



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 305 536**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03776743 .1**

(86) Fecha de presentación : **17.12.2003**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1581555**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **05.10.2005**

(54) Título: **Proteínas G_{αq}-Gustducina quiméricas.**

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

(73) Titular/es: **Givaudan S.A.**
Chemin de la Parfumerie 5
1214 Vernier-Genève, CH

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

(72) Inventor/es: **Slack, Jay, Patrick y**
McCluskey, Thomas, Scott

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

(74) Agente: **Durán Moya, Carlos**

ES 2 305 536 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

Proteínas G _{αq}-Gustducina químéricas.

5 La presente invención se refiere a proteínas G químéricas y, en particular, aquellas que actúan como mediadoras en las vías de transducción del receptor del gusto. La presente invención también se refiere a los ensayos basados en sistemas de expresión heterólogos que contienen dichas proteínas y su utilización en el cribado de moduladores de la respuesta al gusto amargo, dulce y "umami" en humanos.

10 La sensación del gusto se puede clasificar en cinco modalidades diferentes: amargo, salado, ácido, dulce y "umami". Los estimuladores del gusto "tastants" afectan la palatabilidad de alimentos y bebidas, influenciando, de este modo, los hábitos nutricionales de los humanos. También afectan la palatabilidad de otros productos que se ingieren, tales como los productos farmacéuticos y nutracéuticos que se administran oralmente. La comprensión y manipulación del mecanismo de la transducción del gusto tiene implicaciones en las industrias farmacéutica y alimentaria. Si las vías 15 de transducción del gusto se pueden manipular, puede ser posible crear ensayos basados en sistemas de expresión heterólogos, que a su vez pueden utilizarse para identificar compuestos que pueden modular la respuesta al gusto y, por lo tanto, dar como resultado ciertos alimentos más sabrosos o aumentar la aceptación de los pacientes de productos farmacéuticos y nutracéuticos orales.

20 Ya se ha publicado mucho sobre el mecanismo de la transducción del gusto. La sensación del gusto se inicia mediante la interacción de moléculas estimuladoras del gusto con sus receptores localizados en la membrana de las células que se encuentran en las papilas del gusto, que están localizadas en el epitelio lingual de las papilas fungiformes, foliadas y circunvaladas, así como en el velo del paladar y en la epiglotis. Avances recientes en estudios bioquímicos y 25 fisiológicos han permitido a los investigadores concluir que la transducción del gusto dulce, "umami" y amargo está mediada en gran medida por los denominados receptores acoplados a proteínas G o GPCR.

Los GPCR son proteínas de la superficie celular que son capaces de unirse a moléculas estimuladoras del gusto después de lo cual se acoplan a proteínas G iniciando procesos celulares que producen mensajeros secundarios, tales como iones de calcio, que permiten que las células envíen una señal al cerebro indicando una respuesta al gusto. 30 En general, los GPCR se clasifican como receptores acoplados a G_q, G_i, G_o y G_s, cuya notación refleja el efector de proteína G primario en sus correspondientes vías de transducción de señal. Los receptores del gusto se clasifican como GPCR acoplados a G_i debido a su interacción con la Gustducina, que es una proteína G de tipo G_{ai}.

35 La reciente identificación de genes que codifican GPCR, que se cree que están implicados en la sensación del gusto amargo, dulce y "umami", permite el desarrollo de sistemas de expresión heterólogos que pueden ser útiles en la identificación de moléculas químicas que modulan las vías de transducción del gusto. Por ejemplo, la disponibilidad y utilización de los receptores en los sistemas de expresión heterólogos permite el cribado de agonistas, antagonistas, agonistas inversos y moduladores de la actividad del gusto de elevada afinidad. Sin embargo, existen muchas tentativas 40 técnicas de desarrollo de ensayos fiables basados en sistemas de expresión heterólogos. Un problema reside en la expresión fiable de elevadas concentraciones de GPCR en la superficie de una célula huésped foránea. Un segundo problema es la aportación de proteínas G que no sólo sean capaces de acoplarse con diferentes tipos de GPCR (a menudo, se hace referencia a dichas proteínas G como "promiscuas"), sino también de acoplarse con elevada eficacia, de tal modo que incluso con concentraciones superficiales bajas de GPCR, la señal de la célula sea lo más fuerte posible.

45 Con respecto a este segundo problema, se sabe que las denominadas proteínas G_{ai1}, G_{ai5} y G_{ai6} se unen a muchas clases de GPCR. Además, se acoplan a GPCR para la activación de fosfolipasa C que conduce a un incremento en los niveles de calcio intracelular. La cascada de señalización se puede medir fácil y rápidamente midiendo los niveles de calcio en las células, tal como se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, la patente WO 0118050). Sin embargo, no se considera que G_{ai5} y G_{ai6} sean realmente proteínas G universalmente promiscuas dado que existen 50 diversos receptores que son incapaces de activarlas, véase por ejemplo, Offermanns, S. y Simon, M., 1995, J. Biol. Chem., 270: 15175-15180; Lee, J.W.M. y otros, 1998, J Neurochem., 70: 2203-2211); Huang, Y. y otros, 1996, J. Biol. Chem. 271: 3975-3978.; Wu, D. y otros, 1992, J. Biol. Chem. 267: 25798-25802; Wu, D. y otros, 1993, Science, 261: 101-103; Zhu, X y Bimbaumer, L., PNAS USA, 93: 2827-2831; Parmentier, M.L. y otros, 1998, Mol. Pharmacol., 53: 778-786). Además, la bibliografía publicada indica que la mayor parte de estos GPCR que son particularmente 55 ineficaces en la activación de proteínas G G_{ai5} y G_{ai6} son los GPCR de tipo G_i (Mody, S.M. y otros, 2000, Mol. Pharmacol., 57: 13-23).

Por lo tanto, dado que se cree que los receptores del gusto dulce, "umami" y amargo se acoplan a la gustducina (una proteína G de tipo G_{ai}) y que los estudios mencionados anteriormente sugieren que G_{ai5} y G_{ai6} no son las parejas óptimas para los GPCR de tipo G_{ai}, un experto en la técnica no esperaría un acoplamiento eficaz de los receptores del gusto activados a G_{ai5} o bien a G_{ai6}. Por otra parte, la propia Gustducina no ofrece una solución práctica dado que esta proteína G modula la liberación de nucleótidos cílicos (NMPc) que no se miden tan fácilmente como, por ejemplo, los aumentos de iones de Calcio. La medición de los NMPc es difícil técnicamente y requiere un inmunoensayo que tarda generalmente del orden de 4 a 6 horas y, al final, sólo aporta una valoración del punto final. Además, es complicado 65 utilizar una proteína G_{ai} especializada, tal como la Gustducina, en un sistema de expresión celular heterólogo. Para hacerlo, se tendrían que introducir dos subunidades adicionales de proteína G (las subunidades beta y gamma) en las células huésped heterólogas para reconstituir completamente el complejo de gusto-receptor-proteína G. Por otra parte,

ES 2 305 536 T3

la $G_{\alpha 16}$ puede formar complejos con las subunidades beta/gama endógenas en las células de mamíferos, tales como células de la línea celular HEK 293. Es más rápido, fácil y más sensible utilizar $G_{\alpha 16}$ en lugar de una proteína G de tipo $G_{\alpha i}$, tal como Gustducina.

- 5 Permanece una necesidad de desarrollar proteínas G que muestren elevada afinidad con una amplia gama de receptores del gusto y, en particular, con los receptores dulce, “umami” y amargo, que se pueden incorporar en los ensayos de sistemas de expresión heterólogos para cribar moduladores de la respuesta al gusto humana, para cuantificar, de este modo, la actividad de las moléculas estimuladoras del gusto conocidas y para descubrir nuevas.
- 10 En la técnica anterior se ha sugerido la utilización de proteínas G químéricas. En la patente WO 02/36622 se describe una proteína $G_{\alpha q}$ químérica que se sustituye con, como mínimo 5 unidades de aminoácido del extremo C-terminal de la Transducina. Se describe que dichas proteínas Químéricas son más promiscuas que la $G_{\alpha q}$ nativa en relación a dos GPCR quimiosensoriales. Sin embargo, en particular, el único receptor del gusto ensayado en esta referencia fue un receptor amargo de ratón. Por lo tanto, no está claro si alguna de las proteínas químéricas descritas 15 se acoplaría más eficientemente a los receptores del gusto amargo, dulce o “umami” humanos.

20 Mody S.M. en Molecular Pharmacology 57: 13-23 (2000) describe quimeras de $G_{\alpha 16}$ y una secuencia específica de $G_{\alpha 2}$ y su promiscuidad aumentada hacia los receptores acoplados a $G_{\alpha i}$. Mody concluye que las proteínas químéricas no son adaptadores universales de los GPCR, pero son capaces de mejorar el reconocimiento de subgrupos específicos 25 de GPCR. Particularmente, ninguno de los GPCR en los subgrupos estudiados incluyó receptores del gusto.

De forma sorprendente, los presentes inventores han encontrado actualmente que las proteínas G químéricas basadas en la $G_{\alpha q}$ -Gustducina son capaces de unirse a una amplia variedad de receptores conocidos y supuestos del gusto amargo, y receptores dulce y “umami” con elevada afinidad.

