléculas también se pueden conjugar directamente a compuestos generadores de señales, p. ej., mediante conjugación con una enzima o un fluoróforo. Las enzimas de interés como marcadores serán principalmente hidrolasas, particularmente fosfatasas, esterasas y glicosidasas, u oxidotasas, particularmente peroxidasas. Los compuestos fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, etc. Los compuestos quimioluminiscentes incluyen luciferina y 2,3-dihidroftalacínodionas, p. ej., luminol. Para una revisión de sistemas marcadores o productores de señales, véase la Patente de EE. UU. N° 4.391.904.

Medios para detectar marcadores son muy conocidos por los expertos en la especialidad. Así, por ejemplo, cuando el marcador es un marcador radiactivo, medios para la detección incluyen un contador de centelleo o película fotográfica como en la autorradiografía. Cuando el marcador sea un marcador fluorescente, se puede detectar al excitar el fluorocromo con la longitud de onda de luz apropiada y detectar la fluorescencia resultante. La fluorescencia se puede detectar visualmente, por medio de película fotográfica, mediante el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos de carga acoplada (CCDs) o fotomultiplicadores y similares. De forma similar, los marcadores enzimáticos se pueden detectar al proporcionar los sustratos apropiados para la enzima y detectar el producto de reacción resultante. Finalmente, se pueden detectar marcadores colorimétricos simples sencillamente al observar el color asociado con el marcador. Así, en diversos ensayos con tiras reactivas, el oro conjugado a menudo se presenta rosa, mientras que diversas cuentas conjugadas se presentan del color de la cuenta.

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

Detección de moduladores

Se describen posteriormente composiciones y métodos para determinar si un compuesto de prueba se une específicamente a un receptor T1R de la invención *in vitro*. Muchos aspectos de la fisiología celular se pueden verificar para evaluar el efecto de la unión de un ligando a un polipéptido de T1R. Estos ensayos se pueden realizar sobre células intactas que expresan un receptor quimiosensorial, sobre células permeabilizadas o sobre fracción de membrana producidas por métodos estándar o proteína sintetizadas *de novo in vitro*.

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

Las proteínas o los polipéptidos de T1R del ensayo preferiblemente se seleccionarán de un polipéptido que tienen la secuencia del polipéptido de T1R seleccionada de las divulgadas en el Ejemplo 1, o fragmentos o variantes modificadas conservativamente de la misma. Opcionalmente, los fragmentos y las variantes pueden ser fragmentos y variantes antigénicos que se unen a un anticuerpo anti-T1R. Opcionalmente, los fragmentos y las variantes se pueden unir a o ser activados por edulcorantes o saborizantes umami.

Alternativamente, las proteínas o polipéptidos de T1R del ensayo se pueden derivar de una célula hospedadora eucariótica y pueden incluir una subsecuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia de aminoácidos con los polipéptidos de T1R divulgados en el Ejemplo 1, o fragmentos o variantes modificadas conservativamente de la misma. Generalmente, la identidad de secuencia de aminoácidos será al menos de 35 a 50%, u opcionalmente 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 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, una transmembranaria, un dominio transmembranario, un dominio citoplásmico, un dominio de unión a ligando, y similares. Además, como se describe anteriormente, la proteína de T1R o un dominio de la misma se puede conectar covalentemente a una proteína heteróloga para crear una proteína quimérica usada en los ensayos descritos en la presente.

Los moduladores de la actividad de receptores T1R se prueban usando proteínas o polipéptidos de T1R como los descritos anteriormente, bien recombinantes o bien presentes en la naturaleza. Las proteínas o polipéptidos de T1R se pueden aislar, coexpresar en una célula, coexpresar en una membrana derivada de una célula, coexpresar en tejido o en un animal, bien recombinante o bien presente en la naturaleza. Por ejemplo, se pueden usar rodajas de lengua, células disociadas de una lengua, células transformadas o membranas. La modulación se puede probar usando los ensayos *in vitro* descritos en la presente.

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

1. Ensayos de unión in vitro

La transducción del sabor se puede examinar in vitro con reacciones solubles o en estado sólido, usando los polipéptidos de T1R de la descripción. En una realización particular, se pueden usar dominios de unión a ligando de T1R in vitro en reacciones solubles o en estado sólido para ensayar la unión a ligandos.

A modo de ejemplo, se predice que el dominio N-terminal de T1R está implicado en la unión a ligandos. Más particularmente, los T1Rs pertenecen a una subfamilia de GPCR que se caracteriza por segmentos N-terminales extracelulares grandes, de aproximadamente 600 aminoácidos. Se cree que estos segmentos N-terminales forman los dominios de unión a ligandos, y por lo tanto son útiles en ensayos bioquímicos para identificar agonistas y antagonistas de T1R. Es posible que el dominio de unión a ligando pueda estar formado por porciones adicionales del dominio extracelular, tales como los bucles extracelulares del dominio transmembranario.

Se han usado ensayos de unión in vitro con otros GPCRs que están relacionados con los T1Rs, tales como los receptores de glutamato metabotrópicos (véase, p. ej., Han y Hampson, *J. Biol. Chem.* 274:10008-10013 (1999)). Estos ensayos podrían implicar desplazar un ligando marcado radiactivamente o fluorescentemente, medir los cambios en la fluorescencia intrínseca o los cambios en la sensibilidad proteolítica, etc.

La unión de ligandos a un complejo heteromultímero de polipéptidos de T1R de la invención se puede probar en solución, en una membrana de doble capa, opcionalmente ligada a una fase sólida, en una monocapa lipídica, o en vesículas. La unión de un modulador se puede probar usando, p. ej., cambios en las características, las propiedades espectroscópicas (p. ej., fluorescencia, absorbencia, índice de refracción), hidrodinámicas (p. ej., conformación), cromatográficas o de solubilidad.

En otra realización de la invención, se puede usar un ensayo con GTPγ³⁵S. Según se describe anteriormente, al activar un GPCR, la subunidad Gα del complejo de proteína G se estimula para intercambiar GDP unida por GTP. La estimulación mediada por ligando de la actividad de intercambio de proteína G se puede medir en un ensayo bioquímico que mide la unión de GTPγ³⁵S marcado radiactivamente añadida a la proteína G en presencia de un ligando putativo. Típicamente, membranas que contienen el receptor quimiosensorial del interés se mezclan con un complejo de proteínas G. Inhibidores y/o activadores potenciales y GTPγ³⁵S se añaden al ensayo y se mide la unión de GTPγ³⁵S a la proteína G. La unión se puede medir mediante recuento por centelleo en líquido o mediante cualesquiera otros medios conocidos en la especialidad, incluyendo ensayos de proximidad por centelleo (SPA). En otros formatos de ensayo, se puede utilizar GTPγS marcado fluorescentemente.

2. Ensayos de polarización fluorescente

En otra realización, se pueden usar ensayos basados en polarización fluorescente ("FP") para detectar y verificar la unión a ligandos. La polarización fluorescente es una técnica de laboratorio versátil para medir la unión en equilibrio la hibridación de ácidos nucleicos y la actividad enzimática. Los ensayos de polarización fluorescente son homogéneos ya que no requieren una etapa de separación tal como centrifugación, filtración, cromatografía, precipitación o electroforesis. Estos ensayos se realizan en tiempo real, directamente en solución y no requieren una fase inmovilizada. Los valores de polarización se pueden medir repetidamente y después de la adición de reactivos ya que la medida de la polarización es rápida y no destruye la muestra. Generalmente, esta técnica se puede usar para medir valores de polarización de fluoróforos desde niveles picomolares bajos hasta micromolares. Esta sección describe cómo se puede usar la polarización fluorescente de un modo simple y cuantitativo para medir la unión de ligandos a los polipéptidos de T1R de la invención.

Cuando una molécula marcada fluorescentemente se excita con luz polarizada plana, emite luz que tiene un grado de polarización que es inversamente proporcional a su rotación molecular. Las moléculas marcadas fluorescentemente grandes permanecen relativamente estacionarias durante el estado excitado (4 nanosegundos en el caso de fluoresceína) y la polarización de la luz permanece relativamente constante entre la excitación y la emisión. Las moléculas marcadas fluorescentemente pequeñas giran rápidamente durante el estado excitado y la polarización cambia significativamente entre la excitación y la emisión. Por ejemplo, las moléculas pequeñas tienen valores de polarización bajos y las moléculas grandes tienen valores de polarización altos. Por ejemplo, un oligonucleótido marcado con fluoresceína de una sola hebra tiene un valor de polarización relativamente bajo, pero, cuando se hibrida a una hebra complementaria, tiene un valor de polarización superior. Cuando se usa FP para detectar y verificar la unión a saborizantes que puede activar o inhibir los receptores quimiosensoriales de la invención, se pueden usar saborizantes marcados fluorescentemente o saborizantes autofluorescentes.

La polarización (P) fluorescente se define como:

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

5 donde \parallel es la intensidad de la luz de emisión paralela al plano de luz de excitación e Int_{∞} es la intensidad de la luz de emisión perpendicular al plano de luz de excitación. P, que es una relación de intensidades de luz, es un número adimensional. Por ejemplo, se puede usar el sistema Beacon® y Beacon 2000™ en conexión con estos ensayos. Tales sistemas típicamente expresan la polarización en unidades de milipolarización (1 Unidad de Polarización = 1.000 unidades de mP).

10 La relación entre la rotación molecular y el tamaño se describe mediante la ecuación de Perrin y se refiere al lector a Jolley, M. E. (1991) en Journal of Analytical Toxicology, pp. 236-240, que da una explicación a fondo de esta ecuación. En resumen, la ecuación de Perrin indica que la polarización es directamente proporcional al tiempo de relajación, el tiempo que emplea una molécula en rotar a través de un ángulo de aproximadamente 68,5°. El tiempo de relajación rotacional se relaciona con la viscosidad (η), la temperatura absoluta (T), el volumen molecular (V) y la constante de los gases (R) mediante la siguiente ecuación:

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

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

A. Ensayos de alto rendimiento en estado sólido y solubles

30 En otra realización más, la descripción proporciona ensayos solubles que usan un complejo de polipéptido de T1R heterooligómero; o una célula o un tejido que coexpresa polipéptidos de T1R. Preferiblemente, la célula comprenderá una línea celular que coexpresa establemente un receptor gustativo T1R1/T1R3 funcional (umami) o un receptor gustativo T1R2/T1R3 (dulce). En otra realización, la descripción proporciona ensayos in vitro basados en fase sólida en un formato de alto rendimiento, donde los polipéptidos de T1R, o una célula o un tejido que expresa los polipéptidos de T1R, se ligan a un sustrato en fase sólida o un compuesto estimulante gustativo y se pone en contacto con un receptor T1R, y se detecta la unión usando una etiqueta apropiada o un anticuerpo producido contra el receptor T1R.

40 En los ensayos de alto rendimiento, es posible cribar hasta varios miles de diferentes moduladores o ligandos en un solo día. En particular, cada pocillo de una placa de microvaloración se puede usar para efectuar un ensayo separado contra un modulador potencial seleccionado, o, si se van a observar los efectos de la concentración o el tiempo de incubación, cada 5-10 pocillos se puede probar un solo modulador. Así, una sola placa de microvaloración estándar puede ensayar aproximadamente 100 (p. ej., 96) moduladores. Si se usan placas de 1.536 pocillos, entonces una sola placa puede ensayar fácilmente de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 1.500 compuestos diferentes. También se posible ensayar múltiples compuestos en cada pocillo de la placa. Es posible ensayar varias placas diferentes por día; son posibles cribados de ensayo para hasta aproximadamente 6.000-20.000 compuestos diferentes usando los sistemas integrados de la invención. Más recientemente, se han desarrollado enfoques microfluídicos para la manipulación de reactivos.

50 La molécula de interés se puede unir al componente en estado sólido, directamente o indirectamente, a través de conexión covalente o no covalente, p. ej., a través de una etiqueta. La etiqueta puede ser cualquiera de una variedad de componentes. En general, una molécula que se une a la etiqueta (un aglutinante de la etiqueta) se fija a un soporte sólido, y la molécula de interés etiquetada (p. ej., la molécula de transducción de la etiqueta de interés) se liga al soporte sólido mediante interacción de la etiqueta y el aglutinante de la etiqueta.

55 Se puede usar un número de etiquetas y aglutinantes de etiquetas, basándose en interacciones moleculares conocidas bien descritas en la bibliografía. Por ejemplo, cuando una etiqueta tiene un aglutinante natural, por

ejemplo, biotina, proteína A o proteína G, se puede usar junto con aglutinantes de etiquetas apropiados (avidina, estreptavidina, neutravidina, la región Fc de una inmunoglobulina, etc.). También están ampliamente disponibles anticuerpos para moléculas con aglutinantes naturales tales como biotina, y aglutinantes de etiquetas apropiados (véase, SIGMA Immunochemicals 1998 catalogue SIGMA, St. Louis MO).

5 De forma similar, cualquier compuesto hapténico o antigénico se puede usar en combinación con un anticuerpo apropiado para formar un par etiqueta/aglutinante de la etiqueta. Miles de anticuerpos específicos están disponibles comercialmente y muchos anticuerpos adicionales se describen en la bibliografía. Por ejemplo, en una configuración común, la etiqueta es un primer anticuerpo y el aglutinante de la etiqueta es un segundo anticuerpo que reconoce el primer anticuerpo. Además de las interacciones anticuerpo-antígeno, también son apropiadas interacciones receptor-ligando como pares de etiqueta y aglutinante de etiqueta. Por ejemplo, agonistas y antagonistas de receptores de la membrana celular (p. ej., interacciones receptor celular-ligando tales como transferrina, c-kit, ligandos de receptores virales, receptores de citocinas, receptores de quimiocinas, receptores de interleucinas, receptores de inmunoglobulinas, y anticuerpos, la familia de la cadhereínas, la familia a de las integrinas, la familia de las selectinas, y similares; véase, p. ej., Pigott & Power, *The Adhesion Molecule Facts Book I* (1993)). De forma similar, toxinas y venenos, epítomos virales, hormonas (p. ej., opiáceos, esteroides, etc.), receptores intracelulares (p. ej., que median en los efectos de diversos ligandos pequeños, incluyendo esteroides, hormona tiroidea, retinoides y vitamina D; péptidos), fármacos, lectinas, azúcares, ácidos nucleicos (configuraciones de polímeros tanto lineales como cíclicos), oligosacáridos, proteínas, fosfolípidos y anticuerpos pueden interactuar todos con diversos receptores celulares.

Polímeros sintéticos, tales como poliuretanos, poliésteres, policarbonatos, poliureas, poliamidas, polietileniminas, poli(sulfuros de arileno), polisiloxanos, poliimididas y poliacetatos también pueden formar una etiqueta o aglutinante de etiqueta apropiado. También son útiles muchos otros pares etiqueta/aglutinante de etiqueta en los sistema de ensayo descritos en la presente, como será evidente para un experto al revisar esta divulgación.

Conectores comunes tales como péptidos, poliéteres y similares también pueden servir como etiquetas, e incluyen, secuencias polipeptídicas, tales como secuencias de poli-gly de entre aproximadamente 5 y 200 aminoácidos. Estos conectores flexibles son conocidos por los expertos en la especialidad. Por ejemplo, conectores de poli(etilenglicol) están disponibles de Shearwater Polymers, Inc. Huntsville, Alabama. Estos conectores tienen opcionalmente conexiones amida, conexiones sulfhidrilo o conexiones heterofuncionales.

Los aglutinantes de etiquetas se fijan a sustratos sólidos usando cualquiera de una variedad de métodos disponibles actualmente. Los sustratos sólidos comúnmente se derivan o se funcionalizan al exponer la totalidad o una porción del sustrato a un reactivo químico que fija un grupo químico a la superficie que es reactivo con una porción del aglutinante de etiqueta. Por ejemplo, grupos que son adecuados para la ligación a una porción de cadena más larga podrían incluir aminas, grupos hidroxilo, tiol y carboxilo. Se pueden usar aminoalquilsilanos e hidroxialquilsilanos para funcionalizar una variedad de superficies, tales como superficies de vidrio. Lo esencial de estas matrices de biopolímeros en fase sólida está bien descrito en la bibliografía. Véanse, p. ej., Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963) (que describe la síntesis en fase sólida de, p. ej., péptidos); Geysen y cols., *J. Immun. Meth.*, 102:259-274 (1987) (que describe la síntesis de componentes en fase sólida sobre varillas); Frank & Doring, *Tetrahedron*, 44:60316040 (1988) (que describe la síntesis de diversas secuencias peptídicas sobre discos de celulosa); Fodor y cols., *Science*, 251:767-777 (1991); Sheldon y cols., *Clinical Chemistry*, 39(4):718-719 (1993); y Kozal y cols., *Nature Medicine*, 2(7):753759 (1996) (que describen todos matrices de biopolímeros fijadas a sustratos sólidos). Enfoques no químicos para fijar aglutinantes de etiquetas a sustratos incluyen otros métodos comunes, tales como calor, reticulación mediante radiación UV y similares.

3. Ensayos basados en células

En una realización de tratamiento preferida, una combinación de proteínas o polipéptidos de T1R se coexpresan transitoriamente o establemente en una célula eucariótica bien en formas no modificadas o bien como receptores quiméricos, variantes o truncados con o preferiblemente sin una secuencia de chaperona heteróloga que facilite su maduración y orientación a través de la ruta secretora. Estos polipéptidos de T1R se pueden expresar en cualquier célula eucariótica, tal como células HEK-293. Preferiblemente, las células comprenden una proteína G funcional, p. ej., Gα15 o la proteína G quimérica previamente identificada, u otra proteína G que sea capaz de acoplar el receptor quimérico a una ruta de señalización intracelular o a una proteína de señalización tal como fosfolipasa C. Además, preferiblemente, se producirá una célula que coexpresa establemente T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3 ya que se ha encontrado que tales células (según se muestra en los ejemplos experimentales) exhiben respuestas potenciadas a estímulos gustativos (relación con células que expresan transitoriamente la misma combinación de T1R). La activación de receptores T1R en estas células se puede detectar usando cualquier método estándar, tal como al detectar cambios en el intracelular al detectar fluorescencia dependiente de Fluo-4 en la célula. Tal ensayo es la base de los hallazgos experimentales presentados en esta solicitud.

Los receptores GPCR activados a menudo son sustratos para cinasas que fosforilan la cola C-terminal del receptor (y posiblemente también otros sitios). Así, los activadores promoverán la transferencia de ³²P desde ATP

radiomarcado hasta el receptor, que se puede ensayar con un contador de centelleo. La fosforilación de la cola C-terminal promoverá la unión de proteínas similares a arrestina e interferirá con la unión de proteínas G. Para una revisión general de la transducción de señales de GPCR y métodos para ensayar la transducción de señales, véanse, p. ej., *Methods in Enzymology*, vol. 237 y 238 (1994) y volumen 96 (1983); Bourne y cols., , 10:349:117-27 (1991); Bourne y cols., , 348:125-32 (1990); Pitcher y cols., *Annu. Rev. Biochem.*, 67:653-92 (1998).

La modulación de T1R se puede ensayar al comparar la respuesta de polipéptidos de T1R tratados con un modulador de T1R putativo con la respuesta de una muestra de control no tratada o una muestra que contiene un control "positivo" conocido. Estos moduladores de T1R putativos pueden incluir moléculas que bien inhiben o bien activan la actividad de polipéptidos de T1R. En una realización, a muestras de control (no tratadas con activadores o inhibidores) se les asigna un valor de actividad de T1R relativo de 100. La inhibición de un polipéptido de T1R se alcanza cuando el valor de actividad de T1R con relación al control es aproximadamente 90%, opcionalmente 50%, opcionalmente 25-0%. La activación de un polipéptido de T1R se alcanza cuando el valor de la actividad de T1R con relación al control es 110%, opcionalmente 150%, 200-500% o 1.000-2.000%.

Los cambios en el flujo iónico se pueden evaluar al determinar cambios en la polarización iónica (es decir, potencial eléctrico) de la célula o la membrana que expresa un polipéptido de T1R. Un medio para determinar cambios en la polarización celular es al medir cambios en la corriente (midiendo de ese modo cambios en la polarización) con técnicas de fijación de voltaje y pinzamiento zonal (véanse, p. ej., el modo "ligado a la célula", el modo "dentro-fuera" y el modo de la "célula entera", p. ej., Ackerman y cols., *New Engl. J Med.*, 336:1575-1595 (1997)). Las corrientes de células enteras se determinan convenientemente usando el estándar. Otros ensayos conocidos incluyen: ensayos de flujo de iones radiomarcados y ensayos fluorescentes que usan colorante sensibles al voltaje (véanse, p. ej., Vestergaard-Bogind y cols., *J. Membrane Biol.*, 88:67-75 (1988); Gonzales & Tsien, *Chem. Biol.*, 4:269-277 (1997); Daniel y cols., *J. Pharmacol. Meth.*, 25:185-193 (1991); Holevinsky y cols., *J. Membrane Biology*, 137:59-70 (1994)).

Los efectos de los compuestos de prueba sobre la función de los polipéptidos se pueden medir al examinar cualquiera de los parámetros descritos anteriormente. Se puede usar cualquier cambio fisiológico que afecte a la actividad de GPCR para evaluar la influencia de un compuesto de prueba sobre los polipéptidos. Cuando las consecuencias funcionales se determinan usando células intactas en animales, también se puede medir una variedad de efectos tales como la liberación de transmisores, la liberación de hormonas, cambios transcripcionales para marcadores genéticos tanto conocidos como no caracterizados (p. ej., transferencias Northern), cambios en el metabolismo celular tales como crecimiento celular o cambios de pH, y cambios en segundos mensajeros intracelulares tales como Ca^{2+} , IP3, cGMP o cAMP.

Ensayos preferidos para GPCRs incluyen células que están cargadas con colorantes sensibles a iones o voltaje para presentar la actividad receptora. Los ensayos para determinar la actividad de estos receptores también pueden usar agonistas y antagonistas conocidos para otros receptores acoplados a proteína G como controles para evaluar la actividad de los compuestos probados. En ensayos para identificar compuestos moduladores (p. ej., agonistas, antagonistas), los cambios en el nivel de iones en el citoplasma o la membrana se verificarán usando un indicador fluorescente sensible a iones o del voltaje de la membrana, respectivamente. Entre los indicadores sensibles a iones y las sondas de voltaje que se pueden emplear están los divulgados en el catálogo de 1997 de Molecular Probes. Para receptores acoplados a proteína G se pueden usar proteínas G promiscuas tales como $G\alpha 15$ y $G\alpha 16$ en el ensayo de elección (Wilkie y cols., *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, 88:10049-10053 (1991)).

La activación del receptor se inicia después de episodios intracelulares, p. ej., incrementos en segundos mensajeros. La activación de algunos receptores acoplados a proteína G estimula la formación de trifosfato de inositol (IP3) a través de hidrólisis mediada por fosfolipasa C de fosfatidilinositol (Berridge & Irvine, , 312:315-21 (1984)). El IP3, a su vez, estimula la liberación de almacenes de iones calcio intracelulares. Así, un cambio en los niveles de calcio citoplásmicos, o un cambio en los niveles de segundos mensajeros tales como IP3, se puede usar para evaluar la función del receptor acoplado a proteína G. Las células que expresan receptores acoplados a proteína G pueden exhibir niveles de calcio citoplásmico incrementados como resultado de la contribución tanto de la liberación de calcio desde almacenes intracelulares como de la entrada de calcio extracelular a través de canales iónicos de la membrana plasmática.

En una realización preferida, la actividad del polipéptido de T1R se mide coexpresando establemente o transitoriamente genes de T1R, preferiblemente establemente, en una célula heteróloga con una proteína G promiscua que conecta el receptor a una ruta de transducción de señales de fosfolipasa C (véase Offermanns & Simon, *J. Biol. Chem.*, 270:15175-15180 (1995)). En una realización preferida, la línea celular es HEK-293 (que normalmente no expresa genes de T1R) y la proteína G promiscua es $G\alpha 15$ (Offermanns & Simon, anteriormente). La modulación de la transducción del sabor se ensaya al medir cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelular, que cambian en respuesta a la modulación de la ruta de transducción de señales de T1R a través de la administración de una molécula que se asocia con polipéptidos de T1R. Los cambios en los niveles de Ca^{2+} se miden opcionalmente usando colorantes indicadores de Ca^{2+} fluorescentes y obtención de imágenes fluorométrica.

En otra realización, la hidrólisis de fosfatidilinositol (PI) se puede analizar según la Patente de EE. UU. 5.436.128. Brevemente, el ensayo implica el marcaje de células con 3H-mioinositol durante 48 o más. Las células marcadas se

tratan con un compuesto de prueba durante una hora. Las células tratadas se someten a lisis y se extraen en cloroformo-metanol-agua en los que los fosfatos de inositol se separaban mediante cromatografía e intercambio iónico y se cuantificaban mediante recuento por centelleo. La estimulación en número de veces se determina al calcular la relación de cpm en presencia de agonista con cpm en presencia de control de tampón. Asimismo, se determina la inhibición en número de veces al calcular la relación de cpm en presencia de antagonista con cpm en presencia de control de tampón (que puede contener o no un agonista).

Otros ensayos de receptores pueden implicar determinar el nivel de nucleótidos cíclicos, p. ej., cAMP o cGMP, intracelulares. En los casos en los que la activación del receptor da como resultado una disminución en los niveles de nucleótidos cíclicos, puede ser preferible exponer las células a agentes que incrementan los niveles de nucleótidos cíclicos intracelulares, p. ej., forskolina, antes de añadir un compuesto activador del receptor a las células en el ensayo. En una realización, los cambios en cAMP o cGMP intracelulares se pueden medir usando inmunoensayos. El método descrito en Offermanns & Simon, *J. Bio. Chem.*, 270:15175-15180 (1995), se puede usar para determinar el nivel de cAMP. También se puede usar el método descrito en Felley-Bosco y cols., *Am. J. Resp. Cell and Mol. Biol.*, 11:159-164 (1994), para determinar el nivel de cGMP. Además, un estuche de ensayo para medir cAMP y/o cGMP se describe en la Patente de EE. UU. 4.115.538,

En otra realización, se pueden medir los niveles de transcripción para evaluar los efectos de un compuesto de prueba sobre la transducción de señales. Una célula hospedadora que contiene polipéptidos de T1R de interés se pone en contacto con un compuesto de prueba durante un tiempo suficiente para efectuar cualesquiera interacciones, y a continuación se mide el nivel de expresión. La cantidad de tiempo para efectuar estas interacciones se puede determinar empíricamente, tal como dejando transcurrir el tiempo y midiendo el nivel de transcripción como una función del tiempo. La cantidad de transcripción se puede medir al usar cualquier método que se sepa que es adecuado por parte de los expertos en la técnica. Por ejemplo, la expresión de ARNm de la proteína de interés se puede detectar usando transferencias Northern o sus productos polipeptídicos se pueden identificar usando inmunoensayos. Alternativamente, se pueden usar ensayos basados en la transcripción que usan un gen informador según se describe en la Patente de EE. UU. 5.436.128. Los genes informadores pueden ser, p. ej., cloranfenicol acetiltransferasa, luciferasa, β -galactosidasa, β -lactamasa y fosfatasa alcalina. Por otra parte, la proteína de interés se puede usar como un informador indirecto a través de la ligación a un segundo informador tal como proteína fluorescente verde (véase, p. ej., Mistili & Spector, *Nature Biotechnology*, 15:961-964 (1997)).

