



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 603 20 682 T2** 2009.06.10

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 581 555 B1**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07K 14/47** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **603 20 682.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CH03/00830**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 776 743.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2004/055048**

(86) PCT-Anmeldetag: **17.12.2003**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **01.07.2004**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.10.2005**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **30.04.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.06.2009**

(30) Unionspriorität:  
**434790 P 18.12.2002 US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR**

(73) Patentinhaber:  
**Givaudan S.A., Vernier-Geneve, CH**

(72) Erfinder:  
**SLACK, Jay Patrick, Loveland, OH 45140, US;  
MCCLUSKEY, Thomas Scott, Amelia, OH 45102,  
US**

(74) Vertreter:  
**Spott, Weinmiller & Böhm, 80336 München**

(54) Bezeichnung: **CHIMÄRE ALPHA Q-GUSTDUCIN G-PROTEINE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

**[0001]** Die Erfindung betrifft chimäre G-Proteine und insbesondere solche, die in Geschmacksrezeptortransduktionswegen vermitteln. Die Erfindung betrifft auch Tests, die auf heterologe Expressionssysteme basieren, die diese Proteine enthalten und ihre Verwendung beim Screenen auf Modulatoren für Modulatoren der bitteren, süßen und umami Geschmacksreaktion beim Menschen.

**[0002]** Die Geschmacksempfindung kann in 5 getrennte Modalitäten klassifiziert werden: Bitter, salzig, sauer, süß und umami. Geschmacksstoffe beeinflussen die Palatabilität von Nahrung und Getränken und beeinflussen daher die Essgewohnheiten des Menschen. Das Verstehen und Beeinflussen der Mechanismen der Geschmacksübertragung hat Auswirkungen auf die Nahrungsmittel- und Pharmaindustrien. Falls die Geschmacksübertragungswege beeinflusst werden können, kann es möglich sein, Tests zu entwerfen, die auf heterologe Expressionssysteme beruhen, die wiederum verwendet werden können, um Verbindungen zu identifizieren, die die Geschmacksreaktion modulieren und hierdurch bestimmte Nahrungsmittel schmackhafter zu machen oder die Patientencompliance für orale Pharmazeutika und Nahrungsergänzungsmittel zu erhöhen.

**[0003]** Es wurde bereits viel über die Mechanismen der Geschmacksübertragung veröffentlicht. Die Empfindung des Geschmacks wird durch die Wechselwirkung der Geschmacks-moleküle mit ihren Rezeptoren initiiert, die in der Membran von Zellen gefunden werden, die in den Geschmacksknospen gefunden werden, welche im Zungenepithel der fungiformen, folaten und circumvallaten Papillen wie auch in den Gaumenweichteilen und der Epiglottis lokalisiert sind. Kürzliche Fortschritte in biochemischen und physiologischen Untersuchungen haben es Forschern ermöglicht, die Schlussfolgerung zu treffen, dass die süße, umami und bittere Geschmacksübertragung großteils durch sogenannte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder GPCRs vermittelt wird.

**[0004]** GPCRs sind Zelloberflächenproteine, die fähig sind, Geschmacks-moleküle zu binden, wobei sie an G-Proteine kuppeln und zelluläre Prozesse initiieren, die sekundäre Botenstoffe bilden, wie Calciumionen, welche es den Zellen ermöglichen, ein Signal an das Gehirn zu senden, das eine Geschmacksreaktion anzeigt. Im allgemeinen werden GPCRs als  $G_q$ -,  $G_i$ -,  $G_o$ - und  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren klassifiziert, wobei die Angabe den primären G-Proteineffektor in ihren jeweiligen Signaltransduktionswegen widerspiegelt. Die Geschmacksrezeptoren werden als  $G_i$ -gekoppelte GPCRs aufgrund ihrer Wechselwirkung mit Gustducin klassifiziert, das ein  $G_q$ -Typ H-Protein ist.

**[0005]** Die kürzliche Identifizierung von Genen, die die GPCRs kodieren, welche bei der bitteren, süßen und umami Geschmacksentwicklung beteiligt sein dürften, erlaubt die Entwicklung von heterologen Expressionssystemen, die zur Identifizierung von chemischen Molekülen brauchbar sein können, die die Geschmacks-transduktionswege modulieren. Beispielsweise erlaubt die Verfügbarkeit und die Verwendung von Rezeptoren in heterologen Expressionssystemen das Screenen auf Hochaffinitätsagonisten, Antagonisten, inverse Agonisten und Modulatoren der Geschmacksaktivität. Jedoch gibt es viele technische Herausforderungen bei der Entwicklung von verlässlichen Tests, die auf heterologen Expressionssystemen basieren. Ein Problem liegt in der verlässlichen Expression hoher Konzentrationen an GPCRs an der Oberfläche einer fremden Wirtszelle. Ein zweites Problem ist die Maßgabe von G-Proteinen, die nicht nur zur Kupplung mit vielen verschiedenen Typen an GPCRs fähig sind (oft werden solche G-Proteine auch als "unspezifisch" bezeichnet), sondern mit hoher Effizienz kuppeln, so dass sogar mit relativ geringen Oberflächenkonzentrationen an GPCRs das Zellsignal so stark wie möglich ist.

**[0006]** In Bezug auf dieses zweite Problem ist von den sogenannten  $G_{aq}$  Proteinen,  $G_{a15}$  und  $G_{a16}$  bekannt, dass sie an viele Klassen an GPCRs binden. Ferner kuppeln sie GPCRs an die Aktivierung der Phospholipase C, was wiederum zu einer Zunahme der intrazellulären Calciumspiegel führt. Diese Signalkaskade kann leicht und schnell durch das Messen der Calciumspiegel in den Zellen gemessen werden, wie dies in Technik bekannt ist (siehe beispielsweise WO 01 18 050 A). Jedoch werden  $G_{a15}$  und  $G_{a16}$  nicht als universell unspezifische G-Proteine bezeichnet, da mehrere Rezeptoren existieren, die unfähig sind, sie zu aktivieren, siehe beispielsweise Offermanns, S. and Simon, M., 1995, J. Biol. Chem., 270: 15175–15180; Lee, J.W.M. et al., 1998, J Neurochem., 70: 2203–2211; Huang, Y. et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 3975–3978.; Wu, D. et al., 1992, J. Biol. Chem. 267: 25798–25802; Wu, D. et al., 1993, Science, 261: 101–103; Zhu, X and Bimbaumer, 1, PNAS USA, 93: 2827–2831; Parmentier, M. L. et al., 1998, Mol. Pharmacol., 53: 778–786). Ferner deutet die publizierte Literatur an, dass die meisten dieser GPCRs, die besonders ineffektiv bei der Aktivierung von  $G_{a15}$  und  $G_{a16}$  G-Proteinen sind, die GPCRs vom  $G_i$ -Typ sind (Mody, S.M. et al., 2000, Mol. Pharmacol., 57: 13–23).

**[0007]** Da süße, umami und bittere Geschmacksrezeptoren an Gustducin (ein  $G_{ai}$  Typ G-Protein) kuppeln

dürften und die vorher erwähnten Studien nahelegen, dass  $G_{\alpha 15}$  und  $G_{\alpha 16}$  keine optimalen Partner für  $G_{\alpha i}$ -Typ GPCRs sind, würde somit ein Fachmann keine effiziente Kupplung der aktivierten Geschmacksrezeptoren weder an  $G_{\alpha 15}$  noch  $G_{\alpha 16}$  erwarten. Andererseits bietet Gustducin selbst keine praktische Lösung da dieses G-Protein die Freisetzung von cyclischen Nukleotiden (cNMPs) anbietet, die nicht so leicht gemessen werden können, wie beispielsweise Zunahme in Calciumionen. Es ist technisch schwierig cNMPs zu messen erfordert einen Immuntest, der im allgemeinen in der Größenordnung von 4 bis 6 Stunden erfordert und dann nur eine Endpunktbestimmung bietet. Ferner ist es kompliziert ein spezialisiertes  $G_{\alpha i}$  Protein, wie Gustducin, in einem heterologen Expressionssystem zu verwenden. Um dies zu erreichen muss man zwei zusätzliche G-Proteinuntereinheiten (die beta und gamma Untereinheiten) in die heterologen Wirtszellen einführen, um den Geschmacksrezeptor-G-Protein Komplex vollkommen zu rekonstituieren.  $G_{\alpha 16}$  kann andererseits mit beta/gamma Untereinheiten komplexieren, die in Sängerzellen endogen sind, wie Zellen der HEK 293 Zelllinie. Es ist schneller, leichter und empfindlicher  $G_{\alpha 16}$  anstelle des  $G_{\alpha i}$ -Typs des G-Proteins zu verwenden, wie Gustducin.

**[0008]** Es besteht ein Bedarf, G-Proteine zu entwickeln, die eine hohe Affinität für einen weiten Bereich an Geschmacksrezeptoren zeigen und insbesondere süße, umami und bittere Rezeptoren, die in heterologe Expressionssystemtests eingebaut werden können, um auf Modulatoren der humanen Geschmacksreaktion zu screenen und hierbei die Aktivität von bekannten Geschmacksmolekülen zu quantifizieren und neue zu finden.

**[0009]** Die Verwendung von chimären Proteinen wurde im Stand der Technik vorgeschlagen. In WO 02 36 622 A wird ein chimäres Protein beschrieben, dass mit mindestens 5 Aminosäureeinheiten vom C-Terminus von Transducin substituiert ist. Solche chimären Proteine sind als unspezifischer als das native  $G_{\alpha q}$  in Bezug auf zwei chemosensorische GPCRs beschrieben. Erwähnenswert ist jedoch, dass der einzige in dieser Literaturstelle getestete Geschmacksrezeptor ein bitterer Rezeptor der Maus war. Daher ist es nicht klar, ob eines der beschriebenen chimären G-Proteine effizienter an humane bittere, süße oder umami Geschmacksrezeptoren koppeln würde.

**[0010]** S.M. Mody beschreibt in Molecular Pharmacology 57: 13–23 (2000) eine Chimäre von  $G_{\alpha 16}$  und eine spezifische Sequenz von  $G_{\alpha z}$  und ihre Unspezifität gegenüber  $G_i$ -gekuppelten Rezeptoren. Mody kommt zu der Schlussfolgerung, dass die chimären Proteine keine universellen Adaptoren für GPCRs sind, sie aber fähig sind, die Erkennung von bestimmten Untergruppen an GPCRs zu verbessern. Erwähnenswerterweise umfasst keiner der GPCRs in den untersuchten Untergruppen Geschmacksrezeptoren.

**[0011]** Überraschenderweise wurde nun festgestellt, dass chimäre G-Proteine, die auf  $G_{\alpha q}$ -Gustducin basieren, dazu fähig sind, einen weiten Bereich an bekannten und putativen Bittergeschmacksrezeptoren und süße und umami Rezeptoren mit hoher Affinität zu binden.

**[0012]** Demnach liefert die Erfindung in einem ersten Aspekt ein chimäres  $G_{\alpha q}$ -Gustducin G-Protein.

**[0013]** In einer spezifischen Ausführungsform ist das chimäre  $G_{\alpha q}$ -Gustducin ein  $G_{\alpha 15}$  oder  $_{16}$ -Gustducin Protein, genauer gesagt ein  $G_{\alpha 16}$ -Gustducin Protein.

**[0014]** In einer weiteren spezifischen Ausführungsform ist das G-Protein eines, worin zumindest 5 Aminosäuren von  $G_{\alpha q}$  durch eine entsprechende Anzahl an Aminosäuren von Gustducin ersetzt sind, genauer gesagt sind die letzten 44 Aminosäuren des  $G_{\alpha q}$  durch eine 44 Aminosäuren lange Einheit von Gustducin ersetzt.