- 25 Por consiguiente, la presente invención da a conocer en un primer aspecto una proteína G químérica $G_{\alpha q}$ -Gustducina.
- En una realización específica la $G_{\alpha q}$ -Gustducina químérica es una proteína $G_{\alpha 15}$ ó $G_{\alpha 16}$ -Gustducina, más específicamente una 30 proteína $G_{\alpha 16}$ -Gustducina.
- 30 En una realización específica adicional la proteína G es una en la que, como mínimo, los últimos 5 aminoácidos de la $G_{\alpha q}$ se sustituyen por un número correspondiente de aminoácidos de la Gustducina, más particularmente las últimas 44 secuencias de aminoácidos de la $G_{\alpha q}$ se sustituyen por una unidad de 44 aminoácidos de la Gustducina.
- 35 En una realización preferente se da a conocer una proteína que tiene secuencias de aminoácidos, tal como se muestra en la SEQ ID 2.

Otro aspecto de la presente invención da a conocer un ácido nucleico que codifica una proteína, tal como la que se ha definido anteriormente.

- 40 En una realización preferente, el ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID 1.
- Mientras que las proteínas químéricas de la presente invención se pueden formar haciendo sustituciones en el 45 extremo C terminal de la Gustducina, la persona experta en la materia comprenderá que se pueden incorporar otras sustituciones o mutaciones en la proteína G que pueden afectar su promiscuidad y/o su grado de acoplamiento a un receptor determinado y estas variantes de las proteínas G forman otro aspecto de la presente invención. Además, dichas 50 sustituciones o mutaciones se pueden formar sin que el experto en la técnica tenga que recurrir a cualquier actividad inventiva, simplemente utilizando técnicas de rutina de la tecnología génica, tales como PCR, la clonación de genes, mutagénesis dirigida a lugar o ADNc, transfección de células huésped y transcripción *in vitro*. Después de lo anterior, las variantes se pueden cribar para el acoplamiento funcional a los receptores.

- 55 En una realización específica de este aspecto de la presente invención se da a conocer una variante que es un polipéptido que tiene el 80%, preferentemente el 90%, más preferentemente el 95% o superior de homología con la secuencia que se muestra en la SEQ ID No. 2.
- Otros aspectos de la presente invención son un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica las proteínas G químéricas definidas en la presente invención y células huésped transformadas o transfectadas con dicho vector.

- 60 Todavía en otro aspecto de la presente invención se da a conocer un método para la producción de una proteína G químérica, tal como se han definido, que comprende la etapa de cultivo de células huésped, tal como se ha definido, que contienen en ellas un vector de expresión que codifica la proteína G químérica, bajo condiciones suficientes para la expresión de dicha proteína G, causando de este modo la producción de la proteína y la recuperación de la proteína producida por la célula.
- 65 Todavía en otro aspecto de la presente invención se da a conocer un método para el análisis y descubrimiento de moduladores de los receptores del gusto, en particular, receptores amargo, dulce y “umami”, mediante proteínas químéricas definidas en la presente.

En una realización específica se da a conocer un ensayo basado en células de mamífero que utiliza un gen transfectado transitoriamente o ADNc que codifica una proteína quimérica de la presente invención y un receptor del gusto, en particular un receptor amargo, dulce o “umami”, comprendiendo el método las etapas de poner en contacto un compuesto con las células y la determinación de los efectos funcionales del compuesto sobre el complejo receptor: 5 proteína G quimérica, tal como un incremento en los mensajeros secundarios citosólicos.

En otra realización específica de este aspecto, la presente invención se dirige a un ensayo basado en células de mamífero, que utiliza un gen expresado de forma estable o ADNc.

10 Todavía en otra realización específica, la presente invención se dirige a un ensayo basado en células de mamífero en el que las células expresan de forma estable tanto el receptor como la proteína G quimérica, preferentemente en forma inducible.

15 Todavía en otro aspecto de la presente invención, se da a conocer un compuesto, o colección de compuestos que contienen el compuesto, que actúa para modular la respuesta al gusto de los receptores del gusto, en particular los receptores amargo, dulce o “umami”, para la utilización en un método de ensayo definido en la presente invención.

20 Todavía en otro aspecto de la presente invención se da a conocer un compuesto, o colección de compuestos que contienen el compuesto, que se identifica como modulador de la respuesta al gusto mediante el método de ensayo descrito en la presente invención y alimentos, bebidas o preparaciones farmacéuticas o nutracéuticas orales que contienen el mismo.

25 Los diferentes aspectos de la presente invención se describirán con más profundidad en la presente invención, en referencia a la descripción detallada, el listado de secuencias y los Ejemplos.

Descripción detallada de la invención

Se pueden utilizar sistemas de expresión transitorios bien establecidos, los cuales se describen con más detalle a continuación, para establecer la capacidad de las proteínas G químéricas de la presente invención para acoplarse con receptores del gusto GPCR y en particular, receptores del gusto amargo, receptores dulce y “umami”.

Las células que expresan tanto una proteína G de la presente invención como un GPCR se pueden poner en contacto con compuestos estimuladores del gusto conocidos.

35 Ejemplos de compuestos estimuladores del gusto amargo que se pueden utilizar en la presente invención se seleccionan del grupo que comprende Acteosido, Adhumulona, Adlupulona, Aesculetina, Aesculina, L-Alanina, L-alanil-L-alanil-L-Alanina, L-alanil-L-isoleucil-L-Alanina, L-valil-L-valil-Amarogentina, Amaropanina, AmaroSwetina, Amigdalina, Angustifolina, Antiacetilhumulona, Antiisohumulona, Arginina, L-Arginil Leucina, Arginil Leuci Leucina, Arginil Prolina, Asaronaldehido, Ácido Aspartil Aspártico, Asparasaponina I, Atropina, Bencil beta-D-arabinósido, Bencil beta-L-arabinósido, Bencil beta-D-fructósido, Bencil beta-D-galactósido, Bencil alfa-D-glucósido, Bencil beta-D-glucósido, Bencil alfa-D-manósido, Péptidos Amargos, Péptidos Amargos de Proteínas de Soja, Butil alfa-D-glucósido, Butil beta-D-glucósido, Cafeína, Carnosiflósido II, Carnosiflósido III, Carnosiflósido IV, Catequina, Epicatequina, galato de Epicatequina, Caconina, alfa-Caconina, beta2-Cloranfenicol, Ácido cárlico, Cicorína, Cohumulona, Colupulona, Ácido Criptoclorogénico, gamma-lactona, Cucurbitacina B, Cucurbitacina D, Ciclo Alanina-glicina, Ciclo Alanina-fenilalanina, Ciclo Alanina-valina, Ciclo(L-arginilglicil-L-prolil-L-prolil-L-fenilalanil-L-isoleucil-L-valil), Ciclo Asparagina-fenilalanina, Ciclo Glicina-fenilalanina, Cicloheximida Ciclo Lucina-Tríptofano, Ciclopent(b)acepin-8(1 H)-ona, 7-Metil-2,3,6,7-Tetrahidro-Ciclopent(b)acepin-8(1H)-ona, 2,3,6,7-tetrahidro-7-hidroxí-7-metil-Ciclopent-2-en-1-ona, 2,5-dihidroxi-5-metil-3-(1-piperidinil)-Ciclopent-2-en-1-ona, 2,5-dihidroxi-5-metil-3-(1-pirrolidinil)Ciclopent-2-en-1-ona, 2,3-di-1-pirrolidinil-Ciclopent-2-en-1-ona, 5-hidroxi-5-metil-2,3-di-1-piperidinil-Ciclopent-2-en-1-ona, 5-hidroxi-5-metil-2,3-di-1-pirrolidinil-Ciclopent-2-en-1-ona, 5-metil-2,3-di-1-pirrolidinil-Ciclopent-2-en-1-ona, 5-metilen-2,3-di-1-pirrolidinil-Ciclopent-2-en-1-ona, ácido 3-metil-2-(1-pirrolidinil)-Ciclo Fenialanina-aspártico, Ciclo Prolina-alanina, Ciclo Prolina-asparagina, Ciclo Prolina-glicina, Ciclo Prolina-isolucina, Ciclo Prolinaleucina, Ciclo Prolina-metionina, Ciclo Prolina-fenilalanina, Ciclo Prolinaprolina, Ciclo Prolina-valina, Ciclo Valina-fenilalanina, Cinaratriol, Cinaropicrina, Cinaropicrina, Daidceína, Daidcina benzoato de Denatonium, Denatonium sacárido, Dhurrina, Ácido Dihidroxibenzoico, Ácido 2,3-Dihidroxibenzoico, 2,4-Etil b-L-arabinósido, Etil alfa-D-Glucósido, Etil beta-D-Glucósido, Eustomorósido, Eustomósido, Ácido Gálico, Epigalocatequina, Galato de Epigalocatequina, Gaudicaudiósido F, Gelidósido, Genisteína, Genistina, Gentiopicrósido, Ácido Gentístico, Genitomósido, Geshoidina, 6'-O-beta-D-Glucosilgentipicrósido, ucozaluzanina C, Ácido Glutamil Aspártico, Ácido Glutamíl Glutámico, Glicil Leucina, Goitrina, Gramina, Grosshemina, Hematoxilina, Tetrametil Éter Helicina, Heptadeca-60 16-eno, 1-Acetoxy-2,4-Dihidroxi-Heptadeca-16-eno, 1,2,4-Trihidroxi-Histidina, L-Hulupona, Humulinona, Humulona, Ácido Hidroxibenzoico, 4-Himenósido A, Himenósido B, Himenósido C, Himenósido D, Himenósido E, Himenósido F, Isohumulona, cis-Isohumulona, trans-Isoleucina, L-isolupanina, Isosparteína, beta-Isosparteína, 10,17-Dioxo-beta-Isosparteína, 10-oxo-beta-Lactucina, L-Leucina, L-alanil-L-alanil-L-Leucina, N-[(2R)-6-amino-2-[(4S)-2,5-dioxo-4-(fenilmetil)-1-imidazolidinil]-1-oxohexil]-L-leucil-L-metionil-N-metil-L-fenilalanil-, (4-1)-lactam, L-Leucina, glicil-L-alanil-Leucina, L-L-Leucina, N-(N2-L-leucil-L-glutaminil)-L-Leucina, N-(N-L-leucil-L-a-glutamil)-L-Leucina, N-[N2-[N2-[N-(1-L-leucil-L-prolil)-L-fenilalanil]-L-seril]-L-glutaminil]-L-Leucina, N-[N2-[N-[N-(1-L-leucil-L-prolil)-L-fenilalanil]-L-seril]-L-glutaminil]-L-Leucina, L-leucil-L-valil-Leuci Leucina, Leucil Fenilalanina, Limonina, Limoninmonolactona, Linamarina, Lotaustralina, Lupina, Lupanina, 13-Hidroxi-Lupanina, 7-hidroxi-Lu-

ES 2 305 536 T3

pinina, Epilupinina Lupoxes B, Lupoxes C, Lupulona, Luputriona, Meleína, 6-Metoxi-Metionina, L-Metil alfa-L-arabinósido, Metil beta-L-arabinósido, Metil beta-D-Glucósido, Metil alfa-D-Glucósido 2,3-Di-isoleucina, Metil alfa-D-Glucósido 2,3-Di-leucina, Metil alfa-D-Glucósido 2,3-Di-L-fenilalanina, Metil alfa-D-Glucósido 2,3-Di-treonina, Metil alfa-D-Glucósido 2,3-Di-tirosina, Metil a-D-manósido, Metil beta-L-xilopiranósido, Metil alfa-D-xilosido, Naringina, Ácido Neoclórógeno, gamma-Lactona, Neohesperidina, Nuezhénido, Oleonuezhénido, Oleuropeína, Olivierósido A, Olivierósido B, Olivierósido C, Perrottetina H, Fenilalanina, L-Fenil alfa-D-galactósido, Fenil alfa-D-glucósido, Fenil beta-D-glucósido, Feniltioureia, Flomísido II, ácido Piperidin-2-carboxílico, ácido 4-[(2-carboxi-2-hidroxietil)tolu]Piperidincarboxílico-2,4-[(2-carboxi-2-hidroxietil)tolu]Prehumulona, Prelupulona, Propil beta-D-fructósido, Propil alfa-D-glucósido, Propil beta-D-glucósido, Ácido Protocatechuico, Prunasina, Pulquerrima, Quinidina, Quinina, Quinolizinium-7-olato, Ranitidina, Rebaudiósido C, Salicina, Salidrósido, Escabrárido, Escandenósido R5, Esclareólido, Escopolina, Septemfidósido, Seril Lisil Glicil Leucina, Sinapina, Solanina, alfa-Esparteína, Esparteína, 17-oxo-Estevisaliósido A, Estricnina, Suaviósido C1, Suaviósido D2, Suaviósido F, Octaacetato de Sacarosa, Swerósido, Swertia marina, Swertia punimaria, Taxipilina, TFI (Furostano, beta-D-galactopiranósido), Teaflavina, Galato de Teaflavina A, Galato de Teaflavina B, Tomatidina, Tomatina, alfa-Triciclodihydroisohumulona, Triflorósido, 15 Ácido Trihidroxibenzoico, 2,4,6-Triptófano, L-Uracilo, 6-propil-2-tio-L-Valina, L-arginilglicil-L-prolil-L-prolil-L-fenilalanil-L-isoleucil-(BPla)Valina y L-Yohimbina.

Como ejemplos de estimuladores del gusto dulce o compuestos que modifican el gusto dulce pueden mencionarse Teasaponina E1, Acesulfamo K, Alitamo, Aspartamo, CH 401, Dulcina, Eritritol, Edulcorante de Guanidina, 20 Isomalto, Isomaltosilfructósido, Isorafinosa, NC 174, Neotamo, Perillartina, Fenilacetilglicil-L-Lisina, Sacarina, SC 45647, Ciclamato de sodio, Sorbitol, Sucralosa, Ácido Sucronónico, Suosano, Superaspartamo, Metil alfa-L-arabinósido, Metil beta-L-arabinósido, Metil beta-D-Glucósido, Metil a-D-manósido, Metil beta-L-xilopiranósido, Metil alfa-D-xilosido, Metil alfa-D-Glucósido 2,3-Di-treonina, Metil alfa-D-Glucósido 2,3-Di-isoleucina, Ácido Protocatechuico, Cinarina, Glicifilina, Rebaudiósido C, Abrusósido A, Abrusósido B, Abrusósido C, Abrusósido D, Abrusósido 25 E, Apioxiciricina, Arabogliciricina, Baiyunósido, Braceína, Briadulcósido, Carnosiflósido V, Carnosiflósido VI, D. cumminsii, Ciclocariósido A, Ciclocariósido I, Dulcósido A, ácido Fluoren-4-alfa,6-dicarboxílico, 4-beta,10-alfa-dimetil-1,2,3,4,5,10-hexahidro-Gaudicauósido A, Ácido Glicirrífico, Hernandulcina, Hernandulcina, 4beta-hidrox-Hesperitin-7-Glucósido Dihidrochalcona, Huangquiósido E, Huangquiósido E, 3-Hidroxifloridecina, Camperol, 2,3-Dihidro-6-Metoxi3-O-Aacetato, Mabinlina Maltosil-Alfa-(1,6)-Neohesperidina Dihidrochalcona, Mogrósido IIE, Mogrósido III, Mogrósido IIIE, Mogrósido IV, Mogrósido V, 11-Oxo Mogrósido V, Monatina, Monelina, Glicirrincinato de Monoamonio (Mag), Mukurocósido lib, Naringina Dihidrochalcona, Neoastilbina, Neohesperidina Dihidrochalcone (NHDHC), Neomogrósido, Osladina, Pentadina, Periandrina I, Periandrina II, Periandrina III, Periandrina IV, Periandrina V, Flomísido I, Floricina, Filodulcina, Polipodósido A, Potasio magnesio calcio glicirricina, Pterocáriósidos A, Pterocáriósidos B, Quercetina, 2,3-Dihidro-3-O-Aacetato, Quercetina, 2,3-Dihidro-6-Metoxi-Quercetina, 2,3-Dihidro-35 6-Metoxi-3-O-Aacetato, Rebaudiósido A, Rebaudiósido B, Rubusósido, Escandenósido R6, Siamenósido I, glicirrincinato de sodio, Esteviobíósido, Esteviósido, Esteviósido, alfa-Glicosil Suaviósido A, Suaviósido B, Suaviósido G, Suaviósido H, Suaviósido I, Suaviósido J, Taumatina, Glicirrincinato de Triamonio (TAG), Trilobatina Selligueáfina A, Hematoxilina, Maltitol, Manitol, ácido Metil alfa-D-Glucósido 2,3-Di-aspártico, Ácido Benzoíco, Ácido 2-(4-Dimethylaminobenzoíl)-Benzoíco, Ácido 2-Hidroxi-4-aminometil-Benzoíco, 2-(3-Hidroxi-4-Metoxibenzoíl)-Metil beta-D-fructósido, Metil alfa-D-galactósido, Metil beta-D-galactósido, Curculina, Estrogina 1, Estrogina 2, Estrogina 4, Miraculina, Ácido Fenilacético, Ácido 3,4-Dimetoxi-Aminobenzoíco, Ácido 3-Anísico, Alcohol Bencílico, 3-Amino-4-n-propoxil, Ácido 3,4-Cafeico, Ácido Cinámico, Ácido Dihidroxycinámico, Ácido 2,4-Ferúlico, Goma Guar Hidrolizada, Ácido Hidroxiaminobenzoíco, 2,4-Nigerooligosacáridos, Extracto de Sugarcane Bagasse, Ácido Dihidroxibenzoíco, Ácido 2,3-Dihidroxibenzoíco, Ácido 2,4-Cumárico, Ácido p-Dihidroxibenzoíco, Ácido 3,5-Hidroxibenzoíco, 3-Gurmarina, Gimnemasaponina III, Gimnemasaponina IV, Gimnemasaponina V, Ácido Gimnémico I, Ácido Gimnémico II, Ácido Gimnémico III, Ácido Gimnémico IV, Hodulcina, Jujubasaponina II, Jujubasaponina III, Ácido Propiónico, (-)-2-(4-Metoxifenoxi)-Cicicina, Etil Maltol, Maltol, Ácido Butanoico, 2-Oxo-3-Metil-Alanina, N-(1-Metil-4-oxo-2-imidazolina-2-il)Creatinina, Abrusósido E, éster mono-metílico, Lactitol, Ácido Periandrínico I, monoglucurónico, Ácido Periandrínico II, monoglucurónico, Xilitol, Tagatosa, Ácido d-Benzoiloxiacético, 4-Metoxi Hodulósido 50 1,4-Nitrofenil a-D-galactósido, 4-Nitrofenil alfa-D-glucósido, 4-Nitrofenil beta-D-glucósido, 4-Nitrofenil alfa-D-mannopiranósido, Urea, (N-(4-cianofenil)-N'-(sodiosulfo)metil)-Cloranfenicol, Ácido Clorogénico, Metil alfa-D-Glucósido, Metil alfa-D-Glucósido 2,3-Di-alanina, Metil alfa-D-Glucósido 2,3-Di-glicina, Metil alfa-D-Glucósido 2,3-Di-prolina, Metil alfa-D-Glucósido 2,3-Di-valina, Anilina, 2-Butoxi-5-NitroAnilina, 2-Etoxi-5-Nitro-Anilina, 2-Metoxi-5-Nitro-Anilina, 3-Nitro-(+)-Baiyunol-beta-D-glucósido-alfa-D-glucósido, Anilina, 1,3-Hidroxi-4-metoxibencilAnilina, Ácido 2-Propoxi-5-Nitro-(P4000)Benzo-1,4-dioxano 2-(3-Hidroxi-4-Metoxifenil)-Benzoe-1,3-dioxan-4-ona 2-(3-Hidroxi-4-metoxifenil)-Benzoíco, Ácido 2-Benzoíl-4-Metoxi-Benzoíco, 2-(4-Metoxibenzoíl)-Benzo-1,3(4H)-xatiano, Ácido 2-(3-Hidroxi-4-Metoxifenil)-Benzo-1,4-xatiano 3-(3-Hidroxi-4-metoxifenil)-Butanoico, sal monosódica de 4-[3,5-dihidroxi-4-[3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-1-oxopropil]fenoxi]-2-hidroxi, ácido butanoico, sal monosódica de 4-[3,5-dihidroxi-4-[3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-1-oxopropil]fenoxi]-3-oxo, Ciclohexadien-1,4-1-Carboxaldeído-4-(Metoximetil)-, (E)oxima Etilbenceno, beta-(1,3-Hidroxi-4-metoxibencil)-Hespertina Dihidrochalcona, 3'-Carboxi-Hespertina Dihidrochalcona, 3'-Formil-Isocumarina, 3,4-Dihidro-3-(3-Hidroxi-4-metoxi)-Perillartina, 8,9-epoxi-Fenil 3-Hidroxi-4-metoxibencil Éter, Ácido Fosfónico, sal monopotásica de [3-[3,5-dihidroxi-4-[3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-1-oxopropil]fenoxi]propil], análogo de Esteviósido, ácido Sulfámico, sal monopotásica de [2-[3,5-dihidroxi-4-[3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-1-oxopropil]fenoxi]etil], Urea, y N-(4-cianofenil)-N'-(2-carboxietil)-L-Teanina.

Como estimuladores de "umami" se pueden mencionar Glutatona, Ácido Glutamil Glutámico, (Z)-6-Dodecen-4-ólido, Ácido Inosínico, Dodec-Z6-en-4-ólido, Ácido Glutámico, Ácido L-Aconítico, N-(1-deoxi-fructos-1-il) glu-

ES 2 305 536 T3

tamato, proteína vegetal hidrolizada, Metil alfa-D-Glucósido, 2,3-Di-lisina, Metil alfa-D-Glucósido 2,3-Di-ornitina, L-Asparagina, Ácido L-a-glutamil-L-a-glutamil-L-Glutámico, L-a-aspartil-L-a-glutamil-Glutamil valina, Hidrolizado de gluten de Trigo, Ácido L-Aspártico, Ácido L-a-aspartil-L-a-aspartil-L-a-aspartil-Docosahexaenoico y (4Z,7Z,10Z, 13Z,16Z,19Z)-L-Teanina.

5 Los efectos funcionales de las moléculas estimuladoras del gusto sobre la proteína G se pueden determinar midiendo los cambios en los parámetros de las vías de transducción, tales como el IP₃ y el Ca²⁺ intracelular o mediante otros ensayos específicos de proteína G, tales como el marcaje con GTP γ S, según técnicas conocidas en la materia y que se describen con más detalle a continuación.

10 Muchos receptores del gusto amargo funcionales y huérfanos y receptores dulces y “umami” son capaces de acoplarse con las proteínas G químéricas de la presente invención. Como receptores amargos, se pueden mencionar los denominados T2R o TAS2R descritos en Bufe y otros en *Nature Genetics* 32: 397-401 o Chandrashekhar y otros en *Cell*, 100: 703-711 o Matsunami en *Nature*, 404: 601-604. Mientras que, como receptores dulces o “umami” se pueden mencionar los conocidos receptores T1R, tal como se describe en Li, X. y otros, 2002, *PNAS USA*, 99: 4692-4696; Nelson, G. y otros, 2002, *Nature*, 416: 199-202; y Nelson, G. y otros, 2001, *Cell*, 101: 381-390. Todavía adicionalmente, las proteínas G químéricas de la presente invención son capaces de provocar una respuesta celular más fuerte cuando se une un ligando a un receptor GPCR determinado, en comparación con las proteínas G_{aq} nativas y aquellas proteínas G_{aq} químéricas sobre las que se ha informado, a las que se ha hecho referencia anteriormente en la presente invención.

15 20 Para ilustrar esto, se pueden poner en contacto células de Mamífero, por ejemplo, células HEK293T transfectadas con un conocido receptor del gusto amargo funcional, conocido con el nombre de TAS2R16, tal como describe y caracteriza Bufe (véase la referencia anterior) y la proteína G químérica G_{α16-gustducina44} de la presente invención, con salicina 5 mM o fenil-beta-D-glucopiranósido 5 mM (ambos conocidos estimuladores del gusto amargo) según el siguiente protocolo para provocar una señal fluorescente robusta (utilizando Flexstation) que es aproximadamente 3 veces más fuerte que una proteína G químérica de referencia (G_{α16-z44}) y aproximadamente 7 veces más fuerte que la G_{α16} de tipo salvaje.

25 30 El protocolo se describe en “Receptores acoplados a proteínas G (Series de Transducción de Señal)” (“G-protein coupled receptors (Signal Transduction Series)”), Editores: Tatsuya Haga y Gabriel Berstein, 1^a ed., 424 págs. CRC Press - Boca Raton FL; Septiembre de 1999, y se puede resumir de la siguiente forma:

35 1. Día 0: Se siembran placas de 96 pocillos con 20.000 células por pocillo y se mantienen a 37°C durante toda la noche en un medio de cultivo nutritivo.

40 2. Día 1: Las células se transfectan utilizando 300 ng de ADN de GPCR y 0,6 μ l de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) por pocillo. Las células transfectadas están y se mantienen a 37°C durante toda la noche en un medio de cultivo nutritivo.

45 3. Día 2: El medio de cultivo se retira y las células se incuban durante 1 hora (a temperatura ambiente en oscuridad) con 75 μ l de solución de ensayo de calcio que consiste en Fluo-4 AM (Molecular Probes) 1,5 μ M y probenicida disuelta en una solución de sales equilibradas de Hanks (HBSS) 2,5 mM que se ha suplementado con Hepes 10 mM, cloruro cárlico 200 μ M y albúmina de suero bovino al 0,1%, pH 7,4 a 37°C.

50 4. A cada pocillo se añaden 125 μ l de tampón lavado que consiste en probenicida disuelta en una solución de sales equilibradas de Hanks (HBSS) 2,5 mM, que se ha suplementado con Hepes 10 mM, cloruro cárlico 200 μ M y albúmina de suero bovino al 0,1%, pH 7,4 a 37°C y la placa se vuelve a incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

55 5. Se retiran las soluciones tampón y la placa se lava 3 veces con 100 μ l de tampón de lavado y las células se reconstituyen en 200 μ l de tampón de lavado y se incuban durante 15 minutos a 37°C.

60 6. La placa se coloca en un lector de microplacas de fluorescencia, por ejemplo el Flexstation (Molecular Devices) o el FLIPR (Molecular Devices) y se inicia la activación del receptor seguida de la adición de 20 μ l de una solución de reserva de ligando concentrado 10 veces. Se registra la fluorescencia continuamente durante 15 segundos antes de la adición del ligando y durante 45-75 segundos después de la adición del ligando. Los niveles de activación del receptor se definen según las dos ecuaciones siguientes: % Activación = (Fluorescencia Máxima - fluorescencia de base/fluorescencia de base) * 100 o Aumento de la Fluorescencia = Fluorescencia Máxima - fluorescencia de base, en las que la fluorescencia de base representa los niveles promedio de fluorescencia antes de la adición de ligando.

65 En otro ejemplo, se pusieron en contacto células HEK293T transfectadas con un conocido receptor del gusto amargo funcional, conocido como T2R5 de ratón (véase Chandrashekhar y otros, en *Cell*; Vol. 100, 70-711, 17 de Marzo de 2000) y la proteína G químérica G_{α16-gustducina44} de la presente invención con cicloheximida 10 uM, que fue capaz de provocar una señal de fluorescencia robusta que fue 5 veces más fuerte que la G_{α16} de tipo salvaje.

En otro ejemplo, se pusieron en contacto células HEK293 T-RexTM transfectadas de forma estable con el conocido receptor del gusto amargo funcional humano TAS2R10 (véase Bufe y otros en *Nature Genetics* 32: 397-401) y la

ES 2 305 536 T3

proteína G quimérica G16-gustducina 44 de la presente invención con estricnina 250 uM, que fue capaz de provocar una señal de fluorescencia robusta.

En otro ejemplo, se pusieron en contacto células HEK293 T-RexTM transfectadas de forma estable con TAS2R38

5 (un receptor amargo propuesto para feniltiocarbamida, véase Kim y otros en *Science* 299, 1221-5 y Bufo y otros en *Nature Genetics* 32: 397-401) y la proteína G quimérica G16-gustducina 44 de la presente invención con feniltiocarbamida 250 uM, que fue capaz de provocar una señal de fluorescencia robusta. De forma similar, propitiouracil 250 μ M provocó una respuesta robusta.

10 En otro ejemplo, se pusieron en contacto células HEK293 T-RexTM transfectadas de forma estable con TAS2R43 y la proteína G quimérica G16-gustducina 44 de la presente invención con ácido aristolóquico 10 μ M, que fue capaz de provocar una señal de fluorescencia robusta.

15 En otro ejemplo, se pusieron en contacto células HEK293 T-RexTM transfectadas de forma estable con TAS2R44 y la proteína G quimérica G16-gustducina 44 de la presente invención con ácido aristolóquico 10 μ M, que fue capaz de provocar una señal de fluorescencia robusta.

20 Aún en otro ejemplo, se pusieron en contacto células HEK293T transfectadas con el conocido complejo de receptor del gusto dulce funcional que está formado por el heterodímero de TAS1R2 y TAS1R3 humanos (Li, X. y otros, 2002, PNAS USA, 99: 4692-4696; Nelson, G. y otros, 2001, *Cell*, 101: 381-390) y la proteína G quimérica G _{α 16-gustducina44} con aspartamo, acesulfamo K o bien sucralosa 2,5 mM, todos los cuales fueron capaces de provocar una señal de fluorescencia robusta que fue 2 veces más fuerte que la G _{α 16} de tipo salvaje.

25 Las construcciones quiméricas se pueden producir de una forma conocida por sí misma utilizando Reacciones en Cadena de la Polimerasa. En una realización, las construcciones quiméricas se pueden producir utilizando una estrategia de mutagénesis por PCR con solapamiento de puente, tal como se describe en Mody S. M. y otros, 2000, Mol. Pharmacol., 57: 13-23, en la que se diseña un cebador para unirse a un extremo terminal, por ejemplo, el extremo C terminal de una G _{α q} y también para codificar, como mínimo los 5 aminoácidos derivados de la gustducina. Los productos químicos de la PCR se pueden clonar en un vector adecuado, por ejemplo pCR2.1-Topo (disponible comercialmente de la firma Invitrogen) y someterse a la secuenciación del ADN a efectos de verificar la sustitución correcta del extremo terminal de la G _{α q}.

30 Despues de la verificación de la secuencia, los fragmentos de ADNc de la G _{α q-Gustducina} quimérica se pueden subclonar en un vector adecuado, por ejemplo el vector de expresión mamífero pcDNA 3.1 y transfectar de forma transitoria en una célula huésped de mamífero, por ejemplo HEK293T o HEK T-RexTM, para verificar la expresión correcta del transgén.

35 Despues de un periodo de postransfección, por ejemplo 48 horas, se pueden preparar lisados de células y analizar mediante un análisis de transferencia Western a efectos de confirmar la expresión correcta de las proteínas quiméricas. 40 Una vez se ha confirmado la expresión correcta de la proteína, se pueden transfectar células de mamífero adecuadas, por ejemplo HEK293T o HEK T-RexTM para generar células que expresan de forma estable la G _{α q-Gustducina} quimérica, según técnicas bien conocidas en la materia.

45 Al poner en práctica algunos de los diferentes aspectos y realizaciones de la presente invención en relación a la clonación, la determinación de las parejas ligando-receptor y el descubrimiento de moduladores de la respuesta amarga, dulce o "umami", se recurre a técnicas convencionales en la biología molecular, microbiología y tecnología recombinante. Por consiguiente, la persona experta en la materia está completamente informada de dichas técnicas y, de este modo, se tratan en adelante sólo a modo de resumen a efectos de describir en más profundidad el contexto de la presente invención.

50 55 A efectos de expresar los ADNc que codifican las proteínas G o los receptores, habitualmente se subclona el ADNc adecuado en un vector de expresión que contiene un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un terminador de transcripción/traducción y un sitio de unión a ribosomas para la iniciación traduccional. En la técnica se conocen bien promotores bacterianos adecuados, por ejemplo, *E. Coli*, *Bacillus* sp. y *Salmonella*, y están disponibles comercialmente equipos para dichos sistemas de expresión. De forma similar, en la técnica se conocen sistemas de expresión eucarióticos para células de mamíferos, levaduras y células de insectos y también están disponibles comercialmente. El vector de expresión eucariótico puede ser, por ejemplo, un vector adenovírico, un vector adenoasociado o un vector retrovírico.

60 65 Además del promotor, el vector de expresión contiene, habitualmente, una unidad de transcripción o un casete de expresión que contiene todos los elementos adicionales necesarios para la expresión del ácido nucleico que codifica la proteína G o el receptor en las células huésped. De este modo, un casete de expresión típico, contiene un promotor unido de forma operativa a una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína G o el receptor y señales, necesarias para la poliadenilación eficaz del tránscrito, sitios de unión a ribosomas y terminación de la traducción. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína G o el receptor, según sea el caso, puede estar unida habitualmente a una señal de dirección a membrana, tal como la secuencia de 45 aminoácidos del extremo N terminal del receptor de Somatostatina-3 de rata para promover la expresión eficaz de superficie celular de la proteína G o del receptor recombinante. Se pueden incluir elementos adicionales, por ejemplo, potenciadores.

ES 2 305 536 T3

Un casete de expresión también debería contener una región de terminación de la transcripción más abajo del gen estructural para facilitar una terminación eficaz. La región de terminación se puede obtener del mismo gen que la secuencia del promotor o se puede obtener de diferentes genes.

5 Para la expresión de las proteínas G o los receptores, se pueden utilizar vectores convencionales para la expresión en células eucariotas o procariotas bien conocidos en la técnica. Entre los ejemplos de vectores se incluyen, aunque no se limitan a ellos, vectores de expresión bacteriana estándares que incluyen plásmidos, tales como los plásmidos basados en pBR322, pSKF, pET23D y sistemas de expresión de fusión, tales como GST y LacZ.

10 Los vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucarióticos se utilizan habitualmente en vectores de expresión eucarióticos, por ejemplo, vectores de SV40, vectores de citomegalovirus, vectores del virus del papiloma y vectores derivados del virus de Epstein-Barr. Entre otros vectores eucarióticos de ejemplo se incluyen pMSG, pAV009/A.sup.+ , pMT10/A.sup.+ , pMAMneo-5, pDSVE de baculovirus, pcDNA3.1, pIRES y otros vectores que permiten la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano de SV40, el promotor tardío 15 de SV40, el promotor de metalotioneína, el promotor del virus de tumor mamario murino, el promotor del virus del sarcoma de Rous, el promotor de polihedrina u otros promotores que muestran eficaces para la expresión en células eucarióticas.

20 Algunos sistemas de expresión tienen marcadores que proporcionan la amplificación de genes, tales como timidina quinasa, higromicina B fosfotransferasa y dihidrofolato reductasa. De forma alternativa, también son adecuados los sistemas de expresión de campo alto que no implican la amplificación de genes.

25 Los elementos que se incluyen habitualmente en los vectores de expresión también incluyen un replicón que funciona en *E. coli*, un gen que codifica la resistencia a los fármacos para permitir la selección de bacterias que 30 albergan plásmidos recombinantes y sitios de restricción únicos en regiones no esenciales del plásmido para permitir la inserción de secuencias eucarióticas. El gen particular de resistencia a los fármacos escogido no es crítico, cualquiera de los muchos genes resistentes a los fármacos conocidos en la técnica es adecuado. Las secuencias procarióticas se escogen opcionalmente, de tal modo que no interfieran con la replicación del ADN en células eucarióticas, si fuera necesario.

30 Se pueden utilizar métodos de transfección estándares para producir líneas de células bacterianas, de mamíferos, de levaduras o de insectos que expresan grandes cantidades de proteína G o receptor, las cuales se purifican posteriormente utilizando técnicas estándares.

35 Se puede utilizar cualquiera de los procedimientos bien conocidos para la introducción de secuencias de nucleótidos en las células huésped. Éstos incluyen la utilización de la transfección con fosfato cálcico, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, liposomas, microinyección, vectores plasma, vectores víricos y cualquiera de los otros 40 métodos bien conocidos para la introducción del ADN genómico clonado, ADNc, ADN sintético u otro material genético foráneo en una célula huésped. Sólo es necesario que el procedimiento de ingeniería genética particular utilizado sea capaz de introducir con éxito, como mínimo un gen dentro de la célula huésped capaz de expresar el receptor.

45 Por ejemplo, se puede utilizar el sistema de expresión T-RexTM (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). El Sistema T-RexTM es un sistema de expresión mamífero regulado por tetraciclina que utiliza elementos reguladores del operón de resistencia a tetraciclina (Tet) de *E. Coli* codificado por Tn10 (Hillen y Berens 1994, Annu. Rev. Microbiol. 48, 345-369; Hillen y otros, 1983, Control, J. Mol. Biol. 169, 707-721). La regulación de la tetraciclina en el Sistema T-RexTM está basada en la unión de la tetraciclina al represor Tet y la desrepresión del promotor que controla la expresión del gen de interés (Yao y otros 1998, Hum. Gene Ther. 9, 1939-1950).

50 Después de que el vector de expresión se introduzca en las células, las células transfectadas se pueden cultivar bajo condiciones de cultivo estándares. La proteína G o la proteína de receptor se puede recuperar del cultivo mediante técnicas estándares. Por ejemplo, las células se pueden abrir de golpe mecánicamente o bien mediante choque osmótico antes de someterlas a etapas de precipitación y cromatografía, la naturaleza y secuencia de las cuales dependerá del material recombinante particular que se va a recuperar. De forma alternativa, la proteína G o el receptor recombinante 55 se pueden recuperar del medio de cultivo en el cual las células recombinantes se han cultivado.

60 La actividad de un receptor en la unión a los ligandos y el acoplamiento de la proteína G al receptor se pueden evaluar utilizando diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar los efectos funcionales, químicos y físicos, por ejemplo, midiendo la unión al ligando, los mensajeros secundarios (por ejemplo, AMPc, GMPc, IP₃, DAG o Ca²⁺), el flujo de iones, los niveles de fosforilación, los niveles de transcripción, los niveles de neurotransmisor y similares. Además, dichos ensayos se pueden utilizar para ensayar inhibidores de los receptores, tal como se conoce bien en la técnica.

65 Las muestras o ensayos que se tratan con un inhibidor de receptor potencial se pueden comparar con muestras de control sin el compuesto de prueba, para examinar la extensión de la modulación. A las muestras de control (no tratadas con inhibidores) se les asigna un valor de actividad de receptor relativa de 100. La inhibición de la actividad del receptor se consigue cuando el valor de la actividad del receptor relativa al control es inferior y, por el contrario, la actividad del receptor aumenta cuando la actividad relativa al control es superior.

Los efectos de los compuestos de prueba sobre la función de los receptores se pueden medir examinando cualquiera de los parámetros descritos anteriormente. Cualquier cambio fisiológico adecuado que afecte la actividad del receptor se puede utilizar para evaluar la influencia de un compuesto de prueba sobre el acoplamiento de los receptores a las proteínas G de la presente invención. Cuando se determinan las consecuencias funcionales utilizando células o animales intactos, se pueden medir diferentes efectos, tales como cambios en los mensajeros secundarios intracelulares, tales como Ca^{2+} , IP_3 o AMPc. En la patente WO 01 18050 se describen ensayos adecuados para hacer dichas mediciones.

Entre los ensayos preferentes para los receptores acoplados a proteínas G se incluyen células que se cargan con tintes sensibles a iones para dar información sobre la actividad del receptor, tal como se presentan de forma más completa en "Receptores acoplados a proteínas G (Series de Transducción de Señal)" ("G-protein coupled receptors (Signal Transduction Series)"), CRC Press 1999; 1^a Edición; Editores Haga y Berstein. En ensayos para la identificación de compuestos moduladores, se registrarán cambios en el nivel de iones en el citoplasma o en la tensión de la membrana mediante un indicador fluorescente sensible a iones o a la tensión de membrana, respectivamente.

La activación del receptor habitualmente inicia procesos intracelulares posteriores, por ejemplo, aumento de mensajeros secundarios, tales como el IP_3 , el cual libera depósitos intracelulares de iones de calcio. La activación de algunos receptores acoplados a proteínas G estimula la formación de inositol trifosfato (IP_3) a través de la hidrólisis del fosfatidilinositol mediada por fosfolipasa C (Berridge & Irvine, Nature 312:315-21 (1984)).

A su vez, el IP_3 estimula la liberación de depósitos de iones de calcio intracelulares. De este modo, se puede utilizar un cambio en los niveles de iones de calcio citoplásmicos o un cambio en los niveles de mensajero secundario, tal como IP_3 , para evaluar la función del receptor acoplado a proteína G. Las células que expresan dichos receptores acoplados a proteína G pueden mostrar niveles de calcio citoplásmico aumentados como resultado de la contribución de los depósitos intracelulares y a través de la activación de los canales de iones, en cuyo caso puede ser deseable, aunque no necesario, llevar a cabo dichos ensayos en un tampón libre de calcio, opcionalmente suplementado con un agente quelante, tal como EDTA, para distinguir la respuesta de fluorescencia que resulta de la liberación de calcio de los depósitos internos.

En una realización preferente, la actividad del receptor se mide mediante la expresión del receptor en una célula con una proteína G, tal como se ha definido anteriormente en la presente invención, que une el receptor a una vía de transducción de señal de fosfolipasa C. Opcionalmente, la línea celular es HEK-293, aunque también son preferentes otras células de mamíferos, tales como células CHO y COS. La modulación de la transducción del gusto se ensaya midiendo cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelular, los cuales cambian como respuesta a la modulación de la vía de transducción de señal del receptor a través de la administración de una molécula que se asocia con el receptor. Los cambios en los niveles de Ca^{2+} se miden opcionalmente mediante tintes fluorescentes indicadores de Ca^{2+} y técnicas de imagen fluorométricas.

Todavía en otra realización, se pueden utilizar los dominios de unión al ligando de los receptores *in vitro* en reacciones solubles o en estado sólido para ensayar la unión al ligando. La unión al ligando en un receptor, o en un dominio de un receptor, se puede ensayar en solución, en una membrana de bicapa acoplada a una fase sólida en una monocapa lipídica o en vesículas. De este modo, se puede observar la unión de un modulador al receptor, o dominio, utilizando cambios en las características espectroscópicas, por ejemplo, fluorescencia, absorbancia o índice de refracción; o propiedades hidrodinámicas (por ejemplo, la forma), cromatográficas o de solubilidad, tal como se conoce de forma general en la técnica.

Los compuestos ensayados como moduladores de receptores pueden ser cualquier compuesto químico pequeño, o una entidad biológica, tal como una proteína, azúcar, ácido nucleico o lípido.

Habitualmente, los compuestos de prueba serán moléculas químicas pequeñas. Esencialmente, se puede utilizar cualquier compuesto químico como modulador potencial o ligando en los ensayos de la presente invención, aunque el conocimiento de la especificidad de un ligando de un receptor individual permitiría a una persona experta en la técnica hacer una preselección de compuestos interesantes. Algunos compuestos preferentes se han expuesto anteriormente en la presente invención. Los ensayos se pueden diseñar para cribar bibliotecas químicas grandes mediante la automatización de las etapas de ensayo y facilitando compuestos de cualquier fuente conveniente para los ensayos, que se llevan a cabo, habitualmente, en paralelo (por ejemplo, en formatos de microtitración sobre placas de microtitración en ensayos robotizados). El experto en la técnica entenderá que hay muchos proveedores de bibliotecas de compuestos químicos.

Los ensayos se pueden llevar a cabo en métodos de cribado con elevado rendimiento que implican la disposición de una biblioteca de química combinatoria o de péptidos que contiene un gran número de potenciales compuestos terapéuticos o estimuladores del gusto (que son potenciales compuestos de ligando). Dichas bibliotecas se criban entonces en uno o más ensayos, tal como se ha descrito en la presente invención, para identificar aquellos miembros de la biblioteca (especies químicas particulares o subclases) que muestran una actividad característica deseada. Los compuestos que se identifican de este modo pueden servir como compuestos de partida para desarrollar posteriormente moduladores para productos finales, o pueden utilizarse ellos mismos como moduladores reales.

ES 2 305 536 T3

Una biblioteca de química combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generada por síntesis química o bien síntesis biológica, mediante la combinación de varios “componentes esenciales” químicos, tales como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca de química combinatoria lineal, tal como una biblioteca de polipéptidos está formada por la combinación de un conjunto de componentes esenciales químicos (aminoácidos) en todas las 5 formas posibles para una longitud de compuesto determinada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto de polipéptido). Se pueden sintetizar millones de compuestos químicos a través de dicha mezcla combinatoria de componentes esenciales químicos.

La preparación y cribado de bibliotecas químicas combinatorias es bien conocida por los expertos de la técnica y 10 no necesita exponerse con más detalle en la presente invención.

En los ensayos de elevado rendimiento de la presente invención, es posible cribar desde varios miles de diferentes 15 moduladores o ligandos en un solo día. En particular, se puede utilizar cada pocillo de una placa de microtitración para llevar a cabo un ensayo separado contra un modulador potencial seleccionado o, si se tienen que observar los efectos 20 de la concentración o del tiempo de incubación, en cada 5-10 pocillos se puede ensayar un único modulador. De este modo, una sola placa de microtitración estándar puede ensayar aproximadamente 100 (por ejemplo, 96) moduladores. Si se utilizan placas de 1536 pocillos, entonces una sola placa puede ensayar fácilmente desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 1500 compuestos diferentes. Es posible ensayar diferentes placas por día; utilizando los sistemas integrados de la presente invención son posibles cribados de ensayo de hasta aproximadamente 6.000-20.000 compuestos diferentes.

Los compuestos de partida encontrados mediante la tecnología de ensayo de la presente invención, descrita anteriormente, o compuestos de desarrollo formados de dichos compuestos de partida se pueden administrar directamente a un individuo humano para modular el gusto. De forma alternativa, dichos compuestos se pueden formular con otros 25 ingredientes de preparaciones que para tomar de forma oral, por ejemplo, alimentos y bebidas, preparaciones farmacéuticas o nutracéuticas u homeopáticas.

La cantidad de compuesto para tomar de forma oral debe ser suficiente para provocar una respuesta beneficiosa en el individuo humano y se determinará por la eficacia de los moduladores del gusto particulares y la existencia, 30 naturaleza y extensión de cualquier efecto secundario adverso que acompañe la administración de un compuesto particular.

A continuación se sigue con una serie de ejemplos que sirven para ilustrar la presente invención.

35 Para todos los ejemplos, se utilizaron células HEK293; para la transfección transitoria de los receptores, se utilizaron células HEK293T y para la transfección estable de los receptores, se utilizaron células T-ReX™ HEK293 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

Ejemplo 1

40 *Producción de la quimera G_{α16}-gustducina44*

La G_{α16}gustducina44 se construyó mediante mutagénesis por PCR de solapamiento de puente utilizando los ADNc de la G_{α16} humana y de gustducina de rata en pcDNA3.1 como patrones con secuencias de promotor T7 y SP6 como 45 regiones de cebador situadas en el exterior. Se utilizaron cebadores específicos de gen en los que:

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

16gust44-AS: (5' TTCCTTATCTTCTTTTAAGTTGCTGCCCTCGGGGCC 3')

50 En primer lugar, se amplificaron dos fragmentos de PCR que se solapaban que corresponden a G_{α16} y gustducina. El fragmento 5' de G_{α16} se hizo utilizando el cebador T7 junto con el cebador 16gust44-AS, mientras que el fragmento 3' de gustducina se hizo utilizando el cebador SP6 junto con el cebador 16gust44-S. Los productos de PCR individuales se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificaron. Los productos de PCR purificados se mezclaron, 55 se unieron entre ellos y, a continuación, los fragmentos químicos de longitud completa se amplificaron utilizando los cebadores T7 y SP6. En las mezclas de PCR se incluyó MgCl₂ 1,5 mM y los productos de PCR se amplificaron con parámetros de ciclo térmico a 94°C durante 45 s, 50°C durante 90 s y 72°C durante 120 s mediante un Sistema GeneAmp 9700 de PCR de Applied Biosystems. El fragmento de PCR químico ensamblado se subclonó en un pcDNA3.1 y se comprobó su integridad mediante la secuenciación del ADN y mapeo de restricción. Se confirmó la 60 expresión correcta de la proteína de fusión a través de un análisis de transferencia Western de los lisados de células enteras de células transfectadas utilizando un anticuerpo polyclonal anti-G_{α16} (Torrey Pines Biolabs).