La cantidad de transcripción se compara a continuación con la cantidad de transcripción bien en la misma célula en ausencia del compuesto de prueba o bien se puede comparar con la cantidad de transcripción en una célula sustancialmente idéntica que carece del polipéptido o los polipéptidos de T1R de interés. Una célula sustancialmente idéntica se puede derivar de las mismas células a partir de las que se preparaba la célula recombinante pero que no se habían modificado por la introducción de ADN heterólogo. Cualquier diferencia en la cantidad de transcripción indica que el compuesto de prueba tiene alterada de algún modo la actividad de los polipéptidos de T1R de interés.

4. Animales transgénicos no humanos que expresan receptores quimiosensoriales

También se pueden usar para ensayos de receptores animales no humanos que expresan una combinación de secuencias de receptores gustativos T1R. Esta expresión se puede usar para determinar si un compuesto de prueba se une específicamente a un complejo de receptor transmembranario gustativo de mamífero in vivo al poner en contacto un animal no humano establemente o transitoriamente transfectado con ácidos nucleicos que codifican receptores quimiosensoriales o regiones de unión a ligando de los mismo con un compuesto de prueba y determinar si el animal reacciona con el compuesto de prueba al unirse específicamente al complejo polipeptídico receptor.

Animales transfectados o infectados con los vectores de la descripción son particularmente útiles para ensayos para identificar y caracterizar estímulos gustativos que se pueden unir a un receptor específico o conjuntos de receptores. Tales animales infectados con vectores que expresan secuencias de receptores gustativos humanos se pueden usar para el cribado in vivo de estímulos gustativos y su efecto sobre, p. ej., la fisiología celular (p. ej., sobre neuronas gustativas), sobre el SNC, o el comportamiento. Alternativamente, líneas celulares estables que expresan un T1R o una combinación de los mismos se pueden usar como donantes de transferencia de ácidos nucleicos a animales transgénicos clonados producidos que expresan establemente un T1R particular o una combinación. Métodos para usar la transferencia de ácidos nucleicos para producir animales clonados que expresan un ADN heterólogo deseado son el objeto de diversas patentes de EE. UU. publicadas concedidas a the University of Massachusetts (registradas por Advanced Cell Technology, Inc.) y Roslin Institute (registradas por Geron Corp.).

Medios para infectar/expresar los ácidos nucleicos y vectores, bien individualmente o bien como bibliotecas, son muy conocidos en la especialidad. Una variedad de parámetros de células individuales, órganos o animales enteros se puede medir por una variedad de medios. Las secuencias de T1R de la descripción, por ejemplo, se pueden coexpresar en tejidos gustativos de animales al aportar con un agente infeccioso, p. ej., un vector de expresión adenoviral.

Los genes de receptores gustativos endógenos pueden permanecer funcionales y la actividad silvestre (natural) puede estar todavía presente. En otras situaciones, cuando es deseable que toda la actividad del receptor gustativo sea mediante el receptor híbrido endógeno introducido, se prefiere el uso de una línea inactivada. Métodos para constituir animales transgénico no humanos, particularmente ratones transgénicos, y la selección y la preparación de construcciones es para generar células transformadas son muy conocidos en la especialidad.

La constitución de una célula y un animal "inactivados" se basan en la premisa de que el nivel de expresión de un gen particular en una célula de mamífero se puede disminuir o eliminar completamente al introducir en el genoma una nueva secuencia de ADN que sirve para interrumpir alguna porción de la secuencia de ADN del gen que se va a suprimir. Además, se puede usar la "inserción de una trampa génica" para romper un gen hospedador, y se pueden usar células madre embrionarias (ES) de ratón para producir animales transgénicos inactivados (véase, p. ej., Holzschu, *Transgenic Res* 6:97-106 (1997)). La inserción de la secuencia exógena es típicamente mediante recombinación homóloga entre secuencias de ácido nucleico complementarias. La secuencia exógena es alguna porción del gen hospedador que se va a modificar, tal como secuencias exónicas, intrónicas o reguladoras de la transcripción, o cualquier secuencia genómica que sea capaz de afectar al nivel de la expresión del gen diana; o una combinación de las mismas. La orientación génica a través de recombinación homóloga en células madre embrionarias pluripotenciales permite modificar precisamente la secuencia genómica de interés. Se puede usar cualquier técnica para crear, cribar, propagar un animal inactivado, p. ej., véanse Bijvoet, *Hum. Mol. Genet.* 7:53-62 (1998); Moreadith, *J. Mol. Med.* 75:208-216 (1997); Tojo, *Cytotechnology* 19:161-165 (1995); Mudgett, *Methods Mol. Biol.* 48:167-184 (1995); Longo, *Transgenic Res.* 6:321-328 (1997); las Patentes de EE. UU. N° 5.616.491, 5.464.764, 5.631.153, 5.487.992, 5.627.059, 5.272.071; los documentos WO 91/09955, WO93/09222, WO 96/29411, WO 95/31560, WO 91/12650.

Los ácidos nucleicos de la descripción también se pueden usar como reactivos para producir células humanas "inactivadas" y su progenie. Asimismo, los ácidos nucleicos también se pueden usar como reactivos para producir ratones "activaciones" en ratones. Las secuencias génicas de T1R de ser humano o rata pueden reemplazar al T1R ortólogo en el genoma de ratón. De este modo, se produce un ratón que expresa un T1R de ser humano o rata. Este ratón se puede usar a continuación para analizar la función de T1Rs de ser humano o rata, y para identificar ligandos para tales T1Rs.

a. Moduladores

Los compuestos probados como moduladores de un miembro de la familia T1R pueden ser cualquier compuesto químico pequeño, o una entidad biológica, tal como una proteína, un ácido nucleico o un lípido. Ejemplos de los mismos incluyen 5^1 IMP y 5^1 GMP. Esencialmente, cualquier compuesto químico se puede usar como un modulador o ligando potencial en los ensayos de la invención, aunque lo más a menudo se prueban compuestos que son solubles en soluciones acuosas. Se pueden diseñar ensayos para cribar grandes bibliotecas químicas al automatizar las etapas del ensayo y proporcionar compuestos procedentes de cualquier fuente conveniente; estos ensayos se efectúan típicamente en paralelo (p. ej., en formatos de microvaloración sobre placas de microvaloración en ensayos robóticos). Se apreciará que se pueden sintetizar bibliotecas química mediante una de muchas reacciones químicas (p. ej. químicas patentadas por Senomyx). Adicionalmente, hay muchos proveedores de compuestos químicos, incluyendo Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Suiza) y similares.

En una realización preferida, los métodos de cribado de alto rendimiento implican proporcionar una biblioteca combinatoria de productos químicos o péptidos que contiene un gran número de compuestos que afectan al sabor potenciales (compuestos moduladores o ligandos potenciales). Estas "bibliotecas químicas combinatorias" o "bibliotecas de ligandos" se rastrean a continuación en uno o más ensayos, según se describe en la presente, para identificar los miembros de la biblioteca (especies o subclases químicas particulares) que presenten una característica deseada. Los compuestos así identificados pueden servir como "compuestos principales" convencionales o se pueden usar ellos mismo como moduladores gustativos potenciales o reales.

Preferiblemente, tales bibliotecas se cribarán frente a células o líneas celulares que expresan establemente un T1R o una combinación de T1Rs, es decir T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3, y preferiblemente una proteína G adecuada, p. ej. $G_{\alpha 15}$. Según se muestra en los ejemplos posteriores, tales líneas celulares estables exhiben respuestas muy pronunciadas a estímulos gustativos, p. ej. estímulos gustativos umami o dulces. Sin embargo, también se pueden usar en tales ensayos células y líneas celulares que expresan transitoriamente uno o más T1Rs.

Una biblioteca química combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generados bien por síntesis química o bien por síntesis biológica, al combinar un número de "unidades básicas" químicas tales como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca química combinatoria lineal tal como una biblioteca de polipéptidos se forma al combinar un conjunto de unidades básicas químicas (aminoácidos) en cualquier modo posible para una longitud de compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipeptídico). Se pueden sintetizar de miles a millones de compuestos químicos a través de esta mezcladura combinatoria de unidades básicas químicas.

La preparación y el cribado de bibliotecas químicas combinatorias son muy conocidos por los expertos en la técnica. Estas bibliotecas químicas combinatorias incluyen, pero no se limitan a, bibliotecas de péptidos (véanse, p. ej., la Patente de EE. UU. 5.010.175, Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 37:487-493 (1991) y Houghton y cols., , 354:84-88 (1991)). También se pueden usar otras químicas para generar bibliotecas de diversidad química. Tales químicas incluyen, pero no se limitan a: peptoides (p. ej., Publicación PCT N° WO 91/19735), péptidos codificados (p. ej., Publicación PCT WO 93/20242), biooligómeros aleatorios (p. ej., Publicación N° WO 92/00091), benzodiazepinas (p. ej., Pat. EE. UU. N° 5.288.514), diversómeros tales como hidatoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs y cols., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 90:6909-6913 (1993)), polipéptidos vinillogos (Hagihara y cols., *J. Amer. Chem. Soc.*, 114:6568 (1992)), peptidomiméticos no peptídicos con andamiaje de glucosa (Hirschmann y cols., *J. Amer. Chem. Soc.*, 114:9217-9218 (1992)), síntesis orgánicas análogas de bibliotecas de compuestos pequeños (Chen y cols., *J. Amer. Chem. Soc.*, 116:2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho y cols., *Science*, 261:1303 (1993)), fosfonatos de peptidilo (Campbell y cols., *J. Org. Chem.*, 59:658 (1994)), bibliotecas de ácidos nucleicos (Ausubel, Berger y Sambrook, todos anteriormente), bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (Patente de EE. UU. 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (Vaughn y cols., *Nature Biotechnology*, 14(3):309-314 (1996) y el documento PCT/US96/10287), bibliotecas de carbohidratos (Liang y cols., *Science*, 274:1520-1522 (1996) y la Patente de EE. UU. 5.593.853), bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (benzodiazepinas, Baum, C&EN, 18 enero, página 33 (1993); tiazolidinonas y metatiazanonas, la Patente de EE. UU. 5.549.974; pirrolidinas, las Patentes de EE. UU. 5.525.735 y 5.519.134; compuestos morfolínicos, la Patente de EE. UU. 5.506.337; benzodiazepinas, el documento 5.288.514, y similares).

Dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias están disponibles comercialmente (véanse, p. ej., 357 MPS, 390 MPS (Advanced Chem Tech, Louisville KY), Symphony (Rainin, Woburn, MA), 433A (Applied Biosystems, Foster City, CA), 9050 Plus (Millipore, Bedford, MA)). Además, numerosas bibliotecas combinatorias están ellas mismas disponibles comercialmente (véanse, p. ej., ComGenex, Princeton, NJ; Tripos, Inc., St. Louis, MO; 3D Pharmaceuticals, Exton, PA; Martek Biosciences; Columbia, MD; etc.).

En un aspecto de la descripción, los moduladores de T1R se pueden usar en cualquier producto alimenticio, dulce, composición farmacéutica o ingrediente de los mismos para modular de ese modo el sabor del producto, la composición o en ingrediente de un modo deseado. A modo de ejemplo, moduladores de T1R que potencian la sensación de sabor dulce se pueden añadir para edulcorar un producto o una composición; moduladores de T1R que potencian la sensación de sabor umami se pueden añadir a alimentos para incrementar gustos sabrosos. Alternativamente, se pueden usar antagonistas de T1R para bloquear el sabor dulce y/o umami.

b. Estuches

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 del sabor. Reactivos específicos para miembros de la familia T1R que se hibridan específicamente a ácidos nucleicos de T1R, tales como sondas y cebadores de T1R, y reactivos específicos para T1R que se unen específicamente a un polipéptido de T1R, p. ej., anticuerpos de T1R, se usan para examinar la regulación de la expresión de células gustativas y la transducción del sabor.

Ensayos con ácidos nucleicos con respecto a la presencia de ADN y ARN para un miembro de la familia T1R en una muestra incluyen numerosas técnicas que son conocidas por los expertos en la especialidad, tales como análisis Southern, análisis Northern, transferencia de puntos, protección de ARNasa, análisis de S1, técnicas de amplificación tales como PCR, e hibridación in situ. En la hibridación in situ, por ejemplo, el ácido nucleico diana se libera de sus alrededores celulares de tal modo que esté disponible para la hibridación dentro de la célula mientras se conserva la morfología celular para la interpretación y el análisis posteriores. Los siguientes artículos proporcionan una visión de conjunto de la especialidad de la hibridación in situ: Singer y cols., *Biotechniques*, 4:230250 (1986); Haase y cols., *Methods in Virology*, vol. VII, pp. 189-226 (1984); y *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (Names y cols., eds. 1987). Además, un polipéptido de T1R se puede detectar con las diversas técnicas de inmunoensayo descritas anteriormente. Típicamente, la muestra de prueba se compara tanto con un control positivo (p. ej., una muestra que expresa un polipéptido de T1R recombinante) como con un control negativo.

La presente descripción también proporciona estuches para cribar moduladores de miembros de la familia T1R. Estos estuches se pueden preparar a partir de materiales y reactivos fácilmente disponibles. Por ejemplo, estos estuches pueden comprender uno cualquiera o más de los siguientes materiales: ácidos nucleicos o proteínas de T1R, tubos de reacción e instrucciones para probar la actividad de T1R. Opcionalmente, el estuche contiene un receptor de T1R biológicamente activo o un línea celular que expresa establemente o transitoriamente un T1R biológicamente activo que contiene un receptor gustativo. Una gran variedad de estuches y componentes se puede preparar según la presente descripción, dependiendo del usuario pretendido del estuche y las necesidades particulares del usuario.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar realizaciones preferidas.

5 En las secuencias proteínicas presentadas en la presente, el código de una letra X o Xaa se refiere a cualquiera de los veinte residuos de aminoácido comunes. En las secuencias de ADN presentadas en la presente, los códigos de una letra N o n se refieren a cualquiera de las cuatro bases nucleotídicas comunes, A, T, C o G.

Ejemplo 1

Producción de construcciones de expresión de hT1R sin intrones

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

15

20

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

SEQ ID NO: 4

Secuencia de aminoácidos rT1R3

25 MPGLAILGLSLAFLLELGMGSSSLCLSQQFKAQGDYILGGLFPLGTTTBEATLNQRTQPNGI
 LCTFRFSPLGLFLAMAMKMAVEEINNGSALLPGLRLGYDLFDTCSEPVVTKPSPMLFMAKV
 GSQSI AAYCNYTQYQPRVLAVIGPHSSELALITGKFFSFFLMPQVSYASMDRLSDRETF
 PSFFRTVPSDRVQLQAVVTLQNF SWNWVAALGSDDDYGREGLSIFSGLANSRGICIAHE
 GLVPQHDTSGQQLGKVVDVLRQVNQSKVQVVVLFASARAVYSLFSYSILHDLSPKVVVAS
 ESWLTSDLVMTLPNIARVGTVLGFLQRGALLPEFSHYVETRLAALAADPTFCASLKAELDL
 EERVMGPRCSQCDYIMLQNLSSGLMQNLSAGQLHHQIFATYAAVYSVAQALHNTLQCNVS
 HCHTSEPVPWQLLENMYNMSFRARDLTLQFDAKGSVDMEYDLKMWWVQSPTPVLHTVGT
 FNGTLQLQHSKMYWPGNQVPVSQCSRQCKDGQVRRVKGFHSCCYDCVDCKAGSYRKHPPD
 FTCTPCGKDQWSPEKSTTCLPRRPKFLAWGEPAVLSLLLLLCLVLGLTLAALGLFVHYWD
 SPLVQASGGSLFCFGLICLGLFCLSVLLFPGRPRSASCLAQQPMAHLPLTGCLSTLFLQA
 AEI FVESELPLSWANWLC SYLRGPWAWLVVLLATLVEAALCAWYLMAFPPEVVTDWQVLP
 TEVLEHCRMRSWVSLGLVHITNAVLAFLCFLGTFLVQSQPGRYNRARGLTFAMLAYFIIW
 VSFVPLL ANVQVAYQPAVQMGAILFCALGILATFHLPKCYVLLWLPELNTQEFFLGRSPK
 EASDGNNGSSEATRHSSE

SEQ ID NO: 5

Secuencia de aminoácidos hT1R1

MLLCTARLVGLQLLISCCWAFACHSTESSPDFTLPGDYLLAGLFPPLHSGCLQVRHRPEVT
LCDRSCSFNEHGYHLFQAMRLGVEEINNSTALLPNI TLGYQLYDVCSDSANVYATLRVLS
LPGQHHEIQGDLHYSPTVLAVIGPDSTNRAATTAALLSPFLVPMI SYAASSETLSVKR
QYPSFLRTIPNDKYQVETMVLQLKFGWTWISLVGSSDDYGQLGVQALENQATGQGICIA
FKDIMPFSAQVGDERMQCLMRHLAQAGATVVVVVFSSRQLARVFFESVVLTNLTGKVVAS
EAWALSRHITGVPGIQRIGMVLGVAIQKRAVPGLKAFEEAYARADKKAPRPCHKGSWCSS
NQLCRECQAFMAHTMPKLKAFSSAYNAYRAVYAVAHGLHQLLGCASGACSRGRVYPWQ
LLEQIHKVHFLHKTVAFNDNRDPLSSYNI IAWDWNPKWTF TVLGSSTWSPVQLNINE
TKIQWHGKDNQVPKSVCSDDCLEGHQRVVTGFHCCFECVPCGAGTFLNKS DLYRCQPCG
KEEWAPEGSQTCFPRTVVFLALREHTSWVLLAANTLLLLLLLLGTAGLFAWHLDTPVVRSA
GGRLCFLMLGSLAAGSGSLYGFGEPTRPCALLRQALFALGFTIFLSCLTVRSFQLIIIF
KFSTKVP TFYHAWVQNHGAGLFVMISSAAQLLICTWL VVWTFPLPAREYQRFPHLVMLEC
TETNSLGFILAFLYNGLLSISAFACSYLGKDLPENYNEAKCVTFSLLENFVSWIAFFTTA
SVYDGYLPAANMMAGLSSLSGGYF LPKCYVILCRPDLNSTEHFQASIQDYTRRCGS
T

SEQ ID NO: 6

5

Secuencia de aminoácidos hT1R2

MGPRACTICSLFFLLWVLAEPAENSDFYLPGDYLLGGLFSLHANMKGIVHLNLFQVPMCK
EYEVKVI GYNLMQAMRFAVEEINNDSSLLPGVLLGYEIVDVCYISNNVQPVLYFLAHEDN
LLPIQEDYSNYISRVVAVIGPDNSESVMTVANFLSLFLLPQITYSASIDELRDKVRFPAL
LRTTPSADHHVEAMVQLMLHFRWNWI IVLVSSD TYGRDNGQLLGERVARRD ICIAFQETL
PTLQPNQNM TSEERQRLVTI VDKLQQSTARVVVVFSPDLTLYHFFNEVLRQNFTGAVWIA
SESWAIDPVLHNLTELGH LGTFLGITIQSVPIPGFSEFREWGPQAGPPPLSRTS QS YTCN
QECDNCLNATLSFN TILRLSGERVVYSVYSAVYAVAHALHSLLGCDKSTCTKR VVYPWQL
LEEIWKVNF TLLDHQIFFDPQGDVALHLEIVQWQWDRSQNPFQSVASYYP LQRQLKNIQD
ISWHTVNN T I PMSMCSKRCQSGQKKKPVGIHVCCFECIDCLPGTFLNHTEDEYECQACPN
NEWSYQSETSCFKRQLVFLEWHEAPTIAVALLAALGFLSTLAILVIFWRHFQTPIVRSAG
GPMCFML TLLL VAYMVVPVYVGPVKVSTCLCRQALFPLCFTICISCI AVRSFQIVCAFK
MASRFPRAYSYWVRYQGPYVSMAFITVLKMI VVIGMLATGLSP TTRTD PDDPKITIVSC
NPNYRNSLLFN TSLD LLSVVGFSFAYMGKELPTNYNEAKFITLSM TFYFTSSVSLCTFM
SAYSGVLVTIVD LLVTVLNL LAISLGYFGPKCYMILFYPERNTPAYFN SMIQGYTMRRD

SEQ ID NO: 7

Secuencia de aminoácidos hT1R3

MLGPAVLGSLWALLHPGTGAPLCLSQQLRMKGDYVLGGLFPLGEAEEAGLSRSTRPSSP
VCTRFSSNGLLWALAMKMAVEEINNKSDLLPGLRLGYDLFDTCEPVMKPSLMFLAKA
GSRDIAAYCNYTQYQPRVLAVIGPHSSELAMVTGKFFSFFLMPQVSYGASMELLSARETF
PSFFRTVPSDRVQLTAAAEILLQEFQWVVAALGSDDEYGRQGLSIFSAALAAARGICIAHE
GLVPLPRADDSRLGKVQDVLHQVNQSSVQVLLFASVHAAHALFNYSISSRLSPKVWVAS
EAWLTSDLVMGLPGMAQMGTVLGFLQGAQLHEFPQYVKTHLALATDPAFCSALGEREQG
LEEDVVGQRCPQCDCITLQNVSAGLNHHQTFVYAAVYSVAQALHNTLQCNASGCPAQDP
VKPWQLLENMYNLTFFHVGGPLRFDSSGNVDMFYDLKLWVWQGSVPRLHDVGRFNGLRT

ERLKI RWHTSDNQKPVSRCSRQCQEGQVRRVKG FHS CCYDCVDCEAGSYRQNPDDI ACTF
CGQDEWSPERSTRCFRRRSRFLAWGEPVLLLLLLLLL LSLALGLVLAALGLFVHHRDSPLVQ
ASGGPLACFGLVCLGLVCLSVLLFFPGQSPARCLAQQPLSHLPLTGCLSTLFLQAAEIFV
ESELPLSWADRLSGCLRGPWAWLVVLLAMLVEVALCTWYLVAFPPEVVTDWHMLPTEALV
HCRTRSWVSFGLAHATNATLAFLCFLGTFLVRSQPGRYNRARGLTFAMLAYFITWVSFVP
LLANVQVVL RPAVQMGALLLCVLGILAAFHLP RCYLLMRQ PGLNTP EFFLGGGPGDAQGO
NDGNTGNQKHE

SEQ ID NO: 8

Secuencia de ácido nucleico hT1R1

ATGCTGCTCTGCACGGCTCGCCTGGTCGGCCTGCAGCTTCTCATTTCCCTGCTGCTGGGCC
TTTGCCTGCCATAGCACGGAGTCTTCTCCTGACTTCACCTCCCCGGAGATTACCTCCTG
GCAGGCCTGTTCCCTCTCCATCTGGCTGTCTGCAGGTGAGGCACAGACCCGAGGTGACC
CTGTGTGACAGGTCTTGTAGCTTCAATGAGCATGGCTACCACCTCTTCCAGGCTATGCGG
CTTGGGGTTGAGGAGATAACAAC TCCACGGCCCTGCTGCCAACATCACCTGGGGTAC
CAGCTGTATGATGTGTGTTCTGACTCTGCCAATGTGTATGCCACGCTGAGAGTGCTCTCC
CTGCCAGGGCAACACCACATAGAGCTCCAAGGAGACCTTCTCCACTATTCCCTACGGTG
CTGGCAGTGATTGGGCTGACAGACCAACCGTGCTGCCACCACAGCCGCCCTGCTGAGC
CCTTCTCCTGGTGCCCATGATTAGCTATGCGGCCAGCAGCGAGACGCTCAGCGTGAAGCGG
CAGTATCCCTCTTTCCTGCGCACCATCCCCAATGACAAGTACCAGGTGGAGACCATGGTG
CTGCTGCTGCAGAAAGTTCGGGTGGACCTGGATCTCTCTGGTTGGCAGCAGTGACGACTAT
GGGCAGCTAGGGGTGCAGGCACTGGAGAACCAGGCCACTGGTCAGGGGATCTGCATTGCT
TTCAAGGACATCATGCCCTTCTCTGCCAGGTGGGGCATGAGAGGATGCAGTGCCTCATG
CGCCACCTGGCCCAGGCCGGGGCCACCGTCGTGGTTGTTTTTTCCAGCCGGCAGTTGGCC
AGGGTGTTTTTCGAGTCCGTGGTGCTGACCAACCTGACTGGCAAGGTGTGGGTGCGCTCA
GAAGCCTGGGCCCTCTCCAGGCACATCACTGGGGTGCCCGGGATCCAGCGCATTGGGATG
GTGCTGGGCGTGGCCATCCAGAAGAGGGCTGTCCCTGGCCTGAAGGCGTTTGAAGAAGCC
TATGCCCGGGCAGACAAGAAGGCCCTTAGGCCTTGCCACAAGGGCTCCTGGTGCAGCAGC
AATCAGCTCTGCAGAGAA TGCCAAGCTTTCATGGCACACACGATGCCCAAGCTCAAAGCC
TTCTCCATGAGTTCTGCCTACAACGCATACCGGGCTGTGTATGCGGTGGCCCATGGCCTC

CACCAGCTCCTGGGCTGTGCCTCTGGAGCTTGTTCCAGGGGCCGAGTCTACCCCTGGCAG
 CTTTTGGAGCAGATCCACAAGGTGCATTTCCCTTCTACACAAGGACACTGTGGCGTTTAAT
 GACAACAGAGATCCCCTCAGTAGCTATAACATAATTGCCTGGGACTGGAATGGACCCAAG
 TGGACCTTCACGGTCTCGGTTCCCTCCACATGGTCTCCAGTTCAGCTAAACATAAATGAG
 ACCAAAATCCAGTGGCACGGAAAGGACAACCAGGTGCCTAAGTCTGTGTGTTCCAGCGAC
 TGTCTTGAAGGGCACCAGCGAGTGGTTACGGGTTTCCATCACTGCTGCTTTGAGTGTGTG
 CCCTGTGGGGCTGGGACCTTCCTCAACAAGAGTGACCTCTACAGATGCCAGCCTTGTGGG
 AAAGAAGAGTGGGCACCTGAGGGAAGCCAGACCTGCTTCCCGCGCACTGTGGTGTFTTTG
 GCTTTGCGTGAGCACACCTCTTGGGTGCTGCTGGCAGCTAACACGCTGCTGCTGCTGCTG
 CTGCTTGGGACTGCTGGCCTGTTTGCCTGGCACCTAGACACCCCTGTGGTGAGGTCAGCA
 GGGGGCCGCCTGTGCTTTCTTATGCTGGGCTCCCTGGCAGCAGGTAGTGGCAGCCTCTAT
 GGCTTCTTTGGGGAACCCACAAGGCCTGCGTGCTTGCTACGCCAGGCCCTCTTTGCCCTT
 GGTTCACCATCTTCCCTGTCCCTGCCTGACAGTTCGCTCATTCCAATAATCATCATCTTC
 AAGTTTTCCACCAAGGTACCTACATTCTACCACGCCTGGGTCCAAAACCACGGTGTGGC
 CTGTTTGTGATGATCAGCTCAGCGGCCAGCTGCTTATCTGTCTAACTTGGCTGGTGGTG
 TGGACCCCACTGCCTGCTAGGGAATACCAGCGCTTCCCCATCTGGTGATGCTTGAGTGC
 ACAGAGACCAACTCCCTGGGCTTCATACTGGCCTTCCCTCTACAATGGCCTCCTCTCCATC
 AGTGCCTTTGCCTGCAGCTACCTGGGTAAGGACTTGCCAGAGAACTACAACGAGGCCAAA
 TGTGTCACCTTCAGCCTGCTCTTCAACTTCGTGTCTCTGGATCGCCTTCTTCACCACGGCC
 AGCGTCTACGACGGCAAGTACCTGCCTGCGGCCAACATGATGGCTGGGCTGAGCAGCCTG
 AGCAGCGGCTTCGGTGGGTATTTCTGCCTAAGTGCTACGTGATCCTCTGCCGCCAGAC
 CTCAACAGCACAGAGCACTTCCAGGCCCTCATTTCAGGACTACACGAGGCGCTGCGGCTCC
 ACCTGA