**[0015]** In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Protein mit Aminosäuresequenzen bereitgestellt, wie dies in der SEQ ID Nr. 2 gezeigt ist.

**[0016]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung liefert eine Nukleinsäure, die für ein wie hierin oben definiertes Protein kodiert.

**[0017]** In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nukleinsäure die in SEQ ID Nr. 1 dargestellte Nukleotidsequenz.

**[0018]** Während die chimären Proteine der vorliegenden Erfindung durch Ausführung von Substitutionen am C-Terminus von Gustducin gebildet werden können, erkennt der Fachmann, dass andere Substitutionen oder Mutationen in die G-Proteine eingebaut werden können, die ihre Unspezifität und/oder das Maß der Kupplung an einen gegebenen Rezeptor beeinflussen und diese Varianten der G-Proteine bilden einen weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung. Ferner können solche Substitutionen oder Mutationen ohne dem Fachmann ausgeführt werden, der Zugriff auf eine erfinderische Aktivität hat, indem man einfach Routinetechniken der Gen-

technologie verwendet, wie PCR, Genklonierung, ortsspezifische Mutagenese oder cDNAs, Transfektion von Wirtszellen und in vitro Transkription. Danach können diese Varianten auf die funktionelle Kupplung an die Rezeptoren gescreened werden.

**[0019]** In einer spezifischen Ausführungsform des Aspekts der Erfindung wird eine Variante bereitgestellt, die ein Polypeptid ist, das 80%, vorzugsweise 90%, bevorzugter 95% oder eine größere Homologie zu der Sequenz aufweist, die in SEQ ID Nr. 2 gezeigt ist.

**[0020]** Andere Aspekte der Erfindung sind ein Expressionsvektor, der eine Nukleinsäure umfasst, die für hierin definierte chimäre Proteine kodiert und Wirtszellen, die mit diesem Vektor transformiert oder transfiziert sind.

**[0021]** In einem weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung eines chimären G-Proteins bereitgestellt, wie dies definiert ist, das umfasst den Kultivierungsschritt von Wirtszellen, wie sie definiert sind, wobei hierin ein Expressionsvektor enthalten ist der für das chimäre G-Protein kodiert, unter Bedingungen, die für die Expression des G-Proteins ausreichend sind, wobei die Bildung des Proteins veranlasst wird und Gewinnung des Proteins, das durch die Zelle gebildet wird.

**[0022]** In einem weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Analyse und Auffindung von Modulatoren von Geschmacksrezeptoren, insbesondere bitterer, süßer und umami Rezeptoren unter Verwendung der hierin definierten chimären Proteine bereitgestellt.

**[0023]** In einer spezifischen Ausführungsform wird ein Säugerzell-basierter Test verwendet, der ein transient transfiziertes Gen oder eine cDNA verwendet, die für ein chimäres Protein der Erfindung kodiert und einen Geschmacksrezeptor, insbesondere einen bitteren, süßen oder umami Rezeptor, wobei das Verfahren die Schritte des Zusammenbringens einer Verbindung mit den Zellen und der Bestimmung der funktionellen Wirkungen der Verbindung auf den Komplex aus Rezeptor: chimären G-Protein umfasst, wie einer Zunahme in cytosolischen sekundären Botenstoffen.

**[0024]** In einer weiteren spezifischen Ausführungsform dieses Aspekts richtet sich die Erfindung auf einen Säugerzell-basierten Test unter Verwendung eines stabil exprimierten Gens oder cDNA.

**[0025]** In einer weiteren spezifischen Ausführungsform richtet sich die Erfindung auf einen Säugerzellbasierten Test, worin die Zellen stabil sowohl den Rezeptor als auch das chimäre G-Protein exprimieren, vorzugsweise in einer induzierbaren Form.

**[0026]** In einem weiteren Aspekt der Erfindung wird eine Verbindung oder Sammlung von Verbindungen, die die Verbindung enthält, die zur Modulation der Geschmacksreaktion von Geschmacksrezeptoren fähig ist, insbesondere bitterer, süßer oder umami Rezeptoren, zur Verwendung in einem Testverfahren bereitgestellt, wie dies hierin definiert ist.

**[0027]** In einem weiteren Aspekt der Erfindung wird eine Verbindung oder eine Sammlung an Verbindungen, die die Verbindung enthält, welche als Modulator der Geschmacksreaktion unter Verwendung der hierin beschriebenen Testmethode identifiziert wurde, und Nahrungsmittel, Getränke oder orale Pharmazeutika- oder Nahrungsergänzungspräparationen, die diese enthalten, bereitgestellt.

**[0028]** Die verschiedenen Aspekte der vorliegenden Erfindung werden hierin ferner in Bezug auf die detaillierte Beschreibung, der Sequenzliste und Beispiele beschrieben.

#### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

**[0029]** Gut etablierte transiente Expressionssysteme, die später mehr im Detail diskutiert werden, können zur Etablierung der Fähigkeit der chimären G-Proteine der vorliegenden Erfindung zur Kupplung mit GPCR Geschmacksrezeptoren und insbesondere bitterer Geschmacksrezeptoren, süßer und umami Rezeptoren, verwendet werden.

**[0030]** Zellen, die sowohl ein G-Protein der Erfindung als auch einen GPCR exprimieren, können mit bekannten Geschmacksstoffen zusammengebracht werden.

**[0031]** Beispiele für bittere Geschmacksstoffe, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sind aus der Gruppe ausgewählt, die besteht aus Acteosid, Adhumulon, Adlupulon, Aesculetin, Aesculin,

L-Alanin, L-Alanyl-L-alanyl-L-alanin, L-Alanyl-L-isoleucyl-L-alanin, L-Valyl-L-valyl-amarogentin, Amaroparin, Amaroswerin, Amygdalin, Angustifolin, Antiacetylhumulon, Antiisohumulon, Arginin, L-Arginyl-leucin, Arginyl-leucyl-leucin, Arginylprolin, Asaronaldehyd, Aspartylasparaginsäure, Asparasaponin I, Atropin, Benzyl- $\beta$ -D-arabinosid, Benzyl- $\beta$ -L-arabinosid, Benzyl- $\beta$ -D-fructosid, Benzyl- $\beta$ -D-galactosid, Benzyl- $\alpha$ -D-glucosid, Benzyl- $\beta$ -D-glucosid, Benzyl- $\alpha$ -D-mannosid, Bitterpeptide, Bitterpeptide aus Sojaproteinen, Butyl- $\alpha$ -D-glucosid, Butyl- $\beta$ -D-glucosid, Koffein, Carnosiflosid II, Carnosiflosid III, Carnosiflosid IV, Catechin, Epicatechin, Epicatechingallat, Chaconin,  $\alpha$ -Chaconin,  $\beta$ -2-Chloramphenicol, Cholsäure, Cichoriin, Cohumulon, Colupulon, Cryptochlorogensäure- $\gamma$ -lacton, Cucurbitacin B, Cucurbitacin D, Cycloalanin-glycin, Cyclo-alanin-phenylalanin, Cyclo-alanin-valin, Cyclo(L-arginylglycyl-L-prolyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-isoleucyl-L-valyl), Cycloasparagin-phenylalanin, Cycloglycinphenylalanin, Cycloheximidcycloleucintryptophan, Cyclopent(b)azepin-8(1H)-on, 7-Methyl-2,3,6,7-tetrahydrocyclopent(b)azepin-8(1H)-on, 2,3,6,7-Tetrahydro-7-hydroxy-7-methylcyclopent-2-en-1-on, 2,5-Dihydroxy-5-methyl-3-(1-piperidinyl)-cyclopent-2-en-1-on, 2,5-Dihydroxy-5-methyl-3-(1-pyrrolidinyl)cyclopent-2-en-1-on, 2,3-Di-1-pyrrolidinylcyclopent-2-en-1-on, 5-Hydroxy-5-methyl-2,3-di-1-piperidinylcyclopent-2-en-1-on, 5-Hydroxy-5-methyl-2,3-di-1-pyrrolidinylcyclopent-2-en-1-on, 5-Methyl-2,3-di-1-pyrrolidinylcyclopent-2-en-1-on, 5-Methylen-2,3-di-1-pyrrolidinylcyclopent-2-en-1-on, 3-Methyl-2-(1-pyrrolidinyl)cyclophenylalaninasparaginsäure, Cycloprolinalanin, Cycloprolinasparagin, Cycloprolin-glycin, Cycloprolinisoleucin, Cycloprolinleucin, Cycloprolinmethionin, Cycloprolinphenylalanin, Cycloprolinprolin, Cycloprolinvalin, Cyclovalinphenylalanin, Cynaratriol, Cynaropicrin, Cynaropicrin, Daidzein, Daidzindenatoniumbenzoate, Denatoniumsaccharid, Dhurbin, Dihydroxybenzoesäure, 2,3-Dihydroxybenzoesäure, 2,4-Ethyl- $\beta$ -L-arabinosid, Ethyl- $\alpha$ -D-glucosid, Ethyl- $\beta$ -D-glucosid, Eustomosid, Eustomosid, Gallensäure, Epigallocatechin, Epigallocatechingallat, Gaudichaudioside F, Gelidoside, Genistein, Genistin, Gentiopicrosid, Gentistinsäure, Gentomosid, Geshoidin, 6'-O- $\beta$ -D-Glucosylgentiopicrosid, Ucozaluzanin C, Glutamylasparaginsäure, Glutamylglutaminsäure, Glycylleucin, Goitrin, Gramin, Grosshemin, Hämatoxylintetramethylether, Helicin, Heptadeca-16-en, 1-Acetoxy-2,4-dihydroxyheptadeca-16-en, 1,2,4-Trihydroxyhistidin, L-Hulupon, Humulinon, Humulon, Hydroxybenzoesäure, 4-Hymenosid A, Hymenosid B, Hymenosid C, Hymenosid D, Hymenosid E, Hymenosid F, Isohumulon, cis-Isohumulon, trans-Isoleucin, L-Isolupanin, Isosparteine, beta-Isosparteine, 10,17-Dioxo- $\beta$ -isosparteine, 10-Oxo- $\beta$ -Lactucin, L-Leucin, L-Alanyl-L-alanyl-L-leucin, N-[(2R)-6-Amino-2-[(4S)-2,5-dioxo-4-(phenylmethyl)-1-imidazolidinyl]-1-oxohexyl]-L-leucyl-L-methionyl-N-methyl-L-phenylalanyl-(4-1)-lactam, L-Leucin, Glycyl-L-alanyl-leucin, L-L-Leucin, N-(N2-L-Leucyl-L-glutaminyl)-L-leucin, N-(N-L-Leucyl-L- $\alpha$ -glutamyl)-L-leucin, N-[N2-[N2-[N-(1-L-Leucyl-L-prolyl)-L-phenylalanyl]-L-asparaginy]-L-glutaminyl]-L-leucin, N-[N2-[N-[N-(1-L-Leucyl-L-prolyl)-L-phenylalanyl]-L-seryl]-L-glutaminyl]-L-leucin, L-Leucyl-L-valyl-leucylleucin, Leucylphenylalanin, Limonin, Limoninmonolacton, Linamarin, Lotaustralin, Lupin, Lupanin, 13-Hydroxylupanin, 7-Hydroxylupinin, Epilupinine-lupoxes B, Lupoxes C, Lupulon, Luputrin, Mellein, 6-Methoxy-methionin, L-Methyl- $\alpha$ -L-arabinosid, Methyl- $\beta$ -L-arabinosid, Methyl- $\beta$ -D-glucosid, Methyl- $\alpha$ -D-glucosid-2,3-diisoleucin, Methyl- $\alpha$ -D-glucosid-2,3-dileucin, Methyl- $\alpha$ -D-glucosid-2,3-di-L-phenylalanin, Methyl- $\alpha$ -D-glucosid-2,3-dithreonin, Methyl- $\alpha$ -D-glucosid-2,3-dityrosin, Methyl- $\alpha$ -D-mannosid, Methyl- $\beta$ -L-xylopyranosid, Methyl- $\alpha$ -D-xylosid, Naringin, Neochlorogensäure- $\gamma$ -Lactone, Neohesperidin, Nuezhenid, Oleonuezhenide, Oleuropein, Olivierosid A, Olivierosid B, Olivierosid C, Perrottetin H, Phenylalanin, L-Phenyl- $\alpha$ -D-galactosid, Phenyl- $\alpha$ -D-glucosid, Phenyl- $\beta$ -D-glucosid, Phenylthioharnstoff, Phlomisid II, Piperidin-2-carbonsäure, 4-[(2-Carboxy-2-hydroxyethyl)thio]-piperidincarbonsäurecarbonsäure-2,4-[(2-carboxy-2-hydroxyethyl)thio]-prehumulon, Prelupulon, Propyl- $\beta$ -D-fructosid, Propyl- $\alpha$ -D-glucosid, Propyl- $\beta$ -D-glucosid, Protocatechuinsäure, Prunasin, Pulcherrimin, Quinidin, Quinin, Quinolizinium-7-olat, Rannitidin, Rebaudiosid C, Salicin, Salidroside, Scabrosid, Scandenosid R5, Sclareolid, Scopolin, Septemfidiosid, Seryl-lysyl-glycyl-leucin, Sinapin, Solanin,  $\alpha$ -Sparteine, Sparteine, 17-Oxostevisaliosid A, Strychnin, Suaviosid C1, Suaviosid D2, Suaviosid F, Sucroseoctaacetat, Swerosid, Swertiamann, Swertiapunimarin, Taxiphyllin, TFI (Furostan- $\beta$ -D-Galactopyranosid), Theaflavin, Theaflavingallat A, Theaflavingallat B, Tomatidin, Tomatin,  $\alpha$ -Tri-cyclodehydroisohumulon, Triflorosid, Trihydroxybenzoesäure, 2,4,6-Tryptophan, L-Uracil, 6-Propyl-2-thio-L-valin, L-Arginylglycyl-L-prolyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-isoleucyl-(BPIa)valin und L-Yohimbine.