Ejemplo 2

65 *Ensayo de Calcio del Fluo-4*

Todos los ensayos se llevan a cabo utilizando placas negras de 96 pocillos con el fondo transparente que se han sembrado el día anterior con 20.000 células transfectadas por pocillo y que se han mantenido a 37°C durante toda

ES 2 305 536 T3

la noche en un medio de crecimiento adecuado. En el momento del ensayo, el medio de crecimiento se retira y las células se incuban durante 1 hora (a temperatura ambiente en la oscuridad) con 75 μ l de solución de ensayo de calcio que consiste en Fluo-4 AM 1,5 μ M (Molecular Probes) y probenicida (Sigma-Aldrich) disuelta en una solución de sales equilibradas de Hanks (HBSS) 2,5 mM que se ha suplementado con Hepes 10 mM, cloruro cálcico 200 μ M

- 5 y albúmina de suero bovino al 0,1%, pH 7,4 a 37°C. Después del periodo inicial de carga de 1 hora, a cada pocillo se añaden 125 μ l de tampón lavado que consiste en probenicida disuelta en HBSS 2,5 mM que se ha suplementado con Hepes 10 mM, cloruro cálcico 200 μ M y albúmina de suero bovino al 0,1%, pH 7,4 a 37°C y la placa se vuelve a incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad para permitir la completa desesterificación del Fluo-4-AM. Se retiran las soluciones tampón, la placa se lava 3 veces con 100 μ l de tampón de lavado y finalmente 10 las células se reconstituyen en 200 μ l de tampón de lavado y se incuban durante 15 minutos a 37°C. Para la lectura del ensayo, la placa se coloca en un lector de microplacas de fluorescencia, por ejemplo el Flexstation (Molecular Devices) y se inicia la activación del receptor seguida de la adición de 20 μ l de una solución de reserva de ligando concentrado 10 veces. Se registra la fluorescencia continuamente durante 15 segundos antes de la adición del ligando y durante 45-75 segundos después de la adición del ligando. Los niveles de activación del receptor se definen según 15 las dos ecuaciones siguientes: % Activación = (Fluorescencia Máxima - fluorescencia de base/fluorescencia de base) * 100 o Aumento de la Fluorescencia = Fluorescencia Máxima - fluorescencia de base, en las que la fluorescencia de base representa los niveles de fluorescencia promedio antes de la adición de ligando.

Ejemplo 3

20 *Transfecciones de receptores de amargo T2R*

El día 0, células que expresan de forma estable la proteína G se ponen en placas negras de 96 pocillos con el fondo transparente, a una densidad de 20.000 células por pocillo y se hacen crecer durante la noche en un medio 25 de crecimiento selectivo. El día 1, el medio se cambia a un medio de crecimiento sin antibióticos y las células se transfecan utilizando 300 ng de ADN de GPCR y 0,6 μ l de Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Las células se hacen crecer durante la noche y se procesan el día siguiente utilizando las condiciones del ensayo de calcio del Fluo-4 descritas en el Ejemplo 2 anterior.

30 Ejemplo 4

Transfecciones para receptores de Dulce TIR

El día 0, células que expresan de forma estable la proteína G se ponen en una placa de 6 pocillos a una densidad de 35 800.000-950.000 células por pocillo y se hacen crecer durante la noche en un medio de crecimiento selectivo. El día 1, el medio se cambia a un medio de crecimiento sin antibióticos y las células se transfecan mediante 2 μ g de ADNc de T1R2 y 2 μ g de ADNc de T1R3 y 10 μ l de Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Las células se mantienen durante 40 la noche en un medio de crecimiento sin antibióticos. El día 2, las células se vuelven a poner en una placa, en una placa negra de 96 pocillos con el fondo transparente, a una densidad de 20.000 células por pocillo y se hacen crecer durante la noche. La mañana del ensayo del calcio, el medio se sustituye por medio bajo en glucosa suplementado con Glutamax y FBS dializado para minimizar la desensibilización del receptor por azúcares y glutamato. Las células se vuelven a incubar en este medio durante 6 horas a 37°C. Al final de este periodo, las células se procesan para el ensayo de calcio, según las condiciones descritas anteriormente.

45 Ejemplo 5

Activación del TAS2R16 humano mediante un glucósido amargo en células que expresan diferentes proteínas G

Se añadió fenil- β -D-glucopiranósido 5 mM en células que expresaban hTAS2R16 y $G_{\alpha 16}$ de tipo salvaje, una 50 quimera de la presente invención $G_{\alpha 16gustducina44}$, o bien una quimera comparativa $G_{\alpha 16z44}$. Las células que expresaban de forma estable las diferentes proteínas G se transfecaron de forma transitoria durante 24 horas con el receptor amargo humano TAS2R16. Después de la transfección, las células se trataron con Fluo-4 y se midió la fluorescencia del calcio intracelular, tal como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2. Se registró la fluorescencia celular constantemente y la fluorescencia media medida durante 15 segundos antes de la adición de ligando se consideró la línea de base, el 55 nivel de fluorescencia no estimulada. Las células que expresaban la quimera $G_{\alpha 16gustducina44}$ mostraron un grado mayor de activación del receptor después de la estimulación del ligando respecto a las células que expresaban $G_{\alpha 16}$.

60

65

ES 2 305 536 T3

TABLA 1

Actividad funcional del receptor amargo humano con las variantes de proteína G

5

Proteína G promiscua

Receptor del Gusto	$G_{\alpha 16gustducina44}$	$G_{\alpha 16}$	$G_{\alpha 16z44}$
Transfectado falso (control)	2162	1024	1541
TAS2R16 humano	23821	3494	8296

10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65

Todos los datos se expresan en unidades de fluorescencia relativa (RFU) y representa el aumento de la fluorescencia media sobre la línea de base después de la adición de ligando. El ligando y la concentración final utilizada fue fenil- β -D-glucopiranósido 5 mM. También se obtuvieron resultados similares utilizando D-salicina 5 mM.

Ejemplo 6

Actividad funcional del receptor amargo de ratón (T2R5) con proteínas G

Siguiendo la metodología, tal como se ha descrito en el Ejemplo 5, se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA 2

Proteína G promiscua

Receptor del Gusto	$G_{\alpha 16gustducina44}$	$G_{\alpha 16}$
Transfectado falso (control)	3989	1705
T2R5 de ratón	10407	2569

Todos los datos se expresan en unidades de fluorescencia relativa (RFU) y representa el aumento de la fluorescencia media sobre la línea de base después de la adición de ligando. El ligando y la concentración final utilizada fue cicloheximida 5 μ M.

ES 2 305 536 T3

Ejemplo 7

Activación del receptor amargo humano TAS2R10 mediante estricnina en células que expresan de forma estable $G_{\alpha 16gustducina44}$ y TAS2R10

5 El ejemplo se llevó a cabo esencialmente tal como se ha descrito en el ejemplo 5, excepto en que se utilizaron líneas celulares inducibles por tetraciclina que expresaban de forma estable TAS2R10 humano y $G_{\alpha 16gustducina44}$ en lugar de la transfección transitoria. Las células se mantuvieron a una densidad de células del 75-80%. Se obtuvieron los siguientes resultados:

10

TABLA 3

15	Receptor del Gusto	Proteína G promiscua $G_{\alpha 16gustducina44}$
20	Sólo proteína G (control sin tetraciclina)	13238
25	Proteína G + TAS2R10 humano (con tetraciclina)	24280

30 Todos los datos se expresan en unidades de fluorescencia relativa (RFU) y representa el aumento de la fluorescencia media sobre la linea de base después de la adición de ligando. El ligando y la concentración final utilizada fue estricnina 250 μ M.

Ejemplo 8

35 Activación del receptor amargo humano TAS2R38 mediante feniltiocarbamida o propitiouracil en células que expresan de forma estable $G_{\alpha 16gustducina44}$ y TAS2R38

40 El ejemplo se llevó a cabo esencialmente tal como se ha descrito en el ejemplo 5, excepto en que se utilizaron líneas celulares inducibles por tetraciclina que expresaban de forma estable TAS2R38 humano y G16gust44 en lugar de la transfección transitoria. Las células se mantuvieron a una densidad de células del 75-80%. Se obtuvieron los siguientes resultados:

45

TABLA 4

50	Receptor del Gusto	Proteína G promiscua $G_{\alpha 16gustducina44}$
55	Sólo proteína G (control sin tetraciclina)	3422
60	Proteína G + TAS2R38 humano (con tetraciclina)	8989

65 Todos los datos se expresan en unidades de fluorescencia relativa (RFU) y representa el aumento de la fluorescencia media sobre la linea de base después de la adición de ligando. El ligando y la concentración final utilizada fue feniltiocarbamida 250 μ M. Se obtuvieron resultados similares utilizando propitiouracil 250 μ M.

ES 2 305 536 T3

Ejemplo 9

Actividad funcional del receptor amargo humano (TAS2R43) con proteínas G

5 Utilizando una metodología similar a la del Ejemplo 5 se utilizaron líneas celulares inducibles por tetraciclina que expresaban de forma estable TAS2R43 humano y G16gust44 en lugar de la Transfección transitoria. Las células se mantuvieron a una densidad de células del 75-80%. Se obtuvieron los siguientes resultados:

10

TABLA 5

		Proteína G promiscua
15	Receptor del Gusto	G _{16gust44}
	Sólo proteína G	3955
	Proteína G + TAS2R43 humano	26766

20

Todos los datos se expresan en unidades de fluorescencia relativa (RFU) y representa el aumento de la fluorescencia media sobre la línea de base después de la adición de ligando. El ligando y la concentración final utilizada fue ácido aristolóquico 10 μ M.

30 Ejemplo 10

Actividad funcional del receptor amargo humano (TAS2R44) con proteínas G

35 Utilizando una metodología similar a la del Ejemplo 5 se utilizaron líneas celulares inducibles por tetraciclina que expresaban de forma estable TAS2R44 humano y G16gust44 en lugar de la Transfección transitoria. Las células se mantuvieron a una densidad de células del 75-80%. Se obtuvieron los siguientes resultados:

40

TABLA 6

		Proteína G promiscua
45	Receptor del Gusto	G _{16gust44}
	Sólo proteína G	5700
	Proteína G + TAS2R44 humano	17254

50

Todos los datos se expresan en unidades de fluorescencia relativa (RFU) y representa el aumento de la fluorescencia media sobre la línea de base después de la adición de ligando. El ligando y la concentración final utilizada fue ácido aristolóquico 10 μ M.

60

65

ES 2 305 536 T3

Ejemplo 11

Actividad funcional receptor dulce humano con proteínas G

5 Siguiendo una metodología similar a la del Ejemplo 5 se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA 7

10

Proteína G promiscua		
Receptor del Gusto	$G_{\alpha 16}^{gustducina44}$	$G_{\alpha 15}$
Transfectado falso (control)	1370	643
TAS1R2/TAS1R3 humano	4617	1300

15

20 Todos los datos se expresan en unidades de fluorescencia relativa (RFU) y representa el aumento de la fluorescencia media sobre la línea de base después de la adición de ligando. El ligando y la concentración final utilizada fue 25 sucralosa 2,5 mM. También se obtuvieron resultados similares utilizando aspartamo o acesulfamo K 2,5 mM.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proteína G quimérica $G_{\alpha q-Gustducina}$ en la que los últimos 44 aminoácidos de la secuencia de la proteína $G_{\alpha q}$ se sustituyen con una unidad de 44 aminoácidos de la Gustducina.
- 10 2. $G_{\alpha q-Gustducina}$ quimérica, según la reivindicación 1, la cual es una proteína $G_{\alpha 15-Gustducina}$.
- 15 3. $G_{\alpha q-Gustducina}$ quimérica, según la reivindicación 1, la cual es una proteína $G_{\alpha 16-Gustducina}$.
2. 4. Proteína G quimérica, según la reivindicación 1, que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID 2.
- 15 5. Proteína G, según la reivindicación 1, codificada por un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID 2.
- 20 6. Ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID 1, que codifica una proteína G, según la reivindicación 1.
- 25 7. Vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID 1 que codifica una proteína G, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Célula huésped transfectada con un vector de expresión, según la reivindicación 7.
- 25 9. Célula huésped, según la reivindicación 8, que expresa de forma estable la proteína G quimérica y un receptor del gusto.
- 30 10. Método de producción de una proteína G quimérica, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende la etapa de cultivo de células huésped que contienen en ellas un vector de expresión que codifica la proteína G quimérica, bajo condiciones suficientes para la expresión de dicha proteína G, causando de este modo la producción de la proteína y la recuperación de la proteína producida por la célula.
- 35 11. Método de análisis y descubrimiento de moduladores de los receptores del gusto, utilizando las proteínas quiméricas, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
12. Método de análisis y descubrimiento de moduladores de los receptores del gusto, seleccionados del grupo de receptores del gusto amargo, receptores del gusto dulce y receptores del gusto “umami”, utilizando las proteínas quiméricas, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 40 13. Método, según la reivindicación 11, utilizando un ensayo basado en células de mamífero utilizando un gen transfectado o ADNc que codifica una proteína quimérica de la presente invención y un receptor del gusto, comprendiendo el método las etapas de poner en contacto un compuesto con las células y la determinación del efecto funcional del compuesto sobre el complejo receptor:proteína G quimérica.
- 45 14. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el efecto funcional se determina midiendo los cambios en mensajeros intracelulares, tales como IP₃ o calcio²⁺.

50

55

60

65

ES 2 305 536 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Givaudan SA
5 <120> Proteínas G
5 <130> 30069PCT
5 <150> US 60/434,790
5 <151> 18-12-2002
10 <160> 2
10 <170> PatentIn version 3.1
10 <210> 1
15 <211> 1122
15 <212> ADN
15 <213> *Homo sapiens*
15 <220>
20 <221> CDS
20 <222> (1)..(1122)
20 <223>
25 <400> 1

30 atg gcc cgc tgc ctg acc tgg cgc tgc tgc ccc tgg tgc ctg acg gag 48
30 1 5 10 15

35 gat gag aag gcc gcc gcc cgg gtg gac cag gag atc aac agg atc ctc 96
35 20 25 30

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

45 ggc cca ggc gag agc ggg aag agc acc ttc atc aag cag atg cgg atc 192
45 50 55 60

50 55

60

65

ES 2 305 536 T3

5	atc cac ggc gcc ggc tac tcg gag gag gag cgc aag ggc ttc cgg ccc	240
	65 70 75 80	
10	ctg gtc tac cag aac atc ttc gtg tcc atg cgg gcc atg atc gag gcc	288
	85 90 95	
15	atg gag cgg ctg cag att cca ttc agc agg ccc gag agc aag cac cac	336
	100 105 110	
20	gct agc ctg gtc atg agc cag gac ccc tat aaa gtg acc acg ttt gag	384
	115 120 125	
25	aag cgc lac gct gcg gcc atg cag tgg ctg tgg agg gat gcc ggc atc	432
	130 135 140	
30	cgg gcc tgc tat gag cgt cgg cgg gaa ttc cac ctg ctc gat tca gcc	480
	145 150 155 160	
35	gtg tac tac ctg tcc cac ctg gag cgc atc acc gag gag ggc tac gtc	528
	165 170 175	
40	ccc aca gct cag gag glg ctc cgc agc cgc atg ccc acc act ggc atc	576
	180 185 190	
45	aac gag tac tgc ttc tcc gtg cag aaa acc aac clg cgg atc gtg gac	624
	195 200 205	
50	gtc ggg ggc cag aag tca gag cgt aag aaa tgg atc cat tgt ttc gag	672
	210 215 220	
55		
60		
65		

ES 2 305 536 T3

aac gtg atc gcc ctc atc tac ctg gcc tca ctg agt gaa tac gac cag 720
225 230 235 240

5

tgc ctg gag gag aac aac cag gag aac cgc atg aag gag agc ctc gca 768
10 245 250 255

ttg ttt ggg act atc ctg gaa cta ccc tgg ttc aaa agc aca tcc gtc 816
15 260 265 270

atc ctc ttt ctc aac aaa acc gac atc ctg gag gag aaa atc ccc acc 864
20 275 280 285

tcc cac ctg gct acc tat ttc ccc agt ttc cag ggc cct aag cag gat 912
25 290 295 300

gct gag gca gcc aag agg ttc atc ctg gac atg tac acg agg atg tac 960
30 305 310 315 320

acc ggg tgc gtg gac ggc ccc gag ggc agc aac tta aaa aaa gaa gat 1008
35 325 330 335

aag gaa alc tal tct cac alg acc tgc gct act gac aca caa aac gtc 1056
40 340 345 350

45

aaa ttc gtg ttt gat gcc gtg aca gat ata ata ata aaa gag aac ctc 1104
50 355 360 365

aaa gac tgl ggg ctc ttc 1122
55 370

<210> 2
60 <211> 374
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 305 536 T3

<400> 2

5 Met Ala Arg Ser Leu Thr Trp Arg Cys Cys Pro Trp Cys Leu Thr Glu
1 5 10 15

10 Asp Glu Lys Ala Ala Ala Arg Val Asp Gln Glu Ile Asn Arg Ile Leu
20 25 30

15 Leu Glu Gln Lys Lys Gln Asp Arg Gly Glu Leu Lys Leu Leu Leu
35 40 45

20
25 Gly Pro Gly Glu Ser Gly Ser Thr Phe Ile Lys Gln Met Arg Ile
50 55 60

30 Ile His Gly Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Glu Arg Lys Gly Phe Arg Pro
65 70 75 80

35 Leu Val Tyr Gln Asn Ile Phe Val Ser Met Arg Ala Met Ile Glu Ala
85 90 95

40 Met Glu Arg Leu Gln Ile Pro Phe Ser Arg Pro Glu Ser Lys His His
100 105 110

45 Ala Ser Leu Val Met Ser Gln Asp Pro Tyr Lys Val Thr Thr Phe Glu
115 120 125

50

55

60

65

ES 2 305 536 T3

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

130 135 140

5

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

10 145 150 155 160

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

15 165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

55 275 280 285

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

65

ES 2 305 536 T3

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

20 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

30 370

35

40

45

50

55

60

65