



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 351 094**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/566** (2006.01)  
**C07K 5/00** (2006.01)  
**A23L 1/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06823396 .4**  
96 Fecha de presentación : **08.11.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1946110**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2008**

54 Título: **Procedimiento de cribado para los agentes que confieren el kokumi.**

30 Prioridad: **09.11.2005 JP 2005-325300**  
**22.11.2005 US 738562 P**  
**07.07.2006 JP 2006-188458**  
**20.07.2006 US 807831 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**31.01.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**31.01.2011**

73 Titular/es: **AJINOMOTO Co., Inc.**  
**15-1, Kyobashi 1-chome**  
**Chuo-ku, Tokyo 104-8315, JP**

72 Inventor/es: **Amino, Yusuke;**  
**Yamanaka, Tomohiko;**  
**Eto, Yuzuru;**  
**Miyamura, Naohiro;**  
**Nagasaki, Hiroaki;**  
**Takehita, Sen y**  
**Ohsu, Takeaki**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 351 094 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

Procedimiento de cribado para los agentes que confieren el kokumi.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la selección de una sustancia que confiere el kokumi.

**Antecedentes de la técnica**

10 El receptor de calcio también denominado receptor sensible al calcio (CaSR), y es un receptor constituido por 1078 aminoácidos y está clasificado dentro de la clase C de los receptores siete transmembrana (receptor acoplado a la proteína G; GPCR). Se informó de la clonación del gen para este receptor de calcio en 1993 (documento no patente 1), y es conocido que es el causante de varias respuestas celulares a través de la elevación del nivel de calcio intracelular, etc., cuando se activa con calcio, etc. La secuencia genética del receptor de calcio humano está registrada con el nº de acceso de GenBank NM\_000388, y se conserva perfectamente en animales.

20 El receptor de calcio mencionado anteriormente puede actuar para potenciar o para suprimir funciones biológicas. Por consiguiente, en la actualidad, se utilizan adecuadamente agentes terapéuticos que pueden actuar como activadores y como inhibidores del receptor de calcio para el tratamiento de enfermedades neurológicas, enfermedades hepáticas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades del sistema digestivo y otras enfermedades, dependiendo de las patológicas. Por ejemplo, el receptor de calcio puede detectar el aumento del nivel de calcio en sangre en la paratiroides y suprimir la secreción de la hormona paratiroidea (PTH) para corregir el nivel de calcio en sangre. Por consiguiente, se prevé un efecto de reducción del nivel de calcio en sangre por parte de un activador del receptor de calcio. En realidad ya se ha aclarado que cuando se utiliza un activador del receptor de calcio para el tratamiento de hipertiroidismo secundario en pacientes en hemodiálisis, se reduce el nivel de PTH sin que se eleven los niveles de calcio y fósforo.

30 Como los análisis funcionales del receptor de calcio se han realizado mayoritariamente para la homeostasis de calcio, las investigaciones aplicadas están mayoritariamente enfocadas por consiguiente a las enfermedades metabólicas óseas en las que está implicada la regulación del calcio. Sin embargo, ha quedado claro a través de los resultados de los análisis de las expresiones genéticas que el receptor de calcio está ampliamente distribuido en otros organismos aparte de la paratiroides y el riñón. Se han propuesto (Documentos no patentes 2 y 3), y sus posibilidades de que estén implicados en varias funciones biológicas y en las causas de enfermedades. Por ejemplo, se ha considerado que el receptor de calcio está implicado en las funciones del hígado, corazón, pulmón, canal alimenticio, linfocitos y páncreas. Se ha confirmado en el contexto de la presente invención que se expresa en un amplio intervalo de tejidos en organismos mediante análisis basados en RT-PCR utilizando ARN extraído de tejidos de rata. A partir de los puntos de vista mencionados anteriormente, los valores de los activadores y los inhibidores del receptor de calcio están aumentando rápidamente en la actualidad para varias aplicaciones.

40 Además, aparte del calcio, se ha descrito que otros cationes como el catión gadolinio, péptidos básicos como la poliarginina, poliaminas como la espermina, aminoácidos como la fenilalanina, y demás como activadores del receptor de calcio (Documento no patente 4).

45 Aunque hasta ahora se han desarrollado muchos activadores específicos como activadores del receptor de calcio como se ha descrito anteriormente, existen algunos compuestos existentes en los organismos entre ellos, y las actividades de los compuestos existentes en los organismos son muy bajas. Por consiguiente, los agentes terapéuticos de varias enfermedades que contienen estos activadores presentan serios problemas en relación a los efectos secundarios, permeabilidad y actividad. Por ejemplo, aunque es sabido que los aminoácidos actúan sobre los receptores de calcio, se considera que su aplicación real como activadores es difícil ya que la actividad es muy débil. Además, aunque se ha descrito que otras moléculas como la poliarginina como activadora como se ha descrito anteriormente, se estima que las funciones se basan en las acciones como cationes polivalentes que presentan estructuras irregulares. Esto es, no se sabe que un péptido que presenta una estructura específica es útil como activador del receptor de calcio.

55 Entretanto, en el campo de los alimentos, se han aplicado durante muchos años sustancias aromatizantes. En particular, sustancias que presentan los cinco sabores básicos, concretamente, sabor dulce, sabor salado, sabor ácido, sabor amargo y sabor umami (sabor delicioso), y se han utilizado ampliamente como condimentos sustancias que potencia estos sabores. Como concepto de sabor que no se puede expresar con los sabores mencionados anteriormente, existe el "kokumi". Kokumi significa un sabor que no se puede expresar con los cinco sabores básicos, y significa un sabor que potencia no sólo los sabores básicos sino también los sabores marginales de los sabores básicos, como la densidad, el crecimiento (textura en la boca), la continuidad y la armonía. Hasta la fecha, se han descrito varios procedimientos para conferir el kokumi y se han descrito el glutatión (Documento patente 1), productos calientes de gelatina y tropomiosina (Documento patente 2), compuestos que contienen grupos de sulfona (Documento patente 3), un péptido que contiene la secuencia Asn-His (Documento patente 4) y similares.

65 Aunque se ha intentado el desarrollo de varias sustancias que confieren el kokumi como se ha descrito anteriormente, y se han comercializado principalmente a partir de productos naturales, existen actualmente muy pocos ejemplos del aislamiento del componente kokumi puro a partir de un extracto de un producto natural, como glutatión y N-(4-metil-5-oxo-1-imidazolin-2-yl) sarcosina.

## ES 2 351 094 T3

Por consiguiente, resulta deseable un desarrollo altamente eficaz, seguro y barato de sustancias que confieren el kokumi, y es necesario un procedimiento adecuado y altamente sensible para el cribado de sustancias que confieren el kokumi para este propósito.

5 [Documento no patente 1] Nature., 1993 9 diciembre; 366 (6455): 575-80.

[Documento no patente 2] J. Endocrinol., 2000 mayo, 165(2): 173-7.

10 [Documento no patente 3] Eur. J. Pharmacol., 2002, 5 julio, 447(2-3): 271-8.

[Documento no patente 4] Cell Calcium., 2004 marzo, 35(3): 209-16.

[Documento patente 1] Patente japonesa nº 1464928.

15 [Documento patente 2] Patente japonesa publicación abierta a inspección (KOKAI) nº 10-276709.

[Documento patente 3] Patente japonesa publicación abierta a inspección (KOKAI) nº 8-289760.

[Documento patente 4] WO2004/096836.

20 El documento EP-A-1 554 939 da a conocer el suministro de unas sustancias que confieren kokumi como aminoácidos y péptidos.

25 El documento EP-A-0 672 354 da a conocer una mezcla que confiere kokumi que contiene péptidos y fracciones de bajo peso molecular de los extractos naturales.

El documento WO 94/22438 A da a conocer unas composiciones que contienen glutatión y una sal cálcica.

30 El documento WO 92/07267 A da a conocer una composición que comprende péptidos.

### Exposición de la invención

#### Problemas que va a resolver la invención

35 Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento adecuado y altamente sensible para el cribado de sustancias que confieren el kokumi.

#### Medios para resolver los problemas

40 La presente invención proporciona lo siguiente:

(1) un procedimiento para el cribado de una sustancia que confiere el kokumi, es decir es capaz de potenciar el sabor salado, umami, sabor dulce, sabor ácido o sabor amargo que comprende La primera etapa de reacción del receptor del calcio y una sustancia de prueba y la detección de la actividad del receptor del calcio, y la segunda etapa de medición del efecto que confiere el kokumi de las sustancias de pruebas para las cuales la actividad de activación del receptor del calcio se detecta en la primera etapa.

#### Efecto de la invención

50 Según la presente invención, se proporciona un procedimiento adecuado y altamente sensible para el cribado de una sustancia que confiere el kokumi.

#### Breve descripción de las figuras

55 Figura 1

*Dibujo que representa la acción del calcio en el receptor de calcio*

60 Se introdujo el receptor humano de calcio ARNc en oocitos de *Xenopus laevis* mediante microinyección. Se registraron los valores de las corrientes de respuesta intracelular que ocurrían cuando se añadía una solución de cloruro cálcico a una concentración arbitraria. Los valores máximos de corrientes intracelulares se consideraron valores de la corriente de respuesta. Se confirmó que no se observó ninguna respuesta en oocitos a los que se introdujo agua destilada mediante microinyección como control.

65

## ES 2 351 094 T3

Figura 2

*Dibujo que representa la acción de aminoácidos L en el receptor de calcio*

5 Se introdujo el receptor humano de calcio ARNc en *Xenopus laevis* mediante microinyección. Se registraron los valores de las corrientes de respuesta intracelular que fluían cuando se añadía una solución de L-aminoácido 10 mM. Los valores máximos de corrientes intracelulares se consideraron valores de la corriente de respuesta. Se confirmó que no se observó ninguna respuesta en oocitos en los que se introdujo agua destilada mediante microinyección como control.