**[0032]** Als Beispiele süßer Geschmacksstoffe oder Verbindungen, die süßen Geschmack modifizieren, können erwähnt werden Theasaponin E1, Acesulfam K, Alitame, Aspartame, CH 401, Dulcin, Erythritol, Guanidinsüßstoff, Isomalt, Isomaltosylfructosid, Isoraffinose, NC 174, Neotame, Perillartin, Phenylacetyl-glycyl-L-lysine, Saccharin, SC 45647, Natriumcyclamat, Sorbitol, Sucralose, Sucrononsäure, Suosan, Superaspartame, Methyl- $\alpha$ -L-arabinosid, Methyl- $\beta$ -L-arabinosid, Methyl- $\beta$ -D-glucosid, Methyl- $\alpha$ -D-mannosid, Methyl- $\beta$ -L-xylopyranosid, Methyl- $\alpha$ -D-xylosid, Methyl- $\alpha$ -D-glucosid-2,3-di-threonin, Methyl- $\alpha$ -D-glucosid-2,3-diisoleucin, Protocatechuinsäure, Cynarin, Glycyphyllin, Rebaudiosid C, Abrusosid A, Abrusosid B, Abrusosid C, Abrusosid D, Abrusosid E, Apioglycyrrhizin, Araboglycyrrhizin, Baiyunosid, Brazzein, Bryodulcosid, Carnosiflosid V, Carnosiflosid VI, D. cummingsii, Cyclocariosid A, Cyclocariosid I, Dulcosid A, Fluoren-4- $\alpha$ ,6-dicarbonsäure, 4- $\beta$ ,10- $\alpha$ -dimethyl-1,2,3,4,5,10-hexahydro-gaudichaudiosid A, Glycyrrhizinsäure, Hernandulcin, Hernandulcin, 4 $\beta$ -Hydroxyhesperitin-7-glucosidedihydrochalcon, Huangqiosid E, Huangqiosid E, 3-Hydroxyphloridzin, Kaempferol,

2,3-Dihydro-6-methoxy 3-O-acetat, Mabinlinmaltosyl- $\alpha$ -(1,6)-neohesperidindihydrochalcon, Mogrosid IIE, Mogrosid III, Mogrosid IIIE, Mogrosid IV, Mogrosid V, 11-Oxomogrosid V, Monatin, Monellin, Monoammoniumglycyrrhizinat (Mag), Mukuroziosid lib, Naringindihydrochalcon, Neoastilbin, Neohesperidindihydrochalcon (NHD-HC), Neomogrosid, Osladin, Pentadin, Periandrin I, Periandrin II, Periandrin 111, Periandrin IV, Periandrin V, Phlomisid I, Phlorizin, Phylodulcin, Polypodosid A, Kaliummagnesiumcalciumglycyrrhizin, Pterocaryoside A, Pterocaryoside B, Quercetin-2,3-dihydro-3-O-acetat, Quercetin-2,3-dihydro-6-methoxy, Quercetin-2,3-dihydro-6-methoxy-3-O-acetat, Rebaudiosid A, Rebaudiosid B, Rubusosid, Scandenosid R6, Siamenosid I, Natriumglycyrrhizinat, Steviolbiosid, Steviosid, Steviosid,  $\alpha$ -Glycosylsuaviosid A, Suaviosid B, Suaviosid G, Suaviosid H, Suaviosid I, Suaviosid J, Thaumatin, Triammoniumglycyrrhizinat (TAG), Trilobatinelliguaein A, Hämatoxylin, Maltit, Mannit, Methyl- $\alpha$ -D-glucosid-2,3-di-asparaginsäure, Benzoesäure, 2-(4-Dimethylaminobenzo-yl)-benzoesäure, 2-Hydroxy-4-aminomethylbenzoesäure, 2-(3-Hydroxy-4-methoxybenzoyl)-methyl- $\beta$ -D-fructosid, Methyl- $\alpha$ -D-galactosid, Methyl- $\beta$ -D-galactosid, Curculin, Strogen 1, Strogen 2, Strogen 4, Miraculin, Phenylelessigsäure, 3,4-Dimethoxyaminobenzoessäure, 3-Anisinsäure, Benzylalkohol, 3-Amino-4-n-propoxyl, 3,4-Koffeinsäure, Zimtsäure, Dihydroxymimtsäure, 2,4-Ferulasäure, Hydrolysiertes Gummi arabicum, Hydroxyaminobenzoessäure, 2,4-Nigerooligosaccharide, Zuckerrohrbagassenextrakt, Dihydroxybenzoessäure, 2,3-Dihydroxybenzoessäure, 2,4-Kumarinsäure, p-Dihydroxybenzoessäure, 3,5-Hydroxybenzoessäure, 3-Gurmarin, Gymnemasaponin III, Gymnemasaponin IV, Gymnemasaponin V, Gymnemasäure I, Gymnemasäure II, Gymnemasäure III, Gymnemasäure IV, Hodulcin, Jujubasaponin II, Jujubasaponin III, Propionsäure, (-)-2-(4-Methoxyphenoxy)-zizipin, Ethylmaltol, Maltol, Butansäure, 2-Oxo-3-methylalanin, N-(1-Methyl-4-oxo-2-imidazolin-2-yl)creatinin, Abrusosid E, Monomethylester, Lactitol, Periandrinssäure-I-monoglucuronid, Periandrinssäure-II-mnoglycuronid, Xylitol, Tagatose, d-Benzoyloxyessigsäure, 4-Methoxyhodulosid 1,4-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactosid, 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-gfucosid, 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-giucosid, 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid, Harnstoff, (N-(4-Cyanophenyl)-N'-(isodiosulfo)methyl)-chloramphenicol, Chlorogensäure, Methyl- $\alpha$ -D-glucosid, Methyl- $\alpha$ -D-glucosid-2,3-dialanin, Methyl- $\alpha$ -D-glucosid-2,3-diglycin, Methyl- $\alpha$ -D-glucosid-2,3-di-prolin, Methyl- $\alpha$ -D-glucosid-2,3-di-valin, Anilin, 2-Butoxy-5-nitroanilin, 2-Ethoxy-5-nitroanilin, 2-Methoxy-5-nitroanilin, 3-Nitro-(+)-Baiyunol- $\beta$ -D-glucosid- $\alpha$ -D-glucosid-anilin, 1,3-Hydroxy-4-methoxybenzylanilin, 2-Propoxy-5-nitro-(P4000)benzo-1,4-dioxan, 2-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-benzoe-1,3-dioxan-4-one, 2-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-benzoesäure, 2-Benzoyl-4-methoxybenzoessäure, 2-(4-Methoxybenzoyl)-benzo-1,3(4H)-xathian, 2-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-benzo-1,4-xathian, 3-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-butansäure-4-[3,5-dihydroxy-4-[3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1-oxopropyl]phenoxy]-2-hydroxymononatriumsalz, 4-[3,5-Dihydroxy-4-[3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1-oxopropyl]phenoxy]-3-oxo-butansäuremononatriumsalz, 1-Carboxaldehyde-4-(methoxymethyl)-1,4-cyclohexadien, (E)Oximethylbenzol,  $\beta$ -(1,3-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-hespertindihydrochalcon, 3'-Carboxyhespertindihydrochalcon, 3'-Formylisocoumarin, 3,4-Dihydro-3-(3-hydroxy-4-methoxy)-perillartin, 8,9-Epoxyphenyl 3-hydroxy-4-methoxybenzylether, [3-[3,5-Dihydroxy-4-[3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1-oxopropyl]phenoxy]propyl]-phosphonsuremonokaliumsalz, Steviosidanalog, [2-[3,5-Dihydroxy-4-[3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1-oxopropyl]-phenoxy]ethyl]-sulfaminsäuremonokaliumsalz, Harnstoff und N-(4-Cyanophenyl)-N'-(2-carboxyethyl)-L-theanin.

**[0033]** Als Umamigeschmacksstoffe können erwähnt werden Glutathion, Glutamylglutaminsäure, (Z)-6-Decen-4-olid, Inosinsäure, Dodec-Z6-en-4-olid, Glutaminsäure, L-Aconitinsäure, N-(1-Desoxyfructos-1-yl)glutamat, hydrolysiertes Pflanzenprotein, Methyl- $\alpha$ -D-glucosid, 2,3-Dilysin, Methyl- $\alpha$ -D-glucosid-2,3-diornithin, L-Asparagin, L- $\alpha$ -Glutamyl-L- $\alpha$ -glutamyl-L-glutaminsäure, L- $\alpha$ -Aspartyl-L- $\alpha$ -glutamylglutamylvalin, Pflanzen-glutenhydrolysat, L-Asparaginsäursäure, L- $\alpha$ -Aspartyl-L- $\alpha$ -aspartyl-L- $\alpha$ -aspartylidocosahexaensäure and (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-L-Theanin.

