



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0007712
(43) 공개일자 2009년01월20일

- | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) Int. Cl.⁹
C07K 14/705 (2006.01) C07K 14/00 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2008-7025397</p> <p>(22) 출원일자 2008년10월17일
심사청구일자 없음
번역문제출일자 2008년10월17일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/CH2007/000186
국제출원일자 2007년04월19일</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2007/121600
국제공개일자 2007년11월01일</p> <p>(30) 우선권주장
60/793,521 2006년04월20일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
지보당 에스아
스위스 체하-1214 베르니에 슈멩 드 라 파르뤼르 리 5</p> <p>(72) 발명자
슬락 제이 패트릭
미국 오하이오주 45140 오하이오 러브랜드 스톤브릿지 드라이브 9925</p> <p>(74) 대리인
김창세, 장성구</p> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

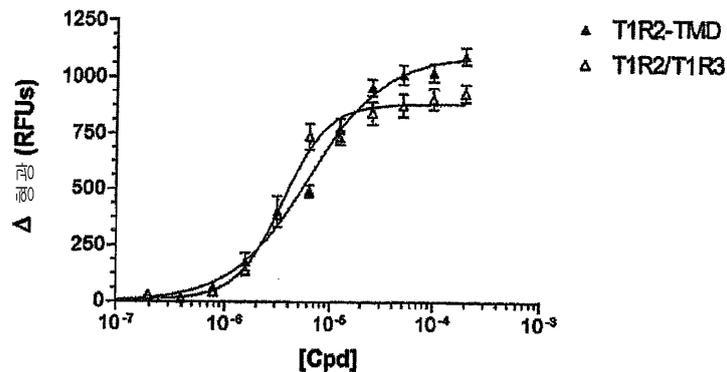
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 핵산, 폴리펩타이드 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명에서는, 신규한 감미 수용체 단백질, 상응하는 핵산 서열, 발현 벡터, 감염된 숙주 세포 및 전술된 것을 사용하는 감미 반응의 리간드를 포함한 조절물을 위한 스크리닝 방법이 제공된다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

서열 식별 번호: 2에 실질적으로 상동하는 폴리펩타이드,

서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 1에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드,

하이브리드화에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 2에 기재된 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드, 및

뉴클레오타이드 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 2에 기재된 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드

중 하나 이상을 포함하며,

상기 실질적으로 상동하는 폴리펩타이드가 74% 이상의 서열 동일성을 갖고,

서열 동일성에 의해 결정되는 경우 상기 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드가 65% 이상의 서열 동일성을 갖고,

하이브리드화에 의해 결정되는 경우 상기 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드가 50% 폼아מיד, 5×SSC 및 1% SDS로 이루어진 용액 중에 42℃의 온도에서 엄격한 하이브리드화 조건 하에 하이브리드화되고, 0.2×SSC 및 0.1% SDS로 이루어진 용액 중에서 65℃의 온도에서 세척되는,

페틸라틴에 결합하고 페틸라틴에 의해 활성화될 수 있는 T1R2-TMD 감미 수용체로서,

단, 상기 T1R2-TMD 수용체가 서열 식별 번호: 10 또는 서열 식별 번호: 12에 상동하는 폴리펩타이드, 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 9 또는 서열 식별 번호: 11에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 상동하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드, 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 10 또는 서열 식별 번호: 12에 기재된 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 상동하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드, 및 뉴클레오타이드 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 10 또는 서열 식별 번호: 12에 기재된 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 상동하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드 중 하나 이상을 포함하지 않으며; 서열 식별 번호: 10 또는 서열 식별 번호: 12에 상동하는 상기 폴리펩타이드가 60% 이상의 서열 동일성을 갖고; 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 9 또는 서열 식별 번호: 11에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 상동하는 뉴클레오타이드 서열이 50% 이상의 서열 동일성을 갖고; 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 상기 서열 식별 번호: 9 또는 서열 식별 번호: 11에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 상동하는 뉴클레오타이드 서열이 50% 폼아מיד, 5×SSC 및 1% SDS로 이루어진 용액 중에 42℃의 온도에서 적당히 엄격한 하이브리드화 조건 하에 하이브리드화되고, 0.2×SSC 및 0.1% SDS로 이루어진 용액 중에서 42℃의 온도에서 세척되는, T1R2-TMD 감미 수용체.

청구항 2

서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 1에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 핵산,

하이브리드화에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 1에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 핵산, 및

제 1 항에 따른 T1R2-TMD 감미 수용체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 핵산

중 하나 이상을 포함하며,

서열 동일성에 의해 결정되는 경우 상기 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드가 65% 이상의 서열 동일성을 갖고,

하이브리드화에 의해 결정되는 경우 상기 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드가 50% 폼아מיד, 5×SSC 및 1% SDS로 이루어진 용액 중에 42℃의 온도에서 엄격한 하이브리드화 조건 하에 하이브리드화되고, 0.2×SSC 및 0.1% SDS로 이루어진 용액 중에서 65℃의 온도에서 세척되는,