SEQ ID NO 9

Secuencia de ácido nucleico hT1R3

ATGCTGGGCCCTGCTGTCTGGGCTCAGCCTCTGGGCTCTCCTGCACCCTGGGACGGGG
 GCCCAATTGTGCCTGTCACAGCAACTTAGGATGAAGGGGGACTACGTGCTGGGGGGGCTG
 TTCCCCCTGGGCGAGGCCGAGGAGGCTGGCCTCCGCAGCCGGACACGGCCAGCAGCCCT
 GTGTGCACCAGGTTCTCCTCAAACGGCCTGCTCTGGGCACTGGCCATGAAAATGGCCGTG

5

GAGGAGATCAACAACAAGTCGGATCTGCTGCCCGGGCTGCGCCTGGGCTACGACCTCTTT
GATACGTGCTCGGAGCCTGTGGTGGCCATGAAGCCCAGCCTCATGTTCTGGCCAAGGCA
GGCAGCCGCGACATCGCCGCCTACTGCAACTACACGCAGTACCAGCCCCGTGTGCTGGCT
GTCATCGGGCCCCACTCGTCAGAGCTCGCCATGGTCACCGGCAAGTTCTTCAGCTTCTTC
CTCATGCCCCAggtcagCTACGGTGTAGCATGGAGCTGCTGAGCGCCCGGGAGACCTTC
CCCTCCTTCTTCCGCACCGTGCCCAGCGACCGTGTGCAGCTGACGGCCGCGCGGAGCTG
CTGCAGGAGTTCGGCTGGAACCTGGGTGGCCGCCCTGGGCAGCGACGACGAGTACGGCCGG
CAGGGCCTGAGCATCTTCTCGGCCCTGGCCGCGCACGCGGCATCTGCATCGCGCACGAG
GGCCTGGTGCCGCTGCCCCGTGCCGATGACTCGCGGCTGGGGAAGGTGCAGGACGTCTTG
CACCAGGTGAACCAGAGCAGCGTGCAGGTGGTGTGCTGCTGTTTCGCCTCCGTGCACGCCGCC
CACGCCCTCTTCAACTACAGCATCAGCAGCAGGCTCTCGCCCAAGGTGTGGGTGGCCAGC
GAGGCCTGGCTGACCTCTGACCTGGTTCATGGGGCTGCCCGGCATGGCCAGATGGGCACG
GTGCTTGGCTTCTCCAGAGGGGTGCCAGCTGCACGAGTTCCCCAGTACGTGAAGACG
CACCTGGCCCTGGCCACCGACCCGGCCTTCTGCTCTGCCCTGGGCGAGAGGGAGCAGGGT
CTGGAGGAGGACGTGGTGGGCCAGCGCTGCCCGCAGTGTGACTGCATCACGCTGCAGAAC
GTGAGCGCAGGGCTAAATCACCACCAGACGTTCTCTGTCTACGCAGCTGTGTATAGCGTG
GCCCAGGCCCTGCACAACACTCTTCAGTGCAACGCCTCAGGCTGCCCCGCGCAGGACCCC
GTGAAGCCCTGGCAGCTCCTGGAGAACATGTACAACCTGACCTTCCACGTGGGCGGGCTG
CCGCTGCGGTTTCGACAGCAGCGGAAACGTGGACATGGAGTACGACCTGAAGCTGTGGGTG
TGCCAGGGCTCAGTGCCAGGCTCCACGACGTGGGCAGGTTCAACGGCAGCCTCAGGACA
GAGCGCCTGAAGATCCGCTGGCACACGTCTGACAACCAGAAGCCCGTGTCCCGGTGCTCG
CGGCAGTGCCAGGAGGGCCAGGTGCGCCGGTCAAGGGTTTCCACTCCTGCTGCTACGAC
TGTGTGGACTGCGAGGCGGGCAGCTACCGGCAAACCCAGACGACATCGCCTGCACCTTT
TGTGGCCAGGATGAGTGGTCCCCGGAGCGAAGCACACGCTGCTTCCGCGCAGGTCTCGG
TTCTTGGCATGGGGCGAGCCGGCTGTGCTGCTGCTGCTCCTGCTGCTGAGCCTGGCGCTG
GGCCTTGTGCTGGCTGCTTTGGGGCTGTTTCGTTCCACATCGGGACAGCCCACTGGTTTCAG
GCCTCGGGGGGGCCCCCTGGCCTGCTTTGGCCTGGTGTGCCTGGGCCTGGTCTGCCTCAGC
GTCCTCCTGTTCCCTGGCCAGCCCAGCCCTGCCCGATGCCCTGGCCCAGCAGCCCTTGTCC
CACCTCCCGCTCACGGGCTGCCTGAGCACACTCTTCCCTGCAGGCGGCCGAGATCTTCGTG
GAGTCAGAACTGCCTCTGAGCTGGGCAGACCGGCTGAGTGGCTGCCTGCGGGGGCCCTGG

ES 2 587 610 T3

GCCTGGCTGGTGGTGCTGCTGGCCATGCTGGTGGAGGTGCACTGTGCACCTGGTACCTG
GTGGCCTTCCC GCCGGAGGTGGTGACGGACTGGCACATGCTGCCACGGAGGCGCTGGTG
CACTGCCGCACACGCTCCTGGGTCAGCTTCGGCCTAGCGCACGCCACCAATGCCACGCTG
GCCTTTCTCTGCTTCTGGGCACTTTCCTGGTGC GGAGCCAGCCGGGCTGCTACAACCGT
GCCCGTGGCCTCACCTTTGCCATGCTGGCCTACTTCATCACCTGGGTCTCCTTTGTGCC
CTCCTGGCCAATGTGCAGGTGGTCTCAGGCCCGCCGTGCAGATGGGCGCCCTCCTGCTC
TGTGTCTGGGCATCCTGGCTGCCTTCCACCTGCCAGGTGTTA CCTGCTCATGCCGCAG
CCAGGGCTCAACACCCCCGAGTTCTTCTGGGAGGGGGCCCTGGGGATGCCCAAGGCCAG
AATGACGGGAACACAGGAAATCAGGGGAAACATGAGTGA

SEQ ID NO: 10

Secuencia de ácido nucleico hT1R2

ATGGGGCCCAGGGCAAAGACCATCTGCTCCCTGTTCTTCTCCTATGGGTCTGGCTGAG
CCGGCTGAGAACTCGGACTTCTACCTGCC TGGGATTACCTCCTGGGTGGCCTCTTCTCC
CTCCATGCCAACATGAAGGGCATTGTTACCTTA ACTTCTCCTGCAGGTGCCATGTGCAAG
GAGTATGAAGTGAAGGTGATAGGCTACAACCTCATGCAGGCCATGCGCTTCGCGGTGGAG
GAGATCAACAATGACAGCAGCCTGCTGCC TGGTGTGCTGCTGGGCTATGAGATCGTGGAT
GTGTGCTACATCTCCAACAATGTCCAGCCGGT GCTCTACTTCTGGCACACGAGGACAAC
CTCCTTCCCATCCAAGAGGACTACAGTA ACTACATTTCCCGTGTGGTGGCTGTCAATTGGC
CCTGACAAC TCCGAGTCTGTCATGACTGTGGCCA ACTTCTCCTCCTATTTCTCCTTCCA
CAGATCACCTACAGCGCCATCAGCGATGAGCTGCGAGACAAGGTGCGCTTCCCGGCTTTG
CTGCGTACCACACCCAGCGCCGACCACCAGT CGAGGCCATGGTGCAGCTGATGCTGCAC
TTCCGCTGGA ACTGGATCATTGTGCTGGT GAGCAGCGACACCTATGGCCGCGACAATGGC
AGCTGCTTGGCGAGCGCGTGGCCCGGCGGAC ATCTGCATCGCCTTCCAGGAGACGCTGC
CCACACTGCAGCCCAACCAGAACATGACGTCAGAGGAGCGCCAGCGCCTGGTGACCATTG
TGGACAAGCTGCAGCAGAGCACAGCGCGCTCGTGGT CGTGTTCTCGCCCGACCTGACCC
TGTACCACTTCTTCAATGAGGTGCTGCGCCAGA ACTTACGGGCGCCGTGTGGATCGCCT
CCGAGTCTTGGGCCATCGACCCGGTCTG CACAACCTCACGGAGCTGGGCCACTTGGGCA
CCTTCTGGGCATCACCATCCAGAGCGTGC CATCCCGGGCTTCA GTGAGTTCCGCGAGT
GGGGCCCACAGGCTGGGCCGCCACCCCTCAGCAGG ACCAGCCAGAGCTATACTGCAACC

AGGAGTGCACAACTGCCTGAACGCCACCTTGTCCTTCAACACCAATTCTCAGGCTCTCTG
GGGAGCGTGTCTACAGCGTGTACTCTGCGGTCTATGCTGTGGCCCATGCCCTGCACA
GCCTCCTCGGCTGTGACAAAAGCACCTGCACCAAGAGGGTGGTCTACCCCTGGCAGCTGC
TTGAGGAGATCTGGAAGGTCAACTTCACTCTCCTGGACCAACAAAATCTTCTTCGACCCGC
AAGGGGACGTGGCTCTGCACTTGGAGATTGTCCAGTGGCAATGGGACCGGAGCCAGAATC
CCTTCCAGAGCGTCGCCTCCTACTACCCCTGCAGCGACAGCTGAAGAACATCCAAGACA
TCTCCTGGCACACCGTCAACAACACGATCCCTATGTCCATGTGTTCCAAGAGGTGCCAGT
CAGGGCAAAGAAGAAGCCTGTGGGCATCCACGTCTGCTGCTTCGAGTGCATCGACTGCC
TTCCCGGCACCTTCTCAACCACACTGAAGATGAATATGAATGCCAGGCCCTGCCCGAATA
ACGAGTGGTCTACCAGAGTGAGACCTCCTGCTTCAAGCGGCAGCTGGTCTTCTGGAAT
GGCATGAGGCCACCAACATCGCTGTGGCCCTGCTGGCCGCCCTGGGCTTCTCAGCACCC
TGGCCATCCTGGTGATATTCTGGAGGCACCTCCAGACACCCATAGTTCGCTCGGCTGGGG
GCCCCATGTGCTTCTGATGCTGACACTGCTGCTGGTGGCATACATGGTGGTCCCGGTGT
ACGTGGGGCCGCCAAGGTCTCCACCTGCCTCTGCCGCCAGGCCCTCTTTCCCTCTGCT
TCACAATTTGCATCTCCTGTATCGCCGTGCGTTCTTTCCAGATCGTCTGCGCCTTCAAGA
TGGCCAGCCGCTTCCACGCGCTACAGCTACTGGGTCCGCTACCAGGGGCCCTACGTCT
CTATGGCATTATCACGGTACTCAAAATGGTCATTGTGGTAATTGGCATGCTGGCCACGG
GCCTCAGTCCCACCAACCGTACTGACCCCGATGACCCCAAGATCAACAATTGTCTCCTGTA
ACCCCAACTACCGCAACAGCCTGCTGTTCAACACCAGCCTGGACCTGCTGCTCTCAGTGG
TGGGTTTTCAGCTTCGCCTACATGGGCAAAGAGCTGCCCAACCAACTACAACGAGGCCAAGT
TCATCACCCCTCAGCATGACCTTCTATTTACCTCATCCGTCTCCCTCTGCACCTTCATGT
CTGCCCTACAGCGGGGTGCTGGTCACCATCGTGGACCTCTTGGTCACTGTGCTCAACCTCC
TGGCCATCAGCCTGGGCTACTTCGGCCCCAAGTGCTACATGATCCTCTTCTACCCGGAGC
GCAACACGCCCGCCTACTTCAACAGCATGATCCAGGGCTACACCATGAGGAGGGACTAG

SEQ ID NO 11

Secuencia de ácido nucleico rT1R3

ATGCCGGGTTTGGCTATCTTGGGCCTCAGTCTGGCTGCTTTCTGAGCTTGGGATGGGG
TCCTCTTTGTGTCTGTACAGCAATTCAAGGCACAAGGGGACTATATATTGGGTGGACTA
TTTCCCTGGGCACAACTGAGGAGGCCACTCTCAACCAGAGAACACAGCCCAACGGCATC

CTATGTACCAGGTTCTCGCCCCTTGGTTTGTTCCTGGCCATGGCTATGAAGATGGCTGTA
 GAGGAGATCAACAATGGATCTGCCCTTGCTCCCTGGGCTGCGACTGGGCTATGACCTGTTT
 GACACATGCTCAGAGCCAGTGGTCACCATGAAGCCCAGCCTCATGTTTCATGGCCAAGGTG
 GGAAGTCAAAGCATTGCTGCCTACTGCAACTACACACAGTACCAACCCCGTGTGCTGGCT
 GTCATTGGTCCCCACTCATCAGAGCTTGCCCTCATTACAGGCAAGTTCTTCAGCTTCTTC
 CTCATGCCACAGGTGAGCTATAGTGCCAGCATGGATCGGCTAAGTGACCGGGAAACATTT
 CCATCCTTCTTCCGCACAGTGCCAGTGACCGGGTGCAGCTGCAGGCCGTTGTGACACTG
 TTGCAGAATTTTTCAGCTGGAACTGGGTGGCTGCCTTAGGTAGTGATGATGACTATGGCCGG
 GAAGGTCTGAGCATCTTTTCTGGTCTGGCCAACCTCACGAGGTATCTGCATTGCACACGAG
 GGCTGGTGCCACAACATGACACTAGTGGCCAAACAATTGGGCAAGGTGGTGGATGTGCTA
 CGCCAAGTGAAACAAAGCAAAGTACAGGTGGTGGTGTGCTGTTTGCATCTGCCCGTGTGCT
 TACTCCCTTTTTAGCTACAGCATCCTTCATGACCTCTCACCCAAGGTATGGGTGGCCAGT
 GAGTCTGGCTGACCTCTGACCTGGTTCATGACACTTCCCAATATTGCCCGTGTGGGCACT
 GTTCTTGGGTTTCTGCAGCGCGGTGCCCTACTGCCTGAAATTTTCCATTATGTGGAGACT
 CGCCTTGCCCTAGCTGCTGACCCAACATTTCTGTGCCTCCCTGAAAGCTGAGTTGGATCTG
 GAGGAGCGCGTGATGGGGCCACGCTGTTCACAATGTGACTACATCATGCTACAGAACCTG
 TCATCTGGGCTGATGCAGAACCTATCAGCTGGGCAGTTGCACCACCAAATATTTGCAACC
 TATGCAGCTGTGTACAGTGTGGCTCAGGCCCTTCAACAACCCCTGCAGTGCAATGTCTCA
 CATTGCCACACATCAGAGCCTGTTCAACCCTGGCAGCTCCTGGAGAACATGTACAATATG
 AGTTTCCGTGCTCGAGACTTGACACTGCAGTTTGTATGCCAAAGGGAGTGTAGACATGGAA
 TATGACCTGAAGATGTGGGTGTGGCAGAGCCCTACACCTGTACTACATACTGTAGGCACC
 TTCAACGGCACCCCTTCAGCTGCAGCACTCGAAAATGTATTGGCCAGGCAACCAGGTGCCA
 GTCTCCAGTGCTCCCGCAGTGCAAAGATGGCCAGGTGCGCAGAGTAAAGGGCTTTTCAT
 TCCTGCTGCTATGACTGTGTGGACTGCAAGGCAGGGAGCTACCGGAAGCATCCAGATGAC
 TTCACCTGTACTCCATGTGGCAAGGATCAGTGGTCCCCAGAAAAAGCACAACCTGCTTA
 CCTCGCAGGCCCAAGTTTCTGGCTTGGGGGGAGCCAGCTGTGCTGTCACTTCTCCTGCTG
 CTTTGCCTGGTGTGCTGGGCTGACACTGGCTGCCCTGGGGCTCTTTGTCCACTACTGGGAC
 AGCCCTCTTGTTCAGGCCTCAGGTGGGTCACTGTTCTGCTTTGGCCTGATCTGCCCTAGGC
 CTCTTCTGCCTCAGTGTCTTCTGTTCACAGGACGACCAGCTCTGCCAGCTGCCTTGCC
 CAACAACCAATGGCTCACCTCCCTCTCACAGGCTGCCTGAGCACACTCTTCTGCAAGCA

GCCGAGATCTTTGTGGAGTCTGAGCTGCCACTGAGTTGGGCAAACCTGGCTCTGCAGCTAC
 CTTCGGGGCCCCCTGGGCTTGGCTGGTGGTACTGCTGGCCACTCTTGTGGAGGCTGCACTA
 TGTGCCTGGTACTTGTATGGCTTTCCCTCCAGAGGTGGTGACAGATTGGCAGGTGCTGCCC
 ACGGAGGTACTGGAACACTGCCGCATGCGTTCCTGGGTGAGCCTGGGCTTGGTGCACATC
 ACCAATGCAGTGTAGCTTTCCCTCTGCTTTCTGGGCACTTTCCCTGGTACAGAGCCAGCCT
 GGTGCTATAACCGTGCCCGTGGCCTCACCTTCGCCATGCTAGCTTATTTTCATCATCTGG
 GTCTCTTTTGTGCCCTCCTGGCTAATGTGCAGGTGGCCTACCAGCCAGCTGTGCAGATG
 GGTGCTATCTTATTCTGTGCCCTGGGCATCCTGGCCACCTTCACCTGCCCAAATGCTAT
 GTACTTCTGTGGCTGCCAGAGCTCAACACCCAGGAGTTCCTTCCCTGGGAAGGAGCCCCAAG
 GAAGCATCAGATGGGAATAGTGGTAGTAGTGAGGCAACTCGGGGACACAGTGAATGA

5 Además, las siguientes traducciones conceptuales, que corresponden a los extremos C de dos pares ortólogos de T1Rs de pez, se derivan de fragmentos de secuencias genómicas no publicados y se proporcionan. T1RA de pez globo se derivó del registro 'armazón 164'; T1RB de pez globo se derivó del registro LPC61711; T1RA de Tetradon se derivó del registro AL226735; T1RB de Tetradon se derivó del registro AL222381. Las ambigüedades en las traducciones conceptuales ('X') resultan de ambigüedades en las secuencias de las bases de datos.

SEQ ID NO 12

T1RA Pez globo

10 PSPFRDIVSYPDKIILGCFMNLKTSSVSFVLLLLLCLLCFIFSYMGKDLPKNYNEAKAIT
 FCLLLLILTWIIFTTASLLYQGKYIHSLNALAVLSSIYSFLLWYFLPKCYIIFQPQKNT
 QKYFQGLIQDYTKTISQ

SEQ ID NO 13

T1RA Tetradon

15 FAVNYNTPVVRASAGGPMCFILGCLSLCSISVFFYFERPTEAFILRFMPFLLFYAVCLA
 CFAVRSFQIVIIFKIAAKFPRVHSWWMKYHGQWLVISMTFVLQAVVIVIGFSSNPPLPYX
 XFVSYDPKIIIGCDVNLNMASTSFFLLLLLCLLCFTFSYMGKDLPKNYNEAKAITFCLLL
 LILTWIIFATAFMLYHGKYIHTLNALAVLSSAYCFLLWYFLPKCYIIFQPHKNTQKYFQ
 LS

SEQ ID NO 14

T1RB Pez globo

KKQGPEVDIFIVSVTILCISVLGVAVGPPEPSQDLDFYMDSIVLECSNTLSPGSFIELCY
 VCVLSVLCFFFSYMGKDLPANYNKAKCVTFSLMVYMI SWISFFTVYLI SRGPFTVAAYVC
 ATLVSVLAFFGGYFLPKIYIIVLKPQMNTTAHFQNCIQMYTMSKQ

SEQ ID NO 15

T1RB Tetradon

APKSSQRXLRRTRLKLEWDHPMSVALLFFLVCCLLMTSSSAVILLNINTPVAKSAGGXT
 CXLKLAALTAAAMSSXCHFGQPSPLASKLKQPQFTFSFTVCLACNRCALATGHLHFXIRV
 ALPPAYNXWAKNHGPXATIFIASAAILCVLCLRVAVGPPQPSQBLBFXTNSIXLXXSNTL
 SPGSFVELCNVSLLSAVCFVFSXMGKBLPANYNEAKCVTFSLMVNXISWISFFTVY

Adicionalmente, el número de registro y las citas de referencias relativos a T1Rs de ratón y rata y variantes alélicas de los mismos en el dominio público se indican a continuación:

- 5 rT1R1 (Nº Registro AAD18069) (Hoon y cols., *Cell* 96 (4): 541-51 (1999));
 rT1R2 (Nº Registro AAD18070) (Hoon y cols., *Cell* 96(4): 541-59 (1999));
 mT1R1 (Nº Registro AAK39437); mT1R2 (Nº Registro AAK 39438);
 mT1R3 (Registro AAK 55537) (Max y cols., *Nat. Genet.* 28(1): 58-63 (2001));
 rT1R1 (Nº Registro AAK7092) (Li y cols., *Mamm. Genome* (12(1): 13-16 (2001));
- 10 mT1R1 (Nº Registro NP 114073); mT1R1 (Nº Registro AAK07091) (Li y cols., *Mamm. Genome* (12(1):13-16 (2001)); rT1R2 (Nº Registro AAD18070) (Hoon y cols., *Cell* 9664): 541-551 (1999)); mT1R2 (Nº Registro NP114079);
- 15 mT1R3 (Nº Registro AAK39436); mT1R3 (Nº Registro BAB47181); (Kitagawa y cols., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 283(1):236-42 (2001)); mT1R3 (Nº Registro NP114078); mT1R3 (Nº Registro AAK55536) (Max y cols., *Nat. Genet.* 28(1):58-63 (2001)); y mT1R3 (Nº Registro AAK01937).

Ejemplo 2

Alineación de secuencias de T1Rs de ser humano y rata

Se alinearon secuencias de T1R clonadas seleccionadas de las identificadas anteriormente frente a los correspondientes T1R de rata. Como se muestra en la Figura 1, T1R1 humano, T1R2 humano y T1R3 humano y T1R3 de rata se alinearon con los T1R previamente descritos (rT1R1 que tiene el nº de registro AAD18069 y rT1R2 que tiene el nº de registro AAD18070), el receptor de glutamato metabotrópico mGluR1 de rata (nº de registro P23385) y el receptor sensible al calcio humano (nº de registro P41180). Por claridad de comparación, extremos de C de los receptores mGluR1 y sensible al calcio se truncan. Los siete segmentos transmembranarios potenciales se encuadran en azul. Los residuos que entran en contacto con el carbutilato de la cadena lateral del glutamato en la estructura cristalina de mGluR1 se encuadran en rojo, y los residuos que entran en contacto con el resto de α -aminoácido del glutamato se encuadran en verde. Los residuos de cisteína del receptor mGluR1 y sensible al calcio implicados en la formación basada en disulfuro entre subunidades se rodean con un círculo morado. Estas cisteínas no se conservan en T1R1 y T1R2, sino que están localizadas en una región degradada del alineamiento que contiene un resto de cisteína de T1R3 potencialmente análogo, también rodeado con un círculo.

30 Ejemplo 3

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

Según se muestra en la Figura 2, hT1R2 y hT1R3 se expresan en tejido gustativo: la expresión de ambos genes se puede detectar mediante RT-PCR a partir de papilas circunvaladas humanas resecaadas.

Ejemplo 4

35 Métodos para la expresión heteróloga de T1Rs en células heterólogas

Un derivado de HEK-293 (Chandrashekar y cols., *Cell*, 100 (6):703-711 (2000)), que expresa establemente G α 15, se desarrolló y se mantuvo a 37°C en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco BRL) complementado

5 con FBS al 10%, aminoácidos no esenciales MEM (Gibco BRL) y 3 µg/ml de blasticidina. Para los experimentos de obtención de imágenes de calcio, las células se sembraron en primer lugar sobre placas de cultivo tisular de 24 pocillos (aproximadamente 0,1 millón de células por pocillo) y se transfectaron mediante lipofección con Mirus Transit-293 (PanVera). Para minimizar la desensibilización inducida por glutamato e inducida por glucosa, el DMEM complementado se reemplazó por DMEM con bajo contenido en glucosa/GlutaMAX (Gibco BRL) aproximadamente 24 horas después de la transfección. Veinticuatro horas después, las células se cargaron con el colorante de calcio Fluo-4 (Molecular Probes) 3 µM en tampón PBS de Dulbecco (DPBS, Gibco BRL) durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Después de la sustitución con 250 µl de DPBS se realizó la estimulación a temperatura ambiente mediante la adición de 200 µl de DPBS complementado con estímulos de sabor. La movilización del calcio se verificó con un microscopio Axiovert S100 TV (Zeiss) usando el programa informático Imaging Workbench 4.0 (Axon). Las respuestas de T1R1/T1R3 y T1R2/T1R3 fueron sorprendentemente transitorias – los incrementos de el calcio raramente persistían más de 15 segundos - y asíncronas. El número de células sensibles era así relativamente constante a lo largo del tiempo; por tanto, las respuestas celulares se cuantificaron mediante un recuento manual del número de células sensibles en un momento fijado, típicamente 30 segundos después de la adición del estímulo.