10

Figura 3

*Dibujo que representa la acción de aminoácidos D en el receptor de calcio*

15

Se introdujo el receptor humano de calcio ARNc en *Xenopus laevis* mediante microinyección. Se registraron los valores de las corrientes de respuesta intracelular que fluían cuando se añadía una solución de aminoácido D 10 mM. Los valores máximos de corrientes intracelulares se consideraron valores de la corriente de respuesta. Se confirmó que no se observó ninguna respuesta en oocitos en los que se introdujo agua destilada mediante microinyección como control.

20

Figura 4

25 *Dibujo que representa la acción de péptidos en el receptor de calcio*

Se introdujo el receptor humano de calcio ARNc en *Xenopus laevis* mediante microinyección. Se registraron los valores de las corrientes de respuesta intracelular que fluían cuando se añadía una solución de péptidos a una concentración arbitraria. Los valores máximos de corrientes intracelulares se consideraron valores de la corriente de respuesta. Se confirmó que no se observó ninguna respuesta en oocitos en los que se introdujo agua destilada mediante microinyección como control.

30

### **Mejor modo de poner en práctica la invención**

35 A continuación, se explicará con detalle la presente invención.

En la presente memoria, el “receptor de calcio” también se denomina receptor sensible al calcio (CaSR), y pertenece a la clase C de los receptores siete transmembrana. En la presente memoria, la “actividad del receptor de calcio” significa la unión del receptor de calcio mencionado anteriormente para activar la proteína de unión guanina nucleótido y de ese modo transmitir señales. Además, en la presente memoria, el “activador del receptor de calcio” es una sustancia que actúa en receptor de calcio mencionado anteriormente para activar el receptor de calcio y controlar las funciones de las células que expresan el receptor de calcio.

40

En la presente memoria, “kokumi” significa un sabor que no se puede expresar mediante los cinco sabores básicos, sabor dulce, sabor salado, sabor ácido, sabor amargo y sabor umami, en el que no solo se realzan/amplifican los sabores básicos sino también los sabores marginales de los sabores básicos, como la densidad, el crecimiento (textura en la boca), la continuidad y la armonía. Además, el “agente que confiere el kokumi” o “sustancia que confiere el kokumi” se refiere a un agente o sustancia que puede potenciar los cinco sabores básicos, sabor dulce, sabor salado, sabor ácido, sabor amargo y sabor umami, y transmitir sabores marginales de los sabores básicos, como la densidad, el crecimiento (textura en la boca), la continuidad y la armonía acompañando a los sabores básicos. Por consiguiente, el agente que confiere el kokumi también se puede utilizar como un agente potenciador del sabor dulce, agente potenciador del sabor salado, agente potenciador del sabor ácido, agente potenciador del sabor amargo o agente potenciador del sabor umami. En cuanto a la intensidad del kokumi, “sabor primero y medio” significa el sabor que se siente durante el periodo de 0 a 4 segundos después de comer, y “sabor posterior” significa el sabor que se siente 5 segundos después de comer.

50

En la presente memoria, todos los aminoácidos y los residuos de aminoácidos que constituyen los péptidos son isómeros L, excepto que se indique lo contrario.

<1> *Procedimiento para el cribado de la sustancia que confiere el kokumi*

60

El procedimiento para el cribado de una sustancia que confiere el kokumi de la presente invención (en adelante se hará referencia al mismo como procedimiento para el cribado de la presente invención) se caracteriza por el uso de la actividad del receptor de calcio como un índice. Específicamente, el procedimiento de cribado de la presente invención comprende la primera etapa de reacción de un receptor de calcio con la sustancia de prueba y la detección de la actividad del receptor de calcio, y la segunda etapa de medición del efecto que confiere el kokumi de las sustancias de prueba para los que se ha detectado en la primera etapa la actividad de la activación del receptor de calcio.

65

## ES 2 351 094 T3

Las etapas específicas del proceso del procedimiento de cribado de la presente invención se ejemplifican a continuación. Sin embargo, las etapas del procedimiento de cribado de la presente invención no se limitan a estas etapas.

- 1) Se añade una sustancia de prueba a un sistema de medición de la actividad del receptor de calcio para medir la actividad del receptor de calcio, y se mide la actividad del receptor de calcio.
- 2) Se compara la actividad del receptor de calcio obtenida con la adición de la sustancia de prueba con la actividad del receptor de calcio obtenida sin la adición de la sustancia de prueba.
- 3) Se elige una sustancia de prueba que representa una actividad de estimulación del receptor de calcio más elevada cuando se selecciona la sustancia de prueba.
- 4) Se mide el efecto que confiere el kokumi de la sustancia de prueba elegida, y se escoge una sustancia de prueba que presenta un efecto que confiere el kokumi.

La actividad del receptor de calcio se mide utilizando, por ejemplo, un sistema de medición que utilizando células que expresan el receptor de calcio. Las células pueden ser células que expresen el receptor de calcio endógenamente, o células recombinantes introducidas con un gen de receptor de calcio externo. Al igual que el sistema de medición de la actividad del receptor de calcio mencionada anteriormente, también se puede utilizar cualquier sistema sin limitaciones en particular siempre y cuando se elija un sistema en el que cuando un ligando extracelular (activador) específico del receptor de calcio se puede detectar o se transmite una señal detectable en respuesta a la unión (reacción) del activador y del receptor de calcio. Cuando la reacción del compuesto a prueba resulta en una actividad del receptor de calcio, se determina que este compuesto a prueba presenta una actividad de activación del receptor de calcio y un compuesto que confiere el kokumi.

El efecto que confiere el kokumi mencionado anteriormente se puede confirmar mediante una prueba de sabor realizada por un individuo, o similar. Además, las sustancia de prueba utilizada para el cribado no está particularmente limitada, y también se pueden utilizar compuestos con pocas moléculas, sacáridos, péptidos, proteínas, y similares.

En cuanto al receptor de calcio mencionado anteriormente, el receptor humano de calcio codificado por el gen humano del receptor de calcio registrado con el n° de acceso de GenBank NM\_000388 se puede ejemplificar como el ejemplo preferido. Además, el receptor de calcio no está limitado a la proteína que codifica para el gen de la secuencia mencionada anteriormente, y puede ser una proteína codificada por un gen que presenta una homología del 60% o superior, preferentemente 80% o superior, más preferentemente 90% o superior, con respecto a la secuencia mencionada anteriormente, siempre y cuando la proteína presente la función de receptor del calcio. El receptor GPRC6A y el receptor 5.24 son también conocidos como subtipos del receptor de calcio, y también se pueden utilizar para la presente invención. La función del receptor de calcio se puede examinar mediante la expresión de un gen de interés en una célula y midiendo los cambios en la corriente eléctrica, o la concentración intracelular de ión de calcio en el momento de la adición de calcio.

El origen del receptor de calcio no está particularmente limitado, y los ejemplos incluyen, además del receptor humano de calcio mencionado anteriormente, receptores de calcio derivados de animales como ratón, rata y perro.

Tal como se ha descrito anteriormente, la actividad del receptor de calcio se puede confirmar utilizando células libres que expresan un receptor de calcio o uno de sus fragmentos, membranas celulares que expresan un receptor de calcio o uno de sus fragmentos, un sistema *in vitro* que contiene una proteína de un receptor de calcio o uno de sus fragmentos, o similares.

A continuación se representa un ejemplo utilizando células vivas. Sin embargo, la confirmación de la actividad del receptor de calcio no está limitada a este ejemplo.

El receptor de calcio se puede expresar en células cultivadas como oocitos de *Xenopus laevis*, células de ovarios de hámster, y células fetales de riñón humano. El receptor de calcio se puede expresar mediante la clonación de un gen de receptor de calcio en un plásmido que puede contener un gen extraño y la introducción del plásmido o ARNc obtenido utilizando el plásmido como una plantilla. Para detectar la reacción, se pueden utilizar técnicas electrofisiológicas, reactivos indicadores de fluorescencia que indican la elevación del nivel intracelular de calcio, y similares.

La expresión del receptor de calcio se confirma primero sobre la base de la respuesta al calcio o a un activador específico. Se utilizaron los oocitos que mostraban corriente intracelular con calcio a una concentración de aproximadamente 5 mM o células de cultivo que mostraban fluorescencia del reactivo indicador fluorescente con calcio a una concentración de aproximadamente 5 mM. La dependencia de la concentración de calcio se determinó mediante el cambio de la concentración de calcio. Después, se prepara una sustancia de prueba como un péptido a una concentración de aproximadamente 1  $\mu$ M a 1 mM y se añade a los oocitos o células cultivadas y se mide la actividad del receptor de calcio de la sustancia de prueba como se ha indicado anteriormente.

## ES 2 351 094 T3

### Ejemplos

A continuación, la presente invención se explicará con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos.

#### 5 Ejemplo 1

(Sólo referencia)

*Preparación del gen (ARNc)*

10

El gen del receptor de calcio se preparó de la siguiente forma. Se diseñaron sobre la base de la secuencia de ADN registrada en NCBI (receptor de calcio: NM\_000388), oligo ADN sintéticos (primer de inicio (N) y primer de final (C) utilizados para la PCR (Tabla 1, SEC. ID n° 1 y 2).