페틸라틴에 결합하고 페틸라틴에 의해 활성화될 수 있는 T1R2-TMD 감미 수용체를 암호화하는 핵산으로서, 단, 상기 핵산이 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 9 또는 서열 식별 번호: 11에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 상동하는 핵산, 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 9 또는 서열 식별 번호: 11에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 상동하는 핵산, 및 서열 식별 번호: 10 또는 서열 식별 번호: 12의 폴리펩타이드에 상동하는 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 상동하는 핵산 중 하나 이상을 포함하지 않으며; 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 상기 상동하는 뉴클레오타이드가 50% 이상의 서열 동일성을 갖고; 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 상기 상동하는 뉴클레오타이드가 50% 폼아마이드, 5×SSC 및 1% SDS로 이루어진 용액 중에 42℃의 온도에서 적당히 엄격한 하이브리드화 조건 하에 하이브리드화되고, 0.2×SSC 및 0.1% SDS로 이루어진 용액 중에서 42℃의 온도에서 세척되는, 핵산.

청구항 3

서열 식별 번호: 2에 실질적으로 상동하는 폴리펩타이드,
 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 1에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드,
 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 2에 기재된 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드, 및
 뉴클레오타이드 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 2에 기재된 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드
 로 이루어진 군 중에서 선택되며,
 상기 실질적으로 상동하는 폴리펩타이드가 74% 이상의 서열 동일성을 갖고,
 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 상기 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드가 65% 이상의 서열 동일성을 갖고,
 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 상기 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드가 50% 폼아마이드, 5×SSC 및 1% SDS로 이루어진 용액 중에 42℃의 온도에서 엄격한 하이브리드화 조건 하에 하이브리드화되고, 0.2×SSC 및 0.1% SDS로 이루어진 용액 중에서 65℃의 온도에서 세척되는,
 T1R2-TMD 감미 수용체.

청구항 4

서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 1에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 핵산,
 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 1에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 핵산, 및
 제 3 항에 따른 T1R2-TMD 감미 수용체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 핵산
 으로 이루어진 군 중에서 선택되며,
 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 상기 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드가 65% 이상의 서열 동일성을 갖고,
 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 상기 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드가 50% 폼아마이드, 5×SSC 및 1% SDS로 이루어진 용액 중에 42℃의 온도에서 엄격한 하이브리드화 조건 하에 하이브리드화되고, 0.2×SSC 및 0.1% SDS로 이루어진 용액 중에서 65℃의 온도에서 세척되는,
 핵산.

청구항 5

제 4 항에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 6

제 5 항에 따르지만, T1R3을 함유하지 않는 발현 벡터에 의해 감염된 숙주 세포.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

제 3 항에 따른 T1R2-TMD 감미 수용체 및 G-단백질을 안정하게 발현하는 숙주 세포.

청구항 8

제 6 항에 있어서,

제 3 항에 따른 T1R2-TMD 감미 수용체 및 G-단백질을 일시적으로 발현하는 숙주 세포.

청구항 9

발현하기에 충분한 조건 하에 T1R2-TMD 감미 수용체를 위해 암호화하는 발현 벡터가 함유된 숙주 세포를 배양함으로써 T1R2-TMD 감미 수용체를 형성하고 임의적으로 이를 세포로부터 회수함을 포함하는, 제 1 항에 따른 T1R2-TMD 감미 수용체의 제조 방법.

청구항 10

발현하기에 충분한 조건 하에 T1R2-TMD 감미 수용체를 위해 암호화하는 발현 벡터가 함유된 숙주 세포를 배양함으로써 T1R2-TMD 감미 수용체를 형성하고 임의적으로 이를 세포로부터 회수함을 포함하는, 제 3 항에 따른 T1R2-TMD 감미 수용체의 제조 방법.

청구항 11

미각 세포에서 단맛의 신호를 조절하는 체제를 동정하는 방법으로서,

(i) 단맛의 자극에 반응하는 T1R2-TMD 감미 수용체를 발현하는 세포를 하나의 체제와, 임의적으로는 다른 체제의 존재 하에 접촉시키는 단계, 및

(ii) 상기 세포에서 하나 이상의 기능성 반응에 의해 하나 이상의 체제가 상기 세포에서 상기 T1R2-TMD 감미 수용체의 기능성 활성화에 영향을 주는 지를 결정하는 단계

를 포함하며,

상기 T1R2-TMD 감미 수용체가 서열 식별 번호: 2에 실질적으로 상동하는 폴리펩타이드, 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 1에 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드에 의해 암호화된 폴리펩타이드, 및 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 1에 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드에 의해 암호화된 폴리펩타이드로 이루어진 군 중에서 선택되고;

상기 실질적으로 상동하는 폴리펩타이드가 74% 이상의 서열 동일성을 갖고;

서열 동일성에 의해 결정되는 경우 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드가 65% 이상의 서열 동일성을 갖고;

하이브리드화에 의해 결정되는 경우 상기 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드가 50% 폼아מיד, 5×SSC 및 1% SDS로 이루어진 용액 중에 42℃의 온도에서 엄격한 하이브리드화 조건 하에 하이브리드화되고, 0.2×SSC 및 0.1% SDS로 이루어진 용액 중에서 65℃의 온도에서 세척되고;

상기 T1R2 감미 수용체 발현 세포가 T1R3 수용체를 발현하지 않는, 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

세포가 G-단백질을 또한 발현하는 방법.

