

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 342**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2004 PCT/US2004/015136**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.01.2005 WO5005480**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2004 E 04752212 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 1639005**

54 Título: **Receptores gustativos de la familia T1R del gato doméstico**

30 Prioridad:

27.06.2003 US 482992 P
19.03.2004 US 554751 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.07.2017

73 Titular/es:

MONELL CHEMICAL SENSES CENTER (100.0%)
3500 MARKET STREET
PHILADELPHIA, PA 19104-3308, US

72 Inventor/es:

LI, XIA;
LI, WEIHUA;
REED, DANIELLE, R.;
BACHMANOV, ALEXANDER, A. y
BRAND, JOSEPH, G.

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 625 342 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 de la familia T1R del gato doméstico

5

ÁMBITO DE LA INVENCION

10

[0002] La presente invención se refiere al campo de los mecanismos sensoriales del gato doméstico (*Felis catus*). La invención se refiere, por ejemplo, al descubrimiento de varios genes que codifican los receptores gustativos (receptores del gusto, del sabor) de la familia T1R de *Felis catus* *Tas1r1*, *Tas1r2* y *Tas1r3*, a los polipéptidos por ellos codificados (T1R1, T1R2 y T1R3) y a métodos y usos de los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

[0003] El sentido del gusto es importante para determinar la elección de los alimentos, para regular la ingesta de alimentos y para garantizar un uso eficiente de los nutrientes ingeridos. El gusto puede actuar como un sistema de advertencia de la presencia de alimentos posiblemente nocivos, mediante, por ejemplo, las sensaciones desagradables de sabor ácido o amargo; también puede actuar como un sistema de atracción a alimentos posiblemente ricos en nutrientes, mediante, por ejemplo, las sensaciones, atractivas de sabor dulce, salado y sabroso (también denominado "umami").

20

25

[0004] Los estímulos gustativos son recibidos por las llamadas células receptoras gustativas (células con receptores gustativos), presentes en los botones gustativos, que están situados en el epitelio de las papilas gustativas de la lengua (Kitagawa *et al.*, *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, 283:236-242 (2001)). Se cree que los estímulos son transducidos por receptores gustativos situados en la superficie de las células receptoras gustativas (véase la referencia anterior). Los receptores gustativos codificados por los genes de una especie dada reflejan las elecciones, en cuanto a alimentos, que dicha especie realiza. Por ejemplo, es de esperar que los "receptores del dulzor" de una especie herbívora sean diferentes de los de una especie carnívora, puesto que dichas especies tienen alimentaciones ("dietas") completamente diferentes, en las que los alimentos respectivos contienen estímulos primarios diferentes. Dado que es probable que la especificidad de los receptores gustativos refleje la elección de alimentos, cabe esperar que la homología entre las secuencias de dichos receptores, de unas especies a otras, sea tan predictiva, o más predictiva, de las preferencias alimenticias de una especie dada, como la relación filogenética entre especies.

30

35

[0005] El comportamiento del gato doméstico (*Felis catus*), que es un carnívoro, hacia estímulos tales como los carbohidratos dulces, que, en general, no puede saborear (detectar), así como hacia los L-aminoácidos, que, en general, sí que puede saborear (detectar), debería poder ser explicado por la especificidad de los receptores gustativos de otras especies de carnívoros. El conocimiento directo de los genes de los receptores gustativos permitirá entender el mundo sensorial de un animal y puede resultar útil para identificar moduladores de los receptores gustativos codificados por dichos genes, a fin de influir sobre las preferencias gustativas de un animal.

40

45

[0006] Se han identificado los receptores moleculares del elemento gustativo "dulzor" en el ser humano, el ratón y la rata. A día de hoy, se conocen tres miembros de la familia de receptores gustativos T1R: T1R1, T1R2 y T1R3 (Montmayeur & Matsunami, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 12(4):366-371 (2002)). El gen del receptor T1R3 está situado dentro del locus *Sac*, que es el principal locus genético (génico) que controla la preferencia por los estímulos de sabor dulce en el ratón (Li *et al.*, *Mamm. Genome*, 12(1):13-16 (2001); Li *et al.*, *Mamm. Genome*, 13(1):5-19 (2002)). La región sinténica humana correspondiente al gen del T1R3 murino está en 1p36.33 (1162-1186 kb (kilobases)). El gen de T1R1 está situado en el 1p36.23 humano (6324-6349 kb), que está a unos ~5 Mb (megabases) del gen de T1R3; por su parte, el gen de T1R2 está situado en el 1p36.13 (18483-18729 kb), que está a unos ~12 Mb del gen de T1R1.

50

55

[0007] La mayoría de los T1Rs son receptores unidos a proteína G, dotados de dominios aminoterminales ("N-terminales") largos extracelulares, que se cree que participan en la unión a ligandos (Montmayeur & Matsunami, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 12(4):366-371 (2002)). Se ha demostrado que los receptores T1R se dimerizan. Por ejemplo, se ha detectado homodimerización de los T1Rs (Zhao *et al.*, *Cell*, 115:255-266 (2003)). Los receptores gustativos también se heterodimerizan. Por ejemplo, se ha detectado la unión de T1R3 con T1R1 o con T1R2. En el ratón, el heterodímero T1R1/T1R3 actúa como un receptor que detecta determinados aminoácidos. El heterodímero T1R2/T1R3 actúa como un receptor que detecta estímulos considerados dulces por los seres humanos. De los datos con los que se cuenta actualmente se desprende que el componente T1R3 del dímero de T1R vincula el receptor gustativo a los procesos de transducción de las señales celulares, con lo que se garantiza que el evento de unión a estímulo sea transducido a una señal neural. Por eso, el conocimiento de los receptores T1R conducirá a una mejor comprensión de las reacciones, específicas de especie, a los estímulos gustativos.

60

65

[0008] En la actualidad, los mecanismos de identificación de estímulos gustativos novedosos en el gato doméstico se limitan, por ejemplo, a estudios sobre la alimentación, laboriosos y complejos, en los que se usan un ingrediente novedoso y un ingrediente de control y se compara la ingesta de ambos. Se pueden invertir cantidades notables de tiempo, esfuerzos y dinero para el descubrimiento de un solo estímulo. Además, hay enfermedades felinas que a menudo se ven exacerbadas cuando un gato se niega a comer. Asimismo, siguen siendo desconocidas, en su mayor parte, las características moleculares que definen a los estímulos gustativos aceptables para el gato doméstico, lo que

dificulta los abordajes racionales de los diseños computacionales de los estímulos gustativos. Por todo ello, el conocimiento de los receptores gustativos felinos y sus ligandos puede llevar a una mejor comprensión de la percepción gustativa (la percepción de los sabores) del gato, y de la modulación de la misma.

5 [0009] La presente invención proporciona genes novedosos que codifican los receptores gustativos T1R1, T1R2 y T1R3 felinos, los polipéptidos codificados por dichos genes, y también, métodos de uso de los receptores, a fin de identificar compuestos capaces de estimular, inhibir o modificar las respuestas en cuanto a ingesta, o el comportamiento general de un gato. Los métodos de análisis/selección de la invención posibilitan el análisis y selección rápidos de socios de unión, agonistas, antagonistas y moduladores de los receptores T1R del gato doméstico. Los resultados de los estudios sobre los receptores T1R felinos reflejan el singular perfil gustativo del gato doméstico.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

15 [0010] Determinadas realizaciones de la presente invención se refieren a un polinucleótido aislado y purificado que codifica un polipéptido de receptor T1R felino que comprende: a) la secuencia de nucleótidos de la SEC N° ID:1 o de la SEC N° ID:99; b) una variante del polinucleótido de la SEC N° ID:1 o SEC N° ID:99, y dicha variante tiene una homología de al menos un 98% respecto del polinucleótido de la SEC N° ID:1 o SEC N° ID:99 y codifica un polipéptido que tiene esencialmente la misma actividad biológica que un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEC N° ID:1 o SEC N° ID:99; c) una variante del polinucleótido de la SEC N° ID:1 o SEC N° ID:99 que tiene una homología de al menos un 98% respecto del polinucleótido de la SEC N° ID:1 o SEC N° ID:99 y que codifica un polipéptido que confiere una percepción modificada del sabor (percepción gustativa modificada respecto de uno o más estímulos gustativos, en comparación con un polipéptido codificado por el polinucleótido de la SEC N° ID:1 o SEC N° ID:99; o d) una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEC N° ID:2. La actividad biológica del polipéptido codificado por los polinucleótidos de la invención puede determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo de unión *in vitro*, como, por ejemplo, entre otros posibles, un ensayo de evaluación del nivel de unión del polipéptido al socio de dimerización de T1R. Los polinucleótidos de la invención puede ser ADN o ARN y ser de cadena única o de cadena doble. En otras realizaciones de la invención, las variantes polinucleotídicas del polinucleótido de la SEC N° ID:1 o SEC N° ID:99 que codifican una secuencia de aminoácidos de SEC N° ID:2 tienen una sustitución no conservada de un aminoácido, por ejemplo, a nivel del residuo 59 o del residuo 64.

30 [0011] Además, la invención engloba vectores de expresión que contienen los polinucleótidos de la invención, unidos operativamente a un promotor. Otra realización de la invención proporciona células "host" (células hospedadoras) que contienen el vector de expresión. Dichas células host pueden ser procarióticas, como, por ejemplo, células bacterianas, o eucarióticas, como, por ejemplo, células de levadura o células de mamífero (por ejemplo, células humanas, murinas, porcinas, bovinas, caninas o felinas). Además, la invención engloba cultivos celulares de las células host. Además, la invención engloba métodos de producción de un receptor T1R felino mediante cultivo de las células host y recuperación de receptores de dicho(s) cultivo(s).

40 [0012] Otra realización de la invención incluye el polipéptido del receptor T1R felino, que comprende: a) la secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido de la Reivindicación 1; b) la secuencia de aminoácidos de la SEC N° ID:2; c) una variante de la SEC N° ID:2 y dicha variante tiene una homología de al menos un 98% respecto de la secuencia de aminoácidos de la SEC N° ID:2 y sustancialmente la misma actividad biológica que el polipéptido de la SEC N° ID:2; d) una variante de la SEC N° ID:2 y dicha variante tiene una homología de al menos un 98% respecto de la secuencia de aminoácidos de la SEC N° ID:2 y al menos una variación en la secuencia de la SEC N° ID:2 y dicha variación confiere una percepción gustativa modificada, hacia uno o más estímulos gustativos, en comparación con un polipéptido de la SEC N° ID:2. La actividad biológica de los polipéptidos de la invención puede determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo de unión *in vitro*, como, por ejemplo, entre otros posibles, uno en el que se evalúe/determine el nivel de unión del polipéptido a un socio de dimerización de T1R. La actividad biológica de los polipéptidos de la invención puede también determinarse mediante medición de la conductancia iónica; flujo iónico; "imagen de calcio" mediante, entre otras posibilidades, Fura-2, actividad medida mediante dextrano verde, o actividad medida mediante acuorina; medición del voltaje y/o análisis de imágenes del voltaje mediante tintes o genes informadores tales como β -luciferasa, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o β -lactamasa; medición de segundos mensajeros, como, por ejemplo, IP_3 (inositol trifosfato), AMPc, ensayos basados en activación de la proteína G; o fosforilación de receptores. Los polipéptidos de las variantes de la invención pueden tener una secuencia de aminoácidos que tenga al menos una variación de la secuencia de la SEC N° ID:2, que confiere una percepción gustativa modificada respecto de uno o más estímulos gustativos, en comparación con un polipéptido de la SEC N° ID:2. Además, los polipéptidos de la invención pueden comprender dominios funcionales de los receptores T1R de la invención, como, por ejemplo, dominios extracelulares, transmembranales e intracelulares de los receptores, así como combinaciones de los mismos. Son ejemplos de dominios funcionales del polipéptido T1R3 de la SEC N° ID:2, entre otros posibles, los dominios extracelulares (residuos 1-571, 628-641, 705-730, y 787-794 de la SEC N° ID:2), los dominios transmembranales (residuos 572-594, 610-627, 642-664, 681-704, 731-754, 767-780, y 795-812 de la SEC N° ID:2), y los dominios intracelulares (residuos 595-609, 665-680, 755-766, y 813-865 de la SEC N° ID:2).

65 [0014] Además, la invención proporciona un kit para la detección de un polinucleótido que codifica un polipéptido de receptor T1R felino, y dicho kit comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de receptor T1R felino de la Reivindicación 6, así como instrucciones referentes a la detección de dicho polinucleótido.

[0015] La invención proporciona asimismo anticuerpos que inmunorreaccionan de manera específica con al menos un epítipo de un polipéptido de la invención. El kit de la invención puede comprender los anticuerpos de la invención, así como instrucciones referentes a la detección.

[0016] Además, la invención proporciona métodos para la identificación de compuestos que interaccionan con un receptor T1R felino; para ello, se pone en contacto un polipéptido de receptor T1R felino, de la invención, con un compuesto de prueba, y se detecta la interacción entre el receptor y el compuesto. Los métodos de detección de dicha interacción pueden ser ensayos basados en células, o ensayos sin células. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede expresarse en un sistema de expresión heterólogo o en un extracto celular. Puede unirse el receptor a un soporte sólido. En un aspecto de la invención, se unen los sitios de reconocimiento del receptor a un sistema de monitorización, de naturaleza eléctrica u óptica. En otra realización, se formula el soporte sólido dentro de una "lengua electrónica" específica o biosensor específico de gato.

[0017] Además, la invención proporciona métodos para identificar agonistas de un receptor T1R felino, y en dichos métodos se pone en contacto un polipéptido de la invención con un compuesto de prueba y se detecta un aumento en la actividad biológica del polipéptido, en presencia del compuesto, respecto de la actividad biológica del polipéptido en ausencia del compuesto. Los métodos de identificación de agonistas de los receptores T1R felinos pueden ser ensayos basados en células, o ensayos sin células. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede expresarse en un sistema de expresión heterólogo o en un extracto celular. Puede unirse el receptor a un soporte sólido. En un aspecto de la invención, se unen los sitios de reconocimiento del receptor a un sistema de monitorización, de naturaleza eléctrica u óptica. En otra realización, se formula el soporte sólido dentro de una "lengua electrónica" o biosensor específicos de gato.

[0018] Además, la invención proporciona métodos de identificación de antagonistas de los polipéptidos de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona métodos para identificar un antagonista de un receptor T1R felino, y en dichos métodos se pone en contacto un polipéptido de la invención con un compuesto de prueba y se detecta una reducción en la actividad biológica del polipéptido, en presencia del compuesto, respecto de la actividad biológica del polipéptido en ausencia del compuesto. Los métodos de identificación de antagonistas pueden ser ensayos basados en células o ensayos sin células. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede expresarse en un sistema de expresión heterólogo o en un extracto celular. Puede unirse el receptor a un soporte sólido. En un aspecto de la invención, se unen los sitios de reconocimiento del receptor a un sistema de monitorización, de naturaleza eléctrica u óptica. En otra realización, se formula el soporte sólido dentro de una "lengua electrónica" o biosensor específicos de gato.

[0019] En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de identificación de compuestos que interaccionan con un dímero de receptores T1R felinos, y dicho método comprende poner en contacto un dímero de receptores T1R que comprende un polipéptido de receptor T1R felino, conforme a la Reivindicación 6, con un compuesto de prueba, y detectar la interacción entre dicho dímero y dicho compuesto.

[0020] En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un dímero de receptores T1R que comprende al menos un polipéptido de receptor T1R felino de la Reivindicación 6.

[0021] Además, en la invención se contempla un animal transgénico no humano que comprende un polinucleótido de la invención.

[0022] Los materiales, métodos y ejemplos que aquí se proporcionan tienen únicamente una finalidad ilustrativa; no están concebidos ni deben interpretarse como limitadores. Otras características y ventajas de la invención quedarán claras en virtud de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0023] Las **Figuras 1A-1I** muestran la alineación de varias secuencias de los ADNc que codifican receptores T1R del gato doméstico (*Tas1r1*, SEC Nº ID:60; *Tas1r2*, SEC Nº ID:63; y *Tas1r3*, SEC Nº ID:99) respecto de secuencias de nucleótidos conocidas de receptores de la familia T1R del ser humano (*Tas1r1*, SEC Nº ID:8; *Tas1r2*, SEC Nº ID:5; *Tas1r3*, SEC Nº ID: 11), del ratón (*Tas1r1*, SEC Nº ID:6; *Tas1r2*, SEC Nº ID:3; *Tas1r3*, SEC Nº ID:9), y de la rata (*Tas1r1*, SEC Nº ID:7; *Tas1r2*, SEC Nº ID:4; *Tas1r3*, SEC Nº ID: 10). Un asterisco (*) indica una posición nucleotídica conservada en las secuencias (es decir, una posición de nucleótido que se conserva en las diferentes secuencias). Un corazón (♥) indica el codón de parada del T1R2 felino.

[0024] Las **Figuras 2A-2D** muestran las secuencias de aminoácidos deducidas para los receptores gustativos T1R felinos (T1R1, SEC Nº ID:61; T1R2, SEC Nº ID:64; y T1R3, SEC Nº ID:2) alineadas con las secuencias de aminoácidos de los miembros de la familia de receptores T1R del ser humano (T1R1, SEC Nº ID:17; T1R2, SEC Nº ID:20; T1R3, SEC Nº ID:12), de la rata (T1R1, SEC Nº ID:16; T1R2, SEC Nº ID:19; T1R3, SEC Nº ID:14), y del ratón (T1R1, SEC Nº ID:15; T1R2, SEC Nº ID:18; T1R3, SEC Nº ID: 13). Un asterisco (*) indica una posición nucleotídica conservada en las secuencias (es decir, una posición de nucleótido que se conserva en las diferentes secuencias). Un signo de dos puntos

(:) indica una sustitución de aminoácido conservada observada. Un punto (.) indica una sustitución de aminoácido semiconservada observada. La secuencia de aminoácidos deducida correspondiente al T1R3 del gato (SEC N° ID:2) contiene cuatro aminoácidos adicionales en las posiciones 11-14, en comparación con los receptores T1R3 del ratón (SEC N° ID:13), del ser humano (SEC N° ID:12) y de la rata (SEC N° ID: 14). La secuencia deducida correspondiente al gato revela una treonina en la posición 64 (una posición equivalente al aminoácido 60 del ratón), y una leucina en la posición 59 (una posición equivalente a la posición 55 del ratón). En el ratón, las sustituciones de aminoácidos, a saber, de una treonina en la posición 60 y de una alanina en la posición 55 (ambas posiciones situadas dentro del dominio N-terminal extracelular putativo del polipéptido, están presentes en estirpes de ratones que muestran una preferencia baja (una menor preferencia) por el estímulo dulce sacarina (Bachmanov *et al.*, *Chem. Senses*, 26:925-933 (2001)). La leucina es una sustitución conservadora para la alanina. Las diferencias entre las secuencias de aminoácidos del receptor T1R3 felino y murino pueden ser responsables de las diferencias funcionales que conducen a las diferentes preferencias gustativas de una especie y la otra.

[0025] En la **Figura 3** se ilustra un árbol filogenético que muestra las relaciones entre la familia de receptores T1R del gato doméstico y la familia de receptores T1R de otras especies, incluidos los T1R1, los T1R2 y los T1R3 del ser humano, de la rata y del ratón. Los receptores T1R de la rata y del ratón están estrechamente relacionados, mientras que los receptores T1R del ser humano y del gato difieren de los de la rata y del ratón. Un hecho interesante es que los estímulos dulces a los que responden la rata y el ratón son muy similares, mientras que los que estimulan al ser humano y los que estimulan al gato difieren entre sí y de los de la rata y del ratón. Por ejemplo, un hecho singular es que los seres humanos tienen capacidad para saborear la mayoría de los endulzantes de alta intensidad, mientras que a los gatos les resultan atractivos numerosos aminoácidos, pero no son capaces de saborear ni la mayoría de los endulzantes tipo carbohidrato ni la mayoría de los endulzantes de alta intensidad. El T1R2 felino difiere del T1R2 del ser humano, del ratón y de la rata, algo que se ajusta al hecho de que el gato no muestra una preferencia por los endulzantes tipo carbohidrato.

[0026] En la **Figura 4** se ilustra la conformación prevista para el receptor T1R3 felino. El receptor T1R3 felino es un receptor con siete dominios transmembranales. Se generó la estructura del receptor T1R3 felino usando el programa de modelado de proteínas disponible en <www.ebi.ac.uk/~moeller/transmembrane.html>.

[0027] La **Figura 5A** muestra la conformación prevista del T1R1 felino e indica que el receptor es un receptor del tipo "7-transmembranal" (7 dominios transmembranales). En la **Figura 5B** se ilustra la conformación prevista para el receptor T1R2 felino. Dado que el T1R2 felino es una proteína corta (391 aminoácidos), no se prevé una proteína con 7 dominios transmembranales. Sin los siete dominios transmembranales, es posible que el receptor T1R2 felino no interaccione adecuadamente con su socio de dimerización (por ejemplo, T1R3) y/o tampoco con la membrana plasmática (citoplásmica), lo que podría conducir a la indiferencia del gato hacia los carbohidratos dulces. Es posible que el T1R2 felino tenga otra función.

[0028] Las **Figuras 6A-6D** muestran la secuencia genómica del *Tas1r1* felino (SEC N° ID:59) obtenida mediante secuenciación de BACs. La letra "N" denota huecos entre los exones o secuencias desconocidas.

[0029] Las **Figuras 7A-7E** muestran la secuencia genómica del *Tas1r2* felino (SEC N° ID:62) obtenida mediante secuenciación de BACs. La letra "N" denota huecos entre los exones o secuencias desconocidas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

[0030] Las obras de referencia, patentes, solicitudes de patentes, y bibliografía científica a las que se hacen referencia en esta invención reflejan, en parte, los conocimientos de los expertos en la técnica. Todo conflicto entre cualquier referencia citada en el presente y los conocimientos específicos expuestos en la presente especificación se resolverá a favor de esta última. De modo similar, todo conflicto entre la definición, vigente en este campo de la técnica, de un término o de una frase, y su definición conforme a lo establecido específicamente en la presente especificación, se resolverá a favor de esta última.

[0031] Son conocidas por los expertos en la técnica las obras de referencia estándar en las que se describen los principios generales de la tecnología del ADN recombinante (Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1998; Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2D ED., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 1989; Kaufman *et al.*, Eds., HANDBOOK OF MOLECULAR AND CELLULAR METHODS IN BIOLOGY AND MEDICINE, CRC Press, Boca Raton, 1995; McPherson, Ed., DIRECTED MUTAGENESIS: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press, Oxford, 1991).

[0032] Tal y como se usa en el presente, el término "receptor T1R" comprende los receptores gustativos de los tipos T1R1, T1R2 y T1R3; por ejemplo, los receptores gustativos T1R1, T1R2 y T1R3 felinos de la invención.

[0033] Tal y como se usa en el presente, el término "percepción del sabor" se refiere a una respuesta (por ejemplo, bioquímica, conductual) o a una sensibilidad, de un receptor T1R de la invención, a un estímulo gustativo. Tal y como se usa en el presente, el término "estímulo gustativo" se refiere a cualquier compuesto que provoque, por ejemplo a nivel bioquímico (por ejemplo, activación o inhibición de un receptor gustativo) o a nivel conductual (por ejemplo, una

preferencia, o indiferencia, o desagrado), una respuesta a un sabor, que es o sería percibida, por un mamífero, como al menos uno de los cinco elementos del sabor, incluidos los sabores dulce, salado, ácido, amargo y sabroso (“umami”). La “percepción del sabor”, o el “estímulo gustativo”, o las variantes de los mismos, no requieren que exista transmisión de una señal neural que conduzca a una sensación de sabor/sensación gustativa, *in vivo*, en un mamífero, aunque sí que incluyen dicha posibilidad. La modificación de la percepción del sabor comprende una alteración de (mejora de, reducción de, o cambio a) una respuesta bioquímica, una respuesta en cuanto a ingestión, una preferencia gustativa o la conducta general de un mamífero en respuesta a un compuesto.

[0034] Tal y como se usa en el presente, el término “polinucleótido” se refiere a una molécula de ácido nucleico y comprende ADN genómico, ADNc, ARN, ARNm, polímeros mixtos, ácidos nucleicos recombinantes, fragmentos y variantes de lo antedicho, y similares. Los fragmentos polinucleotídicos (fragmentos de polinucleótidos) de la invención comprenden al menos 10, y preferiblemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 ó 100 nucleótidos consecutivos, de un polinucleótido de referencia. Los polinucleótidos de la invención comprenden cadenas “sense” (con una orientación que es la del “sentido habitual”) y “antisense” (con una orientación que es en “sentido contrario” al “habitual”). Los polinucleótidos de la invención pueden ser “naturales” (es decir, que se dan en la naturaleza) o “no naturales” (es decir, que no se dan en la naturaleza). Tal y como se usa en el presente, el término “polinucleótido sintetizado” significa polinucleótidos producidos mediante métodos puramente químicos (y no enzimáticos). Por lo tanto, las secuencias de ADN “enteramente” sintetizadas se producen, en su totalidad, mediante medios químicos; en cambio, los ADNs “parcialmente” sintetizados comprenden aquellos en los que se producen, mediante medios químicos, únicamente determinadas porciones del ADN resultante. Los polinucleótidos de la invención pueden ser de cadena única o de cadena doble. Los polinucleótidos de la invención pueden ser modificados químicamente y pueden contener bases nucleotídicas no naturales o derivadas, como comprenderán fácilmente los expertos en la técnica. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, marcadores, metilación, sustitución de uno o más nucleótidos con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como moléculas unidas sin carga (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.), moléculas unidas cargadas (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), fracciones colgantes (por ejemplo, polipéptidos, etc.), intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), quelantes, alquilantes y moléculas unidas modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). Comprenden, además, moléculas sintéticas que imitan a los polinucleótidos en su capacidad para unirse a una secuencia dada, mediante enlaces de hidrógeno y otras interacciones químicas. Tales moléculas son conocidas en este campo del conocimiento y comprenden, por ejemplo, aquellas en las que uniones péptido son sustituidas por uniones fosfato en el esqueleto de la molécula.

[0035] El término “ácido nucleico recombinante” significa un ácido nucleico generado mediante combinación de dos segmentos de secuencias de nucleótidos. Dicha combinación puede realizarse, por ejemplo, mediante medios químicos o mediante ingeniería genética.

[0036] Tal y como se usa en el presente, el término “amplificación de polinucleótidos” se refiere a un amplio abanico de técnicas empleadas para aumentar el número de copias de secuencias de polinucleótidos concretas. Habitualmente, la amplificación de una cadena, o de las dos cadenas, del ácido nucleico diana, comprende el uso de una o más enzimas que modifican los ácidos nucleicos; son ejemplos de tales enzimas, por ejemplo, las siguientes: ADN polimerasa, ligasa, ARN polimerasa, transcriptasa inversa dependiente de ARN. Son ejemplos de amplificación de polinucleótidos, entre otros posibles, los siguientes: reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASB, por sus siglas en inglés [NASBA]), replicación de secuencia autónoma (3SR, por sus siglas en inglés), amplificación con desplazamiento de cadena (SDA, por sus siglas en inglés), reacción en cadena de la ligasa, sistema de la Q β -replicasa, y similares. Existe un amplio abanico de metodologías alternativas de clonación, y de amplificación *in vitro*, bien conocido por los expertos en la técnica. Se pueden encontrar ejemplos de tales técnicas en, por ejemplo, Berger *et al.*, *Guide to Molecular Cloning Techniques*, METHODS IN ENZYMOLOGY 152, Academic Press, Inc., San Diego, California, Estados Unidos de América (Berger).

[0037] Tal y como se usa en el presente, el término “oligonucleótido” o “cebador” se refiere a una serie de residuos nucleotídico unidos, que tenga un número suficiente de bases para ser usadas en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dicha secuencia corta se basa en (o de diseña a partir de) una secuencia genómica o secuencia de ADNc y se usa para amplificar, confirmar o revelar la presencia de un ADN o ARN idéntico, similar o complementario en una célula concreta o en un tejido concreto. Los oligonucleótidos comprenden porciones, de una secuencia de ácidos nucleicos, que tienen al menos unos 10 nucleótidos y hasta unos 50 nucleótidos; a menudo, de unos 12 ó 15 a unos 30 nucleótidos. Son moléculas sintetizadas químicamente y se pueden emplear como sondas. “Par de cebadores” se refiere a un conjunto de cebadores que comprende un cebador, situado antes del extremo 5', que se hibrida con el extremo 5' de una secuencia diana que se desea amplificar, así como un cebador, situado después del extremo 3', que se hibrida con el complemento del extremo 3' de la secuencia diana que se desea amplificar.

[0038] Tal y como se usa en el presente, el término “sonda” se refiere a secuencias de ácidos nucleicos de longitud variable, como, por ejemplo, de al menos unos 10 y a al menos unos 6.000 nucleótidos, dependiendo del uso que se les desee dar. Las sondas se usan en la detección de secuencias de ácidos nucleicos diana idénticas, similares o complementarias, y dichas secuencias diana pueden ser de cadena única o de cadena doble. Las sondas más largas se suelen obtener de una fuente natural o recombinante, son muy específicas, y se hibridan mucho más lentamente que los oligómeros, o sondas más cortas. Pueden ser de cadena única o de cadena doble y se diseñan de modo meticuloso

para que tengan especificidad en la PCR, en las tecnologías de hibridación basadas en membrana, o en las tecnologías tipo ELISA. Una "sonda *overgo*" ["overgo" significa "oligonucleótidos solapados", y viene del inglés "overlapping oligonucleotides"] es una sonda de ADN que comprende dos secuencias de ADN cortas solapadas (por ejemplo, de 10-50 nucleótidos) con una región solapada complementaria (por ejemplo, de 5-15 nucleótidos) que se usa en una estrategia de hibridación "overgo". Por ejemplo, una sonda "overgo" puede tener dos 22-ómeros con un solapamiento complementario de 8 pb (pb = pares de bases), lo que conduce a una sonda "overgo" de 36-ómeros. Como otro ejemplo, una sonda "overgo" puede tener dos 24-ómeros con un solapamiento complementario de 8 pb, lo que conduce a una sonda "overgo" de 40-ómeros.

[0039] Tal y como se usa en el presente, la frase "condiciones de hibridación estrictas" o "condiciones muy estrictas" se refiere a las condiciones en las que una sonda, un cebador o un oligonucleótido se hibrida con la secuencia que tiene como diana (y no a otras secuencias, o al menor número posible de otras secuencias). Las condiciones estrictas son dependientes de secuencia y, en diferentes circunstancias, difieren. Las secuencias más largas se hibridan de manera específica con sus complementos adecuados a temperaturas más altas que las secuencias menos largas. En general, las condiciones estrictas se seleccionan de manera que sean unos 5 °C más bajas que el punto de fusión térmica (T_m) de la secuencia específica a la concentración iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (a la concentración iónica, el pH y la concentración de ácidos nucleicos definidos) a la que el 50% de las sondas complementarias de la secuencia diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Dado que, por lo general, las secuencias diana están presentes "en exceso" (es decir, que hay más secuencias diana que sondas), a la T_m , el 50% de las sondas se hibridan con sus complementos en equilibrio. En general, las condiciones de temperatura estrictas comprenden temperaturas superiores a 30 °C, y normalmente, superiores a 37 °C, y pueden ser superiores a 45 °C. Habitualmente, las condiciones de concentración de sal estrictas son inferiores a una concentración 1,0 M, y habitualmente, son inferiores a una concentración 0,5 M, y pueden ser inferiores a una concentración 0,2 M. Habitualmente, las condiciones estrictas son aquellas en las que la concentración de sal es inferior a aproximadamente una concentración 1,0 M de iones de sodio, y habitualmente, a una concentración de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de iones de sodio (u otras sales) a un pH de 7,0 a 8,3, y en las que la temperatura es de al menos unos 30 °C para las sondas cortas, los cebadores cortos o los oligonucleótidos cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos), y de al menos unos 60 °C para las sondas largas, los cebadores largos o los oligonucleótidos largos. También se pueden lograr condiciones estrictas mediante la adición de agentes desestabilizadores, como, por ejemplo, formamida.

[0040] Tal y como se usa en el presente, el término "oligonucleótido antisense" se refiere a una molécula de ácido nucleico que es complementaria de al menos una porción de una secuencia de nucleótidos diana de interés, y que se hibrida de manera específica con la secuencia de nucleótidos diana, en condiciones fisiológicas. Tal y como se usa en el presente, el término "ARN de cadena doble" o "ARNds" (por sus siglas) se refiere a una molécula de ARN de cadena doble capaz de ejercer interferencia de ARN, incluido el ARN corto interferente (ARNsi) (véase, por ejemplo, Bass, *Nature*, 411, 428-429 (2001); Elbashir *et al.*, *Nature*, 411, 494-498 (2001)).

[0041] Tal y como se usa en el presente, el término "complementariedad" se refiere al emparejamiento de bases, conforme a Watson y Crick, entre unidades nucleótido de una molécula de ácido nucleico.

[0042] El término "gen marcador" o "gen informador" se refiere a un gen que codifica un producto que, cuando se expresa, confiere un fenotipo, a nivel físico, morfológico o bioquímico, a una célula transformada, que sea fácilmente identificable, directa o indirectamente, mediante técnicas estándar; comprende, entre otras posibilidades, genes que codifican proteínas que confieren resistencia a toxinas o a antibióticos (por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotroxato); genes que codifican proteínas que complementan deficiencias auxotróficas; y genes que codifican proteínas que suministran/aportan componentes cruciales no disponibles en medios complejos. Son ejemplos de genes marcadores, entre otros, los siguientes: proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés), proteína fluorescente roja (DsRed), fosfatasa alcalina (AP, por sus siglas en inglés), β -lactamasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), adenosina desaminasa (ADA), aminoglicósido fosfotransferasa (neor [neo], G418r) dihidrofolato reductasa (DHFR), higromicina-B-fosfotransferasa (HPH), timidina quinasa (TK, por sus siglas en inglés), lacZ (que codifica la β -galactosidasa), β -lactamasa, luciferasa (luc), xantina guanina fosforribosiltransferasa (XGPRT, por sus siglas en inglés). Como con muchos de los procedimientos estándar asociados a la puesta en práctica de la invención, los expertos en la técnica sabrán de secuencias adicionales que puedan ejercer la función de marcador o de informador. Por eso, esta lista está meramente concebida para indicar ejemplos de lo que se puede usar, y no debe entenderse que limite, en modo alguno, la invención.

[0043] Tal y como se usa en el presente, el término "promotor" se refiere a un elemento regulador que regula, controla o promueve la expresión de una molécula de ácido nucleico de interés y que puede "derivarse" (obtenerse) de fuentes tales como adenovirus, SN40, parvovirus, virus de la vacuna de la viruela, citomegalovirus, o ADN genómico de mamíferos. Son ejemplos de promotores adecuados, entre otros posibles, los siguientes: promotores (de) CMV, MSH2, trp, lac, fago, y ARNt. Son promotores adecuados que se pueden usar en levaduras, entre otros posibles, los siguientes: promotores constitutivos como, por ejemplo, de la 3-fosfoglicerato quinasa, y diversos otros promotores de genes de enzimas glicolíticas como, por ejemplo, de la enolasa o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, o promotores inducibles como, por ejemplo, el promotor de la alcohol deshidrogenasa-2 o el promotor de la metalotioneína. De nuevo, como con muchos de los procedimientos estándar asociados a la puesta en práctica de la invención, los expertos en la técnica sabrán de promotores adicionales que puedan ejercer la función de dirigir la expresión de un marcador o

informador. Por eso, la lista está meramente concebida para indicar ejemplos de lo que se puede usar, y no debe entenderse que limite, en modo alguno, la invención.

5 [0044] “Unido/a/s operativamente” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes están en una relación funcional. Por ejemplo, un promotor está unido o conectado operativamente a una secuencia codificadora si controla la transcripción o la expresión de dicha secuencia.

10 [0045] En la presente invención, los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan como sinónimos. “Polipéptido” se refiere a un polímero de aminoácidos, sin hacer alusión a una longitud concreta [de dicho polímero]. Los polipéptidos de la invención comprenden fragmentos de péptidos, derivados de péptidos y proteínas de fusión. Preferiblemente, los fragmentos de péptidos tienen al menos unos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100 aminoácidos. Algunos fragmentos de péptidos de la invención son biológicamente activos. Las actividades biológicas comprenden inmunogenicidad, unión a/fijación de ligandos, dimerización, y actividad asociada al péptido de referencia. Los péptidos inmunogénicos y fragmentos inmunogénicos de la invención generan una respuesta inmunitaria específica de epítipo; “epítipo” se refiere a un determinante inmunogénico de un péptido, y preferiblemente contiene al menos tres, cinco, ocho, nueve, diez, quince, veinte, treinta, cuarenta, cuarenta y cinco, o cincuenta aminoácidos. Algunos péptidos inmunogénicos de la invención generan una respuesta inmune específica de los mismos. Los polipéptidos de la invención comprenden péptidos que se dan en la naturaleza y péptidos que no se dan en la naturaleza. El término incluye a los polipéptidos modificados (en los que son ejemplos de tales modificaciones, entre otras posibles, los siguientes: glicosilación, acetilación, fosforilación, carboxilación, ubiquitinación, marcado, etc.), los análogos (como, por ejemplo, aminoácidos que no se dan en la naturaleza, moléculas unidas sustituidas, etc.), y miméticos funcionales. Son bien conocidos, en este campo del conocimiento, diversos métodos para marcar polipéptidos; comprenden isótopos radiactivos (“radioisótopos”) tales como ³²P o ³⁵S, ligandos que se unen a antiligandos (por ejemplo, anticuerpos) marcados, fluoróforos, agentes (sustancias) quimioluminiscentes, enzimas y antiligandos.

25

[0046] Tal y como se usa en el presente, el término “aminoácido” denota una molécula que contiene tanto un grupo amino como un grupo carboxilo. En algunas realizaciones, los aminoácidos son α -, β -, γ - o δ -aminoácidos, incluidos sus estereoisómeros y racematos. Tal y como se usa en el presente, el término “L-aminoácido” denota un α -aminoácido que tiene la configuración L alrededor del α -carbono, es decir, un ácido carboxílico con la fórmula general CH(COOH)(NH₂)-(cadena lateral), que tiene la configuración L (levógira). De manera similar, el término “D-aminoácido” denota un ácido carboxílico con la fórmula general CH(COOH)(NH₂)-(cadena lateral), que tiene la configuración D (dextrógira) alrededor del α -carbono. Las cadenas laterales de los L-aminoácidos comprenden fracciones que se dan en la naturaleza y fracciones que no se dan en la naturaleza. Las cadenas laterales de aminoácido que no se dan en la naturaleza (es decir, que son no naturales) son fracciones que se usan en lugar de cadenas laterales de aminoácido que sí se dan en la naturaleza, en, por ejemplo, análogos de aminoácidos. Pueden unirse sustituyentes de aminoácidos; por ejemplo, mediante sus grupos carbonilo a través del oxígeno o del carbono carbonilo de los mismos, o mediante sus grupos amino, o mediante funcionalidades que residen en sus porciones cadena lateral.

30

35

[0047] Las secuencias de aminoácidos se representan en el sentido de amino (N) a carboxi (C), de izquierda a derecha. El grupo α -amino N-terminal y los grupos β -carboxi C-terminales no se ilustran en la secuencia. Las secuencias de nucleótidos se representan solamente en forma de cadenas únicas, en el sentido de 5' a 3', de izquierda a derecha. Los nucleótidos y los aminoácidos se representan de la manera recomendada por el Comité mixto de nomenclatura bioquímica de la IUPAC y la IUB, o en el caso de los aminoácidos, éstos pueden ser representados también mediante sus designaciones conforme a su código de tres letras.

40

45

[0048] Tal y como se usa en el presente, el término “anticuerpo” se refiere a anticuerpos completos, intactos, así como a los fragmentos Fab, Fab', F(ab)₂, F_v, y a otros fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos completos, intactos, comprenden anticuerpos tales como los siguientes: anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, y anticuerpos felinizados, así como equivalentes, con capacidad de unión inmunológica, de lo antedicho. Los anticuerpos de la invención pueden estar marcados o no. Son ejemplos de marcadores de anticuerpos, entre otros posibles, los siguientes: radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. En la invención se describen también inmunoglobulinas recombinantes.