Ejemplo 5

T1R2/T1R3 humano funciona como un receptor gustativo del dulce

20 Células HEK que expresan establemente Gα15 se transfectaron transitoriamente con T1R2, T1R3 y T1R2/T1R3 humanos, y se ensayaron con respecto a los incrementos en el calcio intracelular en respuesta a concentraciones crecientes de sacarosa (Figura 3(a)). Además, las respuestas a la dosis de T1R2/T1R3 se determinaron para varios estímulos gustativos dulces (Figura 3(b)). El porcentaje máximo de células sensibles era diferente para diferentes edulcorantes, variando de 10-30%. Po claridad, las respuestas a las dosis se normalizaron hasta el porcentaje máximo de células sensibles. Los valores de la Figura 3 representan la media ± e.e. de cuatro respuestas independientes. Los círculos del eje x marcan umbrales de detección psicofísica determinados por la prueba gustativa. La gurmaína (dilución de 50 veces de un extracto acuoso de 10 g/l de *Gymnema sylvestre* filtrado) inhibía la respuesta de T1R2/T1R3 a sacarosa 250 mM, pero no la respuesta de receptor β2-adrenérgico endógeno a isoproterenol 20 µM (Figura 3(b)). La Figura 3(c) contiene la respuesta normalizada de líneas celulares que coexpresan T1R2/T1R3 a diferentes edulcorantes (sacarosa, aspartamo, D-triptófano y sacarina).

Ejemplo 6

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

Células HEK que expresan establemente Gα15 se transfectaron transitoriamente con hT1R2/hT1R3, rT1R2/rT1R3, hT1R2/rT1R3 y rT1R2/hT1R3. A continuación, estas células transfectadas se ensayaron con respecto al incremento del calcio intracelular en respuesta a sacarosa 350 mM, triptófano 25 mM, aspartamo 15 mM y 0, 05% de monelina. Los resultados con sacarosa y aspartamo están contenidos en la Figura 4, e indican que rT1R2/rT1R3 también funciona como receptor gustativo del dulce. Además, estos resultados sugieren que T1R2 puede controlar la especificidad para ligandos de T1R2/T1R3.

Ejemplo 7

Respuestas de T1R2/T1R3 usando un ensayo basado en fluorescencia automatizado

40 Células HEK que expresan establemente Gα15 se transfectaron transitoriamente con hT1R2 y hT1R3. Estas células se cargaron con el colorante de calcio Fluo-4, y sus respuestas a un edulcorante se midieron usando un lector de placas de fluorescencia. La Figura 5 contiene respuestas a ciclamato (12,5 mM) para células que expresan hT1R2/hT1R3 y para células que expresan sólo hT1R3 (J19-22). Los resultados de fluorescencia obtenidos indican que las respuestas a estos estímulos gustativos sólo se producían en las células que expresaban hT1R2/hT1R3. La Figura 6 contiene curvas de respuesta a la dosis normalizadas, cuyos resultados muestran que hT1R2 y hT1R3 funcionan conjuntamente como un receptor gustativo humano basándose en su interacción específica para la dosis con diversos estímulos dulces. Particularmente, la figura 6 contiene respuestas a las dosis para sacarosa, triptófano y otros varios edulcorantes disponibles comercialmente. Estos resultados indican que T1R2/T1R3 es un receptor gustativo del dulce humano, puesto que el orden de rango y los valores liminares obtenidos en el ensayo se parecen mucho a los valores para el sabor dulce humano.

50 Ejemplo 8

Los residuos que se unen a ligandos de mGluR1 se conservan en T1R1

Según se muestra en la Figura 6, los residuos que se unen a ligando clave de mGluR1 se conservan en T1R1. La interacción de glutamato con mGluR1 se muestra con varios residuos clave destacados según el mismo esquema cromático que en la Figura 1.

Ejemplo 9

5 T1R1/T1R3 humano funciona como receptores gustativos del umami

Células HEK que expresan establemente $G\alpha_{15}$ se transfectaron transitoriamente con T1R1, T1R3 y T1R1/T1R3 humanos, y se ensayaron con respecto a incrementos en el calcio intracelular en respuesta a concentraciones crecientes de glutamato (Figura 8 (a)) y glutamato 0,5 mM, IMP 0,2 mM y glutamato 0,5 mM más IMP 0,2 mM (Figura 8 (b)). Se determinaron las respuestas a las dosis de T1R1/T1R3 humano para glutamato en presencia y ausencia de IMP 0,2 mM (Figura 8 (c)). Los porcentajes máximos de células sensibles eran aproximadamente 5% para el glutamato y aproximadamente 10% para el glutamato más IMP. Por claridad, las respuestas a las dosis se normalizan al porcentaje máximo de células sensibles. Los valores representan la media \pm e.e. de cuatro respuestas independientes. Los círculos en el eje X marcan los umbrales de detección del sabor determinados mediante la prueba gustativa.

15 Ejemplo 10

PDZIP como una secuencia de exportación

La secuencia PDZIP de seis residuos (SVSTW (SEQ ID NO: 1)) se fusionó al extremo C de hT1R2 y el receptor quimérico (es decir hT1R2-PDZIP) se transfectó en una célula hospedadora HEK-293. A continuación, la expresión superficial de hT1R2 se verificó usando datos de inmunofluorescencia y barrido FACS. Según se muestra en las Figuras 9A y 9B, la inclusión de la secuencia PDZIP incrementaba la expresión superficial de hT1R2-PDZIP con relación a hT1R2. Más específicamente, la Figura 9A muestra una tinción de inmunofluorescencia de hT1R2 etiquetado con myc que demuestra que PDZIP incrementa significativamente la cantidad de proteína de hT1R2 sobre la membrana plasmática. La Figura 9B muestra datos de análisis de FACS que demuestran el mismo resultado - Las células que expresan hT1R2 etiquetado con myc se indican mediante la línea de puntos y las células que expresan hT1R2-PDZIP etiquetado con myc se indican mediante la línea sólida. Particularmente, la Figura 10A muestra células hospedadoras estables a $G\alpha_{15}$ no transfectadas en tampón de HBS, la Figura 10B muestra células hospedadoras estables a $G\alpha_{15}$ transfectadas con hT1R2-PDZIP en el grupo de edulcorantes n° (sacarina, ciclamato sódico, acesulfamo K y aspartamo - 20 mM cada uno en tampón de HBS), la Figura 10C muestra células hospedadoras estables a $G\alpha_{15}$ transfectadas con T1R3-PDZIP en el grupo de edulcorantes n° 5, y la Figura 10D muestra células hospedadoras estables a $G\alpha_{15}$ cotransfectadas con hT1R2-PDZIP/hT1R3-PDZIP en el grupo de edulcorantes n° 5. Además, las Figuras 10E-10H muestran una respuesta dependiente de la dosis de células hospedadoras estables a $G\alpha_{15}$ cotransfectadas con hT1R2/hT1R3 a sacarosa E: 0 mM en tampón de HBS; F: 30 mM; G: 60 mM; y H: 250 mM. Las Figuras 10I-10L muestran las respuestas de células hospedadoras estables a $G\alpha_{15}$ cotransfectadas con hT1R2/hT1R3 a edulcorantes individuales - I: aspartamo (1,5 mM); J: acesulfamo K (1 mM); K: neotamo (20 mM); L: ciclamato sódico (20 mM). Según se demuestra por las imágenes de calcio de la Figura 10, hT1R2 y hT1R3 se requieren ambos para la actividades intensificadas por los estímulos dulces.

Ejemplo 11

Generación de líneas celulares que coexpresan establemente T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3

Se generaron líneas celulares humanas que coexpresan establemente T1R2/T1R3 humano o T1R1/T1R3 humano al transfectar vectores derivados de PEAK10 linealizados (Edge Biosystems) y vectores derivados de pCDNA 3.1/ZEO (Invitrogen) que contienen respectivamente una construcción de expresión de hT1R1 o hT1R2 (plásmido SAV2485 para T1R1, SAV2486 para T1R2) y hT1R3 (plásmido SXV550 para T1R3) en una línea celular que expresa $G\alpha_{15}$. Específicamente, se produjeron líneas celulares estables a T1R2/T1R3 al cotransfectar SAV2486 y SXV550 linealizados en la línea celular HEK-293 de Aurora Bioscience que expresa establemente $G\alpha_{15}$. Se produjeron líneas celulares estables a T1R1/T1R3 al cotransfectar SAV2485 y SXV550 linealizados en la misma célula HEK-293 que expresa establemente $G\alpha_{15}$. Después de las transfecciones de SAV2485/SXV550 y SAV2486/SXV550, colonias resistentes a puromicina y resistentes a zeocina se seleccionaron, se expandieron y se probaron mediante obtención de imágenes de calcio con respecto a respuestas a estímulos gustativos dulces o umami. Se seleccionaron células en 0,0005 mg/ml de puromicina (CALBIOCHEM) y 0,1 mg/ml de zeocina (Invitrogen) a 37°C en DMEM de bajo contenido de glucosa complementado con GlutaMAX, 10% de FBS dializada y 0,003 mg/ml de blastidina. Las colonias resistentes se expandieron y sus respuestas a estímulos gustativos dulces se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia. Para la obtención de imágenes fluorimétrica automatizada con instrumentación VIPR-II (Aurora Biosciences), células estables a T1R2/T1R3 se sembraron en primer lugar sobre placas de 96 pocillos (aproximadamente 100.000 células por pocillo). Veinticuatro horas más tarde, las células se cargaron con el

colorante de calcio fluo-3-AM (Molecular Probes), 0,005 mM en PBS, durante una hora a temperatura ambiente. Después de la sustitución con 70 μ l de PBS, la estimulación se realizó a temperatura ambiente mediante la adición de 70 μ l de PBS complementada con estímulos gustativos. Las respuestas de fluorescencia (480 nm de excitación y 535 nm de emisión) desde 20 hasta 30 segundos después de la adición de compuesto se promediaron, se corrigieron para la fluorescencia de fondo medida antes de la adición del compuesto y se normalizaron a la respuesta a ionomicina (CALBIOCHEM) 0,001 mM, un ionóforo de calcio.

Se observó que cuando estas células se exponían a estímulos dulces o umami, para clones activos típicamente 80-100% de las células respondían a estímulos gustativos. Inesperadamente, la magnitud de las respuestas celulares individuales era notablemente mayor que las de células transfectadas transitoriamente.

Basándose en esta observación, los inventores probaron la actividad de líneas celulares estables a T1R mediante obtención de imágenes de fluorescencia automatizada usando instrumentación VIPR de Aurora Bioscience según se describe anteriormente. Las respuestas de dos líneas celulares T1R1/T1R3 y una T1R2/T1R3 se muestran en la Figura 11 y la Figura 12, respectivamente.

Notablemente, la combinación de números incrementados de células sensibles y las magnitudes de respuesta incrementadas daban como resultado un incremento de más de 10 veces en la actividad con relación a células transfectadas transitoriamente. (A modo de comparación, el porcentaje de respuesta a ionomicina para células transfectadas transitoriamente con T1R2/T1R3 era aproximadamente 5% bajo condiciones óptimas.) Por otra parte, las respuestas a la dosis obtenidas para T1R2/T1R3 y T1R1/T1R3 humanos expresados establemente se correlacionaron con umbrales de detección gustativos humanos. La robusta actividad de T1R de estas líneas celulares estables sugiere que son muy adecuadas para el uso en el cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas a fin de identificar compuestos, p. ej. moléculas pequeñas, que modulan el receptor gustativo dulce o umami y que por lo tanto modulan, potencian, bloquean o imitan el sabor dulce o umami.

Ejemplo 12

Generación de líneas celulares que coexpresan induciblemente T1R1/T1R3 que responden selectivamente a estímulos gustativos umami

Líneas celulares HEK 293 T1R1/T1R3 que expresaban establemente el receptor gustativo umami presentan una actividad mejorada robusta con relación a células transfectadas transitoriamente. Sin embargo, una desventaja es que pueden perder rápidamente la actividad durante la propagación celular.

Además, estos hallazgos apoyan la hipótesis de los inventores de que (i) T1R1/T1R3 es un receptor gustativo umami, y (ii) que las líneas celulares que expresan robustamente T1R1/T1R3, preferiblemente líneas celulares T1R1/T1R3 estables y/o inducibles, se pueden usar en ensayos, preferiblemente para el cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas para identificar nuevos moduladores del sabor umami. Se pueden usar moduladores que potencian el sabor umami.

Para vencer la inestabilidad de las líneas celulares estables a T1R1/T1R3, las células HEK-G_{α15} se han manipulado para expresar induciblemente T1R1/T1R3 usando el sistema GeneSwitch (Invitrogen). Vectores de expresión resistentes a zeocina derivados de pGene para T1R1 y T1R3 humanos (plásmido SXV603 para T1R1 y SXV611 para T1R3) y un vector derivado de pSwitch resistente a puromicina que soporta la proteína GeneSwitch (plásmido SXV628) se linealizaron y se cotransfectaron en la línea celular HEK-G_{α15}. Colonias resistentes a zeocina y resistentes a puromicina se seleccionaron, se expandieron, se indujeron con cantidades variables de mifepristona, y se probaron mediante obtención de imágenes de calcio con respecto a estímulos gustativos umami.

La expresión inducible de T1R1/T1R3 daba como resultado una actividad robusta. Por ejemplo, aproximadamente 80% de células inducidas pero sólo aproximadamente 10% de células transfectadas transitoriamente respondían a L-glutamato. Más específicamente, vectores de expresión resistentes a zeocina derivados de pGene que expresan T1R1 humano y T1R3 humano y un vector derivado de pSwitch resistente a puromicina que soporta la proteína GeneSwitch se linealizaron y se cotransfectaron en células G_{α15}. Se seleccionaron células en 0,5 μ g/ml de puromicina (CAL BIOCHEM) y 100 μ g/ml de zeocina (Invitrogen) a 37°C en medio de Eagle modificado de Dulbecco complementado con GlutaMAX, (10% de FBS dializada, y 3 μ g/ml de blasticidina). Las colonias resistentes se expandieron y sus respuestas a estímulos gustativos umami después de la inducción con mifepristona 10⁻¹⁰ M se determinaron mediante microscopía de fluorescencia siguiendo los métodos de Li y cols., PNAS 99(7): 4692-4696 (2002).

Para la obtención de imágenes fluorométrica automatizada con instrumentación FLIPR (Molecular Device), células procedentes de un clon (denominado clon I-17) se sembraron en placas de 96 pocillos (aproximadamente 80.000 células por pocillo) en presencia de mifepristona 10⁻¹⁰ M y se incubaron durante 48 horas. A continuación, las células se cargaron con el colorante de calcio fluo-4-AM (Molecular Probes), 3 μ M en PBS, durante 1,5 horas a temperatura ambiente.

Después de la sustitución con 50 μ l de PBS, se realizó estimulación a temperatura ambiente mediante la adición de 50 μ l de PBS complementada con diferentes estímulos. En contraste con sistemas de expresión de receptores umami T1R1/T1R3 transitorios previos que necesitaba cuantificar la actividad del receptor T1R1/T1R3 al contar individualmente células sensibles (Li y cols., PNAS 99(7): 4692-4696 (2002)) (debido a la baja actividad del receptor en las mismas), el sistema de expresión inducible en cuestión daba como resultado un clon I-17 que tenía una actividad sustancialmente incrementada que permitía que la actividad del receptor se cuantificara al determinar incrementos de fluorescencia máximos (480 nm de excitación y 535 nm emisión) sumados a los campos de células en forma de imagen. La fluorescencia máxima de cuatro determinaciones independientes se promediaron, se corrigieron con respecto a la fluorescencia de fondo medida antes de la adición del compuesto, y se normalizaron a la respuesta a ionomicina (CALBIOCHEM) 0,002 mM.

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

La selectividad del receptor gustativo T1R1/T1R3 umami también se evaluó al cribar con diferentes L-aminoácidos. Los resultados obtenidos indicaban que T1R1/T1R3 es activado selectivamente por los L-aminoácidos con sabor umami (L-glutamato y L-aspartato).

Los resultados de experimentos en los que resultaban las respuestas del clon I-17 probados en presencia de diferentes L-aminoácidos están contenidos en la Figura 14 y la Figura 15. La Figura 14 muestran los resultados de un experimento en el que la línea celular I-17 se ponía en contacto con diferentes L-aminoácidos a una concentración de 10 mM en presencia y ausencia de IMP 1 mM.

La Figura 15 contiene una curva de respuesta a la dosis para aminoácidos activos determinada en presencia de IMP 0,2 mM. Cada valor representa el promedio de cuatro determinaciones independientes.

Los resultados obtenidos en estos experimentos apoyan la especificidad y la selectividad del receptor gustativo umami a estímulos gustativos umami. Mientras los estímulos gustativos umami L-glutamato y L-aspartato activaban significativamente el receptor T1R1/T1R3 a diferentes concentraciones (véase la Figura 14 y 15), los otros L-aminoácidos que activaban el receptor T1R1/T1R3 humano solo activaban el receptor débilmente y a concentraciones muy superiores.

Por lo tanto, estos resultados apoyan la selectividad del receptor T1R1/T1R3 para estímulos gustativos umami y la idoneidad de este sistema de expresión estable inducible para el uso en ensayos de cribado de alto rendimiento usando instrumentación para obtención de imágenes fluorométrica automatizada para identificar compuestos que activan el receptor gustativo umami, por ejemplo L-glutamato o L-aspartato, o que potencian la actividad de L-glutamato para activar el receptor gustativo umami, por ejemplo 5-IMP o 5'-GMP, o bloquean la activación del receptor gustativo umami por estímulos gustativos umami tales como L-glutamato y L-aspartato.

Los compuestos identificados que usan estos ensayos tienen aplicación potencial como aromatizantes en alimentos y bebidas para imitar o bloquear estímulos gustativos umami.

Ejemplo 13

El lactisol inhibe las actividades receptoras de T1R2/T1R3 y T1R1/T1R3 humanos y el sabor dulce y umami

Se pensó que el lactisol, un ácido aralquilcarboxílico, era un inhibidor selectivo del sabor dulce (véanse, p. ej., la Patente de EE. UU. 4.567.053 de Lindley (1986); y Schiffman y cols. *Chem Senses* 24:439-447 (1999)). Se midieron las respuestas de células HEK-G α_{15} transfectadas transitoriamente con T1R2/T1R3 a sacarosa 150 mM en presencia de concentraciones variables de lactisol. El lactisol inhibe la actividad de T1R2/T1R3 humano con una IC₅₀ de 24 μ M.

El receptor gustativo del umami T1R1/T1R3 y el dulce T1R2/T1R3 pueden compartir una subunidad común. Por lo tanto, se ha establecido como teoría que el lactisol, que inhibe el receptor gustativo del dulce T1R2/T1R3, puede tener un efecto similar sobre el receptor gustativo del umami T1R1/T1R3. Los presentes inventores probaron el efecto del lactisol sobre la respuesta de T1R1/T1R3 humano a L-glutamato 10 mM. Como con el receptor del dulce T1R2/T1R3, el lactisol inhibía T1R1/T1R3 con una IC₅₀ de 165 μ M. La inhibición por lactisol refleja probablemente antagonismo en los receptores T1R en lugar de, por ejemplo, inhibición no específica de la señalización mediada por G α_{15} debido a que la respuesta de receptores de acetilcolina muscarínicos no era inhibida por lactisol.

5 Los presentes inventores evaluaron a continuación el efecto del lactisol sobre el sabor umami en seres humanos. Los umbrales del sabor en presencia de lactisol 1 y 2 mM se determinaron para los estímulos gustativos umami L-glutamato con o sin IMP 0,2 mM, los estímulos gustativos dulces sacarosa y D-triptófano y el estímulo gustativo salada cloruro sódico siguiendo los métodos de Schiffman y cols. (*Chem. Senses* 24: 439-447 (1989)). Concentraciones milimolares de lactisol incrementaban drásticamente los umbrales de detección para estímulos gustativos dulces y umami pero no salados. Estos resultados están contenidos en la Figura 16.

10 En conclusión, (i) estos hallazgos apoyan la hipótesis de los inventores de que T1R1/T1R3 es el único receptor gustativo umami y (ii) los receptores T1R1/T1R3 y T1R2/T1R3 pueden compartir un dominio de unión al lactisol estructuralmente relacionado.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Senomyx, Inc.

15 <120> RECEPTORES GUSTATIVOS HETEROOLIGÓMEROS T1R Y LÍNEAS CELULARES QUE EXPRESAN DICHOS RECEPTORES Y USO DE LOS MISMOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON SABOR

<130> 304940.EP2/JND/CJS

<160> 19

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 < 211> 5

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia PDZIP

25 <400> 1

ser val ser thr trp
1 5

<210> 2

< 211> 14

< 212> PRT

30 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de consenso

<220>

< 221> MOD_RES

< 222> (1)
< 223> Thr o Arg
<220>
< 221> MOD_RES
5 < 222> (3)
< 223> Phe o Leu
<220>
< 221> MOD_RES
< 222> (4)
10 < 223> Arg, Gln o Pro
<220>
< 221> MOD_RES
< 222> (6)
< 223> Arg o Thr
15 <220>
< 221> MOD_RES
< 222> (7)
< 223> Ser, Pro o Val
<220>
20 < 221> MOD_RES
< 222> (8)
< 223> Val, Glu, Arg, Lys o Thr
<220>
< 221> MOD_RES
25 < 222> (11)
< 223> Ala o Glu
<220>
< 221> MOD_RES

< 222> (12)
< 223> Trp o Leu
<220>
< 221> MOD_RES
5 < 222> (13)
< 223> Arg, His o Gly
<400> 2
Xaa Cys Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Phe Leu Xaa Xaa Xaa Glu
1 5 10
<210> 3
10 < 211> 15
< 212> PRT
< 213> Secuencia Artificial
<220>
< 223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de consenso
15 <220>
< 221> MOD_RES
< 222> (1)
< 223> Leu o Gln
<220>
20 < 221> MOD_RES
< 222> (3)
< 223> Glu, Gly o Thr
<220>
< 221> MOD_RES
25 < 222> (4)
< 223> Asn, Arg o Cys
<220>

< 221> MOD_RES
< 222> (7)
< 223> Arg o Glu
<220>
5 < 221> MOD_RES
< 222> (9)
< 223> Arg o Lys
<220>
< 221> MOD_RES
10 < 222> (10)
< 223> Cys, Gly o Phe
<220>
< 221> MOD_RES
< 222> (11)
15 < 223> Val, Leu o Ile
<220>
< 221> MOD_RES
< 222> (13)
< 223> Phe o Leu
20 <220>
< 221> MOD_RES
< 222> (14)
< 223> Ala o Ser
<220>
25 < 221> MOD_RES
< 222> (15)
< 223> Met o Leu
<400> 3

ES 2 587 610 T3

Xaa Pro Xaa Xaa Tyr Asn Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

<210> 4

< 211> 858

< 212> PRT

5 < 213> Rattus sp.

<400> 4

Met₁ Pro Gly Leu Ala₅ Ile Leu Gly Leu Ser₁₀ Leu Ala Ala Phe Leu₁₅ Glu
 Leu Gly Met Gly₂₀ Ser Ser Leu Cys Leu₂₅ Ser Gln Gln Phe Lys₃₀ Ala Gln
 Gly Asp Tyr₃₅ Ile Leu Gly Gly Leu₄₀ Phe Pro Leu Gly Thr₄₅ Thr Glu Glu
 Ala Thr₅₀ Leu Asn Gln Arg Thr₅₅ Gln Pro Asn Gly Ile₆₀ Leu Cys Thr Arg
 Phe Ser₆₅ Pro Leu Gly Leu₇₀ Phe Leu Ala Met Ala₇₅ Met Lys Met Ala Val₈₀
 Glu Glu Ile Asn₈₅ Asn Gly Ser Ala Leu Leu₉₀ Pro Gly Leu Arg Leu₉₅ Gly
 Tyr Asp Leu Phe₁₀₀ Asp Thr Cys Ser Glu₁₀₅ Pro Val Val Thr Met₁₁₀ Lys Pro
 Ser Leu Met₁₁₅ Phe Met Ala Lys Val₁₂₀ Gly Ser Gln Ser Ile₁₂₅ Ala Ala Tyr
 Cys Asn Tyr Thr Gln Tyr Gln₁₃₅ Pro Arg Val Leu Ala Val Ile Gly Pro
 His Ser Ser Glu Leu Ala₁₅₀ Leu Ile Thr Gly Lys₁₅₅ Phe Phe Ser Phe Phe₁₆₀
 Leu Met Pro Gln Val₁₆₅ Ser Tyr Ser Ala Ser₁₇₀ Met Asp Arg Leu Ser Asp₁₇₅
 Arg Glu Thr Phe₁₈₀ Pro Ser Phe Phe Arg Thr Val Pro Ser Asp Arg Val₁₉₀
 Gln Leu Gln Ala Val Val Thr Leu Leu Gln Asn Phe Ser₂₀₅ Trp Asn Trp
 Val Ala Ala Leu Gly Ser Asp₂₁₅ Asp Asp Tyr Gly Arg₂₂₀ Glu Gly Leu Ser
 Ile Phe Ser Gly Leu Ala₂₃₀ Asn Ser Arg Gly Ile₂₃₅ Cys Ile Ala His Glu₂₄₀
 Gly Leu Val Pro Gln₂₄₅ His Asp Thr Ser Gly₂₅₀ Gln Gln Leu Gly Lys Val₂₅₅

ES 2 587 610 T3

Val Asp Val Leu Arg Gln Val Asn Gln Ser Lys Val Gln 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 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

ES 2 587 610 T3

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> 5

<211> 841

<212> PRT

5

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Leu Leu Cys Thr Ala Arg Leu Val Gly Leu Gln Leu Leu Ile Ser
 1 5 10 15
 Cys Cys Trp Ala Phe Ala Cys His Ser Thr Glu Ser Ser Pro Asp Phe
 20 25 30
 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

ES 2 587 610 T3

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
 225 230 235 240
 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

ES 2 587 610 T3

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
 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
 500 510
 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
 645 650 655
 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
 690 695 700
 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
 740 745 750
 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> 6

ES 2 587 610 T3

< 211> 839

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 6

Met Gly Pro Arg Ala Lys Thr Ile Cys Ser Leu Phe Phe Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ala Glu Pro Ala Glu Asn Ser Asp Phe Tyr Leu Pro Gly Asp
 20 25 30
 Tyr Leu Leu Gly Gly Leu Phe Ser Leu His Ala Asn Met Lys Gly Ile
 35 40 45
 Val His Leu Asn Phe Leu Gln Val Pro Met Cys Lys Glu Tyr Glu Val
 50 55 60
 Lys Val Ile Gly Tyr Asn Leu Met Gln Ala Met Arg Phe Ala Val Glu
 65 70 75 80
 Glu Ile Asn Asn Asp Ser Ser Leu Leu Pro Gly Val Leu Leu Gly Tyr
 85 90 95
 Glu Ile Val Asp Val Cys Tyr Ile Ser Asn Asn Val Gln Pro Val Leu
 100 105 110
 Tyr Phe Leu Ala His Glu Asp Asn Leu Leu Pro Ile Gln Glu Asp Tyr
 115 120 125
 Ser Asn Tyr Ile Ser Arg Val Val Ala Val Ile Gly Pro Asp Asn Ser
 130 135 140
 Glu Ser Val Met Thr Val Ala Asn Phe Leu Ser Leu Phe Leu Leu Pro
 145 150 155 160
 Gln Ile Thr Tyr Ser Ala Ile Ser Asp Glu Leu Arg Asp Lys Val Arg
 165 170 175
 Phe Pro Ala Leu Leu Arg Thr Thr Pro Ser Ala Asp His His Val Glu
 180 185 190
 Ala Met Val Gln Leu Met Leu His Phe Arg Trp Asn Trp Ile Ile Val
 195 200 205
 Leu Val Ser Ser Asp Thr Tyr Gly Arg Asp Asn Gly Gln Leu Leu Gly
 210 215 220
 Glu Arg Val Ala Arg Arg Asp Ile Cys Ile Ala Phe Gln Glu Thr Leu
 225 230 235 240
 Pro Thr Leu Gln Pro Asn Gln Asn Met Thr Ser Glu Glu Arg Gln Arg
 245 250 255
 Leu Val Thr Ile Val Asp Lys Leu Gln Gln Ser Thr Ala Arg Val Val
 260 265 270
 Val Val Phe Ser Pro Asp Leu Thr Leu Tyr His Phe Phe Asn Glu Val
 275 280 285