15

TABLA 1

*Oligos ADN sintéticos (primer de inicio (N) y primer de final (C), h: humano)*

20

Código	Secuencia(5'-3')
hCASR_N	ACTAATACGACTCACTATAGGGACCATGGCATT T TATAGCTGCTGCTGG
hCASR_C	TTATGAAT T CACTACG T T T TCTGTAACAG

25

Utilizando cADN de riñón humano (Clontech) como material, se sintetizaron los cebadores representados en la Tabla 1 (hCASR\_N (SEC ID n°: 1) y hCASR\_C (SEC ID n°:2)), y se realizó una PCR utilizando ultra Pfu ADN Polimerasa (Stratagene) bajo las siguientes condiciones. Después de una reacción a 94°C durante 3 minutos, se repitió 35 veces un ciclo de reacciones a 94°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30 segundos, y a 72°C durante 2 minutos, y después se realizó la reacción a 72°C durante 7 minutos. Se detectó mediante PCR si se había realizado la amplificación mediante la realización de electroforesis en agarosa, tinción con un reactivo de tinción de ADN, y irradiación ultravioleta. Las longitudes de la cadena de los productos de PCR se confirmaron mediante la comparación con marcadores de ADN de tamaños conocidos sometidos simultáneamente a la electroforesis. El vector plásmido pBR322 (Takara) fue digerido con la enzima de restricción EcoVR. El fragmento de gen amplificado por la PCR se ligó al sitio de corte del plásmido utilizando Ligation Kit (Promega). La cepa de la *Escherichia coli* DH5a se transformó con cada solución de reacción de ligación, y se seleccionó un punto de transformación que albergaba el plásmido en el que se clonó el producto de amplificación de PCR. El producto de amplificación de la PCR se confirmó mediante el análisis de la secuencia de ADN. Mediante la utilización de este plásmido recombinante como molde junto con el equipo de preparación de ARNc (Ambion), se preparó el ARNc del gen receptor de calcio.

30

35

40

#### 45 Ejemplo 2

(Únicamente como referencia)

*Elaboración de varias muestras*

50

55

60

65

Como muestras de aminoácido L, se utilizaron 23 tipos amino ácidos de calidad pura alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina, ornitina, taurina (todos estos a partir del Ajinomoto), y hidroxiprolina (Nakarai Tesque). Como D-Cys y D-Trp (Nakarai Tesque) y cloruro de calcio, se utilizaron los de especial calidad. Además, como muestras de péptidos, se utilizaron  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly (Sigma Aldrich Japan),  $\gamma$ -Glu-Cys (SNO)-Gly (Dojin Chemical laboratory),  $\gamma$ -Glu-Ala (Bachem Feinchemikalien AG),  $\gamma$ -Glu-Gly (Bachem Feinchemikalien AG),  $\gamma$ -Glu-Cys (Sigma Aldrich Japan),  $\gamma$ -Glu-Met (Bachem Feinchemikalien AG),  $\gamma$ -Glu-Abu-Gly (Abu: ácido  $\alpha$ -aminobutírico, Bachem Feinchemikalien AG),  $\gamma$ -Glu-Thr (Kokusai Chemical),  $\gamma$ -Glu-Val (Kokusai Chemical),  $\gamma$ -Glu-Leu (producto fabricado contratado),  $\gamma$ -Glu-Ile (producto fabricado contratado),  $\gamma$ -Glu-Orn (Kokusai Chemical), Asp-Gly (producto fabricado contratado), Cys-Gly (producto fabricado contratado), Cys-Met (producto fabricado contratado), Glu-Cys (producto fabricado contratado), Gly-Cys (producto fabricado contratado), Leu-Asp (producto fabricado contratado),  $\gamma$ -Glu-Val-Val (producto fabricado contratado),  $\gamma$ -Glu-Val-Glu (producto fabricado contratado),  $\gamma$ -Glu-Val Lys (producto fabricado contratado),  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Val (producto fabricado contratado),  $\gamma$ -Glu-Gly-Gly (producto fabricado contratado),  $\gamma$ -Glu-Val-Phe (producto fabricado contratado),  $\gamma$ -Glu-Val-Ser (producto fabricado contratado),  $\gamma$ -Glu-Val Pro (producto fabricado contratado),  $\gamma$ -Glu-Val-Arg (producto fabricado contratado),  $\gamma$ -Glu-Val Asp (producto fabricado contratado),  $\gamma$ -Glu-Val-Met (producto fabricado contratado),  $\gamma$ -Glu-Val-Thr (producto fabricado contratado),  $\gamma$ -Glu-Val-His (producto fabricado contratado),  $\gamma$ -Glu-Val-Asn (producto fabricado contratado),  $\gamma$ -Glu-Val-Gln (producto fabricado contratado),  $\gamma$ -Glu-Val-Cys (producto fabricado contratado),  $\gamma$ -Glu-

## ES 2 351 094 T3

Val-Orn (producto fabricado contratado), y  $\gamma$ -Glu-Ser-Gly (producto fabricado contratado). La glutamina y la cisterna se prepararon en el momento de su utilización y las otras muestras se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  después de su preparación. En cuanto a los péptidos, se utilizaron los que presentaban una pureza de 90% o superior. En cuanto al  $\gamma$ -Glu-Cys, se utilizó uno que presentaba una pureza de 80% o superior. Cuando la solución que disuelve cada muestra, mostró un pH ácido o alcalino, la solución se ajustó hasta un pH aproximadamente neutro mediante la utilización de NaOH o HCl. La solución utilizada para la disolución de aminoácidos y péptidos, la preparación de oocitos de *Xenopus laevis*, y el cultivo de los oocitos presentaba la siguiente composición: NaCl 96 mM, KCl 2 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM,  $\text{CaCl}_2$  1,8 mM, Hepes 5 mM, pH 7,2.

10

### Ejemplo 3

(Únicamente como referencia)

#### 15 Síntesis de $\gamma$ -Glu-Val-Gly

Se disolvieron Boc-Val-OH (8,69 g, 40,0 mmoles) y Gly-OBzl·HCl (8,07 g, 40,0 mmoles) en cloruro de metileno (100 ml) y la solución se guardó a  $0^{\circ}\text{C}$ . Se añadió a la solución tietilamina (6,13 ml, 44,0 mmoles), HOBt (1-hidroxibenzotriazol, 6,74 g, 44,0 mmoles) y WSC·HCl (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) hidrocloruro de carbodiimida, 8,44 g, 44,0 mmoles) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida, y el residuo se disolvió en acetato de etilo (200 ml). La solución se lavó con agua (50 ml), una solución acuosa de ácido cítrico al 5% (50 ml x dos veces), salmuera saturada (50 ml), una solución acuosa con hidrógeno carbonato sódico al 5% (50 ml x dos veces) y salmuera saturada (50 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidra, se extrajo el sulfato de magnesio mediante filtración y el filtrado se concentró bajo presión reducida. El residuo se recristalizó a partir de acetato de etilo/n-hexano para obtener Boc-Val-Gly-OBzl (13,2 g, 36,2 mmoles) como cristales blancos.

Se añadió Boc-Val-Gly-OBzl (5,47 g, 15,0 mmoles) a una solución de 4 N HCl/dioxano (40 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 50 minutos. Se extrajo el dioxano mediante concentración bajo presión reducida, se añadió n-hexano (30 ml) al residuo y la mezcla se concentró bajo presión reducida. Este proceso se repitió 3 veces para obtener cuantitativamente H-Val-Gly-OBzl·HCl.

Los productos anteriores H-Val-Gly-OBzl·HCl y Z-Glu-OBzl (5,57 g, 15,0 mmoles) se disolvieron en cloruro de metileno (50 ml), y la solución se guardó a  $0^{\circ}\text{C}$ . Se añadió a la solución de tietilamina (2,30 ml, 16,5 mmoles), HOBt (1-hidroxibenzotriazol, 2,53 g, 16,5 mmoles) y WSC·HCl (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) hidrocloruro de carbodiimida, 3,16 g, 16,5 mmoles) y la mezcla se agitó durante 2 días a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida, y el residuo se disolvió en acetato de etilo calentado (1.500 ml). La solución se lavó con agua (200 ml), una solución acuosa con ácido cítrico al 5% (200 ml x dos veces), salmuera saturada (150 ml), una solución acuosa con hidrógeno carbonato sódico al 5% (200 ml x dos veces) y salmuera saturada (150 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidra, se extrajo el sulfato de magnesio mediante filtración y el filtrado se concentró bajo presión reducida. Se extrajeron los cristales depositados mediante filtración, y se secaron bajo presión reducida para obtener Z-Glu(Val-Gly-OBzl)-OBzl (6,51 g, 10,5 mmoles) como cristales blancos.

El producto anterior Z-Glu(Val-Gly-OBzl)-OBzl (6,20 g, 10,3 mmoles) se suspendió en etanol, (200 ml) y se añadió paladio/carbono al 10% (1,50 g) y se realizó la reacción de reducción a  $55^{\circ}\text{C}$  durante 5 horas bajo una atmósfera de hidrógeno. Durante la reacción, se añadieron gradualmente un total de 100 ml de agua. Se extrajo el catalizador mediante filtración utilizando un embudo Kiriyama, y el filtrado se concentró bajo presión reducida hasta el medio volumen. La mezcla de reacción se filtró después a través de un filtro de membrana, y el filtrado se concentró bajo presión reducida. El residuo se disolvió en un volumen pequeño de agua, y se añadió etanol para depositar los cristales, y se extrajeron los cristales mediante filtración, y se secaron bajo presión reducida para obtener un polvo blanco de  $\gamma$ -Glu-Val-Gly (2,85 g, 9,40 mmoles).

ESI-MS:  $(\text{M}+\text{H})^+ = 304,1$ .

$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 0,87 (3H, d, J = 6,8 Hz), 0,88 (3H, d, J = 6,8 Hz), 1,99-2,09 (3H, m), 2,38-2,51 (2H, m) 3,72 (1H, t, J = 6,35 Hz), 3,86 (1H, d, J = 17,8 Hz), 3,80 (1H, d, J = 17,8 Hz), 4,07 (1H, d, J = 6,8 Hz).