**[0034]** Die funktionellen Effekte der Geschmacksmoleküle auf dem G-Protein können durch Messen der Veränderungen der Parameter der Transduktionswege, wie intrazelluläres IP3 und  $\text{Ca}^{2+}$  oder durch andere G-Protein spezifische Tests gemessen werden, wie der Markierung mit GTPyS gemäß in der Technik bekannter Verfahren und diese sind später ausführlicher beschrieben.

**[0035]** Viele funktionelle und stummen bitteren Geschmacksrezeptoren und süße und umami Rezeptoren sind zur Kupplung mit den chimären G-Proteinen der vorliegenden Erfindung fähig. Als bittere Rezeptoren können die sogenannten T2Rs oder TAS2Rs aufgeführt werden, die in Bufer et al in Nature Genetics 32: 397–401 oder Chandrashekar et al. in Cell, 100: 703–711 oder Matsunami in Nature, 404, 601–604 beschrieben sind. Während man als süße oder umami Rezeptoren die bekannten T1R Rezeptoren erwähnen kann, wie sie in X. Li et al., 2002, PNAS USA, 99: 4692–4696, G. Nelson et al., 2002, Nature, 416: 199–202 und G. Nelson et al., 2001, Cell, 101: 381–390 beschrieben wurde. Ferner sind die chimären G-Proteine der vorliegenden Erfindung fähig, eine stärkere Zellreaktion auszulösen, wenn ein Ligand an einen gegebenen GPCR bindet im Vergleich mit den nativen  $G_{\alpha q}$  Proteinen und jenen aufgeführten chimären  $G_{\alpha q}$  Proteinen, auf die oben Bezug genommen

wird.

**[0036]** Um dies zu illustrieren werden Säugerzellen beispielsweise HEK293T Zellen mit einem bekannten funktionellen bitteren Geschmacksrezeptor transfiziert, der als TAS2R16 bekannt ist, wie dieser von Bufo (siehe obige Literaturstelle) beschrieben und charakterisiert wurde und das chimäre G-Protein  $G_{\alpha16\text{-Gustducin44}}$  der vorliegenden Erfindung kann mit 5 mM Salicin oder 5 mM Phenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (beide bekannte bittere Geschmacksstoffe) gemäß folgendem Protokoll zusammengebracht werden, um ein robustes Fluoreszenzsignal (unter Verwendung von Flexstation) auszulösen, das etwa dreimal stärker ist, als ein chimäres Referenz G-Protein ( $G_{\alpha16\text{-z44}}$ ) und etwa siebenmal stärker als der Wildtyp  $G_{\alpha16}$ .

**[0037]** Das Protokoll ist beschrieben in "G-Protein coupled receptors (Signal Transduction Series)", Herausgeber: Tatsuya Haga und Gabriel Berstein, 1. Ausgabe, Seiten 424. CRC Press – Boca Raton FL, September 1999 und kann folgendermaßen zusammengefasst werden.

1. Tag 0: Platten mit 96 Vertiefungen werden mit 20 000 Zellen pro Vertiefung angeimpft und bei 37°C über Nacht in Wachstumsnährmedien gehalten.
2. Tag 1: Die Zellen werden unter Verwendung von 300 ng an GPCR DNA und 0,6  $\mu$ l Lipofectamin 2000 (Invitrogen) pro Vertiefung transfiziert. Die transfizierten Zellen werden bei 37°C über Nacht in Wachstumsnährmedien gehalten.
3. Tag 2: Das Wachstumsmedium wird verworfen und die Zellen werden für 1 Stunde (bei Raumtemperatur im Dunklen) mit 75  $\mu$ l an Calciumtestlösung inkubiert, die aus 1,5  $\mu$ M Fluo-4 AM (Molecular Probes) und 2,5 mM Probenicid besteht, die in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) gelöst sind, die mit 10 mM Hepes, 200  $\mu$ M Calciumchlorid und 0,1% Rinderserumalbumin, pH 7,4 bei 37°C supplementiert wurde.
4. 125  $\mu$ l Waschpuffer, der besteht aus 2,5 mM Probenicid, das in einer Hank Balanced Salz Solution (HBSS) gelöst ist, welche mit 10 mM Hepes, 200  $\mu$ M Calciumchlorid und 0,1% Rinderserumalbumin supplementiert wurde, wird mit pH 7,4 bei 37°C zu jeder Vertiefung gegeben und die Platte wird weiter für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.
5. Die Pufferlösungen werden verworfen und die Platte wird dreimal mit 100  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen und die Zellen werden in 200  $\mu$ l Waschpuffer rekonstituiert und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert.
6. Die Platte wird in einen Fluoreszenzmikrotiterplattenlesegerät gegeben, beispielsweise der Flexstation (Molecular Devices) oder FLIPR (Molecular Devices) und die Rezeptoraktivierung wird nach einer Zugabe von 20  $\mu$ l einer 10fach konzentrierten Ligandenstammlösung gestartet. Die Fluoreszenz wird kontinuierlich für 15 Sekunden vor der Ligandenzugabe und für 45–75 Sekunden nach der Ligandenzugabe gemessen. Die Rezeptoraktivierungsniveaus werden durch die zwei folgenden Gleichungen definiert: % Aktivierung =  $(\text{Maximum Fluoreszenz} - \text{Grundlinienfluoreszenz}) / \text{Grundlinienfluoreszenz} \times 100$  oder Fluoreszenzzunahme =  $\text{Maximale Fluoreszenz} - \text{Grundlinienfluoreszenz}$ , wobei die Grundlinienfluoreszenz die mittleren Fluoreszenzniveaus vor der Ligandenzugabe darstellt.

**[0038]** In einem weiteren Beispiel werden HEK293T Zellen, die mit einem bekannten funktionellen bitteren Geschmacksrezeptor, der als Maus T2R5 bekannt ist (siehe Chandreshekar et al., in Cell, Band 100, 70–711, 17. März 2000) und dem chimären G-Protein  $G_{\alpha16\text{-Gustducin44}}$  der vorliegenden Erfindung transfiziert sind, mit 10  $\mu$ M Cycloheximid zusammengebracht, das zur Auslösung eines robusten Fluoreszenzsignals fähig ist, das fünfmal stärker ist als das Wildtyp  $G_{\alpha16}$ .

**[0039]** In einem weiteren Beispiel werden HEK T-Rex<sup>R</sup> Zellen, die stabil mit dem bekannten funktionellen, humanen bitteren Geschmacksrezeptor TAS2R10 (siehe Bufo et al in Nature Genetics 32: 397–401) und dem chimären G-Protein G16-Gustducin 44 der vorliegenden Erfindung transfiziert sind, mit 250  $\mu$ M Strychnin zusammengebracht, das fähig ist, ein robustes Fluoreszenzsignal auszulösen.

**[0040]** In einem weiteren Beispiel werden HEL293 T-Rex<sup>R</sup> Zellen, die stabil mit TAS2R38 (ein vorgeschlagener bitterer Rezeptor für Phenylthiocarbamid, siehe Kim et al., Science 299, 1221–1225 und Bufo et al. in Nature Genetics 32: 397–401) und dem chimären G-Protein G16-Gustducin 44 der vorliegenden Erfindung transfiziert sind, werden mit 250  $\mu$ M Phenylthiocarbamid zusammengebracht, das ebenfalls fähig ist, ein robustes Fluoreszenzsignal zu erzeugen. Ähnlich rufen 250  $\mu$ M Propylthiouracil eine robuste Reaktion hervor.

**[0041]** In einem weiteren Beispiel werden HEK293 T-Rex<sup>R</sup> Zellen, die stabil mit TAS2R43 und dem chimären G-Protein G16-Gustducin 44 der vorliegenden Erfindung transfiziert sind, mit 10  $\mu$ M Aristolochinsäure zusammengebracht, die fähig ist, ein robustes Fluoreszenzsignal hervorzurufen.

**[0042]** In einem weiteren Beispiel werden HEL293 T-Rex<sup>R</sup> Zellen, die stabil mit TAS2R44 und dem chimären G-Protein G16-Gustducin 44 der vorliegenden Erfindung mit 10  $\mu$ M Aristolochinsäure zusammengebracht, die

fähig st, ein robustes Fluoreszenzsignal hervorzurufen.

**[0043]** In einem weiteren Beispiel werden HEK 293 T Zellen mit dem bekannten funktionellen süßen Geschmacksrezeptorkomplex, der durch ein Heterodimer von humanem TAS1 R2 und TAS1 R3 gebildet wird (X. Li, et al., 2002, PNAS USA, 99: 4692–4696, G. Nelson et al., 2001, Cell, 101: 381–390) und dem chimären G-Protein  $G_{\alpha 16\text{-Gustducin44}}$  transfiziert sind, werden entweder mit 2,5 mM Aspartam, Acesulfam K oder Sucralose zusammengebracht, die alle zur Hervorrufung eines robusten Fluoreszenzsignals fähig sind, das zweimal stärker ist als das Wildtyp  $G_{\alpha 16}$ .

**[0044]** Die chimären Konstrukte können auf eine an sich bekante Weise unter Verwendung der Polymerasekettenreaktionen hergestellt werden. In einer Ausführungsform können die chimären Konstrukte unter Verwendung einer Brückenüberlappungs PCR Strategie hergestellt werden, wie sie in S.M. Mody et al., 2000, Mol. Pharmacol. 57: 13–23 beschrieben ist, worin ein Primer so entworfen ist, dass er mit einem Ende anneliert, beispielsweise dem C-Terminus von  $G_{\alpha q}$  und auch für die letzten 5 von Gustducin stammenden Aminosäuren. Die chimären Produkte der PCR können in einen geeigneten Vektor kloniert werden, beispielsweise pCR2.1-Togo (im Handel erhältlich von Invitrogen) und einer DNA Sequenzierung unterzogen werden, um den korrekten Ersatz des Terminus von  $G_{\alpha q}$  zu verifizieren.

**[0045]** Nach der Verifikation der Sequenz können die chimären  $G_{\alpha q\text{-Gustducin}}$  cDNA Fragmente in einen geeigneten Vektor subkloniert werden, beispielsweise pcDNA 3.1 Säugerexpressionsvektor und transient in eine Säugerwirtszelle transfiziert werden, beispielsweise HEK 293T oder HEL T-Rex®, um die korrekte Expression des Transgens zu verifizieren.

**[0046]** Nach einer Posttransfektionsperiode, beispielsweise 48 Stunden, können Zelllysate hergestellt werden und durch eine Western Blot Analyse analysiert werden, um die korrekte Expression der chimären Proteine zu bestätigen. Wenn die korrekte Proteinexpression bestätigt ist, können geeignete Säugerzellen, beispielsweise HEK 293T Zellen oder HEK T-Rex® gemäß in der Technik gut bekannter Verfahren transfiziert werden, um Zellen zu generieren, die stabil chimäres  $G_{\alpha q\text{-Gustducin}}$  exprimieren.

**[0047]** Bei der Durchführung der verschiedenen Aspekte und Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung in Bezug auf Klonierung, Ermittlung der Liganden-Rezeptor Paare und das Finden von Modulatoren der bitteren, süßen oder umami Reaktion, wird auf herkömmliche Techniken der Molekularbiologie, Mikrobiologie und Rekombinationstechnologie zurückgegriffen. Demnach sind dem Fachmann solche Techniken vollkommen bekannt und daher werden sie hierin später nur zusammengefasst, um den Zusammenhang der vorliegenden Erfindung weiter zu beschreiben.