ES 2 587 610 T3

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

ES 2 587 610 T3

645 650 655
 Cys Ala Phe Lys Met Ala Ser Arg Phe Pro Arg Ala Tyr Ser Tyr Trp
 660 665 670
 Val Arg Tyr Gln Gly Pro Tyr Val Ser Met Ala Phe Ile Thr Val Leu
 675 680 685
 Lys Met Val Ile Val Val Ile Gly Met Leu Ala Thr Gly Leu Ser Pro
 690 695 700
 Thr Thr Arg Thr Asp Pro Asp Asp Pro Lys Ile Thr Ile Val Ser Cys
 705 710 715 720
 Asn Pro Asn Tyr Arg Asn Ser Leu Leu Phe Asn Thr Ser Leu Asp Leu
 725 730 735
 Leu Leu Ser Val Val Gly Phe Ser Phe Ala Tyr Met Gly Lys Glu Leu
 740 745 750
 Pro Thr Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Phe Ile Thr Leu Ser Met Thr Phe
 755 760 765
 Tyr Phe Thr Ser Ser Val Ser Leu Cys Thr Phe Met Ser Ala Tyr Ser
 770 775 780
 Gly Val Leu Val Thr Ile Val Asp Leu Leu Val Thr Val Leu Asn Leu
 785 790 795 800
 Leu Ala Ile Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Pro Lys Cys Tyr Met Ile Leu
 805 810 815
 Phe Tyr Pro Glu Arg Asn Thr Pro Ala Tyr Phe Asn Ser Met Ile Gln
 820 825 830
 Gly Tyr Thr Met Arg Arg Asp
 835

<210> 7

< 211> 852

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 7

Met Leu Gly Pro Ala Val Leu Gly Leu Ser Leu Trp Ala Leu Leu His
 1 5 10 15
 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 80
 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

ES 2 587 610 T3

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 Gln Val Ser Tyr Gly Ala Ser Met Glu Leu Leu Ser Ala
 165 170 175
 Arg Glu Thr Phe Pro Ser Phe Phe Arg Thr Val Pro Ser Asp Arg Val
 180 185 190
 Gln Leu Thr Ala Ala Ala Glu Leu Leu Gln Glu Phe Gly Trp Asn Trp
 195 200 205
 Val Ala Ala Leu Gly Ser Asp Asp Glu Tyr Gly Arg Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ile Phe Ser Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Ile Cys Ile Ala His Glu
 225 230 235 240
 Gly Leu Val Pro Leu Pro Arg Ala Asp Asp Ser Arg Leu Gly Lys Val
 245 250 255
 Gln Asp Val Leu His Gln Val Asn Gln Ser Ser Val Gln Val Val Leu
 260 265 270
 Leu Phe Ala Ser Val His Ala Ala His Ala Leu Phe Asn Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Ser Ser Arg Leu Ser Pro Lys Val Trp Val Ala Ser Glu Ala Trp Leu
 290 295 300
 Thr Ser Asp Leu Val Met Gly Leu Pro Gly Met Ala Gln Met Gly Thr
 305 310 315
 Val Leu Gly Phe Leu Gln Arg Gly Ala Gln Leu His Glu Phe Pro Gln
 325 330 335
 Tyr Val Lys Thr His Leu Ala Leu Ala Thr Asp Pro Ala Phe Cys Ser
 340 345 350
 Ala Leu Gly Glu Arg Glu Gln Gly Leu Glu Glu Asp Val Val Gly Gln
 355 360 365
 Arg Cys Pro Gln Cys Asp Cys Ile Thr Leu Gln Asn Val Ser Ala Gly
 370 375 380
 Leu Asn His His Gln Thr Phe Ser Val Tyr Ala Ala Val Tyr Ser Val
 385 390 395 400
 Ala Gln Ala Leu His Asn Thr Leu Gln Cys Asn Ala Ser Gly Cys Pro
 405 410 415
 Ala Gln Asp Pro Val Lys Pro Trp Gln Leu Leu Glu Asn Met Tyr Asn
 420 425 430
 Leu Thr Phe His Val Gly Gly Leu Pro Leu Arg Phe Asp Ser Ser Gly
 435 440 445
 Asn Val Asp Met Glu Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Val Trp Gln Gly Ser
 450 455 460
 Val Pro Arg Leu His Asp Val Gly Arg Phe Asn Gly Ser Leu Arg Thr
 465 470 475 480
 Glu Arg Leu Lys Ile Arg Trp His Thr Ser Asp Asn Gln Lys Pro Val

ES 2 587 610 T3

				485						490						495	
Ser	Arg	Cys	Ser	Arg	Gln	Cys	Gln	Glu	Gly	Gln	Val	Arg	Arg	Val	Lys		
			500					505					510				
Gly	Phe	His	Ser	Cys	Cys	Tyr	Asp	Cys	Val	Asp	Cys	Glu	Ala	Gly	Ser		
		515					520					525					
Tyr	Arg	Gln	Asn	Pro	Asp	Asp	Ile	Ala	Cys	Thr	Phe	Cys	Gly	Gln	Asp		
	530					535					540						
Glu	Trp	Ser	Pro	Glu	Arg	Ser	Thr	Arg	Cys	Phe	Arg	Arg	Arg	Ser	Arg		
545					550					555					560		
Phe	Leu	Ala	Trp	Gly	Glu	Pro	Ala	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
				565					570						575		
Ser	Leu	Ala	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Phe	Val	His		
			580					585					590				
His	Arg	Asp	Ser	Pro	Leu	Val	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Ala	Cys		
		595					600					605					
Phe	Gly	Leu	Val	Cys	Leu	Gly	Leu	Val	Cys	Leu	Ser	Val	Leu	Leu	Phe		
	610					615					620						
Pro	Gly	Gln	Pro	Ser	Pro	Ala	Arg	Cys	Leu	Ala	Gln	Gln	Pro	Leu	Ser		
625					630					635					640		
His	Leu	Pro	Leu	Thr	Gly	Cys	Leu	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	Gln	Ala	Ala		
				645					650					655			
Glu	Ile	Phe	Val	Glu	Ser	Glu	Leu	Pro	Leu	Ser	Trp	Ala	Asp	Arg	Leu		
			660					665					670				
Ser	Gly	Cys	Leu	Arg	Gly	Pro	Trp	Ala	Trp	Leu	Val	Val	Leu	Leu	Ala		
		675					680					685					
Met	Leu	Val	Glu	Val	Ala	Leu	Cys	Thr	Trp	Tyr	Leu	Val	Ala	Phe	Pro		
	690					695					700						
Pro	Glu	Val	Val	Thr	Asp	Trp	His	Met	Leu	Pro	Thr	Glu	Ala	Leu	Val		
705					710					715					720		
His	Cys	Arg	Thr	Arg	Ser	Trp	Val	Ser	Phe	Gly	Leu	Ala	His	Ala	Thr		
				725					730					735			
Asn	Ala	Thr	Leu	Ala	Phe	Leu	Cys	Phe	Leu	Gly	Thr	Phe	Leu	Val	Arg		
			740					745					750				
Ser	Gln	Pro	Gly	Arg	Tyr	Asn	Arg	Ala	Arg	Gly	Leu	Thr	Phe	Ala	Met		
		755					760					765					
Leu	Ala	Tyr	Phe	Ile	Thr	Trp	Val	Ser	Phe	Val	Pro	Leu	Leu	Ala	Asn		
	770					775					780						
Val	Gln	Val	Val	Leu	Arg	Pro	Ala	Val	Gln	Met	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu		
785					790					795					800		
Cys	Val	Leu	Gly	Ile	Leu	Ala	Ala	Phe	His	Leu	Pro	Arg	Cys	Tyr	Leu		
				805					810					815			
Leu	Met	Arg	Gln	Pro	Gly	Leu	Asn	Thr	Pro	Glu	Phe	Phe	Leu	Gly	Gly		
			820					825					830				
Gly	Pro	Gly	Asp	Ala	Gln	Gly	Gln	Asn	Asp	Gly	Asn	Thr	Gly	Asn	Gln		
		835					840					845					

Gly Lys His Glu
850

<210> 8

<211> 2526

5

<212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 8

```

atgctgctct gcacggctcg cctggctcggc ctgcagcttc tcatttcctg ctgctggggc 60
ttgacctgcc atagcacgga gtcttctcct gacttcaccc tccccggaga ttacctctg 120
gcaggcctgt tccctctcca ttctggctgt ctgcaggtga ggcacagacc cgaggtgacc 180
ctgtgtgaca ggtctttag cttcaatgag catggctacc acctcttcca ggctatgceg 240
cttgggggtg aggagataaa caactccacg gccctgctgc ccaacatcac cctgggggtac 300
cagctgtatg atgtgtgttc tgactctgcc aatgtgtatg ccacgctgag agtgctctcc 360
ctgccagggc aacaccacat agagctcaa ggagacctc tccactatc ccctacggtg 420
ctggcagtga ttgggcctga cagcaccaac ctgctgcca ccacagccgc cctgctgagc 480
cctttcctgg tgcccatgat tagctatgag gccagcagcg agacgctcag cgtgaagcgg 540
cagtatccct ctttctgctg caccatcccc aatgacaagt accaggtgga gaccatgggt 600
ctgctgctgc agaagtctcg gtggacctgg atctctctgg ttggcagcag tgacgactat 660
gggcagctag ggggtgcaggc actggagaac caggccactg gtcaggggat ctgcattgct 720
ttcaaggaca tcatgccctt ctctgccag gtgggcgatg agaggatgca gtgcctcatg 780
cgccacctgg cccaggccgg ggccaccgtc ttgggtgttt tttccagccg gcagtgtggc 840
aggggtgttt tcgagctcgt gggtctgacc aaactgactg gcaaggtgtg ggtctgctca 900
gaagcctggg ccctctccag gcacatcact ggggtgcccc ggatccagcg cattgggatg 960
gtgctggggc tggccatcca gaagagggtg gtccctggcc tgaaggcgtt tgaagaagc 1020
tatgcccggg cagacaagaa ggcccttagg ccttgccaca agggctcctg gtgcagcagc 1080
aatcagctct gcagagaatg ccaagctttc atggcacaca cgatgcccaa gctcaaagcc 1140
ttctccatga gttctgccta caacgcatac cgggctgtgt atgcggtggc ccatggcctc 1200
caccagctcc tgggctgtgc ctctggagct tttccaggg gccgagtcta cccctggcag 1260
cttttggagc agatccacaa ggtgcatttc ctctacaca aggacctgt ggcgtttaat 1320
gacaacagag atccccctag tagctataac ataattgcct gggactggaa tggacccaag 1380
tggaccttca cggctctcgg ttctccaca ttggtctccag ttcagctaaa cataaatgag 1440
accaaaatcc agtggcacgg aaaggacaac caggtgccta agtctgtgtg ttccagcgac 1500
tgtcttgaag ggcaccagcg agtggttacg ggtttccatc actgctgctt tgagtgtgtg 1560
ccctgtgggg ctgggacctt cctcaacaag agtgacctct acagatgcca gccttgtggg 1620
aaagaagagt gggcacctga gggaaagccag acctgcttcc cgcgcaactg ggtgtttttg 1680
gctttgctgt agcacacctc ttgggtgctg ctggcagcta acacgctgct gctgctgctg 1740
ctgcttggga ctgctggcct gtttgctgg caactagaca cccctgtggt gaggtcagca 1800
gggggcccgc tgtgctttct tatgtgggc tccctggcag caggtagtgg cagcctctat 1860
ggcttctttg gggaaaccac aaggcctgag tgcttgctac gccaggccct ctttgcctt 1920
ggtttcacca tcttctgtc ctgcctgaca gttcgtctat tccaaactaat catcatctc 1980
aagttttcca ccaaggtacc tacattctac cacgcctggg tccaaaacca cgggtgctggc 2040
ctgtttgtga tgatcagctc agcggcccag ctgcttatct gtctaactg gctggtgggt 2100
tggaccccac tgctgctag ggaataccag cgcttcccc atctggtgat gcttgagtgc 2160
acagagacca actccctggg cttcactact gccttctct acaatggcct cctctccatc 2220
agtgcctttg cctgcagcta cctgggtaag gacttgccag agaactaaa cgaggccaaa 2280
tgtgtcacct ctgacctgct cttcaacttc gtgtctgga tcgcttctt caccacggcc 2340
agcgtctacg acggcaagta cctgcctgag gccaacatga tggctgggct gagcagcctg 2400
agcagcggtc tcggtgggta ttttctgctt aagtgtctag tgatcctctg ccgcccagac 2460
ctcaacagca cagagcactt ccaggcctcc attcaggact acacgaggcg ctgctggctcc 2520
acctga
    
```

<210> 9

5

< 211> 2559

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 9

```

atgctggggc ctgctgtcct gggcctcagc ctctgggctc tcttgcaccc tgggacgggg 60
gccccattgt gcctgtcaca gcaacttagg atgaaggggg actacgtgct gggggggctg 120
ttccccctgg gcgaggccga ggaggctggc ctccgcagcc ggacacggcc cagcagccct 180
gtgtgcacca ggttctcctc aaacggcctg ctctgggcac tggccatgaa aatggccctg 240
gaggagatca acaacaagtc ggatctgctg cccgggctgc gcctgggcta cgacctttt 300
gatacgtgct cggagcctgt ggtggcctag aagcccagcc tcatgttctt ggccaagca 360
ggcagcccg gacatgcggc ctactgcaac tacacgcagt accagccccg tgtgctggct 420
    
```

10

ES 2 587 610 T3

gtcatcgggc	cccactcgtc	agagctcgcc	atgggtaccg	gcaagtctct	cagcttcttc	480
ctcatgcccc	aggctagcta	cggtgctagc	atggagctgc	tgagcgcccg	ggagaccttc	540
ccctccttct	tccgcaccgt	gcccagcgac	cggtgtagc	tgacggccgc	cgcgagctg	600
ctgcaggagt	tcggctggaa	ctgggtggcc	gcccctggga	gcgacgacga	gtacggccgg	660
cagggcctga	gcatcttctc	ggccctggcc	gcggcacgcy	gcatctgcat	cgcgacagag	720
ggcctggtgc	cgctgccccg	tgccgatgac	tcgcggtggy	ggaagggtga	ggagctctct	780
caccaggtga	accagagcag	cgctgaggtg	gtgctgctgt	tcgctctcgt	gcagcgccgc	840
cacgccccct	tcaactacag	catcagcagc	aggctctcgc	ccaagggtgtg	ggtggccagc	900
gaggcctggc	tgacctctga	cctggctcatg	gggctgcccc	gcatggccca	gatgggacag	960
gtgcttggct	tcctccagag	gggtgccccg	ctgcacgagt	tccccagta	cgatgaagacg	1020
cacctggccc	tggccaccga	cccggccttc	tgctctgccc	tgggcgagag	ggagcaggggt	1080
ctggaggagg	acgtgggtgg	ccagcgctgc	ccgcagtgty	actgcatcac	gctgcagaac	1140
gtgagcgag	ggctaaatca	ccaccagacy	ttctctgtct	acgcagctgt	gtatagcgtg	1200
gcccaggccc	tgcaacaac	tcttcagtgc	aacgcctcag	gctgccccgc	gcaggacctc	1260
gtgaagccct	cgcagctcct	ggagaacatg	tacaacctga	ccttccacgt	ggcggggtg	1320
ccgctgcygt	tcgacagcag	cggaaacgtg	gacatggagt	acgacctgaa	gctgtgggtg	1380
tggcagggct	cagtccccag	gctccacgac	gtgggcaggt	tcaacggcag	cctcaggaca	1440
gagcgcctga	agatccgctg	gcacacgtct	gacaaccaga	agcccgtgtc	ccggtgctcg	1500
cgagctggcc	aggagggcca	gggtgcgccg	gtcaaggggt	tccactcctg	ctgctacgac	1560
tgtgtggact	gcgaggcggg	cagctaccgg	caaaaccag	acgacatcgc	ctgcaccttt	1620
tgtggccagg	atgagtggct	cccggagcga	agcacacgct	gcttccgcy	caggtctcgg	1680
ttcctggcat	gggcgagcc	ggctgtgctg	ctgctgctcc	tgctgctgag	cctggcgctg	1740
ggccttgtgc	tggctgcttt	ggggctgttc	gttcaccatc	gggacagccc	actggttcag	1800
gcctcggggg	ggcccctggc	ctgctttggc	ctgggtgtcc	tgggcctggt	ctgcctcagc	1860
gtcctcctgt	tccttggcca	gcccagccct	gcccgatgcy	tggccagca	gcccttgtcc	1920
cacctcccgc	tcacgggctg	cctgagcaca	ctcttctgcy	aggcggccga	gatcttctgt	1980
gagtcagaac	tgctctgag	ctgggcagac	cggtgagty	gctgcttgcg	ggggccctgg	2040
gcctggctgg	tgggtgctgt	ggccatgctg	gtggaggtcg	cactgtgcac	ctggtacctg	2100
gtggccttcc	cgccggaggt	ggtgacggac	tggcacatgc	tgcccacgga	ggcgctggty	2160
cactgcccga	cacgctcctg	ggtcagcttc	ggcctagcgc	acgccacca	tgccacgctg	2220
gcctttctct	gcttcttggg	cactttcctg	gtgcygagcc	agccgggctg	ctacaacctg	2280
gcccgtggcc	tcacctttgc	catgctggcc	tacttcatca	cctgggtctc	ctttgtgccc	2340
ctcctggcca	atgtgcaggt	ggtcctcagc	cccgcctgcy	agatgggcy	cctcctgctc	2400
tgtgtcctgg	gcatcctggc	tgcttccac	ctgcccaggt	gttacctgct	catgcygag	2460
ccagggctca	acacccccga	gttcttctg	ggagggggcc	ctggggatgc	ccaaggccag	2520
aatgacggga	acacagga	tcaggggaaa	catgagtga			2559

<210> 10

< 211> 2519

< 212> ADN

5

< 213> Homo sapiens

<400> 10

atggggcca	gggaaagac	catctgctcc	ctgttcttcc	tcctatgggt	cctggctgag	60
ccggctgaga	actcggactt	ctacctgcct	ggggattacc	tcctgggtgg	cctcttctcc	120
ctccatgcca	acatgaaggg	cattgttcac	cttaacttcc	tgaggtgcc	catgtgcaag	180
gagtatgaag	tgaaggtgat	aggctacaac	ctcatgcagg	ccatgcyctt	cgcyggtggag	240
gagatcaaca	atgacagcag	cctgctgcct	gggtgtgctg	tgggctatga	gatcgtggat	300
gtgtgtctaca	tctccaacaa	tgtccagccg	gtgctctact	tcctggcaca	cgaggacaac	360
ctccttccca	tccaagagga	ctacagtaac	tacatttccc	gtgtgggtgg	tgtcattggc	420
cctgacaact	ccgagtctgt	catgactgtg	gccaaacttc	tctccctatt	tctccttcca	480
cagatcacct	acagcgccat	cagcgatgag	ctgcgagaca	agggtgcgctt	cccggctttg	540
ctgcytacca	caccagcgc	cgaccaccac	gtcagggcca	tgggtcagct	gatgctgcac	600
ttccgctgga	actggatcat	tgtgtggtg	agcagcgaca	cctatggccg	cgacaatggc	660
agctgcttgg	cgagcgcgtg	gcccggcgcg	acatctgcat	cgcttccag	gagacgctgc	720
ccacactgca	gcccacccag	aacatgacgt	cagaggagcy	ccagcgcctg	gtgaccattg	780
tggacaagct	gcagcagagc	acagcgcgcg	tcgtggctgt	gttctcgcct	gacctgacct	840
tgtaccactt	cttcaatgag	gtgctgcgcc	agaacttca	gggcgcctgt	tggatcgctt	900
ccgagctcct	ggccatcgac	ccggtctcgc	acaacctcac	ggagctgggc	cacttggcca	960
ccttctctgg	catcaccatc	cagagcgtgc	ccatcccggg	cttcagtgag	ttccgcgagt	1020
ggggccca	ggctgggccc	ccacccctca	gcaggaccag	ccagagctat	acctgcaacc	1080
aggagtgcga	caactgcctg	aacgccactt	tgctcttcaa	caccattctc	aggctctctg	1140
gggagcgtgt	cgtctacagc	gtgtactctg	cggtctatgc	tgtggcccat	gccctgcaca	1200
gcctcctcgg	ctgtgacaaa	agcacctgca	ccaagagggt	ggtctacccc	tggcagctgc	1260
ttgaggagat	ctggaaggtc	aacttactc	tcctggacca	ccaaatcttc	ttcgacctgc	1320
aaggggacgt	ggctctgcac	ttggagattg	tcagtgga	atgggaccgg	agccagaatc	1380
ccttccagag	cgctgcctcc	tactaccccc	tgcagcgaca	gctgaagaac	atccaagaca	1440

ES 2 587 610 T3

tctcctggca caccgtcaac aacacgatcc ctatgtccat gtgtccaag aggtgccagt 1500
cagggcaaaa gaagaagcct gtgggcatcc acgtctgctg cticgagtgc atcgactgcc 1560
ttcccggcac cttcctcaac cacactgaag atgaatatga atgccaggcc tgcccgaata 1620
acgagtggtc ctaccagagt gagacctcct gcttcaagcg gcagctggtc ttcctggaat 1680
ggcatgaggc acccaccatc gctgtggccc tgctggccgc cctgggcttc ctacagaccc 1740
tggccatcct ggtgatattc tggaggcaact tcacagacacc catagttcgc tcggctgggg 1800
gccccatgtg cttcctgatg ctgacactgc tgctgggtggc atacatggtg gtcccgggtg 1860
acgtggggcc gcccaaggtc tccacctgcc tctgcccgca ggccctctt cccctctgct 1920
tcacaatttg catctcctgt atcgccgtgc gttctttcca gatcgtctgc gccttcaaga 1980
tggccagccg cttcccacgc gcctacagct actgggtccg ctaccagggg ccctacgtct 2040
ctatggcatt tatcacggta ctcaaatgg tcattgtggg aattggcatg ctggccacgg 2100
gcctcagtcc caccaccgt actgacccc atgaccccaa gatcacaatt gtctcctgta 2160
acccaacta ccgcaacagc ctgctgttca acaccagcct ggacctgctg ctctcagtgg 2220
tgggtttcag cttcgcctac atgggcaaag agctgcccac caactacaac gaggccaagt 2280
tcatcaccct cagcatgacc ttctatttca cctcatccgt ctccctctgc acctcatgt 2340
ctgcctacag cgggggtgctg gtcaccatcg tggacctctt ggtcactgtg ctcaacctc 2400
tggccatcag cctgggctac ttcggcccca agtgctacat gatcctctc taccgggagc 2460
gcaacacgcc gcctacttc aacagcatga tccagggcta caccatgagg agggactag 2519

<210> 11

< 211> 2577

< 212> ADN

5

< 213> Rattus sp.