청구항 13

제 11 항에 있어서,

G-단백질이 Gaq-구스트듀신(Gustducin)에 기초한 키메라성 G-단백질인 방법.

청구항 14

제 12 항에 있어서,

G-단백질이 키메라성 G-단백질 G 알파 16-구스트듀신 44인 방법.

청구항 15

제 11 항에 있어서,

단계 (ii)가 세포내 메신저의 변화 또는 세포내 메신저에 의해 유발된 변화를 측정함으로써 수행되는 방법.

청구항 16

제 12 항에 있어서,

가능성 반응이 IP3 및 Ca²⁺ 중에서 선택된 세포내 메신저에서의 변화를 측정함으로써 결정되는 방법.

청구항 17

제 11 항에 있어서,

세포가 박테리아 세포, 진핵 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 포유류 세포, 양서류 세포 및 연충 세포로 이루어진 군 중에서 선택되는 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서,

세포가 포유류 세포인 방법.

청구항 19

제 11 항에 있어서,

세포가 CHO, COS, HeLa 및 HEK-293 세포로 이루어진 군 중에서 선택된 포유류 세포인 방법.

청구항 20

제 11 항에 있어서,

단계 (i)가 감미 자극물질의 존재 하에 T1R2 감미 수용체를 시험 제제와 접촉시킴을 추가로 포함하는 방법.

청구항 21

제 20 항에 있어서,

감미 자극물질이 페릴라틴 및 메틸 차비콜로 이루어진 군 중에서 선택되는 방법.

청구항 22

(i) T1R2-TMD 감미 수용체 또는 이의 실질적으로 유사한 상동체를 발현시키지만, T1R3 수용체를 발현시키지 않는 재조합 세포, 및

(ii) T1R2-TMD 감미 수용체의 작용물질

을 포함하는, T1R2-TMD의 조절물로서 시험 제제를 동정하기 위한 조합 용도용 키트.

청구항 23

(i) 고체 지지체 상에서 재조합 세포를 성장시키는 단계,

(ii) 시험 제제를 적합한 농도의 작용물질의 존재 하에서 한정된 플레이트 또는 웰의 배양 배지로 첨가하는 단계, 및

(iii) 시험 제제의 존재 및 부재에서의 반응을 비교하여 세포의 기능성 반응의 변화를 결정함으로써, 시험 제제를 T1R2 감미 수용체 또는 이의 실질적으로 유사한 상동체의 조절물로서 동정하는 단계를 포함하는, 제 22 항에 따른 키트의 사용 방법.

청구항 24

제 23 항에 있어서,

적합한 농도의 작용물질의 존재 하에서 한정된 플레이트 또는 웰의 배양 배지로 약 1nM 내지 100mM의 양의 시험 제제를 첨가하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 25

(i) T1R2-TMD에 결합하는 리간드에 반응하여 변하는 파라미터를 측정하는 단계,

(ii) 음성 대조군과 비교시, 임의적으로 리간드의 존재하에, 시험 제제에 반응하는 파라미터의 변화를 결정함으로써, 조절물 또는 리간드를 동정하는 단계를 포함하는, T1R2-TMD를 조절하는 제제를 동정하는 방법.

청구항 26

제 25 항에 있어서,

리간드가 페틸라틴 및 메틸 차비콜로 이루어진 군 중에서 선택되는 방법.

청구항 27

제 25 항 또는 제 26 항에 있어서,

단계 (i)가 형광 분광법; NMR 분광법; 흡광도, 굴절률, 유체역학법, 크로마토그래피 중 하나 이상을 측정; 용해도의 측정 및 생화학적 방법으로 이루어진 군 중에서 선택된 방법에 의해 수행되며, 상기 방법이 용액, 2층 막, 고체 상에 부착됨, 지질 단층 상태, 막에 결합됨 및 소포 상태로 이루어진 군 중에서 선택된 적합한 환경에서 T1R2-TMD 폴리펩타이드의 특성을 측정하는 것인 방법.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 신규한 감미 수용체 단백질을 기반으로 한 분석, 상기 감미 수용체 단백질을 형성하는 핵산 구조체를 함유하는 이중 발현 시스템 및 상기 감미 수용체 단백질의 스크리닝에서의 용도에 관한 것이다.

<2> 본원은 35 U.S.C. § 111(b)에 의거한 특허에 대한 가출원이다.

배경기술

<3> 신규한 미각 수용체 단백질에 의한 분석을 사용하여 인간의 미각 반응을 조절할 수 있는 제제(감미 조절물)를 동정함으로써 어떤 음식의 맛을 더욱 좋게 하거나, 경구 약물 및 기능성 식품에 대한 환자의 수용도를 증가시킬 수 있다. 이러한 감미 조절물은 인간의 미각 반응을 유도하는 감미 자극물질을 포함한다.