50

55

[0049] Tal y como se usa en el presente, el término “unión” (o “fijación”) significa la interacción física o química entre dos proteínas o compuestos, o proteínas asociadas o compuestos asociados, o combinaciones de lo antedicho. La unión/fijación comprende enlaces iónicos, enlaces no iónicos, enlaces de hidrógeno, fuerzas/interacciones de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, etc. La interacción física, la unión/fijación, puede ser o directa o indirecta; indirecta significa que se produce mediante, o a consecuencia de, los efectos de otra proteína u otro compuesto. La unión/fijación directa significa interacciones que no tienen lugar mediante, o a consecuencia de, el efecto de otra proteína u otro compuesto, sino que, en tal tipo de unión/fijación, no hay otros intermediarios químicos de importancia. La unión/fijación puede detectarse de muchas maneras diferentes. Por ejemplo, entre otras posibilidades, la interacción física de la unión entre dos moléculas puede detectarse usando un compuesto marcado. Hay otros métodos de detección de la unión/fijación que son bien conocidos por los expertos en la técnica.

60

65

[0050] Tal y como se usa en el presente, el término “poner en contacto/puesta en contacto” significa llevar, directa o indirectamente, un compuesto, hasta la proximidad física de una molécula de interés. Por ejemplo, la puesta en contacto puede tener lugar en un número cualquiera de tampones, sales, soluciones, o en una célula o extracto celular.

5 [0051] Tal y como se usan en el presente, los términos “modula” o “modifica” significan un aumento o una disminución en la cantidad, la calidad o el efecto de una actividad concreta o proteína concreta. El término “moduladores” se refiere a cualesquiera moléculas inhibitoras o activadoras identificadas usando ensayos *in vitro* e *in vivo*; por ejemplo, agonistas, antagonistas, y homólogos de moléculas inhibitoras o activadoras, lo que comprende fragmentos, variantes y miméticos, conforme a como aquí se definen, que ejercen esencialmente la misma actividad biológica que la molécula.
 10 Los “inhibidores” o “antagonistas” son compuestos moduladores que reducen, disminuyen, bloquean, previenen, retrasan la activación de, inactivan, desensibilizan, o regulan a la baja, la actividad biológica o la expresión de una molécula o ruta de interés. Los “inductores,” “activadores” o “agonistas” son compuestos moduladores que incrementan, inducen, estimulan, abren, activan, facilitan, aumentan/mejoran la activación de, sensibilizan, o regulan al alza (la actividad biológica o la expresión de), una molécula o ruta de interés. En algunas realizaciones preferidas de la invención, el nivel de inhibición o de regulación al alza de la expresión o de la actividad biológica de una molécula o ruta de interés, se refiere a una reducción (inhibición o regulación a la baja) o a un aumento (regulación al alza) de más de aproximadamente un 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. La inhibición o la regulación al alza puede ser directa, es decir, actuar sobre la molécula o ruta de interés en sí, o indirecta, es decir, actuar sobre una molécula o ruta que afecte a la molécula o ruta de interés.

20 [0052] Un polinucleótido o polipéptido “purificado” o “esencialmente purificado” está esencialmente separado de otros componentes celulares que acompañan naturalmente a un ácido nucleico o polipéptido nativo (o “de tipo natural”), y/o de otras impurezas (por ejemplo, gel de agarosa). Un polipéptido purificado o proteína purificada comprende de aproximadamente un 60% a más de un 99%, en p/p (peso/peso), de una muestra, y puede tener una pureza de aproximadamente un 90%, aproximadamente un 95% o aproximadamente un 98%. Tal y como se usa en el presente, el término “aislada” se refiere a una molécula que ha sido retirada de su entorno nativo. Son ejemplos de moléculas de ácido nucleico aisladas, entre otras posibles, las siguientes: moléculas de ADN recombinante contenidas en un vector, moléculas de ADN recombinante mantenidas en una célula host heteróloga, moléculas de ácido nucleico parcial o esencialmente purificadas, y moléculas de ADN o ARN sintético.

30 [0053] Tal y como se usa en el presente, el término “aproximadamente” (y expresiones sinónimas, como, por ejemplo, “unos” o “unas”) significa un +/- 10% del valor de referencia.

35 [0054] Tal y como se usa en el presente, el término secuencias de nucleótidos o de aminoácidos “variantes” se refiere a homólogos, incluidos/as, por ejemplo, las isoformas, las variantes de especie, las variantes alélicas, y fragmentos, de la secuencia de interés. “Secuencia de nucleótidos homóloga” o “secuencia de aminoácidos homóloga”, o variaciones de esos términos, se refieren a secuencias caracterizadas por una homología, a nivel de nucleótidos o a nivel de aminoácidos, de al menos aproximadamente un 98%, o de al menos aproximadamente un 99%, y más preferiblemente un 100%, respecto de una secuencia de referencia. La secuencia de referencia puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEC N° ID:1 o de la SEC N° ID:99, que codifican un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEC N° ID:2. Los dominios funcionales de los receptores T1R de la invención comprenden dominios extracelulares, dominios transmembranales y dominios intracelulares. Son ejemplos de dominios funcionales del polipéptido T1R3 de la SEC N° ID:2, entre otros posibles, los dominios extracelulares (residuos 1-571, 628-641, 705-730, y 787-794 de la SEC N° ID:2), los dominios transmembranales (residuos 572-594, 610-627, 642-664, 681-704, 731-754, 767-780, y 795-812 de la SEC N° ID:2), y los dominios intracelulares (residuos 595-609, 665-680, 755-766, y 813-865 de la SEC N° ID:2). Las isoformas pueden ser expresadas en diferentes tejidos del mismo organismo, a consecuencia de, por ejemplo, un “splicing” (corte-eliminación-unión) alternativo del ARN. Alternativamente, las isoformas pueden ser codificadas por genes diferentes. Las secuencias de nucleótidos homólogas comprenden secuencias de nucleótidos que codifican una variante de especie de una proteína. Además, comprenden, entre otras posibilidades, variaciones alélicas y mutaciones, que se dan en la naturaleza, de las secuencias de nucleótidos descritas en la presente invención. El estudio de las mutaciones y de los polimorfismos de las secuencias de nucleótidos de los receptores T1R puede explicar las preferencias gustativas, específicas de raza y/o individuales, de un mamífero tal como un gato. Además, las variantes de las secuencias de los receptores T1R pueden estar asociadas a estados patológicos concretos, de manera tal que el conocimiento de los genes permita diagnosticar y tratar trastornos asociados a T1R (por ejemplo, obesidad, diabetes). Las secuencias de aminoácidos homólogas comprenden las secuencias de aminoácidos [sic] que codifican sustituciones conservadoras de aminoácidos en polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de la SEC N° ID:2, así como en polipéptidos identificados de conformidad con los métodos de la invención. El porcentaje de homología puede determinarse mediante, por ejemplo, el programa Gap (*Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix*, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, Wisconsin, Estados Unidos de América), utilizando la configuración predeterminada del mismo, que hace uso del algoritmo de Smith y Waterman (Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2: 482-489, 1981). Preferiblemente, los fragmentos de ácido nucleico de la invención tienen al menos unos 5, al menos unos 10, al menos unos 15, al menos unos 20, al menos unos 25, al menos unos 50, o al menos unos 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. Los fragmentos de ácido nucleico de la invención pueden codificar un polipéptido que tenga al menos una propiedad biológica, o función, que sea esencialmente similar a una propiedad biológica del polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico de longitud completa.

[0055] Es un hecho bien conocido, en este campo del conocimiento, que, a causa de la naturaleza degenerativa del código genético, existen numerosas moléculas de ADN y de ARN que pueden codificar el mismo polipéptido que el codificado por una secuencia de nucleótidos de interés. Por eso, en la presente invención se contemplan esas otras moléculas de ADN y de ARN que, cuando se expresan, codifican un polipéptido que es codificado por la molécula de ácido nucleico de interés. Por ejemplo, las “inserciones”, “sustituciones” o “deleciones” (eliminaciones) de nucleótidos son cambios a, o dentro de, una secuencia de nucleótidos. Tales variantes polinucleotídicas recaen dentro del ámbito de la presente invención. Dentro del ámbito de la presente invención se encuentran las moléculas de ADN y de ARN (que no sean las que se describen específicamente/explicitamente en la presente invención) caracterizadas simplemente por un cambio a/de un aminoácido concreto en un codón.

[0056] Las “inserciones”, “sustituciones” o “deleciones” de aminoácidos son cambios a, o dentro de, una secuencia de aminoácidos. La variación permitida en una secuencia de aminoácidos concreta puede determinarse experimentalmente mediante la producción sintética del péptido, o mediante la realización sistemática de inserciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos, en la secuencia de ácido nucleico, usando técnicas de ADN recombinante. Pueden efectuarse alteraciones a/de una secuencia de aminoácidos que se da en la naturaleza, mediante cualquiera de una serie de técnicas conocidas. Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones en el polinucleótido que codifica un polipéptido, a nivel de ubicaciones concretas del mismo, mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica; por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos.

[0057] Una variante polipeptídica de la presente invención puede mostrar esencialmente la actividad biológica de un polipéptido de referencia que se dé en la naturaleza. Tal y como se usa en el presente, el término “actividad biológica” se refiere al nivel de una función concreta (por ejemplo, actividad enzimática) de una molécula o ruta de interés, en un sistema biológico. “Actividad biológica de tipo natural” se refiere al nivel normal de la función de una molécula o ruta de interés. “Actividad biológica reducida” se refiere a un nivel reducido de la función de una molécula o ruta de interés, respecto de un nivel de referencia de la actividad biológica de esa molécula o ruta. Por ejemplo, la “actividad biológica reducida” puede referirse a un nivel reducido (un nivel menor) de actividad biológica, en comparación con la actividad biológica de tipo natural de una molécula o ruta de interés. “Actividad biológica aumentada” se refiere a un nivel aumentado de la función de una molécula o ruta de interés, en comparación con un nivel de referencia de la actividad biológica de esa molécula o ruta. Por ejemplo, la “actividad biológica aumentada” puede referirse a un nivel aumentado de actividad biológica, en comparación con la actividad biológica de tipo natural de una molécula o ruta de interés. Cuando en el presente se hace referencia a que muestran “esencialmente la actividad biológica de un polipéptido que se da en la naturaleza”, esa expresión indica que las variantes comprendidas dentro del ámbito de la invención pueden comprender secuencias sustituidas conservadoramente, lo que significa que uno o más residuos aminoácido de un polipéptido son reemplazados por residuos diferentes que no alteran la estructura secundaria, ni/o la estructura terciaria, del polipéptido. Tales sustituciones pueden comprender la sustitución de un aminoácido por un residuo que tenga propiedades similar fisicoquímicas similares, como, por ejemplo, al sustituir un residuo alifático (Ile, Val, Leu o Ala) con otro, o en el caso de una sustitución entre los residuos básicos Lys y Arg, los residuos ácidos Glu y Asp, los residuos amida Gln y Asn, los residuos hidroxilo Ser y Tyr, o los residuos aromáticos Phe y Tyr. Hay fuentes de información adicionales, en cuanto a la realización de intercambios de aminoácidos fenotípicamente silentes, que son conocidas en este campo del conocimiento (Bowie *et al.*, *Science*, 247: 1306-1310, 1990). Otros homólogos polipeptídicos que podrían retener esencialmente las actividades biológicas del polipéptido de referencia son aquellos en los que se hayan realizado sustituciones de aminoácidos en áreas situadas fuera de las regiones funcionales de la proteína. La actividad biológica puede evaluarse mediante, por ejemplo, la medición de la unión de un receptor T1R de la invención a un socio de dimerización. La actividad biológica de los polipéptidos de la invención puede también determinarse mediante medición de la conductancia iónica; flujo iónico; “imagen de calcio” mediante, entre otras posibilidades, Fura-2, actividad medida mediante dextrano verde, o actividad medida mediante acurina; medición del voltaje y/o análisis de imágenes del voltaje mediante tintes o genes informadores tales como β -luciferasa, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o β -lactamasa; medición de segundos mensajeros, como, por ejemplo, IP₃ (inositol trifosfato), AMPc, ensayos basados en activación de la proteína G; o fosforilación de receptores.

[0058] Puede usarse una secuencia de nucleótidos y/o de aminoácidos de una molécula de ácido nucleico o de un polipéptido empleado en la invención, o de un compuesto identificado mediante el método de análisis/selección de la invención, para buscar, en un banco de datos de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos, regiones de similitud, usando el algoritmo “Gapped BLAST” (BLAST segmentado) (Altschul *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 25: 3389, 1997). En resumen, el algoritmo BLAST, cuyas siglas significan “Herramienta para búsquedas de alineaciones locales básicas” (*Basic Local Alignment Search Tool*), resulta adecuado para determinar la similitud entre secuencias (Altschul *et al.*, *J Mol. Biol.*, 215: 403-410, 1990). El software para llevar a cabo análisis BLAST está disponible públicamente, a través del Centro estadounidense de información biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Al usar este algoritmo, primero se identifica un “par de secuencias de alta puntuación” (HSPs, por sus siglas en inglés) mediante la identificación de “palabras” cortas, de longitud W, en la secuencia de la consulta, que o coincidan o satisfagan alguna puntuación T umbral, de valor positivo, cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en la secuencia de una base de datos. A “T” (la inicial de “umbral”, en inglés) se la denomina “umbral de puntuación de palabras del vecindario” (“*neighborhood word score threshold*”) (Altschul *et al.*, *J Mol. Biol.*, 215: 403-410, 1990). Dichos resultados en cuanto a “palabras del vecindario” iniciales actúan como “semillas” con las que iniciar búsquedas para encontrar HSPs que las contengan. Los resultados, en cuanto a palabras, se extienden en

ambos sentidos a lo largo de cada secuencia, todo lo lejos que se pueda incrementar la puntuación acumulada (sumada). La extensión (ampliación) de los resultados, en cuanto a dichas palabras, en cada sentido, se detiene cuando: 1) la puntuación de alineación acumulada difiere, en una cantidad X, respecto de su valor máximo alcanzado; 2) la puntuación acumulada desciende hasta cero, o por debajo de cero, a causa de la acumulación de una o más alineaciones de residuos con puntuación negativa; o 3) se alcanza el final de cualquiera de ambas secuencias. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST usa como valores predeterminados una longitud de palabra (W) de 11, alineaciones de la matriz de puntuaciones BLOSUM62 (Henikoff *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 10915-10919, 1992) (B) de 50, una expectativa (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas cadenas. El algoritmo BLAST (Karlin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5873-5787, 1993) y el algoritmo Gapped BLAST efectúan un análisis estadístico de la similitud existente entre dos secuencias. Una medida de la similitud, proporcionada por el algoritmo BLAST, es la probabilidad de la suma menor (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad de que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos ocurra al azar. Por ejemplo, se considera que un ácido nucleico es similar a un gen o a un ADNc si la probabilidad de la suma menor, comparando el ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia, es inferior a 1, y preferiblemente inferior a aproximadamente 0,1, más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,01, y en el caso más preferible, inferior a aproximadamente 0,001.

[0059] Tal y como se usa en el presente, el término "mimético" se refiere a un compuesto que es estéricamente similar a un compuesto de referencia. Los miméticos son equivalentes estructurales y funcionales de los compuestos de referencia.

[0060] Tal y como se usa en el presente, los términos "paciente" y "sujeto" son sinónimos y comprenden, entre otras especies posibles, las siguientes: aviares, felinos, caninos, bovinos, ovinos, porcinos, equinos, roedores, simios y seres humanos. "Célula host" comprende, por ejemplo, una célula procariótica, como, por ejemplo, una célula bacteriana, o una célula eucariótica, como, por ejemplo, una célula de mamífero (por ejemplo, de humano, de roedor, canina, felina), una célula de levadura, o una célula de planta. El término "roedores" comprende, por ejemplo, ratas y ratones.

[0061] Tal y como se usa en el presente, el término "tratamiento" se refiere a cualquier indicio de éxito de la prevención, del tratamiento o de la mejoría de una enfermedad o estado patológico. El término "tratamiento" comprende cualquier parámetro objetivo o subjetivo, como, entre otros posibles, los siguientes: mitigación, remisión, normalización de la actividad de los receptores, reducción del número o de la gravedad de los síntomas o de los efectos secundarios, o ralentización de la velocidad de degeneración o de empeoramiento del paciente. El término "tratamiento" comprende, además, una prevención de la aparición de síntomas en un paciente que puede tener un mayor riesgo de padecer, o que se sospecha que padece, una enfermedad o estado patológico, pero que aún no experimenta o aún no muestra síntomas de dicha enfermedad o dicho estado patológico.

[0062] Tal y como se usa en el presente, el término "compuesto" significa cualquier compuesto químico o molécula identificable, como, entre otras posibilidades, una molécula pequeña, un péptido, una proteína, un azúcar, un nucleótido o un ácido nucleico. Dicho compuesto puede ser natural o sintético.

[0063] Topológicamente, los GPCRs (receptores unidos a proteína G) sensoriales tienen diversos dominios: uno o más de un "dominio N-terminal" un "dominio extracelular", un "dominio transmembranal", bucles citoplásmicos y extracelulares, un "dominio intracelular", y un "dominio C-terminal" (véase, por ejemplo, Hoon *et al.*, *Cell* 96:541-551 (1999); Buck & Axel, *Cell* 65:175-187 (1991)). Dichos dominios pueden ser identificados estructuralmente usando métodos conocidos por los expertos en la técnica, como, por ejemplo, programas de análisis de secuencias que identifican los dominios hidrofóbicos e hidrofílicos (véase, por ejemplo, Stryer, *Biochemistry* (3rd ed. 1988)). Tales dominios son útiles para construir proteínas quiméricas y para los ensayos *in vitro* de la invención, como, por ejemplo, ensayos de unión a/fijación de ligandos. Se cree que, en los polipéptidos de la invención, el dominio N-terminal es extracelular, y que el dominio C-terminal es citoplásmico o intracelular.

Polinucleótidos

[0064] La invención proporciona polinucleótidos aislados y purificados (por ejemplo, ADNc, ADN genómico, ADN sintético, ARN, o combinaciones de lo antedicho, bien de cadena única, bien de cadena doble) que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de la invención. Tales polinucleótidos son útiles para expresar recombinantemente el receptor y también para detectar la expresión del receptor en las células (por ejemplo, mediante ensayos de "hibridación Northern" y ensayos de hibridación *in situ*). Tales polinucleótidos resultan asimismo útiles en el diseño de moléculas antisense y de otras moléculas para la supresión de la expresión de un receptor T1R en una célula cultivada, en un tejido, o en un animal; con finalidades terapéuticas; o a fin de proporcionar un modelo de enfermedades o estados patológicos caracterizadas/os por una expresión aberrante de T1R. Se excluyen expresamente de la definición de "polinucleótidos" de la invención los cromosomas enteros nativos, no recombinantes, aislados, de las células host. Los polinucleótidos de la invención comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEC N° ID:1 o de la SEC N° ID:99. Se entenderá que existen numerosas otras secuencias de polinucleótidos que también codifican los receptores T1R de la invención en virtud de la bien conocida naturaleza degenerativa del código genético universal. Tales polinucleótidos están incluidos dentro del ámbito de la presente invención.

5 [0066] El ADN genómico de la invención comprende la región codificadora de proteína que codifica un polipéptido de la invención, y además, está concebido de manera que comprenda variantes alélicas del mismo. Es un hecho ampliamente conocido que, en el caso de muchos genes, el ADN genómico se transcribe de manera que produce transcritos de ARN que son sometidos a uno o más eventos de “splicing”, en que los intrones (es, decir las regiones no codificadoras) de los transcritos son retirados, o recortados y eliminados. Los transcritos de ARN que pueden ser sometidos a splicing mediante mecanismos alternativos, y por lo tanto, ser sometidos a la retirada de secuencias de ARN diferentes, y aun así, seguir codificando un polipéptido de T1R, se conocen en este campo del conocimiento como “variantes obtenidas por splicing”, o simplemente “variantes de splicing”, y se encuentran dentro del ámbito de la invención. Por lo tanto, las variantes de splicing comprendidas por la invención son codificadas por las mismas secuencias de ADN genómicas originales, aunque se originen mediante transcritos de ARNm diferentes. Las variantes alélicas son formas modificadas de una secuencia génica de tipo natural, y la modificación se deriva de recombinación durante la segregación cromosómica o de exposición a condiciones que dan lugar a mutación genética. Las variantes alélicas, al igual que los genes de tipo natural, son secuencias que se dan en la naturaleza (no así las variantes que se derivan de la manipulación *in vitro* [que no se dan en la naturaleza]).

20 [0067] La invención comprende también ADNc que se obtiene mediante transcripción inversa de un polinucleótido de ARN que codifica un receptor T1R (convencionalmente seguido de la síntesis de una segunda cadena, cuya cadena es complementaria, a fin de obtener un ADN de cadena doble).

25 [0068] Una realización del ADN de la invención comprende una molécula de cadena doble, así como la molécula complementaria (la “cadena no codificadora” o “complemento”), que tiene una secuencia que se puede deducir, sin ambigüedades, de la cadena codificadora, conforme a las reglas de emparejamiento de bases de ADN de Watson y Crick.

30 [0073] Conociendo la información sobre las secuencias de nucleótidos que se proporciona en la presente invención, los expertos en la técnica pueden identificar y obtener, de diferentes fuentes (a saber, diferentes tejidos o diferentes organismos), secuencias de nucleótidos que codifican receptores T1R; dicha identificación y obtención puede realizarse mediante diversos medios bien conocidos por los expertos en la técnica y que se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989).

35 [0074] Por ejemplo, se puede obtener ADN, que codifique un receptor T1R, mediante análisis y selección de ARNm, ADNc, o ADN genómico, con sondas de oligonucleótidos generadas a partir de la información sobre las secuencias génicas del T1R que se proporciona en esta invención. Se pueden marcar sondas con un grupo detectable, como, por ejemplo, un grupo fluorescente, un átomo radioactivo o un grupo quimioluminiscente, de conformidad con los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica y que se usan en los ensayos de hibridación convencionales, como se describe, por ejemplo, en Sambrook *et al.*.

40 [0075] Alternativamente, se puede sintetizar una molécula de ácido nucleico que comprenda una secuencia de nucleótidos de T1R (secuencia de nucleótidos correspondiente al T1R) mediante el uso del procedimiento reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con los cebadores de oligonucleótidos para PCR producidos a partir de las secuencias de nucleótidos que se proporcionan en esta invención. La reacción PCR proporciona un método para aumentar selectivamente la concentración de una secuencia de ácido nucleico concreta, incluso si no se ha purificado previamente dicha secuencia e incluso si está presente únicamente en forma de una sola copia en una muestra concreta. El método puede usarse para amplificar o ADN de cadena única o ADN de cadena doble. En esencia, el método comprende el uso de dos sondas de oligonucleótidos que sirven de cebadores para la replicación, dependiente de plantilla, mediada por la polimerasa, de una molécula de ácido nucleico deseada.

50 [0076] Existe un amplio abanico de metodologías alternativas de clonación, y de amplificación *in vitro*, bien conocido por los expertos en la técnica. Se pueden encontrar ejemplos de tales técnicas en, por ejemplo, Berger *et al.*, *Guide to Molecular Cloning Techniques*, METHODS IN ENZYMOLOGY 152, Academic Press, Inc., San Diego, California, Estados Unidos de América (Berger).

55 [0077] Los polinucleótidos de la invención pueden emplearse en técnicas de hibridación conocidas por los expertos en la técnica, como, entre otras posibles, las siguientes: “Northern blotting” (hibridación Northern), “Southern blotting” (hibridación “Southern”) e hibridación “overgo” (véase más adelante). Por ejemplo, pueden usarse las sondas de polinucleótidos de la invención en estudios de distribución tisular y en ensayos diagnósticos. Es probable que los receptores T1R de la invención estén presentes y activos en tejidos que no son los que participan en la percepción gustativa. Por lo tanto, es probable que los receptores T1R felinos ejerzan varias funciones *in vivo*, como, por ejemplo, la regulación de la metabolización de los aminoácidos, además de la percepción de los sabores.

60 [0078] Pueden usarse métodos de secuenciación automatizados a fin de obtener o de verificar la secuencia de nucleótidos que codifica al receptor T1R. Se cree que las secuencias de nucleótidos de la presente invención son exactas. No obstante, como es bien conocido en este campo del conocimiento, las secuencias de nucleótidos obtenidas mediante métodos automatizados pueden contener algunos errores. Las secuencias de nucleótidos determinadas

mediante automatización son habitualmente al menos en torno a un 90%, y más habitualmente, de al menos en torno a un 95% a al menos en torno a un 99,9%, idénticas, a la secuencia de nucleótidos real de una molécula de ácido nucleico dada. La secuencia real puede determinarse con mayor precisión usando métodos de secuenciación manual, que son bien conocidos en este campo del conocimiento. Si un error en una secuencia provoca una inserción o una

5

[0079] Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención y los fragmentos derivados a partir de las mismas resultan útiles para el análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) asociados a ciertos trastornos, para el mapeado genético, y para métodos de predicción de la percepción gustativa de un organismo tal como un mamífero, y en dichos métodos, se detecta una secuencia de nucleótidos de la invención en una muestra biológica de dicho organismo. Por ejemplo, un mamífero que tenga un polinucleótido de la invención puede sentirse atraído por el sabor de uno o más aminoácidos y/o ser insensible o indiferente a uno o más

10

15

[0080] La información sobre las secuencias de polinucleótidos que se proporciona en la invención posibilita la expresión a gran escala, mediante técnicas bien conocidas y puestas en práctica rutinariamente en este campo del conocimiento, del polipéptido codificado.

20

Vectores

[0081] Otro aspecto de la presente invención se refiere a vectores, o a vectores de expresión recombinantes, que comprenden cualquiera de las moléculas de ácido nucleico que se han descrito anteriormente. En la invención, los vectores se usan para amplificar ADN o ARN que codifica un receptor T1R, y/o para expresar ADN que codifica un receptor T1R. Son ejemplos de vectores, entre otros posibles, los siguientes: plásmidos, fagos, cósmidos, episomas, partículas víricas o virus y fragmentos de ADN integrables (es decir, fragmentos que se pueden integrar en el genoma del host, mediante recombinación homóloga). Son ejemplos de partículas víricas, entre otros posibles, los siguientes: adenovirus, baculovirus, parvovirus, herpesvirus, poxvirus, virus adeno-asociados, virus de la selva de Semliki, virus de la vacuna de la viruela, y retrovirus. Son ejemplos de vectores de expresión, entre otros posibles, los siguientes: pcDNA3 (empresa fabricante: Invitrogen) y pSVL (empresa fabricante: Pharmacia Biotech). Otros vectores de expresión son, entre otros posibles, los siguientes: vectores pSPORT™, vectores pGEM™ (fabricante: Promega), vectores pPROXvectors™ (fabricante: LTI, Bethesda, MD, Estados Unidos), vectores Bluescript™ (fabricante: Stratagene), vectores pQET™ (fabricante: Qiagen), pSE420™ (fabricante: Invitrogen) y pYES2™ (fabricante: Invitrogen).

25

30

35

[0082] Los constructos de expresión pueden comprender polinucleótidos que codifican T1R, unidos operativamente a una secuencia de ADN de control de la expresión endógena o exógena, y un terminador de la transcripción. Las secuencias de ADN de control de la expresión comprenden sitios de unión a promotores, mejoradores, operadores, y elementos reguladores en general, y habitualmente se seleccionan en función de los sistemas de expresión en los que se va a utilizar el constructo de expresión. En general, las secuencias de los promotores y de los mejoradores (secuencias promotoras y mejoradoras) se seleccionan en virtud de su capacidad para aumentar la expresión génica; por su parte, en general, las secuencias de los operadores (secuencias operadoras) se seleccionan en virtud de su capacidad para regular la expresión génica. Los constructos de expresión de la invención pueden comprender también secuencias que codifiquen uno o más marcadores seleccionables que permitan la identificación de las células host que portan el constructo. Además, los constructos de expresión pueden comprender secuencias que faciliten, o que promuevan, la recombinación homóloga en una célula host. Los constructos de la invención pueden comprender también secuencias necesarias para la replicación en una célula host.

40

45

[0083] Los constructos de expresión pueden utilizarse para la producción de una proteína codificada, aunque también pueden utilizarse simplemente para amplificar una secuencia polinucleotídica que codifique el T1R. En algunas realizaciones preferidas, el vector es un vector de expresión, y en él, un polinucleótido de la invención se une operativamente a un polinucleótido que comprende una secuencia de control de la expresión. Se proporcionan, además, constructos de expresión recombinantes que se replican de manera autónoma, como, por ejemplo, vectores de ADN basados en plásmidos y vectores de ADN víricos que incorporan polinucleótidos de la invención. Algunos vectores de expresión son constructos de ADN replicables en los que una secuencia de ADN que codifica un receptor T1R se une o conecta operativamente a una secuencia o secuencias de control adecuada(s) capaz/capaces de efectuar la expresión del receptor en un host adecuado. Los vectores de amplificación no necesitan dominios de control de la expresión, sino únicamente capacidad para replicarse en un host (tal como la capacidad conferida por un origen de la replicación), y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de transformantes. La necesidad de secuencias de control en el vector de expresión varía en función del host que se seleccione y del método de transformación que se elija. Las secuencias de control comprenden un promotor de la transcripción, una secuencia operadora, opcional, para controlar la transcripción, una secuencia que codifica la unión ribosómica a ARNm adecuado y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y de la traducción.

50

55

60

[0084] Los vectores de la invención pueden contener un promotor que sea reconocido por el organismo host. Las secuencias promotoras de la presente invención pueden ser procarióticas, eucarióticas o víricas. Son ejemplos de

65

secuencias procarióticas adecuadas, entre otros posibles, los siguientes: los promotores P_R y P_L del bacteriófago lambda (THE BACTERIOPHAGE LAMBDA, Hershey, A. D., Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, Estados Unidos de América (1973), publicación que se incorpora en su totalidad a la presente invención, mediante referencia a la misma; LAMBDA II, Hendrix, R. W., Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, Estados Unidos de América (1980), publicación que se incorpora en su totalidad a la presente invención, mediante referencia a la misma), los promotores tip (TIP), recA, del choque térmico y lacZ de *E. coli*, y el promotor temprano del SV40 (Benoist *et al.*, *Nature*, 1981, 290, 304-310, publicación que se incorpora en su totalidad a la presente invención, mediante referencia a la misma). Son promotores adicionales, entre otros, los siguientes: virus del tumor mamario murino, repetición terminal larga del virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la leucemia de Maloney, promotor temprano inmediato del citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus del sarcoma de Rous, actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana y metalotioneína humana.

[0085] También pueden incluirse en los vectores de la invención secuencias reguladoras adicionales. La secuencias de Shine-Dalgarno del gen de la replicasa del fago MS-2 y del gen cII del bacteriófago lambda constituyen ejemplos de secuencias reguladoras adecuadas. La secuencia de Shine-Dalgarno puede ir seguida inmediatamente de un ADN que codifica un receptor T1R, lo que conduce a la expresión de la proteína madura.

[0086] Además, los vectores de expresión adecuados pueden comprender un marcador apropiado que haga posible el análisis y selección de células host transformadas. La transformación del host seleccionado se lleva a cabo usando cualquiera de las diversas técnicas, bien conocidas por los expertos en la técnica y que se describen en Sambrook *et al.*, (véase anteriormente en el presente documento).

[0087] También puede proporcionarse un origen de la replicación o secuencia de replicación autónoma (ARS, por sus siglas en inglés), mediante construcción del vector de manera que incluya un origen exógeno, o bien, puede ser proporcionado por el mecanismo de replicación cromosómica de la célula host (esto último puede ser suficiente si el vector se integra en el cromosoma de la célula host). Alternativamente, en vez de usar vectores que contengan orígenes de replicación víricos, los expertos en la técnica pueden transformar células de mamífero mediante el método de la cotransformación con un marcador seleccionable y ADN de T1R. Un ejemplo de un marcador adecuado es la dihidrofolato reductasa (DHFR) o la timidina quinasa (véase la patente estadounidense N° 4399216).

[0088] Son secuencias reguladoras adicionales que pueden incluirse en los polinucleótidos de la invención las señales de secreción que permiten que el polipéptido codificado atravesase, y/o se aloje en, las membranas celulares, o que sea secretado de la célula.

[0089] Las secuencias de nucleótidos que codifican un receptor T1R pueden ser recombinadas con ADN de vector con arreglo a técnicas convencionales, como, por ejemplo, extremos terminales romos o en bisel para ligamiento, digestión con enzima(s) de restricción para obtener extremos terminales apropiados, llenado de extremos cohesivos conforme sea adecuado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones no deseables, y ligamiento con ligasas apropiadas. En Sambrook *et al.* (véase anteriormente en el presente documento) se describen técnicas para tal manipulación; dichas técnicas son bien conocidas en este campo del conocimiento. Se describen métodos para la construcción de vectores de expresión en mamíferos en, por ejemplo, Okayama *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 1983, 3, 280, Cosman *et al.*, *Mol. Immunol.*, 1986, 23, 935, Cosman *et al.*, *Nature*, 1984, 312, 768, en EP-A-0367566, y en WO 91/18982.

[0090] Los vectores de la invención son útiles para expresar T1Rs en diversos sistemas celulares. La sobreexpresión de un T1R puede, por ejemplo, ser útil en el análisis/selección de antagonistas del receptor, tal y como se describe en la presente invención. La estimulación de la transcripción de polinucleótidos de T1R puede emplearse para analizar el efecto de la expresión del T1R sobre la expresión de otros receptores gustativos. Los vectores pueden utilizarse, asimismo, para producir polinucleótidos antisense que inhiban la expresión del T1R endógeno, a fin de analizar el efecto de la pérdida del gen del T1R.

Células host

[0091] Conforme a otro aspecto de la invención, se proporcionan células host, incluidas células procarióticas y células eucarióticas, que comprenden un polinucleótido de la invención (o vector de la invención), de una manera tal que permite la expresión del polipéptido T1R codificado. Se pueden introducir los polinucleótidos de la invención en la célula host como parte de un plásmido circular, o como ADN lineal que comprenda una región codificadora de proteína aislada o un vector vírico. Son métodos para la introducción de ADN en la célula host, que son bien conocidos y que se ponen en práctica rutinariamente en este campo del conocimiento, los siguientes: transformación, transfección, electroporación, inyección nuclear, o fusión con transportadores tales como liposomas, micelas, células fantasma, y protoplastos. Los sistemas de expresión de la invención comprenden sistemas de células bacterianas, de levaduras, fúngicas, de plantas, de insectos, de invertebrados, de vertebrados y de mamíferos.

[0092] La invención proporciona células host que se transforman o transfectan (de manera estable o transitoria) con polinucleótidos de la invención o con vectores de la invención. Como se ha indicado anteriormente, tales células host

son útiles para amplificar los polinucleótidos y también para expresar un polipéptido T1R o fragmento del mismo codificado por el polinucleótido.

5 [0093] En otra realización relacionada, la invención proporciona un método para la producción de un polipéptido T1R (o de un fragmento del mismo), y dicho método comprende los pasos consistentes en cultivar una célula host de la invención en un medio con nutriente(s), y en aislar el polipéptido o variante del mismo de la célula o del medio. Puesto que el receptor T1R es un polipéptido que abarca la membrana, se comprenderá que, en el caso de algunas aplicaciones, como, por ejemplo, ciertos ensayos de actividad, el aislamiento preferible puede conllevar el aislamiento de membranas celulares que contengan el polipéptido incluido en ellas, mientras que, en el caso de otras aplicaciones, puede resultar preferible un aislamiento más completo.

10 [0094] De conformidad con algunos aspectos de la presente invención, se proporcionan células host transformadas que tienen un vector de expresión que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico que se han descrito hasta aquí. La expresión de la secuencia de nucleótidos tiene lugar cuando el vector de expresión se introduce en una célula host apropiada. Son células host adecuadas para la expresión de los polipéptidos de la invención, entre otras posibles, las siguientes: procariotas, levaduras, y eucariotas. Si se emplea un vector de expresión en procariotas, entonces la célula host apropiada sería cualquier célula procariótica capaz de expresar las secuencias clonadas. Son células procarióticas adecuadas, entre otras posibles, las siguientes: bacterias de los géneros *Escherichia*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*.

15 [0095] Si se emplea un vector de expresión en eucariotas, entonces la célula host apropiada sería cualquier célula eucariótica capaz de expresar las secuencias clonadas. Las células eucarióticas pueden ser células de eucariotas superiores. Son células eucarióticas adecuadas, entre otras posibles, las siguientes: células de cultivo tisular de mamífero no humano y células de cultivo tisular humano. Las células host pueden ser, entre otras posibles: células de insecto, células HeLa, células ováricas de hámster chino (células CHO, por sus siglas en inglés), células de riñón de mono verde africano (células COS), células embrionarias de riñón humano 293 (células HEK-293, por sus siglas en inglés) y fibroblastos 3T3 murinos. La propagación de tales células en cultivos celulares ha devenido un procedimiento rutinario (véase TISSUE CULTURE, Academic Press, Kruse and Patterson, eds. (1973), publicación que se incorpora en su totalidad a la presente invención, mediante referencia a la misma).

20 [0096] Además, puede emplearse, como célula host, un host levadura (una célula de levadura). Las células de levadura pueden ser, entre otras posibles, células de los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, y *Kluveromyces*. Pueden ser hosts levadura: *S. cerevisiae* y *P. pastoris*. Los vectores de levadura pueden contener una secuencia de origen de la replicación de un plásmido de levadura 2T, una secuencia de replicación autónoma (ARS), una región promotora, secuencias para poliadenilación, secuencias para terminación de la transcripción, y un gen marcador seleccionable. Se incluyen, además, en la presente invención, vectores "shuttle" (vectores lanzadera) para la replicación en levaduras y en *E. coli*.

25 [0097] Alternativamente, pueden usarse como células host células de insecto. En algunas realizaciones, los polipéptidos de la invención se expresan usando un sistema de expresión en baculovirus (véase Luckow *et al.*, *Bio/Technology*, 1988, 6, 47; BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL, O'Reilly *et al.*, (Eds.), W.H. Freeman and Company, New York, 1992; y la patente estadounidense N° 4879236). Además, puede usarse el sistema de expresión en baculovirus completo MAXBAC™ (fabricante: Invitrogen), por ejemplo para la producción en células de insecto.

30 [0098] Las células host de la invención son una valiosa fuente de inmunógeno para el desarrollo de anticuerpos inmunorreactivos, de manera específica, con el receptor T1R. Las células host de la invención son también útiles en métodos para la producción a gran escala de polipéptidos T1R; en dichos métodos, se cultivan las células en un medio de cultivo adecuado y se aíslan los productos polipeptídicos deseados de dichas células o del medio en el que se cultivan las células, mediante métodos de purificación conocidos en este campo del conocimiento, como, por ejemplo, métodos cromatográficos convencionales, que comprenden cromatografía de inmunoafinidad, cromatografía de afinidad para receptores, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad para lectinas, cromatografía de intercambio catiónico o aniónico, cromatografía de exclusión o filtración por tamaño, cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés, también denominada "cromatografía líquida de alta presión"), HPLC de fase inversa y similares. Son otros métodos de purificación aquellos en los que la proteína deseada se expresa y se purifica como proteína de fusión que tiene una etiqueta, un marcador o una fracción quelante específico/a que es reconocido/a por un socio de unión o agente de unión específico. La proteína purificada puede ser escindida a fin de obtener la proteína deseada, o puede dejarse como proteína de fusión intacta. La escisión del componente de fusión puede producir una forma, de la proteína deseada, que tenga residuos aminoácido adicionales a consecuencia del proceso de escisión.