<400> 11

atgccgggtt tggctatctt gggcctcagt ctggctgctt tcctggagct tgggatgggg 60
tcctctttgt gtctgtcaca gcaattcaag gcacaagggg actatatatt ggggtggacta 120
tttcccctgg gcacaactga ggaggccact ctcaaccaga gaacacagcc caacggcatc 180
ctatgtacca ggttctcgcc ccttggtttg ttccctggcca tggctatgaa gatggctgta 240
gaggagatca acaatggatc tgccttgctc cctgggctgc gactgggcta tgacctgtt 300
gacacatgct cagagccagt ggtcaccatg aagcccagcc tcatgttcat ggccaagggtg 360
ggaagtcaaa gcattgctgc ctactgcaac tacacacagt accaaccctg tgtgctggct 420
gtcattggtc cccactcacc agagcttgcc ctattacag gcaagttctt cagcttctc 480
ctcatgcccac aggtcagcta tagtgccagc atggatcggc taagtgaccg ggaacattt 540
ccatccttct tccgcacagt gccagtgac cgggtgcagc tgaggccgt tgtgacctg 600
ttgcagaatt tcagctggaa ctgggtggct gccttaggta gtgatgata ctatggctg 660
gaaggtctga gcacttttct tggctctggcc aactcacgag gtatctgcat tgcacacgag 720
ggcctggctg cacaacatga cactagtggc caacaattgg gcaaggtggg ggatgtgcta 780
cgccaagtga accaaagcaa agtacaggtg gtgggtgctgt ttgcatctgc ccgtgctgtc 840
tactcccttt tttagctacag catccttcat gacctctcac ccaaggtatg ggtggccagt 900
gagtcctggc tgacctctga cctggctcat acactccca atattgcccg tgtgggact 960
gttcttgggt tctgacagc cgggacctga ctgctgaaat ttcccatta tgtgagact 1020
cgccttgccc tagctgctga cccaacattc tgtgctccc tgaaagctga gttggactg 1080
gaggagcggc tgatggggcc acgctgttca caatgtgact acatcatgct acagaacctg 1140
tcacttgggc tgatgcagaa cctatcagct gggcagttgc accaccaaat atttgaacc 1200
tatgcagctg tttacagttg ggctcaggcc cttcacaca cctgacagt caatgtctca 1260
cattgccaca catcagagcc tgttcaacc tggcagctcc tggagaacat gtacaatatg 1320
agtttccgtg ctgcagactt gacactgcag tttgatgcca aagggaggtg agacatggaa 1380
tatgacctga agatgtgggt gtggcagagc cctacacctg tactacatac tgtaggcacc 1440
ttcaacggca cccttcagct gcagcactcg aaaaagtatt ggccaggcaa ccagggtgcca 1500
gtctcccagt gctcccggca gtgcaaatgt ggccagggtgc gcagagtaaa gggcttctat 1560
tcctgctgct atgactgtgt ggactgcaag gcaggagct accggaagca tccagatgac 1620
ttcacctgta ctccatgtgg caaggatcag tggctcccag aaaaaagcac aacctgctta 1680
cctcgcaggc ccaagtttct ggcttggggg gagccagctg tgctgtcact tctcctgctg 1740
ctttgctctg tgctgggctt gacactggct gccctggggc tctttgtcca ctactgggac 1800
agccctcttg ttcaggcctc aggtgggtca ctgttctgct ttggctgat ctgacctaggc 1860
ctcttctgcc tcagtgtcct tctgttccca ggacgaccac gctctgcccag ctgcccctg 1920
caacaaccaa tggctcacct cctctcaca ggctgcctga gcacactctt cctgcaagca 1980
gccgagatct ttgtggagtc tgaggtgcca ctgagttggg caaactggct ctgcagctac 2040
cttcggggcc cctgggcttg gctgggtgta ctgctggcca ctcttggtga ggctgacta 2100
tgtgcctggg acttgatggc tttccctcca gaggtgggtga cagattggca ggtgctgccc 2160
acggaggtag tggaaactg ccgcatgctg tcctgggtca gcctgggctt ggtgcacatc 2220
accaatgcag tgttagcttt cctctgcttt ctgggcaact tcctggtaca gagccagctt 2280
ggctgctata accgtgcccg tggcctcacc ttcgcatgc tagcttattt catcatctgg 2340
gtctcttttg tgcccctctt ggctaagtgt caggtggcct accagccagc tgtgcagatg 2400
ggtgctatct tattctgtgc cctgggcatc ctggccacct tccacctgcc caaatgctat 2460
gtacttctgt ggctgccaga gctcaacacc caggagtctt tcctgggaa gaggcccaag 2520

ES 2 587 610 T3

gaagcatcag atgggaatag tggtagtagt gaggcaactc ggggacacag tgaatga 2577

<210> 12

< 211> 137

5 < 212> PRT

< 213> Fugu rubripes

<400> 12

```

Pro Ser Pro Phe Arg Asp Ile Val Ser Tyr Pro Asp Lys Ile Ile Leu
 1          5          10
Gly Cys Phe Met Asn Leu Lys Thr Ser Ser Val Ser Phe Val Leu Leu
          20          25          30
Leu Leu Leu Cys Leu Leu Cys Phe Ile Phe Ser Tyr Met Gly Lys Asp
          35          40          45
Leu Pro Lys Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Ala Ile Thr Phe Cys Leu Leu
          50          55          60
Leu Leu Ile Leu Thr Trp Ile Ile Phe Thr Thr Ala Ser Leu Leu Tyr
          65          70          75          80
Gln Gly Lys Tyr Ile His Ser Leu Asn Ala Leu Ala Val Leu Ser Ser
          85          90          95
Ile Tyr Ser Phe Leu Leu Trp Tyr Phe Leu Pro Lys Cys Tyr Ile Ile
          100          105          110
Ile Phe Gln Pro Gln Lys Asn Thr Gln Lys Tyr Phe Gln Gly Leu Ile
          115          120          125
Gln Asp Tyr Thr Lys Thr Ile Ser Gln
          130          135

```

<210> 13

10 < 211> 242

< 212> PRT

< 213> Tetraodon cutcutia

<220>

< 221> MOD_RES

15 < 222> (120)..(121)

< 223> Cualquier aminoácido

<400> 13

ES 2 587 610 T3

Phe Ala Val Asn Tyr Asn Thr Pro Val Val Arg Ser Ala Gly Gly Pro
 1 5 10 15
 Met Cys Phe Leu Ile Leu Gly Cys Leu Ser Leu Cys Ser Ile Ser Val
 20 25 30
 Phe Phe Tyr Phe Glu Arg Pro Thr Glu Ala Phe Cys Ile Leu Arg Phe
 35 40 45
 Met Pro Phe Leu Leu Phe Tyr Ala Val Cys Leu Ala Cys Phe Ala Val
 50 55 60
 Arg Ser Phe Gln Ile Val Ile Ile Phe Lys Ile Ala Ala Lys Phe Pro
 65 70 75 80
 Arg Val His Ser Trp Trp Met Lys Tyr His Gly Gln Trp Leu Val Ile
 85 90 95
 Ser Met Thr Phe Val Leu Gln Ala Val Val Ile Val Ile Gly Phe Ser
 100 105 110

Ser Asn Pro Pro Leu Pro Tyr Xaa Xaa Phe Val Ser Tyr Pro Asp Lys
 115 120 125
 Ile Ile Leu Gly Cys Asp Val Asn Leu Asn Met Ala Ser Thr Ser Phe
 130 135 140
 Phe Leu Leu Leu Leu Leu Cys Ile Leu Cys Phe Thr Phe Ser Tyr Met
 145 150 155 160
 Gly Lys Asp Leu Pro Lys Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Ala Ile Thr Phe
 165 170 175
 Cys Leu Leu Leu Leu Ile Leu Thr Trp Ile Ile Phe Ala Thr Ala Phe
 180 185 190
 Met Leu Tyr His Gly Lys Tyr Ile His Thr Leu Asn Ala Leu Ala Val
 195 200 205
 Leu Ser Ser Ala Tyr Cys Phe Leu Leu Trp Tyr Phe Leu Pro Lys Cys
 210 215 220
 Tyr Ile Ile Ile Phe Gln Pro His Lys Asn Thr Gln Lys Tyr Phe Gln
 225 230 235 240
 Leu Ser

<210> 14

< 211> 165

5 < 212> PRT

< 213> Fugu rubripes

<400> 14

ES 2 587 610 T3

Lys₁ Lys Gln Gly Pro₅ Glu Val Asp Ile Phe₁₀ Ile Val Ser Val Thr₁₅ Ile
 Leu Cys Ile Ser₂₀ Val Leu Gly Val Ala₂₅ Val Gly Pro Pro Glu₃₀ Pro Ser
 Gln Asp Leu₃₅ Asp Phe Tyr Met Asp₄₀ Ser Ile Val Leu Glu₄₅ Cys Ser Asn
 Thr Leu₅₀ Ser Pro Gly Ser Phe₅₅ Ile Glu Leu Cys Tyr₆₀ Val Cys Val Leu
 Ser Val₆₅ Leu Cys Phe Phe₇₀ Phe Ser Tyr Met Gly₇₅ Lys Asp Leu Pro Ala₈₀
 Asn Tyr Asn Glu Ala₈₅ Lys Cys Val Thr Phe₉₀ Ser Leu Met Val Tyr₉₅ Met
 Ile Ser Trp Ile₁₀₀ Ser Phe Phe Thr Val₁₀₅ Tyr Leu Ile Ser Arg Gly Pro
 Phe Thr Val₁₁₅ Ala Ala Tyr Val Cys₁₂₀ Ala Thr Leu Val Ser Val Leu Ala
 Phe Phe₁₃₀ Gly Gly Tyr Phe Leu₁₃₅ Pro Lys Ile Tyr Ile₁₄₀ Ile Val Leu Lys
 Pro Gln Met Asn Thr₁₅₀ Thr Ala His Phe Gln₁₅₅ Cys Ile Gln Met Tyr₁₆₀
 Thr Met Ser Lys Gln₁₆₅

<210> 15

< 211> 236

< 212> PRT

5 < 213> Tetraodon cutcutia

<220>

< 221> MOD_RES

< 222> (8)

< 223> Cualquier aminoácido

10 <220>

< 221> MOD_RES

< 222> (15)

< 223> Cualquier aminoácido

<220>

15 < 221> MOD_RES

< 222> (59)

< 223> Cualquier aminoácido

<220>
< 221> MOD_RES
< 222> (62)
< 223> Cualquier aminoácido

5 <220>
< 221> MOD_RES
< 222> (76)
< 223> Cualquier aminoácido

10 <220>
< 221> MOD_RES
< 222> (117)
< 223> Cualquier aminoácido

15 <220>
< 221> MOD_RES
< 222> (128)
< 223> Cualquier aminoácido

20 <220>
< 221> MOD_RES
< 222> (136)
< 223> Cualquier aminoácido

25 <220>
< 221> MOD_RES
< 222> (168)
< 223> Cualquier aminoácido

<220>
< 221> MOD_RES
< 222> (173)
< 223> Cualquier aminoácido

<220>

< 221> MOD_RES

< 222> (175)..(176)

< 223> Cualquier aminoácido

5

<220>

< 221> MOD_RES

< 222> (203)

< 223> Cualquier aminoácido

<220>

10

< 221> MOD_RES

< 222> (226)

< 223> Cualquier aminoácido

<400> 15

ES 2 587 610 T3

Ala Pro Lys Ser Ser Gln Arg Xaa Leu Arg Arg Thr Arg Leu Xaa Leu
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp His Pro Met Ser Val Ala Leu Leu Phe Phe Leu Val Cys
 20 25 30
 Cys Leu Leu Met Thr Ser Ser Ser Ala Val Ile Leu Leu Leu Asn Ile
 35 40 45
 Asn Thr Pro Val Ala Lys Ser Ala Gly Gly Xaa Thr Cys Xaa Leu Lys
 50 55 60
 Leu Ala Ala Leu Thr Ala Ala Ala Met Ser Ser Xaa Cys His Phe Gly
 65 70 75 80
 Gln Pro Ser Pro Leu Ala Ser Lys Leu Lys Gln Pro Gln Phe Thr Phe
 85 90 95
 Ser Phe Thr Val Cys Leu Ala Cys Asn Arg Cys Ala Leu Ala Thr Gly
 100 105 110
 His Leu His Phe Xaa Ile Arg Val Ala Leu Pro Pro Ala Tyr Asn Xaa
 115 120 125
 Trp Ala Lys Asn His Gly Pro Xaa Ala Thr Ile Phe Ile Ala Ser Ala
 130 135 140
 Ala Ile Leu Cys Val Leu Cys Leu Arg Val Ala Val Gly Pro Pro Gln
 145 150 155 160
 Pro Ser Gln Asx Leu Asx Phe Xaa Thr Asn Ser Ile Xaa Leu Xaa Xaa
 165 170 175
 Ser Asn Thr Leu Ser Pro Gly Ser Phe Val Glu Leu Cys Asn Val Ser
 180 185 190
 Leu Leu Ser Ala Val Cys Phe Val Phe Ser Xaa Met Gly Lys Asx Leu
 195 200 205
 Pro Ala Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Cys Val Thr Phe Ser Leu Met Val
 210 215 220
 Asn Xaa Ile Ser Trp Ile Ser Phe Phe Thr Val Tyr
 225 230 235

<210> 16

< 211> 840

< 212> PRT

5 < 213> Rattus sp.

<400> 16

Met Leu Phe Trp Ala Ala His Leu Leu Leu Ser Leu Gln Leu Val Tyr
 1 5 10 15
 Cys Trp Ala Phe Ser Cys Gln Arg Thr Glu Ser Ser Pro Gly Phe Ser
 20 25 30
 Leu Pro Gly Asp Phe Leu Leu Ala Gly Leu Phe Ser Leu His Gly Asp
 35 40 45
 Cys Leu Gln Val Arg His Arg Pro Leu Val Thr Ser Cys Asp Arg Pro
 50 55 60
 Asp Ser Phe Asn Gly His Gly Tyr His Leu Phe Gln Ala Met Arg Phe

ES 2 587 610 T3

65					70					75				80	
Thr	Val	Glu	Glu	Ile	Asn	Asn	Ser	Ser	Ala	Leu	Leu	Pro	Asn	Ile	Thr
				85					90					95	
Leu	Gly	Tyr	Glu	Leu	Tyr	Asp	Val	Cys	Ser	Glu	Ser	Ala	Asn	Val	Tyr
			100					105					110		
Ala	Thr	Leu	Arg	Val	Leu	Ala	Leu	Gln	Gly	Pro	Arg	His	Ile	Glu	Ile
		115					120					125			
Gln	Lys	Asp	Leu	Arg	Asn	His	Ser	Ser	Lys	Val	Val	Ala	Phe	Ile	Gly
	130					135					140				
Pro	Asp	Asn	Thr	Asp	His	Ala	Val	Thr	Thr	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	Pro
145					150					155					160
Phe	Leu	Met	Pro	Leu	Val	Ser	Tyr	Glu	Ala	Ser	Ser	Val	Val	Leu	Ser
				165					170					175	
Ala	Lys	Arg	Lys	Phe	Pro	Ser	Phe	Leu	Arg	Thr	Val	Pro	Ser	Asp	Arg
			180					185					190		
His	Gln	Val	Glu	Val	Met	Val	Gln	Leu	Leu	Gln	Ser	Phe	Gly	Trp	Val
		195					200					205			
Trp	Ile	Ser	Leu	Ile	Gly	Ser	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Gly	Gln	Leu	Gly	Val
	210					215					220				
Gln	Ala	Leu	Glu	Glu	Leu	Ala	Val	Pro	Arg	Gly	Ile	Cys	Val	Ala	Phe
225					230					235					240
Lys	Asp	Ile	Val	Pro	Phe	Ser	Ala	Arg	Val	Gly	Asp	Pro	Arg	Met	Gln
				245					250					255	
Ser	Met	Met	Gln	His	Leu	Ala	Gln	Ala	Arg	Thr	Thr	Val	Val	Val	Val
			260					265					270		
Phe	Ser	Asn	Arg	His	Leu	Ala	Arg	Val	Phe	Phe	Arg	Ser	Val	Val	Leu
		275					280					285			
Ala	Asn	Leu	Thr	Gly	Lys	Val	Trp	Val	Ala	Ser	Glu	Asp	Trp	Ala	Ile
	290					295					300				
Ser	Thr	Tyr	Ile	Thr	Ser	Val	Thr	Gly	Ile	Gln	Gly	Ile	Gly	Thr	Val
305					310					315					320
Leu	Gly	Val	Ala	Val	Gln	Gln	Arg	Gln	Val	Pro	Gly	Leu	Lys	Glu	Phe
				325					330					335	
Glu	Glu	Ser	Tyr	Val	Arg	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Pro	Ser	Ala	Cys	Pro
			340					345					350		
Glu	Gly	Ser	Trp	Cys	Ser	Thr	Asn	Gln	Leu	Cys	Arg	Glu	Cys	His	Thr
		355					360					365			
Phe	Thr	Thr	Arg	Asn	Met	Pro	Thr	Leu	Gly	Ala	Phe	Ser	Met	Ser	Ala
	370					375					380				
Ala	Tyr	Arg	Val	Tyr	Glu	Ala	Val	Tyr	Ala	Val	Ala	His	Gly	Leu	His
385					390					395					400
Gln	Leu	Leu	Gly	Cys	Thr	Ser	Glu	Ile	Cys	Ser	Arg	Gly	Pro	Val	Tyr
				405					410					415	
Pro	Trp	Gln	Leu	Leu	Gln	Gln	Ile	Tyr	Lys	Val	Asn	Phe	Leu	Leu	His
			420					425					430		

ES 2 587 610 T3

Glu Asn Thr Val Ala Phe Asp Asp Asn Gly Asp Thr Leu Gly Tyr Tyr
 435 440 445
 Asp Ile Ile Ala Trp Asp Trp Asn Gly Pro Glu Trp Thr Phe Glu Ile
 450 455 460
 Ile Gly Ser Ala Ser Leu Ser Pro Val His Leu Asp Ile Asn Lys Thr
 465 470 475 480
 Lys Ile Gln Trp His Gly Lys Asn Asn Gln Val Pro Val Ser Val Cys
 485 490 495
 Thr Thr Asp Cys Leu Ala Gly His His Arg Val Val Val Gly Ser His
 500 505 510
 His Cys Cys Phe Glu Cys Val Pro Cys Glu Ala Gly Thr Phe Leu Asn
 515 520 525
 Met Ser Glu Leu His Ile Cys Gln Pro Cys Gly Thr Glu Glu Trp Ala
 530 535 540
 Pro Lys Glu Ser Thr Thr Cys Phe Pro Arg Thr Val Glu Phe Leu Ala
 545 550 555 560
 Trp His Glu Pro Ile Ser Leu Val Leu Ile Ala Ala Asn Thr Leu Leu
 565 570 575
 Leu Leu Leu Leu Val Gly Thr Ala Gly Leu Phe Ala Trp His Phe His
 580 585 590
 Thr Pro Val Val Arg Ser Ala Gly Gly Arg Leu Cys Phe Leu Met Leu
 595 600 605
 Gly Ser Leu Val Ala Gly Ser Cys Ser Phe Tyr Ser Phe Phe Gly Glu
 610 615 620
 Pro Thr Val Pro Ala Cys Leu Leu Arg Gln Pro Leu Phe Ser Leu Gly
 625 630 635 640
 Phe Ala Ile Phe Leu Ser Cys Leu Thr Ile Arg Ser Phe Gln Leu Val
 645 650 655
 Ile Ile Phe Lys Phe Ser Thr Lys Val Pro Thr Phe Tyr Arg Thr Trp
 660 665 670
 Ala Gln Asn His Gly Ala Gly Leu Phe Val Ile Val Ser Ser Thr Val
 675 680 685
 His Leu Leu Ile Cys Leu Thr Trp Leu Val Met Trp Thr Pro Arg Pro
 690 695 700
 Thr Arg Glu Tyr Gln Arg Phe Pro His Leu Val Ile Leu Glu Cys Thr
 705 710 715 720
 Glu Val Asn Ser Val Gly Phe Leu Leu Ala Phe Thr His Asn Ile Leu
 725 730 735
 Leu Ser Ile Ser Thr Phe Val Cys Ser Tyr Leu Gly Lys Glu Leu Pro
 740 745 750
 Glu Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Cys Val Thr Phe Ser Leu Leu Leu Asn
 755 760 765
 Phe Val Ser Trp Ile Ala Phe Phe Thr Met Ala Ser Ile Tyr Gln Gly
 770 775 780
 Ser Tyr Leu Pro Ala Val Asn Val Leu Ala Gly Leu Thr Thr Leu Ser
 785 790 795 800

 Gly Gly Phe Ser Gly Tyr Phe Leu Pro Lys Cys Tyr Val Ile Leu Cys
 805 810 815
 Arg Pro Glu Leu Asn Asn Thr Glu His Phe Gln Ala Ser Ile Gln Asp
 820 825 830
 Tyr Thr Arg Arg Cys Gly Thr Thr
 835 840

ES 2 587 610 T3

<210> 17

< 211> 843

< 212> PRT

< 213> Rattus sp.

5

<400> 17

Met Gly Pro Gln Ala Arg Thr Leu Cys Leu Leu Ser Leu Leu Leu His
 1 5 10 15
 Val Leu Pro Lys Pro Gly Lys Leu Val Glu Asn Ser Asp Phe His Leu
 20 25 30
 Ala Gly Asp Tyr Leu Leu Gly Gly Leu Phe Thr Leu His Ala Asn Val
 35 40 45
 Lys Ser Ile Ser His Leu Ser Tyr Leu Gln Val Pro Lys Cys Asn Glu
 50 55 60
 Phe Thr Met Lys Val Leu Gly Tyr Asn Leu Met Gln Ala Met Arg Phe
 65 70 75 80
 Ala Val Glu Glu Ile Asn Asn Cys Ser Ser Leu Leu Pro Gly Val Leu
 85 90 95
 Leu Gly Tyr Glu Met Val Asp Val Cys Tyr Leu Ser Asn Asn Ile His
 100 105 110
 Pro Gly Leu Tyr Phe Leu Ala Gln Asp Asp Asp Leu Leu Pro Ile Leu
 115 120 125
 Lys Asp Tyr Ser Gln Tyr Met Pro His Val Val Ala Val Ile Gly Pro
 130 135 140
 Asp Asn Ser Glu Ser Ala Ile Thr Val Ser Asn Ile Leu Ser His Phe
 145 150 155 160
 Leu Ile Pro Gln Ile Thr Tyr Ser Ala Ile Ser Asp Lys Leu Arg Asp
 165 170 175
 Lys Arg His Phe Pro Ser Met Leu Arg Thr Val Pro Ser Ala Thr His
 180 185 190
 His Ile Glu Ala Met Val Gln Leu Met Val His Phe Gln Trp Asn Trp
 195 200 205
 Ile Val Val Leu Val Ser Asp Asp Asp Tyr Gly Arg Glu Asn Ser His
 210 215 220
 Leu Leu Ser Gln Arg Leu Thr Lys Thr Ser Asp Ile Cys Ile Ala Phe
 225 230 235 240
 Gln Glu Val Leu Pro Ile Pro Glu Ser Ser Gln Val Met Arg Ser Glu
 245 250 255
 Glu Gln Arg Gln Leu Asp Asn Ile Leu Asp Lys Leu Arg Arg Thr Ser
 260 265 270

ES 2 587 610 T3

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

ES 2 587 610 T3

Phe Thr Val Cys Phe Ser Ile Cys Leu Ser Cys Ile Thr Val Arg Ser
 645 650 655
 Phe Gln Ile Val Cys Val Phe Lys Met Ala Arg Arg Leu Pro Ser Ala
 660 665 670
 Tyr Ser Phe Trp Met Arg Tyr His Gly Pro Tyr Val Phe Val Ala Phe
 675 680 685
 Ile Thr Ala Ile Lys Val Ala Leu Val Val Gly Asn Met Leu Ala Thr
 690 695 700
 Thr Ile Asn Pro Ile Gly Arg Thr Asp Pro Asp Asp Pro Asn Ile Met
 705 710 715 720
 Ile Leu Ser Cys His Pro Asn Tyr Arg Asn Gly Leu Leu Phe Asn Thr
 725 730 735
 Ser Met Asp Leu Leu Leu Ser Val Leu Gly Phe Ser Phe Ala Tyr Met
 740 745 750
 Gly Lys Glu Leu Pro Thr Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Phe Ile Thr Leu
 755 760 765
 Ser Met Thr Phe Ser Phe Thr Ser Ser Ile Ser Leu Cys Thr Phe Met
 770 775 780
 Ser Val His Asp Gly Val Leu Val Thr Ile Met Asp Leu Leu Val Thr
 785 790 795 800
 Val Leu Asn Phe Leu Ala Ile Gly Leu Gly Tyr Phe Gly Pro Lys Cys
 805 810 815
 Tyr Met Ile Leu Phe Tyr Pro Glu Arg Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Asn
 820 825 830
 Ser Met Ile Gln Gly Tyr Thr Met Arg Lys Ser
 835 840

<210> 18

< 211> 845

< 212> PRT

5

< 213> Rattus sp.

<400> 18

Met Val Arg Leu Leu Leu Ile Phe Phe Pro Met Ile Phe Leu Glu Met
 1 5 10 15
 Ser Ile Leu Pro Arg Met Pro Asp Arg Lys Val Leu Leu Ala Gly Ala
 20 25 30
 Ser Ser Gln Arg Ser Val Ala Arg Met Asp Gly Asp Val Ile Ile Gly
 35 40 45
 Ala Leu Phe Ser Val His His Gln Pro Pro Ala Glu Lys Val Pro Glu
 50 55 60
 Arg Lys Cys Gly Glu Ile Arg Glu Gln Tyr Gly Ile Gln Arg Val Glu
 65 70 75 80
 Ala Met Phe His Thr Leu Asp Lys Ile Asn Ala Asp Pro Val Leu Leu
 85 90 95
 Pro Asn Ile Thr Leu Gly Ser Glu Ile Arg Asp Ser Cys Trp His Ser
 100 105 110

ES 2 587 610 T3

Ser Val Ala Leu Glu Gln Ser Ile Glu Phe Ile Arg Asp Ser Leu Ile
 115 120 125
 Ser Ile Arg Asp Glu Lys Asp Gly Leu Asn Arg Cys Leu Pro Asp Gly
 130 135 140
 Gln Thr Leu Pro Pro Gly Arg Thr Lys Lys Pro Ile Ala Gly Val Ile
 145 150 155 160
 Gly Pro Gly Ser Ser Ser Val Ala Ile Gln Val Gln Asn Leu Leu Gln
 165 170 175
 Leu Phe Asp Ile Pro Gln Ile Ala Tyr Ser Ala Thr Ser Ile Asp Leu
 180 185 190
 Ser Asp Lys Thr Leu Tyr Lys Tyr Phe Leu Arg Val Val Pro Ser Asp
 195 200 205
 Thr Leu Gln Ala Arg Ala Met Leu Asp Ile Val Lys Arg Tyr Asn Trp
 210 215 220
 Thr Tyr Val Ser Ala Val His Thr Glu Gly Asn Tyr Gly Glu Ser Gly
 225 230 235 240
 Met Asp Ala Phe Lys Glu Leu Ala Ala Gln Glu Gly Leu Cys Ile Ala
 245 250 255
 His Ser Asp Lys Ile Tyr Ser Asn Ala Gly Glu Lys Ser Phe Asp Arg
 260 265 270
 Leu Leu Arg Lys Leu Arg Glu Arg Leu Pro Lys Ala Arg Val Val Val
 275 280 285
 Cys Phe Cys Glu Gly Met Thr Val Arg Gly Leu Leu Ser Ala Met Arg
 290 295 300
 Arg Leu Gly Val Val Gly Glu Phe Ser Leu Ile Gly Ser Asp Gly Trp
 305 310 315 320
 Ala Asp Arg Asp Glu Val Ile Glu Gly Tyr Glu Val Glu Ala Asn Gly
 325 330 335
 Gly Ile Thr Ile Lys Leu Gln Ser Pro Glu Val Arg Ser Phe Asp Asp
 340 345 350
 Tyr Phe Leu Lys Leu Arg Leu Asp Thr Asn Thr Arg Asn Pro Trp Phe
 355 360 365
 Pro Glu Phe Trp Gln His Arg Phe Gln Cys Arg Leu Pro Gly His Leu
 370 375 380
 Leu Glu Asn Pro Asn Phe Lys Lys Val Cys Thr Gly Asn Glu Ser Leu
 385 390 395 400
 Glu Glu Asn Tyr Val Gln Asp Ser Lys Met Gly Phe Val Ile Asn Ala
 405 410 415
 Ile Tyr Ala Met Ala His Gly Leu Gln Asn Met His His Ala Leu Cys
 420 425 430
 Pro Gly His Val Gly Leu Cys Asp Ala Met Lys Pro Ile Asp Gly Arg
 435 440 445
 Lys Leu Leu Asp Phe Leu Ile Lys Ser Ser Phe Val Gly Val Ser Gly
 450 455 460
 Glu Glu Val Trp Phe Asp Glu Lys Gly Asp Ala Pro Gly Arg Tyr Asp
 465 470 475 480