**[0048]** Um cDNAs zu exprimieren, die G-Proteine oder Rezeptoren kodieren, subkloniert man typischerweise die geeignete cDNA in einen Expressionsvektor, der einen starken Promotor zur Transkriptionssteuerung, einen Transkriptions-/Translationsterminator und eine Ribosomenbindungsstelle zur Translationsinitiation enthält. Geeignete bakterielle Promotoren sind in der Technik bekannt, beispielsweise E. coli, Bacillus sp. und Salmonella und Kits für solche Expressionssysteme sind im Handel erhältlich. Ähnlich sind eukaryontische Expressionssysteme für Säugerzellen, Hefe und Insektenzellen in der Technik gut bekannt und auch im Handel erhältlich. Der eukaryontische Vektor kann beispielsweise ein Adenovirusvektor, ein Adeno-assizierter Vektor oder ein Retrovirusvektor sein.

**[0049]** Zusätzlich zum Promotor enthält der Expressionsvektor typischerweise eine Transkriptionseinheit oder Expressionskassette, die alle zusätzlichen Elemente enthält, die zur Expression des G-Proteins oder Rezeptor-kodierenden Nukleinsäure in Wirtszellen erforderlich sind. Eine typische Expressionskassette enthält daher einen Promotor, der funktionsfähig an die Nukleinsäuresequenz gebunden ist, die für das G-Protein oder den Rezeptor und Signale, die für eine effiziente Polyadenylierung des Transkripts erforderlich sind, Ribosomenbindungsstellen und eine Translationstermination kodiert. Die Nukleinsäuresequenz, die für das G-Protein oder den Rezeptor kodiert, kann typischerweise, wie das der Fall sein kann, an ein Membran-hinführendes Signal gebunden sein, wie die N-terminalen 45 Aminosäuren der Somatostatin 3 Rezeptorsequenz der Ratte, um eine effiziente Oberflächenexpression des rekombinanten G-Proteins oder Rezeptors zu fördern. Zusätzliche Elemente können beispielsweise Enhancer umfassen.

**[0050]** Eine Expressionskassette sollte auch eine Transkriptionsterminationsregion stromabwärts des Strukturgens enthalten, um für eine effiziente Termination zu sorgen. Die Terminationsregion kann aus demselben gen erhalten werden, wie die Promotorsequenz oder kann von unterschiedlichen Genen erhalten werden.



**[0051]** Zur Expression der G-Proteine oder Rezeptoren können herkömmliche Vektoren zur Expression in eukaryontischen oder prokaryontischen Zellen verwendet werden, die in der Technik gut bekannt sind. Beispiele für Vektoren umfassen unter anderem Standardbakterienexpressionsvektoren, einschließlich Plasmide, wie die pBR322-basierten Plasmide, pSKF, pET23D und Fusionsexpressionssysteme, wie GST und LacZ.

**[0052]** Expressionsvektoren, die Regulationselemente von eukaryontischen Viren enthalten, werden typischerweise in eukaryontischen Expressionsvektoren verwendet, beispielsweise SV40 Vektoren, Cytomegalovirusvektoren, Papillomavirusvektoren und Vektoren, die vom Eppstein-Barr Virus abstammen. Andere beispielhafte eukaryontische Vektoren umfassen pMSG, pAV009/A. sup. + pMTO10/A. sup. +, pMAMneo-5, Baculovirus pDSVE, pcDNA3.1, pIRES und jeden anderen Vektor, der die Expression von Proteinen unter der Steuerung des frühen SV40 Promotors, späten SV40 Promotors, Metallothioneinpromotors, Mausbrusttumoviruspromotors, Rous Sarcoma Viruspromotor, Polyhedrinpromotor oder anderen Promotoren erlaubt, von denen gezeigt wurde, dass sie in eukaryontischen Zellen wirksam sind.

**[0053]** Einige Expressionssysteme haben Marker, die eine Genamplifikation bereitstellen, wie Thymidinkinase, Hygromycin B Phosphotransferase und Dihydrofolatreduktase. Alternativ dazu sind auch Expressionssysteme mit hoher Ausbeute geeignet, die keine Genamplifikation umfassen.

**[0054]** Die Elemente, die typischerweise in Expressionsvektoren enthalten sind, umfassen auch ein Replikon, das in *E. coli* funktionsfähig ist, ein Gen, das für eine Arzneimittelresistenz kodiert, zum eine Selektion von Bakterien zu erlauben, die rekombinante Plasmide tragen und Restriktionsenzylschnittstellen in nicht-essentiellen Regionen des Plasmids, um eine Insertion von eukaryontischen Genen zu erlauben. Das im einzelnen ausgewählte Arzneimittelresistenzgen ist nicht entscheidend und jedes der vielen Arzneimittelresistenzgene, die in der Technik bekannt sind, sind geeignet. Die prokaryontischen Sequenzen werden, falls sie erforderlich sind, optional so ausgewählt, dass sie nicht mit dem Replikon der DNA in eukaryontischen Zellen Wechselwirken.

**[0055]** Es können Standardtransfektionsverfahren verwendet werden, um Bakterien-, Säuger-, Hefe- oder Insektenzelllinien herzustellen, die große Mengen des G-Proteins oder des Rezeptors exprimieren, die dann unter Verwendung von Standardtechniken gereinigt werden.

**[0056]** Jedes der gut bekannten Verfahren zur Einführung der Nukleotidsequenzen in Wirtszellen kann verwendet werden. Diese umfassen die Verwendung der Calciumphosphattransfektion, Polybren, Protoplastenfusion, Elektroporation, Liposomen, Mikroinjektion, Plasmavektoren, virale Vektoren und jede der anderen gut bekannten Verfahren zur Einführung von klonierter genomischer DNA, cDNA, synthetischer DNA oder von anderem fremden genetischen Material in eine Wirtszelle. Es ist nur notwendig, dass das im einzelnen verwendete Gentechnikverfahren dazu fähig ist, zumindest 1 Gen in die Wirtszelle einzuführen, das zur Expression des Rezeptors fähig ist.

**[0057]** Beispielsweise kann das T-Rex<sup>®</sup> Expressionssystem (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) verwendet werden. Das T-Rex<sup>®</sup> System ist ein durch Tetracyclin reguliertes Säugerexpressionssystem, das regulatorische Elemente vom *E. coli* Tn10-kodierten Tetracyclinresistenzoperon (Tet) verwendet (Hillen und Berens 1994, Annu. Rev. Microbiol. 48, 345–369, Rillen et al. 1983, Control, J. Mol. Biol. 169, 707–721). Die Tetracyclinregulation im T-r<sup>®</sup> System basiert auf der Bindung von Tetracyclin an den tet Repressor und die Derepression des Promotors, der die Expression des Gens von Interesse kontrolliert (yao et al., 1998, Hum. Gene Ther. 9, 1939–1950).

**[0058]** Nachdem der Expressionsvektor in die Zellen eingeführt ist, können die transfizierten Zellen unter Standardkultivierungsbedingungen kultiviert werden. Das G-Protein oder das Rezeptorprotein kann dann aus der Kultur unter Verwendung von Standardtechniken gewonnen werden. Beispielsweise können die Zellen entweder mechanisch oder durch osmotischen Schock zum Platzen gebracht werden, bevor sie Fällungs- und Chromatographieschritten unterzogen werden, wobei die Art und Sequenz hiervon von dem bestimmten rekombinanten Material abhängt, das gewonnen wird. Alternativ dazu können das rekombinante G-Protein oder der Rezeptor aus der Kulturmedium gewonnen werden, in dem die rekombinanten Zellen kultiviert wurden.

**[0059]** Die Aktivität eines Rezeptors bei der Bindung an Liganden und die Kupplung des G-Proteins an den Rezeptor kann mittels einer Vielzahl an in vitro und in vivo Tests untersucht werden, um funktionelle, chemische und physikalische Effekte zu bestimmen, beispielsweise die Messung der Ligandenbindung, sekundären Botenstoffen (beispielsweise cAMP, cGMP, IP<sub>3</sub>, DAG oder Ca<sup>2+</sup>), Ionenfluss, Phosphorylierungsspiegel, Transkriptionsspiegel, Neurotransmitterspiegel und dergleichen. Ferner können solche Tests verwendet werden, um auf Inhibitoren der Rezeptoren zu testen, wie dies in der Technik bekannt ist.

**[0060]** Beispiele oder Tests, die mit dem potentiellen Rezeptorinhibitor behandelt werden, können mit den Kontrollproben ohne der Testverbindung verglichen werden, um das Ausmaß der Modulation zu bestimmen. Die Kontrollproben (unbehandelt mit Inhibitoren) werden einem relativen Rezeptoraktivitätswert von 100 zugeordnet. Es wird eine Hemmung der Rezeptoraktivität erreicht, wenn der Rezeptoraktivitätswert relativ zur Kontrolle kleiner ist und im Gegensatz dazu wird die Rezeptoraktivität erhöht, wenn die Aktivität relativ zur Kontrolle höher ist.

**[0061]** Die Wirkungen der Testverbindungen auf die Funktion der Rezeptoren können durch die Untersuchung jeder der oben beschriebenen Parameter gemessen werden. Jede physiologische Veränderung, die die Rezeptoraktivität beeinflusst, kann verwendet werden, um den Einfluss einer Testverbindung auf die Kupplung der Rezeptoren an die G-Proteine der Erfindung zu ermitteln. Wenn die funktionellen Konsequenzen unter Verwendung intakter Zellen oder Tiere bestimmt sind, kann man eine Vielzahl solcher Effekte als Veränderungen in den intrazellulären sekundären Botenstoffen messen, wie  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{IP}_3$  oder cAMP. Geeignete Tests zur Durchführung solcher Messungen sind in WO 01 18 050 A beschrieben.

**[0062]** Bevorzugte Tests für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren umfassen Zellen, die mit Ionen-sensitiven Farbstoffen beladen sind, um die Rezeptoraktivität anzugeben, wie dies detaillierter beschrieben ist in "G-Protein coupled receptors (Signal Transduction Series), CRC Press 1999, 1. Ausgabe, Herausgeber Haga und Bernstein. In Tests zur Identifizierung von modulierenden Verbindungen werden die Veränderungen im Innen-spiegel im Cytoplasma oder die Membranspannung unter Verwendung jeweils eines ionensensitiven oder Membranspannungsfluoreszenzindikators verfolgt.

**[0063]** Die Rezeptoraktivierung initiiert typischerweise anschließende intrazelluläre Ereignisse, beispielsweise Erhöhungen in den sekundären Botenstoffen, wie  $\text{IP}_3$ , das die intrazellulären Vorräte von Calciumionen freisetzt. Die Aktivierung einiger G-Protein-gekoppelter Rezeptoren stimuliert die Bildung von Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ ) durch die durch Phospholipase C vermittelte Hydrolyse von Phosphatidylinositol (Berridge & Irvine, Nature, 312: 315–321 81984)).

**[0064]**  $\text{IP}_3$  wiederum stimuliert die Freisetzung von intrazellulären Calciumionenvorräten. Daher kann eine Veränderung in den cytoplasmatischen Calciumionenspiegeln oder eine Veränderung in den Botenstoffspiegeln, wie  $\text{IP}_3$  verwendet werden, um eine G-Protein gekoppelte Rezeptorfunktion zu untersuchen. Zellen, die solche G-Protein gekoppelten Rezeptoren exprimieren, können erhöhte cytoplasmatische Calciumspiegel als Ergebnis eines Beitrags sowohl intrazellulärer Vorkommen als auch durch eine Aktivierung von Ionenkanälen zeigen, wobei es erwünscht wenn auch nicht erforderlich sein kann, solche Tests in einem Calcium-freien Puffer auszuführen, der optional mit einem Chelatmittel supplementiert ist, wie EDTA, um die Fluoreszenzreaktion zu unterscheiden, die von einer Calciumfreisetzung aus internen Vorräten resultiert.