### 60 Ejemplo 4

(Únicamente como referencia)

#### Síntesis de $\gamma$ -Glu-Cys(S-Me)-Gly [Cys(S-Me): S-metilcisteína]

Glutación reducida (15,0 g, 48,8 mmoles) se añadió a agua (45 ml) y se añadió hidróxido sódico (4,52 g, 2,2 equivalentes, 107 mmoles) en porciones a la mezcla mientras la mezcla se burbujeaba con nitrógeno. Se añadió yoduro de metilo (4,56 ml, 1,5 equivalentes, 73 mmoles) a la mezcla, y la mezcla se selló y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se ajustó a un pH de 2 a 3 con ácido clorhídrico concentrado se añadió etanol

## ES 2 351 094 T3

(150 ml), y se introdujo durante la noche en un refrigerador. Como se separó la fase oleosa, se extrajo el sobrenadante. Cuando la fase oleosa restante se disolvió en agua y se le añadió etanol gradualmente, se depositó la fase oleosa parcialmente cristalizada. Por consiguiente, el líquido supernadante se extrajo otra vez. El residuo se disolvió en agua (300 ml), se absorbió en una resina de intercambio de iones (Dowex 1-acetato, 400 ml) relleno en una columna, y después de lavarlo con agua, se eluyó con una solución acuosa de ácido acético 1 N. La elución se concentró bajo presión reducida, y se precipitó a partir de agua/etanol para obtener un polvo blanco de  $\gamma$ -Glu-Cys(S-Me)-Gly (5,08 g, 15,8 mmoles).

FAB-MS: (M+H)<sup>+</sup> = 322

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm): 2,14 (3H, s), 2,15-2,22 (2H, m), 2,50-2,58 (2H, m), 2,86 (1H, dd, J = 9,0 Hz, J = 14,0 Hz), 3,03 (1H, dd, J = 5,0 Hz, J = 14,0 Hz), 3,84 (1H, t, J = 6,5 Hz), 3,99 (2H, S), 4,59 (1H, dd, J = 5,0 Hz, J = 9,0 Hz)

### Ejemplo 5

(Únicamente como referencia)

### 20 Síntesis de otros péptidos

$\gamma$ -Glu-Met-(O),  $\gamma$ -Glu-Val-NH<sub>2</sub>,  $\gamma$ -Glu-Val-ol,  $\gamma$ -Glu-Ser,  $\gamma$ -Glu-Tau,  $\gamma$ -Glu-Cys(S-Me)(O),  $\gamma$ -Glu-t-Leu,  $\gamma$ -Glu-Cys(S-alilo)-Gly, y  $\gamma$ -Glu-Cys(S-Me) se sintetizaron de forma similar a los Ejemplos 3 y 4.

### 25 Ejemplo 6

*Evaluación de la actividad de la activación del receptor de calcio*

Para la evaluación de la actividad de activación del receptor de calcio se utilizó un procedimiento de medición de la corriente iónica Cl dependiente de la concentración de ión Ca utilizando un sistema de expresión de oocito de *Xenopus laevis*. Si se añade a los oocitos de la *Xenopus laevis* cada activador que expresan para el receptor de calcio, los iones Ca intracelulares aumentan. Entonces, el canal de de ión Ca dependiente de la concentración Cl se abre, y el valor de la corriente intracelular cambia a una corriente iónica. Mediante la medición del valor de esta corriente intracelular, se puede saber si existe una actividad de la activación del receptor de calcio.

Específicamente, se abrió el abdomen de la *Xenopus laevis* y se extrajo una bolsa de huevos que se trataron con una solución de 1% de colagenasa a 20°C durante 2 horas para obtener oocitos individuales. En el interior de los oocitos, se introdujeron 50 nl de 1  $\mu$ g/ $\mu$ l de receptor de ARNc o 50 nl de agua esterilizada por oocito utilizando un microcapilar de cristal, y los oocitos se cultivaron a 18°C durante 2 ó 3 días. Para el cultivo se utilizó una solución obtenida mediante la adición de ácido pirúvico 2 mM, 10 U/ml de penicilina, y 10  $\mu$ g/ml de estreptomina a la solución mencionada en el Ejemplo 2. Después del cultivo, se añadió una solución de prueba a los oocitos a los que se introdujo ARNc o agua esterilizada. Se realizó una medición electrofisiológica utilizando un amplificador, Geneclamp500 (Axon), y un sistema de grabación, AxoScope 9.0 (Axon). Los oocitos se acoplan a un voltaje a -70 mV mediante el procedimiento de acoplamiento de voltaje de doble electrodo, y se midió la corriente intracelular a través del canal de la concentración de ión Ca dependiente de del ión Cl. El valor máximo de la corriente intracelular se consideró como el valor de la corriente de la respuesta.

### 50 Ejemplo 7

*Evaluación de la actividad de activación del receptor de calcio por el calcio*

La actividad de activación del receptor del calcio se realizó utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 6, es decir, se prepararon los oocitos a los cuales se introdujo ARNc del receptor del calcio o agua esterilizada y se acoplan a un voltaje a -70 mV mediante el procedimiento de acoplamiento de voltaje de doble electrodo, A los oocitos que reciben voltaje, se les añade calcio (2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM) y se calcula la concentración del ión calcio dependiente de la respuesta a la corriente de Cl. Los resultados se presentan en la figura 1. A partir de estos resultados, se confirmó que el ARNc del receptor del calcio introducido en los oocitos se expresaba funcionalmente. Además, puesto que lo oocitos a los que se introdujo agua no respondieron ni a altas concentraciones de calcio, confirmó que el receptor del calcio no se expresa en los oocitos por sí solos.

65

## ES 2 351 094 T3

### Ejemplo 8

#### *Evaluación de la actividad de activación del receptor del calcio de L-aminoácidos*

5 La actividad de activación del receptor del calcio de los L-aminoácidos se realizó utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 6. Es decir, se prepararon los oocitos a los cuales se introdujo ARNc del receptor del calcio o agua esterilizada y se acoplan a un voltaje a -70 mV mediante el procedimiento de acoplamiento de voltaje de doble electrodo. A los oocitos que reciben voltaje, se les añade alanina (10 mM), arginina (10 mM), asparagina (10 mM), ácido aspártico (10 mM), cisteína (10 mM), glutamina (10 mM), ácido glutámico (10 mM), glicina (10 mM), histidina (10 mM), isoleucina (10 mM), leucina (10 mM), lisina (10 mM), metionina (10 mM), fenilalanina (10 mM), prolina (10 mM), serina (10 mM), treonina (10 mM), triptófano (10 mM), tirosina (10 mM), valina (10 mM), ornitina (10 mM), taurina (10 mM) o hidroxiprolina (10 mM) y se calculó la concentración del ión Ca dependiente de la respuesta a la corriente de Cl. Los resultados se presentan en la figura 2. A partir de estos resultados, se confirmó que cisteína, hisidina, fenilalanina, triptófano y tirosina presentan una actividad de activación del receptor del calcio definida. Para los aminoácidos indicados anteriormente, la actividad de activación se ha descrito en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 25 abril, 97 (9): 4814-9.

### Ejemplo 9

#### *Evaluación de la actividad de activación del receptor del calcio de D-cisteína*

20 La actividad de activación del receptor del calcio de D-cisteína se realizó utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 6. Es decir, se prepararon los oocitos a los cuales se introdujo ARNc del receptor del calcio o agua esterilizada y se acoplan a un voltaje a -70 mV mediante el procedimiento de acoplamiento de voltaje de doble electrodo. A los oocitos que reciben voltaje, se les añade D-cisteína (10 mM), L-cisteína (10 mM), D-triptófano (10 mM) o L-triptófano (10 mM) y se calculó la concentración del ión Ca dependiente de la respuesta a la corriente de Cl. Los resultados se presentan en la figura 3. A partir de estos resultados, se confirmó que la D-cisteína presenta una actividad definida de activación del receptor del calcio.

### Ejemplo 10

#### *Evaluación de la actividad de activación del receptor del calcio de péptidos*

35 La actividad de activación del receptor del calcio de péptidos se realizó utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 6. Es decir, se prepararon los oocitos a los cuales se introdujo ARNc del receptor del calcio o agua esterilizada y se acoplan a un voltaje a -70 mV mediante el procedimiento de acoplamiento de voltaje de doble electrodo. A los oocitos que reciben voltaje, se les añade  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly (50  $\mu$ M),  $\gamma$ -Glu-Cys (SNO)-Gly (50  $\mu$ M),  $\gamma$ -Glu-Ala (50  $\mu$ M),  $\gamma$ -Glu-Gly (500  $\mu$ M),  $\gamma$ -Glu-Cys (50  $\mu$ M),  $\gamma$ -Glu-Met (500  $\mu$ M),  $\gamma$ -Glu-Thr (50  $\mu$ M),  $\gamma$ -Glu-Val (50  $\mu$ M),  $\gamma$ -Glu-Orn (500  $\mu$ M), Asp-Gly (1 mM), Cys-Gly (1 mM), Cys-Met (1 mM), Glu-Cys (50  $\mu$ M), Gly-Cys (500  $\mu$ M) o Leu-Asp (1 mM), y se calculó la concentración del ión calcio dependiente de la respuesta a la corriente de Cl. Los resultados se presentan en la figura 4. A partir de estos resultados, se demostró que los péptidos mencionados anteriormente presentan una actividad definida de activación del receptor del calcio.