ES 2 587 610 T3

Ile Met Asn Leu Gln Tyr Thr Glu Ala Asn Arg Tyr Asp Tyr Val His
 485 490 495
 Val Gly Thr Trp His Glu Gly Val Leu Asn Ile Asp Asp Tyr Lys Ile
 500 505 510
 Gln Met Asn Lys Ser Gly Met Val Arg Ser Val Cys Ser Glu Pro Cys
 515 520 525
 Leu Lys Gly Gln Ile Lys Val Ile Arg Lys Gly Glu Val Ser Cys Cys
 530 535 540
 Trp Ile Cys Thr Ala Cys Lys Glu Asn Glu Phe Val Gln Asp Glu Phe
 545 550 555 560
 Thr Cys Arg Ala Cys Asp Leu Gly Trp Trp Pro Asn Ala Glu Leu Thr
 565 570 575
 Gly Cys Glu Pro Ile Pro Val Arg Tyr Leu Glu Trp Ser Asp Ile Glu
 580 585 590
 Ser Ile Ile Ala Ile Ala Phe Ser Cys Leu Gly Ile Leu Val Thr Leu
 595 600 605
 Phe Val Thr Leu Ile Phe Val Leu Tyr Arg Asp Thr Pro Val Val Lys
 610 615 620
 Ser Ser Ser Arg Glu Leu Cys Tyr Ile Ile Leu Ala Gly Ile Phe Leu
 625 630 635 640
 Gly Tyr Val Cys Pro Phe Thr Leu Ile Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ser
 645 650 655
 Cys Tyr Leu Gln Arg Leu Leu Val Gly Leu Ser Ser Ala Met Cys Tyr
 660 665 670
 Ser Ala Leu Val Thr Lys Thr Asn Arg Ile Ala Arg Ile Leu Ala Gly
 675 680 685
 Ser Lys Lys Lys Ile Cys Thr Arg Lys Pro Arg Phe Met Ser Ala Trp
 690 695 700
 Ala Gln Val Ile Ile Ala Ser Ile Leu Ile Ser Val Gln Leu Thr Leu
 705 710 715 720
 Val Val Thr Leu Ile Ile Met Glu Pro Pro Met Pro Ile Leu Ser Tyr
 725 730 735
 Pro Ser Ile Lys Glu Val Tyr Leu Ile Cys Asn Thr Ser Asn Leu Gly
 740 745 750
 Val Val Ala Pro Val Gly Tyr Asn Gly Leu Leu Ile Met Ser Cys Thr
 755 760 765
 Tyr Tyr Ala Phe Lys Thr Arg Asn Val Pro Ala Asn Phe Asn Glu Ala
 770 775 780
 Lys Tyr Ile Ala Phe Thr Met Tyr Thr Thr Cys Ile Ile Trp Leu Ala
 785 790 795 800
 Phe Val Pro Ile Tyr Phe Gly Ser Asn Tyr Lys Ile Ile Thr Thr Cys
 805 810 815
 Phe Ala Val Ser Leu Ser Val Thr Val Ala Leu Gly Cys Met Phe Thr
 820 825 830
 Pro Lys Met Tyr Ile Ile Ile Ala Lys Pro Glu Arg Asn

835

840

845

<210> 19

5

<211> 867

ES 2 587 610 T3

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 19

Met Ala Phe Tyr Ser Cys Cys Trp Val Leu Leu Ala Leu Thr Trp His
 1 5 10 15
 Thr Ser Ala Tyr Gly Pro Asp Gln Arg Ala Gln Lys Lys Gly Asp Ile
 20 25 30
 Ile Leu Gly Gly Leu Phe Pro Ile His Phe Gly Val Ala Ala Lys Asp
 35 40 45
 Gln Asp Leu Lys Ser Arg Pro Glu Ser Val Glu Cys Ile Arg Tyr Asn
 50 55 60
 Phe Arg Gly Phe Arg Trp Leu Gln Ala Met Ile Phe Ala Ile Glu Glu
 65 70 75 80
 Ile Asn Ser Ser Pro Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Leu Gly Tyr Arg
 85 90 95
 Ile Phe Asp Thr Cys Asn Thr Val Ser Lys Ala Leu Glu Ala Thr Leu
 100 105 110
 Ser Phe Val Ala Gln Asn Lys Ile Asp Ser Leu Asn Leu Asp Glu Phe
 115 120 125
 Cys Asn Cys Ser Glu His Ile Pro Ser Thr Ile Ala Val Val Gly Ala
 130 135 140
 Thr Gly Ser Gly Val Ser Thr Ala Val Ala Asn Leu Leu Gly Leu Phe
 145 150 155 160
 Tyr Ile Pro Gln Val Ser Tyr Ala Ser Ser Arg Leu Leu Ser Asn
 165 170 175
 Lys Asn Gln Phe Lys Ser Phe Leu Arg Thr Ile Pro Asn Asp Glu His
 180 185 190
 Gln Ala Thr Ala Met Ala Asp Ile Ile Glu Tyr Phe Arg Trp Asn Trp
 195 200 205
 Val Gly Thr Ile Ala Ala Asp Asp Asp Tyr Gly Arg Pro Gly Ile Glu
 210 215 220
 Lys Phe Arg Glu Glu Ala Glu Glu Arg Asp Ile Cys Ile Asp Phe Ser
 225 230 235 240
 Glu Leu Ile Ser Gln Tyr Ser Asp Glu Glu Glu Ile Gln His Val Val
 245 250 255
 Glu Val Ile Gln Asn Ser Thr Ala Lys Val Ile Val Val Phe Ser Ser
 260 265 270
 Gly Pro Asp Leu Glu Pro Leu Ile Lys Glu Ile Val Arg Arg Asn Ile
 275 280 285
 Thr Gly Lys Ile Trp Leu Ala Ser Glu Ala Trp Ala Ser Ser Ser Leu
 290 295 300
 Ile Ala Met Pro Gln Tyr Phe His Val Val Gly Gly Thr Ile Gly Phe
 305 310 315 320

ES 2 587 610 T3

Ala Leu Lys Ala Gly Gln Ile Pro Gly Phe Arg Glu Phe Leu Lys Lys
 325 330 335
 Val His Pro Arg Lys Ser Val His Asn Gly Phe Ala Lys Glu Phe Trp
 340 345 350
 Glu Glu Thr Phe Asn Cys His Leu Gln Glu Gly Ala Lys Gly Pro Leu
 355 360 365
 Pro Val Asp Thr Phe Leu Arg Gly His Glu Glu Ser Gly Asp Arg Phe
 370 375 380
 Ser Asn Ser Ser Thr Ala Phe Arg Pro Leu Cys Thr Gly Asp Glu Asn
 385 390 395 400
 Ile Ser Ser Val Glu Thr Pro Tyr Ile Asp Tyr Thr His Leu Arg Ile
 405 410 415
 Ser Tyr Asn Val Tyr Leu Ala Val Tyr Ser Ile Ala His Ala Leu Gln
 420 425 430
 Asp Ile Tyr Thr Cys Leu Pro Gly Arg Gly Leu Phe Thr Asn Gly Ser
 435 440 445
 Cys Ala Asp Ile Lys Lys Val Glu Ala Trp Gln Val Leu Lys His Leu
 450 455 460
 Arg His Leu Asn Phe Thr Asn Asn Met Gly Glu Gln Val Thr Phe Asp
 465 470 475 480
 Glu Cys Gly Asp Leu Val Gly Asn Tyr Ser Ile Ile Asn Trp His Leu
 485 490 495
 Ser Pro Glu Asp Gly Ser Ile Val Phe Lys Glu Val Gly Tyr Tyr Asn
 500 505 510
 Val Tyr Ala Lys Lys Gly Glu Arg Leu Phe Ile Asn Glu Glu Lys Ile
 515 520 525
 Leu Trp Ser Gly Phe Ser Arg Glu Val Pro Phe Ser Asn Cys Ser Arg
 530 535 540
 Asp Cys Leu Ala Gly Thr Arg Lys Gly Ile Ile Glu Gly Glu Pro Thr
 545 550 555 560
 Cys Cys Phe Glu Cys Val Glu Cys Pro Asp Gly Glu Tyr Ser Asp Glu
 565 570 575
 Thr Asp Ala Ser Ala Cys Asn Lys Cys Pro Asp Asp Phe Trp Ser Asn
 580 585 590
 Glu Asn His Thr Ser Cys Ile Ala Lys Glu Ile Glu Phe Leu Ser Trp
 595 600 605
 Thr Glu Pro Phe Gly Ile Ala Leu Thr Leu Phe Ala Val Leu Gly Ile
 610 615 620
 Phe Leu Thr Ala Phe Val Leu Gly Val Phe Ile Lys Phe Arg Asn Thr
 625 630 635 640
 Pro Ile Val Lys Ala Thr Asn Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Leu Leu Phe
 645 650 655
 Ser Leu Leu Cys Cys Phe Ser Ser Ser Leu Phe Phe Ile Gly Glu Pro
 660 665 670
 Gln Asp Trp Thr Cys Arg Leu Arg Gln Pro Ala Phe Gly Ile Ser Phe

ES 2 587 610 T3

675 680 685

Val Leu Cys Ile Ser Cys Ile Leu Val Lys Thr Asn Arg Val Leu Leu
690 695 700

Val Phe Glu Ala Lys Ile Pro Thr Ser Phe His Arg Lys Trp Trp Gly
705 710 715 720

Leu Asn Leu Gln Phe Leu Leu Val Phe Leu Cys Thr Phe Met Gln Ile
725 730 735

Val Ile Cys Val Ile Trp Leu Tyr Thr Ala Pro Pro Ser Ser Tyr Arg
740 745 750

Asn Gln Glu Leu Glu Asp Glu Ile Ile Phe Ile Thr Cys His Glu Gly
755 760 765

Ser Leu Met Ala Leu Gly Phe Leu Ile Gly Tyr Thr Cys Leu Leu Ala
770 775 780

Ala Ile Cys Phe Phe Phe Ala Phe Lys Ser Arg Lys Leu Pro Glu Asn
785 790 795 800

Phe Asn Glu Ala Lys Phe Ile Thr Phe Ser Met Leu Ile Phe Phe Ile
805 810 815

Val Trp Ile Ser Phe Ile Pro Ala Tyr Ala Ser Thr Tyr Gly Lys Phe
820 825 830

Val Ser Ala Val Glu Val Ile Ala Ile Leu Ala Ala Ser Phe Gly Leu
835 840 845

Leu Ala Cys Ile Phe Phe Asn Lys Ile Tyr Ile Ile Leu Phe Lys Pro
850 855 860

Ser Arg Asn
865

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para identificar una célula que es potencialmente sensible a estímulos gustativos dulces, comprendiendo el método:

5 (a) detectar la expresión de un polipéptido de T1R2 y/o un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido de T1R2 mediante dicha célula, en donde dicho polipéptido de T1R2

(i) es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 10 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10; o

(ii) posee al menos 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de T1R2 de SEQ ID NO: 6;

y

10 (b) detectar la expresión de un polipéptido de T1R3 y/o un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido de T1R3 mediante dicha célula, en donde dicho polipéptido de T1R3

(i) es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 9 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 9; o

(ii) posee al menos 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de T1R3 de SEQ ID NO: 7.

15 2. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa (a) comprende poner en contacto dicha célula con al menos una sonda que detecta la expresión de dicho polipéptido de T1R2 y/o dicho ácido nucleico que codifica dicho polipéptido de T1R2 mediante dicha célula, y en el que la etapa (b) comprende poner en contacto dicha célula con al menos una sonda que detecta la expresión de dicho polipéptido de T1R3 y/o dicho ácido nucleico que codifica dicho polipéptido de T1R3 mediante dicha célula.

20 3. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además una etapa (c) de confirmar que la célula que se identifica por la etapa (a) y la etapa (b) que expresa T1R2 y T1R3 es sensible a estímulos gustativos dulces.

25 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además usar la célula identificada en un ensayo de cribado de alto rendimiento que detecta compuestos que, específicamente, se unen, activan o modulan la activación de un receptor que comprende dichos polipéptidos de T1R2 y T1R3, o que modulan la unión o la activación de un receptor que comprende dichos polipéptidos de T1R2 y T1R3 mediante otro compuesto

30 5. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que dicha célula es una célula de mamífero.

6. El método según la reivindicación 5, en el que la célula es una célula de mono o de ser humano.

35 7. Un método in vitro para cribar con respecto a un compuesto que bloquee o active putativamente la señalización del sabor dulce, comprendiendo el método las etapas de:

(a) poner en contacto células con uno o más compuestos, en donde dichas células expresan un receptor gustativo T1R2/T1R3 heterooligómero; y

40 (b) detectar si dichos uno o más compuestos se unen específicamente a dicho receptor gustativo T1R2/T1R3 heterooligómero y/o activan específicamente dicho receptor gustativo T1R2/T1R3 heterooligómero y, basándose en ello, identificar dichos uno o más compuestos como compuestos que bloquean o activan putativamente la señalización del sabor dulce,

en donde dicho receptor gustativo T1R2/T1R3 heterooligómero expresado por dichas células comprende al menos un polipéptido de T1R2 que

45 (i) es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 10 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10; o

(ii) posee al menos 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de T1R2 de SEQ ID NO: 6;

y en donde dicho receptor gustativo T1R2/T1R3 heterooligómero expresado por dichas células comprende al menos un polipéptido de T1R3 que

(i) es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 9 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 9; o

5 (ii) posee al menos 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de T1R3 de SEQ ID NO: 7.

8. Un método in vitro para cribar con respecto a un compuesto que modula putativamente la señalización del sabor dulce, comprendiendo el método las etapas de:

(a) poner en contacto células con uno o más compuestos, en donde dichas células expresan un receptor gustativo T1R2/T1R3 heterooligómero; y

10 (b) detectar si dichos uno o más compuestos afectan a la unión de otro compuesto a dicho receptor gustativo T1R2/T1R3 heterooligómero y/o modulan la activación de dicho receptor gustativo T1R2/T1R3 heterooligómero mediante otro compuesto y, basándose en ello, identificar dichos uno o más compuestos como compuesto que modulan putativamente la señalización del sabor dulce,

15 en donde dicho receptor gustativo T1R2/T1R3 heterooligómero expresado por dichas células comprende al menos un polipéptido de T1R2 que

(i) es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 10 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10; o

(ii) posee al menos 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de T1R2 de SEQ ID NO: 6; y

20 en donde dicho receptor gustativo T1R2/T1R3 heterooligómero expresado por dichas células comprende al menos un polipéptido de T1R3 que

(i) es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 9 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 9; o

(ii) posee al menos 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de T1R3 de SEQ ID NO: 7.

25 9. El método según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que las células comprenden células de mamífero aisladas o cultivadas.

30 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que dicho receptor gustativo T1R2/T1R3 heterooligómero expresado por dichas células se une específicamente a un ligando que se une específicamente a un receptor T1R2/T1R3 heterooligómero humano endógeno (silvestre) comprendido por al menos un polipéptido de T1R2 endógeno y al menos un polipéptido de T1R3 endógeno, y en el que al menos uno de dicho polipéptido de T1R2 expresado o dicho polipéptido de T1R3 expresado se expresa a partir de un gen que es endógeno para dichas células.

35 11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que incluye además una prueba gustativa para determinar el efecto del compuesto identificado sobre el sabor dulce y, basándose en el resultado de la prueba gustativa, identificar el compuesto como un compuesto que bloquea, activa o modula la señalización del sabor dulce.

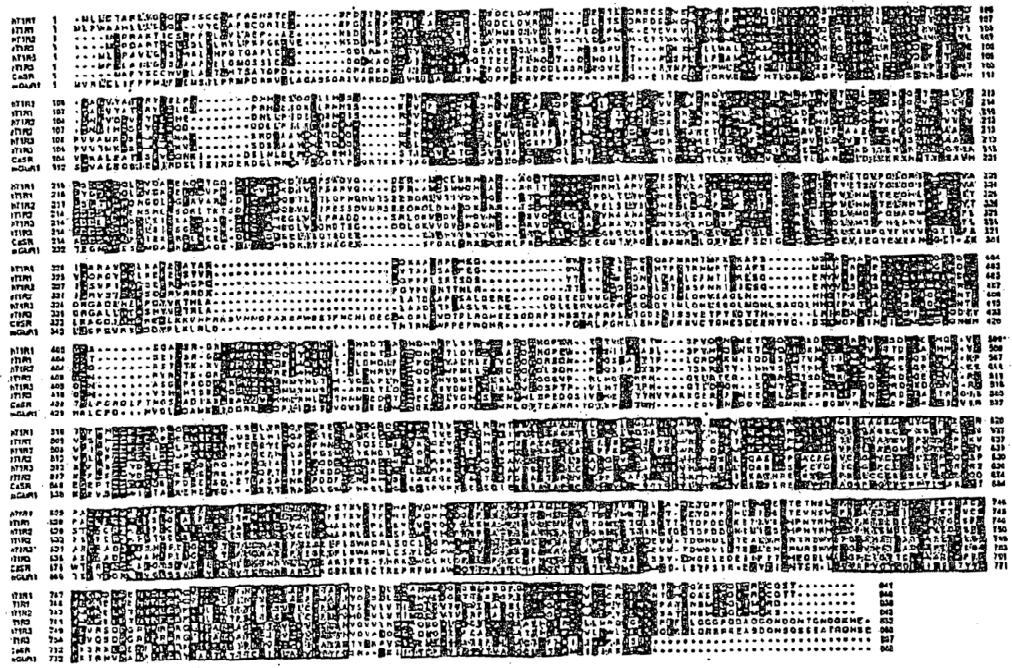
40 12. El método según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que dicho polipéptido de T1R2 expresado se expresa a partir de un gen que es endógeno para dichas células.

13. El método según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que dicho polipéptido de T1R3 expresado se expresa a partir de un gen que es endógeno para dichas células.

45 14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en el que dichas células son células de ser humano o mono.

15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, que comprende un método de cribado de alto rendimiento.

Figura 1: Catálogo de T1Rs de ser humano y rata



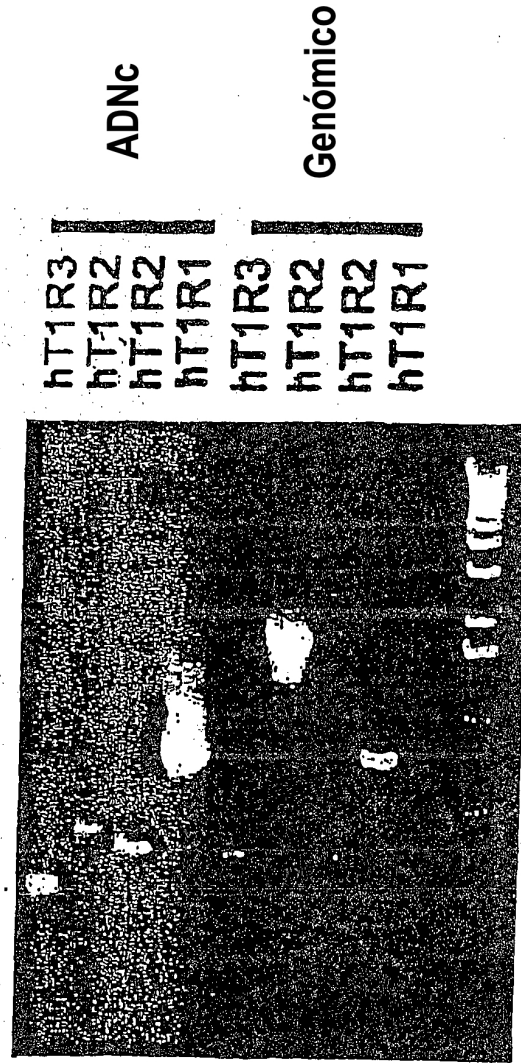


Figura 2 hT1R2 y hT1R3 se expresan en epitelio de lengua humana. Productos de amplificación específicos de ADNc de pueden amplificar de ADNc preparado a partir de papilas circunvaladas humanas resecadas.

Figura 3 T1R2/T1R3 humano funciona como un receptor gustativo para el dulce

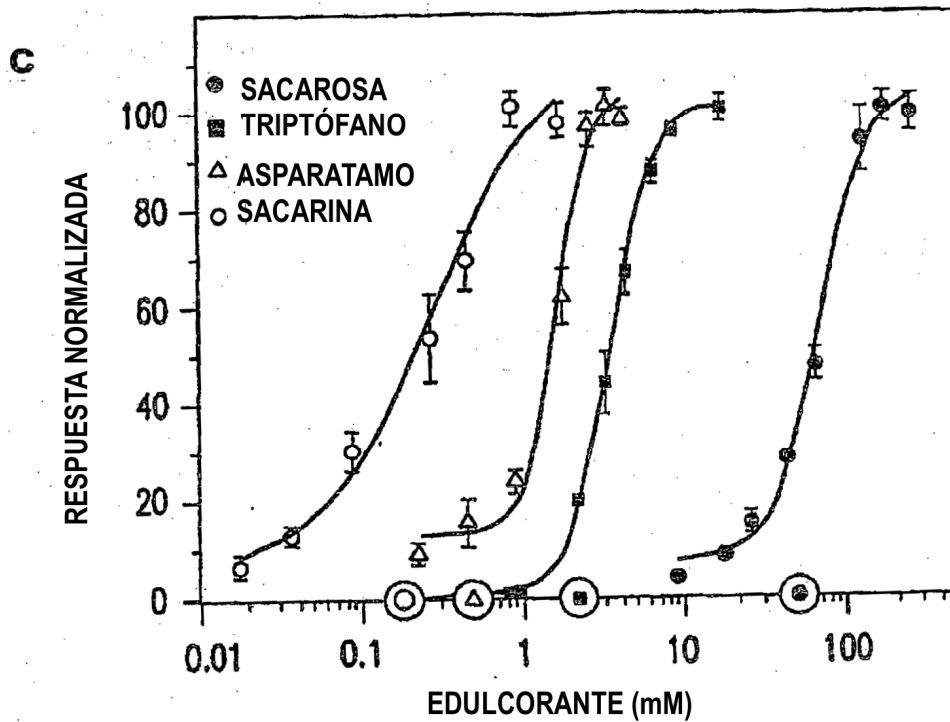
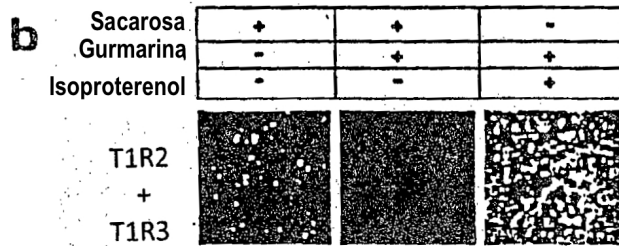
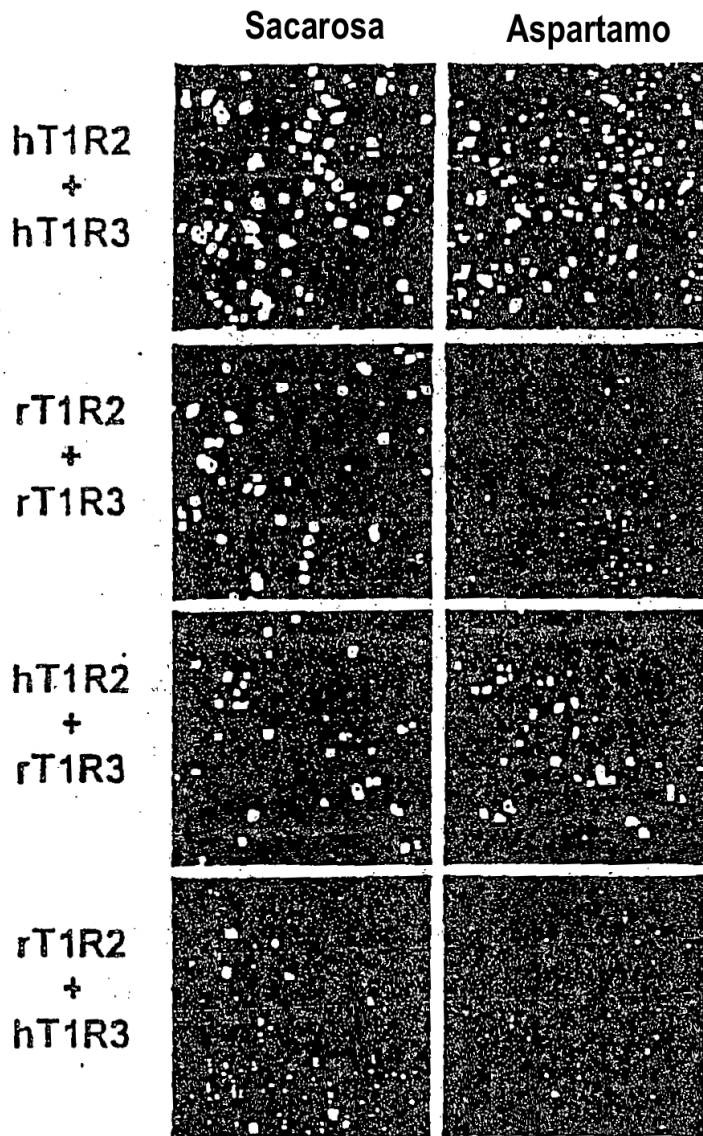