<4> 단맛의 감지는, 특이적으로 미각 수용체 세포 내에서 발견되고 이량체성 감미 수용체 착체(T1R2/T1R3 헤테로이량체)를 형성하는 T1R2 및 T1R3의 두개의 서브유닛(subunit)로 구성된 수용체에 의해 매개되는 것으로 알려져 있다. 상기 두개의 서브유닛은 소위 "G-단백질 결합 수용체" 또는 GPCR 과(family), 특히 C GPCR 강에 속한다.

<5> 대부분의 다른 GPCR과 유사하게 C 수용체 강은 7중나선 막 도메인(TMD)을 갖는다. 그러나, 다른 유형의 GPCR과 다르게, C GPCR 강은 두 부분, 즉 리간드 결합과 관련된 "파리치옥 모듈(VFTM)", 및 9개의 고도로 보존된 시스테인을 함유하고 VFTM을 TMD에 연결하는 시스테인 풍부 도메인(CRD)으로 구성된 큰 세포의 도메인을 또한 갖는다.

다. 가변길이의 세포내 C-말단 꼬리에 의해 C 수용체 강이 완결된다.

- <6> 감미 수용체 반응의 활성화는 이량체성 감미 수용체 착체의 두개의 서브유니트 모두를 필요로 하는 것으로 생각되며, 현재까지 시험된 모든 감미료는 T1R2/T1R3 헤테로이량체를 활성화시킨다. 인간의 감미 수용체의 별개의 서브유니트(T1R2 단일체(homomer) 또는 T1R3 단일체)에서 실시된 공개 시험에서는 활성을 보이지 않는 반면, T1R2/T1R3 헤테로이량체는 천연 당(자당, 과당, 글루코스, 말토스), 감미 아미노산(D-트립토판), 및 인공 감미료(아세설팜-K, 아스파르탐, 사이클라메이트, 사카린, 슈크라로스)로부터 단맛을 내는 단백질(모넬린, 타우마틴, 브라제인)에 이르는 광범위한 화학적으로 다양한 감미료에서는 반응한다(예를 들어 문헌[Li et al. (2002), Proc Natl Acad Sci USA 99(7), 4692-6]과 비교).
- <7> 키메라성 T1R 수용체 및 자리-지향성 돌연변이 유발의 연구에 의하면 감미 화합물인 사이클라메이트는 T1R3의 TMD에 결합함으로써 헤테로이량체성 T1R2/T1R3 수용체 착체를 활성화시킨다는 것을 시사하고 있다. 반대로, 감미 단백질인 브라제인은 T1R3의 시스템인 풍부 도메인에 결합하여 헤테로이량체성 T1R2/T1R3 수용체 착체를 활성화시키는 것으로 보고되어 있다.
- <8> T1R2 단일체 결합 분석은 미국 특허 제 20050032158 호에 기술되어 있다. 결합 분석은 기능적 수용체 활성화에 반대되는 것으로서 결합만을 보여주며, 동력학적 측정을 포함하는 보다 빠른 기능적 분석에 비해 종말점을 기반으로 하고 시간이 걸린다. 미국 특허 제 20050032158 호는 또한 공지된 기능적 수용체인 T1R1/T1R3 및 T1R2/T1R3에 적합한 T1R을 위한 세포 기반의 분석을 포함하는 기능적인 분석을 기술하고 있다.
- <9> 현재까지, TAS1R 단량체 중 하나의 TMD가 감미 화합물을 결합시킬 수 있을 뿐만 아니라 다른 절대 단량체성 파트너의 부재 하에서 G-단백질을 활성화시킬 수 있다는 것이 입증되지 않았을 뿐만 아니라, 두개의 서브유니트의 존재가 신호 전달을 위해 필수적인 것으로 믿어졌다.
- <10> 본 출원인은 T1R2/T1R3 헤테로이량체 수용체 착체의 T1R2 단일체의 대단히 끝이 절단된 서열에 상응하는 신규한 수용체 단백질이, 놀랍게도 감미 리간드에 결합하고 G-단백질을 활성화시킬 수 있는 기능성 감미 수용체를 형성한다는 것을 알게 되었다.
- <11> 본원에서 사용되는 용어 T1R2 "단일체" 또는 "단일체성" 폴리펩타이드, 단백질, 또는 수용체는 헤테로이량체성 T1R2/T1R3 수용체 착체와 반대로 T1R2 폴리펩타이드 또는 단백질의 단량체, 이량체 또는 올리고머를 포함함을 의미한다.
- <12> 신규한 수용체 단백질 T1R2-TMD는 전장 T1R2 단일체와 상이한 작용물질 분광을 가짐을 발견하였다. 전장 T1R2 단일체는 놀랍게도 리간드에 결합할 뿐만 아니라 하향 신호화를 활성화시킬 수 있는 것으로 발견되었다.
- <13> 본원에 제공되는 방법에 따라서, T1R3을 제외하고 T1R2-TMD 및 G-단백질 둘다를 발현시키는 세포는 임의적으로 공지된 또는 새롭게 확인된 감미 자극물질과 함께 시험 제제와 접촉하여 감미 조절물로서 상기 제제의 특성을 결정한다. 그러므로 본원에 제공된 상기 분석은 시험된 제제를 감미 자극물질 또는 감미 반응의 조절물(감미 자극물질, T1R2, 또는 후속 사건의 조절물)로서 동정하는데 사용될 수 있다.
- <14> 상기 제제의 수용체 및 G-단백질에 대한 기능적 효과는, 당해 기술분야에서 공지된 방법에 따라 적합한 기능적인 분석에 의해, 예를 들어 세포내 IP3 및 Ca²⁺와 같은 전달 경로의 파라미터의 변화를 측정하는 분석에 의해, 또는 GTP γ S로 표지화하는 것과 같은 다른 G-단백질 특이 분석에 의해 측정된다.
- <15> 다르게는, T1R2-TMD로의 리간드의 결합을 결정하기 위해 결합 분석을 사용할 수 있다.
- <16> 클로닝과 관련된 본원에 기재된 여러 양태 및 실시양태를 실행하고, 리간드-수용체 쌍을 규명하며, 감미 반응의 조절물을 알아내는데 있어서, 분자 생물학, 미생물학 및 재조합 기술과 같은 종래의 기술에 의지하게 된다. 이들은 T1R2-TMD를 포함하는 G-단백질 결합 수용체(GPCR)에 적합한 여러 공지된 방법을 포함한다. 그러므로, 숙련가는 이러한 기술에 정통하며, 따라서 본 발명의 전후관계를 보다 상세하게 기술하기 위해 이후 이들 기술에 관해서 간략하게 다를 것이다.
- <17> 발명의 개요
- <18> 하나의 양태에서,
- <19> 서열 식별 번호: 2에 실질적으로 상동하는 폴리펩타이드,
- <20> 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 1에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 뉴