**[0065]** In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Rezeptoraktivität durch die Expression des Rezeptors in einer Zelle mit einem G-Protein gemessen, wie dies oben definiert ist, das den Rezeptor an einen Phospholipase C Signaltransduktionsweg bindet. Optional ist die Zelllinie HEK 293, obwohl andere Säugerzellen ebenfalls bevorzugt sind, wie CHO und COS Zellen. Die Modulation der Geschmacksübertragung wird durch Messen der Veränderungen in den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Spiegeln gemessen, die sich in Reaktion auf die Modulation des Reeptorsignalübertragungswegs durch die Verabreichung eines Moleküls verändern, das mit dem Rezeptor assoziiert. Die Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$  Spiegel werden optional unter Verwendung der fluoreszierenden  $\text{Ca}^{2+}$  Indikatorfarbstoffe und der fluorimetrischen Bildgebung gemessen.

**[0066]** In einer weiteren Ausführungsform können die Ligandenbindungsdomänen der Rezeptoren in vitro im löslichen oder festen Zustand verwendet werden, um auf die Ligandenbindung zu testen. Die Ligandenbindung in einem Rezeptor oder einer Domäne eines Rezeptors kann in Lösung in einer Bilayermembran getestet werden, die an eine feste Phase in einem Lipidmonolayer oder an Vesikel gebunden ist. Hierbei kann die Bindung eines Modulators an den Rezeptor oder eine Domäne unter Verwendung von Veränderungen in den spektroskopischen Charakteristiken beobachtet werden, beispielsweise Fluoreszenz, Absorption oder refraktiver Index oder Hydrodynamik-(beispielsweise Form), Chromatographie- oder Löslichkeitseigenschaften, wie dies im allgemeinen in der Technik bekannt ist.

**[0067]** Die als Modulatoren der Rezeptoren getesteten Verbindungen können jede kleine chemische Verbindung oder eine biologische Einheit sein, wie ein Protein, ein Zucker, eine Nukleinsäure oder ein Lipid.

**[0068]** Typischerweise sind die Testverbindungen kleine chemische Moleküle. Im wesentlichen kann jede chemische Verbindung Im wesentlichen kann jede chemische Verbindung als potentieller Modulator oder Li-

gand in den Tests der Erfindung verwendet werden, obwohl die Kenntnis der Ligandenspezifität eines individuellen Rezeptors es dem Fachmann ermöglichen würde, eine Vorselektion an interessanten Verbindungen vorzunehmen. Einige bevorzugte Verbindungen wurden vorher erwähnt. Die Tests können so entworfen werden, dass sie große chemische Banken durch die Automatisierung der Testschritte und die Bereitstellung der Verbindungen aus jeder bequemen Quelle für die Tests screenen, die typischerweise parallel ausgeführt werden (beispielsweise in Mikrotiterformaten auf Mikrotiterplatten in Robotertests). Der Fachmann versteht, dass es viele Anbieter von Banken chemischer Verbindungen gibt.

**[0069]** Die Tests können in Screeningverfahren mit hohem Durchsatz gefahren werden, die die Bereitstellung einer kombinatorischen chemischen oder peptidartigen Bank umfassen, die eine hohe Anzahl an potentiellen therapeutischen oder geschmacksbildenden Verbindungen enthalten (die potentielle Ligandenverbindungen sind). Solche Banken werden dann in einem oder mehreren Tests gescreent, wie dies hierin beschrieben ist, um jene Bankkandidaten zu identifizieren (insbesondere chemische Spezies oder Subklassen), die eine gewünschte charakteristische Aktivität zeigen. Die so identifizierten Verbindungen können als Leitverbindungen dienen, um weiter Modulatoren für Endprodukte zu entwickeln oder können selbst als tatsächliche Modulatoren verwendet werden.

**[0070]** Eine kombinatorische, chemische Bank ist eine Sammlung von diversen chemischen Verbindungen, die entweder durch chemische Synthese oder biologische Synthese erzeugt werden oder durch Kombination von chemischen "Bausteinen", wie Reagenzien. Beispielsweise kann eine lineare kombinatorische, chemische Bank, wie eine Polypeptidbank, durch die Kombination eines Satzes an chemischen Bausteinen (Aminosäuren) auf jede mögliche Weise für eine gegebene Verbindungslänge gebildet werden (das heißt die Anzahl an Aminosäuren in einer Polypeptidverbindung). Es können Millionen an chemischen Verbindungen durch kombinatorisches Mischen von chemischen Bausteinen synthetisiert werden.

**[0071]** Die Herstellung und das Screenen von kombinatorischen, chemischen Banken sind dem Fachmann bekannt und bedürfen keiner weiteren Erläuterung.

**[0072]** In den Hochdurchsatztests der Erfindung ist es möglich, bis zu mehrere Tausend unterschiedliche Modulatoren oder Liganden an einem einzigen Tag zu screenen. Insbesondere kann jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte verwendet werden, um einen getrennten Test gegen einen ausgewählten potentiellen Modulator auszuführen oder, falls die Konzentrations- oder Zeiteffekte beobachtet werden, können jeweils 5–10 Vertiefungen einen einzelnen Modulator testen. Daher kann eine einzelne Standardmikrotiterplatte etwa 100 (beispielsweise 96) Modulatoren testen. Falls Platten mit 1536 Vertiefungen verwendet werden, dann kann eine einzelne Platte leicht etwa 100 bis etwa 1500 unterschiedliche Verbindungen testen. Es ist möglich, mehrere unterschiedliche Platten pro Tag zu testen und daher sind Testscreenings für bis zu etwa 6000–20000 unterschiedliche Verbindungen unter Verwendung der integrierten Systeme der Erfindung möglich.

**[0073]** Leitverbindungen, die durch die hierin oben beschriebene Technologie gefunden werden oder Entwicklungsverbindungen, die aus solchen Leitverbindungen gebildet werden, können direkt einem Menschen verabreicht werden, um den Geschmack zu modulieren. Alternativ dazu können solche Verbindungen mit anderen Inhaltsstoffen von Präparationen formuliert werden, die oral eingenommen werden, beispielsweise Lebensmittel, Getränke, Pharmazeutika oder Nahrungsergänzungstoffe oder homeopathische Präparationen.

**[0074]** Die Menge einer oral einzunehmenden Verbindung muss ausreichen, um eine vorteilhafte Reaktion beim Menschen auszulösen und wird durch die Wirksamkeit der einzelnen Geschmacksmodulatoren und Existenz, Art und Ausmaß an schädlichen Nebenwirkungen bestimmt, die die Verabreichung einer bestimmten Verbindung begleiten.

**[0075]** Es folgt nun eine Reihe an Beispielen, die zur Erläuterung der Erfindung dienen.

**[0076]** Für alle Beispiele werden HEK 293 Zellen verwendet, wobei für die transiente Transfektion der Rezeptoren HEK 293T Zellen verwendet werden und zur stabilen Transfektion der Rezeptoren T-Rex<sup>®</sup> HEK 293 Zellen (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) verwendet werden.

#### Beispiel 1:

##### Herstellung der G<sub>α16-Gustducin44</sub> Chimäre

**[0077]** Das G<sub>α16Gustducin44</sub> wird durch eine Brückenüberlappungs PCR Mutagenese unter Verwendung der G<sub>α16</sub>

cDNA vom Menschen und der Gustducin cDNA der Ratte in pcDNA3.1 als Matrize und SP6 Promotorsequenzen als außen flankierende Primerregionen konstruiert. Die verwendeten Gen-spezifischen Primer sind:

16gust44-S: (5'-GGCCCCGAGGGCAGCAACTTAAAAAAGAAGATAAGGAA-3')

16gust-44-AS: (5'-TTCCTTATCTTCTTTTTTTAAGTTGCTGCCCTCGGGGCC-3')

**[0078]** Zuerst werden die zwei überlappenden PCR Fragmente, die  $G_{\alpha 16}$  und Gustducin entsprechen, amplifiziert. Das 5' $G_{\alpha 16}$  Fragment wird unter Verwendung des T7 Primers zusammen mit dem 16gust44-AS Primer hergestellt, während das 3' Gustducin Fragment unter Verwendung des SP6 Primers zusammen mit dem 16gust44-S Primer hergestellt wird. Die einzelnen PCR Produkte werden durch Agarosegelelektrophorese getrennt und gereinigt. Die gereinigten PCR Produkte werden gemischt, zusammen anneliert und dann werden die chimären Vollängenfragmente unter Verwendung von T7 und SP6 Primern amplifiziert. Es werden 1,5 mM  $MgCl_2$  in den PCR Gemischen eingebracht und die PCR Produkte werden mit den thermischen Zyklusparametern bei 94°C für 45 Sekunden, 50°C für 90 Sekunden und 72°C für 120 Sekunden unter Verwendung eines GeneAmp PCR System 9700 von Applied Biosystems amplifiziert. Das zusammengefügte PCR Fragment wird in pcDNA3.1 subkloniert und durch DNA Sequenzierung und Restriktionskartierung auf Integrität überprüft. Eine korrekte Expression des Fusionsproteins wird durch Western Blot Analyse aus Ganzzelllysaten von transfizierten Zellen unter Verwendung eines polyklonalen anti- $G\alpha 16$  Antikörpers (Torreg Pines Biolabs) bestätigt.

#### Beispiel 2

##### Fluo-4 Calciumtest

**[0079]** Alle Tests werden unter Verwendung von schwarzen Platten mit 96 Vertiefungen und klarem Boden ausgeführt, die am Tag vorher mit 20 000 transfizierten Zellen pro Vertiefung angeimpft wurden und bei 37°C über Nacht in einem geeigneten Wachstumsmedium gehalten wurden. Zur Zeit des Tests wird das Medium verworfen und die Zellen werden für 1 Stunde (bei Raumtemperatur im Dunklen) mit 75  $\mu$ l einer Calciumtestlösung, die aus 1,5  $\mu$ M Fluo-4 AM (Molecular Probes) und 2,5 mM Probenicid (Sigma-Aldrich) gelöst in Hanks Balanced Salts Solution (HBSS) besteht, die mit 10 mM Hepes, 200  $\mu$ M Calciumchlorid und 0,1% Rinderserumalbumin supplementiert wurde, bei pH 7,4 und 37°C inkubiert. Nach der anfänglichen Beladungsperiode für 1 Stunde werden 125  $\mu$ l Waschpuffer, der aus 2,5 mM Probenicid, das in HBSS gelöst ist, welche mit 10 mM Hepes, 200  $\mu$ M Calciumchlorid und 0,1% Rinderserumalbumin supplementiert ist, bei pH 7,4 und 37°C zu jeder Vertiefung gegeben und die Platte wird ferner für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, um eine vollständige Verseifung des Fluo-4 AM zu erlauben. Die Pufferlösungen werden verworfen, die Platte wird dreimal mit 100  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen und schließlich werden die Zellen in 200  $\mu$ l Waschpuffer rekonstituiert und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Für die Testablesung wird die Platte in einen Fluoreszenzmikrotiterplattenlesegerät gegeben, beispielsweise der Flexstation (Molecular Devices) und die Rezeptoraktivierung wird nach der Zugabe von 20  $\mu$ l einer 10fach konzentrierten Ligandenstammlösung gestartet. Die Fluoreszenz wird kontinuierlich für 15 Sekunden vor der Ligandenzugabe und für 45 bis 75 Sekunden nach der Ligandenzugabe verfolgt. Die Rezeptoraktivierungsspiegel werden durch die zwei folgenden Gleichungen definiert: % Aktivierung = (Maximale Fluoreszenz – Grundlinienfluoreszenz/Grundlinienfluoreszenz)  $\times$  100 oder Fluoreszenzzunahme = Maximale Fluoreszenz – Grundlinienfluoreszenz, worin die Grundlinienfluoreszenz das mittlere Fluoreszenzniveau vor der Ligandenzugabe darstellt.