Figura 4 T1R2 puede controlar la especificidad para ligandos de T1R2/T1R3



J19-22 frente a K19-22

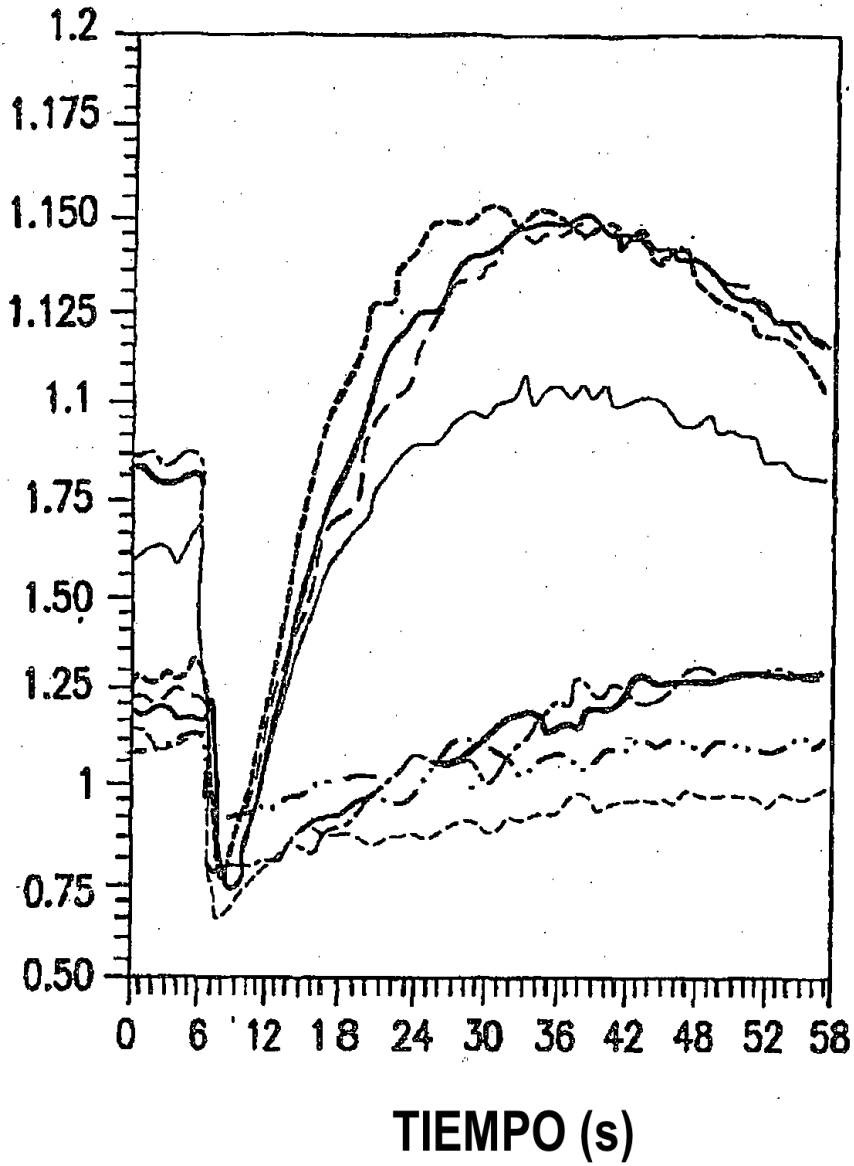


Figura 5

Curvas de Respuesta a la Dosis Normalizadas

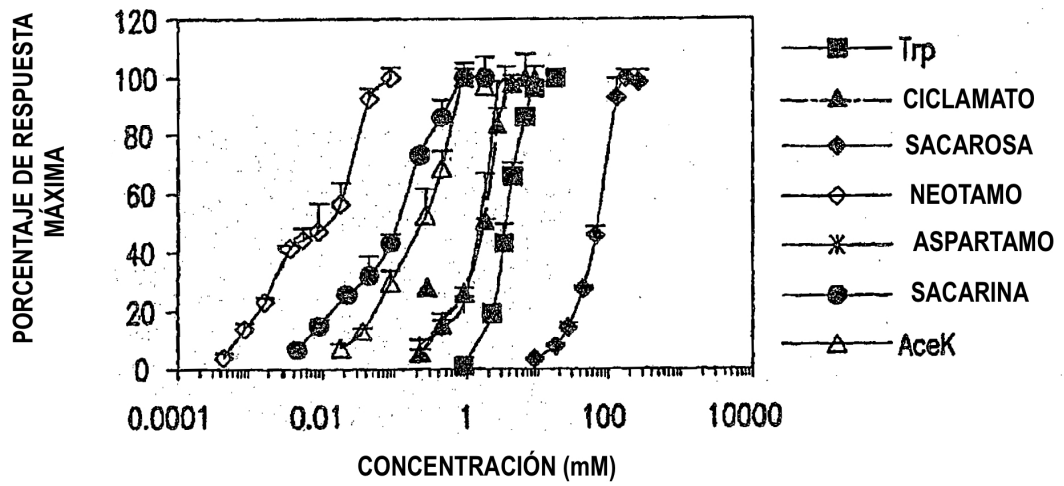


Figura 6

Figura 7 Los residuos de unión a ligando clave de mGluR1 se conservan en T1R1

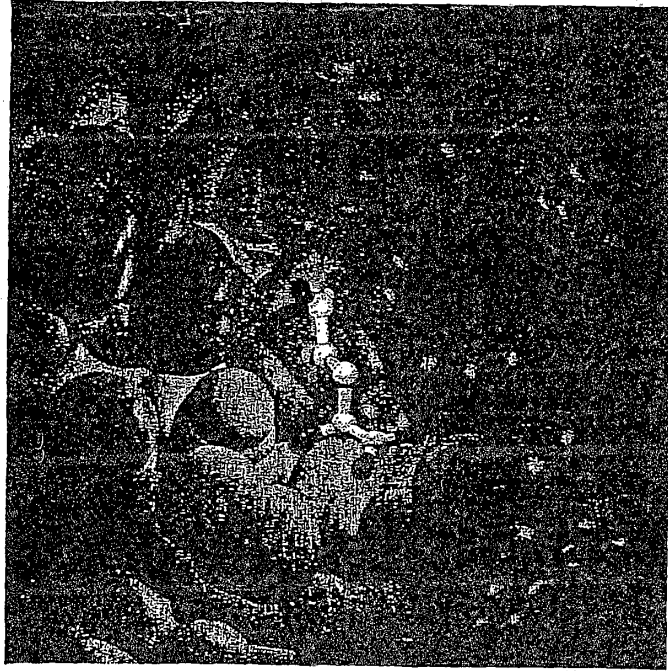
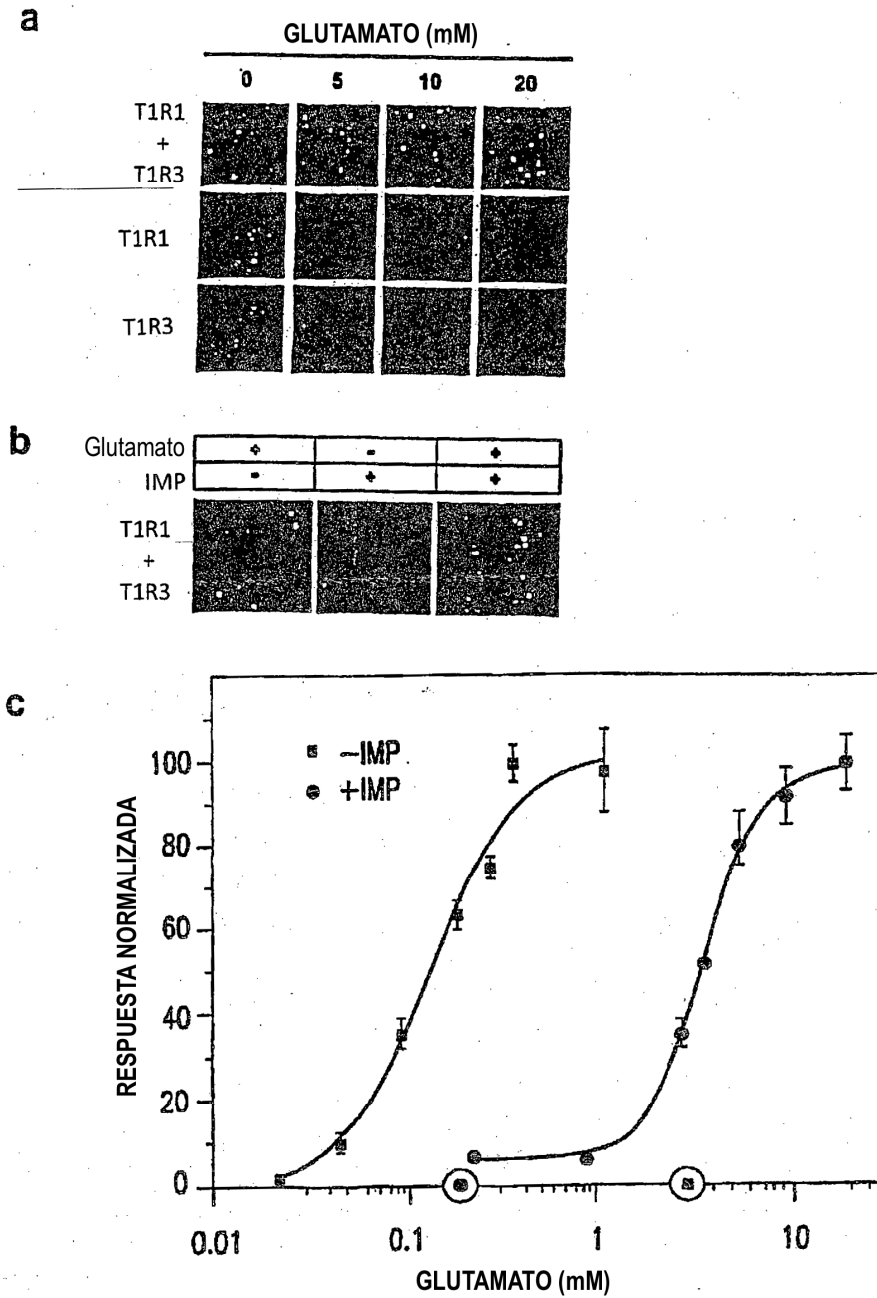


Figura 8 T1R1/T1R3 humano funciona como un receptor gustativo del umami



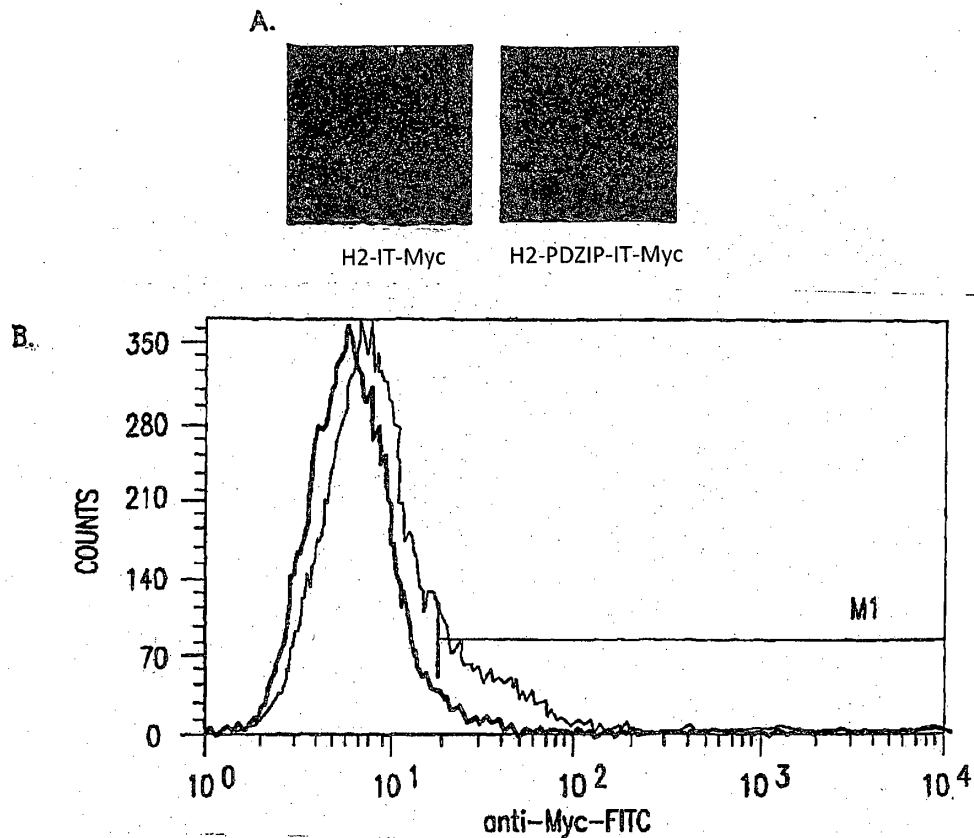


Figura 9 PDZIP facilita la expresión superficial de T1R2 humano.

- A. La tinción por inmunofluorescencia de hT1R2 etiquetado con Myc indica que PDZIP incrementa significativamente la cantidad de proteína de T1R2 humano sobre la membrana plasmática.**
- B. Datos de análisis de FACS que demuestran el mismo resultado.**
T1R2 etiquetado con Myc: Línea verde. Etiquetado con Myc
- C. T1R2 humano con PDZIP: línea negra**

Figura 10 Datos de formación de imágenes de calcio que demuestran respuestas de hT1R2/hT1R3 a un número de estímulos dulces

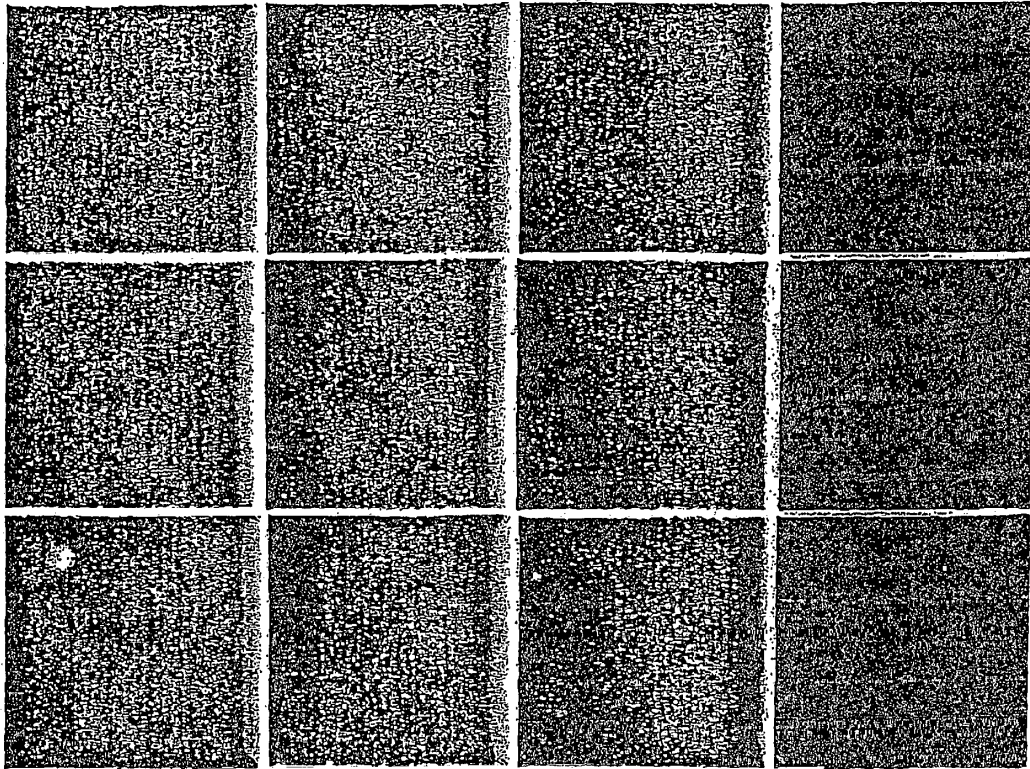


Figura 11

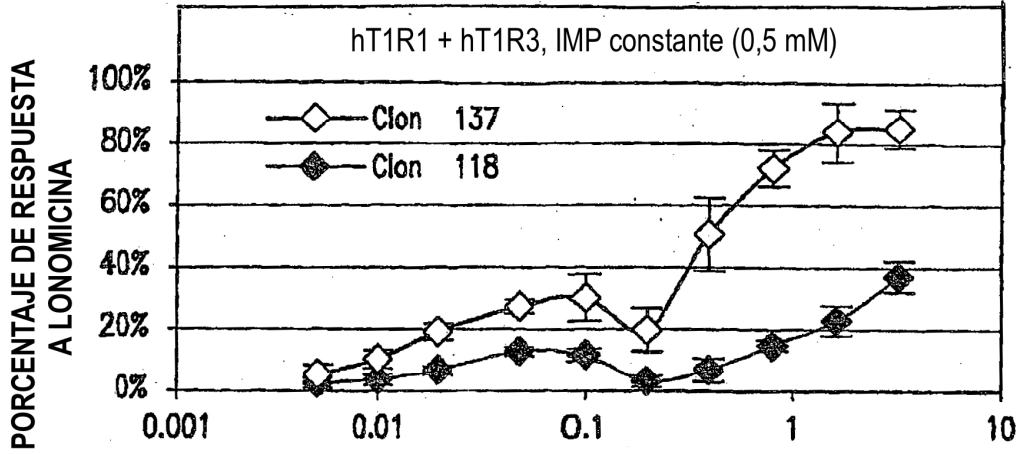


Figura 12

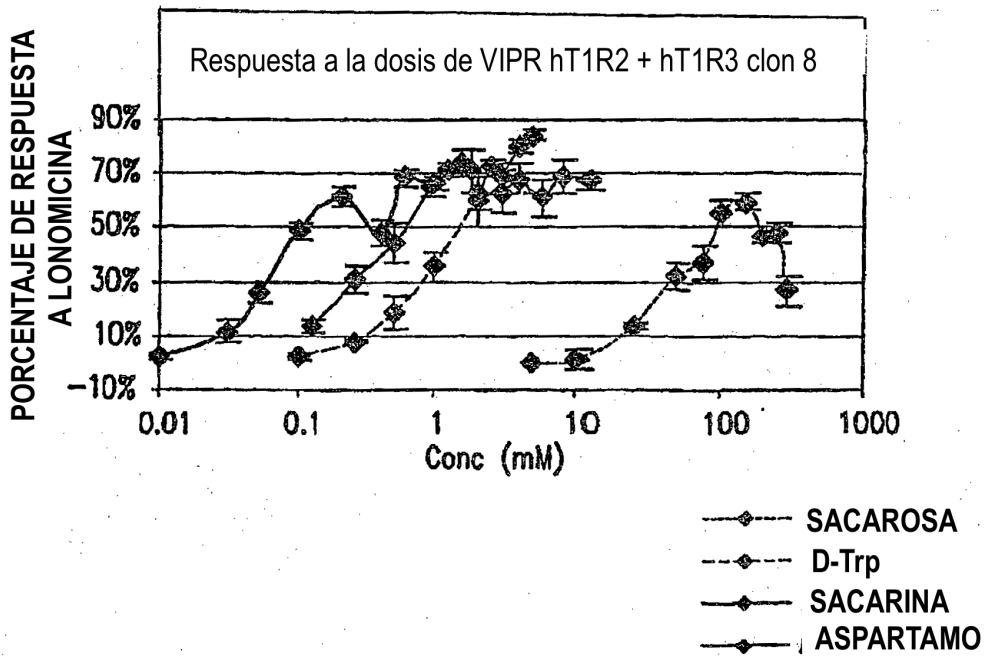
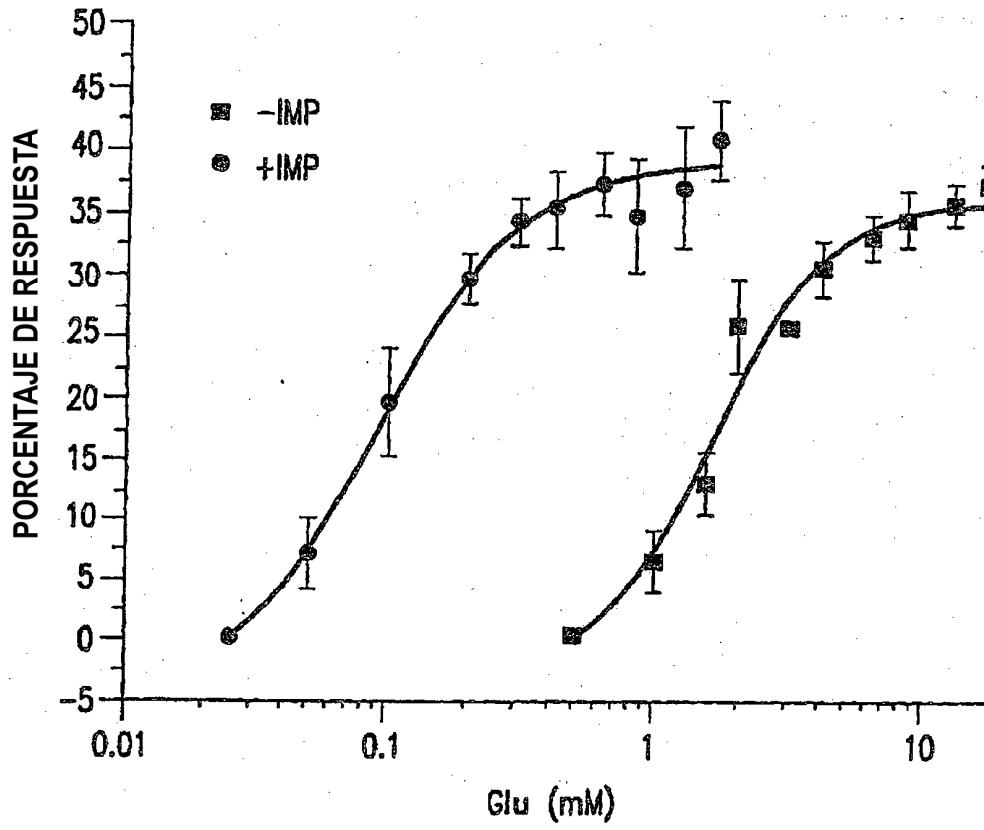


Figura 13



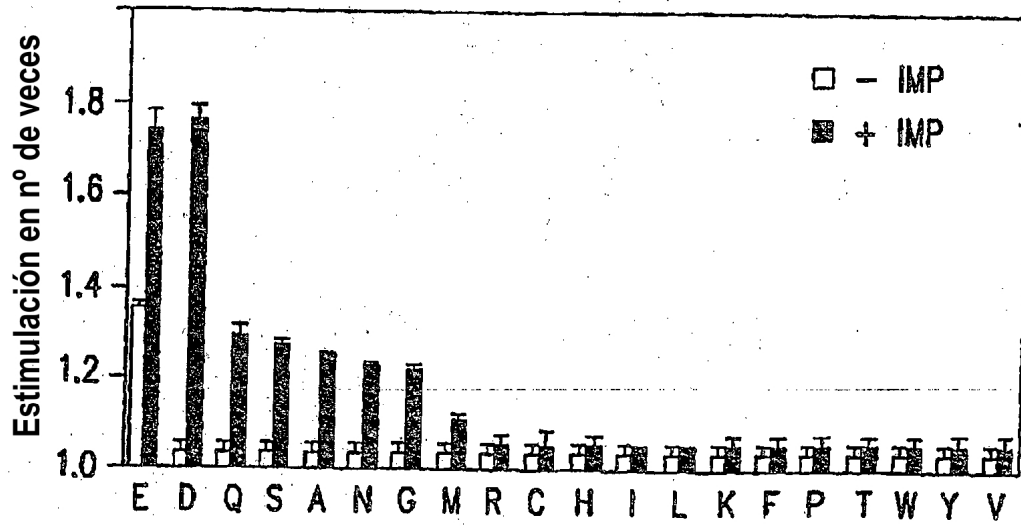


Figura 14

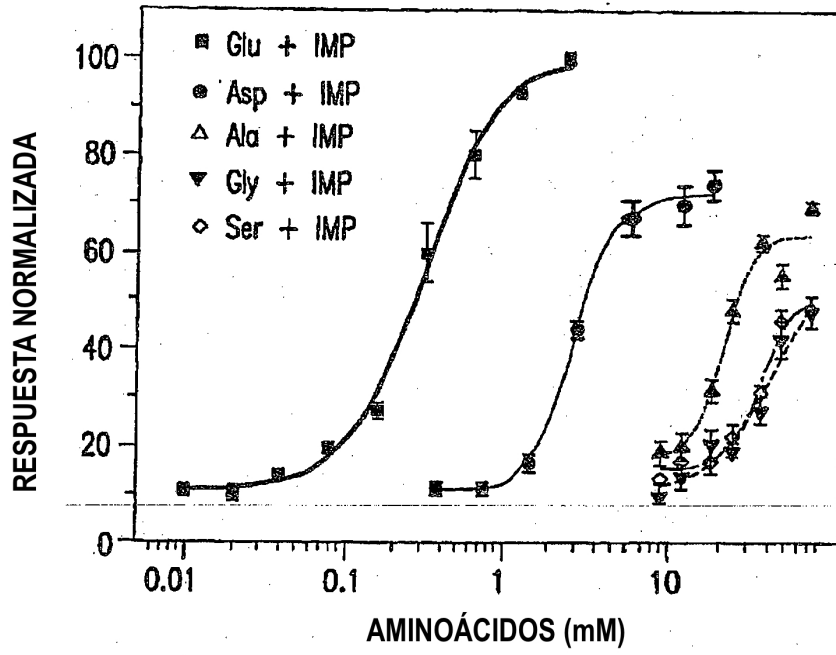


Figura 15

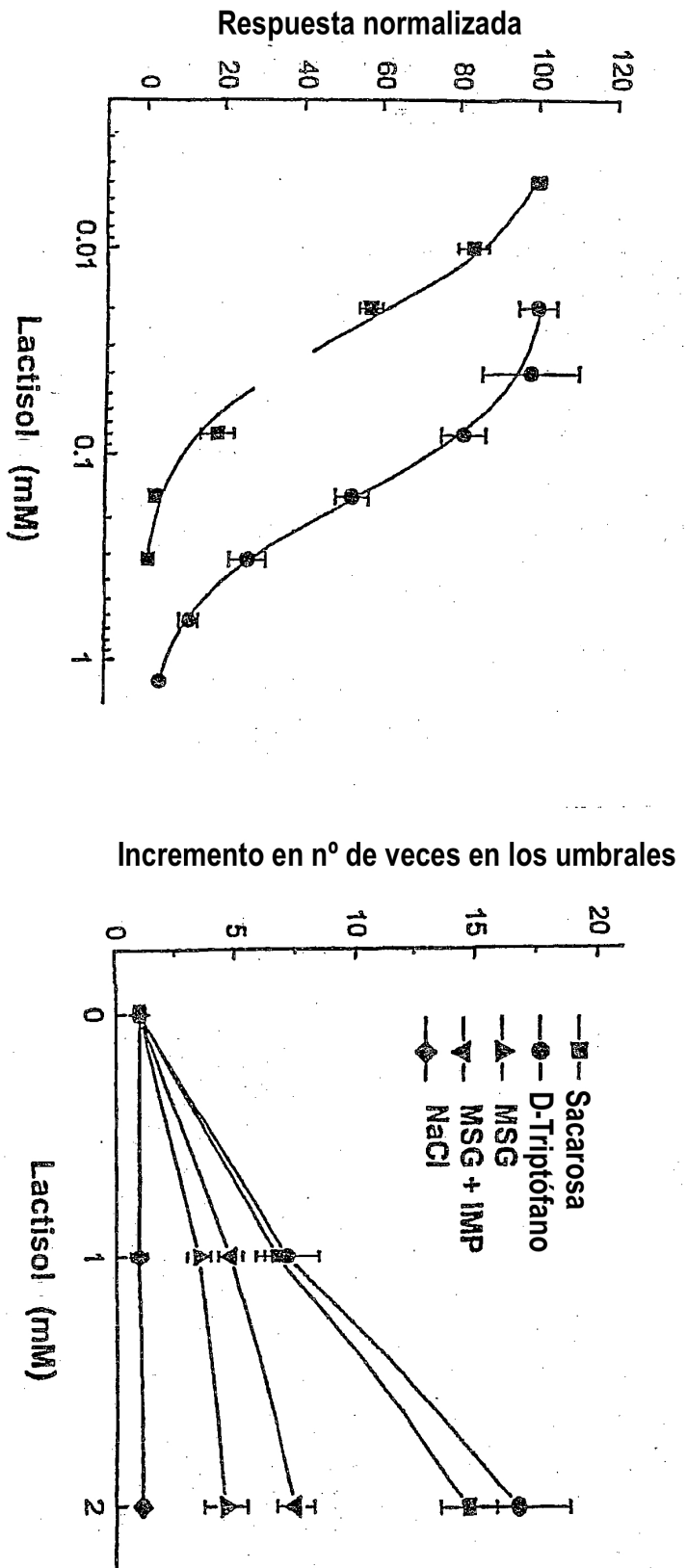


Figura 16

El lactisol inhibe los receptores del dulce T1R2/T1R3 y el umami T1R1/T1R3 y el sabor dulce y umami (Panel izquierdo) Se muestran respuestas de células HEK-Gc15 transfectadas transitoriamente con T1R1/T1R3 (círculos) a L-glutamato 10 mM y células HEK-Gc15 transfectadas transitoriamente con T1R2/T1R3 (cuadrados) a sacarosa 150 mM en presencia de concentraciones variables de lactisol. (Panel derecho) Se muestran incrementos en número de veces en umbrales de detección del sabor en presencia de lactisol 1 y 2 mM para los estímulos gustativos dulces sacarosa y D-triptófano, los estímulos gustativos umami L-glutamato (MSG) y L-glutamato más IMP 0,2 mM, y cloruro sódico. Los umbrales de detección se determinaron siguiente el método de Schiffman y cols.