### Ejemplo 11

#### *Evaluación de la actividad de activación del receptor del calcio de péptidos*

50 La actividad de activación del receptor del calcio de péptidos se evaluó de la misma manera que en el Ejemplo 10. Cada uno de los péptidos que se representan en la tabla 2 se añadió a unos oocitos que reciben voltaje a una concentración de 1.000  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M y 0,1  $\mu$ M y se calculó la concentración del ión calcio dependiente de la respuesta a la corriente de Cl. La concentración más baja a la que se detecta corriente se representa en la Tabla 2 como actividad. A partir de estos resultados, resulta evidente que estos 32 péptidos presentan actividad de activación del receptor del calcio.

# ES 2 351 094 T3

TABLA 2

nº	Péptido	Actividad
1	$\gamma$ -Glu-Met(O)	1.000 $\mu$ M
2	$\gamma$ -Glu-Val-Val	1.000 $\mu$ M
3	$\gamma$ -Glu-Val-Glu	1.000 $\mu$ M
4	$\gamma$ -Glu-Val-Lys	1.000 $\mu$ M
5	$\gamma$ -Glu-Val-Arg	1.000 $\mu$ M
6	$\gamma$ -Glu-Val-Asp	1.000 $\mu$ M
7	$\gamma$ -Glu-Val-Met	1.000 $\mu$ M
8	$\gamma$ -Glu-Val-Thr	1.000 $\mu$ M
9	$\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Val	1.000 $\mu$ M
10	$\gamma$ -Glu-Val-NH <sub>2</sub>	1.000 $\mu$ M
11	$\gamma$ -Glu-Val-ol	1.000 $\mu$ M
12	$\gamma$ -Glu-Ser	300 $\mu$ M
13	$\gamma$ -Glu-Tau	300 $\mu$ M
14	$\gamma$ -Glu-Cys(S-Me)(O)	300 $\mu$ M
15	$\gamma$ -Glu-Val-His	100 $\mu$ M
16	$\gamma$ -Glu-Val-Orn	100 $\mu$ M
17	$\gamma$ -Glu-Leu	100 $\mu$ M
18	$\gamma$ -Glu-Ile	100 $\mu$ M
19	$\gamma$ -Glu-t-Leu	100 $\mu$ M
20	$\gamma$ -Glu-Cys(S-alilo)-Gly	100 $\mu$ M
21	$\gamma$ -Glu-Val-Asn	30 $\mu$ M
22	$\gamma$ -Glu-Gly-Gly	30 $\mu$ M
23	$\gamma$ -Glu-Val-Phe	30 $\mu$ M
24	$\gamma$ -Glu-Val-Ser	30 $\mu$ M
25	$\gamma$ -Glu-Val-Pro	30 $\mu$ M
26	$\gamma$ -Glu-Ser-Gly	30PM
27	$\gamma$ -Glu-Cys(S-Me)	30 $\mu$ M
28	$\gamma$ -Glu-Val-Cys	10 $\mu$ M
29	$\gamma$ -Glu-Val-Gln	10 $\mu$ M
30	$\gamma$ -Glu-Abu-Gly	3 $\mu$ M
31	$\gamma$ -Glu-Cys(S-Me)-Gly	3 $\mu$ M
32	$\gamma$ -Glu-Val-Gly	0,1 $\mu$ M

Ejemplo 12

(Únicamente como referencia)

*Actividad que transmite Kokumi de los péptidos y aminoácidos*

Los ejemplos habituales se seleccionan de entre los péptidos y aminoácidos cuya actividad de activación del receptor del calcio se ha confirmado:  $\gamma$ -Glu-X-Gly (X representa Cys (SNO)), Cys (S-alilo), Gly, Cys (S-Me), Abu o Ser),  $\gamma$ -Glu-Val-Y (Y representa Gly, Val, Glu, Lys, Phe, Ser, Pro, Arg, Asp, Met, Thr, His, Orn, Asn, Cys o Gln),  $\gamma$ -Glu- Ala,  $\gamma$ -Glu-Gly,  $\gamma$ -Glu-Cys,  $\gamma$ -Glu-Met,  $\gamma$ -Glu-Thr,  $\gamma$ -Glu-Val,  $\gamma$ -Glu-Orn, Asp-Gly, Cys-Gly, Cys-Met, Glu-Cys, Gly-Cys, Leu-Asp, D-Cys,  $\gamma$ -Glu-Met (O),  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Val,  $\gamma$ -Glu-Val-NH<sub>2</sub>,  $\gamma$ -Glu-Val-ol,  $\gamma$ -Glu-Ser,  $\gamma$ -Glu-Tau,  $\gamma$ -Glu-Cys (S-Me) (O),  $\gamma$ -Glu-Leu,  $\gamma$ -Glu-Ile,  $\gamma$ -Glu-t-Leu y  $\gamma$ -Glu-Cys (S-Me), y se determinó si presentan actividad que confiere kokumi o no mediante un ensayo de evaluación sensorial.

El ensayo de evaluación sensorial se llevó a cabo, como se explica a continuación. En agua destilada que contiene glutamato sódico (0,05 g/dl), inosina monofosfato (0,05 g/dl), cloruro cálcico (1 mM), aliina (S-alil-cisteína sulfóxido: experimento control de la actividad que confiere Kokumi),  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly,  $\gamma$ -Glu-Cys,  $\gamma$ -Glu-Ala o  $\gamma$ -Glu-Val se mezclan como muestra en una cantidad de 0,2 g/dl, y se determina si presentaban o no actividad que confiere kokumi. Las soluciones de muestra que se vuelven ácidas después de la disolución de las muestras se ajustan a un pH de 6,8 a 7,2 con NaOH antes de su uso. Los resultados son representados en la Tabla 3.

## ES 2 351 094 T3

TABLA 3

*Actividad que confiere Kokumi de los activadores del receptor del calcio*

Activador de receptor de calcio	Actividad que confiere kokumi
$\gamma$ Glu-Cys-Gly	+
$\gamma$ Glu-Cys	+
$\gamma$ Glu-Ala	+
$\gamma$ Glu-Val	+

### 5 Ejemplo 13

(Únicamente como referencia)

*Actividad que transmite Kokumi de los péptidos*

20 Se midió la intensidad de la actividad que confiere kokumi de cada péptido, aquellos cuya actividad de activación del receptor del calcio se confirmó, mediante un ensayo de evaluación sensorial cuantitativo.

25 El ensayo de evaluación sensorial cuantitativo se llevó a cabo, como se explica a continuación. En agua destilada que contiene glutamato sódico (0,05 g/dl), inosina monofosfato (0,05 g/dl) y cloruro sódico (0,5 g/dl),  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly (glutación),  $\gamma$ -Glu-Ala,  $\gamma$ -Glu-Met o  $\gamma$ -Glu-Val se mezclan como muestra en una cantidad de 0,1 g/dl, y se determinó si tenían o no actividad que confiere kokumi. Las soluciones de muestra que se vuelven ácidas después de la disolución de las muestras se ajustan a un pH de 6,8 a 7,2 con NaOH antes de su uso. La evaluación se representó mediante 30 unas escalas de evaluación sensorial basadas en la muestra control (0 puntos) y las muestras a las que se ha añadido (glutación (3 puntos) y el ensayo se llevó a cabo con n=3. Los resultados son representados en la Tabla 4.

TABLA 4

Muestra	Concentración (g/dl)	Intensidad de kokumi		Observaciones de la evaluación
		Gusto inicial e intermedio	Gusto posterior	
Control	-	0	0	-
$\gamma$ -Glu-Cys-Gly	0,1	3,0	3,0	Se han potenciado la densidad, el crecimiento (textura en la boca) y la continuidad.
$\gamma$ -Glu-Ala	0,1	0,5	0,2	Aunque el efecto es débil, la densidad se ha potenciado ligeramente.
$\gamma$ -Glu-Met	0,1	1,5	0,4	La densidad y crecimiento (textura en la boca) se han potenciado ligeramente.
$\gamma$ -Glu-Val	0,1	3,0	1,0	La densidad y crecimiento (textura en la boca) se han potenciado principalmente para los sabores inicial e intermedio.

### 60 Ejemplo 14

(Únicamente como referencia)

*Actividad que confiere Kokumi de los péptidos*

65 Se midió la intensidad de la actividad que confiere kokumi de cada péptido, aquellos cuya actividad de activación del receptor del calcio se confirmó, mediante un ensayo de evaluación sensorial cuantitativo.

## ES 2 351 094 T3

El ensayo de evaluación sensorial cuantitativo se llevó a cabo, como se explica a continuación. En agua destilada que contiene glutamato sódico (0,05 g/dl), inosina monofosfato (0,05 g/dl) y cloruro sódico (0,5 g/dl),  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly (glutación),  $\gamma$ -Glu-Cys,  $\gamma$ -Glu-Val o  $\gamma$ -Glu-Val-Gly se mezclan como muestra en una cantidad de 0,1 g/dl o 0,01 g/dl según se necesite y se midió la intensidad de la actividad que confiere kokumi. Las soluciones de muestra que se vuelven ácidas después de la disolución de las muestras se ajustan a un pH de 6,8 a 7,2 con NaOH antes de su uso. La evaluación se representó mediante unas escalas de evaluación sensorial basadas en la muestra control (0 puntos) y las muestras a las que se ha añadido (glutación (3 puntos) y el ensayo se llevó a cabo con n=5. Los resultados son representados en la Tabla 5.