#### Beispiel 3

##### Transfektionen für T2R Bitterrezeptoren

**[0080]** Am Tag 0 werden Zellen, die das G-Protein stabil exprimieren, in schwarze Platten mit 96 Vertiefungen und klarem Boden mit 20 000 Zellen pro Vertiefung plattiert und über Nacht in selektivem Wachstumsmedium angezogen. Am Tag 1 wird das Medium zu einem Antibiotika-freien Wachstumsmedium gewechselt und die Zellen werden unter Verwendung von 300 ng GPCR DNA und 0,6  $\mu$ l Lipofectamin 2000 (Invitrogen) transfiziert. Die Zellen werden über Nacht angezogen und am nächsten Tag unter Verwendung der Fluo-4 Calciumtestbedingungen prozessiert, die oben in Beispiel 2 beschrieben sind.

#### Beispiel 4

##### Transfektionen für T1 R Süßrezeptoren

**[0081]** Am Tag 0 werden Zellen, die das G-Protein stabil exprimieren, in eine Platte mit 6 Vertiefungen mit einer Dichte von 800 000 bis 950 000 Zellen pro Vertiefung plattiert und über Nacht in selektivem Wachstums-

medium angezogen. Am Tag 1 wird das Medium zu einem Antibiotikum-freien Wachstumsmedium gewechselt und die Zellen werden unter Verwendung von 2 µg an T1R2 und 2 µg an T1R3 cDNA und 10 µl Lipofectamin 2000 (Invitrogen) transfiziert. Die Zellen werden über Nacht in Antibiotikum-freien Wachstumsmedium gehalten. Am Tag 2 werden die Zellen erneut in eine schwarze Platte mit 96 Vertiefungen und klarem Boden mit 20 000 Zellen pro Vertiefung plattiert und über Nacht angezogen. Am Morgen des Calciumtests wird das Medium mit Niedrigglucosemedium ersetzt, das mit Glutamax und dialysiertem FBS supplementiert ist, um die Rezeptordesensitivierung durch Zucker und Glutamat zu minimieren. Die Zellen werden ferner in diesem Medium für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Am Ende der Periode werden die Zellen für den Calciumtest gemäß den oben beschriebenen Bedingungen prozessiert.

#### Beispiel 5

Aktivierung von humanem TAS2R16 durch ein Bitterglucosid in Zellen, die verschiedene G-Proteine exprimieren

**[0082]** 5 mM an Phenyl-β-D-glucopyranosid werden zu den Zellen gegeben, die hTAS2R16 und entweder Wildtyp  $G_{\alpha 16}$ , eine Chimäre der Erfindung  $G_{\alpha 16\text{gustducin}44}$  oder eine vergleichende Chimäre  $G_{\alpha 16\text{z}44}$  exprimieren. Zellen, die stabil unterschiedliche G-Proteine exprimieren, werden mit Fluo-4 behandelt und die intrazelluläre Calciumfluoreszenz wird wie oben in Beispiel 2 beschrieben gemessen. Die zelluläre Fluoreszenz wird konstant gemessen und die mittlere Fluoreszenz, die 15 Sekunden vor der Ligandenzugabe gemessen wird, wird als das nicht-stimulierte Grundlinienfluoreszenzniveau betrachtet. Zellen, die die  $G_{\alpha 16\text{gustducin}44}$  Chimäre exprimieren, zeigen ein größeres Ausmaß an Rezeptoraktivierung nach einer Ligandenstimulierung als Zellen, die  $G_{\alpha 16}$  exprimieren.

Tabelle 1: Funktionelle Aktivität des humanen Bitterrezeptors mit G-Proteinvarianten

		unspezifisches G-Protein	
Geschmacksrezeptor	$G_{\alpha 16\text{gustducin}44}$	$G_{\alpha 16}$	$G_{\alpha 16\text{z}44}$
Scheintransfiziert (Kontrolle)	2162	1024	1541
humaner TAS2R16	23821	3494	8296

**[0083]** Alle Daten sind in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFUs) ausgedrückt und repräsentieren den Anstieg der mittleren Fluoreszenz gegenüber der Grundlinie nach der Ligandenaktivierung. Die verwendete Ligandenkonzentration beträgt 5 mM Phenyl-β-D-glucopyranosid. Ähnliche Ergebnisse werden auch unter Verwendung von 5 mM D-Salicin erhalten.

#### Beispiel 6

Funktionelle Aktivität des Mausbitterrezeptors (T2R5) mit G-Proteinen

**[0084]** Gemäß der in Beispiel 5 beschriebenen Methodik erhält man folgende Ergebnisse:

Tabelle 2

	Unspezifisch	es G-Protein
Geschmacksrezeptor	$G_{\alpha 16\text{gustducin}44}$	$G_{\alpha 16}$
Scheintransfiziert (Kontrolle)	3989	1705
Maus T2R5	10407	2569

**[0085]** Alle Daten werden in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFUs) ausgedrückt und stellen die Erhöhung der mittleren Fluoreszenz gegenüber der Grundlinie nach der Ligandenzugabe dar. Die verwendete Ligandenkonzentration beträgt 10 µM Cycloheximid.

## Beispiel 7

Aktivierung des humanen Bitterrezeptors TAS2R10 durch Strychnin in Zellen, die stabil  $G_{\alpha 16\text{gustducin}44}$  und TAS2R10 exprimieren

**[0086]** Das Beispiel wird im wesentlichen ausgeführt, die dies in Beispiel 5 beschrieben ist, außer dass Tetracyclin-induzierbare Zelllinien, die stabil humanen TAS2R10 und  $G_{16\text{gust}44}$  exprimieren, anstelle der transienten Expression verwendet werden. Die Zellen werden auf einer Zelldichte von 75 bis 80% gehalten. Man erhält die folgenden Ergebnisse:

Tabelle 3

	Unspezifisches G-Protein
Geschmacksrezeptor	$G_{\alpha 16\text{gustducin}44}$
Nur G-Protein (Kontrolle ohne Tetracyclin)	13238
G-Protein + humaner TAS2R10 (mit Tetracyclin)	24280

**[0087]** Alle Daten werden in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFUs) ausgedrückt und stellen die Erhöhung der mittleren Fluoreszenz gegenüber der Grundlinie nach der Ligandenzugabe dar. Die verwendete Ligandenkonzentration beträgt 250  $\mu\text{M}$  Strychnin.

## Beispiel 8

Aktivierung des humanen Bitterrezeptors TAS2R10 durch Phenylthiocarbamid oder Propylthiouracil in Zellen, die stabil  $GG_{\alpha 16\text{gustducin}44}$  und TAS2R38 exprimieren

**[0088]** Das Beispiel wird im wesentlichen so ausgeführt, die dies in Beispiel 5 beschrieben ist, außer dass Tetracyclin-induzierbare Zelllinien, die stabil den humanen TAS2R38 und  $G16\text{gust}44$  exprimieren, anstelle der transienten Transfektion verwendet werden. Die Zellen werden bei einer Zelldichte von 75 bis 80% gehalten. Man erhält die folgenden Ergebnisse:

Tabelle 4

	Unspezifisches G-Protein
Geschmacksrezeptor	$G_{\alpha 16\text{gustducin}44}$
Nur G-Protein (Kontrolle ohne Tetracyclin)	3422
G-Protein + humaner TAS2R38 (mit Tetracyclin)	8989

**[0089]** Alle Daten werden in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFUs) ausgedrückt und stellen die Erhöhung der mittleren Fluoreszenz gegenüber der Grundlinie nach der Ligandenzugabe dar. Die verwendete Ligandenkonzentration beträgt 250  $\mu\text{M}$  Phenylthiocarbamid. Ähnliche Ergebnisse werden unter Verwendung von 250  $\mu\text{M}$  Propylthiouracil erhalten.

## Beispiel 9

Funktionelle Aktivität des humanen Bitterrezeptors (TAS2R43) mit G-Proteinen

**[0090]** Es erfolgt unter Verwendung einer ähnlichen Methodik, wie in Beispiel 5 außer dass Tetracyclin-induzierbare Zelllinien, die stabil humanen TAS2R43 und  $G16\text{gust}44$  exprimieren, anstelle der transienten Expression verwendet werden. Die Zellen werden auf einer Zelldichte von 75 bis 80% gehalten. Man erhält die folgenden Ergebnisse:

Tabelle 5

	Unspezifisches G-Protein
Geschmacksrezeptor	G <sub>α16gustducin44</sub>
Nur G-Protein	3955
G-Protein + humaner TAS2R43	26766

**[0091]** Alle Daten werden in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFUs) ausgedrückt und stellen die Erhöhung der mittleren Fluoreszenz gegenüber der Grundlinie nach der Ligandenzugabe dar. Die verwendete Ligandenkonzentration beträgt 10 µM Aristolochinsäure.

Beispiel 10

#### Funktionelle Aktivität des humanen Bitterrezeptors (TAS2R44) mit G-Proteinen

**[0092]** Es erfolgt unter Verwendung einer ähnlichen Methodik, wie in Beispiel 5 außer dass Tetracyclin-induzierbare Zelllinien, die stabil humanen TAS2R44 und G16gust44 exprimieren, anstelle der transienten Expression verwendet werden. Die Zellen werden auf einer Zelldichte von 75 bis 80% gehalten. Man erhält die folgenden Ergebnisse:

Tabelle 6

	Unspezifisches G-Protein
Geschmacksrezeptor	G <sub>α16gustducin44</sub>
Nur G-Protein	5700
G-Protein + humaner TAS2R44	17254

**[0093]** Alle Daten werden in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFUs) ausgedrückt und stellen die Erhöhung der mittleren Fluoreszenz gegenüber der Grundlinie nach der Ligandenzugabe dar. Die verwendete Ligandenkonzentration beträgt 10 µM Aristolochinsäure.

Beispiel 11

#### Funktionelle Aktivität des humanen Süßrezeptors mit G-Proteinen

**[0094]** Gemäß der in Beispiel 5 beschriebenen Methodik erhält man die folgenden Ergebnisse:

Tabelle 7

	Unspezifisches	G-Protein
Geschmacksrezeptor	G <sub>α16gustducin44</sub>	G <sub>α15</sub>
Scheintransfiziert (Kontrolle)	1370	643
Humaner TAS1R2/TAS1R3	4617	1300

**[0095]** Alle Daten werden in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFUs) ausgedrückt und stellen die Erhöhung der mittleren Fluoreszenz gegenüber der Grundlinie nach der Ligandenzugabe dar. Die verwendete Ligandenkonzentration beträgt 2,5 mM Sucralose. Ähnliche Ergebnisse werden auch unter Verwendung von 2,5 mM Aspartam oder Acesulfam K erhalten.