클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드,

- <21> 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 2에 기재된 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드, 및
- <22> 뉴클레오타이드 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 2에 기재된 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드
- <23> 중 하나 이상을 포함하며,
- <24> 상기 실질적으로 상동하는 폴리펩타이드는 74% 이상의 서열 동일성을 갖고,
- <25> 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 상기 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드는 65% 이상의 서열 동일성을 갖고,
- <26> 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 상기 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드는 50% 폼아מיד, 5×SSC 및 1% SDS로 이루어진 용액 중에 42℃의 온도에서 엄격한 하이브리드화 조건 하에 하이브리드화되고, 0.2×SSC 및 0.1% SDS로 이루어진 용액 중에서 65℃의 온도에서 세척되는,
- <27> 페틸라틴에 결합하고 페틸라틴에 의해 활성화될 수 있는 T1R2-TMD 감미 수용체가 제공되되,
- <28> 단, 상기 T1R2-TMD 수용체는 서열 식별 번호: 10 또는 서열 식별 번호: 12에 상동하는 폴리펩타이드, 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 9 또는 서열 식별 번호: 11에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 상동하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드, 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 10 또는 서열 식별 번호: 12에 기재된 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 상동하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드, 및 뉴클레오타이드 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 10 또는 서열 식별 번호: 12에 기재된 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 상동하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드 중 하나 이상을 포함하지 않으며; 서열 식별 번호: 10 또는 서열 식별 번호: 12에 상동하는 상기 폴리펩타이드는 60% 이상의 서열 동일성을 갖고; 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 9 또는 서열 식별 번호: 11에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 상동하는 뉴클레오타이드 서열은 50% 이상의 서열 동일성을 갖고; 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 상기 서열 식별 번호: 9 또는 서열 식별 번호: 11에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 상동하는 뉴클레오타이드 서열은 50% 폼아מיד, 5×SSC 및 1% SDS로 이루어진 용액 중에 42℃의 온도에서 적당히 엄격한 하이브리드화 조건 하에 하이브리드화되고, 0.2×SSC 및 0.1% SDS로 이루어진 용액 중에서 42℃의 온도에서 세척된다.
- <29> 다른 양태에서, 본 발명은
- <30> 서열 식별 번호: 2에 실질적으로 상동하는 폴리펩타이드,
- <31> 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 1에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드,
- <32> 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 2에 기재된 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드, 및
- <33> 뉴클레오타이드 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 2에 기재된 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드
- <34> 로 이루어진 군 중에서 선택되며,
- <35> 상기 실질적으로 상동하는 폴리펩타이드는 74% 이상의 서열 동일성을 갖고,
- <36> 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 상기 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드는 65% 이상의 서열 동일성을 갖고,
- <37> 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 상기 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드는 50% 폼아מיד, 5×SSC 및 1% SDS로 이루어진 용액 중에 42℃의 온도에서 엄격한 하이브리드화 조건 하에 하이브리드화되고, 0.2×SSC 및 0.1% SDS로 이루어진 용액 중에서 65℃의 온도에서 세척되는,
- <38> T1R2-TMD 감미 수용체에 관한 것이다.
- <39> 추가의 양태에서,

- <40> 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 1에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 핵산,
- <41> 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 1에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 핵산, 및
- <42> T1R2-TMD 감미 수용체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 핵산
- <43> 중 하나 이상을 포함하며,
- <44> 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 상기 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드는 65% 이상의 서열 동일성을 갖고,
- <45> 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 상기 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드는 50% 폼아마이드, 5×SSC 및 1% SDS로 이루어진 용액 중에 42℃의 온도에서 엄격한 하이브리드화 조건 하에 하이브리드화되고, 0.2×SSC 및 0.1% SDS로 이루어진 용액 중에서 65℃의 온도에서 세척되는,
- <46> 페틸라틴에 결합하고 페틸라틴에 의해 활성화될 수 있는 T1R2-TMD 감미 수용체를 암호화하는 핵산이 제공되며,
- <47> 단, 상기 핵산은 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 9 또는 서열 식별 번호: 11에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 상동하는 핵산, 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 9 또는 서열 식별 번호: 11에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 상동하는 핵산, 및 서열 식별 번호: 10 또는 서열 식별 번호: 12의 폴리펩타이드에 상동하는 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 상동하는 핵산 중 하나 이상을 포함하지 않으며; 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 상기 상동하는 뉴클레오타이드는 50% 이상의 서열 동일성을 갖고; 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 상기 상동하는 뉴클레오타이드는 50% 폼아마이드, 5×SSC 및 1% SDS로 이루어진 용액 중에 42℃의 온도에서 적당히 엄격한 하이브리드화 조건 하에 하이브리드화되고, 0.2×SSC 및 0.1% SDS로 이루어진 용액 중에서 42℃의 온도에서 세척된다.
- <48> 다른 양태에서,
- <49> 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 1에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 핵산,
- <50> 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 1에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 핵산, 및
- <51> T1R2-TMD 감미 수용체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 핵산
- <52> 으로 이루어진 군 중에서 선택되며,
- <53> 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 상기 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드는 65% 이상의 서열 동일성을 갖고,
- <54> 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 상기 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드는 50% 폼아마이드, 5×SSC 및 1% SDS로 이루어진 용액 중에 42℃의 온도에서 엄격한 하이브리드화 조건 하에 하이브리드화되고, 0.2×SSC 및 0.1% SDS로 이루어진 용액 중에서 65℃의 온도에서 세척되는,
- <55> 핵산이 제공된다.
- <56> 다른 양태에서, 상기 정의된 핵산을 포함하는 발현 벡터가 제공된다.
- <57> 다른 양태에서, 상기 정의된 것과 같지만 T1R3을 함유하지 않는 발현 벡터에 의해 감염된 숙주 세포가 제공된다.
- <58> 특정한 예시적인 실시양태에서, 상기 정의된 숙주 세포는 상기 정의된 T1R2-TMD 감미 수용체 및 G-단백질을 안정하게 발현한다.
- <59> 다른 실시양태에서, 상기 정의된 숙주 세포는 상기 정의된 T1R2-TMD 감미 수용체 및 G-단백질을 일시적으로 발현한다.
- <60> 다른 양태에서, 발현하기에 충분한 조건 하에 T1R2-TMD 감미 수용체를 위해 암호화하는 발현 벡터가 함유된 숙주 세포를 배양함으로써 T1R2-TMD 감미 수용체를 형성하고 임의적으로 이를 세포로부터 회수함을 포함하는, 상

기 정의된 T1R2-TMD 감미 수용체의 제조 방법이 제공된다.