TABLA 5

Muestra	Concentración (g/dl)	Intensidad de kokumi		Observaciones de la evaluación
		Gusto inicial e intermedio	Gusto posterior	
Control	-	0	0	-
$\gamma$ -Glu-Cys-Gly	0,1	3,0	3,0	Se han potenciado la densidad, el crecimiento (textura en la boca) y la continuidad.
$\gamma$ -Glu-Cys	0,1	2,0	2,0	El efecto fue ligeramente más débil pero sustancialmente equivalente comparado con $\gamma$ -Glu-Cys-Gly
$\gamma$ -Glu-Val	0,1	3,0	1,0	La densidad y crecimiento (textura en la boca) se han potenciado principalmente para los sabores inicial e intermedio
$\gamma$ -Glu-Val-Gly	0,1	*	*	*
$\gamma$ -Glu-Val-Gly	0,01	3,0	3,0	Se han potenciado principalmente la densidad y la continuidad. Gusto total potenciado.

\* Inmedible: actividad que confiere kokumi era demasiado fuerte y no se pudo medir por evaluación sensorial.

### Ejemplo 15

(Únicamente como referencia)

#### Actividad que confiere Kokumi de los péptidos

Se midió la intensidad de la actividad que confiere kokumi de cada péptido, aquellos cuya actividad de activación del receptor del calcio se confirmó, mediante un ensayo de evaluación sensorial cuantitativo.

El ensayo de evaluación sensorial cuantitativo se llevó a cabo, como se explica a continuación. En agua destilada que contiene glutamato sódico (0,05 g/dl), inosina monofosfato (0,05 g/dl) y cloruro sódico (0,5 g/dl),  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly (glutación),  $\gamma$ -Glu-Ala-Gly o  $\gamma$ -Glu-Val-Gly se mezclan como muestra en una cantidad de 0,1 g/dl o 0,01 g/dl según se necesite y se midió la intensidad de la actividad que confiere kokumi. Las soluciones de muestra que resultan ácidas después de la disolución de las muestras se ajustan a un pH de 6,8 a 7,2 con NaOH antes de su utilización. La evaluación se representó mediante unas escalas de evaluación sensorial basadas en la muestra control (0 puntos) y las muestras a las que se ha añadido glutación (3 puntos) y el ensayo se llevó a cabo con n=12. Los resultados se representan en la Tabla 6.

## ES 2 351 094 T3

TABLA 6

Muestra	Concentración (g/dl)	Intensidad de kokumi		Observaciones de la evaluación
		Gusto Inicial e intermedio	Gusto posterior	
Control	-	0	0	-
$\gamma$ Glu-Cys-Gly	0,1	3,0	3,0	Se han potenciado la densidad, el crecimiento (textura en la boca) y la continuidad.
$\gamma$ Glu-Abu-Gly	0,01	3,0	2,0	La densidad y crecimiento (textura en la boca) se han potenciado principalmente para los gustos inicial e intermedio.
$\gamma$ Glu-Val-Gly	0,01	3,0	3,0	* Se han potenciado principalmente la densidad y la continuidad. Gusto total potenciado.

### Ejemplo 16

(Únicamente como referencia)

#### *Actividad de los péptidos en los sabores básicos*

Se midió la intensidad de la actividad que confiere kokumi de cada péptido, aquellos cuya actividad de activación del receptor del calcio se confirmó, mediante un ensayo de evaluación sensorial cuantitativo.

El ensayo de evaluación sensorial cuantitativo se llevó a cabo, como se explica a continuación. En agua destilada que contiene glutamato sódico (0,2 g/dl) como una solución estándar umami, sacarosa (5 g/dl) como solución estándar de sabor dulce, cloruro sódico (0,7 g/dl) como solución estándar de gusto salado o ácido cítrico (0,05 g/dl) como solución estándar de gusto ácido,  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly (glutación), o  $\gamma$ -Glu-Val-Gly se mezclan como muestra a una concentración de 0,0001 g/dl a 1 g/dl y se midió la intensidad de la actividad sobre gustos ácidos.

Las soluciones de muestra que resultan ácidas después de la disolución de las muestras con respecto a las soluciones estándar sin las muestras se ajustan con NaOH a un pH no superior o inferior en 0,2 en relación con las soluciones estándar antes de su utilización. La evaluación se representó mediante las escalas siguientes de evaluación sensorial: 0 para la muestra control, 1 punto para la actividad ligeramente intensa del control, y 2 puntos para una actividad intensa del control y el ensayo se realizó con n=12. Las muestras presentaron una actividad que potencia el gusto ácido a unas concentraciones dentro del amplio intervalo de concentraciones mencionados anteriormente. Los resultados para las concentraciones generales se representan en la Tabla 7.

TABLA 7

Sistema de evaluación	Agua destilada	$\gamma$ Glu-Cys-Gly 0,10 g/dl	$\gamma$ Glu-Val-Gly 0,005 g/dl	$\gamma$ Glu-Val-Gly 0,01 g/dl
Umami	0	0,7	0,7	1,5
Gusto dulce	0	1,5	0,5	1,0
Sabor salado	0	0,2	0,5	1,0
Gusto ácido	0	1,5	0,5	1,0

### Ejemplo 17

(Únicamente como referencia)

#### *Actividad de los péptidos para conferir kokumi a la sopa de consomé*

Se midió la intensidad de la actividad que transmite kokumi a la sopa de consomé de cada péptido, aquellos cuya actividad de activación del receptor del calcio se confirmó, mediante un ensayo de evaluación sensorial cuantitativo.

## ES 2 351 094 T3

El ensayo de evaluación sensorial cuantitativo se llevó a cabo, como se explica a continuación. La sopa de consomé se preparó disolviendo polvos de sopa de consomé (35% de cloruro sódico, 18% de glutamato sódico, 0,2% de inopina monofosfato, 0,3% de pimienta blanca en polvo, 0,5% de pimienta negra en polvo, 8,0% de extracto de buey en polvo, 3,0% de vino blanco en polvo, 2,0% de polvo de apio, 8,0% de extracto de col china en polvo, 2,5% de extracto de cebolla en polvo, 25,5% de lactosa) a una concentración de 5 g/dl. Se mezcló en esta sopa de consomé  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly (glutación) o  $\gamma$ -Glu-Val-Gly como una muestra a una concentración de 0,0001 a 1 g/dl, y se midió la intensidad de la actividad que confiere el kokumi para cada muestra. La sopa de consomé con las muestras que resultan ácidas después de la disolución de las muestras con respecto a la sopa de consomé sin las muestras se ajustaron con NaOH a un pH no superior o inferior en 0,2 en relación con las soluciones estándares antes de su utilización. La evaluación se representó mediante las escalas siguientes de evaluación sensorial: 0 para la muestra control, 3 puntos para la actividad intensa del control y 5 puntos para una actividad extremadamente intensa del control y el ensayo se realizó con n=12. Las muestras presentaron una actividad que confiere kokumi a unas concentraciones dentro del amplio intervalo de concentraciones mencionados anteriormente. Los resultados para las concentraciones generales se representan en la Tabla 8.

TABLA 8

Muestra	Concentración (g/dl)	Intensidad de kokumi		Observaciones de la evaluación
		Gusto inicial e intermedio	Gusto posterior	
Control	-	0	0	-
$\gamma$ Glu-Cys-Gly	0,01	3,0	3,0	Se han potenciado la densidad, el crecimiento (textura en la boca) y la continuidad.
$\gamma$ Glu-Val-Gly	0,0005	2,5	3,0	La densidad y crecimiento (textura en la boca) se han potenciado principalmente para los gustos del inicial e intermedio.
$\gamma$ Glu-Val-Gly	0,001	3,0	3,5	La densidad y crecimiento (textura en la boca) se han potenciado principalmente para los gustos inicial e intermedio.
$\gamma$ Glu-Val-Gly	0,01	5,0	5,0	Se han potenciado principalmente la densidad y la continuidad. Se potenció el gusto total potenciado.
$\gamma$ Glu-Val-Gly	0,1	5,0	5,0	Se han potenciado principalmente la densidad y la continuidad. Se potenció el gusto total potenciado.

### Ejemplo 18

(Únicamente como referencia)

#### *Actividad de los péptidos para conferir kokumi a la sopa Japonesa ligera*

Se midió la intensidad de la actividad para conferir kokumi a la sopa ligera japonesa de cada péptido, aquellos cuya actividad de activación del receptor del calcio se confirmó, mediante un ensayo de evaluación sensorial cuantitativo.

El ensayo de evaluación sensorial cuantitativo se llevó a cabo, como se explica a continuación. La sopa ligera Japonesa se preparó añadiendo 0,5 g/dl de salsa de soja y 0,6 g/dl de cloruro sódico de un reservorio de alga bonito (una solución que se obtiene añadiendo 5 g de algas secas a 3 litros de agua, se calienta el agua, se añaden 25 g de copos secos de bonito justo antes de hervirlo y después se filtra el agua que contiene el alga y los copos de bonito). En esta sopa ligera,  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly (glutación), o  $\gamma$ -Glu-Val-Gly se mezclan como muestra a una concentración de 0,0001 g/dl a 1 g/dl y se midió la intensidad de la actividad que confiere kokumi. La sopa ligera con las muestras que resultan ácidas después de la disolución de las muestras con respecto a la sopa ligera sin las muestras se ajustaron con NaOH a un pH no superior o inferior en 0,2 al pH de la sopa ligera sin las muestras antes de su utilización. La evaluación se

## ES 2 351 094 T3

representó mediante las escalas siguientes de evaluación sensorial: 0 para la muestra control, 3 puntos para la actividad intensa del control y 5 puntos para una actividad extremadamente intensa del control y el ensayo se realizó con n=12. Las muestras presentaron una actividad que confiere kokumi a unas concentraciones dentro del amplio intervalo de concentraciones mencionados anteriormente. Los resultados para las concentraciones generales son representados en la Tabla 9.