## Sequenzliste

<110> Givaudan SA  
 <120> G-Proteine  
 <130> 30069PCT  
 <150> US 60/434 790  
 <151> 18.12.2002

<160> 2  
 <170> PatentIn Version 3.1

<210> 1  
 <211> 1122  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(1122)  
 <223>

<400> 1

atg gcc cgc tgc ctg acc tgg cgc tgc tgc ccc tgg tgc ctg acg gag 48  
 1 5 10 15

gat gag aag gcc gcc gcc cgg gtg gac cag gag atc aac agg atc ctc 96  
 20 25 30

ttg gag cag aag aag cag gac cgc ggg gag ctg aag ctg ctg ctt ttg 144  
 35 40 45

ggc cca ggc gag agc ggg aag agc acc ttc atc aag cag atg cgg atc 192  
 50 55 60



atc cac ggc gcc ggc tac tgc gag gag gag cgc aag ggc ttc cgg ccc 240  
 65 70 75 80

ctg gtc tac cag aac atc ttc gtg tcc atg cgg gcc atg atc gag gcc 288  
 85 90 95

atg gag cgg ctg cag att cca ttc agc agg ccc gag agc aag cac cac 336  
 100 105 110

gct agc ctg gtc atg agc cag gac ccc tat aaa gtg acc acg ttt gag 384  
 115 120 125

aag cgc tac gct gcg gcc atg cag tgg ctg tgg agg gat gcc ggc atc 432  
 130 135 140

cgg gcc tgc tat gag cgt cgg cgg gaa ttc cac ctg ctc gat tca gcc 480  
 145 150 155 160

gtg tac tac ctg tcc cac ctg gag cgc atc acc gag gag ggc tac gtc 528  
 165 170 175

ccc aca gct cag gac gtg ctc cgc agc cgc atg ccc acc act ggc atc 576  
 180 185 190

aac gag tac tgc ttc tcc gtg cag aaa acc aac ctg cgg atc gtg gac 624  
 195 200 205

gtc ggg ggc cag aag tca gag cgt aag aaa tgg atc cat tgt ttc gag 672  
 210 215 220

aac gtg atc gcc ctc atc tac ctg gcc tca ctg agt gaa tac gac cag 720

225 230 235 240

tgc ctg gag gag aac aac cag gag aac cgc atg aag gag agc ctc gca 768

245 250 255

ttg ttt ggg act atc ctg gaa cta ccc tgg ttc aaa agc aca tcc gtc 816

260 265 270

atc ctc ttt ctc aac aaa acc gac atc ctg gag gag aaa atc ccc acc 864

275 280 285

tcc cac ctg gct acc tat ttc ccc agt ttc cag ggc cct aag cag gat 912

290 295 300

gct gag gca gcc aag agg ttc atc ctg gac atg tac acg agg atg tac 960

305 310 315 320

acc ggg tgc gtg gac ggc ccc gag ggc agc aac tta aaa aaa gaa gat 1008

325 330 335

aag gaa atc tat tct cac atg acc tgc gct act gac aca caa aac gtc 1056

340 345 350

aaa ttc gtg ttt gat gcc gtg aca gat ata ata ata aaa gag aac ctc 1104

355 360 365

aaa gac tgt ggg ctc ttc

1122

370

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 374

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Ala Arg Ser Leu Thr Trp Arg Cys Cys Pro Trp Cys Leu Thr Glu

1 5 10 15

Asp Glu Lys Ala Ala Ala Arg Val Asp Gln Glu Ile Asn Arg Ile Leu

20 25 30

Leu Glu Gln Lys Lys Gln Asp Arg Gly Glu Leu Lys Leu Leu Leu Leu

35 40 45

Gly Pro Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe Ile Lys Gln Met Arg Ile

50 55 60

Ile His Gly Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Glu Arg Lys Gly Phe Arg Pro

65 70 75 80

Leu Val Tyr Gln Asn Ile Phe Val Ser Met Arg Ala Met Ile Glu Ala

85 90 95

Met Glu Arg Leu Gln Ile Pro Phe Ser Arg Pro Glu Ser Lys His His

100 105 110

Ala Ser Leu Val Met Ser Gln Asp Pro Tyr Lys Val Thr Thr Phe Glu

115 120 125

Lys Arg Tyr Ala Ala Ala Met Gln Trp Leu Trp Arg Asp Ala Gly Ile

130 135 140

Arg Ala Cys Tyr Glu Arg Arg Arg Glu Phe His Leu Leu Asp Ser Ala

145 150 155 160

Val Tyr Tyr Leu Ser His Leu Glu Arg Ile Thr Glu Glu Gly Tyr Val

165 170 175

Pro Thr Ala Gln Asp Val Leu Arg Ser Arg Met Pro Thr Thr Gly Ile

180 185 190

Asn Glu Tyr Cys Phe Ser Val Gln Lys Thr Asn Leu Arg Ile Val Asp

195 200 205

Val Gly Gly Gln Lys Ser Glu Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu

210 215 220

Asn Val Ile Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Glu Tyr Asp Gln

225 230 235 240

Cys Leu Glu Glu Asn Asn Gln Glu Asn Arg Met Lys Glu Ser Leu Ala

245 250 255

Leu Phe Gly Thr Ile Leu Glu Leu Pro Trp Phe Lys Ser Thr Ser Val

260 265 270

Ile Leu Phe Leu Asn Lys Thr Asp Ile Leu Glu Glu Lys Ile Pro Thr

275 280 285

Ser His Leu Ala Thr Tyr Phe Pro Ser Phe Gln Gly Pro Lys Gln Asp

290

295

300

Ala Glu Ala Ala Lys Arg Phe Ile Leu Asp Met Tyr Thr Arg Met Tyr

305

310

315

320

Thr Gly Cys Val Asp Gly Pro Glu Gly Ser Asn Leu Lys Lys Glu Asp

325

330

335

Lys Glu Ile Tyr Ser His Met Thr Cys Ala Thr Asp Thr Gln Asn Val

340

345

350

Lys Phe Val Phe Asp Ala Val Thr Asp Ile Ile Ile Lys Glu Asn Leu

355

360

365

Lys Asp Cys Gly Leu Phe

370

In der Beschreibung zitierte Referenzen

**[0096]** Diese Liste von Referenzen, die vom Anmelder zitierten worden sind, dient lediglich für die Annehmlichkeit des Lesers. Sie bildet keinen Teil dieses europäischen Patentdokuments. Die Zusammenstellung der Referenzen erfolgte zwar mit großer Sorgfalt, doch können Fehler oder Auslassungen nicht ausgeschlossen werden, so dass das EPA jegliche diesbezügliche Haftung ausschließt.

In der Beschreibung zitierte Patentdokumente

- WO 0118050 A [0006] [0061]
- US 60434790 B [0095]

In der Beschreibung zitierte Nicht-Patentliteratur

- OFFERMANN, S.; SIMON, M. J. Biol. Chem., 1995, Bd. 270, 15175–15180 [0006]
- LEE, J.W.M. et al. J Neurochem., 1998, Bd. 70, 2203–2211 [0006]
- HUANG, Y. et al. J. Biol. Chem., 1996, Bd. 271, 3975–3978 [0006]
- WU, D. et al. J. Biol. Chem., 1992, Bd. 267, 25798–25802 [0006]
- WU, D. et al. Science, 1993, Bd. 261, 101–103 [0006]
- ZHU, X; BIMBAUMER, L. PNAS USA, Bd. 93, 2827–2831 [0006]
- PARMENTIER, M.L. et al. Mol. Pharmacol., 1998, Bd. 53, 778–786 [0006]
- MODY, S.M. et al. Mol. Pharmacol., 2000, Bd. 57, 13–23 [0006]
- MODY S.M. Molecular Pharmacology, 2000, Bd. 57, 13–23 [0010]
- BUFE et al. Nature Genetics, Bd. 32, 397–401 [0035] [0039] [0040]
- CHANDRASHEKAR et al. Cell. Bd. 100, 703–711 [0035]
- MATSUNAMI. Nature, Bd. 404, 601–604 [0035]
- LI, X. et al. PNAS USA. 2002, Bd. 99, 4692–4696 [0035] [0043]
- NELSON, G. et al. Nature, 2002, Bd. 416, 199–202 [0035]
- NELSON, G. et al. Cell, 2001, Bd. 101, 381–390 [0035] [0043]

- CHANDRESHEKAR et al. Cell, 17 March 2000, Bd. 100, 70–711 [0038]
- KIM et al. Science, Bd. 299, 1221–5 [0040]
- MODY S. M. et al. Mol. Pharmacol., 2000, Bd. 57, 13–23 [0044]
- HILLEN; BERENS. Annu. Rev. Microbiol, 1994, Bd. 48, 345–369 [0057]
- HILLEN et al. Control, J. Mol. Biol., 1983, Bd. 169, 707–721 [0057]
- YAO et al. Hum. Gene Ther., 1998, Bd. 9, 1939–1950 [0057]
- BERRIDGE; IRVINE. Nature, 1984, Bd. 312, 315–21 [0063]

### Patentansprüche

1. G<sub>αq-Gustducin</sub> chimäres G-Protein, worin die letzten 44 Aminosäuren der Sequenz des G<sub>αq</sub> Proteins ersetzt sind mit einer 44 Aminosäureeinheit von, Gustducin.
2. Chimäres G<sub>αq-Gustducin</sub> nach Anspruch 1, das ein G<sub>α15-Gustducin</sub> Protein ist.
3. Chimäres G<sub>αq-Gustducin</sub> nach Anspruch 1, das ein G<sub>α16-Gustducin</sub> Protein ist.
4. Chimäres G-Protein nach Anspruch 1, das eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID 2 hat.
5. G-Protein nach Anspruch 1, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID 1 umfasst.
6. Nukleinsäure, umfassend die Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID 1, die für ein im Anspruch 1 definiertes G-Protein kodiert.
7. Expressionsvektor, umfassend eine Nukleinsäure, umfassend die Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID 1, die für ein in einem der Ansprüche 1 bis 6 definiertes G-Protein kodiert.
8. Wirtszelle, die mit einem im Anspruch 7 definierten Expressionvektor transfektiert ist.
9. Wirtszelle nach Anspruch 8, die das chimäre G-Protein und einen Geschmacksrezeptor stabil exprimiert.
10. Verfahren zur Herstellung eines chimären G-Proteins wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 definiert, umfassend die Stufe einer Züchtung von Wirtszellen mit einem darin enthaltenen Expressionsvektor, der für das chimäre G-Protein kodiert, unter Bedingungen, die für die Expression des G-Proteins ausreichend sind, so dass die Produktion des Proteins verursacht wird, und einer Gewinnung des von der Zelle produzierten Proteins.
11. Verfahren zur Analyse und Gewinnung von Modulatoren von Geschmacksrezeptoren unter Verwendung der chimären Proteine, gemäß Definition nach einem der Ansprüche 1 bis 6.
12. Verfahren zur Analyse und Gewinnung von Modulatoren von Geschmacksrezeptoren, die ausgewählt sind aus der Gruppe von Rezeptoren für einen bitteren Geschmack, Rezeptoren für einen süßen Geschmack und Rezeptoren für einen Umamigeschmack, unter Verwendung des chimären Proteins gemäß Definition nach einem der Ansprüche 1 bis 6.
13. Verfahren nach Anspruch 11, unter Verwendung eines auf einer Sängierzelle basierenden Assays, der ein transfektiertes Gen oder eine cDNA mit einer Kodierung für ein erfindungsgemäßes chimäres Protein und einen Geschmacksrezeptor umfasst, umfassend die Stufen einer Kontaktierung einer Verbindung mit Zellen und einer Bestimmung des funktionalen Effekts der Verbindung auf den Rezeptor von chimärem G-Protein-Komplex.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, worin der funktionale Effekt bestimmt wird durch Messung der Veränderungen in den intrazellulären Messengern, wie IP3 oder Calcium<sup>2+</sup>.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen