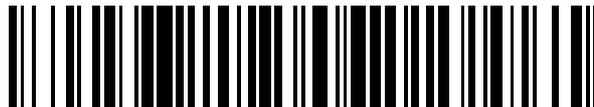


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 859**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2006 PCT/US2006/041158**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2007 WO07047988**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2006 E 06826406 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 1937718**

54 Título: **Receptores del sabor dulce-umami y umami-dulce humanos quiméricos**

30 Prioridad:

**20.10.2005 US 728324 P**

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

**12.03.2018**

73 Titular/es:

**SENOMYX, INC. (100.0%)  
4767 NEXUS CENTRE DRIVE  
SAN DIEGO, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**LI, XIAODONG;  
ZHANG, FENG;  
XU, HONG y  
LI, QING**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 658 859 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 del sabor dulce-umami y umami-dulce humanos quiméricos

**Campo de la invención**

5 Esta invención se refiere a nuevos polipéptidos receptores del sabor quiméricos del ser humano y de roedores, a secuencias de ácido nucleico codificantes, a células que expresan estos polipéptidos receptores del sabor quiméricos y a su uso en la identificación de moduladores del sabor, particularmente moduladores del sabor dulce y umami.

**Antecedentes de la invención**

10 Los receptores del sabor de la familia T1R humanos incluyen hT1R1, 2 y 3. Los T1Rs pertenecen a los receptores acoplados a proteína G de clase C, y cada GPCR de clase C consiste en un gran dominio extracelular N-terminal y un dominio 7-transmembranario C-terminal. Generalmente, se sabe que hT1R1 y hT1R3 forma un receptor heterómero que modula la transducción del sabor umami y que reconoce saborizantes umami, mientras que hT1R2 y hT1R3 forman un receptor heterómero que modula la transducción del sabor dulce y que reconoce saborizantes dulces. Por lo tanto, se sabe que el receptor del sabor umami (hT1R1/hT1R3) y el receptor del sabor dulce (hT1R2/hT1R3) comparten una subunidad común hT1R3.

15 El documento WO2005/015158 divulga un polipéptido receptor del sabor quimérico que comprende el dominio extracelular de T1R1 humano y el dominio extracelular de T1R2 humano. La solicitud muestra que el polipéptido quimérico se puede usar en ensayos para identificar compuestos que afectan al sabor incluyendo saborizantes, antagonistas, agonistas, bloqueadores y potenciadores dulces y umami. La solicitud también muestra ensayos en los que T1R1 o T1R2 no quiméricos se coexpresan con T1R3 y se usan para identificar compuestos que afectan a o moduladores del sabor.

**Breve descripción y objetivos de la invención**

25 La presente invención proporciona una línea celular que expresa un polipéptido receptor del sabor quimérico que comprende el dominio extracelular de T1R2 y la región transmembranaria de T1R1 según están contenidos en SEQ ID N°: 2, línea celular que expresa además una proteína G quimérica derivada de Galfa16 y bien gustducina o bien transducina.

30 La presente invención también proporciona un ensayo de cribado que usa una línea celular según las reivindicaciones, que comprende: (i) poner en contacto una línea celular con un compuesto a fin de determinar si el compuesto tiene un efecto modulador sobre el sabor; (ii) determinar si dicho compuesto tiene un efecto modulador sobre el sabor basándose en si se une específicamente a un receptor del sabor que comprende el polipéptido receptor del sabor quimérico de SEQ ID N°: 2 o modula la actividad de un receptor del sabor que comprende el polipéptido receptor del sabor quimérico de SEQ ID N°: 2.

35 También se describen en la presente polipéptidos receptores del sabor quiméricos que responden a estímulos de sabor umami y/o dulce y/o que potencian el sabor umami o dulce producido por otros compuestos.

40 También se describe en la presente el uso de estos polipéptidos receptores del sabor quiméricos en ensayos para identificar compuestos que modulan por sí mismos el sabor dulce o umami y/o que potencian el sabor umami o dulce producido por otros compuestos.

45 Se describe en la presente la creación de una fusión de ADN que codifica un receptor del sabor quimérico al combinar porciones de los genes receptores del sabor T1R1 y T1R2 y coexpresar las mismas con un receptor del sabor T1R3 de la misma especie o una diferente para crear un receptor del sabor quimérico que responde a estímulos de sabor dulce y/o umami o que potencia el sabor umami o dulce producido por otros compuestos.

50 Se describe en la presente la producción de un receptor del sabor quimérico al combinar la totalidad o una porción de los dominios extracelulares de un polipéptido de T1R1 o un ADN codificante, preferiblemente hT1R1 o mT1R1 o rT1R1 y la totalidad o una porción del dominio transmembranario de un polipéptido de T1R2 o un ADN codificante, preferiblemente hT1R2, rT1R2 o mT1R2 o una porción de los mismos para crear un polipéptido receptor del sabor umami-dulce quimérico o un ADN codificante.

55 También se describe en la presente la producción de un receptor del sabor quimérico al combinar la totalidad o una porción de los dominios extracelulares de un polipéptido de T1R2 o un ADN codificante, preferiblemente hT1R2, rT1R2 o mT1R2, y la totalidad o una porción de los dominios transmembranarios de un polipéptido de T1R1 o un

ADN codificante, preferiblemente hT1R1, mT1R1 o rT1R1 para crear un polipéptido receptor del sabor dulce-umami quimérico o un ADN codificante.

5 También se describe en la presente el suministro de las secuencias de ácido nucleico y las secuencias polipeptídicas de hT1R1-2 y hT1R2-1 específicas contenidas en SEQ ID N°: 1-4.

10 También se describe en la presente la expresión de estas secuencias de ácido nucleico que codifican receptores del sabor quiméricos en células hospedadoras adecuadas, preferiblemente células HEK-293, que adicionalmente expresan preferiblemente una proteína G y una secuencia de ácido nucleico de T1R3.

Otro objetivo de la invención es usar estas células en ensayos para identificar moléculas que modulan el sabor dulce, p. ej., ligados de sabor dulce y potenciadores del dulzor.

### Breve descripción de las figuras

15 La Figura 1 contiene la secuencia de ácido nucleico de un receptor del sabor dulce-umami quimérico denominado hT1R2-1 que comprende el dominio extracelular de T1R2 humano fusionado a la transmembrana de T1R1 humano (SEQ ID N°: 1)

La Figura 2 contiene la secuencia polipeptídica de un polipéptido receptor del sabor dulce-umami quimérico denominado hT1R2-1 que comprende la porción extracelular de T1R2 humano y la porción transmembranaria de T1R1 humano (SEQ ID N°: 2).

20 La Figura 3 contiene la secuencia de ácido nucleico de un receptor del gusto quimérico denominado hT1R1-2 que contiene los dominios extracelulares de hT1R1 y los dominios transmembranarios de hT1R2. (SEQ ID N°: 3)

La Figura 4 contiene la secuencia polipeptídica de un receptor quimérico denominado hT1R1-2 (SEQ ID N°: 4) y contiene la secuencia proteínica de una proteína G quimérica G16gust44 que contiene la porción N-terminal de Galfa16 fusionada a los 44 aminoácidos carboxiterminales de gustducina (SEQ ID N°: 5).

25 La Figura 5 contiene esquemas para T1R2/T13, T1R1/T1R3 naturales y hT1R2-1/T1R3 de dulce-umami quimérico y hT1R1-2/T1R3 de umami-dulce quimérico.

La Figura 6 contiene las secuencias de ácido nucleico y las secuencias proteínicas para T1R1, T1R2 y T1R3 humanos, murinos y de rata (SEQ ID N°: 6-17)

30 La Figura 7 contiene los resultados de experimentos de obtención de imágenes con calcio que usan células HEK-293 que expresan el receptor hT1R2-1 quimérico de la Figura 1 que muestran que este receptor del sabor quimérico responde a todos los edulcorantes probados (sacarosa, fructosa, D-Trp, Acek, dulcina), excepto para el ciclamato.

La Figura 8 contiene resultados experimentales que comparan concentraciones eficaces (EC50s) de diferentes edulcorantes que activan el receptor hT1R2/hT1R3 natural en comparación con hT1R2-1 quimérico (SEQ ID N°: 2).

35 La Figura 9 contiene los resultados de un experimento que muestra que el ciclamato potencia la respuesta a aspartamo en una línea celular HEK-293 que expresa establemente el presente hT1R2--1 quimérico y una secuencia de hT1R3 no modificada.

La Figura 10 contiene un experimento que muestra que el ciclamato potencia la respuesta a D-triptófano en una línea celular HEK-293 estable que expresa el receptor del sabor quimérico hT1R2-1 y una secuencia de hT1R3 no modificada.

40 La Figura 11 contiene un experimento que muestra que el ciclamato potencia la respuesta a sacarosa en una línea celular estable que expresa el presente receptor del sabor hT1R2-1 y una secuencia de hT1R3 no modificada.

La Figura 12 contiene un experimento que muestra que el ciclamato potencia la respuesta a fructosa en una línea celular HEK-293 estable que expresa el presente receptor quimérico hT1R2-1 y una secuencia de hT1R3 no modificada.

45 La Figura 13 contiene un experimento que muestra que el ciclamato potencia la respuesta provocada por un compuesto agonista de umami patentado (denominado '807) en una línea celular HEK-293 estable que expresa el

presente receptor quimérico hT1R2-1 y una secuencia de hT1R3 no modificada y que el compuesto umami '807 activa el receptor del sabor hT1R2-1 quimérico.

La Figura 14 contiene un experimento que muestra que un compuesto agonista del ligando umami patentado '807 potencia la respuesta a aspartamo en una línea celular HEK-293 estable que expresa hT1R2-1 y hT1R3.

- 5 La Figura 15 contiene un experimento que muestra la respuesta de una línea celular HEK-293 estable que expresa el receptor quimérico hT1R1-2 (SEQ ID N°: 3) y el receptor rT1R3 y muestra que este receptor quimérico responde a los ligandos umami L-Glu, L-Asp y L-AP4 y que las respuestas se potenciaban por la presencia de IMP o GMP.

La Figura 16 muestra que la activación del receptor hT1R1-2/rT1R3 quimérico por MSG es potenciada por IMP.

### Descripción detallada de la invención

- 10 Antes de describir específicamente la invención, se proporcionan las siguientes definiciones.

El término familia "T1R" incluye variantes polimórficas, alelos, mutantes y homólogos que: (1) tienen aproximadamente 30-40% de identidad de secuencia de aminoácidos, más específicamente aproximadamente 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con los T1Rs divulgados posteriormente y en las solicitudes de Zuker (Id) (2001) y Adler (Id.) (2001) a lo largo de un tramo de aproximadamente 25 aminoácidos, óptimamente 50-100 aminoácidos; (2) se unen específicamente a anticuerpos producidos contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de T1R divulgadas posteriormente, y variantes modificadas conservativamente de las mismas; (3) se hibridan específicamente (con un tamaño de al menos aproximadamente 100, opcionalmente al menos aproximadamente 500-1000 nucleótidos) bajo condiciones de hibridación rigurosas a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de ADN de T21 divulgadas posteriormente, y variantes modificadas conservativamente de las mismas; (4) comprenden una secuencia al menos aproximadamente 40% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de T1R divulgadas posteriormente o (5) se amplifican mediante cebadores que se hibridan específicamente bajo condiciones de hibridación rigurosas a las secuencias de T1R descritas.

En particular, estos "T1R's" incluyen GPCRs receptores del sabor denominados hT1R1, hT1R2, hT1R3, rT1R1, rT1R2, rT1R3, mT1R1, mT1R2 y mT1R3 que tienen las secuencias de ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos proporcionadas en esta solicitud, y variantes, alelos, mutantes, ortólogos y quimeras de las mismas que se unen y/o responden específicamente a ligandos dulces o umami incluyendo activadores, inhibidores y potenciadores. Preferiblemente, los T1Rs de la presente son secuencias quiméricas derivadas de porciones de un polipéptido de T1R1 y un polipéptido de T1R2 o sus correspondientes secuencias de ADN codificante. Según se ejemplifica en la presente, T1Rs quiméricos preferidos según la invención comprenden la región extracelular de un T1R, es decir, T1R2 y la región transmembranaria de T1R1.

35 Topológicamente, ciertos GPCRs quimiosensores tienen un "dominio N-terminal", "dominios extracelulares", un "dominio transmembranario" que comprende siete regiones transmembranarias, y los correspondientes bucles citoplásmicos y extracelulares, "regiones citoplásmicas" y una "región C-terminal" (véanse, p. ej., Hoon y cols, Cell, 96:541-51 (1999); Buck & Axel, Cell, 65:175-87 (1991)). Estas regiones se pueden identificar estructuralmente usando métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como programas de análisis de secuencias que identifican dominios hidrófobos e hidrófilos (véase, p. ej., Stryer, Biochemistry, (3ª ed. 1988); véase también cualquiera de un número de programas de análisis de secuencias basados en Internet, tales como los encontrados en dot.imgen.bcm.tmc.edu). Estas regiones son útiles para elaborar proteínas quiméricas y para ensayos in vitro, p. ej., ensayos de unión a ligandos.

45 Por lo tanto, "dominios extracelulares" se refiere a los dominios de polipéptidos de T1R que sobresalen de la membrana celular y están expuestos a la cara extracelular de la célula. Estas regiones incluirían el "dominio N-terminal" que está expuesto a la cara extracelular de la célula, así como los bucles extracelulares del dominio transmembranario que están expuestos a la cara extracelular de la célula, es decir, los bucles extracelular entre las regiones transmembranarias 2 y 3, las regiones transmembranarias 4 y 5 y las regiones transmembranarias 6 y 7. El "dominio N-terminal" empieza en el extremo N y se extiende hasta una región cercana al inicio de la región transmembranaria. Estas regiones extracelulares son útiles para ensayos de unión a ligandos in vitro, tanto en fase soluble como sólida. Además, las regiones transmembranarias, descritas posteriormente, también pueden estar implicadas en la unión a ligandos, bien en combinación con la región extracelular o bien solas, y por lo tanto también son útiles para ensayos de unión a ligandos in vitro. Las regiones o dominios extracelulares de T1R1, T1R2 y T1R3 humanos, murinos o de rata están contenidas en la Figura 6.

"Dominio transmembranario", que comprende las siete "regiones" transmembranarias, se refiere al dominio de polipéptidos de T1R que está dentro de la membrana plasmática, y también puede incluir los correspondientes

bucles citoplásmicos (intracelulares) y extracelulares, también denominados "regiones" transmembranarias. Las siete regiones transmembranarias y los bucles extracelulares y citoplásmicos se pueden identificar usando métodos estándar, según se describe en Kyte & Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157:105-32 (1982)), o en Stryer, anteriormente. Los dominios o regiones transmembranarios de T1R1, T1R2 y T1R3 humanos, de rata y murinos también están contenidos en la Figura 6.

"Dominios citoplásmicos" se refiere a los dominios de proteínas de T1R que están frente al interior de la célula, p. ej., el "dominio C-terminal" y los bucles intracelulares del dominio transmembranario, p. ej., los bucles intracelulares entre las regiones transmembranarias 1 y 2, las regiones transmembranarias 3 y 4 y las regiones transmembranarias 5 y 6. "Dominio C-terminal" se refiere a la región que abarca desde el final de la última región transmembranaria hasta el extremo C de la proteína, y que normalmente está situada dentro del citoplasma.

El término "receptor 7-transmembranario" significa un polipéptido perteneciente a la superfamilia de proteínas transmembranarias que tienen siete regiones que abarcan la membrana plasmática siete veces (así, las siete regiones se denominan dominios "transmembranarios" o "TM" TM I a TM VII).

El término "región que se une a ligando" se refiere a secuencias derivadas de un receptor quimiosensorial o gustativo que incorpora sustancialmente los dominios transmembranarios II a VII (TM II a VII). La región puede ser capaz de unirse a un ligando y, más particularmente, un compuesto que produce sabor.

El término "dominio de translocación de la membrana plasmática" o simplemente "dominio de translocación" significa un dominio polipeptídico que, cuando se incorpora en el extremo amino de una secuencia codificante de polipéptido, puede "chaperonar" o "translocar" con gran eficacia la proteína híbrida ("de fusión") a la membrana plasmática de la célula. Un "dominio de translocación" ejemplar se deriva del extremo amino del polipéptido receptor de rodopsina humano, un receptor 7-transmembranario. Otro dominio de translocación que se conoce es la secuencia de rodopsina bovina y también es útil para facilitar la translocación. Las secuencias derivadas de rodopsina son particularmente eficaces para translocar proteínas de fusión 7-transmembranarias a la membrana plasmática.

La expresión "efectos funcionales" en el contexto de ensayos para probar compuestos que modulan la transducción del sabor mediada por miembros de la familia T1R incluye la determinación de cualquier parámetro que esté indirectamente o directamente bajo la influencia del receptor, p. ej., efectos funcionales, físicos y químicos. Incluye la unión a ligandos, cambios en el flujo iónico, el potencial de membrana, el flujo de corriente, la transcripción, la unión a proteína G, la fosforilación o desfosforilación de GPCR, la transducción de señales, las interacciones receptor-ligando, las concentraciones del segundo mensajero (p. ej., cAMP, cGMP, IP3, o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular), in vitro, in vivo y ex vivo, y también incluye otros efectos fisiológicos tales como incrementos o disminuciones de la liberación de neurotransmisores u hormonas.

Por "determinar el efecto funcional" se entiende ensayos con respecto a un compuesto que incrementa o disminuye un parámetro que está indirectamente o directamente bajo la influencia de un miembro de la familia T1R, p. ej., efectos funcionales, físicos o químicos. Estos efectos funcionales se pueden medir mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica, p. ej., cambios en las características espectroscópicas (p. ej., fluorescencia, absorbancia, índice de refracción), las propiedades hidrodinámicas (p. ej., conformación), cromatográficas o de solubilidad, pinzamiento zonal, colorantes sensibles al voltaje, corrientes celulares totales, salida de radioisótopos, marcadores inducibles, expresión de genes de T1R de ovocitos; expresión de T1R en células de cultivo tisular; activación transcripcional de genes de T1R; ensayos de unión a ligandos; cambios de voltaje, potencial de membrana y conductancia; ensayos de flujo iónico; cambios en segundos mensajeros intracelulares tales como cAMP, cGMP y trifosfato de inositol (IP3); cambios en los niveles de calcio intracelular; liberación de neurotransmisores, y similares.

"Inhibidores", "activadores" y "moduladores" de receptores de proteínas de T1R se usan intercambiamente para hacer referencia a moléculas inhibidoras, activadoras o moduladoras identificadas usando ensayos in vitro e in vivo para la transducción del sabor, p. ej., ligandos, agonistas, antagonistas y sus homólogos y miméticos. Los inhibidores son compuestos que, p. ej., se unen a, bloquean parcialmente o totalmente la estimulación, disminuyen, evitan, retardan la activación, inactivan, desensibilizan o regulan a la baja la transducción del sabor, p. ej., antagonistas. Los activadores son compuestos que, p. ej., se unen a, estimulan, incrementan, abren, activan, facilitan, potencian la activación, sensibilizan o regulan al alza la transducción del sabor, p. ej., agonistas. Los moduladores incluyen compuestos que, p. ej., alteran la interacción de un receptor con proteínas extracelulares que se unen a activadores o un inhibidor; proteínas G; cinasas (p. ej., homólogos de rodopsina cinasa y cinasas receptoras betaadrenérgicas que están implicadas en la desactivación y la desensibilización de un a receptor); y arrestinas, que también desactivan y desensibilizan receptores. Los moduladores incluyen versiones genéticamente modificadas de miembros de la familia T1R, p. ej., con actividad alterada, así como ligandos, antagonistas, agonistas, moléculas químicas pequeñas presentes en la naturaleza y sintéticos, y similares. Esto incluye en particular ligandos dulces (agonistas o antagonistas), ligandos umami (agonistas y antagonistas), potenciadores del dulzor y potenciadores del umami e inhibidores del sabor dulce o el sabor umami.

Estos ensayos para inhibidores y activadores incluyen, p. ej., expresar miembros de la familia T1R en células o membranas celulares, aplicar compuestos moduladores putativos en presencia o ausencia de compuestos que modulan, p. ej., compuestos dulces y umami, y a continuación determinar los efectos funcionales sobre la transducción del sabor, según se describe anteriormente. Muestras o ensayos que comprenden miembros de la familia T1R que se tratan con un activador, inhibidor o modulador potencial se comparan con muestras de control sin el inhibidor, activador o modulador para examinar el alcance de la modulación. A las muestras de control (no tratadas con moduladores) se les asigna un valor de actividad de T1R relativo de 100%. La inhibición de un T1R se alcanza cuando el valor de actividad de T1R con relación al control es aproximadamente 80%, opcionalmente 50% o 25-0%. La activación de un T1R se alcanza cuando el valor de actividad de T1R con relación al control es 110%, opcionalmente 150%, opcionalmente 200-500%, o 1000-3000% superior. Estos ensayos usarán T1Rs quiméricos que comprenden la totalidad o una porción de la porción extracelular de T1R1 o T1R2 y la totalidad o una porción de los dominios transmembranarios de otro T1R, es decir, T1R2 o T1R1.

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

Según se usa en la presente, el término "aislado", cuando se refiere a un ácido nucleico o un polipéptido se refiere a un estado de purificación o concentración diferente del que se presenta naturalmente en el cuerpo del mamífero, especialmente el ser humano. Cualquier grado de purificación o concentración mayor del que se presenta naturalmente en el cuerpo, incluyendo (1) la purificación de otras estructuras o compuestos asociados presentes en la naturaleza, o (2) la asociación con estructuras o compuestos a los que normalmente no está asociado en el cuerpo, están dentro del significado de "aislado" según se usa en la presente. Los ácidos nucleicos o polipéptidos descritos en la presente se pueden aislar o asociar de otro modo con estructuras o compuestos a los que normalmente no están asociados en la naturaleza, según una variedad de métodos y procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

Según se usan en la presente, los términos "amplificar" y "amplificación" se refieren al uso de cualquier metodología de amplificación adecuada para generar o detectar un ácido nucleico recombinante o expresado naturalmente, según se describe con detalle posteriormente. Por ejemplo, se describen en la presente métodos y reactivos (p. ej., pares de cebadores oligonucleotídicos específicos) para amplificar (p. ej., mediante la reacción en cadena de la polimerasa, PCR) ácidos nucleicos expresados naturalmente (p. ej., genómico o ARNm) o recombinantes (p. ej., ADNc) según se describe en la presente (p. ej., secuencias que se unen a compuestos que producen sabor según se describen en la presente) in vivo o in vitro.

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

El término "biblioteca" significa una preparación que es una mezcla de diferentes moléculas de ácido nucleico o polipéptido, tal como la biblioteca de regiones que se unen a ligandos de receptores sensoriales, particularmente del sabor, generados recombinantes generadas mediante la amplificación de un ácido nucleico con pares de cebadores degenerados, o una colección aislada de vectores que incorporan las regiones que se unen a ligandos amplificadas, o una mezcla de células, cada una transfectada aleatoriamente con al menos un vector que codifica un receptor del sabor.

El término "ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" se refiere a un oligonucleótido desoxirribonucleotídico o ribonucleotídico en forma de una sola hebra o doble hebra. El término abarca ácidos nucleicos, es decir,

oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales. El término también abarca estructuras similares a ácidos nucleicos con esqueletos sintéticos.

A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas conservativamente de la misma (p. ej., sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden alcanzar al generar, p. ej., secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionado se sustituye por residuos de bases mixtas y/o desoxiinosina (Batzer y cols., *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka y cols., *J. Biol. Chem.*, 260:2605-08 (1985); Rossolini y cols., *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994)). El término ácido nucleico se usa intercambiamente con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido.

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

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

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

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

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

Son muy conocidas en la técnica tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos similares. Por ejemplo, una pauta ejemplar para seleccionar sustituciones conservativas incluye (residuo original seguido por la sustitución ejemplar): ala/gly o ser; arg/lys; asn/gln o his; asp/glu; cys/ser; gln/asn; gly/asp; gly/ala o pro; his/asn o gln; ile/leu o val; leu/ile o val; lys/arg o gln o glu; met/leu o tyr o ile; phe/met o leu o tyr; ser/thr; thr/ser; trp/tyr; tyr/trp o phe; val/ile o leu. Una pauta ejemplar alternativa usa los seis grupos siguientes, que contiene cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (I); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); (véanse además, p. ej., Creighton, *Proteins*, W. H. Freeman and Company (1984); Schultz y Schimer, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag (1979)). Un experto en la técnica apreciará que las sustituciones identificadas anteriormente no son las únicas sustituciones conservativas posibles. Por ejemplo, para algunos propósitos, se pueden considerar todos los aminoácidos cargados como sustituciones conservativas entre sí ya sean positivos o negativos. Además, sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales que alteran, añaden o eliminan un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en una secuencia codificada también se pueden considerar "variaciones modificadas conservativamente".

Los términos "mimético" y "peptidomimético" se refieren a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y/o funcionales de los polipéptidos, p. ej., dominios de translocación, regiones de unión a ligandos, o receptores quiméricos según se describen en la presente. El mimético bien puede estar totalmente compuesto por análogos no naturales sintéticos de aminoácidos o puede ser una molécula

química de aminoácidos peptídicos parcialmente naturales y análogos parcialmente no naturales de aminoácidos. El mimético también puede incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservativas de aminoácidos naturales con la condición de que estas sustituciones tampoco alteren sustancialmente la estructura y/o la actividad del mimético.

5 En cuanto a los polipéptidos que son variantes conservativas, la experimentación habitual determinará si una estructura y/o función de un mimético no está sustancialmente alterada. Las composiciones de miméticos polipeptídicos pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales no naturales, que son típicamente de tres grupos estructurales: a) grupos de conexión a residuos distintos a las conexiones por enlaces amida naturales ("enlace peptídico"); b) residuos no naturales en lugar de residuos de aminoácido presentes en la naturaleza; o c) residuos que inducen un mimetismo estructural secundario, es decir, para inducir o estabilizar una estructura secundaria, p. ej., una conformación de giro beta, giro gamma, lámina beta, hélice alfa, y similares. Un polipéptido se puede caracterizar como un mimético cuando todos o algunos de sus residuos están ligados por medios químicos distintos a los enlaces peptídicos naturales. Los residuos peptidomiméticos individuales pueden estar ligados por enlaces peptídicos, otros enlaces químicos o medios de acoplamiento, tales como, p. ej., glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, maleimidias bifuncionales, N,N'-díciclohexilcarbodiimida (DCC) o N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC). Grupos de conexión que pueden ser una alternativa a las conexiones por uniones amida tradicionales ("enlaces peptídicos") incluyen, p. ej., cetometileno (p. ej.,  $-\text{C}=\text{O}-\text{CH}_2$  para  $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ), aminometileno ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), etileno, olefina ( $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), éter ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), tioéter ( $\text{CH}_2-\text{S}$ ), tetrazol ( $\text{CN}_4$ ), tiazol, retroamida, tioamida o éster (véase, p. ej., Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, 267-357, Marcell Dekker, Peptide Backbone Modifications, NY (1983)). Un polipéptido también se puede caracterizar como un mimético al contener todos o algunos residuos no naturales en lugar de residuos de aminoácido presentes en la naturaleza; los residuos no naturales se describen bien en la bibliografía científica y de patentes.

25 Un "marcador" o un "resto detectable" es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos o químicos. Por ejemplo, marcadores útiles incluyen  $^{32}\text{P}$ , colorantes fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas (p. ej., como los usados comúnmente en un ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos y proteínas que se pueden hacer detectables, p. ej., al incorporar un radiomarcador en el péptido, o se pueden usar para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el péptido.

30 Una "sonda de ácido nucleico o un oligonucleótido marcados" son los que están unidos, bien covalentemente, a través de un conector o un enlace químico, o bien no covalentemente, a través de enlaces iónicos, de van der Waals, electrostáticos o de hidrógeno a un marcador de modo que la presencia de la sonda se pueda detectar al detectar la presencia del marcador unido a la sonda.

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

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

60 Un "promotor" se define como una serie de secuencias de ácido nucleico que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Según se usa en la presente, un promotor incluye secuencias de ácido nucleico necesarias cercanas al sitio de inicio de la transcripción, tales como, en el caso de un promotor de tipo polimerasa 11, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales, que pueden estar situados tanto como varios miles de pares de bases desde el sitio de inicio de la transcripción. Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo bajo la mayoría de las condiciones ambientales y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que es activo bajo una regulación ambiental y de desarrollo. El término "conectado operativamente" se refiere a una conexión funcional entre una secuencia de control de ácido nucleico (tal

como un promotor, o una serie de sitios de unión a factores de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

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

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

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

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

50 "Anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende una región de soporte procedente de un gen de inmunoglobulina o fragmentos de la misma que se une a y reconoce un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de las regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como los múltiples genes de regiones variables inmunoglobulínicas. Las cadenas ligeras se clasifican bien como kappa o bien como lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

55 Una unidad estructural inmunoglobulínica (anticuerpo) ejemplar comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (V<sub>L</sub>) y cadena pesada variable (V<sub>H</sub>) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente.  
60

65 Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia de modo que el sitio de unión antigénica (región variable) esté conectado a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o una molécula totalmente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, p. ej., una enzima, una toxina, una hormona, un

factor de crecimiento, un fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia con una región variable que tiene una especificidad antigénica diferente o alterada.

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

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

15 La expresión "se une específicamente (o selectivamente)" a un anticuerpo o "específicamente (o selectivamente) inmunorreactivo con", cuando se refiere a una proteína o un péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros materiales biológicos. Así, bajo las condiciones de inmunoensayo diseñadas, los anticuerpos específicos se unen a una proteína particular al menos dos veces el fondo y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo bajo estas condiciones puede requerir un anticuerpo que se seleccione por su especificidad para una proteína particular.

20 Por ejemplo, se pueden seleccionar anticuerpos policlonales producidos para un miembro de la familia T1R de especies específicas tales como rata, ratón o ser humano para obtener solo los anticuerpos policlonales que sean específicamente inmunorreactivos con el polipéptido de T1R o una porción inmunogénica del mismo y no con otras proteínas, excepto para ortólogos o variantes polimórficas y alelos del polipéptido de T1R. Esta selección se puede alcanzar al sustraer anticuerpos que reaccionan cruzadamente son moléculas de T1R de otras especies u otras moléculas de T1R. También se pueden seleccionar anticuerpo que reconocen solamente miembros de la familia GPCR de T1R pero no GPCRs de otras familias. Se puede usar una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se usan normalmente inmunoensayos de ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (véase, p. ej., Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, (1988), para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que se pueden usar para determinar inmunorreactividad específica). Típicamente, una reacción específica será al menos dos veces la señal de fondo o el ruido y más típicamente más de 10 a 100 veces el fondo.

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

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

45 Por "célula hospedadora" se entiende una célula que contiene un vector de expresión y soporta la replicación o expresión del vector de expresión. Las células hospedadoras pueden ser células procarióticas tales como E. coli o células eucarióticas tales como células de levadura, insecto, anfibio o mamífero tales como CHO, HeLa, HEK-293 y similares, p. ej., células cultivadas, explantes y células in vivo.

50 Basándose en lo precedente y descrito en la presente está el descubrimiento de que se pueden construir receptores quiméricos que comprenden porciones de un T1R1 y un T1R2 de la misma especie o una diferente que cuando se coexpresan con una secuencia de T1R3 intacta o modificada de la misma especie o una diferente responden específicamente a compuestos con sabor umami y/o dulce y que la activación de estos receptores del sabor quiméricos se potencia mediante compuestos potenciadores del dulce o umami. Por lo tanto, estos receptores quiméricos se pueden usar en ensayos para cribar ligandos (saborizantes) dulces y umami, así como cribar compuestos que potencian o inhiben el sabor dulce o umami producido por otros compuestos con sabor dulce o umami.

60 Según se muestra en las Figuras 1-4, a fin de establecer la eficacia de los presentes receptores quiméricos en ensayos basados en células para identificar compuestos moduladores del sabor, los presentes inventores construyeron receptores del sabor quiméricos que comprendían porciones de hT1R2 y HT1R1 llamadas hT1R2-1, que consiste en el dominio extracelular N-terminal de hT1R2 y el dominio 7-transmembranario C-terminal de HT1R1, y hT1R1-2 que contiene dominios extracelulares de hT1R1 y el dominio 7-transmembranario C-terminal de hT1R2. Cuando estos receptores quiméricos se coexpresaban con una secuencia de T1R3 de ser humano o roedor en una línea celular HEK-293 que expresaba establemente este receptor quimérico así como una proteína G quimérica

promiscua G16-t25 o G16g44 que comprende respectivamente la porción N-terminal de Galfa16 y los 25 o 44 aminoácidos carboxiterminales de transducina o gustducina, que el receptor quimérico de dulce-umami o el receptor quimérico de sabor umami-dulce resultante era funcional y respondía específicamente a compuestos ligados y potenciadores del dulce y/o umami.

Particularmente, se observó que hT1R2-1 (SEQ ID N°: 1 y 2) respondía específicamente tanto a edulcorantes como compuestos umami y que la actividad de este receptor es potenciada por un ciclamato agonista del dulce y se activa mediante los compuestos umami denominados '807 y '336 que también funcionan como potenciadores a concentraciones inferiores. Además, se observó que este receptor quimérico no respondía a IMP o MSG y también que IMP no tenía efecto potenciador sobre la respuesta producida por otros compuestos umami. Esto sugiere que la región extracelular de hT1R1 no se requiere para que todos los compuestos umami interactúen con el receptor de umami pero que si influye y es necesaria para las interacciones de MSG e IMP. Además, los resultados que muestran que el ciclamato, un agonista del dulce del receptor natural, se comporta como un potenciador indican que el compuesto puede estar interactuando con una porción diferente del receptor del sabor que cuando interactúa con el receptor del dulce natural.

Particularmente, se observó que hT1R1-2 (SEQ ID N°: 3 y 4) respondía a los compuestos umami incluyendo L-glutamato, L-aspartato y L-AP4 y que la actividad de este receptor del sabor quimérico es potenciada por los nucleótidos 5' IMP y GMP. Según se apunta, estos resultados sugieren que la porción extracelular de hT1R1 está implicada en el reconocimiento de algunos ligandos umami y sus potenciadores. En contraste, ninguno de los compuestos dulces probados que incluían carbohidratos, aminoácidos dulces y edulcorantes sintéticos activaba hT1R1-2 (SEQ ID N°: 3 y 4)

Más específicamente, los inventores generaron líneas celulares HEK-293 estables que expresan constitutivamente hT1R2-1 o hT1R1-2 y una secuencia de T1R3, es decir hT1R3 o rT1R3, y una proteína G quimérica G16-g44 que consiste en la porción N-terminal de Galfa16 fusionada a los 44 últimos aminoácidos de gustducina o G16-t25 que consiste en la porción N-terminal de Galfa16 y los 25 últimos codones reemplazados por codones que codifican la cola C-terminal (25 últimos residuos de aminoácido) de transducina. Así, en la proteína G quimérica resultante, los 25 últimos aminoácidos de Galfa16 se reemplazan por los 25 últimos residuos de aminoácido de la secuencia proteínica de transducina o los 44 últimos aminoácidos se derivan de gustducina.

Usando la línea celular HEK-293 estable que expresaba hT1R2-1, los inventores probaron el efecto de edulcorantes que incluían sacarosa, fructosa, D-triptófano, aspartamo, ciclamato, sacarina y dulcina. (Figure 7) Excepto para el ciclamato, todos estos edulcorantes activaban el receptor quimérico hT1R2-1/hT1R3, indicando que el dominio 7-transmembranario C-terminal de hT1R2 no se requiere para la interacción del receptor del sabor dulce (hT1R2/hT1R3) con estos edulcorantes. Según se muestra en las Figuras 9-12, el ciclamato potenciaba la activación de este receptor quimérico por aspartamo, D-triptófano, sacarosa y fructosa. Según se muestra en la Figura 13, el ligando umami registrado '807 inducía la actividad de este receptor quimérico, y esta actividad era potenciada adicionalmente por el ciclamato.

En experimentos adicionales, los inventores también probaron el efecto de diversos compuestos con sabor umami y potenciadores sobre esta línea celular estable, incluyendo L-glutamato monosódico (MSG), IMP, '807 y '336, sobre el receptor hT1R2-1 quimérico. Se encontró que el MSG o el IMP no tenían efecto sobre el receptor del sabor dulce-umami quimérico. Además, el IMP no tenía efecto potenciador sobre las actividades del receptor expresado en la línea celular estable, indicando que el dominio extracelular N-terminal de hT1R1 se requiere aparentemente para la interacción de MSG/IMP con el receptor del sabor umami (hT1R1/hT1R3). También se observó usando la misma línea celular HEK-293 estable que dos ligandos umami registrados, identificados como '807 y '336, activaban fuertemente el receptor quimérico. Estos resultados sugerirían que el dominio N-terminal de hT1R1 aparentemente no se requiere para que estos compuestos interactúen con u activen el receptor del sabor umami.

Los inventores probaron el efecto del ciclamato como un potenciador debido a que es ciclamato es un edulcorantes que los inventores demostraron previamente que interactúa con el dominio 7-transmembranario C-terminal de hT1R3. Según se menciona, el ciclamato que se encontró previamente es un agonista del receptor del sabor dulce (hT1R2/hT1R3) y un potenciador del receptor del sabor umami (hT1R1/hT1R3). Por lo tanto, los inventores efectuaron experimentos que elucidaban el efecto del ciclamato sobre la respuesta del presente receptor hT1R2-1 quimérico a ligandos dulces naturales y sintéticos incluyendo aspartamo, D-triptófano, sacarosa, fructosa, y sobre el efecto de '807 y viceversa así como el efecto de '807 sobre la respuesta a aspartamo.

Particularmente según se muestra en las Figuras 9-12, se observó que el ciclamato potenciaba la respuesta de hT1R2-1 a diversos edulcorantes (aspartamo, D-triptófano, sacarosa, fructosa) y se observó que el ciclamato solo no activaba el receptor quimérico de dulce-umami (hT1R2-1/hT1R3), pero potenciaba sus respuestas a los edulcorantes y los compuestos umami '807 y '336 en las líneas celulares hT1R2-1/hT1R3 estables. Estos resultados sugieren que el ciclamato, un agonista del receptor del sabor dulce (hT1R2/hT1R3), actúa como un potenciador sobre el receptor quimérico del dulce-umami (hT1R2-1/hT1R3).

Según se menciona, se mostró que '807 y '336 interactuaban con el dominio transmembranario C-terminal de hT1R1. Además de activar el receptor quimérico del dulce-umami, también se observó que 807 y 336 potencian las actividades del receptor del sabor dulce-umami quimérico a concentraciones inferiores.

5 Según se apunta anteriormente, también se efectuaron experimentos usando líneas celulares HEK-293 que expresaban el receptor hT1R1-2 quimérico, una proteína G16gust44 quimérica y una secuencia de T1R3 de rata, lo que revelaba que este receptor del sabor quimérico respondía a compuestos con sabor umami y que la actividad del mismo se potencia mediante IMP y GMP.

10 Por lo tanto, basándose en lo precedente, se pueden usar un receptor quimérico del dulce-umami quimérico o receptores del sabor umami-dulce quiméricos como los descritos en la presente y líneas celulares estables o transitorias que expresan este receptor del sabor quimérico para identificar potenciadores del sabor dulce, potenciadores del sabor umami, edulcorantes y moléculas con sabor umami. Además, estos receptores del sabor quiméricos y líneas celulares que expresan estos receptores del sabor quiméricos se pueden usar en estudios cartográficos y funcionales para determinar en qué residuos los ligandos dulces y umami interactúan con sus respectivos receptores del sabor. Además, estas moléculas se pueden usar para elucidar el mecanismo de la activación de receptores del dulce y el umami y la potenciación de la activación.

20 Según se analiza con más detalle posteriormente, estos receptores híbridos se pueden usar en cualquiera de los ensayos de cribado divulgados en las solicitudes relacionadas con T1R previas del solicitante, incluyendo los documentos US N° de Serie 09/897.427 presentado el 3 de julio de 2001 y US N° de Serie 10/179.373 presentado el 26 de junio de 2002. Adicionalmente, según se analiza posteriormente, estos receptores híbridos se pueden expresar usando cualquiera de los vectores de expresión y las células divulgados en la presente. Sin embargo, células preferidas para la expresión incluyen células usadas típicamente en ensayos de GPCR tales como HEK-293, CHO, COS, MDK, BHK, L de mono y ovocitos (de rana).

25 En ensayos basados en células funcionales tales como los analizados posteriormente, el receptor quimérico preferiblemente se expresará en asociación con una proteína G adecuada tal como una proteína G promiscua tal como Galfa15, Galfa16, transducina, gustducina, una proteína Gq, una proteína Gi o una proteína G quimérica tal como una proteína quimérica derivada de Galfa16 y gustducina. Se ejemplifican en la presente proteínas G quiméricas derivadas de G16 y transducina o gustducina.

30 Además, se debe entender que aunque la solicitud ejemplifica secuencias de ácido nucleico y proteína dulces-umami y umami-dulces quiméricas específicas, la invención contempla además variantes de las mismas, p. ej., secuencias de ácido nucleico y polipéptidos que poseen al menos 80% de identidad de secuencia con las mismas, más preferiblemente al menos 90% de identidad de secuencia con las mismas y más típicamente de 95, 96, 97, 98, o 99% de identidad de secuencia con las mismas. De forma similar, estas secuencias quiméricas se pueden expresar en asociación con secuencias de T1R3 silvestres o variantes, es decir, variantes que poseen al menos 80% de identidad de secuencia con T1R3 humano o de roedor, más típicamente al menos 90% de identidad de secuencia con las mismas, y aún más típicamente al menos 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia con las mismas.

45 El efecto modulador del sabor de ligandos umami y dulces y potenciadores identificados usando los presentes receptores del sabor quiméricos se confirmará preferiblemente en pruebas de sabor en seres humanos o animales. Por ejemplo, se confirmará que modulan el sabor dulce o umami solos o en asociación con otros compuestos (compuesto dulce o compuesto con sabor umami). Estos compuestos se pueden usar como aditivos aromáticos en diversas composiciones incluyendo alimentos, bebidas, medicamentos y cosméticos.

50 Preferiblemente, estos ensayos utilizarán una célula de prueba que expresa un ADN que codifica un hTIR que tiene una de las secuencias de aminoácidos identificadas anteriormente. Sin embargo, se anticipa que también serán útiles en estos ensayos fragmentos, ortólogos, variantes o quimeras de estos polipéptidos receptores que retienen las propiedades funcionales de estos receptores del sabor dulce-umami o umami-dulce quiméricos, es decir, responden a algunos compuestos dulces o umami o potenciadores de los mismos compuestos. Ejemplos de estas variantes incluyen variantes de empalme, polimorfismos de un solo nucleótido, variantes alélica y mutaciones producidas por medios recombinantes o químicos, o presentes en la naturaleza. Se indican posteriormente medios para el aislamiento y la expresión de T1Rs, que se usan en los ensayos de la presente invención y ensayos que son contemplados para el uso en la presente invención para identificar compuestos que inhiben la activación de estos receptores.

#### Aislamiento y expresión de T1Rs

60 El aislamiento y la expresión de los T1Rs, o fragmentos o variantes de los mismos, de la invención se pueden efectuar mediante procedimientos de clonación bien establecidos usando sondas o cebadores construidos basándose en las secuencias de ácidos nucleicos de T1R divulgadas en la solicitud. También se pueden identificar secuencias de T1R relacionadas a partir de bases de datos genómicas de ser humano u otra especie usando las

secuencias divulgadas en la presente y tecnologías de búsqueda informatizadas, p. ej., la búsqueda de secuencias BLAST. En un ejemplo particular, los pseudogenes divulgados en la presente se pueden usar para identificar alelos funcionales o genes relacionados.

5 Los vectores de expresión se pueden usar a continuación para infectar o transfectar células hospedadoras para la expresión funcional de estas secuencias. Estos genes y vectores se pueden elaborar y expresar in vitro o in vivo. Un experto identificará que se pueden obtener fenotipos deseados para alterar y controlar la expresión de ácidos nucleicos al modular la expresión o la actividad de los genes y los ácidos nucleicos (p. ej., promotores, potenciadores y similares) dentro de los vectores descritos en la presente. Se puede usar cualquiera de los métodos conocidos descritos para incrementar o disminuir la expresión o la actividad. La invención se puede poner en práctica junto con cualquier método o protocolo conocido en la técnica, que se describen a fondo en la bibliografía científica y de patentes.

15 Alternativamente, estos ácidos nucleicos se pueden sintetizar in vitro mediante técnicas de síntesis química muy conocidas, según se describe, p. ej., en Carruthers, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47:411-18 (1982); Adams, Am. Chem. Soc., 105:661 (1983); Belousov, Nucleic Acids Res. 25:3440-3444 (1997); Frenkel, Free Radic. Biol. Med. 19:373-380 (1995); Blommers, Biochemistry 33:7886-7896 (1994); Narang, Meth. Enzymol. 68:90 (1979); Brown, Meth. Enzymol. 68:109 (1979); Beaucage, Tetra. Lett. 22:1859 (1981); la Pat. de EE. UU. N° 4.458.066. A continuación, se pueden obtener fragmentos de ADN de doble hebra al sintetizar la hebra complementaria y renaturalizar las hebras conjuntamente bajo condiciones apropiadas, o al añadir la hebra complementaria usando ADN polimerasa con una secuencia cebadora apropiada.

25 Técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, para generar mutaciones en las secuencias, subclonación, sondas de marcaje, secuenciación, hibridación y similares se describen a fondo en la bibliografía científica y de patentes. Véanse, p. ej., Sambrook, ed., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989); Ausubel, ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1997); Tijssen, ed., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Parte I, Theory and Nucleic Acid Preparation, Elsevier, N.Y. (1993).

30 Ácidos nucleicos, vectores, cápsides, polipéptidos y similares se pueden analizar y cuantificar mediante cualquiera de un número de medios generales muy conocidos por los expertos en la técnica art. Estos incluyen, p. ej., métodos bioquímicos analíticos tales como NMR, espectrofotometría, radiografía, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía de hiperdifusión, diversos métodos inmunológicos, p. ej., reacciones con precipitina fluida o en gel, inmunodifusión, inmunoelectroforesis, radioinmunoensayos (RIAs), ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISAs), ensayos inmunofluorescentes, análisis Southern, análisis Northern, análisis de transferencia de gota, electroforesis en gel (p. ej., SDS-PAGE), RT-PCR, PCR cuantitativa, otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos o dianas o señales, radiomarcaje, recuento por centelleo y cromatografía de afinidad.

40 Se pueden usar cebadores oligonucleotídicos para amplificar ácidos nucleicos que codifican una región de unión de ligando a T1R. Los ácidos nucleicos descritos en la presente también se pueden clonar o medir cuantitativamente usando técnicas de amplificación. Los métodos de amplificación también son muy conocidos en la técnica e incluyen, p. ej., reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Innis ed., PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications, Academic Press, N.Y. (1990); Innis ed., PCR Strategies, Academic Press, Inc., N.Y. (1995)); reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Wu, Genomics, 4:560 (1989); Landegren, Science, 241:1077 (1988); Barringer, Gene, 89:117 (1990)); amplificación por transcripción (Kwoh, PNAS, 86:1173 (1989)); replicación de secuencias autosostenida (Guatelli, PNAS, 87:1874 (1990)); amplificación por replicasa Q Beta (Smith, J. Clin. Microbiol., 35:1477-91 (1997)); ensayo de amplificación por replicasa Q-beta automatizado (Burg, Mol. Cell. Probes, 10:257-71 (1996)); y otras técnica mediadas por ARN polimerasa (p. ej., NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario). Véanse además Berger, Methods Enzymol., 152:307-16 (1987); Sambrook; Ausubel; las Pat. EE. UU. N° 4.683.195 y 4.683.202; Sooknanan, Biotechnology, 13:563-64 (1995).

Una vez amplificados, los ácidos nucleicos, bien individualmente o bien como bibliotecas, se pueden clonar según métodos conocidos en la técnica, si se desea, en cualquiera de una variedad de vectores usando métodos biológicos moleculares normales; métodos para clonar in vitro ácidos nucleicos amplificados se describen, p. ej., la Pat. EE. UU. N° 5.426.039. Para facilitar la clonación de secuencias amplificadas, sitios enzimáticos de restricción se pueden "incorporar en" el cebador de PCR. Por ejemplo, se diseñaron sitios Pst I y Bsp E1 en los pares de cebadores ejemplares. Estos sitios de restricción particulares tienen una secuencia que, cuando están ligados, están "en el marco" con respecto a la secuencia codificante "donante" de receptor 7-membranario en la que están empalmados (la secuencia codificante de la región de unión al ligando es interna con respecto al polipéptido 7-membranario, así, si se desea que la construcción sea traducida aguas abajo de un sitio de empalme de enzima de restricción, se deben evitar los resultados fuera del marco; esto puede no ser necesario si la región de unión a ligando insertada comprende sustancialmente la mayoría de la región transmembranaria VII). Los cebadores se pueden diseñar para retener la secuencia original del receptor 7-membranario "donante". Alternativamente, los cebadores pueden codificar residuos de aminoácido que son sustituciones conservativas (p. ej., residuo hidrófobo

por hidrófobo, véase el análisis anterior) o sustituciones funcionalmente benignas (p. ej., no evitar la inserción en la membrana plasmática, provocan escisión por peptidasa, provocan plegamiento anormal del receptor, y similares).

Los pares de cebadores se pueden diseñar para amplificar selectivamente regiones de unión a ligando de proteínas de T1R. Estas regiones de unión pueden variar para diferentes ligandos; así, lo que puede ser una región de unión mínima para un ligando, puede ser demasiado limitativo para un segundo ligando potencial. Así, se pueden amplificar regiones de unión de diferentes tamaños que comprenden diferentes estructuras de dominios; por ejemplo, los dominios transmembranarios (TM) II a VII, III a VII, III a VI o II a VI, o variaciones de los mismos (p. ej., solamente una subsecuencia de un dominio particular, mezclando el orden de los dominios, y similares), de un T1R 7-transmembranario.

Como las estructuras de los dominios y la secuencia de muchas proteínas de T1R 7-membranario son conocidas, el experto puede seleccionar fácilmente secuencias que flanquean dominios y de dominio interno como secuencias modélicas para diseñar pares de cebadores de amplificación degenerados. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica regiones de dominios II a VII se puede generar mediante amplificación por PCR usando un par de cebadores. Para amplificar una secuencia del dominio transmembranario I (TM I) que comprende ácido nucleico, se puede diseñar un cebador degenerado a partir de un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la secuencia de consenso 1 de la familia T1R descrita anteriormente. Este cebador degenerado se puede usar para generar una región de unión que incorpora TM I a TM III, TM I a TM IV, TM I a TM V, TM I a TM VI o TM I a TM VII). Se pueden diseñar otros cebadores degenerados basándose en las otras secuencias de consenso de la familia T1R proporcionadas en la presente. Este cebador degenerado se puede usar para generar una región de unión que incorpora TM III a TM IV, TM III a TM V, TM III a TM VI o TM III a TM VII.

Paradigmas para diseñar pares de cebadores degenerados son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, un programa informático estratégico de cebadores oligonucleotídicos híbridos de consenso-degenerados (CODEHOP) es accesible como <http://blocks.fhcr.org/codehop.html>, y está conectado directamente desde el sitio de alineamiento de secuencias múltiple BlockMaker para la predicción de cebadores híbridos empezando con un grupo de secuencias proteínicas relacionadas, como regiones de unión a ligandos de receptores del sabor conocidos (véanse, p. ej., Rose, *Nucleic Acids Res.*, 26:1628-35 (1998); Singh, *Biotechniques*, 24:318-19 (1998)).

Medios para sintetizar pares de cebadores oligonucleotídicos son muy conocidos en la técnica. Se pueden usar pares de bases "naturales" o pares de bases sintéticas. Por ejemplo, el uso de nucleobases artificiales ofrece un enfoque versátil para manipular la secuencia del cebador y generar una mezcla más compleja de productos de amplificación. Diversas familias de nucleobases artificiales son capaces de asumir múltiples orientaciones de los enlaces de hidrógeno a través de rotaciones de los enlaces internos para proporcionar un medio para el reconocimiento molecular degenerado. La incorporación de estos análogos en una sola posición de un cebador de PCR permite la generación de una biblioteca compleja de productos de amplificación. Véase, p. ej., Hoops, *Nucleic Acids Res.*, 25:4866-71 (1997). También se pueden usar moléculas no polares para mimetizar la conformación de bases de ADN naturales. Un mimético de conformación sin enlaces de hidrógeno para la adenina se puede replicar eficazmente y selectivamente frente a un mimético de conformación no polar para timina (véase, p. ej., Morales, *Nat. Struct. Biol.*, 5:950-54 (1998)). Por ejemplo, dos bases degeneradas pueden ser la base pirimidínica 6H,8H-3,4-dihidropirimidino[4,5-c][1,2]oxazin-7-ona o la base purínica N6-metoxi-2,6-diaminopurina (véase, p. ej., Hill, *PNAS*, 95:4258-63 (1998)). Cebadores degenerados ejemplares incorporan el análogo de nucleobase 5'-dimetoxitritil-N-benzoi-2'-desoxi-citidina, 3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (el término "P" en las secuencias, véase anteriormente). Este análogo pirimidínico se une por enlaces de hidrógeno con purinas, incluyendo residuos de A y G.

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

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

En un ejemplo, se pueden construir secuencias codificantes de proteínas híbridas que comprenden ácidos nucleicos que codifican T1Rs quiméricos o naturales fusionados con secuencias de translocación. También se proporcionan T1Rs híbridos que comprenden los motivos de translocación y regiones que se unen a compuestos que producen sabor de otras familias de receptores quimiosensoriales, particularmente receptores del sabor. Estas secuencias de ácido nucleico pueden estar conectadas operativamente a elementos de control de la transcripción o la traducción, p. ej., secuencias de iniciación de la transcripción y la traducción, promotores y potenciadores, terminadores de la transcripción y la traducción, secuencias de poliadenilación y otras secuencias útiles para transcribir ADN a ARN. En

la construcción de casetes de expresión recombinantes, vectores y transgénicos, se puede emplear un fragmento promotor para dirigir la expresión del ácido nucleico deseado en todas las células o los tejidos deseados.

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

La inclusión de una secuencia conectora escindible tal como Factor Xa (véase, p. ej., Ottavi, *Biochimie*, 80:289-93 (1998)), motivo de reconocimiento de la proteasa subtilisina (véase, p. ej., Polyak, *Protein Eng.*, 10:615-19 (1997)); enterocinasa (Invitrogen, San Diego, Calif.), y similares, entre el dominio de translocación (para una expresión eficaz en la membrana plasmática) y el resto del polipéptido recientemente traducido puede ser útil para facilitar la purificación. Por ejemplo, una construcción puede incluir un polipéptido que codifica una secuencia de ácido nucleico conectada a seis residuos de histidina seguida por una tiorredoxina, un sitio de escisión de enterocinasa (véase, p. ej., Williams, *Biochemistry*, 34:1787-97 (1995)) y un dominio de translocación C-terminal. Los residuos de histidina facilitan la detección y la purificación mientras que el sitio de escisión de enterocinasa proporciona un medio para purificar la proteína o las proteínas deseadas del resto de la proteína de fusión. Tecnología relativa a vectores que codifican proteínas de fusión y la aplicación de proteínas de fusión son descritos a fondo en la bibliografía científica y de patentes (véase, p. ej., Kroll, *DNA Cell. Biol.*, 12:441-53 (1993)).

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

Los ácidos nucleicos se pueden expresar en casetes de expresión, vectores o virus que se expresan establemente o transitoriamente en células (p. ej., sistemas de expresión episómicos). Se pueden incorporar marcadores de selección en casetes de expresión y vectores para conferir un fenotipo seleccionable a células y secuencias transformadas. Por ejemplo, los marcadores de selección pueden codificar el mantenimiento y la replicación episómicos de modo que no se requiera la integración en el genoma hospedador. Por ejemplo, el marcador puede codificar resistencia a antibióticos (p. ej., cloranfenicol, kanamicina, G418, bleomicina, higromicina) o resistencia a herbicidas (p. ej., clorosulfurona o Basta) para permitir la selección de las células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véanse, p. ej., Blondelet-Rouault, *Gene*, 190:315-17 (1997); Aubrecht, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 281:992-97 (1997)). Debido a que los genes marcadores seleccionables que confieren resistencia a sustratos como neomicina o higromicina solo se pueden utilizar en cultivo tisular, también se usan genes de quimiorresistencia como marcadores seleccionables in vitro e in vivo.

Una secuencia de ácido nucleico quimérica puede codificar una región de unión a ligando de T1R dentro de cualquier polipéptido 7-transmembranario. Debido a que los polipéptidos del receptor 7-transmembranario tienen secuencias primarias y estructuras secundarias y terciarias similares, los dominios estructurales (p. ej., dominio extracelular, dominios TM, dominio citoplásmico, etc.) se pueden identificar fácilmente mediante análisis de secuencias. Por ejemplo, el modelado por homología, el análisis de Fourier y la detección de la periodicidad helicoidal pueden identificar y caracterizar los siete dominios con una secuencia del receptor 7-transmembranario. Se pueden usar algoritmos de transformación de Fourier rápida (FFT) para determinar los períodos dominantes que caracterizan perfiles de la hidrofobia y la variabilidad de las secuencias analizadas. Se pueden realizar una potenciación de la detección de periodicidad y un índice de periodicidad helicoidal alfa como por, p. ej., Donnelly, *Protein Sci.*, 2:55-70 (1993). Otros algoritmos de alineamiento y modelado son muy conocidos en la técnica (véanse, p. ej., Peitsch, *Receptors Channels*, 4:161-64 (1996); Kyte & Doolittle, *J. Md. Biol.*, 157:105-32 (1982); y Cronet, *Protein Eng.*, 6:59-64 (1993).

También se describen en la presente no solo las moléculas de ácido nucleico y los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico de T1R naturales y quiméricas específicas, sino también fragmentos de las mismas, particularmente fragmentos de, p. ej., 40, 60, 80, 100, 150, 200 o 250 nucleótidos o más, así como fragmentos polipeptídicos de, p. ej., 10, 20, 30, 50, 70, 100 o 150 aminoácidos o más. Opcionalmente, los fragmentos de ácido nucleico pueden codificar un polipéptido antigénico que es capaz de unirse a un anticuerpo producido contra un miembro de la familia T1R. Además, un fragmento proteínico puede ser opcionalmente un fragmento antigénico que es capaz de unirse a un anticuerpo producido contra un miembro de la familia T1R.

También se contemplan proteínas quiméricas, que comprenden al menos 10, 20, 30, 50, 70, 100 o 150 aminoácidos o más, de uno de al menos uno de los polipéptidos de T1R descritos en la presente, acopladas a aminoácidos adicionales que representan la totalidad o parte de otro GPCR, preferiblemente un miembro de la superfamilia 7-transmembranaria. Estas quimeras se pueden elaborar a partir de los presentes receptores y otro GPCR, o se pueden elaborar al combinar dos o más de los presentes receptores. En un ejemplo, una porción de la quimera corresponde a o se deriva del dominio transmembranario de un polipéptido de T1R de la invención. En otro ejemplo, una porción de la quimera corresponde a o se deriva de la una o más de las regiones transmembranarias de un polipéptido de T1R descrito en la presente, y la porción o las porciones restantes pueden provenir de otro GPCR. Los receptores quiméricos son muy conocidos en la técnica y también son muy conocidas las técnicas para crearlos y la selección y los límites de los dominios o fragmentos de los receptores acoplados a proteína G para la incorporación en los mismos. Así, este conocimiento de los expertos en la técnica se puede usar fácilmente para crear estos receptores quiméricos. El uso de estos receptores quiméricos puede proporcionar, por ejemplo, una característica de sensibilidad al sabor de uno de los receptores divulgados específicamente en la presente, acoplada con las características de transducción de señales de otro receptor, tal como un receptor muy conocido usado en sistemas de ensayo de la técnica anterior.

Por ejemplo, una región tal como una región de unión a ligando, un dominio extracelular, un dominio transmembranario, un dominio transmembranario, un dominio citoplásmico, un dominio N-terminal, un dominio C-terminal, o cualquier combinación de los mismos, se puede conectar covalentemente a una proteína heteróloga. A modo de ejemplo, una región transmembranaria de T1R se puede conectar a un dominio transmembranario de GPCR heterólogo, o un dominio extracelular de GPCR heterólogo se puede conectar a una región transmembranaria de T1R. Otras proteínas heterólogas de elección pueden incluir, p. ej., proteína fluorescente verde, polipéptidos de beta-galactosidasa, receptor de glutamato y los polipéptidos de rodopsina, p. ej., fragmentos N-terminales de rodopsina, p. ej., rodopsina bovina.

También está dentro del alcance de la invención el uso de diferentes células hospedadoras para expresar los T1Rs según las reivindicaciones. Para obtener altos niveles de expresión de un gen o ácido nucleico clonado, tales como ADNcs que codifican los T1Rs, fragmentos o variantes descritos en la presente, un experto típicamente subclona la secuencia de ácido nucleico de interés en un vector de expresión que contiene un promotor fuerte para la transcripción directa, un terminador de la transcripción/traducción y, si es para un ácido nucleico que codifica una proteína, un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción. Promotores bacterianos adecuados son muy conocidos en la técnica y se describen, p. ej., en Sambrook y cols. Preferiblemente, se usan sistemas de expresión eucarióticos para expresar el presente receptor hT1R.

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

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

Ensayos para la detección de compuestos que modulan la actividad de un T1R según la invención

Se describen ahora métodos y composiciones para determinar si un compuesto de prueba se une específicamente a un polipéptido de T1R según se describe en la presente, tanto in vitro como in vivo. Se pueden controlar muchos aspectos de la fisiología celular para evaluar el efecto de la unión al ligando de un T1R presente en la naturaleza o quimérico. Estos ensayos se pueden realizar sobre células intactas que expresan un polipéptido de T1R, sobre células permeabilizadas o sobre fracciones de membrana producidas mediante métodos estándar.

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

Los presentes polipéptidos de T1R quiméricos del ensayo se seleccionarán típicamente de un polipéptido que tiene una secuencia contenida en las SEQ ID N°: 2 y 4 o fragmentos o variantes modificadas conservativamente del mismo.

- 5 Alternativamente, las proteínas o los polipéptidos de T1R quiméricos del ensayo se pueden derivar de una célula hospedadora eucariótica, y pueden incluir una secuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID N°: 2 o 4 o variantes modificadas conservativamente de la misma. Generalmente, la identidad de secuencia de aminoácidos será al menos 30% preferiblemente 30-40%, más específicamente 50-60, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. Opcionalmente, las proteínas o los polipéptidos de T1R de los ensayos pueden comprender una región de un polipéptido de T1R, tal como un dominio extracelular, una región transmembranaria, un dominio citoplásmico, un dominio de unión a ligando, y similares. Opcionalmente, el polipéptido de T1R, o una porción del mismo, puede estar conectado covalentemente a una proteína heteróloga para crear una proteína quimérica usada en los ensayos descritos en la presente.
- 10
- 15 Se pueden probar moduladores de la actividad de T1R usando proteínas o polipéptidos de T1R como los descritos anteriormente, bien recombinantes o bien presentes en la naturaleza. Las proteínas o los polipéptidos de T1R se pueden aislar, expresar en una célula, expresar en una membrana derivada de una célula, expresar en tejido o en un animal, bien recombinante o bien presente en la naturaleza. Por ejemplo, se pueden usar rodajas de lengua, células disociadas de una lengua, células transformadas o membranas. La modulación también se puede probar usando uno de los ensayos in vitro o in vivo descritos en la presente.
- 20

#### Detección de moduladores

- Se describen posteriormente composiciones y métodos para determinar si un compuesto de prueba se une específicamente a un receptor T1R según se describe en la presente, tanto in vitro como in vivo. Se pueden controlar muchos aspectos de la fisiología celular para evaluar el efecto de la unión de un ligando a un polipéptido de T1R según se describe en la presente. Estos ensayos se pueden realizar sobre células intactas que expresan un receptor quimiosensorial, sobre células permeabilizadas o sobre fracciones de membrana producidas mediante métodos estándar o in vitro usando proteína sintetizadas *de novo*.
- 25

- In vivo, los receptores del sabor se unen a compuestos moduladores del sabor e inician la transducción de estímulos químicos en señales eléctricas. Una proteína G activada o inhibida alterará a su vez las propiedades de enzimas diana, canales y otras proteínas efectoras. Algunos ejemplos son la activación de cGMP fosfodiesterasa por transducina en el sistema visual, adenilato ciclasa por la proteína G estimulante, fosfolipasa C por Gq y otras proteínas G cognadas, y la modulación de diversos canales por Gi y otras proteínas G. También se pueden examinar consecuencias aguas abajo tales como la generación de diacilglicerol e IP3 por fosfolipasa C y, a su vez, para la movilización de calcio por IP3.
- 30
- 35

- Alternativamente, las proteínas o los polipéptidos de T1R quiméricos del ensayo se pueden derivar de una célula hospedadora eucariótica y pueden incluir una subsecuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia de aminoácidos con los polipéptidos de T1R divulgados en la presente, o fragmentos o variantes modificadas conservativamente de la misma. Generalmente, la identidad de secuencia de aminoácidos será al menos 35 a 50%, u opcionalmente 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. Opcionalmente, las proteínas o los polipéptidos de T1R de los ensayos pueden comprender un dominio de una proteína de T1R, tal como un dominio extracelular, una región transmembranaria, un dominio transmembranario, un dominio citoplásmico, un dominio de unión a ligando, y similares. Además, según se describe anteriormente, la proteína de T1R o un dominio de la misma se puede conectar covalentemente a una proteína heteróloga para crear una proteína quimérica usada en los ensayos descritos en la presente.
- 40
- 45

- Se prueban moduladores de la actividad del receptor T1R usando proteínas o polipéptidos de T1R como los descritos anteriormente, bien recombinantes o bien presentes en la naturaleza. Las proteínas o los polipéptidos de T1R se pueden aislar, expresar en una célula, expresar en una membrana derivada de una célula, expresar en tejido o en un animal, bien recombinante o bien presente en la naturaleza. Por ejemplo, se pueden usar rodajas de lengua, células disociadas de una lengua, células transformadas o membranas. La modulación también se puede probar usando uno de los ensayos in vitro o in vivo descritos en la presente.
- 50

#### 1. Ensayos de unión in vitro

- La transducción del sabor también se puede examinar in vitro con reacciones en estado sólido o soluble, usando los polipéptidos de T1R descritos en la presente. En un ejemplo particular, se pueden usar dominios de unión a ligando de T1R in vitro en reacciones en estado soluble o sólido para ensayar con respecto a la unión al ligando.
- 55

- Es posible que el dominio de unión a ligando pueda estar formado por el dominio N-terminal junto con porciones adicionales del dominio extracelular, tales como los bucles extracelulares del dominio transmembranario.
- 60

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

La unión del ligando a un polipéptido de T1R según se describe en la presente se puede probar en solución, en una membrana de doble capa, opcionalmente ligada a una fase sólida, en una monocapa lipídica o en vesículas. La unión de un modulador se puede probar usando, p. ej., cambios en las características espectroscópicas (p. ej., fluorescencia, absorbancia, índice de refracción) las propiedades hidrodinámicas (p. ej., conformación), cromatográficas o de solubilidad.

En un ejemplo preferido, se usa un ensayo de unión a  $^{35}\text{S}$ GTP $\gamma$ S. Según se describe anteriormente, al activar un GPCR, la subunidad G $\alpha$  del complejo de la proteína G se estimula para intercambiar GDP unido por GTP. La estimulación mediada por ligando de la actividad de intercambio de proteína G se puede medir en un ensayo bioquímico que mide la unión de  $^{35}\text{S}$ GTP $\gamma$ S marcado radiactivamente añadido a la proteína G en presencia de un ligando putativo. Típicamente, membranas que contienen el receptor quimiosensorial de interés se mezclan con una proteína G. Se añaden al ensayo inhibidores y/o activadores potenciales y  $^{35}\text{S}$ GTP $\gamma$ S y se mide la unión de  $^{35}\text{S}$ GTP $\gamma$ S a la proteína G. La unión se puede medir mediante recuento por centelleo de líquido o por otros medios conocidos en la técnica, incluyendo ensayos de proximidad de centelleo (SPA). En otros formatos de ensayo, se puede utilizar GTP $\gamma$ S marcado fluorescentemente.

## 2. Ensayos de polarización fluorescente

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

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

La polarización (P) fluorescente se define como:

$$P = \frac{[\text{Int}_{\text{par}} - \text{Int}_{\text{perp}}]}{[\text{Int}_{\text{par}} + \text{Int}_{\text{perp}}]}$$

Donde,  $\text{Int}_{\text{par}}$  es la intensidad de la luz de emisión paralela al plano de luz de excitación y  $\text{Int}_{\text{perp}}$  es la intensidad de la luz de emisión perpendicular al plano de luz de excitación. P, que es una relación de intensidades de luz, es un número adimensional. Por ejemplo, se puede usar el sistema Beacon<sup>TM</sup> y Beacon 2000<sup>TM</sup> en relación con estos ensayos. Estos sistemas expresan típicamente la polarización en unidades de milipolarización (1 unidad de polarización = 1000 unidades mP).

La relación entre la rotación molecular y el tamaño se describe por la ecuación de Perrin y el lector es referido a Jolley, M. E. (1991) en Journal of Analytical Toxicology, pp. 236-240, que da una explicación a fondo de esta ecuación. En resumen, la ecuación de Perrin indica que la polarización es directamente proporcional al tiempo de relajación rotacional, el tiempo que emplea una molécula para girar a través de un ángulo de aproximadamente

68,5°. El tiempo de relajación rotacional se relaciona con la viscosidad ( $\eta$ ), la temperatura absoluta (T), el volumen molecular (V) y la constante de los gases (R) mediante la siguiente ecuación:  $2(\text{tiempo de relajación rotacional}) = 3 \frac{V}{RT}$ .

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

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

15 En otro ejemplo más, se describen en la presente ensayos solubles que usan un polipéptido de T1R; o una célula o un tejido que expresa un polipéptido de T1R. En otro ejemplo, se describen en la presente ensayos in vitro basados en fase sólida en un formato de alto rendimiento, en los que el polipéptido de T1R, o la célula o el tejido que expresa el polipéptido de T1R, está ligado a un sustrato en fase sólida o un compuesto estimulante del sabor y se pone en contacto con un receptor T1R, y la unión se detecta usando una etiqueta apropiada o un anticuerpo producido contra el receptor T1R.

25 En los ensayos de alto rendimiento descritos, es posible cribar hasta varios miles de moduladores o ligandos diferentes en un solo día. En particular, cada pocillo de una placa de microvaloración se puede usar para realizar un ensayo separado contra un modulador potencial seleccionado o, si se van a observar efectos de la concentración o el tiempo de incubación, cada 5-10 pocillos pueden probar un único modulador. Así una sola placa de microvaloración estándar puede ensayar aproximadamente 100 (p. ej., 96) moduladores. Si se usan placas de 1536 pocillos, entonces una sola placa puede ensayar fácilmente de aproximadamente 1000 a aproximadamente 1500 compuestos diferentes. También es posible ensayar múltiples compuestos en cada pocillo de la placa. Es posible ensayar varias placas diferentes al día; cribados de ensayo para hasta aproximadamente 6.000-20.000 compuestos diferentes son posibles usando los sistemas integrados descritos en la presente. Más recientemente, se han desarrollado enfoques microfluídicos para manipulación de reactivos.

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

40 Se puede usar un número de etiquetas y ligadores de etiquetas, basándose en interacciones moleculares conocidas descritas a fondo en la bibliografía. Por ejemplo, cuando la etiqueta tiene un ligador natural, por ejemplo, biotina, proteína A o proteína G, se puede usar junto con ligadores de etiquetas apropiados (avidina, estreptavidina, neutravidina, la región Fc de una inmunoglobulina, etc.). Anticuerpos para moléculas con ligadores naturales tales como biotina también son ligadores de etiquetas ampliamente disponibles y apropiados (véase SIGMA Immunochemicals catálogo SIGMA de 1998, St. Louis Mo.).

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

60 Los polímeros sintéticos, tales como poliuretanos, poliésteres, policarbonatos, poliureas, poliamidas, polietileniminas, poli(sulfuros de arileno), polisiloxanos, poliimididas y poliacetatos, también pueden formar una etiqueta o ligador de

etiqueta apropiados. Muchos otros pares de etiqueta/ligador de etiqueta también son útiles en sistemas de ensayo descritos en la presente, como sería evidente para un experto al revisar esta divulgación.

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

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

### 3. Ensayos basados en células

25 En un ejemplo preferido, una proteína de T1R se expresa en una célula eucariótica bien en formas no modificadas o bien como receptores quiméricos, variantes o truncados con o preferiblemente sin una secuencia chaperónica heteróloga que facilite su maduración y orientación a través de la ruta secretora. Estos polipéptidos de T1R se pueden expresar en cualquier célula s eucariótica, tal como células HEK-293. Preferiblemente, las células comprenden una proteína G funcional, p. ej., G<sub>α15</sub>, o una G<sub>α16</sub> quimérica, gustducina o transducina o una proteína G quimérica tal como G16gust44 que es capaz de acoplar el receptor quimérico a una ruta de señalización intracelular o a una proteína de señalización tal como fosfolipasa C. La activación de receptores de T1R en estas células se puede detectar usando cualquier método estándar, tal como al detectar cambio en el calcio intracelular al detectar fluorescencia dependiente de FURA-2 en una célula. Este ensayo es la base de los hallazgos experimentales presentados en esta solicitud.

35 Los receptores GPCR activados a menudo son sustratos para cinasas que fosforilan la cola C-terminal del receptor (y posiblemente también otros sitios). Así, los activadores promoverán la transferencia de <sup>32</sup>P desde ATP radioetiquetado al receptor, lo que se puede ensayar mediante un contador de centelleo. La fosforilación de la cola C-terminal promoverá la unión de proteínas similares a arrestina e interferirá con la unión de proteínas G. Para una revisión general de la transducción de señales de GPCR y métodos para ensayar la transducción de señales, véanse, p. ej., *Methods in Enzymology*, vols. 237 y 238 (1994) y volumen 96 (1983); Bourne y cols., *Nature*, 10:349:117-27 (1991); Bourne y cols., *Nature*, 348:125-32 (1990); Pitcher y cols., *Annu. Rev. Biochem.*, 67:653-92 (1998).

45 La modulación de T1R se puede ensayar al comparar la respuesta de polipéptidos de T1R quiméricos como los descritos en la presente tratados con un modulador de T1R putativo con la respuestas de una muestra de control no tratada o una muestra que contiene un control "positivo" conocido. Estos moduladores de T1R putativos pueden incluir moléculas que bien inhiben o bien activan la actividad del polipéptido de T1R. En un ejemplo, a muestras de control tratadas con un compuesto que activa el T1R se les asigna un valor de actividad relativa de T1R de 100. La inhibición de un polipéptido de T1R se alcanza cuando el valor de la actividad de T1R con relación a la muestra de control es aproximadamente 90%, opcionalmente 50%, opcionalmente 25-0%. La activación de un polipéptido de T1R se alcanza cuando el valor de la actividad de T1R con relación al control es 110%, opcionalmente 150%, 200-500% o 1000-2000%.

55 Los cambios en el flujo iónicos se pueden evaluar al determinar cambios en la polarización iónica (es decir, el potencial eléctrico) de la célula o la membrana que expresa un polipéptido de T1R. Un medio para determinar cambios en la polarización celular es medir cambios en la corriente (midiendo de ese modo cambios en la polarización) con técnicas de fijación de voltaje y pinzamiento zonal (véanse, p. ej., el modo "ligado a célula", el modo "de dentro a afuera" y el modo de "células enteras", p. ej., Ackerman y cols., *New Engl. J Med.*, 336:1575-1595 (1997)). Las corrientes en células enteras se determinan convenientemente usando el patrón. Otros ensayos conocidos incluyen: ensayos de flujo iónico radiomarcados y ensayos fluorescentes que usan colorantes sensibles al voltaje (véanse, p. ej., Vestergarrd-Bogind y cols., *J. Membrane Biol.*, 88:67-75 (1988); Gonzales & Tsien, *Chem.*

60

Biol., 4:269-277 (1997); Daniel y cols., J. Pharmacol. Meth., 25:185-193 (1991); Holevinsky y cols., J. Membrane Biology, 137:59-70 (1994)).

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

15 Ensayos preferidos para GPCRs incluyen células que están cargadas con colorantes sensibles a los iones o el voltaje para presentar la actividad del receptor. Ensayos para determinar la actividad de estos receptores también pueden usar agonistas y antagonistas conocidos para otros receptores acoplados a proteína G como controles para evaluar la actividad de los compuestos probados. En ensayos para identificar compuestos moduladores (p. ej., agonistas, antagonistas), los cambios en el nivel de iones en el citoplasma o el voltaje de la membrana se comprobarán usando un indicador sensible a iones o fluorescente para el voltaje de la membrana, respectivamente. Entre los indicadores sensibles a iones y las sondas de voltaje que se pueden emplear están los divulgados en el catálogo de 1997 de Molecular Probes. Para receptores acoplados a proteína G, proteínas G promiscuas tales como  $G_{\alpha 15}$  y  $G_{\alpha 16}$  se pueden usar en el ensayo de elección (Wilkie y cols., Proc. Nat'l Acad. Sci., 88:10049-10053 (1991)). Alternativamente, se pueden usar otras proteínas G tales como gustducina, transducina y proteínas G quiméricas tales como G $\alpha 16$ gust44 o G16g44.

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

35 En un ejemplo preferido, la actividad del polipéptido de T1R se mide al expresar gen de T1R en una célula heteróloga con una proteína G promiscua que conecta el receptor a una ruta de transducción de señales de fosfolipasa C (véase Offermanns & Simon, J. Biol. Chem., 270:15175-15180 (1995)). Preferiblemente, la línea celular es HEK-293 (que no expresa normalmente genes de T1R) y la proteína G promiscua es  $G_{\alpha 15}$  (Offermanns & Simon, anteriormente) o una proteína G quimérica tal como G $\alpha 16$ gust44. La modulación de la transducción del sabor se evalúa al medir cambios en los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular, que cambian en respuesta a la modulación de la ruta de transducción de señales de T1R a través de la administración de una molécula que se asocia con el polipéptido de T1R. Los cambios en los niveles de  $Ca^{2+}$  se miden opcionalmente usando tintes indicadores de  $Ca^{2+}$  fluorescentes y obtención fluorimétrica de imágenes.

45 En otro ejemplo, se puede analizar la hidrólisis de fosfatidilinositol (PI) según la Pat. EE. UU. N° 5.436.128. Brevemente, el ensayo el marcaje de células con 3H-mioinositol durante 48 o más h. Las células marcadas se tratan con un compuesto de prueba durante una hora. Las células tratadas se someten a lisis y se extraen en cloroformo-metanol-agua después de los cual los fosfatos de inositol se separan mediante cromatografía de intercambio iónico y se cuantifican mediante recuento por centelleo. La estimulación en número de veces se determina al calcular la relación de cpm en presencia de agonista con cpm en presencia de control de tampón. Asimismo, la inhibición en número de veces se determina al calcular la relación de cpm en presencia de antagonista con cpm en presencia de control de tampón (que puede contener o no un agonista).

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

65 En otro ejemplo, se pueden medir los niveles de transcripción para evaluar los efectos de un compuesto de prueba sobre la transducción de señales. Una célula hospedadora que contiene polipéptido de T1R de interés se pone en contacto con un compuesto de prueba durante un tiempo suficiente para efectuar cualesquiera interacciones, y a

continuación se mide el nivel de expresión génica. La cantidad de tiempo para efectuar estas interacciones se puede determinar empíricamente, tal como dejando pasar un período de tiempo y midiendo el nivel de transcripción como una función del tiempo. La cantidad de transcripción se puede medir al usar cualquier método conocido por ser adecuado por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la expresión por ARNm de la proteína de interés se puede detectar usando transferencias Northern o sus productos polipeptídicos se pueden identificar usando inmunoensayos. Alternativamente, se pueden usar ensayos basados en la transcripción que usan un gen indicador, según se describe en la Pat. EE. UU. N° 5.436.128. Los genes indicadores pueden ser, p. ej., cloranfenicol acetiltransferasa, luciferasa, beta-galactosidasa, beta-lactamasa y fosfatasa alcalina. Por otra parte, la proteína de interés se puede usar como un indicador indirecto a través de la ligación a un segundo indicador tal como proteína fluorescente verde (véase, p. ej., Mistili & Spector, Nature Biotechnology, 15:961-964 (1997)).

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

#### 4. Animales no humanos transgénicos que expresan receptores quimiosensoriales

Los animales no humanos que expresan una o más de las secuencias de receptor del sabor descritas en la presente también se pueden usar para ensayos de receptores. Esta expresión se puede usar para determinar si un compuesto de prueba se une específicamente a un complejo de receptores del sabor transmembranarios de mamífero in vivo al poner en contacto un animal no humano transfectado establemente o transitoriamente con ácidos nucleicos que codifican receptores quimiosensoriales o regiones de unión a ligando de los mismos con un compuesto de prueba y determinar si el animal reacciona con el compuesto de prueba al unirse específicamente al complejo polipeptídico de receptores.

Los animales transfectados o infectados con los vectores descritos en la presente son particularmente útiles para ensayos para identificar y caracterizar estímulos gustativos que se pueden unir a un receptor específico o conjunto de receptores. Estos animales infectados con vectores, que expresan secuencias de receptores del sabor humanos se pueden usar para el cribado in vivo de estímulos gustativos y su efecto sobre, p. ej., la fisiología celular (p. ej., sobre neuronas gustativas), sobre el SNC o el comportamiento.

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

Los genes de receptores del sabor endógenos pueden permanecer funcionales y todavía puede estar presente una actividad silvestre (natural). En otras situaciones, en las que es deseable que toda la actividad del receptor del sabor sea por el receptor híbrido exógeno introducido, se prefiere el uso de una línea inactivada. Métodos para la construcción de animales transgénicos no humanos, particularmente ratones transgénicos, y la selección y preparación de construcciones recombinantes para generar células transformadas son muy conocidos en la técnica.

La construcción de una célula y un animal "inactivados" se basa en la premisa de que el nivel de expresión de un gen particular en una célula de mamífero se puede disminuir o eliminar completamente al introducir en el genoma una nueva secuencia de ADN que sirve para interrumpir alguna porción de la secuencia de ADN del gen que se va a suprimir. Además, se puede usar una "inserción de una trampa génica" para alterar un gen hospedador, y se pueden usar células madre embrionarias (ES) de ratón para producir animales transgénicos inactivados (véase, p. ej., Holzschu, Transgenic Res 6:97-106 (1997)). La inserción del exógeno es típicamente mediante recombinación homóloga entre secuencias de ácido nucleico complementarias. La secuencia exógena es alguna porción del gen diana que se va a modificar, tales como secuencias exónicas, intrónicas o reguladoras de la transcripción, o cualquier secuencia genómica que sea capaz de afectar al nivel de la expresión del gen diana; o una combinación de las mismas. La elección como diana del gen a través de recombinación homóloga en células madre embrionarias pluripotenciales permite modificar precisamente la secuencia genómica de interés. Se puede usar cualquier técnica para crear, cribar, propagar un animal inactivado, p. ej., véanse Bijvoet, Hum. Mol. Genet. 7:53-62 (1998); Moreadith, J. Mol. Med. 75:208-216 (1997); Tojo, Cytotechnology 19:161-165 (1995); Mudgett, Methods Mol. Biol. 48:167-184 (1995); Longo, Transgenic Res. 6:321-328 (1997); las Pat. de EE. UU. N° 5.616.491, 5.464.764, 5.631.153, 5.487.992, 5.627.059, 5.272.071; los documentos WO 91/09955, WO 93/09222, WO 96/29411, WO 95/31560, WO 91/12650.

Los ácidos nucleicos descritos en la presente también se pueden usar como reactivos para producir células humanas "inactivadas" y su progenie. Asimismo, los ácidos nucleicos también se pueden usar como reactivos para

producir "activaciones" en ratones. Las secuencias génicas de T1R de ser humano o rata pueden reemplazar a los T1R ortólogos en el genoma del ratón. De este modo, se produce un ratón que expresa un T1R de ser humano o rata. A continuación, este ratón se puede usar para analizar la función de los TIRs de ser humano o rata y para identificar ligandos para estos TIRs.

## 5 Moduladores

Los compuestos probados como moduladores de un miembro de la familia de T1R pueden ser cualquier compuesto químico pequeño, o una entidad biológica, tal como una proteína, un azúcar, un ácido nucleico o un lípido. Alternativamente, los moduladores pueden ser versiones genéticamente alteradas de un miembro de la familia de T1R. Típicamente, los compuestos de prueba pueden ser moléculas químicas pequeñas y péptidos. Se puede usar esencialmente cualquier compuesto químico como un modulador o ligando potencial en los ensayos de la invención, aunque lo más a menudo se usan compuestos que se pueden disolver en soluciones acuosas u orgánicas (especialmente basadas en DMSO). Los ensayos se pueden diseñar para cribar bibliotecas de productos químicos grandes al automatizar las etapas de ensayo y proporcionar compuestos a partir de cualquier fuente conveniente a los ensayos, que típicamente se efectúan en paralelo (p. ej., en formatos de microvaloración en ensayos robóticos). Se apreciará que existen muchos proveedores de compuestos químicos, incluyendo Sigma (St. Louis, Mo.), Aldrich (St. Louis, Mo.), Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo.), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Suiza) y similares.

En un ejemplo, los métodos de cribado de alto rendimiento implican proporcionar una biblioteca combinatoria de productos químicos o péptidos que contiene un gran número de compuestos terapéuticos potenciales (compuestos moduladores o ligandos comerciales). Estas "bibliotecas combinatorias de productos químicos" o "bibliotecas de ligandos" se criban a continuación en uno o más ensayos, según se describe en la presente, para identificar los miembros de la biblioteca (especies químicas particulares o subclases) que exhiben una actividad característica deseada. Estos compuestos así identificados pueden servir como "compuestos principales" convencionales o se pueden usar ellos mismos como productos de consumo potenciales o reales.

Una biblioteca combinatoria de productos químicos es una colección de diversos compuestos químicos generados bien por síntesis química o bien por síntesis biológica, al combinar un número de "unidades estructurales" químicas tales como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca combinatoria lineal de productos químicos tal como una biblioteca de polipéptidos se forma al combinar un grupo de unidades de construcción químicas (aminoácidos) de todos los modos posibles para una longitud de compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipeptídico). Se pueden sintetizar millones de compuestos químicos a través de estas unidades estructurales químicas.

La preparación y el cribado de bibliotecas combinatorias de productos químicos son muy conocidos por los expertos en la técnica. Estas bibliotecas combinatorias de productos químicos incluyen, pero no se limitan a, bibliotecas de péptidos (véanse, p. ej., la Pat. EE. UU. N° 5.010.175, Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 37:487-93 (1991) y Houghton y cols., *Nature*, 354:84-88 (1991)). También se pueden usar otros productos químicos para generar bibliotecas de diversidad de productos químicos. Estas químicas incluyen, pero no se limitan a: peptoides (p. ej., el documento WO 91/19735), péptidos codificados (p. ej., el documento WO 93/20242), biooligómeros aleatorios (p. ej., el documento WO 92/00091), benzodiazepinas (p. ej., la Pat. EE. UU. N° 5.288.514), diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs y cols., *PNAS.*, 90:6909-13 (1993)), polipéptidos vinílogos (Hagihara y cols., *J. Amer. Chem. Soc.*, 114:6568 (1992)), peptidomiméticos no peptídicos tales como andamiaje de glucosa (Hirschmann y cols., *J. Amer. Chem. Soc.*, 114:9217-18 (1992)), síntesis orgánicas análogas de bibliotecas de compuestos pequeños (Chen y cols., *J. Amer. Chem. Soc.*, 116:2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho y cols., *Science*, 261:1303 (1993)), fosfonatos de peptidilo (Campbell y cols., *J. Org. Chem.*, 59:658 (1994)), bibliotecas de ácidos nucleicos (Ausubel, Berger y Sambrook, todos anteriormente), bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (Pat. EE. UU. N° 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (Vaughn y cols., *Nature Biotechnology*, 14(3):309-14 (1996) y el documento PCT/US96/10287), bibliotecas de carbohidratos (Liang y cols., *Science*, 274:1520-22 (1996) y Pat. EE. UU. N° 5.593.853), bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (benzodiazepinas, Baum, C&EN, 18 enero, páginas 33 (1993); tiazolidinonas y metatiazanonas, Pat. EE. UU. N° 5.549.974; pinrolidinas, Pat. EE. UU. N° 5.525.735 y 5.519.134; compuestos morfolínicos, Pat. EE. UU. N° 5.506.337; benzodiazepinas, 5.288.514, y similares).

Están disponibles comercialmente dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias (véanse, p. ej., 357 MPS, 390 MPS (Advanced Chem Tech, Louisville Ky.), Symphony (Rainin, Woburn, Mass.), 433A (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), 9050 Plus (Millipore, Bedford, Mass.)). Además, están disponibles comercialmente por sí mismas numerosas bibliotecas combinatorias (véanse, p. ej., ComGenex, Princeton, N.J.; Tripos, Inc., St. Louis, Mo.; 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa.; Martek Biosciences; Columbia, Md.; etc.).

En un ejemplo, los moduladores de T1R se pueden usar en cualquier producto alimenticio, repostería, composición farmacéutica o ingrediente de los mismos para modular de ese modo el sabor del producto, la composición o el ingrediente de un modo deseado. A modo de ejemplo, se pueden añadir moduladores de T1R que provocan sensación de sabor dulce o umami para proporcionar un sabor dulce o umami mejorado a un producto o una

composición, aunque se pueden añadir moduladores de T1R que potencian sensaciones de sabor dulce o umami para potenciar el sabor dulce o umami de otro compuesto en una composición tal como un producto o una composición alimenticios o de bebida. También se divulgan en la presente medios para identificar compuestos dulces o umami y mejoradores encontrados en alimentos, bebidas y medicamentos y producir alimentos, bebidas y medicamentos de sabor mejorado que carecen de o tienen una cantidad reducida de los mismos.

Uso de compuestos identificados por la invención

Los compuestos identificados según la invención se pueden añadir a alimentos, bebidas y composiciones medicinales para modular el sabor dulce o umami.

Según se apunta previamente, preferiblemente, las propiedades moduladoras del sabor de compuestos identificados en los ensayos basados en células se conformarán en pruebas gustativas, p. ej., pruebas gustativas en seres humanos.

Estuches

Los presentes genes de T1R quiméricos y sus homólogos son herramientas útiles para identificar células receptoras del sabor, para determinaciones forenses y de paternidad y para examinar la transducción del sabor. Se usan reactivos específicos para miembros de la familia T1R que se hibridan específicamente a ácidos nucleicos de T1R, tales como sondas y cebadores de T1R, y reactivos específicos para T1R que se unen específicamente a una proteína de T1R, p. ej., se usan anticuerpos para T1R para examinar la regulación de la expresión de células gustativas y la transducción del sabor.

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

También se describen en la presente estuches para cribar moduladores de miembros de la familia T1R. Estos estuches se pueden preparar a partir de materiales y reactivos fácilmente disponibles. Por ejemplo, estos estuches pueden comprender uno o más de los siguientes materiales: ácidos nucleicos o proteínas de T1R, tubos de reacción e instrucciones para probar la actividad de T1R. Opcionalmente, el estuche contiene un polipéptido funcional de T1R. Se puede preparar una amplia variedad de estuches y componentes, dependiendo del usuario pretendido del estuche y las necesidades particulares del usuario.

Habiendo descrito ahora generalmente la invención, la misma se entenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Se construyeron secuencias de ácido nucleico que codifican la secuencia de ácido nucleico de hT1R2-1 híbrida contenida en SEQ ID N°: 1 y la secuencia de ácido nucleico hT1R1-2 umami-dulce quimérica contenida en SEQ ID N°: 3. La primera secuencia de hT1R2-1 contiene los dominios extracelulares de hT1R2 y los dominios transmembranarios de hT1R1 y la segunda secuencia contiene los dominios extracelulares de hT1R1 y los dominios transmembranarios de hT1R2. Se crearon líneas celulares HEK-293 que producen establemente estos receptores del sabor híbridos. Particularmente, se produjo una línea celular HEK-293 estable que expresa constitutivamente establemente la secuencia de hT1R2-1 quimérica, hT1R3, y se produjo una proteína G quimérica G16-t25 que coexpresa hT1R2-1, hT1R3 y esta proteína G quimérica. Adicionalmente, se produjo una línea celular HEK-293 estable que expresa constitutivamente establemente hT1R1-2 quimérica, rT1R3 y otra proteína G quimérica G16g44 que comprende los residuos N-terminales de G16 y los 44 últimos residuos carboxi sustituidos por los 44 residuos de gustducina correspondientes. Estas líneas celulares HEK-293 estables se usaron en ensayos para ligandos y potenciadores dulces y umami como los descritos en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 2

La línea celular hT1R2-1 estable del ejemplo 1 se cribó frente a un número de ligandos dulces y las concentraciones se muestran en la Figura 7 y el efecto sobre el calcio intracelular y la actividad del receptor hT1R2-1 se detectaron mediante obtención fluorimétrica de imágenes. Estos ensayos mostraban que todos los compuestos dulces probados activaban el receptor hT1R2-1 quimérico a las concentraciones probadas con la excepción del ciclamato. Las concentraciones eficaces (EC50s) de los compuestos dulces específicos aspartamo, D-Trp, sacarosa, fructosa y ciclamato para hT1R2-1/hT1R3 también se comparó con las EC50s de estos mismos compuestos cuando se usaban para activar el receptor dulce silvestre hT1R2/hT1R3. Los resultados están contenidos en la Figura 8.

Ejemplo 3

Se efectuó un ensayo para determinar el efecto del ciclamato sobre la activación del receptor del sabor hT1R2-1 quimérico por aspartamo. Según se muestra en la Figura 9, la adición de ciclamato potenciaba las respuestas a aspartamo en la línea celular estable hT1R2-1. Según se muestra en la Figura 9, la EC50 para el aspartamo era 0,97 en ausencia de ciclamato y 0,44 en presencia de ciclamato 10 mM. Adicionalmente, según se muestra por los resultados experimentales de las Figuras 10-12, respectivamente, el ciclamato también potenciaba la activación por D-triptófano, sacarosa y fructosa de hT1R2-1.

Ejemplo 4

Se efectuaron ensayos para evaluar el efecto del ciclamato sobre la activación de hT1R2-1 (SEQ ID N°: 2) por un ligando umami patentado denominado '807. Según se muestra en la Figura 13, el ciclamato potenciaba la actividad de '807. La EC50 para el compuesto '807 en ausencia de ciclamato era 0,42 y en presencia de ciclamato 5 mM era 0.31. Además, según se muestra en la Figura 14, el compuesto '807 potencia la respuesta de activación de hT1R2-1 a aspartamo.

Ejemplo 5

También se ensayó la respuesta de receptor umami-dulce quimérico hT1R1-2 (SEQ ID N°: 4) en la línea estable que coexpresa hT1R1-2 y rT1R3 a diversos ligandos umami (L-Glu, L-Asp y L-AP4) y a D-Glu en presencia y ausencia de IMP, GMP y CMP según se muestra en la Figura 15. Se encontró que los ligandos umami probados activan el receptor umami-dulce quimérico. Según se muestra también en la Figura 16, se efectuaron además experimentos para evaluar el efecto de IMP sobre la activación inducida por MSG de hT1R1-2 (SEQ ID N°: 4). Según se muestra por los resultados experimentales de la presente, el compuesto IMP actuaba como un potenciador basándose en los valores de EC50 de la presente en presencia y ausencia de IMP.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una línea celular que expresa un polipéptido receptor del sabor quimérico que comprende el dominio extracelular de T1R2 y la región transmembranaria de T1R1 según están contenidos en SEQ ID N°: 2, línea celular que expresa además una proteína G quimérica derivada de Galfal6 y bien gustducina o bien transducina.
2. La línea celular según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es
- (a) una célula procariótica,
- (b) una célula eucariótica, o
- 10 (c) una célula de levadura, insecto o mamífero.
3. La línea celular según la reivindicación 2, que es una célula de mamífero, preferiblemente una célula CHO o HeLa.
- 15 4. La línea celular según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que expresa adicionalmente otro polipéptido de T1R.
5. La línea celular según la reivindicación 4, en la que el otro polipéptido de T1R es un polipéptido de T1R3.
- 20 6. La línea celular según la reivindicación 5, en la que el polipéptido de T1R3 es un polipéptido de ser humano o roedor.
7. La línea celular según la reivindicación 6, en la que la proteína G quimérica comprende la porción N-terminal de Galfal6 y los 25 aminoácidos carboxiterminales de transducina (G16t25).
- 25 8. La línea celular según la reivindicación 6, en la que la proteína G quimérica comprende la porción N-terminal de Galfal6 y los 44 aminoácidos carboxiterminales de transducina (G16g44).
9. La línea celular según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una molécula de ácido nucleico con la secuencia mostrada en SEQ ID N°: 1.
- 30 10. Un ensayo de cribado que usa una línea celular según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende:
- 35 (i) poner en contacto una línea celular según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 con un compuesto a fin de determinar si el compuesto tiene un efecto modulador sobre el sabor;
- (ii) determinar si dicho compuesto tiene un efecto modulador sobre el sabor basándose en si se une específicamente a un receptor del sabor que comprende el polipéptido receptor del sabor quimérico de SEQ ID N°: 2 o modula la actividad de un receptor del sabor que comprende el polipéptido receptor del sabor quimérico de la SEQ ID N°: 2.
- 40 11. El ensayo según la reivindicación 10, en el que la línea celular se pone en contacto con un ligando dulce antes de poner en contacto la línea celular con un compuesto que se va a cribar a fin de determinar si el compuesto tiene un efecto modulador sobre el sabor dulce.

**FIGURA 1**

**Secuencia nucleotídica de hT1R2-1**

ATGGGGCCAGGGCAAAGACCATCTGCTCCCTGTTCTTCCTCCTATGGGTCCTGGCT  
 GAGCCGGCTGAGAACTCGGACTTCTACCTGCCTGGGGATTACCTCCTGGGTGGCCTC  
 TTCTCCCTCCATGCCAACATGAAGGGCATTGTTACCTTAACTTCCTGCAGGTGCCCA  
 TGTGCAAGGAGTATGAAGTGAAGGTGATAGGCTACAACCTCATGCAGGCCATGCGCT  
 TCGCGGTGGAGGAGATCAACAATGACAGCAGCCTGCTGCCTGGTGTGCTGCTGGGCT  
 ATGAGATCGTGGATGTGTGCTACATCTCCAACAATGTCCAGCCGGTGCTCTACTTCCT  
 GGCACACGAGGACAACCTCCTTCCCATCCAAGAGGACTACAGTAACTACATTTCCCGT  
 GTGGTGGCTGTCATTGGCCCTGACAACTCCGAGTCTGTTCATGACTGTGGCCAACTTC  
 CTCTCCCTATTTCTCCTTCCACAGATCACCTACAGCGCCATCAGCGATGAGCTGCGAG  
 ACAAGGTGCGCTTCCCGGCTTTGCTGCGTACCACACCCAGCGCCGACCACCACGTCG  
 AGGCCATGGTGCAGCTGATGCTGCACTTCCGCTGGAAGTGGATCATGTGTGCTGGTGA  
 GCAGCGACACCTATGGCCGCGACAATGGCCAGCTGCTTGGCGAGCGCGTGGCCCGG  
 CGCGACATCTGCATCGCCTTCCAGGAGACGCTGCCACACTGCAGCCCAACCAGAAC  
 ATGACGTCAGAGGAGCGCCAGCGCCTGGTGACCATTGTGGACAAGCTGCAGCAGAGC  
 ACAGCGCGCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT  
 AGGTGCTGCGCCAGAACTTCACGGCGCCGTGTGGATCGCCTCCGAGTCTGGGCCA  
 TCGACCCGGTCTGCACAACCTCACGGAGCTGGGCCACTTGGGCACCTTCCTGGGCA  
 TCACCATCCAGAGCGTGGCCATCCCGGGCTTCAGTGAGTTCGCGAGTGGGGCCAC  
 AGGCTGGGCCCGCCACCCCTCAGCAGGACCAGCCAGAGCTATACCTGCAACCAGGAGT  
 GCGACAACCTGCCTGAACGCCACCTTGTCTTCAACACCATTCTCAGGCTCTCTGGGGA  
 GCGTGTGCTTACAGCGTGTACTCTGCGGTCTATGCTGTGGCCCATGCCCTGCACAG  
 CCTCCTCGGCTGTGACAAAAGCACCTGCACCAAGAGGGTGGTCTACCCCTGGCAGCT  
 GCTTGAGGAGATCTGGAAGGTCAACTTCACTCTCCTGGACCACCAAATCTTCTTCGAC  
 CCGCAAGGGGACGTGGCTCTGCACTTGGAGATTGTCCAGTGGCAATGGGACCGGAGC  
 CAGAATCCCTTCCAGAGCGTCGCCTCCTACTACCCCTGCAGCGACAGCTGAAGAAC  
 ATCCAAGACATCTCCTGGCACACCGTCAACAACACGATCCCTATGTCCATGTGTTCCA  
 AGAGGTGCCAGTCAGGGCAAAGAAGAAGCCTGTGGGCATCCACGTCTGCTGCTTCG  
 AGTGCATCGACTGCCTTCCCGGCACCTTCCCTCAACCACACTGAAGATGAATATGAATG  
 CCAGGCCCTGCCCGAATAACGAGTGGTCCCTACCAGAGTGAGACCTCCTGCTTCAAGCG  
 GCAGCTGGTCTTCTCAGTTGCGTGAGCACACCTCTTGGGTGCTGCTGGCAGCTAAC  
 ACGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTTGGGACTGCTGGCCTGTTTGCCTGGCACCTAGAC  
 ACCCTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG  
 GCAGCAGGTAGTGGCAGCCTCTATGGCTTCTTTGGGGAACCCACAAGGCCTGCGTGC  
 TTGCTACGCCAGGCCCTCTTTGCCCTTGGTTTACCATCTTCTGTCCTGCCTGACAG  
 TTCGCTCATTCCAACATAATCATCATCTTCAAGTTTTCCACCAAGGTACCTACATTCTAC  
 CACGCTGGGTCCAAAACACGGTGGCTGGCCTGTTTGTGATGATCAGCTCAGCGGCC  
 CAGCTGCTTATCTGTCTAACTTGGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG  
 TACCAGCGCTTCCCCATCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG  
 TTCATACTGGCCTTCTCTACAATGGCCTCCTCTCCATCAGTGCCTTTGCCTGCAGCT  
 ACCTGGGTAAGGACTTGGCAGAGAACTACAACGAGGCCAAATGTGTACCTTCAGCC  
 TGCTCTTCAACTTCGTGTCTGGATCGCCTTCTTACCACGGCCAGCGTCTACGACGG  
 CAAGTACCTGCCTGCGGCCAACATGATGGCTGGGCTGAGCAGCCTGAGCAGCGGCTT  
 CGGTGGGTATTTCTGCCTAAGTGCTACGTGATCCTCTGCCGCCAGACCTCAACAGC  
 ACAGAGCACTTCCAGGCCTCCATTCAGGACTACACGAGGCGCTGCGGCTCCACCTGA

**FIGURA 2****Secuencia proteinica de ht1R2-1**

MGPRAKTICSLFLLWVLAEPAENSDFYLPGDYLLGGLFSLHANMKGIVHLNFLQVPM  
CKEYEVKVIQYNLMQAMRFAVEEINNDSSLLPGVLLGYEIVDVCYISNNVQPVLYFLAH  
EDNLLPIQEDYSNYISRVVAVIGPDNSESVMTVANFSLFLLPQITYSAISDELKVRV  
PALLRTPSADHHVEAMVQLMLHFRWNWIIVLVSSDTYGRDNGQLLGERVARRDIA  
FQETLPTLQPNQNTSEERQRLVTIVDKLQQSTARVVVVFSPDLTLYHFFNEVLRQNF  
TGAVWIASESWAIDPVLHNLTELGHGTLGTLGITIQSVPPIPGFSEFREWGPQAGPPPLSRT  
SQSYTCNQECDNCLNATLSFNILRLSGERVVYSVYSAVYAVAHALHSLGCDKSTCTK  
RVVYPWQLLEEIWKVNFLLDHQIFFDPQGDVALHLEIVQWQWDRSQNPFSVASYY  
PLQRQLKNIQDISWHTVNNIPMSMCSKRCQSGQKKKPVGIHVCCFECIDCLPGTFLN  
HTEDEYECQACPNNESYQSETSCFKRQLVFLELREHTSWVLLAANTLLLLLLGTTAG  
LFAWHLDTPVVRSAGGRLCFLMLGSLAAGSGSLYGFGEPTRPACLLRQALFALGFTIF  
LSCLTVRSFQLIIFKFSTKVPTFYHAWVQNHGAGLVMISSAAQLLICLTWLVVWTPLP  
AREYQRFPHLVMLECTETNSLGFILAFLYNGLLSISAFACSYLGKDLPENYNEAKCVTF  
SLLFNFVSWIAFFTTASVYDYGKYLPAANMMAGLSSSLSSGFGGYFLPKCYVILCRPDLNS  
TEHFQASIQDYTRRCGST

**FIGURA 3**  
**Secuencia nucleotídica de hT1R<sub>1</sub>-2**

ATGCTGCTCTGCACGGCTCGCCTGGTCGGCCTGCAGCTTCTCATTTTCCTG  
 CTGCTGGGCTTTGGCTGCCATAGCACGGAGTCTTCTCCTGACTTCACCC  
 TCCCCGGAGATTACCTCCTGGCAGGCTGTCCCTCCTCATTTCTGGCTGT  
 CTGCAGGTGAGGCACAGACCCGAGGTGACCCCTGTGTGACAGGTCTTTGTAG  
 CTTCAATGAGCATGGCTACCACCTCTTCCAGGCTATGCGGCTTGGGGTTG  
 AGGAGATAAACAACTCCACGGCCCTGCTGCCAACATCACCTGGGGTAC  
 CAGCTGTATGATGTGTGTTCTGACTCTGCCAATGTGTATGCCACGCTGAG  
 AGTGCTCTCCCTGCCAGGGCAACACCACATAGAGCTCCAAGGAGACCTTC  
 FCCACTATTCCCCTACGGTGTGGCAGTGATTGGGCTTGACAGCACCAC  
 CGTGCTGCCACCACAGCCGCTGCTGAGCCCTTCTGGTGCCCATGAT  
 TAGCTATGCGCCAGCAGCGAGACGCTCAGCGTGAAGCGGCAGTATCCCT  
 CTTTCTGCGCACCATCCCCAATGACAAGTACCAGGTGGAGACCATGTTG  
 CTGCTGCTGCAGAAGTTCGGGTGGACCTGGATCTCTCTGGTTGGCAGCAG  
 TGACGACTATGGGCAGCTAGGGGTGCAGGCATGGAGAACCAGGCCACTG  
 GTCAGGGGATCTGCATGCTTTCAAGGACATCATGCCCTTCTGCCCCAG  
 GTGGGCGATGAGAGGATGCAGTGCCTCATGCGCCACCTGGCCAGGCCGG  
 GGCCACCGTCTGGTGTGTTTTTCCAGCCGCGAGTTGGCCAGGGTGTTF  
 TCGAGTCCGTGGTGTGACCAACCTGACTGGCAAGGTGTGGGTGCGCTCA  
 GAAGCCTGGGCCCTCTCCAGGCACATCACTGGGGTGGCCGGATCCAGCG  
 CATTGGGATGGTGTGGCGTGGCCATCCAGAAGAGGGCTGCTCCCTGGCC  
 TGAAGGCGTTTGAAGAAGCCTATGCCCGGGCAGACAAGAAGGCCCTTAGG  
 CCTTGCCACAAGGGCTCCTGGTGCAGCAGCAATCAGCTCTGCAGAGAAAG  
 CCAAGCTTTCATGGCACACACGATGCCCAAGCTCAAAGCCTTCTCCATGA  
 GTTCTGCTTACAACGCATACCGGGCTGTGTATGCGGTGGCCCATGGCCTC  
 CACCAGCTCCTGGGCTGTGCCTCTGGAGCTTGTTCAGGGGCGGAGTCTA  
 CCCCTGGCAGCTTTTGGAGCAGATCCACAAGGTGCATTTCTTCTACACA  
 AGGACACTGTGGCGTTTAATGACAACAGAGATCCCCTCAGTAGCTATAAC  
 ATAATTGCCCTGGGACTGGAATGGACCCAAAGTGGACCTTACAGGTCTCGG  
 TTCTCCTCCATGGTCTCCAGTTCAGCTAAACATAAATGAGACCAAAATCC  
 AGTGGCACCGAAAGGACAACCAGGTGCCTAAGTCTGTGTGTTCCAGCGAC  
 TGTCTTGAAGGGCACCAGCGAGTGGTTACGGGTTTCCATCACTGCTGCTT  
 TGAGTGTGTGCCCTGTGGGGCTGGGACCTTCTCAACAAGAGTGACCTCT  
 ACAGATGCCAGCCTTGTGGGAAAGAAGAGTGGGCACCTGAGGGAAGCCAG  
 ACCTGCTTCCCGCGCACTGTGGTGTTCGAGTGGCATGAGGCACCCAC  
 CATCGCTGTGGCCCTGTGGCCGCTGGGCTTCTCAGCACCCCTGGCCA  
 TCCTGGTGATATTCTGGAGGCACTTCCAGACACCCATAGTTCGCTCGGCT  
 GGGGGCCCATGTGCTTCTGATGCTGACACTGCTGCTGGTGGCATAACAT  
 GGTGGTCCCGGTGTACGTGGGGCCGCCAAAGTCTCCACCTGCCTCTGCC  
 GCCAGGCCCTCTTCCCCTCTGCTTCACAATTTGCATCTCCTGTATCGCC  
 GTGCGTTCTTCCAGATCGTCTGGCCTTCAAGATGGCCAGCCGCTTCCC  
 ACGCGCTACAGCTACTGGGTCCGCTACCAGGGGCCCTACGCTCTATGG  
 CATTATACCGGTACTCAAATGGTCAATGTGGTAATTGGCATGCTGGCC  
 ACGGGCCTCAGTCCCACACCCGACTGACCCCGATGACCCCAAGATCAC  
 AATTGTCTCCTGTAACCCCAACTACCGCAACAGCCTGCTGTTCAACACCA  
 GCCTGGACCTGCTGCTCTCAGTGGTGGGTTTCACTTCGCCTACATGGGC  
 AAAGAGCTGCCCAACCACTACAACGAGGCCAAGTTCATCACCCCTCAGCAT  
 GACCTTCTATTTACCTCATCCGTCTCCCTCTGCACCTTCATGTCTGCCT  
 ACAGCGGGGTGCTGGTCAACATCGTGGACCTCTGGTCACTGTGCTCAAC  
 CTCCTGGCCATCAGCCTGGGCTACTTCCGGCCCAAGTGTACATGATCCT  
 CTTCTACCCGGAGCGCAACACGCCCGCTACTTCAACAGCATGATCCAGG  
 GCTACACCATGAGGAGGGACTAG