TABLA 9

Muestra	Concentración (g/dl)	Intensidad de kokumi		Observaciones de la evaluación
		Inicial e intermedio	Gusto posterior	
Control	-	0	0	-
$\gamma$ Glu-Cys-Gly	0,01	2,0	2,0	Se han potenciado la densidad, el crecimiento (textura en la boca).
$\gamma$ Glu-Val-Gly	0,0005	2,5	3,0	La densidad, el crecimiento (textura en la boca) y la continuidad se han potenciado principalmente para los gustos iniciales e intermedios.
$\gamma$ Glu-Val-Gly	0,001	3,5	4,0	La densidad, el crecimiento (textura en la boca) y la continuidad se potencian principalmente para los gustos inicial e intermedio.
$\gamma$ Glu-Val-Gly	0,01	5,0	5,0	Se han potenciado principalmente la densidad y la continuidad. Se potenció el gusto total potenciado.
$\gamma$ Glu-Val-Gly	0,1	5,0	5,0	Se han potenciado principalmente la densidad y la continuidad. Se potenció el gusto total potenciado.

### Ejemplo 19

(Únicamente como referencia)

#### *Actividad de los péptidos para conferir kokumi a la sopa de maíz*

Se midió la intensidad de la actividad que confiere kokumi a la sopa de maíz de cada péptido, aquellos cuya actividad de activación del receptor del calcio se confirmó, mediante un ensayo de evaluación sensorial cuantitativo.

El ensayo de evaluación sensorial cuantitativo se llevó a cabo, como se explica a continuación. En una sopa de maíz disponible comercialmente,  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly (glutación), o  $\gamma$ -Glu-Val-Gly se mezclan como muestra a una concentración de 0,0001 g/dl a 1 g/dl y se midió la intensidad de la actividad que confiere kokumi. La sopa de maíz con las muestras que resultan ácidas después de la disolución de las muestras con respecto a la sopa de maíz sin las muestras se ajustaron con NaOH a un pH no superior o inferior en 0,2 al pH de la sopa de maíz sin muestras antes de su utilización. La evaluación se representó mediante las escalas siguientes de evaluación sensorial: 0 para la muestra control, 3 puntos para la actividad intensa del control y 5 puntos para una actividad extremadamente intensa del control y el ensayo se realizó con n=12. Las muestras presentaron una actividad que transmite kokumi a unas concentraciones dentro del amplio intervalo de concentraciones mencionados anteriormente. Los resultados para las concentraciones generales se representan en la Tabla 10.

TABLA 10

Muestra	Concentración (g/dl)	Intensidad de kokumi		Observaciones de la evaluación
		Gusto inicial e intermedio	Gusto posterior	
Control	-	0	0	-
$\gamma$ Glu-Cys-Gly	0,01	3,0	3,0	Se han potenciado la riqueza, la densidad y el crecimiento (textura en la boca).
$\gamma$ Glu-Val-Gly	0,0005	2,5	3,0	El sabor dulce, el crecimiento (textura en la boca) y la continuidad se han potenciado principalmente para los sabores inicial e intermedio.
$\gamma$ Glu-Val-Gly	0,001	3,5	4,0	El sabor dulce, el crecimiento (textura en la boca) y la continuidad se han potenciado principalmente para los sabores inicial e intermedio.
$\gamma$ Glu-Val-Gly	0,01	4,5	5,0	El crecimiento (textura en la boca) y la continuidad se han potenciado principalmente. Se potenció el sabor total.
$\gamma$ Glu-Val-Gly	0,1	5,0	5,0	El crecimiento (textura en la boca) y la continuidad se han potenciado principalmente. Se potenció el sabor total.

## Ejemplo 20

(Únicamente como referencia)

*Actividad de los péptidos para conferir kokumi a una salsa curry*

Se midió la intensidad de la actividad que confiere kokumi a una salsa de curry de cada péptido, aquellos cuya actividad de activación del receptor del calcio se confirmó, mediante un ensayo de evaluación sensorial cuantitativo.

El ensayo de evaluación sensorial cuantitativo se llevó a cabo, como se explica a continuación. En la salsa de curry que se prepara de la forma convencional utilizando una salsa de harina y grasa de curry disponible comercialmente,  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly (glutación), o  $\gamma$ -Glu-Val-Gly se mezclan como muestra a una concentración de 0,0001 g/dl a 1 g/dl y se midió la intensidad de la actividad que confiere kokumi. La salsa de curry con las muestras que se vuelven ácidas después de la disolución de las muestras con respecto a la salsa de curry sin las muestras se ajustaron con NaOH a un pH no superior o inferior en 0,2 al pH de la salsa de curry sin muestras antes de su utilización. La evaluación se representó mediante las escalas siguientes de evaluación sensorial: 0 para la muestra control, 3 puntos para la actividad intensa del control y 5 puntos para una actividad extremadamente intensa del control y el ensayo se realizó con n=12. Las muestras presentaron una actividad que confiere kokumi a unas concentraciones dentro del amplio intervalo de concentraciones mencionados anteriormente. Los resultados para las concentraciones generales se representan en la Tabla 11.

TABLA 11

Muestra	Concentración (g/dl)	Intensidad de kokumi		Observaciones de la evaluación
		Gusto inicial e intermedio	Gusto posterior	
Control	-	0	0	-
$\gamma$ Glu-Cys-Gly	0,01	3,0	3,0	Se han potenciado la riqueza, la densidad y la continuidad.
$\gamma$ Glu-Val-Gly	0,001	2,5	3,0	La suavidad, la riqueza y el crecimiento (textura en la boca) se han potenciado principalmente.
$\gamma$ Glu-Val-Gly	0,005	3,5	4,0	La suavidad, la riqueza y el crecimiento (textura en la boca) se han potenciado principalmente.
$\gamma$ Glu-Val-Gly	0,01	5,0	5,0	La riqueza y la continuidad se han potenciado principalmente. Se potenció el sabor total.
$\gamma$ Glu-Val-Gly	0,1	5,0	5,0	La riqueza y la continuidad se han potenciado principalmente. Se potenció el gusto total.

## Ejemplo 21

(Únicamente como referencia)

Actividad para conferir kokumi observada cuando se utilizan en combinación los péptidos y aditivos como los activadores conocidos del receptor calcio

Se midió la intensidad de la actividad que confiere kokumi cada péptido cuya actividad de activación del receptor del calcio se confirmó, utilizando en combinación con un aditivo como los activadores conocidos del receptor del calcio, mediante un ensayo de evaluación sensorial cuantitativo.

El ensayo de evaluación sensorial cuantitativo se llevó a cabo como se explica a continuación. En agua destilada que contiene glutamato sódico (0,05 g/dl), inosina monofosfato (0,05 g/dl) y cloruro sódico (0,5 g/dl), se mezclan 0,0001 a 1 g/dl de  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly (glutación) o  $\gamma$ -Glu-Val-Gly o uno de estos péptidos y otro activador del receptor del calcio (lactato cálcico, protamina o polilisina) o GABA (concentración de adición: 0,0001 a 1 g/dl) y se midió la intensidad de la actividad que confiere kokumi. Las soluciones de muestra que se vuelven ácidas después de la disolución de las muestras se ajustan a un pH de 6,8 a 7,2 con NaOH antes de su utilización. La evaluación se representó mediante las escalas siguientes de evaluación sensorial: 0 para la muestra control, 3 puntos para una actividad intensa (tan intensa como 0,05 g/dl de  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly y 0,005 g/dl de  $\gamma$ -Glu-Val-Gly) y 6 puntos para una intensidad extremadamente intensa (como el doble de la intensidad de 0,05 g/dl de  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly y 0,005 g/dl de  $\gamma$ -Glu-Val-Gly) y el ensayo se llevó a cabo con n=12. Las muestras presentaron una actividad que confiere kokumi a unas concentraciones dentro del amplio intervalo de concentraciones mencionadas anteriormente. Los resultados para las concentraciones típicas son representados en la tabla 12. A modo de resultado, un compuesto existente que presenta una actividad que confiere kokumi, glutación, representa también una actividad que confiere kokumi así como el agente que confiere kokumi de la presente invención cuando se utiliza con un activador existente del receptor de calcio o similares como el calcio.

# ES 2 351 094 T3

TABLA 12

Muestra	Concentración (g/dl)	Aditivo	Concentración (g/dl)	Intensidad de kokumi		Observaciones de la evaluación
				Gusto inicial e intermedio	Gusto posterior	
-	-	-	-	0	0	
γGlu-Cys-Gly	0,05	-	-	3,0	3,0	Grosor, crecimiento (textura en la boca) y continuidad
γGlu-Val-Gly	0,005	-	-	3,0	3,0	Grosor y continuidad
-	-	Lactato cálcico	0,25	0,5	0,5	Grosor
-	-	Protamina	0,005	1,5	1,0	Crecimiento (textura en la boca)
-	-	Polilisina	0,001	0,5	0,5	Grosor
-	-	GABA	0,025	0,5	0,5	Grosor
γGlu-Cys-Gly	0,05	Lactato cálcico	0,25	3,5	4,0	Grosor, crecimiento (textura en la boca) y continuidad.
γGlu-Cys-Gly	0,05	Protamina	0,005	4,5	4,5	Grosor, crecimiento (textura en la boca) y continuidad.
γGlu-Cys-Gly	0,05	Polilisina	0,001	3,5	4,0	Grosor, crecimiento (textura en la boca) y continuidad
γGlu-Cys-Gly	0,05	GABA	0,025	4,5	4,5	Grosor, crecimiento (textura en la boca) y continuidad
γGlu-Val-Gly	0,005	Lactato cálcico	0,25	5,0	5,0	Grosor y continuidad
γGlu-Val-Gly	0,005	Protamina	0,005	4,5	4,5	Grosor, crecimiento (textura en la boca) y continuidad
γGlu-Val-Gly	0,005	Polilisina	0,001	4,5	4,5	Grosor y continuidad
γGlu-Val-Gly	0,005	GABA	0,025	4,5	4,5	Riqueza y grosor.