- <61> 다른 양태에서, 미각 세포에서 단맛의 신호를 조절하는 제제를 동정하는 방법이 제공되며, 이 방법은
- <62> (i) 단맛의 자극에 반응하는 T1R2-TMD 감미 수용체를 발현하는 세포를 하나의 제제와, 임의적으로는 다른 제제의 존재 하에 접촉시키는 단계, 및
- <63> (ii) 상기 세포에서 하나 이상의 기능성 반응에 의해 하나 이상의 제제가 상기 세포에서 상기 T1R2-TMD 감미 수용체의 기능성 활성화에 영향을 주는 지를 결정하는 단계를 포함하며,
- <64> 상기 T1R2-TMD 감미 수용체는 서열 식별 번호: 2에 실질적으로 상동하는 폴리펩타이드, 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 1에 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드에 의해 암호화된 폴리펩타이드, 및 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 서열 식별 번호: 1에 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드에 의해 암호화된 폴리펩타이드로 이루어진 군 중에서 선택되고; 상기 실질적으로 상동하는 폴리펩타이드는 74% 이상의 서열 동일성을 갖고; 서열 동일성에 의해 결정되는 경우 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드는 65% 이상의 서열 동일성을 갖고; 하이브리드화에 의해 결정되는 경우 상기 실질적으로 상동하는 뉴클레오타이드는 50% 폼아미드, 5×SSC 및 1% SDS로 이루어진 용액 중에 42°C의 온도에서 엄격한 하이브리드화 조건 하에 하이브리드화되고, 0.2×SSC 및 0.1% SDS로 이루어진 용액 중에서 65°C의 온도에서 세척되고; 상기 T1R2 감미 수용체 발현 세포는 T1R3 수용체를 발현하지 않는다.
- <65> 특정한 예시적인 실시양태에서, 상기 정의된 방법은 G-단백질을 또한 발현하는 세포를 이용한다.
- <66> 다른 실시양태에서, 상기 정의된 방법에 따르는, G-단백질은 Gαq-구스트듀신(gustducin)에 기초한 키메라성 G-단백질이다.
- <67> 추가의 실시양태에서, 상기 정의된 방법에 따르는, G-단백질은 키메라성 G-단백질 Gα과 16-구스트듀신 44이다.
- <68> 또다른 추가의 실시양태에서, 상기 정의된 방법에 따르는, 단계 (ii)는 세포내 메신저의 변화 또는 세포내 메신저에 의해 유발된 변화를 측정함으로써 수행된다.
- <69> 또다른 추가의 실시양태에, 상기 정의된 방법에 따르는, 기능성 반응은 IP3 및 Ca²⁺ 중에서 선택된 세포내 메신저의 변화를 측정함으로써 결정된다.
- <70> 다른 실시양태에서, 상기 정의된 방법에 따르는, 세포는 박테리아 세포, 진핵 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 포유류 세포, 양서류 세포 및 연충 세포로 이루어진 군 중에서 선택된다.
- <71> 특정 실시양태에서, 상기 정의된 방법에 따르는, 세포는 포유류 세포이다.
- <72> 추가의 실시양태에서, 상기 정의된 방법에 따르는, 세포는 CHO, COS, HeLa 및 HEK-293 세포로 이루어진 군 중에서 선택된 포유류 세포이다.
- <73> 또다른 추가의 실시양태에서, 상기 정의된 방법에 따르는, 단계 (i)는 감미 자극물질의 존재 하에 T1R2 감미 수용체를 시험 제제와 접촉시킴을 추가로 포함한다.
- <74> 또다른 추가의 실시양태에서, 상기 정의된 방법에 따르는, 감미 자극물질은 페틸라틴 및 메틸 차비콜로 이루어진 군 중에서 선택된다.
- <75> 또다른 양태에서, (i) T1R2-TMD 감미 수용체 또는 이의 실질적으로 유사한 상동체를 발현시키지만, T1R3 수용체를 발현시키지 않는 재조합 세포, 및 (ii) T1R2-TMD 감미 수용체의 작용물질을 포함하는, T1R2-TMD의 조절물로서 시험 제제를 동정하기 위한 조합 용도용의 키트가 제공된다.
- <76> 또다른 양태에서, (i) 고체 지지체 상에서 재조합 세포를 성장시키는 단계, (ii) 시험 제제를 적합한 농도의 작용물질의 존재 하에서 한정된 플레이트(plate) 또는 웰(well)의 배양 배지로 첨가하는 단계, 및 (iii) 시험 제제의 존재 및 부재에서의 반응을 비교하여 세포의 기능성 반응의 변화를 결정함으로써, 시험 제제를 T1R2 감미 수용체 또는 이의 실질적으로 유사한 상동체의 조절물로서 동정하는 단계를 포함하는, 상기 정의된 키트의 사용 방법이 제공된다.
- <77> 또다른 양태에서, (i) T1R2-TMD에 결합하는 리간드에 반응하여 변하는 파라미터를 측정하는 단계, (ii) 음성 대조군과 비교시, 임의적으로 리간드의 존재하에, 시험 제제에 반응하는 파라미터의 변화를 결정함으로써, 조절물 또는 리간드를 동정하는 단계를 포함하는, T1R2-TMD를 조절하는 제제를 동정하는 방법이 제공된다.

<78> 특정한 실시양태에서, 상기 정의된 방법에 따르는, 리간드는 페틸라틴 및 메틸 차비콜로 이루어진 군 중에서 선택된다.

<79> 특정한 실시양태에서, 상기 정의된 방법에 따르는, 단계 (i)는 형광 분광법, NMR 분광법, 하나 이상의 흡광도, 굴절률, 유체역학법, 크로마토그래피의 측정, 용해도의 측정 및 생화학적 방법으로 이루어진 군 중에서 선택된 방법에 의해 수행되며, 상기 방법은 용액, 2층 막, 고체 상에 부착된 됨, 지질 단층 상태, 막에 결합됨 및 소포 상태로 이루어진 군 중에서 선택된 적합한 환경에서 T1R2-TMD 폴리펩타이드의 특성을 측정한다.

발명의 상세한 설명

<81> 분석에 사용되는 세포

<82> 본 발명에 따른 스크린 또는 분석에 유용한 세포는 T1R3을 함유하지 않는 세포이다. 감염된(transfected) 또는 내인성 T1R3은 T1R2-TMD의 작용물질 반응 또는 또 다른 조절물에 의존한 상기 반응의 변화를 측정하는 방법을 부정적으로 방해할 수 있다. T1R3의 부재는 T1R2-TMD 활성화의 측정에서 "0"(null) 배경을 제공하여 관측된 신호가 T1R2-TMD 활성화에 직접적으로 관련될 수 있다. 이로 인해 T1R2-TMD를 특이적으로 조절하는 제제를 동정할 수 있고, T1R3이 단맛 및 우마미(umami) 헤타로이량체의 일부이기 때문에 우마미 자극물질을 또한 포함할 수 있는 T1R3을 활성화시키는 제제를 배제할 수 있다.