35 [0099] El conocimiento de la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor T1R felino hace posible modificar las células a fin de permitir, o de aumentar, la expresión del receptor endógeno. Pueden modificarse (por ejemplo, mediante recombinación homóloga) las células de modo que se obtenga una expresión aumentada, mediante el reemplazo, en su totalidad o en parte, del promotor de T1R natural (que se da en la naturaleza), con la totalidad o con parte de un promotor heterólogo, de manera que las células expresen el receptor en cantidades (niveles) mayores o menores. El

promotor heterólogo se inserta de un manera tal que se une operativamente a una secuencia codificadora del T1R endógeno. (Véanse, por ejemplo, la publicación internacional PCT N° WO 94/12650, la publicación internacional PCT N° WO 92/20808, y la publicación internacional PCT N° WO 91/09955). Asimismo, se contempla que, además de ADN promotor heterólogo, se pueda insertar ADN marcador amplificable (por ejemplo, *ada*, *dhfr*, y el gen *CAD* multifuncional que codifica la carbamoilfosfato sintetasa, la aspartato transcarbamilasa, y la dihidroorotasa) y/o ADN de intrón, junto con el ADN promotor heterólogo. La amplificación del ADN marcador mediante métodos de selección estándar, cuando dicho ADN está unido a la secuencia codificadora del T1R, produce una coamplificación de las secuencias codificadoras del T1R en las células.

10 **Animales con inhibición de la expresión (“knock-out”) y con transposición**

[0100] La información sobre secuencias de ADN proporcionada por la presente invención hace posible también el desarrollo (por ejemplo, mediante estrategias de recombinación homóloga; véase Capecchi, *Science* 244:1288-1292 (1989)) de animales transgénicos o animales sometidos a mutagénesis dirigida (“gene targeting”), incluidos, por ejemplo, animales que no expresan T1R funcional (animales “knock-out”, que significa animales con inhibición de la expresión) o que expresan una variante del mismo (esto último se denomina “transposición”). Tales animales no humanos (en especial, animales de laboratorio pequeños tales como ratas, conejos, ratones y gatos) resultan útiles como modelos para estudiar las actividades *in vivo* de los receptores T1R y de los moduladores de los receptores T1R.

20 **“Antisense” y ARNsi**

[0101] Los polinucleótidos “antisense” y “cortos interferentes” pueden reconocer polinucleótidos que codifican los receptores T1R de la invención, e hibridarse con dichos polinucleótidos. Son moléculas antisense de fragmentos de la invención: (i) las que reconocen específicamente y se hibridan específicamente con ARN de T1R (conforme a lo que se determina mediante la comparación entre las secuencias del ADN que codifica el receptor T1R y de ADN que codifica otras moléculas conocidas). La identificación de las secuencias exclusivas de polinucleótidos que codifican el T1R puede deducirse, mediante el uso de cualquier base de datos de secuencias que esté disponible públicamente, y/o mediante el uso de programas, disponibles comercialmente, de comparación de secuencias. Tras la identificación de las secuencias deseadas, puede efectuarse aislamiento mediante digestión con enzimas de restricción o amplificación usando cualquiera de las diversas técnicas de reacción en cadena de la polimerasa, bien conocidas en este campo del conocimiento. Los polinucleótidos antisense son particularmente relevantes para la regulación de la expresión del receptor T1R por parte de las células que expresan ARNm de T1R.

[0102] Se introduce en las células (por ejemplo, mediante un vector vírico o un sistema de dispersión coloidal tal como un liposoma) ácidos nucleicos antisense (preferiblemente, oligonucleótidos de a 10 a 30 pares de bases) capaces de unirse específicamente a secuencias de control de la expresión del T1R o a ARN de T1R. El ácido nucleico antisense se une a la secuencia de nucleótidos diana, en la célula, e impide la transcripción y/o la traducción de la secuencia diana. En la presente invención se contemplan, específicamente para uso terapéutico, oligonucleótidos antisense con fosforotioato y metilfosfonato. Además, en la presente invención se contemplan, específicamente para uso terapéutico, ácidos nucleicos bloqueados. (Véase, por ejemplo, Wahlestedt *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(10), 5633-5638 (2000). Se puede modificar los oligonucleótidos antisense, además, añadiendo poli-L-lisina, transferrina con polilisina, o fracciones colesterol en los extremos 5' de dichos oligonucleótidos antisense. La supresión de la expresión del T1R, a nivel transcripcional o a nivel traduccional, es útil para generar modelos celulares o animales de enfermedades/estados patológicos caracterizados por una expresión aberrante de T1R.

[0103] Los oligonucleótidos antisense respecto de la secuencia de nucleótidos de la SEC N° ID:1, SEC N° ID:99, o los fragmentos de dicha secuencia de nucleótidos, o las secuencias complementarias u homólogas de lo antedicho, derivadas de las secuencias de nucleótidos de la presente invención que codifican receptores T1R, son útiles como herramientas diagnósticas para sondear (analizar mediante sondas) la expresión génica en diversos tejidos. Por ejemplo, el tejido puede sondearse *in situ* con sondas de oligonucleótidos que porten grupos detectables, mediante técnicas autorradiográficas convencionales, a fin de investigar la expresión nativa de esta enzima o trastornos patológicos relacionados con la misma. Se pueden dirigir oligonucleótidos antisense hacia las regiones reguladoras de una secuencia de nucleótidos de T1R, o hacia ARNm correspondiente a las mismas, incluidas, entre otras posibilidades, el codón de iniciación, la caja TATA, secuencias mejoradoras, y similares.

[0104] Los expertos en la técnica sabrán que los oligonucleótidos antisense que inhiben la expresión y/o la actividad biológica de un receptor T1R de la invención pueden predecirse usando cualquier gen que codifique un receptor T1R. Concretamente, las moléculas de ácido nucleico antisense comprenden una secuencia preferiblemente complementaria de al menos unos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 250 ó 500 nucleótidos o de una secuencia entera del gen del receptor T1R. Los oligonucleótidos antisense pueden comprender una secuencia complementaria de unos 15 nucleótidos consecutivos de la cadena codificadora de la secuencia que codifica el receptor T1R.

[0105] Una molécula de ácido nucleico antisense es “antisense” (está en sentido contrario) respecto de una “región codificadora” de la cadena codificadora de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína T1R. La cadena codificadora puede comprender también regiones reguladoras de la secuencia del T1R. El término “región codificadora” se refiere a la región de la secuencia de nucleótidos que comprende codones que se traducen a residuos aminoácido.

En otra realización, la molécula de ácido nucleico antisense es "antisense" de una "región no codificadora" de la cadena codificadora de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína T1R. El término "región no codificadora" se refiere a secuencias 5' y 3' que flanquean a la región codificadora que no son traducidas a aminoácidos (también denominadas regiones no traducidas (UTR, por sus siglas en inglés) 5' y 3').

5 [0106] Se pueden dirigir oligonucleótidos antisense hacia las regiones reguladoras de una secuencia de nucleótidos que codifique una proteína T1R, o hacia ARNm correspondiente a las mismas, incluidas, entre otras posibilidades, el codón de iniciación, la caja TATA, secuencias mejoradoras, y similares. Dadas las secuencias de cadenas codificadoras que se proporcionan en la presente invención, pueden diseñarse ácidos nucleicos antisense de la invención conforme a
10 las reglas de emparejamiento de bases de Watson y Crick o de Hoogsteen. La molécula de ácido nucleico antisense puede ser complementaria de la totalidad de la región codificadora de un ARNm de T1R, aunque también puede ser un oligonucleótido que sea antisense solamente respecto de una porción de la región codificadora o de la región no codificadora del ARNm. Por ejemplo, el oligonucleótido antisense puede ser complementario de la región circundante al sitio de inicio de la traducción de un ARNm. Un oligonucleótido antisense puede tener, por ejemplo, unos 5, 10, 15, 20,
15 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 nucleótidos de longitud.

[0107] Otra manera de inhibir la actividad de un receptor T1R conforme con la invención es mediante interferencia de ARN (iARN) (véase, por ejemplo, Elbashir *et al.*, *Nature*, 411:494-498 (2001); Elbashir *et al.*, *Genes Development*,
20 15:188-200 (2001)). La iARN es el proceso de silenciamiento de genes (silenciamiento génico) postranscripcional, específico de secuencia, iniciado por un ARN de cadena doble (ARNds) que es homólogo, en cuanto a secuencia, del gen que se silencia (por ejemplo, es homólogo, en cuanto a secuencia, de la secuencia que codifica un receptor T1R, como, por ejemplo, entre otras secuencias posibles, la secuencia descrita en la SEC N° ID:1 o en la SEC N° ID:99). Se cree que el silenciamiento mediado por ARNsi (ARN corto interferente) ocurre postranscripcionalmente (después de la transcripción) y/o transcripcionalmente (en el momento de la transcripción). Por ejemplo, dúplex de ARNsi pueden
25 mediar el silenciamiento génico postranscripcional mediante reconstitución de complejos ARNsi-proteína (RNPSi), que guían el reconocimiento del ARNm y la escisión dirigida.

[0108] En consonancia, otra forma de un compuesto inhibidor del T1R de la invención es un ARNsi que tiene como diana una secuencia que codifica el T1R. Son ARNsi ejemplares los dúplex de ARNsi (por ejemplo, 10-25,
30 preferiblemente 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 residuos de longitud) que tienen una secuencia que sea homóloga de o idéntica a un fragmento de la secuencia T1R descrita como SEC N° ID:1 o SEC N° ID:63, y que tenga una secuencia sobresaliente 3' simétrica, de 2 nucleótidos. La secuencia sobresaliente 3' de 2 nucleótidos puede estar compuesta de (2'-desoxi)timidina, dado que ésta reduce los costes de la síntesis de ARN y puede aumentar la resistencia de los ARNsi a la nucleasa en el medio del cultivo celular y dentro de las células transfectadas. La sustitución de la uridina con
35 timidina en la secuencia sobresaliente 3' es también bien tolerada en las células de mamífero, y la secuencia de la secuencia sobresaliente parece no contribuir al reconocimiento de la diana.

Polipéptidos

40 [0109] La invención proporciona asimismo polipéptidos y dímeros de receptor T1R felino, purificados e aislados. Los polipéptidos T1R de la invención pueden ser codificados por un polinucleótido de la invención. Algunas realizaciones incluyen un polipéptido T1R felino que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC N° ID:2. Los receptores T1R pueden formar homodímeros o heterodímeros en los botones gustativos, y en otros tejidos, a fin de detectar ("saborear")
45 moléculas. La invención comprende también formas homodiméricas y heterodiméricas de receptores T1R, y en ellas, una molécula de receptor T1R se asocia con una molécula de T1R1, T1R2 o T1R3. Cuando aquí se hace referencia a "epítipo específico de" o a "epítipo específico de polipéptido", o variaciones de lo antedicho, ello significa/indica que una porción del receptor T1R, de la secuencia de aminoácidos del receptor T1R, o del dímero de T1R es reconocible por un anticuerpo que es específico del T1R o de la secuencia de aminoácidos del T1R.

50 [0110] Incluidos dentro del ámbito de la invención están polipéptidos codificados por variantes alélicas felinas del T1R. Las variantes alélicas del receptor T1R de la invención pueden modificar la percepción gustativa de un mamífero, por ejemplo, de un gato, en respuesta a un estímulo gustativo. Tales modificaciones de la secuencia de aminoácidos funcional podrían ser responsables de las diferencias en la percepción gustativa intraespecie (por ejemplo, percepción gustativa específica de raza).
55

[0113] Los polipéptidos de la invención pueden aislarse de fuentes celulares naturales o pueden sintetizarse químicamente, pero preferiblemente se producen mediante procedimientos de recombinación en los que se usan células host de la invención. Es de esperar que el uso de células host de mamífero proporcione las modificaciones postraduccionales (por ejemplo, glicosilación, truncado, lipidación, fosforilación) que puedan ser necesarias para conferir
60 una actividad biológica óptima a los productos de expresión recombinantes de la invención.

[0114] La invención engloba también polipéptidos T1R variantes. En un ejemplo, se proporcionan variantes de inserción, en las que uno o más residuos aminoácido suplementan una secuencia de aminoácidos de T1R tal como la SEC N° ID:2. Las inserciones pueden ubicarse en uno de los extremos terminales o en ambos extremos terminales de la proteína, o pueden ubicarse dentro de regiones internas de la secuencia de aminoácidos. Las variantes insercionales
65

con residuos adicionales en cada extremo terminal o en ambos extremos terminales pueden incluir, por ejemplo, proteínas de fusión y proteínas que comprendan etiquetas o marcadores de aminoácidos.

5 [0115] Las variantes de inserción incluyen polipéptidos T1R, y se añaden uno o más residuos aminoácido a un fragmento biológicamente activo de dichos polipéptidos. Por ejemplo, las variantes de inserción de la invención incluyen receptores T1R quiméricos, en los que está presente al menos un dominio funcional de un receptor T1R felino de la invención.

10 [0116] La invención engloba también variantes de T1R que tienen residuos aminoácido adicionales derivados del uso de sistemas de expresión específicos. Por ejemplo, el uso de vectores disponibles comercialmente que expresan un polipéptido deseado como parte de un producto de fusión de la glutation-S-transferasa (GST) proporciona el polipéptido deseado que tiene un residuo glicina adicional en la posición -1 tras la escisión del componente GST del polipéptido deseado. También se contemplan variantes originadas a partir de la expresión en otros sistemas de vectores.

15 [0117] En otro aspecto, la invención proporciona variantes con deleciones, en las que son eliminados uno o más residuos aminoácido de un polipéptido T1R. Las deleciones pueden ser efectuadas en uno o ambos extremos terminales del polipéptido T1R, o mediante la eliminación de uno o más residuos aminoácidos no terminales del T1R. Por eso, las variantes con deleciones comprenden todos los fragmentos de un polipéptido T1R.

20 [0120] En otro aspecto, la invención proporciona variantes con sustituciones de polipéptidos T1R. Las variantes con sustituciones incluyen aquellos polipéptidos en los que se eliminan uno o más residuos aminoácido de un polipéptido T1R y son sustituidos con residuos alternativos. En un aspecto de la invención, las sustituciones son de naturaleza conservadora; no obstante, la invención también engloba sustituciones que no son conservadoras. Las sustituciones conservadoras acordes a dicho aspecto pueden definirse de la manera indicada en las Tablas 1, 2 ó 3 que se muestran más adelante.

30 [0121] Las variantes de polipéptido comprenden aquellas en las que se han introducido sustituciones conservadoras mediante modificación de polinucleótidos que codifican polipéptidos de la invención. Los aminoácidos pueden clasificarse con arreglo a propiedades físicas y con arreglo a la contribución a la estructura secundaria y terciaria de las proteínas. En este campo del conocimiento, se denomina sustitución a una sustitución de un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades similares. Se muestran sustituciones conservadoras ejemplares en la Tabla 1 (tomada de WO 97/09433, página 10, publicada el 13 de marzo de 1997 (PCT/GB96/02197, registrada el 6/9/96)), la cual se muestra a continuación.

35 **Tabla 1**

Sustituciones conservadoras I

40	<u>CARACTERÍSTICA DE LA CADENA LATERAL</u>	<u>AMINOÁCIDO</u>
	Alifática	
	No polar	G A P I L V
45	Polar - sin carga	C S T M N Q
	Polar - con carga	D E K R
50	Aromática	H F W Y
	Otra	N Q D E

Alternativamente, los aminoácidos conservadores pueden agruparse conforme a lo descrito en *Lehninger* [BIOCHEMISTRY, Second Edition; Worth Publishers, Inc. NY, NY (1975), páginas 71-77], tal y como se indica en la Tabla 2 que se muestra a continuación.

55 **Tabla 2**

Sustituciones conservadoras II

60	<u>CARACTERÍSTICA DE LA CADENA LATERAL</u>	<u>AMINOÁCIDO</u>
	No polar (hidrófoba)	
	A. Alifática:	A L I V P
	B. Aromática	F W
65	C. Contiene azufre:	M
	D. Caso particular:	G

	Sin carga-polar	
	A. Hidroxilo:	S T Y
	B. Amidas:	N Q
	C. Sulfhidrilo:	C
5	D. Caso particular	G
	Cargada positivamente (básica)	K R H
	Cargada negativamente (ácida)	D E

10

Como otra alternativa, se indican sustituciones conservadoras ejemplares en la Tabla 3 que se muestra a continuación.

Tabla 3

15 **Sustituciones conservadoras III**

	Residuo original	Sustitución ejemplar
20	Ala (A)	Val, Leu, Ile
	Arg (R)	Lys, Gln, Asn
	Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
	Asp (D)	Glu
	Cys (C)	Ser
25	Gln (Q)	Asn
	Glu (E)	Asp
	His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
	Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe,
	Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
30	Lys (K)	Arg, Gln, Asn
	Met (M)	Leu, Phe, Ile
	Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
	Pro (P)	Gly
	Ser (S)	Thr
35	Thr (T)	Ser
	Trp (W)	Tyr
	Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
	Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

40

[0122] Debe comprenderse que la definición de "polipéptidos de la invención" está concebida de manera que incluya polipéptidos que tengan modificaciones que no sean la inserción, delección o sustitución de residuos aminoácido. A modo de ejemplo, las modificaciones pueden ser de naturaleza covalente, e incluir, por ejemplo, la unión química a polímeros, lípidos, otras fracciones orgánicas y fracciones inorgánicas. Tales derivados pueden prepararse a fin de aumentar la vida media circulante (en circulación) de un polipéptido, o pueden diseñarse de manera que aumenten la capacidad de direccionamiento del polipéptido hacia las células deseadas o los tejidos u órganos deseados. De modo similar, la invención engloba, además, polipéptidos T1R que hayan sido modificados covalentemente de manera que incluyan una o más uniones a/de polímeros solubles en agua, tales como polietilenglicol, polioxietilenglicol, o polipropilenglicol. Las variantes que muestran las propiedades de unión a ligandos del T1R nativo y que se expresan en cantidades mayores, así como las variantes que posibilitan receptores constitutivamente activos, son particularmente útiles en los ensayos de la invención; las variantes son también útiles para posibilitar modelos, celulares, tisulares y animales, de enfermedades/estados patológicos que se caracterizan por una actividad aberrante del T1R.

45

50

[0123] Los polipéptidos purificados de la invención pueden proporcionarse en forma de una composición. Algunas composiciones comprenden, además del polipéptido de la invención, un diluyente líquido, semisólido o sólido, farmacéuticamente aceptable (es decir, estéril y no tóxico) que actúa como vehículo, excipiente o medio farmacéutico. Puede emplearse cualquier diluyente conocido en este campo del conocimiento. Son diluyentes ejemplares, entre otros posibles, los siguientes: agua, soluciones salinas, polioxietilén-sorbitán monolaurato, estearato magnésico, metil- y propil-hidroxibenzoato, talco, alginatos, almidones, lactosa, sacarosa, dextrosa, sorbitol, manitol, glicerol, fosfato cálcico, aceite mineral y manteca de cacao.

60

[0124] Las variantes que muestran las propiedades de unión a ligandos del T1R nativo y que se expresan en cantidades mayores, así como las variantes que posibilitan receptores constitutivamente activos, son particularmente útiles en los ensayos de la invención; las variantes son también útiles en los ensayos de la invención y para posibilitar modelos celulares, tisulares y animales de enfermedades/estados patológicos que se caracterizan por una actividad aberrante del T1R.

65

Anticuerpos

[0125] La presente invención comprende también anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos de cadena única, anticuerpos quiméricos, anticuerpos bifuncionales/biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos felinizados, anticuerpos felinos, y anticuerpos injertados con regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), que incluyen compuestos que incluyen secuencias de CDR que reconocen específicamente un polipéptido de la invención) específicos de un receptor T1R de la invención, de un fragmento del mismo, o de dímeros de los receptores T1R de la invención (por ejemplo, dímeros T1R1-T1R3; dímeros T1R2-T1R3; y dímeros T1R3-T1R3). El término “específico de”, cuando se usa en el presente para describir anticuerpos de la invención, indica que las regiones variables de los anticuerpos reconocen, y se unen a, polipéptidos T1R, preferiblemente de manera exclusiva (es decir, que son capaces de distinguir a los polipéptidos T1R de la invención de otros polipéptidos conocidos, en virtud de diferencias mensurables en la afinidad de unión, pese a la posible existencia de una identidad, homología o similitud, localizada, entre las secuencias de T1R y las secuencias de tales polipéptidos). Se comprenderá que los anticuerpos específicos también pueden interactuar con otras proteínas (por ejemplo, con la proteína A de *S. aureus* o con otros anticuerpos en las técnicas ELISA) mediante interacciones con secuencias situadas fuera de la región variable de los anticuerpos y, en particular, en la región constante de la molécula. Son bien conocidos, y se ponen en práctica rutinariamente en este campo del conocimiento, ensayos de análisis/selección con los que se determina la especificidad de unión de un anticuerpo de la invención. Para una descripción muy completa de tales ensayos, véase Harlow *et al.*, (Eds.), ANTIBODIES A LABORATORY MANUAL; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), Chapter 6. Pueden producirse los anticuerpos de la invención usando cualquier método bien conocido y puesto en práctica rutinariamente en este campo del conocimiento.

[0126] La descripción proporciona un anticuerpo que es específico de los receptores T1R felinos de la invención. Se considera que los anticuerpos que se pueden generar a partir de polipéptidos que hayan sido descritos con anterioridad en la literatura científica y que son capaces de establecer reacciones cruzadas, fortuitamente, con el receptor T1R felino (por ejemplo, a causa de la existencia fortuita de un epítipo similar en ambos polipéptidos), son anticuerpos “que reaccionan de manera cruzada”. Tales anticuerpos que reaccionan de manera cruzada no son anticuerpos que sean “específicos” de un receptor T1R felino. La determinación de si un anticuerpo es específico de un receptor T1R felino o de si reacciona de manera cruzada con otro receptor conocido se lleva a cabo mediante cualquiera de varios ensayos, como, por ejemplo, ensayos de “Western blotting”, que son bien conocidos en este campo del conocimiento. Para identificar células que expresan un receptor T1R, y también para modular la actividad de unión a ligandos del T1R, se pueden usar anticuerpos que se unan específicamente a un epítipo extracelular del receptor T1R.

[0127] En algunas realizaciones de la invención, los anticuerpos se unen específicamente a polipéptidos T1R, o impiden que ligandos o socios de unión se unan a los polipéptidos T1R (bloquean la unión de tales ligandos o socios de unión). Dichos anticuerpos también pueden bloquear la actividad biológica de los polipéptidos T1R. En otros casos, los anticuerpos se unen preferencialmente a polipéptidos T1R de una especie o familia determinada de polipéptidos T1R.

[0128] En algunas variaciones, la invención proporciona anticuerpos monoclonales. Se considera que los hibridomas que producen tales anticuerpos son también aspectos de la invención. En otra variación, la invención proporciona un anticuerpo felinizado. Los anticuerpos felinizados son útiles para indicaciones terapéuticas *in vivo*.

[0130] En otra realización relacionada, la invención proporciona un anticuerpo anti-idiotipo, específico de un anticuerpo que es específico del receptor T1R de la invención.

[0132] Se pueden felinizar, mediante cualquiera de los métodos conocidos en este campo del conocimiento, anticuerpos no felinos. En un método, se insertan CDR no felinas en un anticuerpo felino o en la secuencia consenso del marco de un anticuerpo felino. De modo similar, se pueden humanizar, mediante cualquiera de los métodos conocidos en este campo del conocimiento, anticuerpos no humanos. En un método, se insertan CDR no humanas en un anticuerpo humano o en la secuencia consenso del marco de un anticuerpo humano. Después, pueden introducirse cambios adicionales en el marco del anticuerpo, a fin de modular la afinidad o la inmunogenicidad.

[0133] Los anticuerpos de la invención son útiles, por ejemplo, con finalidades terapéuticas (como, por ejemplo, mediante la modulación de la actividad del receptor T1R), con finalidades diagnósticas (como, por ejemplo, detección o cuantificación de la actividad del receptor T1R), y también para la purificación del receptor T1R. También están dentro del ámbito de la invención kits que comprendan un anticuerpo de la invención, con cualquiera de las finalidades que aquí se describen. En general, un kit de la invención incluye, preferiblemente, un antígeno de control, respecto del que el anticuerpo es inmunoespecífico.

Composiciones

[0134] En algunos estados patológicos relacionados con el T1R subyacen mutaciones en el gen del T1R felino que provocan una pérdida de la función normal del producto del gen del T1R. La terapia génica y con péptidos, por ejemplo, puede restaurar la actividad del T1R, a fin de tratar dichos estados patológicos. Se hace llegar *ex vivo*, *in situ* o *in vivo* un gen del T1R funcional a las células adecuadas, mediante el uso de vectores, y más particularmente vectores víricos (por ejemplo, adenovirus, virus adeno-asociados o retrovirus), o *ex vivo* mediante el uso de métodos de transferencia

física de ADN (por ejemplo, liposomas o tratamientos químicos). Véase, por ejemplo, Anderson, *Nature*, supplement to vol. 392, No. 6679, páginas 25-20 (1998). Para consultar descripciones adicionales de la tecnología de terapia génica, véase Friedmann, *Science*, 244: 1275-1281 (1989); Verma, *Scientific American*: 68-84 (1990); y Miller, *Nature*, 357: 455-460 (1992). Alternativamente, se prevé que, en otros estados patológicos, la prevención de la expresión del receptor T1R, o la inhibición de la actividad del receptor T1R, serán útiles en el tratamiento. Se contempla que la "terapia antisense" (terapia con ácidos nucleicos antisense) o la terapia génica podrían aplicarse para regular negativamente la expresión del receptor T1R.

[0135] Las composiciones, incluidas las composiciones farmacéuticas, útiles en tales métodos pueden comprender cualquiera de las moléculas de ácido nucleico o vectores de expresión recombinantes que se han descrito aquí anteriormente, así como un transportador o diluyente aceptable. El transportador o diluyente puede ser farmacéuticamente aceptable. Se describen transportadores adecuados en la edición más reciente de *Remington's Pharmaceutical Sciences*, A. Osol, que es un texto de referencia estándar en este campo. Son ejemplos de tales transportador o diluyentes, entre otros posibles, los siguientes: agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y seroalbúmina al 5%. También pueden emplearse liposomas y vehículos no acuosos, tales como los aceites fijos. Las formulaciones pueden esterilizarse mediante técnicas usadas comúnmente.

[0136] También se encuentran dentro del ámbito de la invención las composiciones que comprenden polipéptidos, polinucleótidos o anticuerpos de la invención, y que se hayan formulado con, por ejemplo, un transportador farmacéuticamente aceptable.

[0137] Pueden usarse los anticuerpos de la invención en un método para modular la unión a ligandos de un receptor T1R, que comprende el paso de poner en contacto el receptor con un anticuerpo específico del polipéptido T1R, en condiciones en las que el anticuerpo se une al receptor.

Métodos para identificar ligandos y moduladores

[0138] La invención proporciona también ensayos con los que identificar compuestos que se unen al receptor T1R y/o que lo modulan. Un "socio de unión al T1R" es un compuesto que fija, directa o indirectamente, un polipéptido T1R de la invención. Un ensayo de la invención comprende los pasos de: (a) poner en contacto el receptor T1R o un dímero de T1R de la invención con un compuesto que se sospecha que se une al receptor T1R o dímero de T1R (el compuesto de prueba); y (b) medir la unión entre dicho compuesto y el receptor T1R o dímero de T1R. En una variación, la composición comprende una célula que expresa el receptor T1R o el dímero de T1R en su superficie. En otra variación, se emplea el receptor T1R o dímero de T1R aislado, o membranas celulares que comprenden el receptor T1R o dímero de T1R. La unión puede medirse directamente, por ejemplo, usando un compuesto marcado, o puede medirse indirectamente. Los compuestos identificados como compuestos que se unen a un receptor T1R o a un dímero de T1R pueden someterse a pruebas, adicionalmente, en otros ensayos como, entre otros posibles, ensayos de la actividad del T1R y/o modelos *in vivo*, a fin de confirmar o cuantificar su actividad.

[0139] Se pueden identificar o desarrollar, usando variantes del T1R, productos de T1R aislados o recombinantes o, preferiblemente, células que expresan tales productos, moléculas de unión específicas, como, por ejemplo, ligandos naturales y compuestos sintéticos. Los socios de unión son útiles para purificar productos de T1R y para detectar o cuantificar productos de T1R en muestras de tejidos y fluidos, usando procedimientos inmunológicos conocidos. Las moléculas de unión son también manifiestamente útiles en la modulación (es decir, bloqueo, inhibición o estimulación) de las actividades biológicas del T1R; en especial, de las actividades implicadas en la transducción de señales. Las moléculas de unión son también útiles en métodos para la predicción de la percepción gustativa de un organismo tal como un mamífero mediante la detección de un polipéptido de la invención en una muestra biológica del organismo. Por ejemplo, un organismo en el que se ha identificado un polipéptido de la invención puede resultar atraído por el sabor de los aminoácidos y/o ser indiferente al sabor de los endulzantes tipo carbohidrato y endulzantes de alta intensidad.

[0140] La información sobre secuencias de ADN y sobre secuencias de aminoácidos proporcionada por la presente invención hace también posible la identificación de los compuestos socios de unión con los que interaccionará un polipéptido T1R o polinucleótido de T1R. Los métodos para la identificación de compuestos socios de unión incluyen ensayos en soluciones, ensayos *in vitro*, en los que se inmovilizan polipéptidos T1R y ensayos basados en células. La identificación de compuestos socios de unión de los polipéptidos T1R proporciona candidatos para la intervención terapéutica o profiláctica en patologías asociadas a la actividad biológica normal y aberrante del T1R.

[0141] La invención incluye varios sistemas de ensayo para la identificación de los socios de unión al (del) T1R. En ensayos en soluciones, los métodos de la invención comprenden los pasos de: (a) poner en contacto un receptor T1R o dímero de T1R con uno o más compuestos socios de unión candidatos; y (b) identificar los compuestos que se unen al receptor T1R o al dímero de T1R. La identificación de los compuestos que se unen al receptor T1R o al dímero de T1R se puede lograr aislando el complejo polipéptido T1R/socio de unión, y separando el compuesto socio de unión del polipéptido T1R. Un paso adicional consistente en la caracterización de las propiedades físicas, biológicas y/o bioquímicas del compuesto socio de unión está también comprendido en otra realización de la invención. En un aspecto de la invención, se aísla el complejo polipéptido T1R/socio de unión usando un anticuerpo inmunoespecífico del receptor T1R o dímero de T1R o del compuesto socio de unión candidato.

[0142] En otras realizaciones adicionales, el receptor T1R o dímero de T1R, o el compuesto socio de unión candidato, comprende un marcador o una etiqueta que facilita su aislamiento, y los métodos de la invención para la identificación de compuestos socios de unión incluyen un paso de aislamiento del complejo polipéptido T1R/socio de unión mediante la interacción con el marcador o etiqueta. Una etiqueta ejemplar de este tipo es una secuencia polihistidina – generalmente, de en torno a seis residuos histidina– que permite el aislamiento de un compuesto así marcado usando quelación de níquel. En la invención se adoptan otros marcadores y etiquetas, bien conocidos y que se ponen en práctica rutinariamente en este campo del conocimiento, tales como la etiqueta FLAG® (fabricante: Eastman Kodak, Rochester, Nueva York, Estados Unidos de América).

[0143] En lo que constituye una variación de un ensayo *in vitro*, la invención proporciona un método que comprende los pasos de: (a) poner en contacto un receptor T1R o dímero de T1R, inmovilizado, con un compuesto socio de unión candidato; y (b) detectar la unión del compuesto candidato al receptor T1R o dímero de T1R. En una realización alternativa, se inmoviliza el compuesto socio de unión candidato y se detecta la unión al receptor T1R o dímero de T1R. La inmovilización se logra usando cualquiera de los métodos bien conocidos en este campo del conocimiento, incluidas la unión covalente a un soporte, a una perla o a una resina cromatográfica, así como las interacciones de alta afinidad, no covalentes, tales como la unión a anticuerpos, o el uso de la unión con estreptavidina-biotina, en la que el compuesto inmovilizado incluye una fracción biotina. El soporte puede, por ejemplo, formularse dentro de una “lengua electrónica” (o biosensor) específica(o) de gato. La detección de la unión puede lograrse: (i) aplicando un marcador radiactivo al compuesto no inmovilizado; (ii) aplicando un marcador fluorescente al compuesto no inmovilizado; (iii) usando un anticuerpo inmunoespecífico del compuesto no inmovilizado; (iv) aplicando un marcador, al compuesto no inmovilizado, que excite un soporte fluorescente al que se fija el compuesto inmovilizado, así como otras técnicas bien conocidas y puestas en práctica rutinariamente en la técnica.

[0144] Para identificar compuestos socios de unión de un receptor T1R o dímero de T1R, se pueden usar ensayos basados en células. En una realización, la invención proporciona un método que comprende los pasos consistentes en poner en contacto, con un compuesto socio de unión candidato, un receptor T1R o dímero de T1R expresado en la superficie de una célula, y en detectar la unión del compuesto socio de unión candidato al receptor T1R o dímero de T1R. En algunas realizaciones, la detección comprende detectar, en la célula, el evento o eventos fisiológicos ocasionados por la unión de la molécula.

[0145] Otro aspecto de la presente invención se encamina a métodos de identificación de compuestos que se unen al receptor T1R o dímero de T1R, o a moléculas de ácido nucleico que codifican el receptor T1R, y dichos métodos comprenden poner en contacto un receptor T1R o dímero de T1R, o una molécula de ácido nucleico que codifica dicho receptor T1R, con un compuesto, y determinar si el compuesto se une al receptor T1R o dímero de T1R, o a una molécula de ácido nucleico que codifica dicho receptor T1R. La unión puede determinarse mediante ensayos de unión que son bien conocidos por los expertos en la técnica, incluidos, entre otros posibles, los siguientes: ensayos de desplazamiento en gel, ensayos de “Western blotting”, ensayos de competición usando radiomarcadores, clonación mediante expresión basada en fagos, cofraccionamiento por cromatografía, coprecipitación, enlaces cruzados, análisis de trampa de interacciones/de doble híbrido, análisis “Southwestern”, ELISA y similares, que se describen en, por ejemplo, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1999, John Wiley & Sons, Nueva York, Estados Unidos de América. Los compuestos a analizar incluyen (lo que puede incluir compuestos que se sospecha que se unen a un receptor T1R o dímero de T1R, o a una molécula de ácido nucleico que codifica dicho receptor T1R), entre otros posibles, compuestos de origen extracelular, de origen intracelular, de origen biológico, o de origen químico. Los métodos de la invención engloban también ligandos que se unen a un marcador, como, por ejemplo, a un radiomarcador (por ejemplo, ¹²⁵I, ³⁵S, ³²P, ³³P, ³H), a un marcador fluorescente, a un marcador quimioluminiscente, a un marcador enzimático, a un marcador inmunogénico. Son moduladores que se encuentran dentro del ámbito de la invención, entre otros posibles, los siguientes: moléculas no peptídicas tales como miméticos no peptídicos, efectores alostéricos no peptídicos y péptidos. El polipéptido T1R o dímero de T1R o polinucleótido de T1R empleado en una prueba tal puede estar libre en una solución, o acoplado a un soporte sólido, o portado en una superficie celular o situado intracelularmente, o asociado a una porción de una célula. Los expertos en la técnica pueden, por ejemplo, medir la formación de complejos integrados por el receptor T1R, dímero de T1R o polinucleótido de T1R, y el compuesto que se somete a prueba. Alternativamente, los expertos en la técnica pueden examinar la disminución en la formación de complejos integrados por el receptor T1R, dímero de T1R o polinucleótido de T1R y su sustrato, ocasionada por el compuesto que se somete a prueba. En algunas realizaciones de la invención, los sitios de reconocimiento del receptor T1R, dímero de T1R o polinucleótido de T1R se unen a un sistema de monitorización (eléctrico u óptico). Un estímulo químico adecuado puede unirse al dominio de unión a ligandos del receptor, y cambiar la conformación del receptor hasta un grado tal que permita observar, en una lectura, los cambios correspondientes en el sistema electrónico u óptico acoplado (cambios electrónicos u ópticos). Podría desarrollarse un dispositivo tal, en forma de una “lengua electrónica” específica de gato, por ejemplo.

[0146] En otra realización de la invención, se emplea análisis y selección, de alto rendimiento (HTS, por sus siglas en inglés), de compuestos que tengan una afinidad de unión adecuada por el receptor T1R o dímero de T1R. En resumen, se sintetizan sobre un sustrato sólido grandes cantidades de diferentes compuestos peptídicos pequeños de prueba. Los compuestos peptídicos de prueba se ponen en contacto con el receptor T1R o dímero de T1R, y se lavan. Entonces, el receptor T1R o dímero de T1R unido se detecta mediante métodos bien conocidos en este campo del

conocimiento. Pueden también revestirse directamente, con polipéptidos purificados de la invención, placas para uso en las mencionadas técnicas de análisis y selección de fármacos. Además, se pueden usar anticuerpos no neutralizadores para capturar la proteína e inmovilizarla sobre el soporte sólido.

5 [0147] En general, para los ensayos de unión de alto rendimiento (HTS) se puede usar un receptor T1R expresado, en
 10 conjunción con un ligando, tal como un aminoácido o un carbohidrato. El péptido identificado se marca con un
 radioisótopo adecuado, como, por ejemplo, I, H, S o P, mediante métodos que son bien conocidos por los expertos en la
 técnica. Alternativamente, se pueden marcar los péptidos, mediante métodos bien conocidos, con un derivado
 15 fluorescente adecuado (Baindur *et al.*, *Drug Dev. Res.*, 1994, 33, 373-398; Rogers, *Drug Discovery Today*, 1997, 2, 156-
 160). El ligando radiactivo unido específicamente al receptor, en preparaciones de membranas elaboradas a partir de la
 línea celular que expresa la proteína recombinante, puede detectarse en ensayos HTS de una de diversas maneras
 estándar, incluida la filtración del complejo receptor-ligando a fin de separar el ligando unido del ligando no unido
 (Williams, *Med. Res. Rev.*, 1991, 11, 147-184; Sweetnam *et al.*, *J. Natural Products*, 1993, 56, 441-455). Son métodos
 20 alternativos, entre otros posibles, un ensayo de centelleo por proximidad (SPA, por sus siglas en inglés) o en formato de
 placas FlashPlate, en que tal separación resulta innecesaria (Nakayama, *Cur. Opinion Drug Disc. Dev.*, 1998, 1, 85-91;
 Bosse *et al.*, *J. Biomolecular Screening*, 1998, 3, 285-292.). La unión a ligandos fluorescentes se puede detectar de
 diversas maneras, como, entre otras posibles, la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, por
 sus siglas en inglés), el análisis espectrofotofluorimétrico directo de ligando unido, o la polarización fluorescente
 (Rogers, *Drug Discovery Today*, 1997, 2, 156-160; Hill, *Cur. Opinion Drug Disc. Dev.*, 1998, 1, 92-97).

20 [0148] Otros ensayos que pueden usarse para identificar los ligandos específicos de un receptor T1R o dímero de
 T1R son, por ejemplo, ensayos en los que se identifican ligandos de la proteína diana midiendo la unión directa de los
 ligandos de prueba a la diana, así como ensayos en los que se identifican ligandos de las proteínas diana mediante
 métodos de ultrafiltración por afinidad con espectroscopía de masas con chorro de iones/métodos HPLC u otros
 25 métodos físicos y analíticos. Alternativamente, tales interacciones de unión se evalúan indirectamente usando el
 "sistema de doble híbrido en levadura" que se describe en Fields *et al.*, *Nature*, 340:245-246 (1989), y en Fields *et al.*,
Trends in Genetics, 10:286-292 (1994). El sistema de doble híbrido es un ensayo genético para la detección de las
 interacciones entre dos proteínas o polipéptidos. Puede usarse para identificar proteínas que se unen a una proteína de
 interés conocida, o para delinear dominios o residuos cruciales para una interacción. Se han desarrollado variaciones de
 esta metodología para clonar genes que codifican proteínas que se unen a ADN, para identificar péptidos que se unen a
 30 una proteína, y para el análisis y selección de fármacos. El sistema de doble híbrido explota la capacidad de una pareja
 de proteínas interactuantes para poner un dominio de activación de la transcripción en la estrecha proximidad de un
 dominio de unión a ADN, que se une a una secuencia de activación situada en una ubicación anterior (secuencia UAS,
 por sus siglas en inglés) de un gen informador y, generalmente, se pone en práctica en levaduras. Para llevar a cabo el
 35 ensayo es necesario construir dos genes híbridos que codifican: (1) un dominio de unión a ADN que se fusiona con una
 primera proteína; y (2) un dominio de activación que se fusiona con una segunda proteína. El dominio de unión a ADN
 dirige la primera proteína híbrida hacia la secuencia UAS del gen informador; sin embargo, puesto que la mayoría de las
 proteínas carecen de un dominio de activación, dicha proteína híbrida de unión a ADN no activa la transcripción del gen
 40 informador. La segunda proteína híbrida, que contiene el dominio de activación, no puede activar por sí sola la
 expresión del gen informador, dado que no se une a la secuencia UAS. No obstante, cuando están presentes ambas
 proteínas híbridas, la interacción no covalente de la primera proteína y la segunda proteína vincula el dominio de
 activación a la secuencia UAS, con lo que se activa la transcripción del gen informador. Por ejemplo, cuando la primera
 45 proteína es un receptor, o un fragmento de receptor, que se sabe que interacciona con otra proteína o ácido nucleico,
 este ensayo puede usarse para detectar agentes que interfieren con la interacción de unión. La expresión del gen
 informador se monitoriza conforme se añaden diferentes agentes de prueba al sistema. La presencia de un agente
 inhibidor provoca la ausencia de una señal informadora.

[0149] También puede usarse el ensayo de doble híbrido en levadura a fin de identificar proteínas que se unen al
 50 producto génico. En un ensayo para identificar proteínas que se unen a un receptor T1R o fragmento del mismo, puede
 usarse un polinucleótido de fusión que codifica tanto un receptor T1R (o fragmento del mismo) como un dominio de
 unión a secuencia UAS (es decir, una primera proteína). En el ensayo se producen y seleccionan, además, una gran
 cantidad de genes híbridos, cada uno de los cuales codifica una segunda proteína diferente, fusionada con un dominio
 de activación. Habitualmente, la segunda proteína es codificada por uno o más miembros de una biblioteca de fusión de
 55 ADNc total o de ADN genómico total, y la región codificadora de cada segunda proteína se fusiona con el dominio de
 activación. Este sistema es aplicable a una amplia diversidad de proteínas, y no es necesario conocer la identidad y o la
 función de la segunda proteína de unión. El sistema es muy sensible y puede detectar las interacciones no reveladas
 por otros métodos; incluso las interacciones transitorias pueden desencadenar la transcripción, produciendo un ARNm
 estable que se puede traducir repetidamente a fin de producir la proteína informadora.

60 [0150] Para buscar agentes que se unan a la proteína diana pueden usarse otros ensayos. Uno de tales métodos de
 análisis para la identificación de la unión directa de ligandos de prueba a una proteína diana se describe en la patente
 estadounidense N° 5585277. Dicho método se basa en el principio de que, en general, las proteínas existen en forma de
 una mezcla de estados plegados y no plegados, alternando continuamente entre ambos estados. Cuando un ligando de
 65 prueba se une a la forma plegada de una proteína diana (es decir, cuando el ligando de prueba es un ligando de la
 proteína diana), la molécula de proteína diana fijada por el ligando permanece en su estado plegado. Así, la proteína
 diana plegada está presente en un mayor grado en presencia de un ligando de prueba que se une a la proteína diana,

que en ausencia de un ligando. La unión del ligando a la proteína diana puede determinarse mediante cualquier método que distinga entre los estados plegado y no plegado de la proteína diana. No es necesario conocer la función de la proteína para poder llevar a cabo este ensayo. Mediante este método puede evaluarse como ligando de prueba prácticamente cualquier agente; por ejemplo, entre otros posibles: metales, polipéptidos, proteínas, lípidos, polisacáridos, polinucleótidos y pequeñas moléculas orgánicas.

[0151] Otro método para la identificación de los ligandos de una proteína diana se describe en Wieboldt *et al.*, *Anal. Chem.*, 69:1683-1691 (1997). En esta técnica se analizan las bibliotecas combinatorias de 20-30 agentes a la vez, en fase de solución, en cuanto a unión a la proteína diana. Los agentes que se unen a la proteína diana se separan de los demás componentes de las bibliotecas mediante simple lavado de membranas. Las moléculas seleccionadas específicamente que son retenidas en el filtro son subsiguientemente liberadas de la proteína diana y analizadas mediante HPLC y espectroscopía de masas con ionización por electroespray (chorro de iones) asistido por nebulización neumática. Este procedimiento selecciona los componentes de las bibliotecas que tienen la mayor afinidad por la proteína diana, y es particularmente útil para las bibliotecas de pequeñas moléculas.

[0152] Otras realizaciones de la invención comprenden el uso de ensayos de selección competitiva en los que anticuerpos neutralizadores capaces de unirse a un polipéptido de la invención compiten de manera específica con un compuesto de prueba por unirse al polipéptido. De ese modo, los anticuerpos pueden usarse para detectar la presencia de cualquier péptido que comparta uno o más determinantes antigénicos con el receptor T1R. Se describen estudios de unión competitiva en los que se emplean radiomarcadores en A.H. Lin *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997, 41(10): 2127-2131.

[0153] Otro aspecto de la presente invención se refiere a métodos para la identificación de compuestos que modulan (es decir, aumentan o reducen) la actividad del receptor T1R o dímero de T1R, y dichos métodos comprenden poner en contacto un receptor T1R o dímero de T1R con un compuesto y determinar si el compuesto modifica la actividad del receptor T1R o dímero de T1R. La actividad en presencia del compuesto de prueba se compara con la actividad en ausencia del compuesto de prueba. Si la actividad de la muestra en la que está contenido el compuesto de prueba es mayor que la actividad en la muestra que carece del compuesto de prueba, entonces el compuesto es un agonista. De modo similar, si la actividad de la muestra en la que está contenido el compuesto de prueba es menor que la actividad en la muestra que carece del compuesto de prueba, entonces el compuesto es un antagonista.

[0154] También pueden identificarse agentes que modulan (es decir, aumentan, reducen o bloquean) la actividad o la expresión del receptor T1R o dímero de T1R, por ejemplo, mediante incubación de un modulador putativo con una célula que contenga un polipéptido T1R, dímero de T1R o polinucleótido de T1R, y determinación del efecto del modulador putativo sobre la actividad o la expresión del receptor T1R. La selectividad de un compuesto que modula la actividad del receptor T1R o dímero de T1R puede evaluarse mediante comparación de los efectos de dicho compuesto sobre el receptor T1R o dímero de T1R o de su efecto sobre otros receptores T1R o dímeros de T1R. Son moduladores selectivos, por ejemplo, los siguientes: anticuerpos y otras proteínas, péptidos o moléculas orgánicas que se unan específicamente a un polipéptido T1R o a un ácido nucleico que codifique un receptor T1R. Los moduladores de la actividad del receptor T1R serán terapéuticamente útiles en el tratamiento de las enfermedades y trastornos fisiológicos en que está implicada la actividad normal o aberrante del receptor T1R. Los compuestos identificados como compuestos moduladores de la actividad del receptor T1R pueden someterse a prueba adicionalmente en otros ensayos como, entre otros posibles, modelos *in vivo*, a fin de confirmar o cuantificar su actividad.

[0155] La invención proporciona también métodos para identificar un modulador del receptor T1R, de la siguiente manera: (a) poner en contacto un socio de unión del receptor T1R (o dímero de T1R) y una composición que comprende un receptor T1R, en presencia y en ausencia de un compuesto modulador putativo; (b) detectar la unión entre el socio de unión y el receptor T1R; y (c) identificar un compuesto modulador putativo o compuesto modulador en virtud de la unión reducida o aumentada entre el socio de unión y el receptor T1R en presencia del modulador putativo, en comparación con la unión en ausencia del modulador putativo. Los compuestos identificados como moduladores de la unión entre el receptor T1R y un socio de unión del T1R pueden someterse a prueba adicionalmente en otros ensayos como, entre otros posibles, modelos *in vivo*, a fin de confirmar o cuantificar su actividad.

[0156] En el ámbito de la invención están incluidos, asimismo, ensayos de análisis/selección de alto rendimiento (HTS) con los que identificar compuestos que interaccionan con, aumentan, o inhiben, la actividad biológica (es decir, que afectan a la actividad enzimática, a la actividad de unión, etc.) de un receptor T1R o dímero de T1R. Los ensayos HTS permiten el análisis/selección de altos números de compuestos, de una manera eficiente. Se contemplan sistemas HTS basados en células, para la investigación de la interacción receptor T1R-ligando. Los ensayos HTS se diseñan para identificar "coincidencias" o compuestos "lead" (compuestos líder) que tengan la propiedad deseada y, a partir de ellas/ellos, se pueden diseñar modificaciones que mejoren la propiedad deseada. A menudo, la modificación química de la "coincidencia" o del "compuesto lead" se basa en una relación estructura/actividad identificable entre la "coincidencia" y el polipéptido T1R.

[0157] Por ejemplo, resulta posible identificar moduladores de la actividad del receptor T1R expresando el receptor T1R en una línea de células de mamífero cultivada heteróloga, como, por ejemplo, células HEK, y detectando la actividad del receptor, en presencia y en ausencia de un compuesto de prueba, mediante la monitorización de los

cambios en cuanto al calcio intracelular usando un tinte intracelular específico de calcio. En otra realización, este proceso puede automatizarse usando un dispositivo de análisis de alto rendimiento (HTS).

5 [0158] Los moduladores candidatos contemplados por la invención pueden ser, entre otros posibles, compuestos seleccionados de bibliotecas de activadores potenciales o de inhibidores potenciales. Existe una serie de diferentes bibliotecas que se usan para la identificación de moduladores tipo pequeña molécula; por ejemplo, las siguientes: (1) bibliotecas de sustancias/compuestos químicos, (2) bibliotecas de productos naturales, y (3) bibliotecas combinatorias que comprenden péptidos, oligonucleótidos, o moléculas orgánicas, al azar. Las bibliotecas de sustancias/compuestos químicos consisten en estructuras químicas al azar; algunas de dichas estructuras químicas son análogos de compuestos conocidos o análogos de compuestos que han sido identificados como “coincidencias” o compuestos “lead” en otros ensayos realizados para el descubrimiento de fármacos; algunas de dichas estructuras químicas se derivan de productos naturales; y algunas de dichas estructuras químicas se obtienen mediante química orgánica de síntesis, no dirigida. Las bibliotecas de productos naturales son colecciones de microorganismos, animales, plantas u organismos marinos que se usan para crear mezclas para análisis/selección, mediante: (1) fermentación y extracción de caldos a partir de suelos, plantas o microorganismos marinos, o (2) extracción de plantas o microorganismos marinos. Las bibliotecas de productos naturales incluyen polikétidos, péptidos no ribosómicos, y variantes (que no se dan en la naturaleza) de los mismos. Para consultas al respecto, véase *Science* 282:63-68 (1998). Las bibliotecas combinatorias están compuestas de altos números de péptidos, oligonucleótidos o compuestos orgánicos en forma de mezcla. Dichas bibliotecas son relativamente fáciles de preparar mediante métodos de síntesis automatizados tradicionales, PCR, clonación, o métodos de síntesis patentados. De particular interés son las bibliotecas combinatorias integradas por compuestos que no son péptidos. Otras bibliotecas de interés son, entre otras, las bibliotecas de péptidos, de proteínas, de peptidomiméticos, de colecciones sintéticas multiparalelas, las bibliotecas compuestos recombinantes, y las bibliotecas de polipéptidos. Para consultas sobre la química combinatoria y las bibliotecas creadas mediante de la misma, véase Myers, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:701-707 (1997). La identificación de moduladores mediante el uso de las diversas bibliotecas que aquí se describen permite modificar la “coincidencia” (o compuesto “lead”) candidato a fin de optimizar la capacidad de la “coincidencia” para modular la actividad.

30 [0159] Los socios de unión del receptor T1R que estimulan la actividad del receptor T1R son útiles como agonistas en los estados patológicos o trastornos caracterizados por una señalización insuficiente del receptor T1R (por ejemplo, a consecuencia de una insuficiente actividad de un ligando del receptor T1R). Los socios de unión del receptor T1R que bloquean la señalización del receptor T1R mediada por ligandos son útiles como antagonistas del receptor T1R para el tratamiento de estados patológicos o trastornos caracterizados por una señalización excesiva del receptor T1R. Así, las enfermedades o estados anómalos pueden tratarse mediante administración, a un paciente que necesita un tratamiento tal, de una sustancia que modula la actividad o la expresión de un polipéptido que tenga una secuencia de la SEC N° ID:2, o que muestra esencialmente la misma actividad biológica que un polipéptido que tenga una secuencia de la SEC N° ID:2, o dímeros del mismo.

40 [0160] Además, los moduladores del T1R receptor en general, así como los polinucleótidos que codifican el receptor T1R y los polipéptidos T1R, son útiles en ensayos diagnósticos para tales enfermedades o estados patológicos.

45 [0161] Los polinucleótidos de T1R de la invención pueden utilizarse, también, para identificar compuestos por los que un organismo que tenga el receptor muestre una preferencia gustativa o una indiferencia gustativa, usando ensayos de señalización celular conocidos en este campo del conocimiento. En tales ensayos, se incorpora a un vector de expresión el polinucleótido que codifica un receptor T1R, y se transfecta dicho vector en una célula host. La expresión del T1R puede ser inducible o constitutiva. Se ponen en contacto las células host que expresan el receptor T1R con compuestos candidatos, y se estudia mediante ensayos el efecto de cada compuesto sobre las células. La estimulación de una respuesta es indicativa de la reactividad con el compuesto de prueba, y está correlacionada con los compuestos asociados con una preferencia gustativa. Son ensayos que se pueden usar para evaluar la estimulación del receptor T1R, entre otros posibles, los siguientes: ensayos en los que se mide la conductancia iónica, flujo iónico, “imagen de calcio” (por ejemplo, mediante Fura-2, actividad medida mediante dextrano verde, o actividad medida mediante acuorina), medición del voltaje y/o análisis de imágenes del voltaje mediante tintes, expresión de genes informadores (por ejemplo, luciferasa, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, beta-lactamasa, proteína de unión fluorescente), ensayos de unión al receptor, medición de segundos mensajeros (como, por ejemplo, IP3, AMPc), ensayos basados en activación de la proteína G (por ejemplo, modulación de la unión a GTP-gamma-S), mediciones de la fosforilación del receptor, y similares. En algunas realizaciones, el análisis de la estimulación de los receptores T1R y dímeros de receptores T1R puede determinarse usando un ensayo FLIPR®, de la manera descrita por la empresa fabricante (Molecular Devices, Corp.).

60 [0162] El análisis y selección de células tratadas con tintes y reactivos fluorescentes es bien conocido en la técnica. La ingeniería genética de las células para producir proteínas fluorescentes, como, por ejemplo, proteína fluorescente verde modificada (GFP, por sus siglas en inglés), como molécula informadora, es también bien conocida en la técnica. Los reactivos basados en fluorescencia son útiles para el ensayo de muchas funciones celulares, incluidas las concentraciones iónicas, el potencial de membrana, las translocaciones específicas, las actividades enzimáticas, la expresión génica, así como la presencia, las cantidades y los patrones de metabolitos, proteínas, lípidos, carbohidratos, y secuencias de ácidos nucleicos.

[0163] Para identificar antagonistas de los T1R pueden usarse también ensayos de señalización conocidos en este campo del conocimiento. Se ha demostrado que la expresión de receptores unidos a proteína G a muy alta concentración en un sistema heterólogo conduce a señalización celular constitutiva. Como ejemplo, en modo alguno limitador, el receptor T1R puede sobreexpresarse en células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9). Alternativamente, por ejemplo, T1R puede unirse operativamente a un promotor del CMV y expresarse en células COS o HEK293. En el estado constitutivo activado, pueden ensayarse compuestos en cuanto a su capacidad de inhibir la actividad de señalización celular constitutiva. Son ensayos adecuados, entre otros posibles, los siguientes: ensayos en los que se mide la conductancia iónica, flujo iónico, "imagen de calcio" (por ejemplo, mediante Fura-2, actividad medida mediante dextrano verde, o actividad medida mediante acuarina), medición del voltaje y/o análisis de imágenes del voltaje mediante tintes, expresión de genes informadores (por ejemplo, luciferasa, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, beta-lactamasa, proteína de unión fluorescente), ensayos de unión al receptor, medición de segundos mensajeros (como, por ejemplo, IP3, AMPc), ensayos basados en activación de la proteína G (por ejemplo, modulación de la unión a GTP-gamma-S), mediciones de la fosforilación del receptor y similares.

15 **Distribución tisular**

[0164] Los expertos en la técnica pueden determinar si un receptor T1R se expresa en tejidos que no sean los tejidos de los botones gustativos, mediante experimentación rutinaria en la que se sigan las pautas aquí proporcionadas. Específicamente, se puede detectar ARN de T1R usando las técnicas "Northern blotting" o reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés), y otros métodos conocidos en este campo del conocimiento. Se pueden encontrar protocolos y procedimientos para tales ensayos, por ejemplo, en Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, Estados Unidos de América, 1998; Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2D ED., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, Estados Unidos de América, 1989.

[0165] También se puede detectar proteínas T1R usando anticuerpos específicos y sondeando cortes de tejido. Como ejemplo, en modo alguno limitador, se pueden obtener cortes incluidos en parafina de tejidos de interés (de ser humano o de otras especies), o usar tejido fresco. Los cortes de tejido pueden tratarse con H₂O₂ al 0,3%, en metanol, durante 30 minutos, para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena. Después, los tejidos pueden incubarse en anticuerpo anti-T1R (o un antisuero generado contra el T1R) a 4 °C durante un período de horas a días. Después, los tejidos pueden tratarse con un anticuerpo secundario que se una específicamente al anticuerpo primario (por ejemplo, un suero heterólogo generado contra la inmunoglobulina de la especie primaria). Se puede conjugar el anticuerpo secundario con biotina, por ejemplo. Los cortes de tejido se incuban adicionalmente, a temperatura ambiente, con estreptavidina conjugada con peroxidasa. Después de cada paso, los cortes de tejido se enjuagan en solución salina tamponada con fosfatos (pH 7,2, 0,01 M) que contiene Tween 20 al 0,05%. Los productos de inmunorreacción pueden visualizarse mediante reacción con diaminobenzidina (DAB) 0,0125% y con H₂O₂ al 0,002% en tampón Tris-HCl 0,05 M (pH 7,6). Se realiza contratinción de los cortes con hematoxilina, y se observan con un microscopio óptico. Se pueden usar otros ensayos basados en anticuerpos a fin de examinar la expresión del T1R en los tejidos. Hay diversos protocolos conocidos en este campo del conocimiento; pueden encontrarse descripciones de los mismos, por ejemplo, en Harlow *et al.*, (Eds.), ANTIBODIES A LABORATORY MANUAL; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, Nueva York, Estados Unidos de América (1988).

[0166] De la presencia del receptor T1R en tejidos que no son los de los botones gustativos parece desprenderse que los receptores T1R pueden desempeñar otra función además de la función de percepción gustativa.

[0167] Un miembro de la familia de los receptores T1R puede modularse mediante la modulación de la expresión de otro receptor de la familia T1R. Por ejemplo, el gen *Tas1r* puede expresarse de manera tal que un nivel aumentado de ARN correspondiente a dicho *Tas1r* ocasione una inhibición (concretamente, una inhibición por retroalimentación) de la expresión de al menos uno de los siguientes receptores: T1R1, T1R2, T1R3. El gen *Tas1r* puede expresarse de manera tal que un nivel aumentado de ARN correspondiente a T1R ocasione un aumento en la expresión de al menos uno de los siguientes receptores: T1R1, T1R2, T1R3. El gen *Tas1r* puede reprimirse, de manera tal que un nivel reducido de ARN correspondiente a *Tas1r* ocasione un aumento en la expresión de al menos uno de los siguientes receptores: T1R1, T1R2, T1R3. El gen *Tas1r* puede reprimirse, de manera tal que un nivel reducido de ARN correspondiente a *Tas1r* ocasione una reducción concomitante en la expresión de al menos uno de los siguientes receptores: T1R1, T1R2, T1R3. La modulación génica puede ser específica de tejido o de especie. Así, la expresión de *Tas1r* puede regularse usando los vectores de expresión de la invención usando promotores inducibles y promotores específicos de tejido, por ejemplo. Alternativamente, la expresión de *Tas1r* puede reprimirse en células que produzcan T1R, usando ARN antisense y otras estrategias inhibitorias que se describen en la presente invención, y conocidas en el estado de la técnica. La modulación de la familia de receptores T1R en pacientes pueden resultar útil para modificar el metabolismo, la ingesta de nutrientes, la función neural, y para tratar trastornos asociados a un nivel anormalmente bajo o alto de expresión del T1R en las células.

Miméticos

[0168] Los miméticos o mímicos de los compuestos identificados en la presente invención (compuestos estéricamente similares formulados para imitar a las porciones clave de la estructura) pueden diseñarse para uso farmacéutico. Los

miméticos pueden usarse de la misma manera que los compuestos identificados por la presente invención que modulan el receptor T1R y, por ello, son también equivalentes funcionales. La generación de un equivalente estructural-funcional puede lograrse mediante las técnicas de modelado y de diseño químico conocidas por los expertos en la técnica. Se entenderá que todos los constructos estéricamente similares tales se encuentran dentro del ámbito de la presente invención.

[0169] El diseño de miméticos de un compuesto farmacéuticamente activo conocido es un enfoque conocido para el desarrollo de fármacos basados en un compuesto "lead". Dicho enfoque es deseable en casos en los que, por ejemplo, el compuesto activo es difícil o caro de sintetizar o no es adecuado para un método de administración concreto (por ejemplo, algunos péptidos pueden no ser agentes activos adecuados para las composiciones orales, dado que tienden a ser degradados rápidamente por las proteasas presentes en el tubo digestivo).

[0170] Hay varios pasos que se suelen llevar a cabo en el diseño de un mimético. Primero, se determinan las partes concretas del compuesto que son cruciales y/o importantes para la determinación de sus propiedades de modulación del T1R. En el caso de un polipéptido, eso puede hacerse mediante la variación sistemática de los residuos aminoácido del péptido; por ejemplo, mediante sustitución de un residuo cada vez. Para refinar tales motivos péptido, se suelen usar barridos de alanina de péptidos.

[0171] Una vez identificada la región activa del compuesto, se modela su estructura con arreglo a sus propiedades físicas (por ejemplo, estereoquímica, unión/uniones, tamaño, y/o carga), usando datos obtenidos de una diversidad de fuentes, como, por ejemplo, entre otras posibles: técnicas espectroscópicas, datos de difracción de rayos X, y RMN. En este proceso de modelado se pueden usar análisis computacionales, mapeado de la similitud (que modela la carga y/o el volumen de la región activa, en vez de las uniones entre átomos) y otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

[0172] En una variante de este enfoque, se modelan la estructura tridimensional del compuesto que modula un receptor T1R y la región activa del receptor T1R. Ello puede ser especialmente útil cuando uno de dichos compuestos, o ambos compuestos, cambian de conformación al unirse. El conocimiento de la estructura del dominio de unión a ligandos (por ejemplo, los residuos 1-571 de la SEC N° ID:2) del receptor posibilita, además, el diseño de moduladores y/o ligandos de alta potencia.

[0173] Después, se selecciona una molécula plantilla en la que se pueden injertar grupos químicos que imitan al modulador de T1R. La molécula plantilla y los grupos químicos injertados en la misma pueden seleccionarse adecuadamente de manera que el mimético sea fácil de sintetizar, sea farmacológicamente aceptable, no se degrade *in vivo*, y, de manera que, a la vez, retenga la actividad biológica del compuesto "lead". Alternativamente, si el mimético es un compuesto tipo péptido, puede lograrse una mayor estabilidad ciclando el péptido, lo que aumenta su rigidez. Después, el mimético o miméticos hallados mediante este enfoque pueden analizarse mediante los métodos de la presente invención, para comprobar si tienen capacidad para modular el receptor T1R. Tras dicha comprobación, se puede efectuar una mayor optimización o modificación, a fin de obtener uno o más miméticos finales para las pruebas *in vivo* o clínicas.

Composiciones de los compuestos fijadores y/o moduladores

[0174] Tras la identificación de un compuesto que se une a y/o modula un receptor T1R, el compuesto puede fabricarse y/o usarse en la preparación de composiciones tales como, entre otras posibles, alimentos, bebidas, y composiciones farmacéuticas. Las composiciones se proporcionan o administran a pacientes tales como, entre otros posibles, los siguientes: aviares, felinos, caninos, bovinos, ovinos, porcinos, equinos, roedores, simios y seres humanos.

[0175] Tales composiciones pueden usarse para el tratamiento (incluido el tratamiento profiláctico) de un trastorno asociado al receptor T1R (por ejemplo, obesidad, diabetes); o podrían usarse en la fabricación de una composición para administración a un paciente; tales composiciones pueden elaborarse mezclando un compuesto tal con un excipiente, vehículo o transportador farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente, con otros ingredientes.

[0176] Algunas composiciones de la invención pueden comprender una "cantidad modificadora del sabor", de al menos uno o más compuestos fijadores o moduladores. Una "cantidad modificadora del sabor" es una cantidad suficiente para aumentar o reducir la percepción de un estímulo gustativo por un mamífero dado. Las composiciones tipo alimento y tipo bebida pueden formularse mediante adición de un compuesto fijador o modulador a un alimento o bebida del mamífero. Tales composiciones pueden ser de tipo individualizado, o bien, específicas de raza. Por ejemplo, así, se pueden hacer más apetecibles las dietas especiales veterinarias para felinos.

[0177] Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto identificado conforme a los métodos que se describen en el presente, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0178] Los compuestos identificados conforme a los métodos de la invención pueden formularse como formas neutras o sales. Son sales farmacéuticamente aceptables, entre otras posibles, las formadas con grupos amino libres tales

como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con grupos carboxilo libres tales como los derivados de los hidróxidos sódico, potásico, amónico, cálcico, férrico, e isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína, etc.

5 [0179] Son transportadores farmacéuticamente aceptables, entre otros posibles, los siguientes: solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol, y combinaciones de lo antedicho. El transportador y la composición pueden ser estériles. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

10 [0180] Si se desea, la composición puede también contener pequeñas cantidades de agentes humectantes, agentes emulsionantes o agentes tamponadores del pH. La composición puede ser una solución líquida, una suspensión, una emulsión, un comprimido, una píldora, una cápsula, una formulación de liberación sostenida o un polvo. La composición puede formularse como supositorio, con aglutinantes y transportadores tradicionales, como, por ejemplo, triglicéridos. Las formulaciones orales pueden comprender transportadores estándar, tales como variedades con calidad farmacéutica de manitol, lactosa, almidón, estearato magnésico, sacarina sódica, celulosa, carbonato magnésico, etc.

15 [0181] Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, además, un compuesto secundario para el tratamiento de un trastorno no relacionado con el receptor T1R; por ejemplo, un antibiótico u otro agente terapéutico, a fin de mejorar la palatabilidad de la composición farmacéutica, con lo que se aumenta la facilidad de administración.

20 [0182] La composición puede formularse, de conformidad con los procedimientos rutinarios, como composición farmacéutica adaptada para administración oral (por ejemplo, comprimidos, gránulos, jarabes) o no oral (por ejemplo, pomadas, inyecciones) al sujeto. Se conocen y pueden usar diversos sistemas de administración para administrar un compuesto que modula un receptor T1R; por ejemplo, encapsulamiento en liposomas, micropartículas, microcápsulas, expresión por células recombinantes, endocitosis mediada por receptores, construcción de un ácido nucleico terapéutico como parte de un vector retroviral u otro tipo de vector, etc. Son métodos de introducción, entre otros posibles, los siguientes: vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, tópica y oral.

25 [0183] Los compuestos identificados mediante los métodos de la invención pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión, mediante inyección de bolo, mediante absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.); pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos, como, por ejemplo, en una terapia HAART (siglas, en inglés, de terapia antirretroviral altamente activa). La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, como, por ejemplo, mediante inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse mediante un catéter intraventricular: por ejemplo, acoplado a un depósito, como, por ejemplo, un depósito de Ommaya.

30 [0184] Puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas localmente, en la zona que precisa tratamiento; ello puede lograrse mediante, por ejemplo, entre otras posibilidades, las siguientes: infusión local durante una intervención quirúrgica; aplicación tópica, por ejemplo, en conjunción con un vendaje adecuado tras una intervención quirúrgica; mediante inyección; mediante un catéter; mediante un supositorio; o mediante un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, lo que incluye membranas, como, por ejemplo, membranas Silastic® o fibras.

35 [0185] La composición puede administrarse en una forma de administración unitaria, y puede prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en el campo farmacéutico, como, por ejemplo, los que se describen en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, Estados Unidos de América). La cantidad del compuesto de la invención que modula el receptor T1R, que es eficaz en el tratamiento de un trastorno o estado patológico concreto, dependerá de factores como los siguientes, entre otros posibles: características químicas de los compuestos empleados, vía de administración, edad, peso corporal y síntomas de un paciente, naturaleza del trastorno o estado patológico; dicha cantidad puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Habitualmente, la terapia se inicia con niveles bajos del compuesto y se incrementa hasta que se logra el efecto terapéutico deseado. Además, pueden emplearse, opcionalmente, ensayos *in vitro* que ayuden a identificar los intervalos de dosificación óptimos. Preferiblemente, los intervalos de dosificación adecuados para administración intravenosa son, por lo general, de aproximadamente 20-500 microgramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal. Preferiblemente, los intervalos de dosificación adecuados para administración intranasal son, por lo general, de aproximadamente 0,01 pg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal. Preferiblemente, los supositorios contienen, por lo general, ingrediente activo en el intervalo del 0,5% al 10% en peso; preferiblemente, las formulaciones orales pueden contener de un 10% a un 95% de ingrediente activo. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo *in vitro* o basados en modelos animales.

40 [0186] Habitualmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Si es necesario, la composición puede también incluir un agente solubilizante y un anestésico local, como, por ejemplo, lidocaína, para aliviar el dolor en el lugar de inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado, o mezclados, en una forma de administración unitaria, como, por ejemplo, un polvo liofilizado, o un concentrado sin agua, dentro de un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolla o un sobre de dosis, y en

dicho recipiente se indica la cantidad de agente activo. Si la composición se ha de administrar mediante infusión, puede dispensarse con un frasco de infusión que contiene agua o solución salina, de calidad farmacéutica, estéril.

5 [0187] Si la composición se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua o solución salina estéril para inyección, de manera que se pueden mezclar los ingredientes antes de la administración.

Kits

10 [0193] Un kit de la invención comprende un medio transportador compartimentalizado para recibir, en un espacio cerrado, uno o más medios contenedores tales como viales, tubos y similares, y cada uno de los medios contenedores comprende un elemento que se va a usar conforme a los métodos de la invención. Por ejemplo, uno de los medios contenedores puede comprender un polinucleótido que codifica un receptor T1R de la invención, un receptor T1R de la invención o un anticuerpo contra los mismos. El kit puede tener también uno o más e componentes de kit convencionales, incluidos, entre otros posibles, los siguientes: instrucciones, tubos de ensayo, tubos Eppendorf™, etiquetas, reactivos útiles para la cuantificación de la expresión de un gen marcador, etc.

15 [0194] Los siguientes ejemplos están concebidos como ilustrativos de la presente invención, y no debe entenderse que limiten el ámbito de la misma en modo alguno.

20 Clonación y caracterización del receptor T1R3 felino

[0195] El descubrimiento del receptor gustativo felino T1R3 se llevó a cabo usando una estrategia molecular denominada "overgo" (Thomas, *et al.*, *Genome Res.*, 12:1277-1285 (2002); Vollrath, D., *DNA markers for physical mapping* en *GENOME ANALYSIS: A LABORATORY MANUAL*, Vol. 4, ed. B. Birren, *et al.*, páginas 187-215, 1999). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, Estados Unidos de América). Dicha estrategia comprende el uso de las sondas de ADN más cortas, de entre los muchos tipos de sondas que se usan en el análisis de bibliotecas de cromosomas artificiales bacterianos (BACs, por sus siglas en inglés). Dichas sondas están compuestas de dos secuencias de ADN (por ejemplo, 22-ómeros) con un solapamiento de 8 bases complementarias. Pueden diseñarse mediante un programa informático (genome.wustl.edu/tools/?overgo=1) y se sintetizan con facilidad.

30 [0196] Las sondas "overgo" se diseñaron a partir de regiones conservadas del marcador del cromosoma 1 ("disheveled 1" (DVL1)), y del receptor unido a proteína G (T1R3), mediante alineación de las secuencias genómicas de DVL1 y de T1R3 de varias especies. Las secuencias solapadas de las siete sondas "overgo" (del) DVL1 empleadas en la presente invención fueron las siguientes:

35	catOV1a ACTTTGAGAACATGAGTAATGACG	(SEC N° ID:21)
	catOV1b AGTACCCGGACTGCGTCGCATTA	(SEC N° ID:22)
40	catOV2a CACTAGGGTCATCCTTGCTTTCAG	(SEC N° ID:23)
	catOV2b AGTCAGGGTGATGGGCCTGAAAGC	(SEC N° ID:24)
	Ov8-OVa ATGTGGTGGACTGGCTGTACCATC	(SEC N° ID:25)
	Ov8-OVb TTGAAGCCCTCCACGTGATGGTAC	(SEC N° ID:26)
45	Ov9a CACACGGTGAACAAGATCACCTTC	(SEC N° ID:27)
	Ov9b AGTAGCACTGCTCGGAGAAGGTGA	(SEC N° ID:28)
	Ov10A ATCTACCACATGGACGAGGAGGAG	(SEC N° ID:29)
	Ov10b TGACCAGGTACGGCGTCTCCTCCT	(SEC N° ID:30)
50	Ov11a AGCGCGTACGCTGGCCGACTTCA	(SEC N° ID:31)
	Ov11b TTGCTGAGCACGTTCTTGAAGTCG	(SEC N° ID:32)
	Ov12a CACGCCTACAAATTCTTCTTTAAG	(SEC N° ID:33)
55	Ov12b AGTCCTGGTCCATGGACTTAAAGA.	(SEC N° ID:34).

Las secuencias solapadas de las doce sondas "overgo" del T1R3 empleadas en la presente invención fueron las siguientes:

60	t1r3-OV1a CTTCCACTCCTGCTGCTACGACTG	(SEC N° ID:35)
	t1r3-OV1b TGCCTCGCAGTCCACGCAGTCGTA	(SEC N° ID:36)
	t1r3-OV2a AGGTGCGCCGCGTCAAGGGCTTCC	(SEC N° ID:37)
	t1r3-OV2b TCGTAGCAGCAGGAGTGGAAGCCC	(SEC N° ID:38)
65	t1r3-OV3a GTTCCTGGCATGGGGGGAGCCGGC	(SEC N° ID:39)
	t1r3-OV3b GAGCAGCACAAGCACAGCCGGCTC	(SEC N° ID:40)

	t1r3-OV4a ACAGCCCACTAGTTCAGGCCGCAG	(SEC N° ID:41)
	t1r3-OV4b CAGGCCCGGGTCCCCCTGCGGCC	(SEC N° ID:42)
5	t1r3-OV5a CCCACTGGTTCAGGCCTCGGGGGG	(SEC N° ID:43)
	t1r3-OV5b AAAGCAGGCCAGGGGCCCCCGA	(SEC N° ID:44)
	t1r3-OV6a AGGCGCTGGTGCCTGCGCACAC	(SEC N° ID:45)
10	t1r3-OV6b AAGCTGACCCAGGAGCGTGTGCGG	(SEC N° ID:46)
	t1r3-OV7a ACAGAGGCACTGGTGCCTGCGC	(SEC N° ID:47)
	t1r3-OV7b TGATCCAGGAGTGCACGCGGCAGT	(SEC N° ID:48)
	t1r3-OV8a ACCAATGCCACGCTGGCCTTTCTC	(SEC N° ID:49)
15	t1r3-OV8b AAGTGCCAGGAAGCAGAGAAAGG	(SEC N° ID:50)
	t1r3-OV9a TGGTACATGCTGCCAATGCCACGC	(SEC N° ID:51)
	t1r3-OV9b AAGCAGAGGAAAGCCAGCGTGGCA	(SEC N° ID:52)
20	t1r3-OV10a TACAACCGTGCCCGTGGCCTCACC	(SEC N° ID:53)
	t1r3-OV10b AGGCCAGCATGGCGAAGGTGAGGG	(SEC N° ID:54)
	t1r3-OV11a TCATCACCTGGGTCTCCTTTGTGC	(SEC N° ID:55)
25	t1r3-OV11b ACATTGGCCAGGAGGGGCACAAAG	(SEC N° ID:56)
	t1r3-OV12a TGCAGATGGGTGCCCTCCTGCTCT	(SEC N° ID:57)
	t1r3-OV12b AGGATGCCAGCACACAGAGCAGG.	(SEC N° ID:58)

30 Las secuencias sobresalientes de una sola cadena se llenaron con dATP y dCTP marcadas con ³²P, y las sondas "overgo" se hibridaron con bibliotecas de BAC.

35 [0197] Los expertos en el campo del mapeado físico comparativo consideran que la estrategia "overgo" es más versátil que una estrategia basada en PCR, por los siguientes motivos: (1) las sondas "overgo" son cortas (por ejemplo, 36-ómeros o 40-ómeros), lo que incrementa la probabilidad de una buena alineación en muchas especies; (2) las sondas "overgo" son más específicas de los genes diana, en comparación con las sondas de ADNc y de ADN genómico tradicionales usadas en la PCR; y (3) aunque las sondas "overgo" son cortas, no están tan restringidas como las sondas de PCR tradicionales (que no son capaces de tolerar siquiera unas pocas discordancias), dado que se pueden emplear en enfoques de hibridación con bibliotecas BACs o con otras bibliotecas.

40 [0198] **Análisis/selección de una biblioteca de BACs genómicos felinos.** Se emplearon siete sondas "overgo" DVL1 (de las SEC N° ID:21-34) en el análisis/selección de una biblioteca de BACs genómicos felinos. Se marcaron radiactivamente las sondas, mediante el método de hexa-nucleótidos al azar (Feinberg & Vogelstein, *Analytical Biochemistry*, 132:6-13 (1983)). Para la hibridación y el lavado de membranas se siguieron los protocolos estándar (Church & Gilbert, *PNAS U.S.A.*, 81:1991-1995 (1984)). Se identificaron treinta y nueve clones de BACs positivos. Se secuenciaron varios extremos de BACs. Se identificó, usando herramientas bioinformáticas, un clon (BAC 552J19) que contenía una secuencia homóloga a la del cromosoma 1p36 humano.

50 [0199] **Producción de una biblioteca "shotgun" (fragmentos al azar) para el BAC 552J19, e identificación de un único clon que contenía T1R3 felino.** Se preparó, usando el kit "Qiagen Large Construct Kit", ADN de BAC a partir de 552J19. Después, se digirió el ADN mediante la enzima de restricción *Sau3AI* y se subclonó el producto resultante en el vector pGEM+3Z (fabricante: Promega). Tras adosar los transformantes a una membrana de nylon, se efectuaron dos hibridaciones por separado usando siete sondas DVL1 y doce sondas T1R3 (de las SEC N° ID:35-58). Se encontraron dos clones positivos a DVL1 y cuatro clones positivos a T1R3. Dichos clones se confirmaron mediante secuenciación. Dado que DVL1 es el gen vecino de T1R3 en los seres humanos y en el ratón, es probable que en el gato se dé el mismo caso; por lo tanto, los clones positivos a DVL1 confirmaron que BAC 552J19 es el BAC correcto, es decir, que es el que contiene T1R3 felino.

Clonación y caracterización de los receptores T1R1 y T1R2 felinos

60 La elucidación de los receptores T1R1 felino y T1R2 felino se llevó a cabo usando también una estrategia "overgo". Se diseñaron sondas "overgo" a partir de regiones codificadoras conservadas; para ello, se alinearon las secuencias del T1R1 y del T1R2 de muchas especies diferentes, incluidas, entre otras, las siguientes: ser humano, ratón, rata, vaca, cerdo. Las secuencias sobresalientes de una sola cadena (14 bases) se llenaron con dATP y dCTP marcadas con ³²P, y las sondas "overgo" se hibridaron con bibliotecas de BACs. Las secuencias solapadas de las seis
65 sondas "overgo" de T1R1 felino fueron las siguientes:

	t1r1_1-OVa TAAACAACCTCCACGGCCCTGCTGC	(SEC Nº ID:65)
	t1r1_1-OVb CCCAGGGTGATGTTGGGCAGCAGG	(SEC Nº ID:66)
5	t1r1_2-OVa GCTGTGTATGCGGTGGCCCATGGC	(SEC Nº ID:67)
	t1r1_2-OVb CCAGGAGCTGGTGGAGGCCATGGG	(SEC Nº ID:68)
	t1r1_3-OVa TGCTGACCAACCTGACTGGCAAGG	(SEC Nº ID:69)
	t1r1_3-OVb TCTGAGGCGACCCACACCTTGCCA	(SEC Nº ID:70)
10	t1r1_4-OVa CCAGTTCAGCTAAACATAAATGAG	(SEC Nº ID:71)
	t1r1_4-OVb GCCACTGGATTTTGGTCTCATTTA	(SEC Nº ID:72)
	t1r1_5-OVa AGCTAACACGCTGCTGCTGCTGCT	(SEC Nº ID:73)
15	t1r1_5-OVb AGCAGTCCCAAGCAGCAGCAGCAG	(SEC Nº ID:74)
	t1r1_6-OVa TGTGTACCTTCAGCCTGCTCTTC	(SEC Nº ID:75)
	t1r1_6-OVb TCCAGGACACGAAGTTGAAGAGCA.	(SEC Nº ID:76)
20	Las secuencias solapadas de las siete sondas "overgo" de T1R2 felino fueron las siguientes:	
	t1r2_1-OVa TACTTCGGCCCCAAGTGCTACATG	(SEC Nº ID:77)
	t1r2_1-OVb CCGGGTAGAAGAGGATCATGTAGC	(SEC Nº ID:78)
25	t1r2_2-OVa TGGTCACCATCGTGGACCTCTTGG	(SEC Nº ID:79)
	t1r2_2-OVb AGGTTGAGCACAGTGACCAAGAGG	(SEC Nº ID:80)
	t1r2_3-OVa ACCAACTACAACGAGGCCAAGTTC	(SEC Nº ID:81)
	t1r2_3-OVb TCATGCTGAGGGTGATGAACTTGG	(SEC Nº ID:82)
30	t1r2_4-OVa TCCGAGTCCTGGGCCATCGACCCG	(SEC Nº ID:83)
	t1r2_4-OVb TGAGGTTGTGCAGGACCGGGTCGA	(SEC Nº ID:84)
	t1r2_5-OVa TACAACCTCATGCAGGCCATGCGC	(SEC Nº ID:85)
35	t1r2_5-OVb TCTCCTCCACCGCGAAGCGCATGG	(SEC Nº ID:86)
	t1r2_6-OVa ATCACCATCCAGAGCGTGCCCATC	(SEC Nº ID:87)
	t1r2_6-OVb ACTCACTGAAGCCCGGGATGGGCA	(SEC Nº ID:88)
40	t1r2_7-OVa ACCACCAGTTCGAGGCCATGGTGC	(SEC Nº ID:89)
	t1r2_7-OVb AAGTGCAGCATCAGCTGCACCATG.	(SEC Nº ID:90)

[0200] **Análisis/selección de una biblioteca de BACs genómicos felinos.** Se emplearon las sondas "overgo" T1R1 y T1R2 para analizar/seleccionar una biblioteca de BACs genómicos felinos. Se marcaron radiactivamente las sondas, mediante el método de hexa-nucleótidos al azar (Feinberg & Vogelstein, *Analytical Biochemistry*, 132(1):6-13 (1983)). Para la hibridación y el lavado de membranas se siguieron los protocolos estándar (Church & Gilbert, *PNAS U.S.A.*, 81:1991-1995 (1984)). Se identificaron seis clones de BACs positivos a T1R1 felino y ocho clones de BACs positivos a T1R2 felino.

[0201] **Producción de bibliotecas "shotgun" (fragmentos al azar) para BACs que contienen T1R1 felino y T1R2 felino, e identificación de clones con pequeños insertos que contenían T1R1 felino y T1R2 felino.** Para preparar ADNs de BAC, se emplearon dos BACs (150M6 y 233G22) que contenían T1R1 felino y tres BACs (93C1, 240H9 y 400B1) que contenían T1R2 felino, usando el kit "Qiagen Large Construct Kit". Los ADNs de BAC se digirieron usando la enzima *Sau3AI*, y los fragmentos de ADN de BAC digerido se subclonaron en el vector pGEM+3Z (fabricante: Promega). Tras adosar los transformantes a una membrana de nylon, se efectuaron dos hibridaciones por separado usando seis sondas "overgo" T1R1 y siete sondas "overgo" T1R2 agrupadas. Mediante la secuenciación de los clones positivos de bibliotecas "shotgun" y mediante el uso de una estrategia de "paseo cromosómico" (estrategia "walking", en inglés, o recorrido por los cromosomas), se obtuvieron la región codificadora completa del T1R1 felino y del exón 3 al exón 6 del T1R2 felino.

[0202] **Elucidación del exón 1 y del exón 2 del T1R2 felino mediante una estrategia PCR.** Dado que el exón 1 y el exón 2 del T1R2 felino no estaban presentes en los tres BACs seleccionados que se acaban de describir, se llevó a cabo PCR usando cebadores degenerados diseñados a partir de alineaciones de T1R2 de diferentes especies (ser humano, roedores, y perro), y ADN genómico felino como plantilla.

65

Cebadores degenerados correspondientes al exón 1 y al exón 2 del T1R2 felino:

			Tamaño de los productos de PCR
	Dex1f1: 5' TCRGACTTCTACCTGCCTGGRGA 3'	(SEC Nº ID:91)	85 bp
	Dex1r1: 5' CTTCACGTTGGCATGGAGGG 3'	(SEC Nº ID:92)	
5	Dex1f2: 5' TACCTCCTGGGTGGCCTCTTC 3'	(SEC Nº ID:93)	66 bp
	Dex1r2: 5' TCTTGCACwkGGGCACCTGC 3'	(SEC Nº ID:94)	
	Dex2f1: 5' AGGTGtTGGGCTACAACCTsAT 3'	(SEC Nº ID:95)	206 bp
	Dex2r1: 5' GGGCAkGTAGTGGCTGTAGTC 3'	(SEQ ID ND:95)	
10	Dex2f2: 5' GGCTACAACCTsATGCAGGCCA 3'	(SEQ ID ND:97)	220 bp
	Dex2r2: 5' GAGTTGTCAGGGCCAATGACCG 3'	(SEQ ID ND:98)	

15 **Los productos de la PCR se confirmaron mediante secuenciación. Después, se volvió a analizar la biblioteca de BACs felinos usando productos de la PCR, y se obtuvieron cuatro BACs nuevos (4O545, 2J533, 4F220 y 24D448). Usando una estrategia de paseos cromosómico, se obtuvieron las secuencias completas del exón 1 y exón 2 de dichos cuatro clones de BAC.**

Resultados

20 [0203] Se obtuvieron más de 3 kb (kilobases) de secuencias genómicas que contenían el marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) del receptor gustativo del gato doméstico, T1R3. Se obtuvieron aproximadamente 10 kb de secuencia genómica que contenía el marco de lectura abierto del T1R1 de gato, y aproximadamente 38 kb de secuencia genómica que contenía el marco de lectura abierto del T1R2 de gato. Las **Figuras 6A-6D** muestran la secuencia genómica del *T1R1* felino (SEC Nº ID: 59) obtenida mediante secuenciación de BACs. Las **Figuras 7A-7E** muestran la secuencia genómica del *T1R2* felino (SEC Nº ID:62) obtenida mediante secuenciación de BACs. La letra "N" denota huecos entre los exones o secuencias desconocidas. Las **Figuras 1A-1I** muestran la alineación de varias secuencias de los ADNc que codifican los receptores T1R del gato doméstico (T1R1, SEC Nº ID:60; T1R2, SEC Nº ID:63; y T1R3, SEC Nº ID:99) respecto de secuencias de nucleótidos conocidas de los receptores de la familia T1R del ser humano (T1R1, SEC Nº ID:8; T1R2, SEC Nº ID:5; T1R3, SEC Nº ID: 11), del ratón (T1R1, SEC Nº ID:6; T1R2, SEC Nº ID:3; T1R3, SEC Nº ID:9), y de la rata (T1R1, SEC Nº ID:7; T1R2, SEC Nº ID:4; T1R3, SEC Nº ID: 10). Un asterisco (*) indica una posición nucleotídica conservada en las secuencias (es decir, una posición de nucleótido que se conserva en las diferentes secuencias). Un corazón (♥) indica el codón de parada del T1R2 felino.

35 Las **Figuras 2A-D** muestran las secuencias de aminoácidos deducidas para los receptores gustativos T1R felinos (T1R1, SEC Nº ID:61; T1R2, SEC Nº ID:64; y T1R3, SEC Nº ID:2) alineadas respecto de las secuencias de aminoácidos de los miembros de la familia de receptores T1R del ser humano (T1R1, SEC Nº ID:17; T1R2, SEC Nº ID:20; T1R3, SEC Nº ID: 12), de la rata (T1R1, SEC Nº ID:16; T1R2, SEC Nº ID:19; T1R3, SEC Nº ID: 14), y del ratón (T1R1, SEC Nº ID:15; T1R2, SEC Nº ID:18; T1R3, SEC Nº ID: 13). Un asterisco (*) indica una posición nucleotídica conservada en las secuencias (es decir, una posición de nucleótido que se conserva en las diferentes secuencias). Un signo de dos puntos (:) indica una sustitución de aminoácido conservada observada. Un punto (.) indica una sustitución de aminoácido semiconservada observada. El T1R1 del gato es muy similar al humano y al de los roedores en términos de estructura génica; sin embargo, el T1R2 del gato predice una proteína más corta, de 391 aminoácidos, en comparación con la proteína del T1R2 del ser humano, que tiene 839 aminoácidos. Dicha predicción, de un T1R2 corto, es el resultado de un codón de parada TAA en el exón 3. La secuencia de aminoácidos deducida para el T1R3 del gato (SEC Nº ID:2) contiene cuatro aminoácidos adicionales en las posiciones 11-14, en comparación con los receptores T1R3 homólogos del ratón (SEC Nº ID: 13), del ser humano (SEC Nº ID: 12) y de la rata (SEC Nº ID: 14). La secuencia deducida correspondiente al gato revela una treonina en la posición 64 (una posición equivalente al aminoácido 60 del ratón), y una leucina en la posición 59 (una posición equivalente a la posición 55 del ratón). En el ratón, las sustituciones de aminoácidos, a saber, de una treonina en la posición 60 y de una alanina en la posición 55 (ambas posiciones situadas dentro del dominio N-terminal extracelular putativo del polipéptido, están presentes en estirpes de ratones que muestran una preferencia baja (una menor preferencia) por el estímulo dulce sacarina (Bachmanov *et al.*, *Chem. Senses*, 26:925-933 (2001)). La leucina es una sustitución conservadora para la alanina. Las diferencias entre las secuencias de aminoácidos del receptor T1R3 felino y murino pueden ser responsables de las diferencias funcionales que conducen a las diferentes preferencias gustativas de una especie y la otra.

55 [0205] En la **Figura 3** se ilustra un árbol filogenético que muestra las relaciones entre la familia de receptores T1R del gato doméstico y la familia de receptores T1R de otras especies, incluidos los T1R1, los T1R2 y los T1R3 del ser humano, de la rata y del ratón. Los receptores T1R de la rata y del ratón están estrechamente relacionados, mientras que los receptores T1R del ser humano y del gato difieren de los de la rata y del ratón. Un hecho interesante es que los estímulos dulces a los que responden la rata y el ratón son muy similares, mientras que los que estimulan al ser humano

5 y los que estimulan al gato difieren entre sí y de los de la rata y del ratón. Por ejemplo, un hecho singular es que los seres humanos tienen capacidad para saborear la mayoría de los endulzantes de alta intensidad, mientras que a los gatos les resultan atractivos numerosos aminoácidos, pero no son capaces de detectar (saborear) ni la mayoría de los endulzantes tipo carbohidrato ni la mayoría de los endulzantes de alta intensidad. El T1R2 felino difiere del T1R2 del ser humano, del ratón y de la rata, algo que se ajusta al hecho de que el gato no muestra preferencia por los endulzantes tipo carbohidrato.

10 [0206] En la **Figura 4** se ilustra la conformación prevista para el receptor T1R3 felino. El receptor T1R3 felino es un receptor con siete dominios transmembranales. Se generó la estructura del receptor T1R3 felino usando el programa de modelado de proteínas disponible en <www.ebi.ac.uk/~moeller/transmembrane.html>.

15 [0207] La **Figura 5A** muestra la conformación prevista del T1R1 felino, e indica que el receptor es un receptor del tipo "7-transmembranal" (7 dominios transmembranales). En la **Figura 5B** se ilustra la conformación prevista para el receptor T1R2 felino. Dado que el T1R2 felino es una proteína corta (391 aminoácidos), no se prevé una proteína con 7 dominios transmembranales. Sin los siete dominios transmembranales, es posible que el receptor T1R2 felino no interaccione adecuadamente con un socio de dimerización (por ejemplo, T1R3) y/o tampoco con la membrana plasmática (citoplásmica), lo que podría conducir a la incapacidad del gato para saborear los carbohidratos dulces. Es posible que el T1R2 felino tenga otra función.

20 [0208] En la **Tabla 4** se indica el porcentaje de homología de los miembros de la familia (de receptores) T1R, respecto de los receptores gustativos T1R del gato. La porción de la Tabla 4 que queda a la izquierda de la diagonal (en negrita) indica el porcentaje de homología basado en el marco de lectura abierto de las secuencias de nucleótidos obtenidas (Figura 1) para la familia T1R de ser humano, gato, rata y ratón. La porción superior a la derecha de la diagonal (en cursiva) muestra el porcentaje de homología de los miembros de la familia T1R, basado en las secuencias de aminoácidos de la Figura 2. La secuencia de nucleótidos del T1R1 del gato muestra una homología del 84% respecto de la del T1R1 humano, del 78% respecto de la del T1R1 de rata, y del 79% respecto de la del T1R1 murino. A nivel de aminoácidos, el T1R1 del gato muestra una homología del 81% respecto del T1R1 humano, del 74% respecto del T1R1 de rata, y del 74% respecto del T1R1 murino. En general, el T1R1 del gato muestra una homología baja respecto de los demás miembros conocidos de la familia T1R, y T1R2 y T1R3, de ser humano, rata y ratón. El mismo intervalo de homologías relativamente bajas está presente respecto de los receptores T1R1 de ser humano, rata y ratón, y respecto de los receptores T1R2 y T1R3 de la misma especie. La secuencia de nucleótidos del T1R2 del gato muestra una homología del 72% respecto de la del T1R2 humano, del 61% respecto de la del T1R2 de rata, y del 64% respecto de la del T1R2 murino. A nivel de aminoácidos, el T1R2 del gato muestra una homología del 58% respecto del T1R2 humano, del 52% respecto del T1R2 de rata, y del 53% respecto del T1R2 murino. Dado que el T1R2 del gato tiene una proteína más corta (de 391 aa [aminoácidos]) a causa de un codón de parada en el exón 3, el T1R2 del gato muestra una homología mucho menor con el T1R2 de otras especies que la homología en cuanto a T1R1 y T1R3 en las diferentes especies, lo que indica que el T1R2 del gato es muy diferente del T1R2 de las demás especies. Ello se ajusta también a las respuestas conductuales que indican que los gatos no muestran preferencia por los endulzantes tipo carbohidrato. Esto indica que es posible que el T1R2 del gato no sea funcional, lo que lo libera de la presión selectiva. Por eso, lo más probable es que se hayan acumulado mutaciones en el T1R2 del gato. En general, el T1R2 del gato muestra una homología baja respecto de los demás miembros de la familia T1R, T1R1 y T1R3, de ser humano, rata y ratón. El mismo intervalo de homologías relativamente bajas está presente respecto de los receptores T1R2 de ser humano, rata y ratón, y respecto de los receptores T1R1 y T1R3 de la misma especie.

45 **Tabla 4. Porcentaje de homología, entre diversas especies, en cuanto a los T1Rs**

Especie	Ratón			Rata			Ser humano			Gato		
	T1R1	T1R2	T1R3	T1R1	T1R2	T1R3	T1R1	T1R2	T1R3	T1R1	T1R2	T1R3
Ratón T1R1		36	30	90	36	30	73	37	30	74	30	30
Ratón T1R2	55		28	36	91	28	34	69	28	36	53	28
Ratón T1R3	33	15		31	28	92	30	27	72	30	25	72
Rata T1R1	91	55	33		37	31	73	37	31	74	26	31
Rata T1R2	55	91	15	57		28	34	71	29	36	52	28
Rata T1R3	33	21	93	32	15		31	27	73	30	26	72

ES 2 625 342 T3

Ser humano T1R1	79	56	35	79	56	35		<i>35</i>	<i>31</i>	<i>81</i>	<i>29</i>	<i>31</i>
Ser humano T1R2	57	78	17	56	78	17	57		<i>28</i>	<i>36</i>	<i>58</i>	<i>28</i>
Ser humano T1R3	41	39	73	39	36	75	40	38		<i>29</i>	<i>23</i>	<i>73</i>
Gato T1R1	79	54	35	78	56	35	84	56	53		<i>28</i>	<i>30</i>
Gato T1R2	42	64	22	41	61	22	44	72	48	44		<i>29</i>
Gato T1R3	33	34	74	36	36	75	53	39	79	53	39	

Nota: Las celdas de la porción superior, a la derecha (*en cursiva*), contienen la homología deducida basada en los aminoácidos; las celdas de la porción inferior, a la izquierda (**en negrita**), contienen la homología basada en los nucleótidos.

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado y purificado que codifica un polipéptido de receptor T1R felino y que comprende:
- 5
- a) la secuencia de nucleótidos de la SEC N° ID:1 o de la SEC N° ID:99;
 - b) una variante del polinucleótido de la SEC N° ID:1 o SEC N° ID:99, y dicha variante tiene una identidad (igualdad) de al menos un 98% respecto del polinucleótido de la SEC N° ID:1 o SEC N° ID:99 y codifica un polipéptido que tiene esencialmente la misma actividad biológica que un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEC N° ID:1 o SEC N° ID:99;
 - 10 c) una variante del polinucleótido de la SEC N° ID:1 o SEC N° ID:99, y dicha variante tiene una identidad (igualdad) de al menos un 98% respecto del polinucleótido de la SEC N° ID:1 o SEC N° ID:99 y codifica un polipéptido que confiere una percepción modificada del sabor (percepción gustativa modificada) respecto de uno o más estímulos gustativos, en comparación con un polipéptido codificado por el polinucleótido de la SEC N° ID:1 o SEC N° ID:99; o
 - 15 d) una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEC N° ID:2.
2. El polinucleótido de la Reivindicación 1, y dicho polinucleótido comprende una variante del polinucleótido de la SEC N° ID:1 o SEC N° ID:99 que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEC N° ID:2 y tiene una sustitución no conservada de un aminoácido, a nivel del residuo 59 o del residuo 64.
- 20
3. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la Reivindicación 1 o de la Reivindicación 2, unido operativamente a un promotor.
4. Una célula host que comprende el vector de expresión de la Reivindicación 3.
- 25
5. Un cultivo celular que comprende al menos una célula de la Reivindicación 4.
6. Un polipéptido de receptor T1R felino que comprende:
- a) la secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido de la Reivindicación 1;
 - b) la secuencia de aminoácidos de la SEC N° ID:2;
 - c) una variante de la SEC N° ID:2, y dicha variante tiene una identidad (igualdad) de al menos un 98% respecto de la secuencia de aminoácidos de la SEC N° ID:2 y tiene esencialmente la misma actividad biológica que el polipéptido de la SEC N° ID:2;
 - 30 d) una variante de la SEC N° ID:2, y dicha variante tiene una identidad (igualdad) de al menos un 98% respecto de la secuencia de aminoácidos de la SEC N° ID:2 y tiene al menos una variación de la secuencia de la SEC N° ID:2, y dicha variación confiere una percepción gustativa modificada respecto de uno o más estímulos gustativos, en comparación con un polipéptido de la SEC N° ID:2.
- 35
7. Un kit para la detección de un polinucleótido que codifica un polipéptido de receptor T1R felino, y dicho kit comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de receptor T1R felino de la Reivindicación 6, así como instrucciones referentes a la detección de dicho polinucleótido.
- 40
8. Un método para la producción de un polipéptido de receptor T1R felino, y dicho método comprende cultivar la célula host de la Reivindicación 4 y recuperar dicho polipéptido de receptor T1R felino de dicha célula host.
- 45
9. Un método para identificar compuestos que interaccionan con un receptor T1R felino, y dicho método comprende:
- poner en contacto un polipéptido de receptor T1R felino, de la Reivindicación 6, con un compuesto de prueba; y detectar la interacción entre dicho polipéptido de receptor T1R felino y dicho compuesto.
- 50
10. El método de la Reivindicación 9, en el que dicho paso de poner en contacto el mencionado polipéptido de receptor T1R felino con el mencionado compuesto de prueba tiene lugar en presencia de un socio de dimerización de dicho polipéptido de receptor T1R felino.
- 55
11. Un método para la identificación de un agonista o un antagonista de un polipéptido de receptor T1R felino, y dicho método comprende:
- la puesta en contacto de un polipéptido de receptor T1R felino, de la Reivindicación 6, con un compuesto de prueba; y
- 60 la detección de un aumento o una reducción en la actividad biológica de dicho polipéptido de receptor T1R felino, en presencia de dicho compuesto.

12. El método de la Reivindicación 11, en el que el paso de la puesta en contacto tiene lugar en presencia de un socio de dimerización de dicho polipéptido de receptor T1R felino.
- 5 13. El método de la Reivindicación 11, en el que el polipéptido de receptor T1R felino se expresa a partir de un polinucleótido que comprende:
- a) la secuencia de nucleótidos de la SEC N° ID:1 o de la SEC N° ID:99;
 - b) una variante del polinucleótido de la SEC N° ID:1 o SEC N° ID:99, y dicha variante tiene una identidad (igualdad) de al menos un 98% respecto del polinucleótido de la SEC N° ID:1 o SEC N° ID:99 y codifica un polipéptido que tiene esencialmente la misma actividad biológica que un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEC N° ID:1 o SEC N° ID:99;
 - 10 c) una variante del polinucleótido de la SEC N° ID: 1 o SEC N° ID:99, y dicha variante tiene una identidad (igualdad) de al menos un 98% respecto del polinucleótido de la SEC N° ID:1 o SEC N° ID:99 y codifica un polipéptido que confiere una percepción modificada del sabor (percepción gustativa modificada) respecto de uno o más estímulos gustativos, en comparación con un polipéptido codificado por el polinucleótido de la SEC N° ID:1 o SEC N° ID:99; o
 - 15 d) una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEC N° ID:2.
14. Un animal transgénico no humano que comprende un polinucleótido de la Reivindicación 1.
- 20 15. Un método para identificar compuestos que interaccionan con un dímero de receptores T1R felinos, y dicho método comprende:
- la puesta en contacto de un dímero de receptores T1R, que comprende un polipéptido de receptor T1R felino de la Reivindicación 6, con un compuesto de prueba; y
 - 25 la detección de la interacción entre dicho dímero y dicho compuesto.
16. El método de la Reivindicación 15, en el que el dímero comprende un polipéptido de receptor T1R1 y un polipéptido de receptor T1R3, o dos polipéptidos de receptor T1R3.
- 30 17. Un dímero de receptores T1R que comprende al menos un polipéptido de receptor T1R felino de la Reivindicación 6.
18. El dímero de receptores T1R de la Reivindicación 17, en el que el dímero es un homodímero o un heterodímero.
- 35 19. El dímero de receptores T1R de la Reivindicación 17, en el que el dímero comprende un polipéptido de la SEC N° ID:2.
- 40 20. El dímero de receptores T1R de la Reivindicación 19, en el que el dímero comprende un homodímero de la SEC N° ID:2 o un heterodímero de la SEC N° ID:2 y de la SEC N° ID:61.

Figura 1C

Tas1r2 murino ATCGAGGCCATGGTGCACCTGATGGTTCACTTCCAGTGGAACTGGATCGTGGTGTGCTGGTG 639
 Tas1r2 de rata ATCGAGGCCATGGTGCAGCTGATGGTTCACTTCCAAATGGAACTGGATGTGGTGTGCTGGTG 639
 TAS1r2 humano GTCGAGGCCATGGTGCAGCTGATGCTGCACCTTCCGCTGGAACTGGATCATTGTGCTGGTG 630
 Tas1r2 felino ATCGAGGCCATGGTGCAGCTGATGTTGTACTTCCGCGGAACTGGATCATCGCGCTGGTG 630
 Tas1r1 murino GTGGAAAGTCATAGTGCAGCTGCTGCAGAGCTTCCGCTGGGTCTGGATCTCGCTCGTTGGC 648
 Tas1r1 de rata GTGGAGGTTCATGGTGCAGCTGCTGCAGAGTFTTGGGTGGGTGTGGATCTCGCTCATTGGC 642
 TAS1r1 humano GTGGAGACCATGGTGTCTGCTGCTGCAGAAAGTTCGGGTGGAACTGGATCTCTCTGGTTGGC 645
 Tas1r1 felino GTGGAGGCCATGGTGTCTGCTGCTGCAGAGCTTCCGGTGGGTCTGGATCTCGGTGGTGGC 645
 Tas1r3 murino CTGCAGGCCATGGTGTCTGCTGCTGCAGAACTTCAGCTGGAAGTGGGTGGCCGCTTAGGG 639
 Tas1r3 de rata CTGCAGGCCATGGTGTGACTCTGTTGCAGAACTTCAGCTGGAAGTGGGTGGCCGCTTAGGG 639
 Tas1r3 felino GTGGCGGCCATGGTGGAGCTGCTGGAGGAGCTCGGCTGGAAGTGGGTGGCGGGTGGGT 651
 TAS1r3 humano CTGCAGGCCCGCCGCGAGCTGCTGCAGGAGTTCGGCTGGAAGTGGGTGGCCGCTTAGGG 639
 * * * ** * ** ** *

Tas1r2 murino AGCGATGACGATATATGGCCGAGAGAACAGCCACCTGCTGAGCCAGCGTCTGACCAACACT 699
 Tas1r2 de rata AGCGAGCAGCATATACGGCCGCGAGAACAGCCACCTGTTGAGCCAGCGTCTGACCAAAACG 699
 TAS1r2 humano AGCAGCGACACCTATGGCCGCGACRAATGGCCAGCTGCTTGGCCGAGCGGTGGCCCGG--- 687
 Tas1r2 felino AGCGAGCGGCACTGCGGCGCGACAGCAGCCAGCTGCTCAGCGATCGCCCGCCCGG--- 687
 Tas1r1 murino AGCTATGGTGACTACGGGCGAGCTGGGCGTACAGGCGCTGGAGGAGC---TGGCCACTCCA 705
 Tas1r1 de rata AGCTACGGTGATTACGGGCGAGCTGGGTGTGCAGGCGCTGGAGGAGC---TGGCCGTGCC 699
 TAS1r1 humano AGCAGTGACGACTATGGGCGAGCTAGGGGTGCAGGCACTGGAGGAGC---AGGCCACTGGT 702
 Tas1r1 felino AGCGAGCGGCGACTACGGGCGAGCTGGGGGTGCAGGCGCTGGAGGAGC---AGGCCACCGG 702
 Tas1r3 murino AGTGATGATGACTATGGCCGCGGAAAGTCTGAGCATCTTTTCTAGTC---TGGCCAAATGCA 696
 Tas1r3 de rata AGTGATGATGACTATGGCCGCGGAAAGTCTGAGCATCTTTTCTAGTC---TGGCCAACTCA 696
 Tas1r3 felino AGTGACGACGAGTATGGCCGCGGAGGCGCTGAGCCTCTTCTCCGGCC---TGGCCAGCGCC 708
 TAS1r3 humano AGCGACGACGAGTACGGCCGCGAGGCGCTGAGCATCTTCTCGGCC---TGGCCGCGGCA 696
 ** * * * ** * ** ** *

Tas1r2 murino GGCGATATCTGCATTGCCTTCCAGGAGGTTCTGCCTGTACCAGAACCCAAACCAGGCCGTG 759
 Tas1r2 de rata AGCGACATCTGCATTGCCTTCCAGGAGGTTCTGCCCATACCTGAGTCCAGCCAGGTCATG 759
 TAS1r2 humano CGCGACATCTGCATCGCCTTCCAGGAGGAGCTGCCACACTGCAGCCCAACCAGAAACTG 747
 Tas1r2 felino GGCGACACCTGCATCGCCTTCCGGGAGAGCGCTGCCCATGCCCCAGCCCAACCAGGCCGTG 747
 Tas1r1 murino CGGGGCACTCTGCCTCGCCTTCAAGGACGTTGGTGCCTCT--CTCCGCCAGGCCGGGTGACC 763
 Tas1r1 de rata CGGGGCACTCTGCCTCGCCTTCAAGGACATCGTGCCTTT--CTCTGCCCGGGTGGGTGACC 757
 TAS1r1 humano CAGGGGATCTGCATTGCTTCAAGGACATCATGCCCTT--CTCTGCCAGGTGGGCGATG 760
 Tas1r1 felino CAGGGGCACTGCGTTCGCTTCAAGGACATCATGCCCTT--CTCTGCCCGGCCGGGCGAGG 760
 Tas1r3 murino CGAGGTATCTGCATCGCACATGAGGGCGCTGGTGGCCACAA-CATGACACTAGTGGCCAAACA 755
 Tas1r3 de rata CGAGGTATCTGCATTGCACACGAGGGCGCTGGTGGCCACAA-CATGACACTAGTGGCCAAACA 755
 Tas1r3 felino AGGGGCACTCTGCATCGCGCATGAGGGCGCTGGTGGCCACTG-C-CGCCA--GGCAGCCTGCG 764
 TAS1r3 humano CGCGGCATCTGCATCGCGCATGAGGGCGCTGGTGGCCGCTG-CGCCGATGACTGACTCGCG 755
 * * ** * * ** * ** *

Tas1r2 murino AGGCCTGAGGAGCAGGACCAACTGGACAACATCCTGGACAAGCTGCGGC---GGACCTCG 816
 Tas1r2 de rata AGGTCCGAGGAGCAGGACCAACTGGACAACATCCTGGACAAGCTGCGGC---GGACCTCG 816
 TAS1r2 humano ACGTCAGAGGAGCGCCAGCGCCTGGTGAACATTTGGGACAAGCTGCGAGC---AGAGCACA 804
 Tas1r2 felino ACGCAGTGGGAGCGCCGCGCCTGAAAGGCCATCGTGGACGAGCAGCAGCGGCAGAGCTCT 807
 Tas1r1 murino C-----AAGGATGACAGCGCATGATGCTGCGTCTGGCTGCGAGCCA-----GGACCA 810
 Tas1r1 de rata C-----GAGGATGACAGCGCATGATGACAGCATCTGGCTCAGGCCA-----GGACCA 804
 TAS1r1 humano A-----GAGGATGACAGCGCATGATGACAGCATCTGGCTCAGGCCA-----GGACCA 807
 Tas1r1 felino A-----GAGGATGACAGCGCATGATGACAGCATCTGGCTCAGGCCA-----GGACCA 807
 Tas1r3 murino G-----TTGGCAAGGTGCTGGATGTAAGTACGCCAAGTGAACCA-----AAGTAAA 801
 Tas1r3 de rata A-----TTGGCAAGGTGCTGGATGTAAGTACGCCAAGTGAACCA-----AAGTAAA 801
 Tas1r3 felino G-----CTGGGCGCCCTACAGGGCGCTGCTGCGCCAGGTGAACCA-----GAGCAGC 810
 TAS1r3 humano G-----CTGGGGAAGGTGACAGGACCTCTGCAACAGGTGAACCA-----GAGCAGC 801
 * * * ** * * ** *

Tas1r2 murino GCGCGTGTGGTGGTGAATATCTCGCCAGAGCTGAGCCTGCACAACTTCTTCCGCGAGGTG 876
 Tas1r2 de rata GCGCGCTGTGGTGGTGTCTCTCGCCAGAGCTGAGCCTGTATAGCTTCTTTCACGAGGTG 876
 TAS1r2 humano GCGCGCTGTGGTGGTGTCTCTCGCCAGAGCTGAGCCTGTATAGCTTCTTTCACGAGGTG 864
 Tas1r2 felino GCGCGCTGTGGTGGTGTCTCTCGCCAGAGCTGAGCCTGTATAGCTTCTTTCACGAGGTG 867
 Tas1r1 murino GTG---GTGTTGGTCTT-CTTAACCGGCACTGGCTGGAGTG--TTCTTCAGGTCTGTG 864
 Tas1r1 de rata GTG---GTGTTGGTCTT-CTTAACCGGCACTGGCTGGAGTG--TTCTTCAGGTCTGTG 858
 TAS1r1 humano GTG---GTGTTGGTCTT-CTTAACCGGCACTGGCTGGAGTG--TTCTTCAGGTCTGTG 861
 Tas1r1 felino GTT---GTGTTGGTCTT-CTTAACCGGCACTGGCTGGAGTG--TTCTTCAGGTCTGTG 861
 Tas1r3 murino GTACAAAGTGGTGGTGTCTGTTTGCCTCTGCGCCGCTGCTGCTACTCCCTTTTTAGTTACAGC 861
 Tas1r3 de rata GTACAGGTGGTGGTGTCTGTTTGCCTCTGCGCCGCTGCTGCTACTCCCTTTTTAGTTACAGC 861
 Tas1r3 felino GTGCAAGTGGTGGTGTCTGTTTGCCTCTGCGCCGCTGCTGCTACTCCCTTTTTAGTTACAGC 870
 TAS1r3 humano GTGCAAGTGGTGGTGTCTGTTTGCCTCTGCGCCGCTGCTGCTACTCCCTTTTTAGTTACAGC 861
 * ** ** * * * ** *

Figura 1D

Tas1r2 murino	CTGCGCTGGAACTTCACAGGCTTTGTGTGGATTGCCTCTGAGTCTGGGCCATCGACCCT	936
Tas1r2 de rata	CTCCGCTGGAACTTCACGGGTTTTGTGTGGATCGCCTCTGAGTCTGGGCTATCGACCCA	936
TAS1r2 humano	CTGCGCCAGAACTTCACGGGCGCCGTTGTGGATCGCCTCCGAGTCTGGGCCATCGACC	924
Tas1r2 felino	CTCCGCCAGAACCCTACGGGCGTGTGTGGATCGCCTCCGAGTCTGGGCCATCGACC	927
Tas1r1 murino	GTGCTGGCCAACTGACTGGCAAGTGTGGATCGCCTCCGAGACTGGGCCATCT-CCAC	923
Tas1r1 de rata	GTGCTGGCCAACTGACTGGCAAGTGTGGATCGCCTCCGAGACTGGGCCATCT-CCAC	917
TAS1r1 humano	GTGCTGGCCAACTGACTGGCAAGTGTGGATCGCCTCCGAGACTGGGCCATCT-CCAG	920
Tas1r1 felino	GTGCTGGCCAACTGACTGGCAAGTGTGGATCGCCTCCGAGACTGGGCCATCT-CTAG	920
Tas1r3 murino	ATCCATCATGGCCTCTCACCCAAAGGTATGGGTGGCCAGTGGTCTTGGCTGACAT-CTGA	920
Tas1r3 de rata	ATCCTTTCATGACCTCTCACCCAAAGGTATGGGTGGCCAGTGGTCTTGGCTGACCT-CTGA	920
Tas1r3 felino	ATCCGCTGCAAGCTCTCACCCAAAGGTATGGGTGGCCAGGAGGCTGGCTGACCT-CAGA	929
TAS1r3 humano	ATCAGCAGCAGGCTCTCGCCAAAGGTATGGGTGGCCAGGAGGCTGGCTGACCT-CTGA	920
	* * * * *	
Tas1r2 murino	GTTCTACACAAC-----CTCACAGAGCTGCGCCACACGGGCACTTTCTGGGCGTCACCA	991
Tas1r2 de rata	GTTCTGCATAAC-----CTCACGGAGCTGCGCCACACGGGTACTTTCTGGGCGTCACCA	991
TAS1r2 humano	GTCTCTGCACAAC-----CTCACGGAGCTGGGCCACTTGGGCACCTTCTGGGCTACCA	979
Tas1r2 felino	GTCTCTGCACGACAGGCCACGGCTGCACAGCCTCCTGGGCTGCACCCAGACCAGCAGC-	986
Tas1r1 murino	GTACATCACCAA----TGTGCCCGGGATCCAGGGCATGGGACGGTGTGGGGGTGGCCA	979
Tas1r1 de rata	GTACATCACCAAG----CGTGCATGGGATCCAGGGCATGGGACGGTGTGGGGGTGGCCA	973
TAS1r1 humano	GCACATCACTGG----GGTGCCCGGGATCCAGGGCATGGGATGGTGTGGGGGTGGCCA	976
Tas1r1 felino	ACACATCAGCAA----TGTGCCCGGGATCCAGGGCATGGGACGGTGTGGGGGTGGCCA	976
Tas1r3 murino	CCTGGTTCATGAC----ACTTCCCAATATTGCCCGTGTGGGCACTGTGCTTGGGTTTTCG	976
Tas1r3 de rata	CCTGGTTCATGAC----ACTTCCCAATATTGCCCGTGTGGGCACTGTGCTTGGGTTTTCG	976
Tas1r3 felino	CCTGGTTCATGAC----GCTGCCCGGGATGCTGGGGTGGGACCGTGTGGGCTTCTCTG	985
TAS1r3 humano	CCTGGTTCATGGG----GCTGCCCGGGATGGCCAGATGGGACGGTGTGGGCTTCTCTC	976
	** * * *	
Tas1r2 murino	TCCAGAGGGTGTCCATCCCTGGCTTCAGCCAGTCCGAGTGCGCCAC---GACAAGCCAG	1048
Tas1r2 de rata	TCCAGAGGGTGTCCATCCCTGGCTTCAGTCACTCCGAGTGCGCCCT---GACAAGCCAG	1048
TAS1r2 humano	TCCAGAGCGTGCCTATCCCGGGCTTCAGTCACTCCGAGTGCGCCAC---CCACAGGCTG	1036
Tas1r2 felino	TCCGGGTCGT--CTATCCCTGGCA--GGTGAAGGCC-----CAC---CCACGGA--G	1029
Tas1r1 murino	TCCAGCAGAGACAAGTCCCTGGCTTGAAGGATTTGAAGAGTCTAT--GTCCAGGCAG	1036
Tas1r1 de rata	TCCAGCAGAGACAAGTCCCTGGCTTGAAGGATTTGAAGAGTCTAT--GTCCAGGCCTG	1030
TAS1r1 humano	TCCAGAAGAGGGCTGTCCCTGGCTTGAAGGCGTTTGAAGRAGCCTAT--GCCCGGGCAG	1033
Tas1r1 felino	TCCAGCAGAGGCTTGTCCCTGGCTTGAAGGATTTGAAGAGGCTAT---GTCCAGGCAG	1033
Tas1r3 murino	AGCGGGGTGCCCTACTGCCTGAATTTTCCATTATGTGGAGACTCACCTTGCCTGGCCG	1036
Tas1r3 de rata	AGCGGGGTGCCCTACTGCCTGAATTTTCCATTATGTGGAGACTGCCTTGCCTTAGCTG	1036
Tas1r3 felino	AGCAGGGGCCCCGATGCCCGGATGCCATCTACGTGCGGACCCGCTGGCCCTGGCCG	1045
TAS1r3 humano	AGAGGGGTGCCCAGCTGCACAGGTTCCCCAGTACGTGAGACGCACCTGGCCCTGGCCA	1036
	* * *	
Tas1r2 murino	AGTATCCCATGCCTA--ACGAGACCAGCCTG-----AGGACTACCTG-TAACCAG	1095
Tas1r2 de rata	GGTATCCCGTGCCTA--ACAGCACCACCTG-----CGSACGACCTG-CAACCAG	1095
TAS1r2 humano	GGCCGCCACCCCTCA--GCAGGACCAGCCAG-----AGCTATACCTG-CAACCAG	1083
Tas1r2 felino	AGTCGGGGCCACACAC--GCAGGCGCCGCCAC-----AGCCCTGAGTGGTTGCCAT	1078
Tas1r1 murino	TGATGGTGTCTCCAGAACTTGCCCAGAGGG-----GTCTGGTGCAGGCACTAAC	1086
Tas1r1 de rata	TAAAGCTGTCTCCAGCGCTTGCCCGGAGGG-----GTCTGGTGCAGGCACTAAC	1080
TAS1r1 humano	ACAAGAAGGCCCTAGCCCTTCCACAAAGG-----CTCTGGTGCAGGCACTAAC	1083
Tas1r1 felino	ATAAGGGGGCCCTGGCCCTTGTCCAGGAC-----CTCCGAGTGCAGCAGCAAC	1083
Tas1r3 murino	CTGACCCAGCATTCTGTGCCTCACTGAATGCGGA---GTTGGATCTGGAGGAACATGTGA	1093
Tas1r3 de rata	CTGACCCAAACATTCTGTGCCTCCCTGAAAGCTGA---GTTGGATCTGGAGGAGCCGCTGA	1093
Tas1r3 felino	CTGACCCGTGCCTTCTGCCTCGCTGGACGCTGAACAGCCAGGCTGGAGGAGCAGCTGG	1105
TAS1r3 humano	CCGACCCGGCCTTCTGTCTGCCTGGGCGAGAGGGAGCAGGGTCTGGAGGAGGACGCTGG	1096
	*	
Tas1r2 murino	---GACTGTGACGCC---TGATGAACATCACCGAGTCTTTAACAACGTTCTCATGCTTT	1150
Tas1r2 de rata	---GACTGTGACGCC---TGCTTGAACACCACCAAGTCTTCAACAACATCTTTACTTT	1150
TAS1r2 humano	---GAGTGCAGAAC---TGCCCTGAACGCCACCTTGTCTTCAACACCATCTCAGGCTCT	1138
Tas1r2 felino	---GGAGACCACTGCCCTGTCTAGCGTCCCTCTCTGCGGGTCTTGGCAACTGG	1135
Tas1r1 murino	C--AGCTGTGCAGGGAGTGTACGCTTTCACGACATGGAACATGCCCGAGCTTGGAGCCT	1144
Tas1r1 de rata	C--AGCTGTGCAGGGAGTGTCCACACGTTTACAGACTCGTAACATGCCCGAGCTTGGAGCCT	1138
TAS1r1 humano	C--AGCTCTGCAGAGAATGCCAAGCTTTTCATGGCACACAGATGCCCAAGCTCAAGCCT	1141
Tas1r1 felino	C--AGCTCTGTAGAGAGTGTGGGCTTTCACGGCAGAGCAGATGCCCGAGCTTGGGGCAT	1141
Tas1r3 murino	TGGGGCAAGCCTGTCCACAGTGTGACGACATCATGCTGCAGAACCATCATCTGGGCTGT	1153
Tas1r3 de rata	TGGGGCCACGCTGTTCACAATGTGACTACATCATGCTACAGAACCATCATCTGGGCTGA	1153
Tas1r3 felino	TGGGGCCACGCTGCCCCCAATGTGACCACGTCACGCTAGAGAACCATCTGCCGGGCTG-	1164
TAS1r3 humano	TGGGCCACGCTGCCCGCAGTGTGACTGCATCACGCTGCAGAACCATGAGCGCAGGGCTAA	1156
	*	

Figura 1E

	codón de parada del T1R2 felino (▼)		
Tas1r2 murino	CG-----	GGGGAGCGTGTGGTCTACAGTGTGTACTCGGCCGTCT	1189
Tas1r2 de rata	CG-----	GGGGAGCGCGTGGTCTACAGCGTGTACTCGGCCAGTTT	1189
TAS1r2 humano	CT-----	GGGGAGCGTGTGCTCTACAGCGTGTACTCTGCGGTCT	1177
Tas1r2 felino	CG-----	GGGAGGEGCCAGGGGACGTACCCTGTCCCCAGACACAT	1174
Tas1r1 murino	TC-----	TCCATGAGCGCTGCCTACAATGTGTATGAGGCTGTGT	1183
Tas1r1 de rata	TC-----	TCCATGAGTGC CGCCTACAGAGTGTATGAGGCTGTGT	1177
TAS1r1 humano	TC-----	TCCATGAGTTCTGCCTACAACGCATACCGGGCTGTGT	1180
Tas1r1 felino	TC-----	TCCATGAGCTCTGCTTATAACGCCTACCGGGCAGTCT	1180
Tas1r3 murino	TGCAGAACCTATCAGCTGGGCAATTCACACCACAAATATTTGCACCTATGCAGCTGTGT		1213
Tas1r3 de rata	TGCAGAACCTATCAGCTGGGCAATTCACACCACAAATATTTGCACCTATGCAGCTGTGT		1213
Tas1r3 felino	-----	CTGCACCACAGACCTTCGCTGCCTACCGGGCTGTGT	1201
TAS1r3 humano	-----	ATCACCACAGACGTTCTCTGTCTACGCAGCTGTGT	1192
		* * *	
	▼▼		
Tas1r2 murino	ACGGCGGTAGCCACACCCCTCCACAGACTCCTCCACTGCAACCAGGTCCCGTGCACCA---		1246
Tas1r2 de rata	ACGGCGGTGGCCCATGCCCTCCACAGACTCCTCGGCTGTAAACCGGGTCCCGTGCACCA---		1246
TAS1r2 humano	ATGCTGTGGCCCATGCCCTGCACAGCCTCCTCGGCTGTGACAAAAGCACCTGCACCA---		1234
Tas1r2 felino	AA-----		1176
Tas1r1 murino	ATGCTGTGGCCACGGCCCTCCACCAGCTCCTGGGATGTACCTCTGGGACCTGTGCCA---		1240
Tas1r1 de rata	ACGCTGTGGCCACGGCCCTCCACCAGCTCCTGGGATGTACTTCTGAGATCTGTTCCA---		1234
TAS1r1 humano	ATGCGGTGGCCCATGGCCCTCCACCAGCTCCTGGGCTGTGCCTCTGGAGCTGTTTCCA---		1237
Tas1r1 felino	ACGCAGTGGCCCATGGCCCTCCACCAGCTCCTGGGCTGTGCCTCTGGAGCCTGTTTCCA---		1237
Tas1r3 murino	ACAGTGTGGCTCAGGCCCTTCACAACACCCCTACAGTGCATATGCTCACATTCGCCACGAT		1273
Tas1r3 de rata	ACAGTGTGGCTCAGGCCCTTCACAACACCCCTGCAGTGCATATGCTCACATTCGCCACACAT		1273
Tas1r3 felino	ATGGCGTGGCCACGGCCCTTCACAACACACTTCAGTGCACACGCTCAGGCTGCCCCGCGC		1261
TAS1r3 humano	ATAGCGTGGCCACGGCCCTGCACAACACTCTTCAGTGCACACGCTCAGGCTGCCCCGCGC		1252
	*		
Tas1r2 murino	AGCAAATCGTCTATCCATGGCAGCTACTCAGGGAGATCTGGCATGTCMACTTCACGCTCC		1306
Tas1r2 de rata	AGCAAAGGTCTACCCGTGGCAGCTACTCAGGGAGATCTGGCACGTCAACTTCACGCTCC		1306
TAS1r2 humano	AGAGGGTGGTCTACCCCTGGCAGCTCCTTGAGGAGATCTGGAAGGTCAACTTCACTCTCC		1294
Tas1r2 felino	-----		
Tas1r1 murino	GAGGCCAGTCTACCCCTGGCAGCTTCTTCAGCAGATCTACAAGGTGAATTTCTCTTCTAC		1300
Tas1r1 de rata	GAGGCCAGTCTACCCCTGGCAGCTTCTTCAGCAGATCTACAAGGTGAATTTCTCTTCTAC		1294
TAS1r1 humano	GGGGCCGAGTCTACCCCTGGCAGCTTTTGGAGCAGATCCACAAGGTGCATTTCTCTTCTAC		1297
Tas1r1 felino	GGGACCCGAGTCTACCCCTGGCAGCTTCTGGAGCAGATCCGCAAGGTGAATTTCTCTCTAC		1297
Tas1r3 murino	CAGAACATGTTCTACCCCTGGCAGCTCCTGGAGAACATGTACAATATGAGTTTCCATGCTC		1333
Tas1r3 de rata	CAGAGCCTGTTCAACCCCTGGCAGCTCCTGGAGAACATGTACAATATGAGTTTCCGCTGCTC		1333
Tas1r3 felino	GGGAGCCTGTGGGCCCTGGCAGCTCCTAGAGAACATGTACAACGTGAGCTTCCGCTGCTC		1321
TAS1r3 humano	AGGACCCCGTGAAGCCCTGGCAGCTCCTGGAGAACATGTACAACCTGACCTTCCACGTTG		1312
Tas1r2 murino	TGGGCAACCAGCTCTTCTTCGACGAACAAGGGGACATGCCGATGCTCCTGGACATCATCC		1366
Tas1r2 de rata	TGGGTAAACCGCTCTTCTTTGACCAACAAGGGGACATGCCGATGCTCCTGGACATCATCC		1366
TAS1r2 humano	TGGACCACCAATCTTCTTCGACCCGCAAGGGGACGTTGGCTCTGCACTTGGAGATTGTCC		1354
Tas1r2 felino	-----		
Tas1r1 murino	ATAAGAAGACTGTAGCATTCGATGACAAGGGGGACCCTCTAGGTTATTATGACATCATCG		1360
Tas1r1 de rata	ATGAGAATACTGTGGCATTGTATGACAAAGGGGACACTCTAGGTTACTACGACATCATCG		1354
TAS1r1 humano	ACAAGGACACTGTGGCGTTTAAATGACAACAGAGATCCCTPCAGTAGCTATACATAATATG		1357
Tas1r1 felino	ACAAGGACACCGTGGGTTTAAATGACAACAGGGGACCCTCTCAGTGGCTACGACATAATATG		1357
Tas1r3 murino	GAGACTTGACACTACAGTTTGTATGCTGAAGGGAATGTAGACATGGAATATGACCTGAAGA		1393
Tas1r3 de rata	GAGACTTGACACTACAGTTTGTATGCTGAAGGGAATGTAGACATGGAATATGACCTGAAGA		1393
Tas1r3 felino	GCGGCCCTGGCACTGCAGTTTCGACGCCACGCGGGAACGTGAACGTGGATTACGACCTGAAC		1381
TAS1r3 humano	GCGGGCTGCCGCTGCGGTTTCGACGCCACGCGGGAACGTGGACATGGAGTACGACCTGAAGC		1372
Tas1r2 murino	AGTGGCAATGGGGCTGAGCCAGAACCCTTCCAAAGCATCGCCTCCTACTCCCCACCG		1426
Tas1r2 de rata	AGTGGCAGTGGGACTGAGCCAGAATCCCTTCCAAAGCATCGCCTCCTACTCCCCACCA		1426
TAS1r2 humano	AGTGGCAATGGGACCGGAGCCAGAATCCCTTCCAAAGCATCGCCTCCTACTCCCCCTGC		1414
Tas1r2 felino	-----		
Tas1r1 murino	CCTGGGACTGGAATGGACCTGAATGGACCTTTGAGGTCATTGGTTCTGCCTCACTGTCTC		1420
Tas1r1 de rata	CCTGGGACTGGAATGGACCTGAATGGACCTTTGAGGTCATTGGCTCTGCCTCACTGTCTC		1414
TAS1r1 humano	CTTGGGACTGGAATGGACCCAAAGTGGACCTTCACGGTCTCTGCTTCTCCACATGGTCTC		1417
Tas1r1 felino	CCTGGGACTGGAGTGGCCCAAGTGGAACTTCAGGGTCAATGGCTCCTCCATGTGGCTC		1417
Tas1r3 murino	TGTGGGTGTGGCAGAGCCCTACACCTGTATTACATACTGTGGGCACCTTCAACGGCACCC		1453
Tas1r3 de rata	TGTGGGTGTGGCAGAGCCCTACACCTGTACTACATACTGTAGGCACCTTCAACGGCACCC		1453
Tas1r3 felino	TGTGGGTGTGGCAGGACCCGACGCCGAGCTGCGCACCTTAGGCACCTTCAAGGGCCGCC		1441
TAS1r3 humano	TGTGGGTGTGGCAGGGCTCAGTGCDCAGGCTCCACGACGTGGGCAGGTTCAACGGCAGCC		1432

Figura 1F

Tas1r2 murino	AGACGAGGCTGACCTACATTAG---CAATGTGCTCTGGTACACCCCAACACACCGGTCC	1483
Tas1r2 de rata	GCAAGAGGCTAACCTACATTAA---CAATGTGCTCTGGTACACCCCAACACACCGGTCC	1483
TAS1r2 humano	AGCGACAGCTGAAGAACATCCA---AGACATCTCTGGCACACCGTCAACACACCGATCC	1471
Tas1r2 felino	-----	
Tas1r1 murino	CAGTTCATCTAGACATAAATTAAGACAAAATCCAGTGGCACGGGAAGAACAATCAGGTGC	1480
Tas1r1 de rata	CAGTTCATCTGGACATAAATTAAGACAAAATCCAGTGGCACGGGAAGAACAATCAGGTGC	1474
TAS1r1 humano	CAGTTCAGCTAAACATAAATTAAGACAAAATCCAGTGGCACGGGAAGAACAATCAGGTGC	1477
Tas1r1 felino	CAGTTCAGCTGGACATAAATTAAGACAAAATCCAGTGGCACGGGAAGAACAATCAGGTGC	1477
Tas1r3 murino	---TTCAGCTGCAGCACTCGAA-----AATGTACTGGC-----CAGGCACCAGGTGC	1498
Tas1r3 de rata	---TTCAGCTGCAGCACTCGAA-----AATGTACTGGC-----CAGGCACCAGGTGC	1498
Tas1r3 felino	---TGGAGCTCTGGCGCTCTCA-----GATGTGCTGGCACACGCCGGGAGCAGCAGC	1492
TAS1r3 humano	---TCAGGACAGAGCGCCTGAA-----GATCCGCTGGCACACGCTTGACACCAGAAAGC	1483
Tas1r2 murino	CCATATCCATGTGTTCTAAGAGTTGCCAGCCTGGGCAAAATGAAAAAACCCTAGGCGCTCC	1543
Tas1r2 de rata	CTGTCTCCATGTGTTCCAAGAGCTGCCAGCCAGGGCAAAATGAAAAAGTCTGTGGGCTCC	1543
TAS1r2 humano	CTATGTCCATGTGTTCCAAGAGGTGCCAGTCAAGGGCAAAAGAGAGCCCTGTGGGCATCC	1531
Tas1r2 felino	-----	
Tas1r1 murino	CTGTGTGCTGAGTGTGTACCAGGGACTGTCCTGAAAGGGCACCACAGGTTGGTTCATGGGTTCCC	1540
Tas1r1 de rata	CTGTGTGCTGAGTGTGTACCAGGGACTGTCCTGAAAGGGCACCACAGGTTGGTTCATGGGTTCCC	1534
TAS1r1 humano	CTAAGTCTGTGTGTCCAGCGACTGTCCTGAAAGGGCACCACAGGTTGGTTCATGGGTTTCC	1537
Tas1r1 felino	CTAAGTCTGTGTGTCCAGCGACTGTCCTGAAAGGGCACCACAGGTTGGTTCATGGGTTTCC	1537
Tas1r3 murino	CAGTCTCCAGTGTTCCTCCAGTGCAAAAGATGGCCAGGTTCCGCGAGTAAAGGGCTTTC	1558
Tas1r3 de rata	CAGTCTCCAGTGTTCCTCCAGTGCAAAAGATGGCCAGGTTCCGCGAGTAAAGGGCTTTC	1558
Tas1r3 felino	CCGTGTCCAGTGTTCCTCCAGTGCAAAAGATGGCCAGGTTCCGCGCGGTGAAAGGGCTTTC	1552
TAS1r3 humano	CCGTGTCCAGTGTTCCTCCAGTGCAAAAGATGGCCAGGTTCCGCGCGGTGAAAGGGTTCC	1543
Tas1r2 murino	ACCCGTGCTGCTTCGAGTGTGTGGACTGTCCGCCGGGCACCTACCTCAACCGATCAGTATG	1603
Tas1r2 de rata	ACCCGTGCTGCTTCGAGTGTGTGGACTGTCCGCCGGGCACCTACCTCAACCGCTCAGCAG	1603
TAS1r2 humano	ACGTCGTGCTGCTTCGAGTGTGATCGACTGCCTTCCCGGCACCTTCCTCAACCCACTGAA	1591
Tas1r2 felino	-----	
Tas1r1 murino	ACCCTGCTGCTTCGAGTGTGATCGACTGCCTTCCCGGCACCTTCCTCAAC---ACGAGTG	1597
Tas1r1 de rata	ACCCTGCTGCTTCGAGTGTGATCGACTGCCTTCCCGGCACCTTCCTCAAC---ATGAGTG	1591
TAS1r1 humano	ATCACTGCTGCTTCGAGTGTGATCGACTGCCTTCCCGGCACCTTCCTCAAC---AAGAGTG	1594
Tas1r1 felino	ACCCTGCTGCTTCGAGTGTGATCGACTGCCTTCCCGGCACCTTCCTCAAC---AAGAGTG	1594
Tas1r3 murino	ATTCCTGCTGCTATGACTGTGTGGACTGCAAGGCAGGGAGCTACCCGGAAG---CATCCAG	1615
Tas1r3 de rata	ATTCCTGCTGCTATGACTGTGTGGACTGCAAGGCAGGGAGCTACCCGGAAG---CATCCAG	1615
Tas1r3 felino	ACTCTGCTGCTATGACTGTGTGGACTGCAAGGCAGGGAGCTATCCGCGC---AACCCAG	1609
TAS1r3 humano	ACTCTGCTGCTATGACTGTGTGGACTGCAAGGCAGGGAGCTACCCGGAAG---AACCCAG	1600
Tas1r2 murino	ATGAGTTTAACTGCTGTCCTGCCCGGGTTCCATGTGGTCTTACAAGAACAACATCGCTT	1663
Tas1r2 de rata	ATGAGTTTAACTGCTGTCCTGCCCGGGTTCCATGTGGTCTTACAAGAACAACATCACTT	1663
TAS1r2 humano	ATGAATATGAATGCCAGGCGCTGCCCGAATAACGAGTGGTCTTACCAGAGTGAACCTCCT	1651
Tas1r2 felino	-----	
Tas1r1 murino	AGCTTCACACCTGCCAGCCTTGTGGAACAGAAAGATGGGCCCCCTGAGGGGAGCTCAGCCT	1657
Tas1r1 de rata	AGCTTCACACCTGCCAGCCTTGTGGAACAGAAAGATGGGCCCCCTGAGGGGAGCTCAGCCT	1651
TAS1r1 humano	ACCTTACAGATGCCAGCCTTGTGGAAGAAAGAGTGGGCACCTGAGGGGAAGCCAGACCT	1654
Tas1r1 felino	ACCTTACAGATGCCAGCCTTGTGGAAGAAAGATGGGCCCCCTGAGGGGAGTGAACCT	1654
Tas1r3 murino	ATGACTTCACCTGTACTCCATGTAAACAGGACAGTGGTCCCCAGAGAAAAGCACAGCCT	1675
Tas1r3 de rata	ATGACTTCACCTGTACTCCATGTAAACAGGATCAGTGGTCCCCAGAGAAAAGCACACCT	1675
Tas1r3 felino	ATGAOCTCCTCTGCACCCAGTGTGACCAGGACAGTGGTCCCCAGACCAGGACACAGCT	1669
TAS1r3 humano	ACGACATCGCCTGCACCTTTTGTGGCCAGGATGAGTGGTCCCCGGAGCGAAGCACACGCT	1660
Tas1r2 murino	GCTTCAAGCGCGCGCTGGCCTTCTGGAGTGGCACGAAGTGGCCACTATCGTGGTGACCA	1723
Tas1r2 de rata	GCTTCCAGCGCGCGCTACCTTCTGGAGTGGCACGAAGTGGCCACCATCGTGGTGCCA	1723
TAS1r2 humano	GCTTCAAGCGCGCAGCTGGTCTTCTGGAAATGGCATGAGGCACCCACCATCGCTGTGGCC	1711
Tas1r2 felino	-----	
Tas1r1 murino	GCTTCTCACGCACCGTGGAGTCTTGGGGTGGCATGAACCCATCTCTTTGGTGTATATAG	1717
Tas1r1 de rata	GCTTCCACGCACCGTGGAGTCTTGGGGTGGCATGAACCCATCTCTTTGGTGTATATAG	1711
TAS1r1 humano	GCTTCCCGCGCACTGTGGTGTTTTGGCTTTGCGTGAGCACACCTCTGGGTGTCTGTGG	1714
Tas1r1 felino	GCTTCCACGCACCGTGGTGTTTTGGCTTTGCGTGAGCACACCTCTGGGTGTCTGTGG	1714
Tas1r3 murino	GCTTACCTCGCAGGCCAAGTTTCTGGCTTGGGGGGAGCCAGTGTGTCTGTCACTCCTCC	1735
Tas1r3 de rata	GCTTACCTCGCAGGCCAAGTTTCTGGCTTGGGGGGAGCCAGTGTGTCTGTCACTCCTCC	1735
Tas1r3 felino	GCTTCCCGCGCAAGCCATGTCTCTGGCATGGGGGGAGCCAGTGTGTCTGTCACTCCTCC	1729
TAS1r3 humano	GCTTCCCGCGCAGGTCTCGGTTCTGGCATGGGGGGAGCCAGTGTGTCTGTCTGTCTCTCC	1720

Figura 1G

Tas1r2 murino	TGCTGGCCGCCCCGGGCTTCATCAGTACGCTGGCCATTCCTGCTCATCTTCTGGAGACATT	1783
Tas1r2 de rata	TACTGGCTGCCCTGGGCTTCTTCAGTACACTGGCCATTCCTTTTCATCTTCTGGAGACATT	1783
TAS1r2 humano	TGCTGGCCGCCCCGGGCTTCCTCAGCACCCCTGGCCATTCCTGGTGATATTCCTGGAGGCACT	1771
Tas1r2 felino	-----	
Tas1r1 murino	CAGCTAACACGCTATTGCTGCTGCTGCTGATTGGGACTGCTGGCCTGTTTGCCTGGCGTC	1777
Tas1r1 de rata	CAGCTAACACGCTATTGCTGCTGCTGCTGCTGGTGGGACTGCTGGCCTGTTTGCCTGGCATT	1771
TAS1r1 humano	CAGCTAACACGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGTGGGACTGCTGGCCTGTTTGCCTGGCACC	1774
Tas1r1 felino	CAGCTAATACGTTGCTGCTGCTGCTGCTGGTGGGACTGCTGGCCTGTTTGCCTGGCACT	1774
Tas1r3 murino	TGCTGCTTTGCCTGGTGTCTGGGCTAGCACTGGCTGCTCTGGGGCTCTCTGTCCACCACT	1795
Tas1r3 de rata	TGCTGCTTTGCCTGGTGTCTGGGCTGACACTGGCTGCCCTGGGGCTCTTTGTCCACTACT	1795
Tas1r3 felino	CGCTGCTGGCTCTGGCGCTGGGCTGGCGCTGGCAGCCCTGGGGCTCTTCTCTGGCACT	1789
TAS1r3 humano	TGCTGCTGAGCCTGGGCTGGGCTTTGTGCTGGCTGCTTTGGGGCTGTTTCGTTCCACCATC	1780

Tas1r2 murino	TCCAGACGCCCATGGTGGCGCTCGGCCGGCGGCCCATGTGCTTCCTGATGCTGGTGCCCC	1843
Tas1r2 de rata	TCCAGACGCCCATGGTGGCGCTCGGCCGGTGGGCCCATGTGCTTCCTGATGCTGGTGCCCC	1843
TAS1r2 humano	TCCAGACGCCCATAGTTGCTCGGCTGGGGGGCCCCATGTGCTTCCTGATGCTGGACTGTC	1831
Tas1r2 felino	-----	
Tas1r1 murino	TTTACACGCTGTTGTGAGGTGAGCTGGGGTAGGCTGTGCTTCCTCATGCTGGGTTCCT	1837
Tas1r1 de rata	TTTACACACCTGTAGTGAGGTGAGCTGGGGTAGGCTGTGCTTCCTCATGCTGGGTTCCT	1831
TAS1r1 humano	TAGACACCCCTGTGGTGGGCTGAGGTGAGCAGGGGGCCGCTGTGCTTTCTTATGCTGGGCTCC	1834
Tas1r1 felino	TAGACACCCCTGTGGTGAAGTCCGCTGGGGGGCCGACTGTGCTTCCTCATGCTGGGCTCC	1834
Tas1r3 murino	GGGACAGCCCTCTGTGCCAGGCTCAGGTGGCTCAGTTCCTGCTTTGGCCTGATCTGCC	1855
Tas1r3 de rata	GGGACAGCCCTCTGTTCAGGCTCAGGTGGGCTCAGTTCCTGCTTTGGCCTGATCTGCC	1855
Tas1r3 felino	CGGACAGCCCGCTGGTTCAGGCTCAGGTGGGCCAGGGCCCTGCTTTGGCCTGGCTTGGC	1849
TAS1r3 humano	GGGACAGCCCATGGTTCAGGCTCAGGGGGGCCCTGGCCTGCTTTGGCCTGGTGTGCC	1840

Tas1r2 murino	TGCTGCTGGCGTTTCGGGATGGTCCCCGTGATATGTGGGCCCCCCCCACGGTCTTCTCCTGTT	1903
Tas1r2 de rata	TGCTGCTGGCGTTTGGGATGGTCCCCGTGATATGTGGGCCCCCCCCACGGTCTTCTCATGCT	1903
TAS1r2 humano	TGCTGGTGGCATAACATGGTGGTCCCCGTGATAGTGGGCCCCCAAGGTCTCCACCTGCC	1891
Tas1r2 felino	-----	
Tas1r1 murino	TGGTAGCTGGGAGTTGCAGCCTCTACAGCTTCTTCGGGAAGCCACGGTGCCTCCGCTGCT	1897
Tas1r1 de rata	TGGTGGCCGGAAGTTGCAGCTTCTATAGCTTCTTCGGGAGCCACGGTGCCTCCGCTGCT	1891
TAS1r1 humano	TGGCAGCAGGTAGTGGCAGCCTCTATGGCTTCTTTGGGAACCCACAAGGCTGCGTGGCT	1894
Tas1r1 felino	TGGCAGGGGGCAGCTGTGGGCTCTACGGCTTTTTCGGGAGCCACGGTGCCTCCACATGCT	1894
Tas1r3 murino	TAGGCTCTTCTGCTCAGTGTCTTCTGTTCAGGCGGGCCAGGCTCTGCCAGCTGCC	1915
Tas1r3 de rata	TAGGCTCTTCTGCTCAGTGTCTTCTGTTCAGGAGGAGCCACGGTCTGCCAGCTGCC	1915
Tas1r3 felino	TGGGCTGGTCTGCTCAGTGTCTTCTGTTCAGGCGGGCCAGGCTTCCAGCTGCC	1909
TAS1r3 humano	TGGGCTGGTCTGCTCAGGCTTCTTCTGTTCAGGCGGGCCAGGCTTCCAGCTGCC	1900

Tas1r2 murino	TCTGCGGCCAGGCTTTCTTCCACCGTTTGGCTTCTCCGCTGCTGCTCTCCTGCATCAGGTTGC	1963
Tas1r2 de rata	TCTGCGGACAGGCTTTCTTCCACCGTCTGCTTCTCCATCTGCTATCCTGCATCAGGTTGC	1963
TAS1r2 humano	TCTGCGGCCAGGCTCTTTCCCTCTGCTTCCACCAATTCGATCTCCTGTATCGCCGTGC	1951
Tas1r2 felino	-----	
Tas1r1 murino	TGCTGCGTTCAGCCCTCTTTTCTCTCGGGTTTGGCAATTTCTCTCCTGCTGACAAATCC	1957
Tas1r1 de rata	TGCTGCGTTCAGCCCTCTTTTCTCTCGGGTTTGGCAATTTCTCTCCTGCTGACAAATCC	1951
TAS1r1 humano	TGCTAGCCAGGCTCTTTGCCCTTGGTTTCAACCATCTTCTGCTGCTGCTGACAGTTC	1954
Tas1r1 felino	TGTTGCGCCAAAGCCTCCTTGCCTGGGTTTGGCAATTTCTCTGCTGCTGACAAATCC	1954
Tas1r3 murino	TFGCACAAACAACCAATGGCTCACCTCCCTCTCACAGGCTGCTGAGCAGACTCTTCTCTGC	1975
Tas1r3 de rata	TFGCCCAACAACCAATGGCTCACCTCCCTCTCACAGGCTGCTGAGCAGACTCTTCTCTGC	1975
Tas1r3 felino	TGGCCAGCAGCCACTGTTCCACCTCCCACTCACTGGCTGCTGAGCAGGTTTTTCTCTGC	1969
TAS1r3 humano	TGGCCAGCAGCCCTTGTCCACCTCCCGCTCACGGGCTGCTGAGCAGACTCTTCTCTGC	1960

Tas1r2 murino	GCTCCTTCCAGATTGTGTGCGTCTTCAAGATGGCCAGACGCTGCCAAGCGCTACGGTT	2023
Tas1r2 de rata	GCTCCTTCCAGATGCTGTGTGCTTCAAGATGGCCAGACGCTGCCAAGTGCCTACAGTT	2023
TAS1r2 humano	GTTCTTTCAGATCGTCTGCGCTTCAAGATGGCCAGCCGCTTCCACAGCGCTACAGTT	2011
Tas1r2 felino	-----	
Tas1r1 murino	GCTCCTTCCAACCTGGTTCATCATCTTCAAGTTTTCTACCAAGGTACCCACATTTCTACCACA	2017
Tas1r1 de rata	GCTCCTTCCAACCTGGTTCATCATCTTCAAGTTTTCTACCAAGGTGCCACATTTCTACCGTA	2011
TAS1r1 humano	GCTCATTTCCAACTAATCATCATCTTCAAGTTTTCCACCAAGGTACTTACTTCTACCAG	2014
Tas1r1 felino	GCTCCTTCCAACCTGGTCTTTCATCTTCAAGTTTTCTGCCAAAGGTACCCACCTTCTACCGTG	2014
Tas1r3 murino	AAGCAGCTGAGACTTTTGTGGAGTCTGAGCTGCCACTGAGCTGGGCAAACTGGCTATGCA	2035
Tas1r3 de rata	AAGCAGCCGAGATCTTTGTGGAGTCTGAGCTGCCACTGAGTTGGGCAAACTGGCTCTGCA	2035
Tas1r3 felino	AAGCGGCCGAGATATTTGTGGGCTGGAGCTGCCACCAAGCTGGGCTGAGAAGATGCGTG	2029
TAS1r3 humano	AGGCGGCCGAGATCTTGTGGAGTCAAGACTGCTTCTGAGCTGGGCAAGCCGGCTGAGTG	2020

Figura 1H

Tas1r2 murino	TCTGGATGCGTTACCAAGGGCCCTACGCTCTTTGTGGCCCTTCATCACGGCCGTCRAAGGTGG	2083
Tas1r2 de rata	TTTGGATGCGTTACCAAGGGCCCTATGTCCTTCGTGGCCCTTCATCACGGCCATCAAGGTGG	2083
TAS1r2 humano	ACTGGGTCCGCTACCAGGGGCCCTACGCTCTCTATGGCATTATCACGGTACTCAAATGG	2071
Tas1r2 felino	-----	
Tas1r1 murino	CTTGGGCCCAAACCCATGGTGGCCGSAATATTGTCATTGTGTCAGCTCCACGGTCCATTTGT	2077
Tas1r1 de rata	CCTGGGCCCAAACCCATGGTGGCCGSAATATTGTCATTGTGTCAGCTCCACGGTCCATTTGT	2071
TAS1r1 humano	CCTGGGTCCAAAACCACGGTGGTGGCCGCTTTGTGATGATCAGCTCAGCGGCCACGCTGC	2074
Tas1r1 felino	CCTGGGTCCAAAACCACGGTGGTGGCCGCTTTGTGATGATCAGCTCAGCGGCCACGCTGC	2074
Tas1r3 murino	GCTACCTTCGGGGACTCTGGCCCTGGCTAGTGGTACTGTTGGCCACTTTTGTGGAGGCAG	2095
Tas1r3 de rata	GCTACCTTCGGGGCCCTGGCCCTGGCTGGTGGTACTGCTGGCCACTCTTGTGGAGGCTG	2095
Tas1r3 felino	GCCGCCTGCGGGGGCCCTGGCCCTGGCTGGTGGTGGTACTGCTGGCCACTCTTGTGGAGGCTG	2089
TAS1r3 humano	GCTGCCTGCGGGGGCCCTGGCCCTGGCTGGTGGTGGTACTGCTGGCCACTGCTGGTGGAGGCTG	2080
Tas1r2 murino	CCCTGGTGGCAGGCAACATGCTGGCCACCACCATCAACCCCATTTGGCCGGACCGACCCCG	2143
Tas1r2 de rata	CCCTGGTGGTGGGCAACATGCTGGCCACCACCATCAACCCCATTTGGCCGGACCGACCCCG	2143
TAS1r2 humano	TCATTGTGGTAATTGGCATGCTGGCCACGGCCCTCAGTCCCACCACCCGTACTGACCCCG	2131
Tas1r2 felino	-----	
Tas1r1 murino	TCCTCTGTCTCACGTTGGCTTGGCAATGTGGACCCACGGCCACCA---GGGAGTACCAGC	2134
Tas1r1 de rata	TCATCTGTCTCACATGGCTTGTAAATGTGGACCCACGACCCACCA---GGGATACCAGC	2128
TAS1r1 humano	TTATCTGTCTAACTTGGCTGGTGGTGTGGACCCACTGCCTGCTA---GGGAATACCAGC	2131
Tas1r1 felino	TCATCTGTCTAACTTGGCTGGCGGTGTGGACCCACTGCCACCA---GGGAGTACCAGC	2131
Tas1r3 murino	CACTATGTGCTGGTATTGTATCGCTTCCACCAGAGGTGGTGA--CAGACTGGTCAGT	2153
Tas1r3 de rata	CACTATGTGCTGGTACTTGTATGGCTTTCCTCCAGAGGTGGTGA--CAGATTGSCAGGT	2153
Tas1r3 felino	CATTGTGTGCTGGTACTTGGTAGCCTTCCCGCCAGAGGTGGTGA--CGGACTGGCGGGT	2147
TAS1r3 humano	CACTGTGCACCTGGTACTTGGTGGCCTTCCCGCCAGAGGTGGTGA--CGGACTGGCACAT	2138
Tas1r2 murino	ATGACCCCAATATCATAATCCTCTCCTGCCACCCTAACTACCGCAACGGGCTACTCTTCA	2203
Tas1r2 de rata	ATGACCCCAACATCATGATCCTCTCCTGCCACCCTAACTACCGCAACGGGCTACTGTTCA	2203
TAS1r2 humano	ATGACCCCAAGATCACAATTTGCTCCTGTAAACCCCAACTACCGCAACAGCCTGCTGTTCA	2191
Tas1r2 felino	-----	
Tas1r1 murino	GCTTCCCCCATCTGGTATTCTTGGAGTGCACAGAGGTCAACTCTGTGGGCTTCTGGTGG	2194
Tas1r1 de rata	GCTTCCCCCATCTGGTATTCTTGGAGTGCACAGAGGTCAACTCTGTAGGCTTCTGGTGG	2188
TAS1r1 humano	GCTTCCCCCATCTGGTATTCTTGGAGTGCACAGAGGTCAACTCTGGGCTTCTACTGG	2191
Tas1r1 felino	GCTTCCCTCAGCTGGTGGTCTTGGATTGCACAGAGGCCAACTCACCGGGCTTCTGGTGG	2191
Tas1r3 murino	GCTGCCACAGA--GGTACTGGAGCACTGCCACGTGCGTTCCTGGGTGAGCCTGGGCTTGG	2212
Tas1r3 de rata	GCTGCCACAGGA--GGTACTGGAACTGCCGCATGCGTTCCTGGGTGAGCCTGGGCTTGG	2212
Tas1r3 felino	ACTGCCACAGA--GGCGCTGGTGCACCTGCCACGTGCACCTCCTGGATGAGCTTCGGCCTGG	2206
TAS1r3 humano	GCTGCCACAGGA--GGCGCTGGTGCACCTGCCACAGCTCCTGGGTGAGCTTCGGCCTAG	2197
Tas1r2 murino	ACACCAGCATGGACTTGTCTGTCTGCTGGGTTTCAGCTTCGCGTACGTGGGCAAGG	2263
Tas1r2 de rata	ACACCAGCATGGACTTGTCTGTCTGCTGGGTTTCAGCTTCGCTTACATGGGCAAGG	2263
TAS1r2 humano	ACACCAGCCTGGACCTGCTGCTCTCAGTGGTGGGTTTCAGCTTCGCTTACATGGGCAAG	2251
Tas1r2 felino	-----	
Tas1r1 murino	CTTTCGCACACAACATCCTCCTCTCCATCAGCACCTTTGCTGCAGCTACCTGGGTAAAG	2254
Tas1r1 de rata	CTTTCACCCACAACATCCTCCTCTCCATCAGTACCTTTCGCTGCAGCTACCTGGGTAAAG	2248
TAS1r1 humano	CCTTCCCTTACAAATGGCCCTCCTCTCCATCAGTGCCTTTGCTGCAGCTACCTGGGTAAAG	2251
Tas1r1 felino	CTTTCGCCTACAAATGGCCCTCCTGTCCGTCAGCGCCTTTGCTGCAGCTACCTGGGCAAG	2251
Tas1r3 murino	TGCACATCACCAAATGCAATGTTAGCTTTCCCTCTGCTTTCCTGGGCACCTTCTGGTACAGA	2272
Tas1r3 de rata	TGCACATCACCAAATGCAATGTTAGCTTTCCCTCTGCTTTCCTGGGCACCTTCTGGTACAGA	2272
Tas1r3 felino	TGCATGCCACTAACGCCATGCTGGCCCTTCCCTCTGCTTTCCTGGGCACCTTCTGGTACAGA	2266
TAS1r3 humano	CGCACGCCACCAATGCCACGCTGGCCCTTCTCTGCTTTCCTGGGCACCTTCTGGTACAGA	2257
Tas1r2 murino	AAC TGCCCACTACAACGAAGCCAAAGTTCATCACCCCTCAGCATGACCTTCTCCTTCA	2323
Tas1r2 de rata	AGCTGCCCACTACAACGAAGCCAAAGTTCATCACCTCAGCATGACCTTCTCCTTCA	2323
Tas1r2 humano	AGCTGCCCACTACAACGAGGCCAAAGTTCATCACCCCTCAGCATGACCTTCTATTTCA	2311
Tas1r2 felino	-----	
Tas1r1 murino	AAC TGCCGAGAACTATAACGAAGCCAAATGTTGTCACCTTCAGCCTGCTCCTCAACTTCG	2314
Tas1r1 de rata	AAC TGCCGAGAACTATAATGAAGCCAAATGTTGTCACCTTCAGCCTGCTCCTCAACTTCG	2308
TAS1r1 humano	ACTTGCCGAGAACTACAACGAGGCCAAATGTTGTCACCTTCAGCCTGCTCCTCAACTTCG	2311
Tas1r1 felino	ACCTGCCGAGAACTACAACGAGGCCAAATGTTGTCACCTTTFAGTCTGCTGCTCAACTTCG	2311
Tas1r3 murino	GCCAGCCTGGCCGCTACAACCGTGGCCGTTGGTCTCACCTTCGCCATGCTAGCTTATTTCA	2332
Tas1r3 de rata	GCCAGCCTGGTCCGCTATAACCGTGGCCGTTGGCCCTCACCTTCGCCATGCTAGCTTATTTCA	2332
Tas1r3 felino	GCCGGCCAGGCCGCTACAATGTTGCCGCGGCCCTCACCTTTCGCCATGCTGGCCTACTTCA	2326
TAS1r3 humano	GCCAGCCGGGCCGCTACAACCGTGGCCGTTGGCCCTCACCTTTCGCCATGCTGGCCTACTTCA	2317

Figura 11

Tas1r2 murino	CCTCCTCCATCTCCCTCTGCACGTTTCATGTCTGTCCACGATGGCGTGTGGTCACCATCA	2383
Tas1r2 de rata	CCTCCTCCATCTCCCTCTGCACCTTCATGTCTGTGCACGACGGCGTGTGGTCACCATCA	2383
TAS1r2 humano	CCTCATCCGTCCTCCCTCTGCACCTTCATGTCTGTGCTACAGCGGGTGTGGTCACCATCG	2371
Tas1r2 felino	-----	
Tas1r1 murino	TATCCTGGATCGCTTTCTTCACCATGTCCAGCATTTACCAGGGCAGCTACCTACCCGCGG	2374
Tas1r1 de rata	TATCCTGGATCGCCTTCTTCACCATGGCCAGCATTTACCAGGGCAGCTACCTGCTGCGG	2368
TAS1r1 humano	TGTCTGGATCGCCTTCTTCACCACGGCCAGCGTCTACGACGGCAAGTACCTGCTGCGG	2371
Tas1r1 felino	TGTCTGGATTGCTTCTTCACCACGGCCAGCGTCTACCAGGGCAAGTACTTGCCCGCGG	2371
Tas1r3 murino	TCACCTGGGTCTCTTTTGTGCCCTCCTGGCCAAATGTGCAGGTGGCTACCAGCCAGCTG	2392
Tas1r3 de rata	TCATCTGGGTCTCTTTTGTGCCCTCCTGGCTAATGTGCAGGTGGCTACCAGCCAGCTG	2392
Tas1r3 felino	TCACCTGGATCTCTTTTGTGCCCTCCTTTGCCAAATGTGCACGTGGCTACCAGCCTGCCG	2386
TAS1r3 humano	TCACCTGGGTCTCTTTTGTGCCCTCCTGGCCAAATGTGCAGGTGGTCTCAGGCCCGCGG	2377
Tas1r2 murino	TGGATCTCCTGGTCACTGTGCTCAACTTTCGGCCATCGGCTTGGGGTACTTTGGCCCCA	2443
Tas1r2 de rata	TGGACCTCCTGGTCACTGTGCTCAACTTTCGGCCATCGGCTTGGGGTACTTTGGCCCCA	2443
TAS1r2 humano	TGGACCTCTTGGTCACTGTGCTCAACTTTCGGCCATCAGCCTGGGTACTTGGCCCCA	2431
Tas1r2 felino	-----	
Tas1r1 murino	TCAATGTGCTGGCAGGGCTGGCCACTCTGAGTGGCGGCTTCAGCGGCTATTTCTCCCTA	2434
Tas1r1 de rata	TCAATGTGCTGGCAGGGCTGAACACACTGAGCGGGGCTTCAGCGGTTACTTCTCCCTA	2428
TAS1r1 humano	CCAACATGATGGCTGGGCTGAGCAGCCTGAGCAGCGGCTTCGGTGGTATTTCTGCTTA	2431
Tas1r1 felino	TCACCTGCTGGCGGGCTGAGCAGCCTGAGTGGCGGCTTCAGCGGTTATTTCTCCCTA	2431
Tas1r3 murino	TGCAGATGGGTGCTATCCTAGTCTGTGCCCTGGGCATCCTGGTACCTTCCACCTGCCA	2452
Tas1r3 de rata	TGCAGATGGGTGCTATCCTTATTTCTGTGCCCTGGGCATCCTGGCCACCTTCCACCTGCCA	2452
Tas1r3 felino	TGCAGATGGGCACCATCCTCCTCTGTGCCCTGGGTATCCTAGCCACCTTCCACCTGCCA	2446
TAS1r3 humano	TGCAGATGGGCACCTCCTCTGTGTCTGTGCTTGGGCATCCTGGCTGCCTTCCACCTGCCA	2437
Tas1r2 murino	AGTGTTACATGATCCTTTTCTACCCGGAGCGCAACACTTCAGCTTATTTCAATAGCATGA	2503
Tas1r2 de rata	AGTGTACATGATCCTTTTCTACCCGGAGCGCAACACTTCAGCCTTATTTCAATAGCATGA	2503
TAS1r2 humano	AGTGCTACATGATCCTTCTTCTACCCGGAGCGCAACACGCCCCGCTACTTCAACAGCATGA	2491
Tas1r2 felino	-----	
Tas1r1 murino	AATGCTACGTGATTTCTCTGCCGTCCAGAACTCAACAACACAGAACACTTTCAGGCCTCCA	2494
Tas1r1 de rata	AGTGCTATGTGATTTCTCTGCCGTCCAGAACTCAACAATACAGAACACTTTCAGGCCTCCA	2489
TAS1r1 humano	AGTGCTACGTGATCCTCTGCCGCCAGACCTCAACAGCACAGAGCACTTCCAGGCCTCCA	2491
Tas1r1 felino	AGTGCTACGTGATCCTGTGCCGCCAAAATTTAACAGCACACAGCACTTCCAGGCCTCCA	2491
Tas1r3 murino	AGTGCTATGTGCTTCTTTGGCTGCCAAGCTCAACACCCAGGAGTTCTTCTGGGAAGGA	2512
Tas1r3 de rata	AATGCTATGTACTTCTGTGGCTGCCAGAGCTCAACACCCAGGAGTTCTTCTGGGAAGGA	2512
Tas1r3 felino	AGTGCTACCTGCTGCTGCAGCGCCGGAGCTCAACACCCCTGAGTTCTTCTGGGAAGGA	2506
TAS1r3 humano	GGTGTACCTGCTCATGCGGCAGCCAGGGCTCAACACCCCGAGTTCTTCTGGGAGGGG	2497
Tas1r2 murino	TTCCAGGGCTACACGATGAGGAAGAGCTAG-----	2532
Tas1r2 de rata	TCCAGGGCTACACCATGAGGAAGAGC-----	2529
TAS1r2 humano	TCCAGGGCTACACCATGAGGAGGGACTAG-----	2520
Tas1r2 felino	-----	
Tas1r1 murino	TCCAGGACTACACGAGGGCGCTGCCGCCTACTCTGA-----	2529
Tas1r1 de rata	TCCAGGACTACACGAGGGCGCTGCCGCCTACTCTGA-----	2520
TAS1r1 humano	TTCCAGGACTACACGAGGGCGCTGCCGCCTCCACTGA-----	2526
Tas1r1 felino	TCCAGGAGTACACGAGGGCGCTGCCGCCTCCACTGA-----	2526
Tas1r3 murino	ATGCCAAGAAAGCAGCAGATGAGAAC-AGTGGCTGGTGGAGGCAGCTCAGGGACACAAT	2571
Tas1r3 de rata	GCCCCAAGGAAGCATCAGATGGGAAT-AGTGGTAGTAGTGAGGCAACTCGGGGACACAGT	2571
Tas1r3 felino	ATGCCA---GAGCACAGGGCAGCAGTTGGGGCAGGGGAGGGGAGAATCGGGGCAAAAC	2563
TAS1r3 humano	GCCTTGGGGATGCCCAAGGCCAGAAAT---GACGGGNACACAGGAATCAGGGGAAACAT	2553
Tas1r2 murino	-----	
Tas1r2 de rata	-----	
TAS1r2 humano	-----	
Tas1r2 felino	-----	
Tas1r1 murino	-----	
Tas1r1 de rata	-----	
TAS1r1 humano	-----	
Tas1r1 felino	-----	
Tas1r3 murino	GAATGA-----	2577
Tas1r3 de rata	GAATGA-----	2577
Tas1r3 felino	AAGTGACACCCGATCCAGTGACCTCACCOCAGTGA	2598
TAS1r3 humano	GAGTGA-----	2559

Figura 2A

Alineación CLUSTAL W (1.82) de varias secuencias de aminoácidos correspondientes a los receptores T1R

```

T1R2 murino      MGPQARTLHLLFLLHALPKPVML---VGN8DFHLAGDYLLGGLFTLHANVKSIVSHLSYL 57
T1R2 de rata    MGPQARTLCLLSLLLHVLPKPGKL---VENSDFHLAGDYLLGGLFTLHANVKSIVSHLSYL 57
T1R2 humano     MGPRAKTICSLPFTLLWVLAEP-----AENSDFYLPGDYLLGGLFSLHANMKGIVHLNFL 54
T1R2 felino     MGPRAREVCCFTIILPRLLAEP-----AENSDFYLAGDYFLGGLFTLHANVKGIVHLNLL 54
T1R1 murino     MLFWAAHLLLSLQLAVAYCWAFSCQRTSESSPGFSLPGDFLLAGLPSLHADCLQVRRRPLV 60
T1R1 de rata    MLFWAAHLLLSLQL--VYCWAFSCQRTSESSPGFSLPGDFLLAGLPSLHGDCQVRRRPLV 58
T1R1 humano     MLLCTARLVG-LQLLISCCWAFACHSTESSPDFLPGDYLLAGLFPPLHSGCLQVRRRPEV 59
T1R1 felino     MSLPAAHLVG-LQESLSCCWALSCHSTETSADPSLPGDYLLAGLFPPLHSDCPGVRHRPTV 59
T1R3 murino     MPALAIMGLS----LAAPLELGMGASLCLSQQFKAQGDYILGGLFPLG-STEEATLNQRT 55
T1R3 de rata    MPGLAILGLS----LAAPLELGMGSSLCLSQQFKAQGDYILGGLFPLG-TTEEATLNQRT 55
T1R3 humano     MLGPAVLGLS----LWALLHPGTGAPFLCLSQQLRMKGDYVLGGLFPLG-EAEEAGLRST 55
T1R3 felino     MPGLALLGLTALLGLTALLDHWEGATSCLSQQLRMQGDYVLGGLFPLG-SAEGTGLGDGL 59
                . : **:.*.***.*

T1R2 murino     QVPKCNEYNMKVLGYNLMQAMRFAVEEINNCSSLLPGVLLGYEMVDVCYL-SNNIQPGLY 116
T1R2 de rata    QVPKCNEFTMKVLGYNLMQAMRFAVEEINNCSSLLPGVLLGYEMVDVCYL-SNNIHPGLY 116
T1R2 humano     QVPMCKEYEVKVIYGNLMQAMRFAVEEINNDSSLLPGVLLGYEIVDVCYI-SNNVQPVLY 113
T1R2 felino     QVPQCKEYEIYKVLGYDLMQAMCFAGEEINSQSSLLPGVLLGYKMDVSYI-SNNVQPVLY 113
T1R1 murino     TSCDR-SDSFNGHGYHLFQAMRFTVEEINNSTALLPNIITLGYELYDVCSE-SSNVYATLR 118
T1R1 de rata    TSCDR-PDSFNGHGYHLFQAMRFTVEEINNSALLPNIITLGYELYDVCSE-SANVYATLR 116
T1R1 humano     TLCDR-SCSFNEHGYHLFQAMRFGVEEINNSTALLPNIITLGYELYDVCSE-SANVYATLR 117
T1R1 felino     TLCDR-PDSFNGHGYHLFQAMRFGVEEINNSTALLPNIITLGYELYDVCSE-SANVYATLN 117
T1R3 murino     QPNSIPCNRFSPLGLFLAMAMKMAVEEINNGSALLPGLRLGYDLFDTCSEPVVTKPSSLM 115
T1R3 de rata    QPNGILCTRFSPGLFLAMAMKMAVEEINNGSALLPGLRLGYDLFDTCSEPVVTKPSSLM 115
T1R3 humano     RPSSPVCTRFSSNGLLWALAMKMAVEEINNKSDLLPGLRLGYDLFDTCSEPVVAMKPSLM 115
T1R3 felino     QPNATVCTRFSSLGLLWALAVKMAVEEINNGSALLPGLRLGYDLFDTCSEPMVAMKPSLV 119
                .. * * : : ****, ; ***, ; ***, ; *.. : . *

T1R2 murino     FLSQID-DFLPILKDYSQYRQVAVIGPDNSESAITVSNILSYFLVPQVITYSAITDKLR 175
T1R2 de rata    FLAQDD-DLLPILKDYSQYMPHVAVIGPDNSESAITVSNILSHFLIPQITYSAISDKLR 175
T1R2 humano     FLAHED-NLLFIQEDYSNYISRVVAVIGPDNSESVMTVANFLSLFLLPQITYSAISDEL 172
T1R2 felino     FPAKED-CSLFIQEDYSNHCVPRVAVIGPDNSESVMTVARFLSLFLLPQITYSAISDEL 172
T1R1 murino     VLAQQGTGHELMQRDLRNHSSKVALIGPDNTHAVTTAALLSPFIMPLVSYEASSVILS 178
T1R1 de rata    VLSLPGQHHEIQKDLRNHSSKVAFIGPDNTHAVTTAALLGPFIMPLVSYEASSVILS 176
T1R1 humano     VLSLPGQHHEIQKDLRNHSSKVAFIGPDNTHAVTTAALLGPFIMPLVSYEASSVILS 177
T1R1 felino     VLSLPGQHHEIQKDLRNHSSKVAFIGPDNTHAVTTAALLGPFIMPLVSYEASSVILS 177
T1R3 murino     FLAKVGSQSIYAAYCNYTQYQPRVLAVIGPHSSELALITGKFFSFFLMPQVSYASMDRLS 175
T1R3 de rata    FMAKVGSQSIYAAYCNYTQYQPRVLAVIGPHSSELALITGKFFSFFLMPQVSYASMDRLS 175
T1R3 humano     FLAKAGSRDIAAYCNYTQYQPRVLAVIGPHSSELAMVTGKFFSFFLMPQVSYGASMDRLS 175
T1R3 felino     FMAKAGSCSIAAYCNYTQYQPRVLAVIGPHSSELALVTGKFFSFFLMPQVSYGASTDRLS 179
                + : . : : : . .*.*** .: : . . :. **: * : * * *

T1R2 murino     DKRRFPAMLRTPSATHHEIAMVQMLMVHFQWNWIVLVSDDDYGRENSHLLSQRLTNTGD 235
T1R2 de rata    DKRHFPAMLRTPSATHHEIAMVQMLMVHFQWNWIVLVSDDDYGRENSHLLSQRLTKTSD 235
T1R2 humano     DKVRFPALLRTPSADHHEIAMVQMLMLHFRWNWIVLVSDTYGRDNGQLGERVARR-D 231
T1R2 felino     DKQRFPALLRTPAGADHHEIAMVQMLMYFRNWIIVLVSSGDCGRDDSQLSDRPAAG-D 231
T1R1 murino     GKRKFPFLRTIPSDKYQVEVIVALLQSPGWVWISLVGSYGDYDGLGVQALEELATPR-G 237
T1R1 de rata    AKRKFPFLRTVPSDRHQVEVMVQLLQSPGWVWISLIGSYGDYDGLGVQALEELAVPR-G 235
T1R1 humano     VKRQYPSFLRTIPNDKYQVETMVLVLLQKFGWTWISLVGSSDDYDGLGVQALEMQRATGQ-G 236
T1R1 felino     VKRYPSFLRTIPSDKHQVEAMVLLQSPGWVWISLVGSDGDYDGLGVQALEEQATQQ-G 236
T1R3 murino     DRETFFSFFRTVPSDRVQLQAVVTLQNF3WNVVAALGSDDDYGREGLSIFSSLANAR-G 234
T1R3 de rata    DRETFFSFFRTVPSDRVQLQAVVTLQNF3WNVVAALGSDDDYGREGLSIFSSLANAR-G 234
T1R3 humano     ARETFFSFFRTVPSDRVQLTAAAEELLQEPGNVVAALGSDDEYGRQGLSIFSLAAR-G 234
T1R3 felino     NREIFPSFFRTVPSDQVQVAVMVELLEELGWNVVAALGSDDEYGRQGLSIFSLGLASAR-G 238
                : : *:: * * . : : . * : : * : : * . * : . :
    
```


Figura 2C

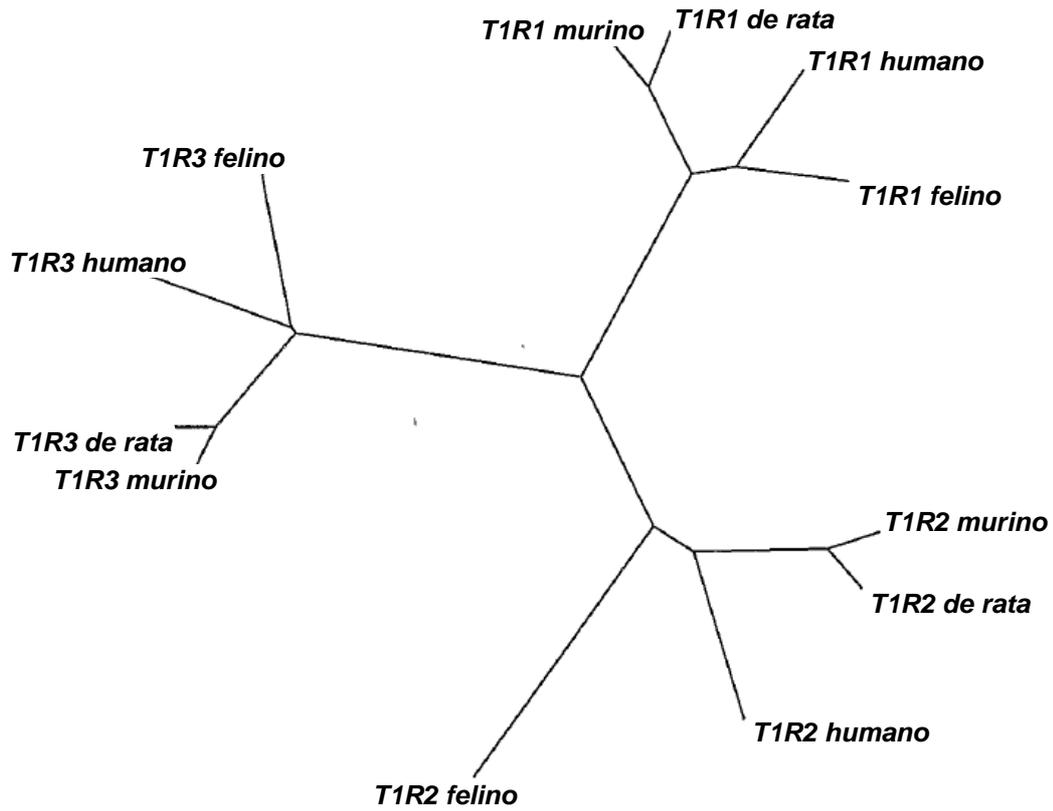
T1R2 murino	FECVDCPPGTYLNRSDVFNCLSCPGSMWS YKNNIACFKRRLAFLEWHEVPTIVVTLAA	578
T1R2 de rata	FECLCDMPGTYLNRSADEFNCLSCPGSMWS YKNDITCFQRRPTFLEWHEVPTIVVAILAA	578
T1R2 humano	FECIDCLPGTFLNHTEDYEBCQACPMNEWSYQSETSCKFRQLVLEWHEAPTIAVALLAA	574
T1R2 felino	-----	
T1R1 murino	FECMPCEAGTFLNFS-ELHTCQPCGTEEWAPFGSSACFSRTVEFLGWHEPISLVLLAANT	576
T1R1 de rata	FECVPCBAGTFLNMS-ELHICQPCGTEEWAPKESSTCFPRTVVEFLAWHEPISLVLLAANT	574
T1R1 humano	FECVPCGAGTFLNKS-DLYRCQPCGKEEWAPFGSQTCPFRTVVFLALREHTSWVLLAANT	575
T1R1 felino	FECVPCBAGSFLNKS-DLHSCQPCGKEKWAPAGSETCFPRTVVFLTWHTISWVLLAANT	575
T1R3 murino	YDCVDCKAGSYRKHP-DDFTCTPCNQDQWSPEKSTACLPRRPFPLAWGEPVVLSSLLLLL	582
T1R3 de rata	YDCVDCKAGSYRKHP-DDFTCTPCGKQDWSPEKSTCLPRRPFPLAWGEPVVLSSLLLLL	582
T1R3 humano	YDCVDCBAGSYRQNP-DDIACTFCGQDWSPERSTRCFRRRSRPLAWGEPVVLSSLLLLL	577
T1R3 felino	YNCVDCKAGSYQRNP-DDLLCTQCDQDQWSPDRSTRCFARKPMPLAWGEPVVLSSLLLLL	580
	: :*	
T1R2 murino	LGFI STLAILLI FWRHFQTPMVRSAAGPMCFLMLVPLLLAFGMVPPVYVGPPTVPSCFRCRQ	638
T1R2 de rata	LGFFSTLAILFI FWRHFQTPMVRSAAGPMCFLMLVPLLLAFGMVPPVYVGPPTVPSCFRCRQ	638
T1R2 humano	LGFLSTLAILVI FWRHFQTFIVRSAGGPMCFLMLTLLLVAYMVVPPVYVGPVKVSTCLCRQ	634
T1R2 felino	-----	
T1R1 murino	LLLLLLIGTAGLFAWRLHPTFVVRSAAGRLCFMLLGSVAGSCLYSFFGKPTVPACLLRQ	636
T1R1 de rata	LLLLLLVGTAGLFAWHFHTFVVRSAAGRLCFMLLGSVAGSCLYSFFGKPTVPACLLRQ	634
T1R1 humano	LLLLLLLGTAGLFAWHLDTFVVRSAAGRLCFMLLGSVAGSCLYSFFGKPTVPACLLRQ	635
T1R1 felino	LLLLLVGTAGLFAWHLDTFVVRSAAGRLCFMLLGSVAGSCLYSFFGKPTVPACLLRQ	635
T1R3 murino	LVLGLALAAALGLSVHWDSPVLVQASGGSLFCFLICLGLFCLSVLLFPGRPSASCLAQQ	642
T1R3 de rata	LVLGLTALAALGLFVHYWDSPLVQASGGSLFCFLICLGLFCLSVLLFPGRPSASCLAQQ	642
T1R3 humano	LALGLVLAALGLFVHHRDSPVLVQASGGPLACFGLVCLGLVCLSVLLFPGQPSARCLAQQ	637
T1R3 felino	LALGLALAAALGLFLWHSDSPVLVQASGGPRACFGLACLGLVCLSVLLFPGQPSARCLAQQ	640
T1R2 murino	AFFTVCFSVCLSCITVRSFQIVCVFKMARRLPSAYGFWMRYHGPYVFAFITAVKVALVA	698
T1R2 de rata	AFFTVCFSICLSCITVRSFQIVCVFKMARRLPSAYSFWMRYHGPYVFAFITAIKVALVV	698
T1R2 humano	ALFPLCFTICISCIIVRSFQIVCAFKMASRFPRAYSYVWRYQGPVVSMAFITVLMKVIIVV	694
T1R2 felino	-----	
T1R1 murino	PLFSLGFAIFLSCLTIRSFQLVIIIFKPFSTKVPTFYHTWAQNHGAG-IFVIVSSTVHLFLC	695
T1R1 de rata	PLFSLGFAIFLSCLTIRSFQLVIIIFKPFSTKVPTFYHTWAQNHGAG-LFVIVSSTVHLFLC	693
T1R1 humano	ALFALGFTIFLSCLTIRSFQLVIIIFKPFSTKVPTFYHAWVQNHGAG-LFVMISSAAQLLFC	694
T1R1 felino	SLLLALGFAIFLSCLTIRSFQLVFIIFKPSAKVPTFYRAWVQNHGAG-LFVIVSMAQLLFC	694
T1R3 murino	PMHPLPTGCLSTLFLQAAETFVSESELPLSWANWLCSYLRGLWAW-LVVLLATFVEAALC	701
T1R3 de rata	PMHPLPTGCLSTLFLQAAEIFVSESELPLSWANWLCSYLRGPWAW-LVVLLATLVEAALC	701
T1R3 humano	PLSHLPLTGCLSTLFLQAAEIFVSESELPLSWADRLSGCLRGPWAW-LVVLLAMLVEAALC	696
T1R3 felino	PLFHLPLTGCLSTLFLQAAEIFVSGSELPPSWAEKMRGRLRGPWAW-LVVLLAMLAEAALC	699
	: :* : :..	
T1R2 murino	GNMLATTINPIGRTPDDPNIIILSCHPNYRNGLLFNTSMDLLLSVLGFSFAYMGKELPT	758
T1R2 de rata	GNMLATTINPIGRTPDDPNIMILSCHPNYRNGLLFNTSMDLLLSVLGFSFAYMGKELPT	758
T1R2 humano	IGMLATGLSPTRTPDDPKITIVSCNPNYRNGLLFNTSLDLLLSVVGFSFAYMGKELPT	754
T1R2 felino	-----	
T1R1 murino	LTWLAMWTPRPTREYQRFPHLVILECTEVNSVGFVAFANNILLSISTFVCSYLKELPE	755
T1R1 de rata	LTWLVMTPRPTREYQRFPHLVILECTEVNSVGFLLAFTHNILLSISTFVCSYLKELPE	753
T1R1 humano	LTWLVVNTPLPAREYQRFPHLVMLECTETNSLGFILAFLYNGLLSISAFACSYLKGDLPE	754
T1R1 felino	LTWLVNTPLPAREYQRFPLVLDCTEANSFGMLAFAYNGLLSVSAFACSYLKGDLPE	754
T1R3 murino	AWYLIAFPPEVVTDNVLPTEVLEHCHVRSWVSLGLVHITNAMLAFCLFLGTFLVQSQPG	761
T1R3 de rata	AWYLVAFPEVVTDNVLPTEVLEHCHVRSWVSLGLVHITNAVLAFCLFLGTFLVQSQPG	761
T1R3 humano	TWYLVAFPEVVTDNVLPTEALVHCRTRSRWVSGLAHATNATLAFCLFLGTFLVRSQPG	756
T1R3 felino	AWYLVAFPEVVTDNVLPTEALVHCHVHSWISFGLVHATNAMLAFCLFLGTFLVQSRPG	759
T1R2 murino	NYNEAKFITLSMTFSFTSSISLCTFMSVHDGVLVTIMDLLVTVLNFLAIGLYFGPKCYM	818
T1R2 de rata	NYNEAKFITLSMTFSFTSSISLCTFMSVHDGVLVTIMDLLVTVLNFLAIGLYFGPKCYM	818
T1R2 humano	NYNEAKFITLSMTPYFTSSVSLCTFMSAYSGLVVTIVDLLVTVLNLLAISLGYFGPKCYM	814
T1R2 felino	-----	
T1R1 murino	NYNEAKCVTFSLLLHFVSNIAFFTMSSIIYQGSYLPVAVNLVAGLATLSGGFSGYFLPKCYV	815
T1R1 de rata	NYNEAKCVTFSLLLNFVSNIAFFTMASIIYQGSYLPVAVNLVAGLATLSGGFSGYFLPKCYV	813
T1R1 humano	NYNEAKCVTFSLLLNFVSNIAFFTTASVYDGKYLPAANMMAGLSSLSGGFSGYFLPKCYV	814
T1R1 felino	NYNEAKCVTFSLLLNFVSNIAFFTTASVYQGYLPAVNVLAALSLSGGFSGYFLPKCYV	814
T1R3 murino	RYNRARGLTFAMLAYFITWVSFVPLLANVQVAYQPAVQMGAILVLCALGILATFHLPKCYV	821
T1R3 de rata	RYNRARGLTFAMLAYFITWVSFVPLLANVQVAYQPAVQMGAILFCALGILATFHLPKCYV	821
T1R3 humano	RYNRARGLTFAMLAYFITWVSFVPLLANVQVLRPAVQMGAILLCVILGILAAAFHLPCYL	816
T1R3 felino	RYNGARGLTFAMLAYFITWVSFVPLFANVHVAYQPAVQMGITILLCALGILATFHLPKCYL	819

Figura 2D

T1R2 murino	ILFYPERNTSAYFNMSIQGYTMRKS-----	843
T1R2 de rata	ILFYPERNTSAYFNMSIQGYTMRKS-----	843
T1R2 humano	ILFYPERNTPAYFNMSIQGYTMRD-----	839
T1R2 felino	-----	
T1R1 murino	ILCRPELNNTTEHFQASIQDYTRCGTT-----	842
T1R1 de rata	ILCRPELNNTTEHFQASIQDYTRCGTT-----	840
T1R1 humano	ILCRPOLNSTEHFQASIQDYTRCGST-----	841
T1R1 felino	ILCRPKFNSTQHFQASIQEYTRCGST-----	841
T1R3 murino	LLWLPKLNTQEFLGRN--AKKAADENSGGGEAAQGHNE-----	858
T1R3 de rata	LLWLPELNTQEFLGRS--PKEASDGNSSGSEATRGHSE-----	858
T1R3 humano	LMRQFGLNTPEFFLGG---GPGDAQGQNDGNTGNQGEHE-----	852
T1R3 felino	LLQRPELNTPEFFLEDNARAQSSWGQGRGESGQKQVTPDPVTSPO	865

Figura 3

Árbol filogenético de los T1Rs:



5

0,1

Figura 4.

Conformación prevista para la secuencia de la proteína 7-TM de T1R3 de gato.
 La flecha apunta a una región de posibles sustituciones de aminoácidos funcionales.

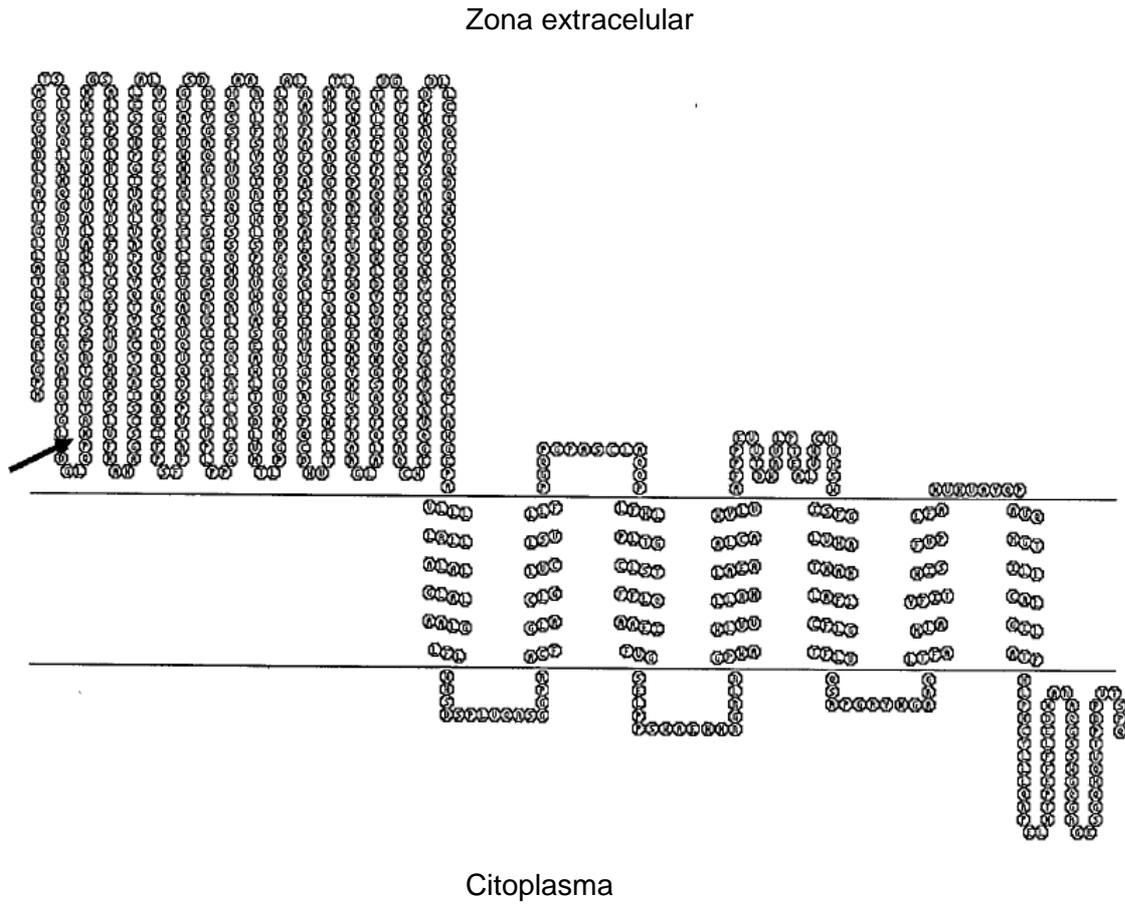


Figura 5A Conformación prevista para la secuencia de la proteína 7-TM de T1R1 de gato.

Figura 5B Conformación prevista para la secuencia de la proteína de T1R2 de gato.

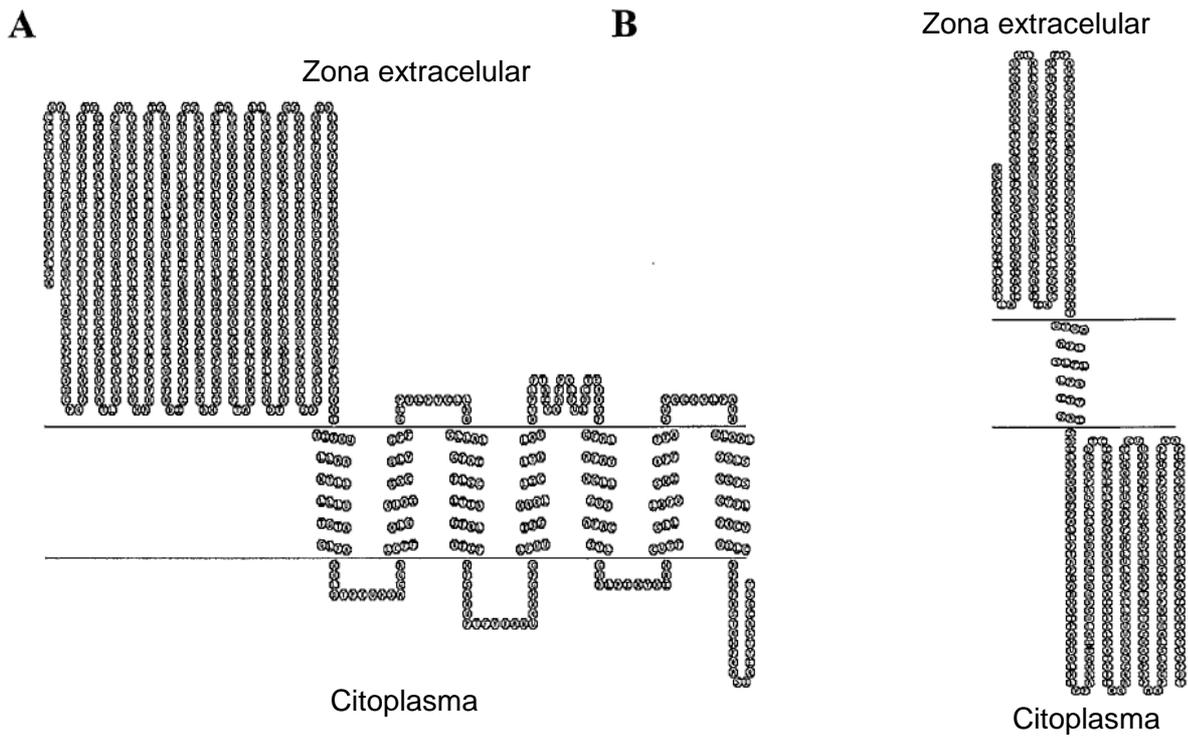


Figura 6A Secuencias genómicas de T1R1 felino obtenidas mediante secuenciación de BACs

CTGGAAAAAAGNGAACCCAGGATGATTACCCCCAAAATTTTCAGTNTCAGAAAANTGAGGACTGGNA
GGAGGTCAACTTAAAGTCAGTTTCATTTGGTAAACTGAGGCCAGGTAAAAAGTTCTAAAACCCACAG
CTCCCTTCCATATTCTGTCCCCCAGAGAAGCAGTGTCCCTGCCTTCTCTGACCCCTGCCCTCAAGA
CGCCTGGGCTCCCTTTCTGAGCCGGGTGAAGCCGCAGGCACCAGAGCGAGAACAGAACCCACAACCAT
CCAGAGGGGAGGGGCAGCGGCCACCACCTGGCTTGCACCTGTGCCTTACCCTGCCAGTTCTCTGAGTA
GGACCGCAGGCCCGGAAGGCCAAGGCAAACAGCCTGGTTCCTACGACTGGGTTCAGCCCCACCCCTG
GCACAGGCGTGAAGTTGGGAAGCATCTGGGCAGCCGCTGTCTATTCTATTTAAACAGCCGAGCTGGTC
AGAGGGTGCTGGCTGGCCATGCCAGGCACAGGACGGACTGGCCAGCATGTCACTCCCGGCGGCTCACC
TGGTCGGCTGCAGCTCTCCCTCTCCTGCTGCTGGGCTCTCAGCTGCCACAGCACAGAGACGTCTGCC
GACTTCAGCCTCCCTGGGGATTACCTCCTCGCAGGTCTGTTCCCTCTGCACTCTGACTGTCCGGGCGT
GAGGCACCGGCCACGGTGACCCTCTGTGACAGGTGAGTGAGGGGTCCCGTGCCTCTAGGACCTCTGC
CCATCCTCTGTCTCCTCAGTGAGGATCCTTGGGTTGTTGATTGAGTGGAGTTAGGGCCTTTTAGAGA
GCTGAGACTCTAGAAGCTAAACCACGTGTTGCTTTACCTGTCTTCCACCCTGAGGATCACACGTTAAG
TGTTCTTACCAGTCAAAATTGAATATGTATCAAACAAAAATAAATGGCCTTCCATGCTGAAATAACAA
AAACAGACACGCATGGAGAACCTACTTTGTGGGGCGCCTGGGTGGCCAGTCGGTTAAGTGTCTGCC
TCTTCGTTTTTGGCTCAGGTGATGACCTCGGGGTTTCATGAGTTCGAGCCCCGCGTCAGCTCCGTGATGA
GCCTGGAGCCCGCTTGGAAATCCCTCCCCACCCCCACCCCCGCTCATGCCAGCTCGAGCTCTCGCTC
ACTCTCTCAAATAAACTTAAGAGGGGCGCCTGGGTGGCGCAGTCAGTTAAGCGTCCGACTTCAGCCA
GGTCACGATCAGCACATTATTTCCCTGGACCTTCCATTCTCCTTTTCGCTGTACAGAGCTTAACGTAAAC
TCCCTGGCAAGACCTCCTTTCTGATTTTAGAAAGGCCAGCTTATTGGTTTGGTTCCTGTAATAGCTTA
AAAATAGAATCCAGCTGTATCAGGAAACATTTAAAAAATGTATCAAGGAAGACCTATAACAGTAAAAA
TATTTTTAAAFCCCAGAGTGTFTTCATAAAGACACAGGATTACATTACTCAATTATTTTTAAAGGGTT
TTTGAAAAGCCGTGTTTCACTTGCCATGGCTAATGATATAGGCATCCGAATGAGCCTGTGGCTATGA
CTTCAGTCTGTTTCGGTGGAAATGACTCTGATGTCATAAACTGACTCGGCTTCGCTGACAGGAAAGTCG
TACAGAAGAAAAGCTGTTTCGAGCCCATATGTTGGTTGCGCTCAATGTCAGGAAGGGGCGACGTAATGT
GTGCAGAAAATGGGCAGCTGTTCGAGAGTGAAGAAATGGGAAGTTGGCACGGAAGAGGGGACCGAGTCC
GAGAAGGCTGCTGGATAAAGCAGAGCTTTTGCAGAAGAGAAGGGCCGGCTGCTGTCCCTATCCTGGTG
GCGGAACCACTTAGAAACAAGGCGTCAGAATTAGAGACTTCGGTTCATGCAGGGAGGGCGGCCAGGG
GGGTGGCGTCTTGGAACTCTGGTAAGTTTGGAGATTGATCCAGGGGTCGTGGGATGGAGCTCGCA
TGAGACTCTACACTGATCGATGAGAAGCAGAAGCCCCTTGTCTGTGAGGAAGGGGACACGAGCAGTTG
GCACACTAAAACGCAAGGACACGTTTCTACGAGAAAACGGTACATCTGTCTGCGACACAGAAAGATCC
CCGGNACCAGTCNTCGNNNNNNNTTCCGNTGGGATTCAGTCAGCAGTTCCCGAGAGGCACTGAGGA
ACACAGGCCCTCACCACGTTTACAAGTGTCTGATGAGAGGGATACTAGGTAAACGAGGTTCTGA : CAG
GTGTGGTGGTTAATTTTTATACATCAACCTGGCTAGGGTACGGTGCCAGTTGTTTGGCCAAACACCAG
TCTAGATGGGGCTGTGAAGGTTAACATTTAAACCAACAGGGTGAGTAAAGCAGATCGCTTTCCATTGT

Figura 6B

GTGGGTGGGCCTCATCCAATCAGTTGAAGACCTTAAAAGAAAAGATTGAGGTCCCCCAAAAAGGAAG
 AAATTCTGCCTTCGAACTCAACACTGCAGCTTTGACCACTGAGAGCATTTCAGCCTGCCCTGCAAAC
 GCCAGACTCACCAGCCCCACAATCATGTGAACCAATTCCTTAAAATAAACTTCTCTTTCTCTCTCT
 ATCCAACCTGGTTCTGTTTCTCTGCAGAACCCTGACTCACGCAGCAGGTTTCCCTGCTACAGGACTTCA
 TCAGCCTTTCAACCCTAATATGCTCATCCAGGGAGGAATGGTTTGTGGTTTCTCCAAGTTGTAACCGC
 CCTCCCCCCCCGCCCCGCCCCCAAGGCCTGTAAACACAGCTGAGTGTATGGTACAGGGCCCAC
 AGTGAGGTTCATGGTGGTAGGGGACGGGACAGATGCCCTCAGAGTTTCCCTTCTACCCTTCCCCCACC
 CCGACGCCAAGAGGGTCTCGGCAAGGCCTTGCTCCTCTGAGCTCTCAGCTGGGCTTTCTCTACAGGC
 CCGACAGCTTCAACGGTCACGGCTACCACCTCTCCAGGCCATGCGGTTTGGCATCGAGGAGATAAAC
 AACTCCACGGCCCTCCTGCCGAACGTCACCCTGGGATACCAGCTGTACGACGTGTGCTCGGAGTCTGC
 CAACGTGTATGCCACACTAAACGTGCTCTCCCTGCTGGGGACACATCACGTAGAGATCCGAGCAGACC
 CTTCCCACTATTCGCCTGCCGCCCTGGCTGTCAATTGGGCCTGACACCACCAACCACGCAGCCACCACT
 GCAGCCCTGCTGAGCCCTTCTGGTGGCCCTGGTGGAGCTGGAGCCCGGGGGCCTGTCCATCTCCCCT
 GCCGGCAGGTCCAGTGTGGGCTGAGGGGGTGGGGGGTGGGCAAGAGCTGCCATGCCCACTCTGAGTC
 TCCTGGGTGGTCACATTGCAGGGGGCCCTGCCCCCTCACAGTCCCCGCCCCAGCATCCCTTCTCCC
 CAAGTGTGCATCCAGACCTCCCTGCCTCAATGTCTGAGAAAAACCGTCTCCTTTGAAACTGCTGCC
 CTTTGCTCTGCCCCCTCCATTCCATCTCCTCTGTGAAGAACGGAAACACCCTTTGTTTCCCACCTCACA
 CACTTGTCCACTTCTCCCCGCCCTCCTCCTTCCGGTCTTCCCTTCCCTCCCTCCCAGCTCAGGCTCAGA
 GGTGTGGTCCCCCTCCCCCTCCAATGCCGTCCTCCTGGGCCTCACCTCTCCTCTGCTCGTAGGCCTG
 TCCTAGGCTTCTCCTCCGCCTATAAGCTGGCTTTACCCCTCTCTGTCTTCCAGGCACCTGTGGTCTT
 AGCGCTGCCCTCTCTCTGAACCTCGTTCGGTGGAACTTGTGCACTGAGCTCTCTCTTCTTGTGTTGCT
 TCTCCCTCTCATCACTTGCTTCCCGGGCCCTGCCCTGACTGCTGCACCACCACTCCTGCTCTTGTGA
 TCTCCAGGGCTTTCTAGATCTCCAGGTCCAGCAAATGCTTTTTCAGCCCTTCTTTGCTTGACATGACGA
 CTTTGTGACAAATTTGACCAGTCCCTCAGTGACGCTCTTGCCCTCGGCATTTATGACCTGCCACCTCCC
 TCTCACTTGTGGTACCTCCTTCTCAGTCTCCTTTGGAGAATCTCCTCCCCCCTCTTCTGAAAAAGTG
 GATGATTCCCCGAGTGCAGGACCACTCCCTTTCCAGGCAGGTGCTGGGAGCAAACAACCTTCCCTAC
 TCTTCAAGAATCTTTCTGGCTGGTCTAAAATAAGTTGATGTGACACAGANAAAAGGAAAAGTCAAAT
 CACGTATGTACAGGGANCTACNAAACACGAAAGGTCAAGANAGGAAAGNGAGGCTANCTGCTATCTGA
 ACTATGAACAAGGGNAGGGGTAAATTCAGGAAAGAAGAAATCANAGAAAGAAGAGGNANGGTATAAA
 AGNTGCTGGCCATCAAAAATGGAAGGAAGAATTANAANNATTGGAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
 NNN
 NNN
 TTTTCCCGTCACCGGTGGCCAGGGTTAAA
 TTCAGGCTGCCAAGCTGTTTTTTGGGATGACTCCAGCAGTCTCCTAGGGAGTTCTTCCCTGACTCTGGT
 CTTGAGCCTTTTCTAACACATTCTTCACTGAAATCAGATACACCCCTGAAACACAAGTCTGGGCAGAT
 TACCTCTCTGCCTAGACATTTAAGGGGCTCCCCAGGGCCTGCAGATAAAGACCAAGTATCTTAGCTAT
 CTTGGTGCCAGGAGTAAGGCCTCCTGCCCTGACCAGACACGCCTACTTTTGTGCTCCTTCTTCCGGCT

Figura 6C

TCCAACCTCCTGGGTGAGTTCTCTCACTGGGTGTAGCTTTTGTTCCTTCCCCTTCTTCTCCCACAAA
 CCTCCCCCTGGGTTTCTGCCTCTTCTTTAGATGTAGCTGGTCGGCCTCCTAGTCCACCAGAGCTGTCC
 TTGAGAGCCAGGGCTGGGACCATGTCTCCCTCCTCCTCGGGTCCCCGCGCCCAGCACAGGGCCAGCAC
 TTGGAGGCTCTGAGTTGAGGCCAAGGCCACTGAAGTCGCTGAACTGAACCCCCCCCCCGGCCCCCTC
 CGCAGATCAGCTACGAGGCCAGCAGCGTGACGCTCGGAGTGAAGCGGCATTACCCCTCGTTTCTGCGC
 ACCATCCCAGCGACAAGCACCAGGTGGAGGCCATGGTGCTGCTGCTGCAGAGCTTCGGGTGGGTCTG
 GATCTCGGTGGTCGGCAGCGACGGCGACTACGGGCAGCTGGGGGTGCAGGCGCTGGAGGAGCAGGCCA
 CCCAGCAGGGCATCTGCGTTGCCTTCAAGGACATCATCCCCTTCTCTGCCCGGCCGGGCGACGAGAGG
 ATGCAGAGCATCATGCACCACCTGGCCGAGCGAGGACCACCGTTGTGGTTCGTTTCTCCAGCAGGCA
 GCTGGCCAGGGTGTTCCTTTGAGTCGGTGGTGCTGGCCAACCTGACTGCCAAGGTGTGGATCGCCTCAG
 AAGACTGGGCCATCTCTAGACACATCAGCAATGTGCCCGGGATCCAGGGCATTGGCACGGTGTGGGT
 GTGGCCATCCAGCAGAGGCTTGTCCCTGGCCTGAAGGAGTTTGAAGAGGCCTATGTCCAGGCAGATAA
 GGGGGCCCCCTGGGCCTTGCTCCAGGACCTCCGAGTGCAGCAGCAACCAGCTCTGTAGAGAGTGTCCGG
 CTTTACGGCAGAGCAGATGCCACGCTCGGGGCATTCTCCATGAGCTCTGCTTATAACGCCTACCGG
 GCAGTCTACGCAGTGGCCCATGGCCTCCACCAGCTCCTGGGCTGTGCCTCTGGAGCCTGTTCCAGGGA
 CCGAGTCTACCCCTGGCAGGTAAGGTAGCCAGACCCCGGCACCCTGAAACGGGGTGCTTTCCTAAGG
 CAAACAGAGTGATCCCTCTCTGGCCAACCTGAGTGTGGGGGTGGGGGACAAAGGCCACCCATCAGAAG
 GCTAATTCCCTTCTCTTGGGCTTCACTTCTCTGACCTCGGCCCTCCCACCACCATGCTCCAGACCCAG
 GGCTAAAAATCTCTGGGAAACGGGCCTTTTTAGAACTTCCCTCTCACTCAGGAGGCCAGTTGGGAGGG
 TCGAGGGGCTTCCCTTGAAGGGAGGGGGCTCTGAATTTCCAGACAGACTGAAACCACCCAAATAGAAG
 CATTGCTTCCCTAAGCCTTCCGGGTCTGGGAGAGTTGAGGAGGAGCAGCCTGCGTCATCTGTGGCTGC
 TCCATGATCCCCGTTTATCTCAGCTTCTGGAGCAGATCCGCAAGGTGAATTTCCCTCCTACACAAGGAC
 ACCGTGAGGTTTAAATGACAACGGGGACCCTCTCAGTGGCTACGACATAATTGCCTGGGACTGGAGTGG
 CCCCAGTGGAACCTCAGGGTCATTGGCTCCTCCATGTGGCCTCCAGTTCAGCTGGACATAAATAAAA
 CAAAATCCGGTGGCACGGGAAGGACAACCAGGTAATGGAGCCATGGTCACTACCAAGTCACCGCCT
 TACGGGCAGCCTGGAGCCTGAAGTCACTGTGACACAGCTCACACGGAGCAGGAGGGGGCCCCGGGTG
 CCAGGCCAACGTGGCTCTATCCAGCCCTGCCAGGGAAGCCCCACAGACCCGACCCAGATGGCCGGCTG
 CAGCTGGTATACACAACCAGGGGCTGTGCCCTGGGAGTGAGCTGTGAGGGCAGATGCACGGAGACTCC
 CATTCCGCATGTGAGCATCCCTTGACTTGGGCCACTCCATGTGGTTCAGAACACCTGTGGCTTCTTG
 CAGGTGCCAAAGTCTGTGTGCTCCAGCGACTGCCTCGAAGGGCACCAGCGAGTGATTTTCGGGTTTCTA
 CCACTGTTGCTTTGAGTGTGTGCCCTGTGAGGCCGGGAGCTTCCCTCAACAAGAGCGGTGAGTGTCCAA
 ATGAGTGGGAGAATGACTGGGCACCTCCAGGGTCTGTATGGCAGATGAGGGGATCTCCCTTGGGCCAC
 GCACGTGCAGAACCAGAGCCTTGCTCCCTCTGTTGCCAGTTGAGGTACAGGTTGTAGAATATTTGCCA
 CCAGACTGAGTTCTGATGAAGCAGAAACCAACAACCAGTTGAAATCCTCAGGTCCCCTACGTCTTTTA
 CTAGAGGGCTCCTGATGCAATCCCTGCAGATGCAATCTTATCCTAAATTC AACCTTTTTATGCGAACA

Figura 6D

GATGTAGTTATGTTCCCTTGTCCCCTCCCATGCTGTCTGTGTGAAGTCCCTTCCGTCGCCCTGCCAA
 AGACAGCCAGCACCTTGGACAGCTTGGCCTTGATGCAGATACTATTGTATCCGCAGACAAGAAACATA
 GCATACTCCACCCAGTGATGGTGAAGGTCAAGATCAGAGAGCAAACCTCAGGTAGCTAAGGGCTCAGC
 CCAGAGCTGGACTCTGTGAGCCACGTTCTTTCCTTTTACTATCTCTGTGGGCGTGAGAACACATCTCT
 TCTGTTCTCAGAGAGTCAGAGAAACCACAGAATGGCAGCACAGATAGGGGGCTTTGGGTAATGGAAGC
 GCTGGGGAGATGAAAATGCCCTTCCCTTGGGGCTGGTTGCTCCTGTTGGATCATAGCCTCACTGGCAT
 GTGGGCAGAGCTACCAGAGTAAGGCCCTCTCTAAGGATCTCTCGGTTTGAAGCCCCTTCTGGGATCA
 TAAGCCATACAGAACCTACCCAAGGGTCTCCAGAATCTGCAATTAACACAGGCATCTGGAGGAAACAC
 TTGGCCGCGGGGCCCCACTCAGGGCTACCCCTATCTCGCTGTGTGCAGTAGGAGCCCGGCTTCTGGG
 GTACAGCGCTCCCAGCACCTTGCAGGCCTACATGGCTTCCCTTCCCTCATTCCCTGCTCTGCTCATCTAG
 GCTCTCAGGAGCCCCCTCCACCTTTTTCTTCCAGACCTCCACAGCTGCCAGCCTTGTGGGAAAGAAGA
 GTGGGCACCCGCGGGAAGTGAAACCTGCTTTCACGCACCGTGGTGTTTTTGACTTGGCAGCAGACCA
 TCTCTTGGGTGCTGCTGGCAGCTAATACGTTGCTGCTGCTGCTGGTACTGGGACTGCTGGCCTGTTT
 GCCTGGCACTTAGACACCCCTGTGGTGAAGTCGGCTGGGGGCCGACTGTGCTTCTTCATGCTAGGCTC
 CCTGGCAGGGGGCAGCTGTGGGCTCTACGGCTTTTTTGGGGAGCCCACGCTGCCACATGCTTGTTC
 GCCAAAGCCTCCTTGCCCTGGGTTTTGCCATCTTCCCTGTCCCTGACCATCCGCTCCTTCCAAGT
 GTCTTCATCTTCAAGTTTTCTGCCAAGGTACCCACCTTCTACCGTGCCTGGGTCCAAAACCACGGTCC
 TGGCCTATTTGTGGTGATCAGCTCAATGGCCCAGCTGCTCATCTGTCTAACTTGGCTGGCGGTGTGGA
 CCCCCTGCCACCAGGGAGTACCAGCGCTTCCCTCAGCTGGTGGTGCTTGATTGCACAGAGGCCAAC
 TCACCGGGCTTCATGTTGGCTTTCGCCTACAATGGCCTCCTGTCCGTCAGCGCCTTTCCTGCAGCTA
 CCTGGGCAAGGACCTGCCAGAGAACTACAACGAGGCCAAATGTGTCACTTTTAGTCTGCTGCTCAACT
 TCGTGTCCCTGGATTGCCTTCTTACCACGGCCAGCGTCTACCAGGGCAAGTACTTGCCCGCGGTCAAC
 GTGCTGGCGGCGCTGAGCAGCCTGAGTGGCGGCTTCAGCGGTTATTTCCCTCCCAAGTGCTACGTGAT
 CCTGTGCCGCCAAAATTTAACAGCACACAGCACTTCCAGGCCTCCATCCAGGAGTACACGAGGCGCT
 GCGGCTCCACCTGACCAGTGGGGCGGGCAGGGCCTAGCCGGGGAGGTGGGGGGTGGGGGGTGAAGGGG
 TAGAAGGTGGGGTAGGGGCGCCTCCCCTGCCCTGAGGGTGAAGGTCGAGCGAGGCGAGCGGGCCCCG
 CGCCCTCCGGGAGGCCTTTTGGACTCCTGTCTTGGCTCGGGTAGTGTACGCTCACGGGAGTCCAGTCC
 AGGCTCCGAGCTGCCAATAAAGCGGTGAAACATGCGTCCCTGGCTGCTCTAGCTGTCTGAACCGAGGGT
 GGGGCG

Figura 7A Secuencias genómicas de T1R2 felino obtenidas mediante secuenciación de BACs

TTAGCTGCTGAAACGCTGCTTTTTAGCAAAAGGCCGTGACCTCATGATGTTATACGTGCGTGGAGATTGA
 GAACCAGGTCCTAGCATCTGACTATGTGCTTTGAGTCCCCACTTTTGCTGGTTGTGCAACCCAGGGTGA
 GCTTCGTAAGCTTCTCTGTGCCTCAGTTTTCTCATCTGTGGAATGGGGCCGGTCATAGTCCCCGTTATT
 GTGATCATCGAGCAAGATGGTGAATGGCGAGCACACAGCATGATGCCTAGTTCTTACTGGAACACCTGT
 CCTGGGTCAGGGGCTGTATATAAAGTACTACCTGCCAGGATCAACTTGATCCGGTTCTATTCTGTCTCC
 TGGGTGAGTATCTGTGCCCTTACTCCCAGATGTTGGAAATGTCAGGGGCATGAGACCTGTCTTAACC
 GAGTGGCAGAAGGTTAAGTTTTGTGTCCGAGATAGCAGGACATGCTTCTCTACCTCCGCAGGGCGTTCT
 CCCAGACCCCCAGGGCCCACCATGCCCTGCTAGGAAGGGATCATCCTAATTCTAGCCTCTTCTCCGC
 CCCAGAGTTCTGAAGCTTCTCCACCTGTCCAGGTGTTTTCCCCACCCCTCAGCCACGGCAAGACCGTCA
 CTATGTAAATGTCTGTGCAAATCCCCTGGTGTCAAGCTGCCAGCTCTCTGATGAGGCAGGGCCACCTCC
 GGGGACCCCTCACTTCCCAGCCATGGGACCCCGGGCCAGGGAAGTCTGCTGCTTCATCATCCTGCCGCG
 GCTCCTGGCTGAGCCGGCTGAGAACTCAGACTTCTACTTGGCTGGGGATTACTTCTCGGGCGCCTCTT
 CACCCTCCATGCCAACGTGAAGGGCATCGTCCACCTCAACCTCCTGCAGGTGCCCCAGTGAAGGAGTG
 AGTCGCCAATGTGGGGCTGGAAGTGGCGACGGGGCGGAGTGGGAAGCCTGGGCTGGTCTGTGCTCCT
 CAGGGGACCACGCCAGGACCAAGGGCTCAAATGCTCTTCTCATTGCAACCTCTCATCCCGCA
 TTATCCCCACCGGCCTGCAGGGAGACCCCATGCAGTTCATGTTACCAAATCTTTGGCAATTGTATTCT
 GAAATATGGAGAGCTGGTTGTCCCGCCGTGTGTCTTAATAAATAAAGAGTTACAGGGTACTTGAGCCTG
 GAGGGGTTGTAGAGACCACCCACCTACTTTGTCAAGTGGGGAACCTACTGAGTCCGTGTCAAGTC
 CAAGCTAGACACCGGGGGTTATGCCTTTGGAAGGCAGAAATGTGGTTTTTCGGTAGCAGGTTCTCAGA
 CTGGAGGGGAAGGTTTGCATTTCTCTAGGGCTGTGGTTAGGTGGGAAGGGGTGCTTCCAGGACCAGAAG
 GGATTTCTCCACTCACCTTGTCCCCTGTGAGCCCTGGGGGTGGCTGCATCACTCAAGGTTGGGTGAGA
 CACCTTTGTGCAAGTGCGAAGGCTGGGATGGCGGACCCAGCGTGGGATGATGAGATAGTGACTTGCTGC
 AGAGAGGGTGAAGGCGTCTGTGAGAGAGGGAGAGAAAAAGTCTGTGACGTCGGGGAAGATCACATGC
 TGGCTTGAGAATGACNN
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGATGTGGAGGTGATRGTGATGGCGGTGATTGTGACGGTGGTA
 TCGGTGATGGTGGTCACAGACAACGCAGTTATAGTGATGGCAGTGGTATAGGAATAGTAGGTGGTGAT
 GGTCAATCTGGAGATGTGGCAGGTGACAACGATGAGATGAAAATGCCAGAATCTTCTGGAGTGGCTCCT
 TCTTGAGCCACTCCTCGGCTTTCCTATGGCAGGCAGAGGGGACTCCCCGGCTCCTGTCCCTTCCCC
 TCTCACTCTGGACCTGCCTCTCACCCACCCACATGGCTCCCCAGGTATGAAATAAAGGTGTTGGGC
 TACGATCTCATGCAGGCCATGTGCTTTGCAGGGGAGGAGATCAATAGCCAGAGCAGCCTGCTGCCTGGC
 GTGCTGCTGGGCTACAAAATGGTGGATGTCAGCTACATCTCCAACAATGTCCAGCCCGTGTCCACTTC
 CCGGCAAAGGAGGACTGTTCCCTGCCCATCCAGGAGGACTACAGCCACTGTGTGCCCCGTGTGGTGGCT
 GTCATTGGTCTGGCAACTCTGAGTCCACTGTGACTGTGGCCCGCTTCTCTCTCTTCTCCTTCCA
 CAGGGGAGGCCCTGGGTCTGGGGTAAGGAGCTGGGGGGCAGAGGAGTGGTTATCCAGGGGGCTCACT
 TCCCCCACCGTCTGGGGGTAGGAGGAGGCAGGAAGTAGGGTCAAGATGTCAACCCCAATCCTRGA
 AGGCAGCCAGCCACGTGGTTAAGAGCTCAGGCTTGGAGGCAGACAGACCKGGNNNNNNNNNNNNNNNN
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGCCTCAGAGAGATCATCCTNTCAAGGGGGCCCTTAT
 TCCTTTNCCCCTGGGAGCCNCTCAGTNCCCACCACTTCTGTCAGCNCCCATTGGGGTCTCCGATTCTC

Figura 7B

CAATCCACTCACTCGCTGTGTGGCTCTGGATAAGTGAAGTGTCCCTCTCTGAACCTCAGCGTCCTCATCT
 GCAAAGTGGAGACATAACAGCACATCAGAAGGTCGCGAGAATAGGGGCGCCTGGGAGGCTCAGTCGGTT
 AAGCATCCGATTCTGGGTGCGGGCTCAGGTCATGATCTCCCGGTTCTGTGAGTTCAAGCCCCGCATCGGG
 CTGTGTGCTGACAGCACAGANCCTGCTTGGGATTCGTGTCTTCCCTTCTCTGCCCCCTCACCTGCTTTT
 GCTCTCTCTCTCTCAAAAATAAATAAACTTTTTAAAAAAAAGGAAGGTAGTGAGAAAAAAGCGGGT
 GACAGAGATGGAGAGGGCTCCACGCGGTACCTGGCATGCTGCGAGCCCTCAGAACCCGTTAGCGACGGA
 AGTGACCTGTGTGCGTCGTCACCACCATCCACGAGGCCTTGAGGCTTCGACCCTGCCTCCCCGCAA
 GCTCACAGTCTCCGAGGCTCCGGGCCACGTCCCCGGGGCGTCTGTGTGTCCCTCGAACCCCGCCCA
 GCCCTGCCGCACCGTGAGCTAGTCAGCGCCTGCTGGGTTCTGTACTCTCTCCGCCATTGTGCACCCTGG
 GGCTGGGGCCACACCAGGGGCTCCGGTTAATTTAGATGCTTTCTTTCTCTGCCATCTGCTTACCCCCG
 AGCTTGGTTAGAGAGCCTGACTTTGCTGGGAGTCTCCAGAACGTCCCGGGACCTCCAGCAACCAGCAT
 CTTTATTTCTCCCTCCTTAGAACTGATGTGTGCAGTCGCTGTGCCTCTGCAGCTCAGAGCAGGGGTGGTT
 CCTGTGAAGTGGGGCCAGGGGTGGTTTCTGGAGGGGGCAAGGCACCGACTAGCCCTCGAAGAAGGAGC
 CGGGCTTGGCTGAGGTGGGACAGGGGGAGAGCATGAGGTTTTCGGCCAGCTTTCTGTGCCTGGGAACCC
 CCTCTCCCCACAACCCCTGGATCCCAGAGGCCTTAACGGGGCCCAGCTGTAACAGACTCGTCTGTGTGCA
 GCATTCACAGTAGGTGTCCCAGGCTCCCTCGGGGCCACCAAAGGACCACAACGACATTACGCGGACA
 GGGTCTCAGATTCCGATGGGTCCCCTGTTTGTGGAACCATCTCCCTTTGGAAATTTACAGCTCTCTTT
 TCTGGCAGTAACCCCGCCCCTTGGTGCTGGGTACGAAGGGGGCACCCAGAGCGGGGCTCACCCAGCAGC
 GCTGACTGCTGCGTTGTGCGGGCTAACGGGTATTAACCGCCTCCCTCGCCGCTCCCATTTCTTTAGTGC
 TGAAACGCTGCTTTTTAGCAAAGGCCGTGACCTCATGATGTTATACGTCGTFGGAGATTGAGAACCAGGT
 CCTAGCATCTGACTATGTGCTTTGAGTCCCCACTTTTGTGGTTGTGCAACCCAGGGTGAGCTTCGTAA
 GCTTCTCTGTGCCTCAGTTTTCTCATCTGTGGAATGTGTGAGGGGGAGACCTCAGTTTTCAAGCGGGGTG
 GCCAGGAGGGCCTTTCTGACAACCTGGACAACGACCTGAGGGAGAGGAAGGAGTGAGGGAGCTATGTGGG
 TGCCTAGAAGAGCGCTCCGGAAGAGGGGGCAGCGAATGCAGAGGCCGGCAGGAGCCTGGTGCGTTGGCT
 GAACCGGTGAGCAGCCCCGGGACCAGGCGGGACAGTAGGAGAAGATGAAGCCAGAGAGGTGAGGGCCGG
 GGTCAGTGGTGGAGCCCCTTGGGGGCCACTGAAGGACTCTGGCTGTCTCGAGTGACATTAGGAGCTGT
 TGGGGAGTTTTGAGCTGAGGAGTAAGGTGACGGACAAGTGGTGCAGAGGCCACCCGGCTGCCACGAAC
 AGCAGCAGAGACAGCCAAGGGGAAGGGTGGGGGGCTGTGGTGACCCCGGGAGGGTGGTGATGGTGGCCC
 GGTGAGGCCCTAGCTCACGCTGGCGGCCCTCCGCTCTCCGGCAGATCACCTACAGCGCCATCAGTGACC
 AGCTACGGGACAAGCAGCGCTTCCCGGCCCTTCTGCCACAGCGCCGGGGCGCCGATCACAGATCGAGG
 CCATGGTGCAGCTGATGTTGFACTTCCGCCGGAACCTGGATCATCGCGCTGGTGAGCAGCGGGACTGCG
 GCCGCGACGACAGCCAGCTGCTCAGCGATCGCCCGGCCGGCGGCGACACCTGCATCGCCTTCCGGGAGA
 CGCTGCCCATGCCCCAGCCCAACCAGGCGGTGACGCAGTGGGAGCGCCGGCGCCTGAAGGCCATCGTGG
 ACGAGCAGCAGCGGCAGAGCTCTGCGCGCGTGTGGTCTGTGTGCGCCAAAGCTGGTCTTGCACAACT
 TCTTCCGCGAGGTGCTCCGCCAGAACCTCACGGGCGTGTGCGGATCGCCTCCGAGTCTTGGGCCATCG
 ACCCGTCTTGCACGACAGGCCACGCGCTGCACAGCCTCCTGGGCTGCACCCAGACCAGCAGCTCCGG
 GTCGTCTATCCCTGGCAGGTGAGGCCCAACCCACGGAGAGTCGGGGCCACACACGCGAGGCGCCGCCACA

Figura 7C

GCCCTGAGTGGTTGCCATGGAGACCACTGCCCTGCTCTAGCGTCCCCCTCTCTGGCCGGGTCTGGGCA
 AACTGGCGGGAGAGGCCAGGGGACGTACCCTGTCCCCAGACACATAAAGCCAGAAGTGCTTCATGGTGA
 CAAAACCTCTTTTTTTTACATTAATGTAATCCTCGCCATCCAAGATAGCCTGTCCCGGCAGGAGATTGG
 GTGAAGTTTCTGGAAGGAGGCCTGGCAGGCAGTGGGCCCCCTGGGCCCCCTGCCGTTTCTCCAGGGTG
 GCGGCCCTGGGGGAGGACTTCTGTGTTTCTGAGCTCTCTGAGGCTCTGCTTTGGGTTTATGCATCTTCTCTC
 GTCCCAGGTCTGGACGATTCAGAGGAGTAAGGAGGCAAGGAGTCGCCTGGATTCAGACCTGGAATTTAA
 ATCTGTATTTTTCTGATCTGCGTGCACACCCGCGTGCACACACACACCTAACCACGAAGTTTATG
 TAGGTAGAAGATTTTACTGAGGGGGCGCCTGGGTGGCTCAGTCGGTTAAGCGTCCGACTTCAGCCAGGT
 CACGATCTCGCGGTCTGTGAGTTCGAGCCCCGCGTCAGGCTCTGGGCTGATGGCTC>NNNNNNNNNNNNN
 NNAGCACCCCGAGGGCCCGGGGGAGGGCACCTGAGCC
 CGTAAAGGGAACAGGAGTGGCCTCTGAACCCAGGTGATAGGTCTCCGCTGGATGGCAGACGTGACTCC
 CACGGGAGCAGGAATAATGTCGACACATCGGCCGGAAGGGGAGCACTTCTGGTGTGCAGTCATTGTGC
 TAAGCTCCCAACATTGGGAACTCATGCGTTGCTTCAGAGCCCCGGGAGACAGGGTTTTTGTGTCTTAC
 TTTACAGAAGAGGAGACTGGAGCTCACGGGGGTGGGCGACAGGCCCGAGGCTCAGAGCAGGTGGCAGA
 GCTGGTGCCTGAACCCAGGTGTGTCTGACTACAGAGCCGGGGCTCCCAGCCGCTGCCTCCCGGGTGACC
 ACATCTGCGGTCTCATTGCCCCCTTGTAGGGATGTGGACACCAGTCTCGTGGGGTAGTCACTCTCCCC
 CGGATCGAGCCCGACTTCTTTTTTTTTTTTTAATTTTTTTTTTCAACGTTTATTTATTTTGGGACAGAG
 AGAGACAGAGCATGAATGGGCGAGGGGCAGAGAGAGAGGGAGACACAGAATCGGAAACAGGCTCCAGGC
 TCCGAGCCATCAGCCCAGAGCCTGATGCGGGGCTCGAACTCACGGACCGGAGATCGTGACCTGGCTGA
 AGTCGGACACTTACCCGAATGCGCCACCCAGGGGCCAGATCGAGCCCGACTTCTGACGCCAGCGTCGC
 TTCCTTCCCTGTGGCCTCCCAGCTGCTTCAGGAAATCTGGAAGGTCAACTTACCCTCCTGGGCCACC
 AGATCTTTTTTGACCAGCGAGGGGACCTACTCATGCGCCTGGAGATCATCCAGGGACGGTGGGACCTGA
 GCCAGAACCTTTCTGGAGCGTCGCCTCCTACTGCCCGGTGCTACGACGGCTGAGGGCCATCCGTGACGT
 CTCTGGCACACGGCCAACAACACGGTCAGCTCTCGGAGGGCTGGTGGGGGGCTGGGACCTGGGTCTGG
 GCACTGGCTCGTGAGGGGTGGCAAGGGCCCTGTGGACCTGAGATCCATTATCGAGCACTGATGTCATC
 CCTATTTGTGGGTGTCCCTCCTCCATTGACTAAGCACTGTGGAAGTCTAGAGCTTTCTGGATCCTCAG
 GACCCAGGGGCTCAGGGGGCTGCACAAAGTGAACGTTAGGTGGACACGTGTGTGCTAAGGACTTCAATT
 CTCATGTCAACCCTAGGAAATAGAGAGTACTGTTCCCTCCTGTCTTTGGGGTTGGGAAACTGGAGGCACA
 GAGGGGGTTCGCGTGACCCATAAAGGCCACACAGCTTTCGCATGTCTCTATACACAGCATTCACTCTAC
 ATCCCATCGATTAGTACTCGCGTTTTGGGGACAGTAGCTGTGCCTTCACCTGTGTCTGACATCTGTGAG
 TCTGAAAGCTCCTTTGTTTTACCCTCTTAGCTTACAAGCTGTCAGAAATGGCCGCGATGTGGGGAAGGTA
 GAGACTCAGCCTCGTGGGGAAGGGGGAGGTGGGGGGACCTAAAAGTTCAAAGAGCCAGGGCACCTGGG
 TGGCTCAGTCAGTTAAGCATCCGACTCTGGATCTCAGCTCAGTCTTGATCTCAGGTCGTGAGTTAGAC
 CCCTGTGTAGGGCTCCGTGCTGGGCGCGCAGCCTACTTAAAAATAATAAAAACAAAAGC>NNNNNNNNNN
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGATCCCCGTGTCCATGTGTTCCAAGGACTGCCAGCCT
 GGGCAAAGGAAGAAGCCCGTGGGTATTCATCCCTGCTGCTTCGAGTGTCTCGACTGCCTTCCGGGCACC
 TTCTCAACCAACTGCAGATGGGACTCACAGACCCACACCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCCGCCCT

Figura 7D

GGGGCTCCCAGGGCCCTTCATCTTTGGCAGGGTCTCTGGAGTCTCATCCAGGGGACACAGGTGTCCAAA
 GGCCAGGGACCATGTTTTGACTCCGCTTGTATCTCCCTAACCGCTGGTGTAAGAAAAATCTTCAATGCT
 GTGAGGGCGTGGGGGTGGGAGAAGGAACAGCCCTCAACCAGGCGAGGCTGTAACCTGATCCCCTCTGCAC
 ACACATGTAGCTGAGGGCCCAGGGGGGTGAGGCCAGAGAATGTCCACCGGATGAACGAACGAATGAATG
 AATGAACGAACGAACAAACACACAAATGAATGAATGTCTCTGTCCGTAGAAGAAATGTTTTCTGGCAGAC
 AGGGCTAGGATCTAATTTCTCTCTGTGGCCTCCCGAGTGCCTCGTGTAGTTCGGAGCATATAATGTTTG
 CTCAGTGAATGTTTATTGAGTGACATCCTTGATGAGAAGAATTGACATCTCCCCCTATAGATCATAAAC
 TCCAGGAAAGGGGGGACAATGTCATCCCTCCAGTGTTTACCACAGTTCACCGTTGGGGCCGAATTATTT
 TTTTTTCATGACTTCACAGATTAGTAACTAAGCGGTTCTGTACATCTACCGATCAGAGTACTTACGACG
 TGCCCAGCAGAGCCCAGGGCACAGGGTAGGTGCTCAACAAAAGTTTGTGTTGCAATTGATCAGTAGCCGG
 AAGTCAGGGGGCTCGGTTTTATCCACGTCTGTGCTCTCCATCTCAGATGCCTATCACAGTGGGTGGCGC
 TCAAAAAGAACTTGAATAAACGGTGAATGTCCATCTCACCAGAGGGTACGGTCTTGAAGGGAGGCA
 TTACGGTTGCCAGGCTCTGAGTCAAGGGGACCTTGGACCACATCCTGCCTCTGTAACCTGGTTTTGTAAC
 NGCCTGGAGGAGCCTCAGATGCCACATCTGTGAAATGGGGTTGCAGTGAGGATCTGATGGGCCGGTGGGA
 TACGAGGGACGCAGTGAGAGGTGCTACGACCGCAGGCATCGCCCTTGGCTCGCCCCCTCCCTACCCCTA
 CAGCCGCGCGGGTGCAGGTGCAGAGGATGTGGGTGCCGGGAAGGTGGGTGTATCTGATGGAACCTGCTGT
 GGGCTCTTGCAGACGAGTTTGGCTGCCGGCCCTGCCCGAGTTGCGGGTGGTCCCGGAGGAACGACGCTT
 CGTGCTTCAAGCGGCGGCTGGCCTCCCTTGAATGACGCGAGGCACCCGCGCTCGCTGTGGCCGTGCTGT
 CCATCCTGGGCTCCCTCTGCACCTGGCCATCCTGGTGATCTTCTGGAGGCACCGCCACGCGCCCATGG
 TTCGCTCGGCCGGGGGCCAGGTGCTTCCCGATGCCGATGCCCTGCTGTATAGGTGACGGTCTCCAT
 GTACATCGGGCAGCCCGCGTTTTTTCATGTGCCTCGGCCACCAGACCCTCTTACCCTCTGCTTACCCT
 CTGTATCTCCCGTGTACCGTGCCTCTTTCCAGATCGTCCGCGTCTTCAACATGGCCAGGCGCCTCCC
 GCGTGCCTACGGCTACTGGGTCCGCTACCACGGGOCCTGTGTCTTCTGGCGTCCCTTACGGTGCTCAA
 GATGGTCATCGTGGCGGGCAACGTGCTGGCCGCGACCGCCGAGCCCGCCGCCCCGCCCCGACCCCGATGA
 CCCAAGATCGCGGTTCTCGCCTGCAACTACCACAACGTGCTCCTGTTGACACCAGCCTGGACCCGCT
 TCTGTCCGTGGCGGGCTTCGGCTTCGCCTACGTGGGCAAGGAGCTGCCACCACCCACAACGAGGCCAA
 GTTCTTACCCTCCGCATGACCTTCTACTTACCTCTTCCATCTCCCTCTGTACCTTCATGTCTGTCTA
 CGAGGGGGTCTGGTACCATCCTGCACCTCGTGGTGGCAGTGCTCAACCTTCTGGGCGCTTTGGCCCC
 TGGGCTACTTCGGCCCCAAGTGCTGCGTGGTCTCTTCTACCCGGATCACAACACGCCCCGTCTACTTCA
 GCAGCATGATTACAGGGCTACACCACCGGAAGGACTAGCACTGCCCCCTGGCTGCCAGGGGGCCAGAG
 GGCTCGGTACTGGGAGATGGAGACCAGGGGTGGGGCTGGGGGTGGTGGTACTCATTACAGCCCCTGCTG
 GGAGCAGGGACACCACCCGCCCTACTCTCTGATTTGGCCTCCCCCTCCAGGTTCTCTGCACCCTGGCC
 GTTTTTACCCACCCGCTGGTGGATGCCTAAAAATACGCTTTCCTGCAGCCGTTTGGCTTGCCAGGCAC
 TGCCACCCATGCTAGGGAAAGGAGCCGGGGTGACCTCCCTATGGGTCTCCAAGACAGAGATGGAGCGAA
 GCAGCCCACAGTCGCCATCTGGTGGTACAGCGGGTGTCCGCAGGTTCCGGCTCCGGGCAGCCATGCTG
 GAAGGCTGGGCTGGGGCTGGTGTGGGGGACATCTGCCCGGCATCATTCACTCCCTGCCACGTTGCTG
 CGCCTCACCTCCCAGACTCCCCCGCCCCCAGCTTGGGACCCAGCTTGGGACCCAGCTTCTCTGAGTCA

Figura 7E

TGGCTGCGCATAGGGGCTGCTTCATAAATGCTTATGAATAAACCTCCCTTGGGTGAAACGAAGGCCTT
CCTTCTTGTTTCCAGAGGTTTCCCCCTCCCCCCCCGTCGCCCAAGAAAGAAGACTGGGATCAGAGA
CCTCAGCTCCATTTCCGCGTTGCCACTTCTGANCCGTGACTTTGGGCCAATTCTATTTACTGTTTCG
GANCTACACGGNCCCTTCTNAAATAGGAACAATAAACCCAGGGGCACCTTTGACNCACTGTGTAGTA
NCCAATTTGACGATAANTTTTTTAAAAGATTAAATTAATCNGATAAATT