## 35 Aplicabilidad industrial

Mediante la invención presente, se ha desarrollado un procedimiento para el cribado de una sustancia que confiere el kokumi que utiliza la activación del receptor de calcio como índice. Por consiguiente, se puede utilizar el denominado cribado de alto rendimiento y de este modo es posible el desarrollo de una sustancia con gusto kokumi incluso más altamente eficiente.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para el cribado de una sustancia que confiere el kokumi, es decir una sustancia que puede potenciar el sabor salado, umami, sabor dulce, sabor ácido o el sabor amargo, que comprende la reacción de un receptor del calcio y una sustancia de prueba y la detección de la actividad del receptor del calcio para indicar un posible efecto que confiere el kokumi a las sustancias de prueba.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

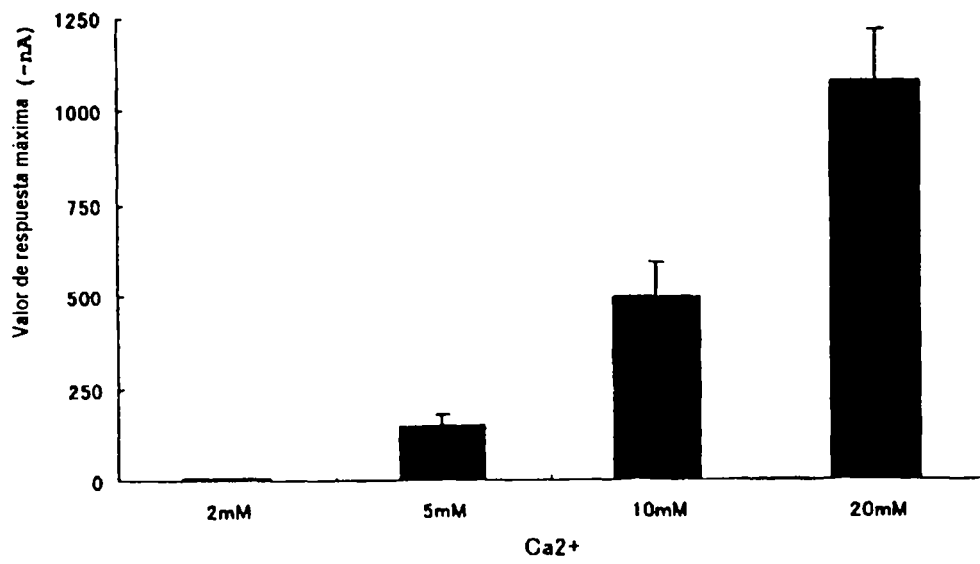


Fig. 1

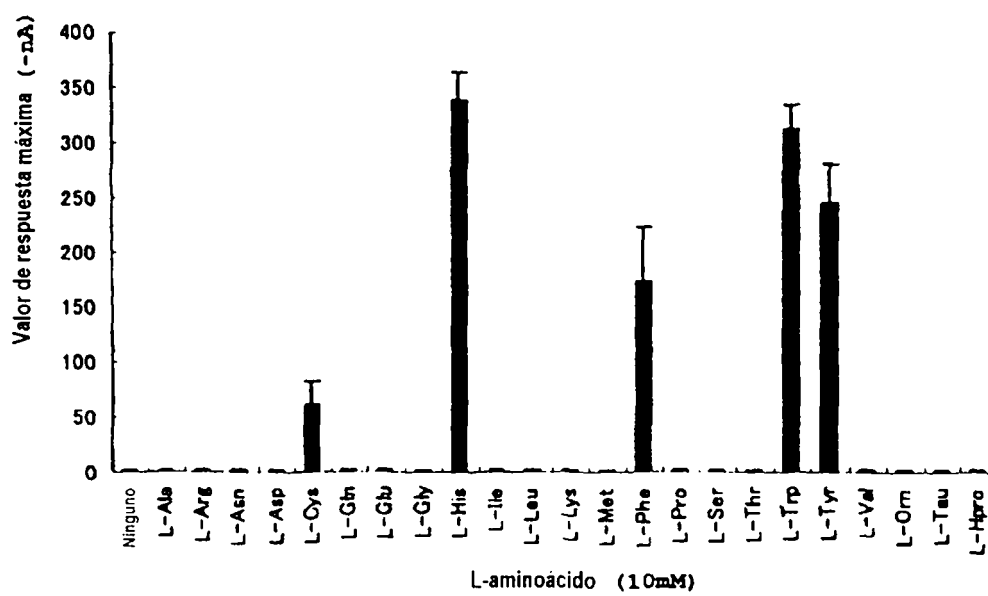


Fig. 2

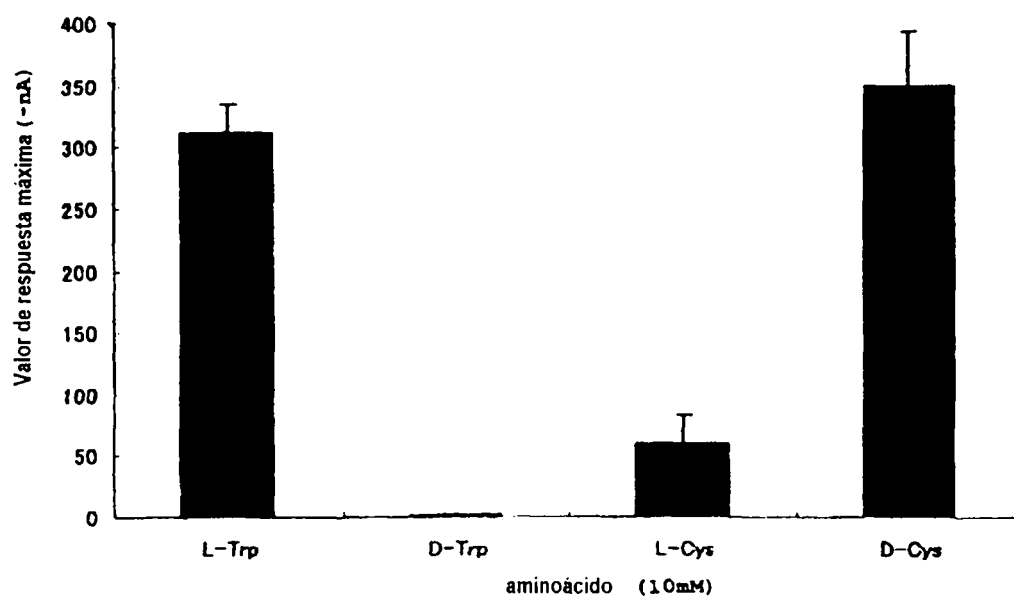


Fig. 3

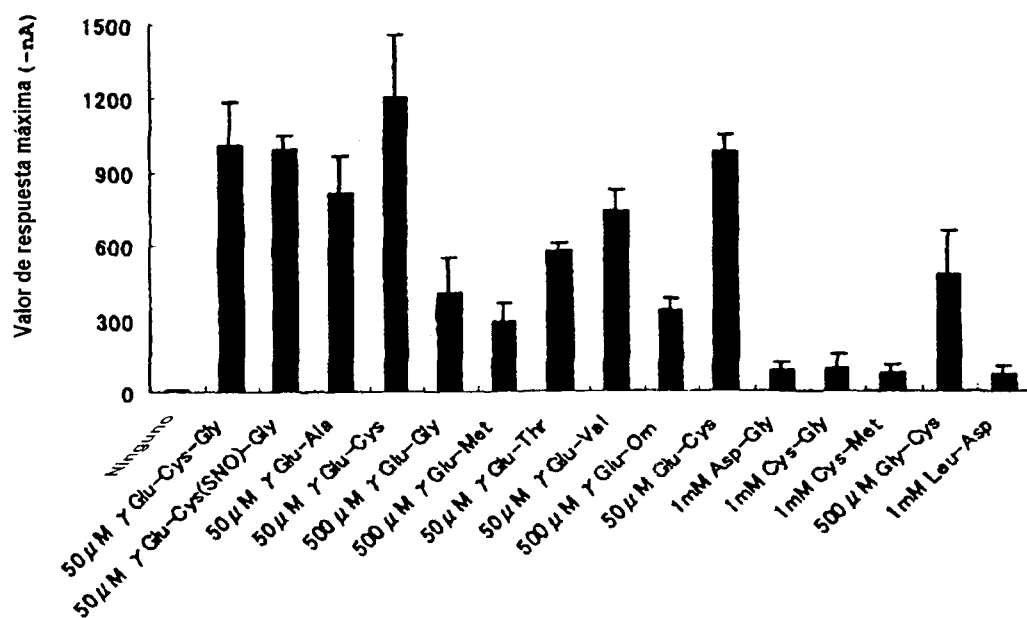


Fig. 4

# ES 2 351 094 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Ajinomoto Co., Inc.

5 <120> Agente que confiere el kokumi

<130> C565-C6200

10 <150> JP2005-325300

<151> 2005-11-09

<150> US 60/738562

15 <151> 2005-11-22

<150> JP2006-188458

<151> 2006-07-07

20

<150> US 60/807831

<151> 2006-07-20

25 <160> 2

<170> PatentIn version 3.1

30 <210> 1

<211> 49

<212> ADN

<213> Artificial

35

<220>

<223> cebador hCASR\_N

40 <400> 1

actaatataga ctactatag ggacatggc atttatagc tgctgctgg

49

45 <210> 2

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

50

<220>

<223> cebador hCASR\_C

55 <400> 2

ttatgaattc actacgtttt ctgtaacag

29

60

65