**FIGURA 4**

**Secuencia proteinica de hT1R1-2**

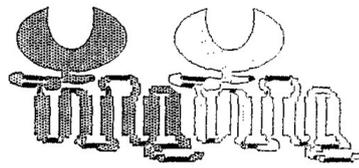
MLLCTARLVGLQLLISCCWAFACHSTESSPDFTLPGDYLLAGLFPPLHSGC  
 LQVRHRPEVTLCDRSCSFNEHGYHLFQAMRLGVVEIINNSTALLPNTLGY  
 QLYDVCSDSANVYATLRVLSLPGQHHEIQGDLLHYSPVLAIVGPDSTN  
 RAATTAALLSPFLVPMISYAASSETLSVKRQYPSFLRTIPNDKYQVETMV  
 LLLQKFGWTWISLVGSSDDYGQLGVQALENQATGQIGICIAFKDIMPFSQA  
 VGDERMQCLMRHLAQAGATVVVVVFSRQLARVFFESVVLTNLTGKVVAS  
 EAWALSRHITGVPGIQRIGMVLGVAIQKRAVPGLKAFEEAYARADKKAPR  
 PCHKGSWCSSNQLCRECQAFMAHTMPKPKAFSSMSSAYNAYRAVYAVAHGL  
 HQLLGCASGACSRGRVYPWQLEQIHKVHFLHDKDTVAFNDNRDPLSSYN  
 IIAWDWNGPKWFTFTVLGSSTWSPVQLNINETKIQWHGKDNQVPKSVCSDD  
 CLEGHQRVVTGFHHCCFECVPCGAGTFLNKSDLYRCQPCGKEEWAPEGSQ  
 TCFPRTVVVFLEWHEAPTI AVALLAALGFLSTLAILVIFWRHFQTPIVRSAG  
 GPMCFLMLTLLLVAYMVVVPVYVGPVKVSTCLCRQALFPLCFTICISCIAV  
 RSFQIVCAFKMASRFPRAYSYWVRYQGPYVSMAFITVLKMWIVVIGMLAT  
 GLSPTTRTDPDDPKITIVSCNPNYRNSLLFNNTSLDLLLSVVGFSFAYMGK  
 ELPTNYNEAKFITLSMTFYFTSSVSLCTFMSAYSGLVLTIVDLLVTVLNL  
 LAISLGYFGPKCYMILFYPERNTPAYFNMSIQGYTMRRD

**Secuencia proteinica de G16gust44**

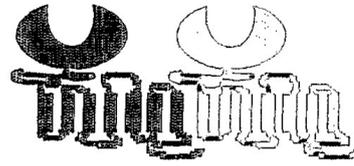
MARSLTWRCCPWCLTEDEKAAARVDQEINRILEQKKQDRGELKLLLLGPGESGKSTFIKQMRI IHGAGYSEEEKGFRPLVYQN  
 IFVSMRAMIEAMERLQIPFSRPESKHASLVMSQDPYKVTTFEKRYAAAMQWLWRDAGIRACYERRREFHLLDSAVYYLSHLERI  
 TEEGYVPTAQDVLRSRMPPTTGINEYCFVQKTNLRIVDVGGQKSERKKWIHCFENVIALIYLASLSEYDQCLEENNQENRMKESL  
 ALFGTILELPPWFKSTSVILFLNKTDILEEKIPTSHLATYFSPFQGPQDAEAAKRFILDMYTRMYTGCVDGPEGSNLKKEKKEIY  
 SHMTCATDTQNVKVFVDAVTDIIKENLKDCGLF

FIGURA 5

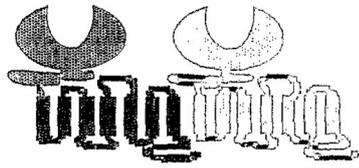
Esquemas de los receptores quiméricos de dulce, umami y dulce-umami



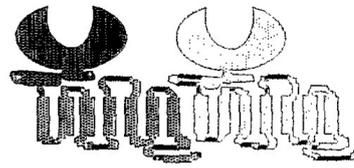
T1R2 T1R3  
Receptor Dulce



T1R1 T1R3  
Receptor Umami



T1R2-T1R1 T1R3  
Híbrido Dulce-Umami



T1R1-T1R2 T1R3  
Híbrido Umami-Dulce

**Figura 6**

**Secuencias de T1R**

ADNc de hT1R1:

```

ATGCTGCTCTGCACGGCTCGCCTGGTTCGGCCTGCAGCTTCTCATTTCTGCTGCTGGGCCTTTGCCTGCCA
TAGCACGGAGTCTTCTCTGACTTACCCTCCCCGGAGATTACCTCCTGGCAGGCCTGTTCCCTCTCCATT
CTGGCTGTCTGCAGGTGAGGCACAGACCCGAGGTGACCCCTGTGTGACAGGTCTTGTAGCTTCAATGAGCAT
GGCTACCACCTCTTCCAGGCTATGCGGCTTGGGGTTGAGGAGATAAACAACTCCACGGCCCTGCTGCCAA
CATCACCTGGGGTACCAGCTGTATGATGTGTGTTCTGACTCTGCCAATGTGTATGCCACGCTGAGAGTGC
TCTCCCTGCCAGGGCAACACCACATAGAGCTCCAAGGAGACCTTCTCCACTATTCCCTACGGTGTGGCA
GTGATTGGGCTGACAGCACCAACCGTGTGCCACCACAGCCGCTGCTGAGCCCTTTCTGGTGCCCAT
GATTAGCTATGCGGCCAGCAGCGAGCGCTCAGCGTGAAGCGGCAGTATCCCTCTTCTGCGCACCATCC
CCAATGACAAGTACCAGTGGAGACCATGGTGTCTGCTGCTGCAGAAAGTTCGGGTGGACTGGATCTCTCTG
GTTGGCAGCAGTACGACTATGGGCAGCTAGGGTGCAGGCACTGGAGAACCAGGCCACTGGTCAAGGGAT
CTGCATTGCTTTCAAGGACATCATGCCCTTCTCTGCCAGTGGGCGATGAGAGGATGAGTGCCTCATGC
GCCACCTGGCCAGGCCGGGGCCACCGTGTGGTGTGTTTTTTCAGCCGGCAGTGGCCAGGGTGTTTTTTC
GAGTCCGTGGTGTGACCAACCTGACTGGCAAGTGTGGTTCGCCTCAGAAGCCTGGGCCCTCTCCAGGCA
CATCATGGGGTGGCCGGGATCCAGCGCATTGGGATGGTGTGGGCGTGGCCATCCAGAAGAGGGCTGTCC
CTGGCCTGAAGGCGTTTGAAGAAGCCTATGCCCGGGCAGACAAGAAGGCCCTAGGCCCTGCCACAAGGGC
TCTGTGTGCAGCAGCAATCAGCTCTGCAGAGAAAGCCAAGCTTTCATGGCACACACGATGCCCAAGCTCAA
AGCCTTCTCCATGAGTTCGCTTACACGCATACCGGGCTGTGTATGCGGTGGCCATGGCCTCCACCAGC
TCCTGGGCTGTGCCTCTGGAGCTTGTCCAGGGCCGAGTCTACCCCTGGCAGCTTTTGGAGCAGATCCAC
AAGGTGCATTTCCCTTCTACACAAGGACACTGTGCGGTTTAAATGACAACAGAGATCCCTCAGTAGCTATAA
CATAATTGCCCTGGGACTGGAATGGACCCAAGTGGACCTTACCGGCTCCTCGGTTCTCCACATGGTCTCCAG
TTCAGCTAAACATAAATGAGACCAAATCCAGTGGCACGGAAAGGACAACCAGGTGCCTAAGTCTGTGTGT
TCCAGCGACTGTCTTGAAGGGCACCAGCGAGTGGTTACGGGTTTCCATCACTGCTGCTTTGAGTGTGTGCC
CTGTGGGGCTGGGACCTTCTCAACAAGAGTGACCTTACAGATGCCAGCCTTGTGGGAAAGAAGAGTGGG
CACCTGAGGGAAGCCAGACCTGCTTCCCGCGCACTGTGGTGTTTTTGGCTTTCGCTGAGCACACCTCTTGG
GTGCTGCTGGCAGCTAACACGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTTGGGACTGCTGGCCTGTTTGCCTGGCACCT
AGACACCCCTGTGGTGGGTGAGGTGAGCAGGGGGCCGCTGTGCTTCTTATGTGGGCTCCTGGCAGCAGGTA
GTGGCAGCCTCTATGGCTTCTTTGGGGAACCCACAAGGCCCTGCGTGTGCTACGCCAGGCCCTCTTTGCC
CTTGGTTTCAACATCTTCTGTCTGCTGCTGACAGTTCGCTCATTCCAATAATCATCATCTTCAAGTTTTTC
CACCAGGTACCTACATTTACACAGCCTGGGTCCAAAACCAGGTGCTGGCCTGTTTGTGATGATCAGCT
CAGCGGCCAGCTGCTTATCTGTCTAACTTGGCTGGTGGTGTGGACCCCACTGCCTGCTAGGGAATAACCAG
CGCTTCCCCATCTGGTGTGCTTGTGAGTGCACAGAGACCAACTCCCTGGGCTTCATACTGGCCTTCTCTTA
CAATGGCCTCCTCTCCATCAGTGCCTTGCCTGCAGCTACCTGGGTAAGGACTTGCCAGAGAACTACAACG
AGGCCAAATGTGTACCTTACGCTGCTTCAACTTGGTGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GTCTACGACGCAAGTACCTGCTGCGGCCAACATGATGGCTGGGCTGAGCAGCCTGAGCAGCGGCTTCCGG
TGGGTATTTTCTGCTAAGTGTCTACGTGATCCTTGCCTGCGCCAGACCTCAACAGCACAGAGCACTTCCAGG
CCTCCATTGAGACTACAGAGGCGCTGCGGCTCCACCTGA
(SEQ ID NO:6)
    
```

**Proteína de hT1R1**

```

MLLCTARLVGLQLLISCCWAFACHSTESSPDFTLPGDYLLAGLFLPHSGCLQVRRHRPEVTLCDRSCSFNEH
GYHLFQAMRLGVVEEINNSTALLPNI TLGYQLYDVCSDSANVYATLRVLSLPGQHHEIQDGLLHYSPTVLA
VIGPDSTNRAATTAALLSPFLVPMISYAASSETLSVKRQYPSFLRTI PNDKYQVETMVLVLLQKFGWTWISL
VGSSDDYDGLGVQALENQATGQIGICIAFKDIMPFSQVGDERMQCLMRHLAQAGATVVVVVSSRQLARVFF
BSVVLNLTGKVVVASEAWALSRIHIGVPGIQRIGMVLGVAIQKRAVPLKAFEEAYARADKKAPRPCHKG
SWCSSNQLCRECQAFMAHTMPKLFKAFMS SAYNAYRAVYAVAHGLHQLLGCASGACSRGRVYYPWQLLEQIH
KVHFLHDKDTAFNDNRDPLSSYNI IAWDWNPKWFTTVLGSSTWSPVQLNINETKIQWHGKDNQVPKSV
SSDCLEGHQRVVTFHHCFFECVPCGAGTFLNKS DLYRCQPCGKEEWAPEGSQTCFPRTVVFLALREHTSW
VLLAANTLLLLLLGLTAGLFAWHLDTPVVRSAGGRLCFLMLGSLAAGSGSLYGFGEPTRPACLLRQALFA
LGFTIFLSCLTVRSFQLIIIFKFKSTKVPTFYHAWQNHGAGL FVMISAAQLLICTLWLVVWVPLPAREYQ
RFPHLVMLECTETNSLGFILAFLYNGLLSI SAFACSYLTKDLPENYNEAKCVTFSLFNFVSWIAFFPTTAS
VYDGKYLPAANMMAGLSSLSGFGGYFLPKCYVILCRPDLNSTEHFQASIQDYTRRCGST
(SEQ ID NO:7)
    
```

ADNc de rT1R1

rT1R1 cDNA

ATGCTCTTCTGGGCTGCTCACCTGCTGCTCAGCCTGCAGTTGGTCTACTGCTGGGCTTTCAGCTGCCAAA  
 GGACAGAGTCTCTCCAGGCTTCAGCCTTCCTGGGGACTTCTCTTGCAGGTCTGTTCTCCCTCCATGGT  
 GACTGTCTGCAGGTGAGACACAGACCTCTGGTGACAAGTTGTGACAGGCCGACAGCTTCAACGGCCATGG  
 CTACCACCTCTTCCAAGCCATGCGGTTCACTGTTGAGGAGATAAACAACCTCCTCGGCCCTGCTTCCAACA  
 TCACCTTGGGGTATGAGCTGTACGACGTGTGCTCAGAATCTGCCAATGTGTATGCCACCCTGAGGGTGCTT  
 GCCCTGCAAGGGCCCCGCCACATAGAGATACAGAAAGACCTTCGCAACCCTCCTCCAAGGTGGTGGCCTT  
 CATCGGGCTGACAACACTGACCACGCTGTCACTACCGCTGCCTTGTGTTGGTCTCTTCTGATGCCCTGG  
 TCAGCTATGAGGCAAGCAGCGTGGTACTCAGTGCCAAGCGCAAGTTCCCGTCTTTCCTTCGTACCCTCCCC  
 AGTGACCGGCACCAGGTGGAGGTGATGGTGCAGCTGCTGCAGAGTTTTGGGTGGGTGTGGATCTCGCTCAT  
 TGGCAGCTACGGTGATTACGGGCAGCTGGGTGTGCAGGCGCTGGAGGAGCTGGCCGTGCCCGGGGCATCT  
 GCGTGCCTTCAAGGACATCGTGCCCTTCTCTGCCCGGGTGGGTGACCCGAGGATGCAGAGCATGATGCAG  
 CATCTGGCTCAGGCCAGACCACCGTGGTGTGGTCTTCTCTAACCGGCACCTGGCTAGAGTGTCTTCAG  
 GTCCGTGGTGTGTCGCCAACCTGACTGGCAAAGTGTGGTTCGCTCAGAAGACTGGGCCATCTCCACGTACA  
 TCACCAGCGTACTGGGATCCAAGGCATTGGGACGGTGTCCGGTGTGGCCGTCCAGCAGAGACAAGTCCCT  
 GGGCTGAAGGAGTTTTGAGGAGTCTTATGTGACGGCTGTAAACAGCTGCTCCAGCGCTTGCCCGAGGGGT  
 CTGGTGCAGCACTAACAGCTGTGCCGGGAGTGCACACGTTACGACTCGTAACATGCCACGCTTGGAG  
 CCTTCTCCATGAGTGCCTACAGAGTGTATGAGGCTGTGTACGCTGTGGCCACGGCCTCCACCAGCTC  
 CTGGGATGTACTTCTGAGATCTGTTCCAGAGGCCAGTCTACCCCTGGCAGCTTCTTCAGCAGATCTACAA  
 GGTGAATTTTCTTCTACATGAGAATACTGTGGCATTGATGACAACGGGGACACTCTAGGTTACTACGACA  
 TCATCGCCTGGGACTGGAATGGACCTGAATGGACCTTTGAGATCATTGGCTCTGCCCTCACTGTCTCCAGTT  
 CATCTGGACATAAATAAGACAAAAATCCAGTGGCACGGGAAGAAACAATCAGGTGCCCTGTGTAGTGTGTAC  
 CACGGACTGTCTGGCAGGGCACACAGGGTGGTGTGGGTTCACCACCTGCTGCTTTGAGTGTGTGCCCT  
 GCGAAGCTGGGACCTTCTCAACATGAGTGAAGTTCACATCTGCCAGCCTTGTGGAAACAGAAGAATGGGCA  
 CCAAGGAGAGCACTACTTGGCTTCCCACGCACGGTGGAGTCTTGGCTTGGCATGAACCCATCTCTTTGGT  
 GCTAATAGCAGCTAACACGCTATTGCTGCTGCTGCTGGTGGGACTGCTGGCCTGTTGCTTGGCATTTTC  
 ACACACCTTAGTGAAGTCACTGAGGTTAGGCTGTGCTTCTCATGCTGGGTTCCCTGGTGGCCGGAAGT  
 TGCAGCTTCTATAGCTTCTTCCGGGAGCCACGGTGCCTGGCTGCTTGTGCTGCTGAGCCCTCTTTTCTCT  
 CGGGTTTGCATCTTCTCTCTGCTGCAATCCGCTCCTTCCAACCTGTCATCATCTTCAAGTTTCTTA  
 CCAAGGTGCCACATCTACCGTACCTGGGCCAAAACCATGGTGCAGGTCTATTTCGTATTGTGAGCTCC  
 ACGGTCCATTTGCTCATCTGTCTCACATGGCTTGTAAATGTGGACCCACGACCCACAGGGAATACCAGCG  
 CTTCCCCATCTGGTGAATCTCGAGTGCACAGAGTCAACTCTGTAGGCTTCCCTGTTGGCTTTCACCCACA  
 ACATTCTCCTCTCCATCAGTACCTTCGTCTGCAGCTACCTGGGTAAGGAACTGCCAGAGAACTATAATGAA  
 GCCAAATGTGTACCTTCAAGCTGCTCCTCAACTTCGTATCCTGGATCGCCTTCTTACCATGGCCAGCAT  
 TTACCAGGGCAGTACCTGCCTGCGGTCAATGTGCTGGCAGGGCTGACCACACTGAGCGCGGGCTTCAAGC  
 GTTACTTCTCCCAAGTGTATGTGATTCTCTGCCGTCCAGAACTCAACAATACAGAACAATTTCAAGGC  
 TCCATCCAGGACTACAGAGGCGCTGCGGCACCTACTGA  
 (SEQ ID NO: 8)

Proteína de rT1R1

MLFWAAHLLLSLQLVYCWAFSCQRTESSPGFSLPGDFLLAGLFSLHGDCLQVRHRPLVTSCTDRPDSFNGHG  
 YHLFQAMRFTVVEINSSALLPNI TLGYELYDVCSESANVYATLRVLALQGRHIEIQKDLRNHSSKVVAF  
 IGPDNTDHA VTTAALLGPFMLPLVSYEASSVLSAKRKFPSFLRTPVSDRHRQVEVMVQLLQSFQVWVWISLI  
 GSYGDYQGLGVQALEELAVPRGICVAFKDIVPFSARVGDPRMQSMMQHLAQARTTVVVVFSNRHLARVFFR  
 SVVLANLTGKVVVASEDWAI STYITSVTGIQIGITVLGVAVQQRQVPGLKEFEESYVRAVTAAPSACPEGS  
 WCSTNQLCRECHTFTTRNMPTLGAFMSAAAYRVYEA VYAVAHGLHQLLGTSEICSRGPVYPWQLLQIYK  
 VNFLLHENTVAFDDNGDTLGYIDI IAWDWNPEWTFEIGSASLSPVHLDINKTKIQWHGKNNQVPVSVCT  
 TDCLAGHHRVVVGGSHHCCFECVPC EAGTFLNMSELHICQPCGTEWAPKESTTCFPRTVEFLAWHEPISLV  
 LIAANTLLLLLVGTAGLFAWHFHTPVVRSAGGRLCFLMLGSLVAGSCSFYSFFGEPTVPACLLRQPLFSL  
 GFALFSLCLTIRSFQLVIFKFKSTKVPFTFYRTWAQNHGAGL FVIVSSTVHLLI CLTWLVMTWTPRPTREYQR  
 FPHLVILECTEVNSVGFLLAFTHNILLSISTFVCSYLKELPENYNEAKCVTFSLLLNFVSWIAFFFTMASI  
 YQGSYLPVAVNLVAGLTTLSGGFSGYFLPKCYVILCRPELNTEHFQASIQDYTRRCGTT  
 (SEQ ID NO: 9)

ADNc de hT1R2

ATGGGGCCAGGGCAAAGACCATCTGCTCCCTGTTCTTCTCCTATGGGTCTGGCTGAGCCGGCTGAGAA  
 CTCGGACTTCTACCTGCTGGGGATTACCTCCTGGGTGGCCTTCTCTCCTCCATGCCAACATGAAGGGCA

TTGTTACCTTAACCTTCTGCGAGGTGCCCATGTGCAAGGAGTATGAAGTGAAGGTGATAGGCTACAACCTC  
 ATGCAGGCCATGCGCTTCGCGGTGGAGGAGATCAACAATGACAGCAGCCTGCTGCCCTGGTGTGCTGCTGGG  
 CTATGAGATCGTGGATGTGTGCTACATCTCCAACAATGTCCAGCCGGTGTCTACTTCTTGGCACACGAGG  
 ACAACCTCCTTCCCATCCAAGAGGACTACAGTAACTACATTTCCCGTGTGGTGGCTGTCATTGGCCCTGAC  
 AACTCCGAGTCTGTGACTGTGGCCAACTTCTCTCCCTATTTCTCCTTCCACAGATCACCTACAGCGC  
 CATCAGCGATGAGCTGCGAGACAAGGTGCGCTTCCCGGCTTTGCTGCGTACCACACCCAGCGCCGACCACC  
 ACGTCGAGGCCATGGTGCAGCTGATGCTGCACTTCCCGTGGAACTGGATCATTGTGCTGGTGGAGCAGCGAC  
 ACCTATGGCCCGGACAATGGCCAGCTGCTTGGCGAGCGCTGGCCCGGCGGACATCTGCATCGCCTTCCA  
 GGAGACGCTGCCCACACTGCAGCCCAACCAGAACATGACGTCAGAGGAGCGCCAGCGCCTGGTGCACATTG  
 TGGACAAGCTGCAGCAGAGCACAGCGCGCTGCTGGTGTGCTTCTCGCCCGACCTGACCCTGTACCACTTC  
 TCAATGAGGTGCTGCCGAGAACTTACGGGCGCGGTGTGGATCGCCTCCGAGTCTTGGGCCATCGACCC  
 GGTCTGCACAACCTCAGCGAGCTGGGCCACTTGGGCACCTTCCCTGGGCATCACCATCCAGAGCCTGCCCA  
 TCCCGGGCTTCACTGAGTTCGCGAGTGGGGCCACAGGCTGGGCGGCCACCCCTCAGCAGGACCAGCCAG  
 AGCTATACTGCAACCAGGAGTGCACAACCTGCTGAACGCCACCTTGTCTTCAACACCATTCTCAGGCT  
 CTCTGGGGAGCGTGTCTTACAGCGTGTACTCTGCGGTCTATGCTGTGGCCCATGCCTGCACAGCCTCC  
 TCGGCTGTGACAAAAGCACCTGCACCAAGAGGGTGGTCTACCCCTGGCAGCTGCTTGAGGAGATCTGGAAG  
 GTCAACTTCACTCTCCTGGACCACCAATCTTCTTCGACCCGCAAGGGGACGTGGCTCTGCACTTGGAGAT  
 TGTCCAGTGGCAATGGGACCGGAGCCAGAATCCCTTCCAGAGCGTCCCTCTACTACCCCTGCAGCGAC  
 AGCTGAAGAACATCCAAGACATCTCCTGGCACACCGTCAACAACACGATCCCTATGTCCATGTGTTCCAAG  
 AGGTGCCAGTCAGGGCAAAGAAGAGCCTGTGGGCATCCAGTCTGCTTCCAGTGCATCGACTGCCT  
 TCCCGGCACCTTCTCAACCACACTGAAGATGAATATGAATGCCAGGCCTGCCGAATAACGAGTGGTCT  
 ACCAGAGTGAACCTCCTGCTTCAAGCGGCAGCTGGTCTTCTGGAATGGCATGAGGCACCCACCATCGCT  
 GTGGCCCTGCTGGCCGCCCTGGGCTTCTCAGCACCCCTGGCCATCCTGGTGTATTTCTGGAGGCACTTCCA  
 GACACCCATAGTTCGCTCGGCTGGGGGCCCATGTGCTTCTGATGCTGACACTGCTGCTGGTGGCATAACA  
 TGGTGGTCCCGGTGTACGTGGGGCCGCCAAGGTCTCCACCTGCCTCTGCCGCCAGGCCCTCTTCCCTC  
 TGCTTCAAAATTTGCATCTCCTGTATCGCCGTGCGTCTTTCCAGATCGTCTGCGCCTTCAAGATGGCCAG  
 CCGCTTCCACCGCCTTACAGCTACTGGGTCCGTACCAGGGGCCCTACGTCTCTATGGCATTATCACGG  
 TACTCAAAATGGTCATTGTGGTAATGGCATGCTGGCCACGGGCTCAGTCCACCACCCGTACTGACCCC  
 GATGACCCCAAGATCACAAATGTCTCCTGTAACCCCAACTACCGCAACAGCCTGCTGTTCAACACCAGCCT  
 GGACCTGCTGCTCTCAGTGGTGGTTCAGCTTCCGCTTACATGGGCAAAGAGCTGCCACCAACTACAACG  
 AGGCCAAGTTCATCACCTCAGCATGACCTTCTATTTACCTCATCCGTCTCCCTCTGCACCTTATGTCT  
 GCCTACAGCGGGTGTGGTCAACATCGTGGACCTCTTGGTCACTGTGCTCAACCTCTGGCCATCAGCCT  
 GGGCTACTTCCGGCCCCAAGTGTACATGATCTTCTTACCAGGAGCGCAACACGCCCGCTACTTCAACA  
 GCATGATCCAGGGCTACACCATGAGGAGGGACTAG  
 (SEQ ID NO:10)

Proteína de hT1R2

MGPRAKTICSLFFLLWVLAEPANSDFYLPDYLGLLFLSLHANMKGIVHLNFLQVPMCKEYEVKVI GYNL  
 MQAMRFAVEEINNDSSLLPGVLLGYEIVDVCYISNNVQPVLYFLAHEDNLLPIQEDYSNYISRVVAVIGPD  
 NSESVMTVANFLSLFLLPQITYSAISDELRLDKVRFALLRTPSADHHVEAMVQLMLHFRWNWIIVLVSSD  
 TYGRDNGQLLGERVARDICIAFQETLPTLQPNQMTSEERQLVTIIVDKLQQSTARVVVVFSPDLTYLHF  
 FNEVLRQNFTEGAVWIASWSAIDPVLHNLTELGHGLTFLGITIIVQVPIPGFSEFREWGPQAGPPPLSRTSQ  
 SYTCNQECDNCLNATLSFNITLRLSGERVVYSVAVYAVAHALHSLGCDKSTCTKRVPVYVWQLEBEIWK  
 VNFTLLDHQIFDFPDQGDVALHLEIVQWQDRSQNPQSVASYPLQRQLKNIQDISWHTVNNTIIPMSMCSK  
 RCQSGQKKKPVGIHVCCFECIDCLPGTFLNHTEDBYECQACPNNEWSYQSETSCFKRQLVFLWHEAPTIA  
 VALLAALGFSLTALILVI FWRHFQTPIVRSAGGPMCFMLMLTLLLVAYMVVVPVYVGPVKVSTCLCRQALFPL  
 CFTTICISCIAVRSFQIVCAFKMASRFPRAYSYWVRYQGPVYSMAFITVLKMIIVVIGMLATGLSPTRTDP  
 DDPKITIVSCNPNYRNSLLENTSLDLLLLSVGFSFAYMGKELPTNYNEAKFITLSMTFYFTSSVSLCTFMS  
 AYSGLVTTIVDLLVTVLNLALISLGYFPGPKCYMILFYPERNTPAYFNSMIQGYTMRRD  
 (SEQ ID NO:11)

ADNc de rT1R2

ATGGGTCCCAGGCAAGGACACTCTGCTTGTCTCTCCTGCTGCATGTTCTGCCTAAGCCAGGCAAGCT  
 GGTAGAGAACTCTGACTTCCACCTGGCCGGGACTACCTCCTGGGTGGCCTCTTTACCTCCATGCCAACG  
 TGAAGAGCATCTCCACCTCAGCTACCTGCAGGTGCCCAAGTGAATGAGTTCACCATGAAGGTGTGGGC  
 TACAACCTCATGCAGGCCATGCGTTTCCGCTGTGGAGGAGATCAACAACCTGTAGCTCCCTGCTACCCGGCGT  
 GCTGCTCGGCTACGAGATGGTGGATGTCTGTACTCTCCAACAATATCCACCTGGGCTCTACTTCTCTG

CACAGGACGACGACCTCTGCCCATCTCAAAGACTACAGCCAGTACATGCCCCACGTGGTGGCTGTCATT  
 GGCCCCGACAACTCTGAGTCCGCCATTACCGTGTCCAACATTCTCTCTCATTTCCTCATCCCACAGATCAC  
 ATACAGCGCCATCTCCGACAAGCTGCGGGACAAGCGGCATTCCTTAGCATGCTACGCACAGTGCCAGCG  
 CCACCCACCACATCGAGGCCATGGTGCAGCTGATGGTTCACTTCCAATGGAAGTGGATTGTGGTCTGGTG  
 AGCGACGACGATTACGGCCGCGAGAACAGCCACCTGTTGAGCCAGCGTCTGACCAAAACGAGCGACATCTG  
 CATTGCCTTCCAGGAGTCTTGCCCATACCTGAGTCCAGCCAGGTCATGAGGTCCGAGGAGCAGAGACAAC  
 TGGACAACATCCTGGACAAGCTGCGGCGGACCTCGGCGCGCGTCTGGTGGTGTCTCGCCGAGCTGAGC  
 CTGTATAGCTTCTTTACGAGGTGCTCCGCTGGAACCTCACGGGTTTTGTGTGGATCGCCTCTGAGTCTG  
 GGCTATCGACCCAGTCTGCATAACCTCACGGAGCTGCGCCACACGGTACTTTTTCTGGGCGTCACCATCC  
 AGAGGGTGTCCATCCTGGCTTCAGTCAGTCCGAGTGCGCCGTGACAAGCCAGGGTATCCCGTGCCTAAC  
 ACGACCAACCTGCGGACGACCTGCAACCAGGACTGTGACGCTGCTGAACACCACCAAGTCCCTCAACAA  
 CATCCTTATACTTTCCGGGGAGCGGTGGTCTACAGCGTGTACTCGGCAGTTTACGCGGTGGCCCATGCC  
 TCCACAGACTCCTCGGCTGTAACCGGGTCCGCTGCACCAAGCAAAGGTCTACCCGTGGCAGCTACTCAGG  
 GAGATCTGGCAGCTCAACTTCACGCTCCTGGGTAACCGGCTCTTCTTTGACCAACAAGGGGACATGCCGAT  
 GCTCTTGGACATCATCCAGTGGCAGTGGGACCTGAGCCAGAATCCCTTCAAAGCATCGCCTCCTATTCTC  
 CCACCAGCAAGAGGCTAACCTACATTAACAATGTGTCTTGGTACACCCCAACAACACGGTCCCTGTCTCC  
 ATGTGTTCCAAGAGCTGCCAGCCAGGGCAAATGAAAAAGTCTGTGGGCTCCACCCTGTGTGCTTCGAGTG  
 CTTGGATTGTATGCCAGGCACCTACCTCAACCGCTCAGCAGATGAGTTTAACTGTCTGTCTGCCCCGGTT  
 CCATGTGGTCTTACAAGAACGACATCACTTGTCTCCAGCGCGGCTACTTCTTGGAGTGGCAGGAAGTG  
 CCCACCATCGTGGTGGCCATACTGGCTGCCCTGGGCTTCTTCAGTACACTGGCCATTTCTTTTCACTTCTG  
 GAGACATTTCCAGACACCCATGGTGCCTCGGCGGTGGCCCATGTGCTTCTGATGCTCGTGGCCCTGC  
 TGCTGGCGTPTGGGATGGTGCCCGTGTATGTGGGCCCCCACGGTCTTCTCATGCTTCTGCCGACAGGCT  
 TTCTTACCCTGTCTTCTCCATCTGCCTATCTGCATCACCGTGCCTCCTTCCAGATCGTGTGTGTCTT  
 CAAGATGGCCAGACGCTGCCAAGTGCCTACAGTTTTTGGATGCGTTACCACGGGCCCTATGTCTTCGTGG  
 CCTTCATCAGGCCATCAAGGTGGCCCTGGTGGTGGGCAACATGCTGGCCACCACCTCAACCCCATTTGGC  
 CGGACCGACCCGGATGACCCCAACATCATGATCCTCTCGTGCCACCCTAACTACCGCAACGGGCTACTGTT  
 CAACACCAGCATGGACTTGTCTGTCTGTGCTGGGTTTTAGCTTCGCTTACATGGGCAAGGAGCTGCCCA  
 CCAACTACAACGAAGCAAGTTCATCACTCTCAGCATGACCTTCTCCTTACCTCCTCCATCTCCTCTGC  
 ACCTTCATGTCTGTGCACGACGGCTGTGGTACCATCATGGACCTCCTGGTCACTGTGCTCAACTTCTCT  
 GGCCATCGGCTTGGGATACTTTGGCCCCAAGTGTACATGATCCTTTTTTACCCGGAGCGCAACACCTCAG  
 CCTATTTCAATAGCATGATCCAGGGCTACACCATGAGGAAGAGC  
 (SEQ ID NO:12)

Proteina de rT1R2

MGPQARTLCLLSLLHLVLPKPGKLVENSDFHLAGDYLLGGLFTLHANVKSISHLSYLQVPKNEFTMKVLG  
 YNLMQAMRFAVEEINNCSLLPGLVLLGYEMVDVCYLSNNIHPGLYFLAQDDLLPILKDYSSQYMPHVAVI  
 GPDNSESATVSNILSHFLIPQITYSAISDKLRDKRHFPSMLRTPVPSATHHI EAMVQLMVHFQWNWVVLV  
 SDDYGRENSHLLSQRLLTKTSDI CIAFQEVLP IPESSQVMRSEEQRQLDNILDKLRRTSARVVVFPSELS  
 LYSFFHEVLRWNFTGFVWIASESWAIDPVLHNLTELRTHTGTF LGVTIQRVSI PGFSQFRVRRDKPGYPV  
 PNTNLRTTCNQDCDACLNTTKSFNNILLSGERVVYSVYSAVAVAHALHRLLG CNRV RCTKQKVYPWQLLR  
 EIWHVNFLLGNRLFDDQQDMPMLLDIIQWQWDLSONPFQSIASYSPTSKRLTYINNVSWYTPNNTVPVS  
 MCSKSCQPGQMKKSVGLHPCCFECLDCMPGTYLNRSADEFNCLSCPMSWMSYKNDITCFQRRTFLEWHEV  
 PTIVVAILAALGFSTLAILFI FWRHFQTPMVRSAAGP MCFMLMLVPLLLAFGMVPVYVGPPTVFSCFCRQA  
 FFTVCFSICLSCITVRSFQIVCVFKMARRLPSAYSFWMRYHGPYVVFVAFITAIKVALVVGNNMLATTINPIG  
 RTDPPDNIMILSCHPNYRNGLLFNTSMDLLLSVLGFSFAYMGKELPTNYNEAKFITLSMTFSFTSSISLC  
 TFMSVHDGVLVTIMDLLVTLNFLAIGLGYFGPKCYMILFYPERNTSAYFNMSMIQGYTMRKS  
 (SEQ ID NO:13)

ADNc de hT1R3

ATGCTGGGCCCTGCTGTCTGGCCCTCAGCCTCTGGGCTCTCTGCACCCTGGGACGGGGGCCCATTTGTG  
 CCTGTACAGCAACTTAGGATGAAGGGGACTACGTGCTGGGGGGCTGTCCCCCTGGGCGAGGCCGAGG  
 AGGCTGGCTCCCGCAGCCGACACGCCCCAGCAGCCCTGTGTGCACCAGGTTCTCCTCAAACGGCTGCTC  
 TGGGCACCTGGCCATGAAAATGGCCGTGGAGGAGATCAACAACAAGTCGGATCTGCTGCCCGGGCTGCGCCT  
 GGGCTACGACCTCTTTGATACGTGCTCGAGCCTGTGGTGGCCATGAAGCCAGCCTCATGTTCTTGGCCA  
 AGGCAGGCAGCCGCGACATCGCCGCTACTGCAACTACACGCAGTACCAGCCCGTGTGCTGGCTGTGCATC  
 GGGCCCCACTCGTCAGAGCTCGCCATGGTACCAGGCAAGTCTTACGCTTCTTCTCATGCCCCAggt cag  
 CTACGGTGTAGCATGAGCTGCTGAGCGCCCGGAGACCTTCCCCTCTTCTTCCGACCGTGCACCGC

ACCGTGTGCAGCTGACGGCCGCCGCGGAGCTGCTGCAGGAGTTGCGCTGGAACTGGGTGGCCGCCCTGGGG  
 AGCGACGACGAGTACGGCCGGCAGGGCCTGAGCATCTTCTCGGCCCTGGCCGCGGCACGCGGCATCTGCAT  
 CGCGCACGAGGGCCTGGTGCCTGCCCCGTGCCGATGACTCGCGGCTGGGGAAGGTGCAGGACGTCTGTC  
 ACCAGGTGAACCAGAGCAGCGTGCAGGTGGTGTCTGCTGTTTCGCTCCGTGCACGCCGCCACGCCCTCTTC  
 AACTACAGCATCAGCAGCAGGCTCTCGCCAAAGGTGTGGGTGGCCAGCAGGCTGGCTGACCTCTGACCT  
 GGTCATGGGGTGCCTGGCATGGCCAGATGGGCACGGTGTCTGGCTTCTTCAGAGGGGTGCCAGCTGC  
 ACGAGTTCCCCAGTACGTGAAGACGCACCTGGCCCTGGCCACCGACCCGGCCTTCTGCTCTGCCCTGGGC  
 GAGAGGGAGCAGGGTCTGGAGGAGGACGTGGTGGGCCAGCGCTGCCCGCAGTGTGACTGCATCACGCTGCA  
 GAACGTGAGCGCAGGGCTAAATCACACCAGACGTTCTCTGTCTACGCAGCTGTGTATAGCTGGCCAGG  
 CCCTGCACAACACTCTTCACTGCAACGCCTCAGGCTGCCCGCGCAGGACCCCGTGAAGCCCTGGCAGCTC  
 CTGGAGAACATGTACAACCTGACCTTCCACGTGGGCGGGCTGCCGCTGCGGTTTCGACAGCAGCGGAAACGT  
 GGACATGGAGTACGACTGAAGCTGTGGGTGTGGCAGGGCTCAGTGCCAGGCTCCACGACGTGGGCAGGT  
 TCAACGGCAGCCTCAGGACAGAGCGCTGAAGATCCGCTGGCACACGTCTGACAACCAGAAGCCCGTGTCC  
 CGGTGCTCGCGGCAGTCCAGGAGGGCCAGGTGCGCCGGTCAAGGGGTTCCACTCTGCTGCTACGACTG  
 TGTGGACTCGAGGCGGGCAGCTACCGGCAAAACCCAGACGACATCGCCTGCACCTTTTGTGGCCAGGATG  
 AGTGGTCCCCGGAGCGAAGCACACGCTGCTTCCGCGCAGGTCTCGGTTCCTGGCATGGGGCGAGCCGGCT  
 GTGCTGCTGCTCCTGCTGCTGAGCCTGGCGCTGGCCCTTGTGCTGGCTGCTTTGGGGCTGTTCTGTTCA  
 CCATCGGGACAGCCACTGGTTCAGGCCTCGGGGGGGCCCTGGCCTGCTTTGGCCTGGTGTGCCCTGGGCC  
 TGGTCTGCCCTCAGCGTCTCTGTTCCCTGGCCAGCCAGCCCTGCCGATGCTGGCCAGCAGCCCTTG  
 TCCCACCTCCCGCTCAGGGCTGCCTGAGCACACTCTTCTGTCAGGCGCGGAGATCTTCGTGGAGTCAGA  
 ACTGCTCTGAGCTGGGCAGACCGGCTGAGTGGCTGCCTGCGGGGGCCCTGGGCCTGGTGGTGGTGTGTC  
 TGGCCATGCTGGTGGAGGTGCACTGTGACCTGGTACCCTGGTGGCCCTTCCCGCCGAGGTGGTGAACGAC  
 TGGCACATGCTGCCACGGAGGCGCTGGTGCCTGCCGCACACGCTCCTGGGTGAGCTTCGGCCTAGCGCA  
 CGCCACCAATGCCACGCTGGCCTTTCTGCTTCTGGGCATTTCTGGTGGGAGCCAGCCGGGCGCT  
 ACAACCGTGCCTGGCTCACCTTGGCCATGCTGGCCTACTTCATCACCTGGGTCTCCTTTGTGCCCTC  
 CTGGCCAATGTGACAGTGGTCTCAGGCCCCGCTGCAGATGGGCGCCCTCCTGCTCTGTGCTCCTGGGCAT  
 CCTGGCTGCCTTCCACTGCCCAGGTGTTACCTGCTCATGCGGCAGCCAGGGCTCAACACCCCGAGTTCT  
 CCTGGGAGGGGGCCTGGGGATGCCAACGGCCAGAATGACGGGAACACAGGAAATCAGGGGAAACATGAG  
 TGA

(SEQ ID NO:14)

Proteína de hT1R3

MLGPAVLGLSLWALLHPGTGAPLCLSQQLRMKGDYVLGGLFPLGEAEEAGLRSRTRPSSPVCTRFSNGLL  
 WALAMKMAVEEINNKSDLLPGLRLGYDLFDTCSEPVVAMKPSLMFLAKAGSRDIAAYCNYTQYQPRVLAVI  
 GPHSSELAMVTKFFSFFLMPQVSYGASMELLSARETFPSFRTVPSDRVQLTAAAEELLQEFGWNVVAALG  
 SDDEYGRQGLSIFSAALAAARGICIAHEGLVPLPRADDSRLGKVDVHLQVNVQSSVQVLLFASVHAHALF  
 NYSISSRLSPKVVVASEAWLTSDLVMGLPGMAQMGTVLGFQRGAQLHEFPQYVKTHLALATDPAFCSALG  
 EREQGLEEDVVGQRCPQCDCTTLQNVSAAGLNHHQTFVSYAAVYSVAQALHNTLQCNASGCPAQDPVKPQL  
 LENMYNLTFFHVGLPLRFDSSGNVMEYDLKLWVWQGSVPRLHDVGRFNGSLRTERLKI RWHTSDNQKPV  
 RCSRQCQEQVRRVKGPHSCCYDCVDCEAGSYRQNPDDIACFTCGQDEWSPERSTRCFRRRSRFLAWGEP  
 VLLLLLLLLLALGLVLAALGLFVHHRDSPLVQASGGPLACFGLVCLGLVCLSVLLFPQPSPARCLAQQPL  
 SHLPLTGLSTLFLQAAEIFVESELPLSWADRLSGCLRGPWAWLVLLAMLVEVALCTWYLVAFPEVVTD  
 WHMLPTEALVHCRTRSWVSFGLAHATNATLAFCLFLGTFLVRSQPGRYNRARGLTFAMLAYFIITWVSFVPL  
 LANVQVVLRPVQMGALLLVLGLIAAFHLPRCYLLMRQPLNTPFFLGGGPGDAQGQNDGNTGNQKHE

(SEQ ID NO:15)

ADNc de rT1R3

ATGCCGGGTTTGGCTATCTTGGCCCTCAGTCTGGCTGCTTCTCTGGAGCTTGGGATGGGGTCTCTTTGTG  
 TCTGTACAGCAATTCAGGCACAAGGGGACTATATATTGGGTGGACTATTTCCCTGGGCACAACCTGAGG  
 AGGCCACTCTCAACCAGAGAAACACAGCCCAACGGCATCCTATGTACCAGGTTCTCGCCCTTGGTTTGTTC  
 CTGGCCATGGCTATGAAGATGGCTGTAGAGGAGATCAACAATGGATCTGCCTTGCTCCTGGGCTGCGACT  
 GGGCTATGACTGTTTGCACATGCTCAGAGCCAGTGGTACCATGAAGCCAGCCTCATGTTTCATGGCCA  
 AGGTGGGAAGTCAAAGCATGCTGCCTACTGCAACTACACACAGTACCAACCCCGTGTGCTGGCTGTCAAT  
 GGTCCCACTCATCAGAGCTTGCCTCATTACAGGCAAGTTCTCAGCTTCTTCTCATGCCACAGGTCAG  
 CTATAGTGCCAGCATGGATCGGCTAAGTGACCGGAAACATTTCCATCCTTCTTCCGCACAGTGCCAGTG  
 ACCGGGTGCAGCTGCAGGCCGTTGTGACACTGTTGCAGAAATTTAGCTGGAACTGGGTGGCTGCCCTTAGGT  
 AGTGATGATGACTATGGCCGGGAAGGTCTGAGCATCTTTTCTGGTCTGGCCAACTCACGAGGTATCTGCAT

TGCACACGAGGGCCTGGTGCCACAACATGACACTAGTGGCCAAACAATTGGGCAAGGTGGTGGATGTGCTAC  
 GCCAAGTGAACCAAAGCAAAGTACAGGTGGTGGTGTGTTTGCATCTGCCCGTGTCTACTCCCTTTTT  
 AGCTACAGCATCCTTCATGACCTCTCACCCAAGGTATGGGTGGCCAGTGAAGTCTGGCTGACCTCTGACCT  
 GGTTCATGACACTTCCCAATATTGCCCGTGTGGGCACTGTTCTTGGGTTTCTGCAAGCGCGGTGCCCTACTGC  
 CTGAATTTTCCATTATGTGGAGACTCGCCTTGCCCTAGCTGTGACCCAAACATTCTGTGCCTCCCTGAAA  
 GCTGAGTTGGATCTGGAGGAGCGGTGATGGGGCCACGCTGTTCAACAATGTGACTACATCATGCTACAGAA  
 CCTGTTCATCTGGGCTGATGAGAACCTATCAGCTGGGCAGTTGCACCACCAAATATTGCAACCTATGCAG  
 CTGTGTACAGTGTGGCTCAGGCCCTTCAACAACCCCTGCAGTGAATGTCTCACATTGCCACACATCAGAG  
 CCTGTTCAACCTGGCAGCTCCTGGAGAACATGTACAATATGAGTTTCCGTGCTCGAGACTTGACACTGCA  
 GTTTGATGCCAAAGGGAGTGTAGACATGGAATATGACCTGAAGATGTGGGTGTGGCAGAGCCCTACACCTG  
 TACTACATACTGTAGGCACCTTCAACGGCACCTTCAGCTGCAGCACTCGAAAATGTATTGGCCAGGCAAC  
 CAGGTGCCAGTCTCCAGTGTCTCCGGCAGTGCAAAGATGGCCAGGTGCCAGAGTAAAGGGCTTTCATTC  
 CTGCTGCTATGACTGTGTGGACTGCAAGGCAGGGAGCTACCGGAAGCATCCAGATGACTTCACCTGTACTC  
 CATGTGGCAAGGATCAGTGGTCCCCAGAAAAAGCACAACTGCTTACCTCGCAGGCCCAAGTTTCTGGCT  
 TGGGGGGAGCCAGCTGTGCTGTCACTTCTCCTGCTGCTTTGCTGCTGGGCTGCACTGGCTGCCCT  
 GGGGCTCTTTGTCCACTACTGGGACAGCCCTCTGTTTCAGGCCTCAGGTGGGTCACTGTTCTGCTTTGGCC  
 TGATCTGCCTAGGCCTCTTCTGCCTCAGTGTCTCTGTTCCAGGACGACCACGCTCTGCCAGCTGCCTT  
 GCCAACACCAATGGCTCACCTCCCTCTCACAGGCTGCCTGAGCACACTCTTCTGCAAGCAGCCGAGAT  
 CTTTGTGGAGTCTGAGCTGCCACTGAGTTGGGCAACTGGCTCTGCAGCTACCTTCGGGGCCCCCTGGGCTT  
 GGCTGGTGTACTGTGCGCACTCTTGTGGAGGCTGCACATATGTGCCTGGTACTTGATGGCTTTCCCTCCA  
 GAGGTGGTACAGATTTGGCAGGTGTGCCCACGGAGGTAAGTGAACACTGCCGCATGCGTTCCTGGGTGAG  
 CCTGGGCTTGGTGCACATACCAATGCAGTGTAGCTTTCTCTGCTTTCTGGGCACCTTCTGCTGACAG  
 GCCAGCCTGGTGTCTATAACCGTGCCTGCGGCTCACCTTCGCCATGCTAGCTTATTTTCATCATCTGGGTC  
 TCTTTTGTGCCCTCTGGCTAATGTGCAGGTGGCCTACCAGCCAGCTGTGCAGATGGGTGCTATCTTATT  
 CTGTGCCCTGGGCATCCTGGCCACCTTCCACCTGCCAAATGCTATGTACTTCTGTGGCTGCCAGAGCTCA  
 ACACCCAGGAGTTCTTCTGGGAAGGAGCCCCAAGGAAGCATCAGATGGGAATAGTGGTAGTAGTGAGGCA  
 ACTCGGGGACACAGTGAATGA  
 (SEQ ID NO:16)

Proteina de rT1R3

MPGLAILGLSLAFLLELGMSSSLCLSQQFKAQGDYILGGLFPLGTTTEATLNQRTQPNILCTRFSPLGLF  
 LAMAMKMAVEEINNGSALLPGLRLGYDLFDTCSEPVVTMKPSLMFMAKVGSSQSIAYCNYTQYQPRVLAVI  
 GPHSSELALITGKFFSFFLMPQVSYASMDRLSDRETFPSFRTVPSDRVQLQAVVTLQNFSWNWVAALG  
 SDDDYGREGLSIFSGLANSRGICIAHEGLVPQHDTSGQQLGKVVVDVLRQVNSKVQVVVLFASARAVYSLF  
 SYSILHDLSLSPKVVAVESWLTSDLVMTLPNIARVGTVLGFLQRGALLPEFSHYVETRLALAADPTFCASLK  
 AELDLEERVMPRCSCQDYIMLQNLSSGLMQNLSAGQLHHQIFATYAAYVSVQAALHNTLQCNVSHCHTSE  
 PVQPWQLLENMYNMSFRARDLTLQFDAGKSVDMYDLKMWVWQSPTPVLHTVGTFNGLTLQLQHSKMYWPGN  
 QVPSQCSRQCKDQVRRVKGFSHCYDCVDCAGSYRKHPPDFTCTPCGKDQWSPEKSTTCLPRRPKFLA  
 WGEPAVLSLLLLLCLVLGLTLAALGLFVHYWDSPLVQASGGSLLFCFLICLGLFCLSVLLFPGRPRASCL  
 AQQPMAHLPLTGCLSTLFLQAAEIFVESELPLSWANWLCSYLRGPWAWLVLLATLVEAALCAWYLMAFP  
 EVVTDWQVLPTEVLEHCRMRSWVSLGLVHITNAVLAFLCFLGTFVLSQSPGRYNRARGLTFAMLAYFI IWW  
 SFVPLLANVQVAYQPAVQMGAILFCALGILATFHLPKCYVLLWLPELNTQEFFLGRSPKEASDNGSGSSEA  
 TRGHSE  
 (SEQ ID NO:17)

El receptor dulce-umami responde a la mayoría de los edulcorantes excepto al ciclamato

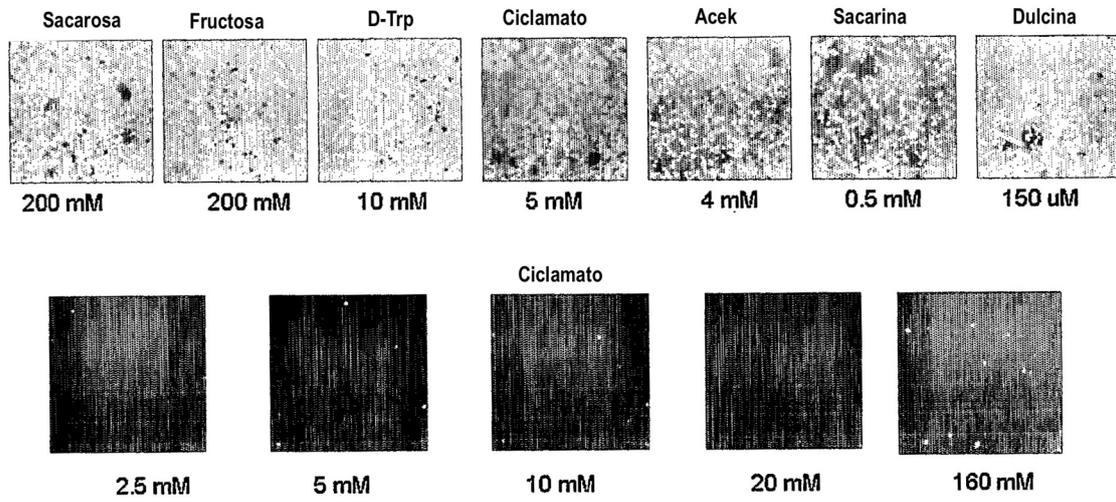


FIGURA 7

FIGURA 8

Ligandos	h2/h3	h2-h1/h3
Aspartamo	0,5 mM	0,97 mM
D-Tpr	1 mM	3,2 mM
Sacarosa	20 mM	>50 mM
Fructosa	20 mM	>50 mM
Ciclamato	0,5 mM	N/E

El ciclamato potencia la respuesta a aspartamo en la línea estable hT1R2-1/h3

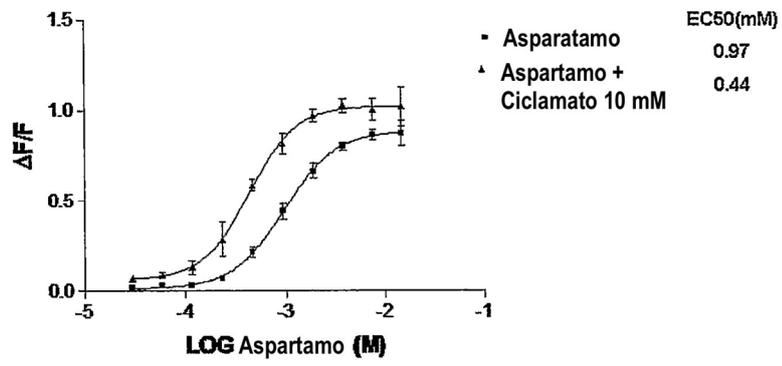


FIGURA 9

El ciclamato potencia la actividad de D-triptófano

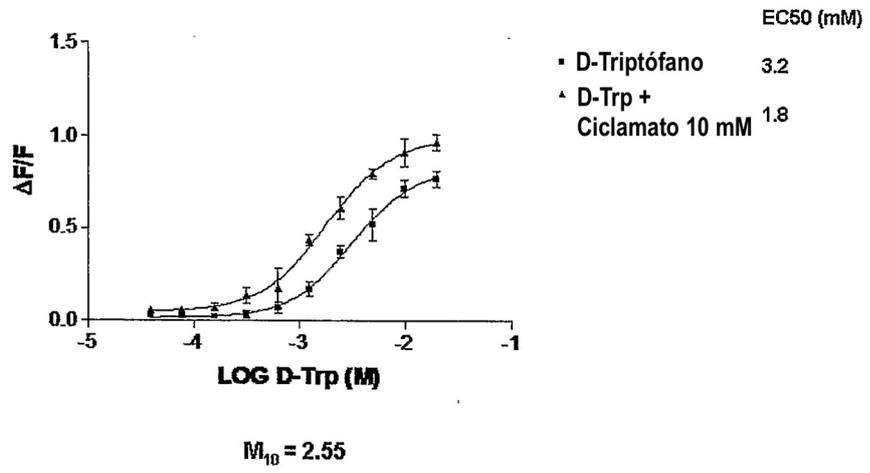


FIGURA 10

El ciclamato potencia la actividad de sacarosa

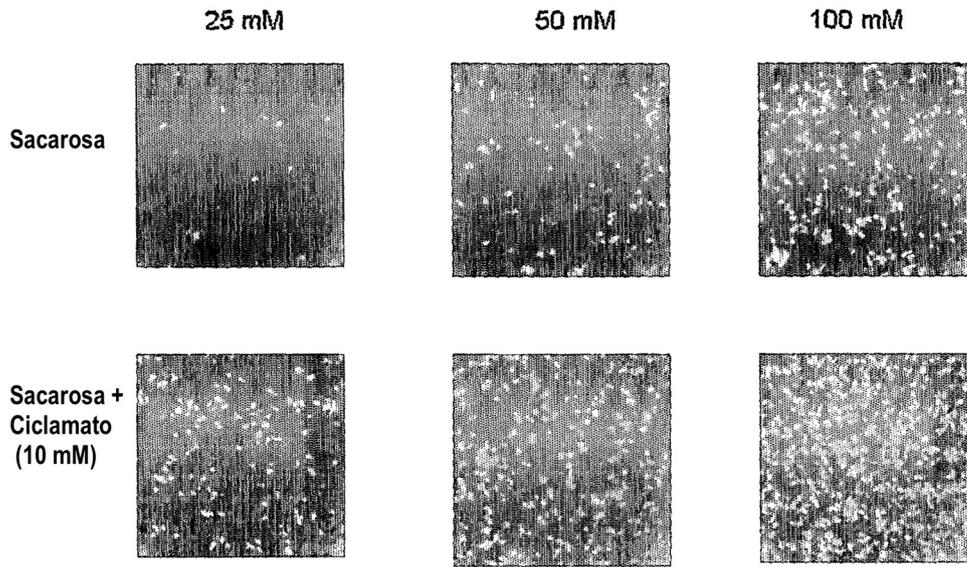


FIGURA 11

El ciclamato potencia la actividad de la fructosa

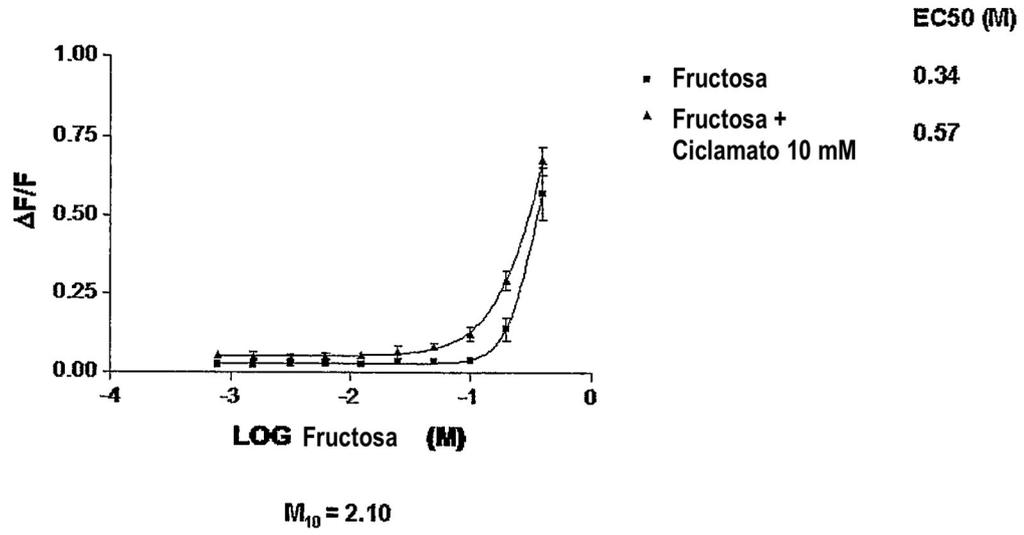


FIGURA 12

'807 activa hT1R2/hT1R3 y el ciclamato potencia la actividad de '807

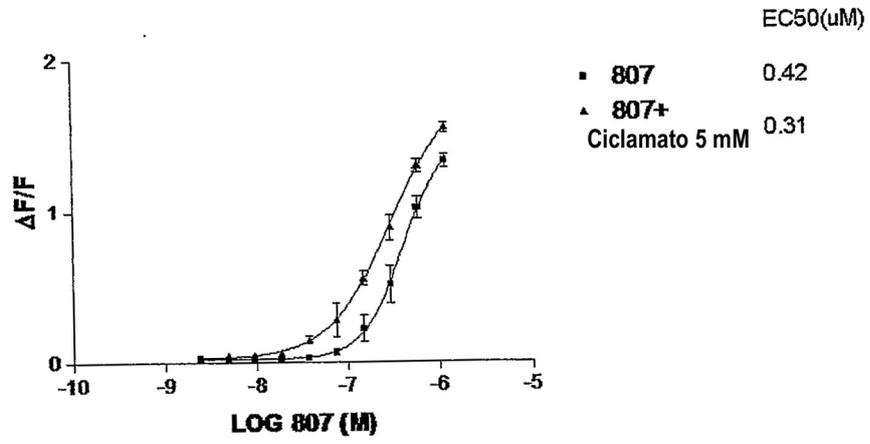


FIGURA 13

'807 potencia la respuesta a aspartamo

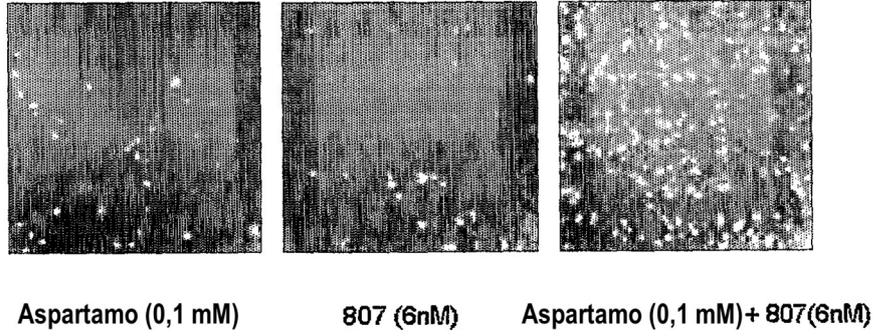


FIGURA 14

FIGURA 15

hT1R1-2/rT1R3 responde a ligandos umami

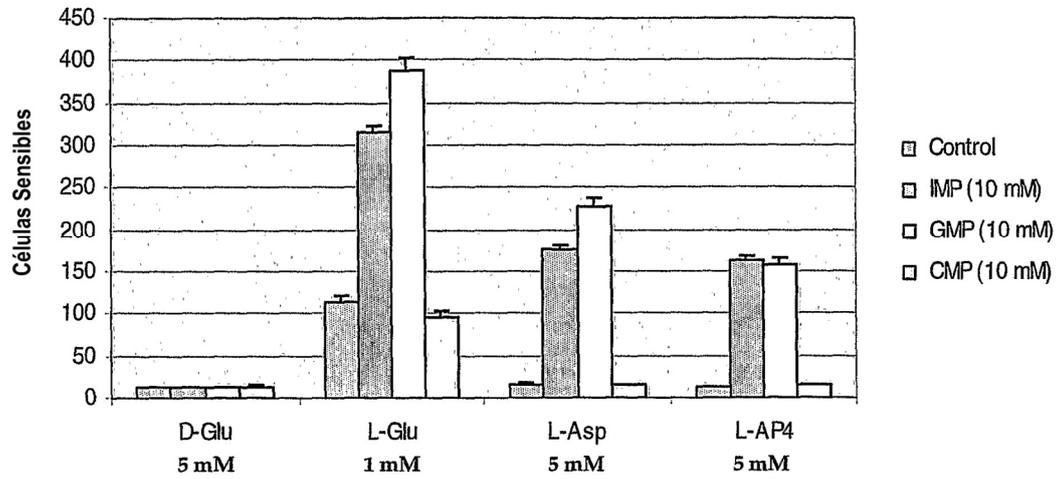


FIGURA 16

La actividad de hT1R1-2/rT1R3 es potenciada por IMP