<83> 적합한 진핵 세포는 T1R3을 함유하지 않는 진핵 세포, 예를들면 비제한적으로 포유류 세포, 효모 세포, 또는 곤충 세포(Sf9 포함), 양서류 세포(멜라닌색소포 세포 포함), 또는 캐노르하브디티스(Caenorhabditis) 세포(꼬마 선충을 포함)을 비롯한 연충 세포를 포함한다.

<84> T1R3을 함유하지 않는 적합한 포유류 세포는 예를들면 비제한적으로 COS 세포(Cos-1 및 Cos-7 포함), CHO 세포, HEK293 세포, HEK293T 세포, HEK293 T-Rex(상표명) 세포, 또는 기타 감염성(transfectable) 진핵 세포주를 포함한다.

<85> T1R3을 함유하지 않는 적합한 박테리아 세포는 비제한적으로 대장균(E. coli)을 포함한다.

<86> 당해 기술 분야에서 잘 알려진 바와 같이, 세포들은 GPCR 및 G-단백질(포스포리파제 C 신호 전달 경로에 수용체를 연결시킴)로 일시적으로 또는 안정적으로 감염된다. GPCR이 맛을 내도록 향상된 결합을 제공하는 키메라성 G-단백질 G 알파 16-구스트듀신 44(또한 G.서브.알파.16구스트(듀신)44, G.서브.알파.16구스트(듀신)44, G α 16구스트(듀신)44, Ga16구스트(듀신)44, G α 16-구스트듀신 44로서 공지되어 있거나 또는 본원의 하기에 사용된 바와 같이 "G16구스트44"로서 공지되어 있음)을 사용하는 우수한 이중 발현 시스템이 국제 특허 출원 공개 제 WO 2004/055048 호에 기술되어 있다. 다르게는, 국제 특허 출원 공개 제 WO 2004/055048 호에 기술된 Gaq-구스트 듀신에 기초한 다른 키메라성 G-단백질, 또는 다른 G-단백질, 예를들면 G16 또는 G15가 또한 사용될 수 있다.

<87> T1R2-TMD는 신호 전달 경로, 예를들면 포스포리파제 C 신호 전달 경로 또는 예를들면 아데닐레이트 사이클라제, 구아닐레이트 사이클라제, 포스포리파제 C, IP3, GTPase/GTP 결합, 아라키노이드 산, cAMP/cGMP, DAG, 단백질 키나제 c(PKC), MAP 키나제 티로신 키나제, 또는 ERK 키나제를 포함하는 신호 전달 경로에 수용체를 연결시키는 G-단백질을 갖는 세포에서 발현될 수 있다.

<88> 다르게는, 하기에 더욱 상세히 기술되는 바와 같이, 임의 적합한 리포터 유전자(reporter gene)가 T1R2-TMD-활성화 반응 프로모터(promoter)에 연결되어 T1R2-TMD 활성을 측정하는데 사용될 수 있다.

<89> 본원의 상기에서 기술된 세포에 사용되는 벡터 구조체

<90> 상기 세포에서 GPCR 및/또는 G-단백질을 발현시키기 위한 벡터 구조체는 폴리머라제 사슬 반응(Polymerase Chain Reactions)을 사용하여 그 자체가 공지된 방법으로 생성될 수 있다. 서열의 규명 후, cDNA 단편은 적합한 벡터, 예를들면 포유류 세포를 위한 pcDNA 3.1 포유류 발현 벡터로 서브클론되고 포유류 숙주 세포에서 일시적으로 감염되어 유전자의 정확한 발현을 가능하게 할 수 있다.

<91> 후-감염 기간 후, 예를들면 48시간 후, 세포 용해물이 제조되어 웨스턴-블롯 분석에 의해 분석하여 단백질의 정확한 발현을 확인할 수 있다. 정확한 단백질 발현이 확인되면, 적합한 세포, 예를들면 HEK293T 세포 및 HEK T-Rex(상표명)를 포함하는 포유류 세포를 감염시켜 당해 기술분야에 잘 공지된 기법에 따라 단백질을 안정하게 발현시키는 세포를 발생시킬 수 있다.

<92> 다르게는, T1R2-TMD GPCR을 암호화하는 서열을 함유하고 발현시킬 수 있도록 다양한 비-포유류세포 발현 벡터/

숙주 시스템을 사용할 수 있다. 이것에는 예를들면 재조합 박테리오파지, 플라스미드 또는 코스미드(cosmid) DNA 발현 벡터로 변형된 박테리아; 효모 발현 벡터로 변형된 효모; 바이러스성 발현 벡터(예를들면 바쿨로바이러스) 또는 박테리아성 발현 벡터(예를들면 pBR322 플라스미드)로 감염된 곤충 세포 시스템을 포함하는 미생물을 포함한다.

<93> 본원의 상기에서 기술된 시스템과 함께 사용될 수 있는 특이적 벡터의 예는 문헌["G-protein coupled receptors(Signal Transduction Series)"; Editors: Tatsuya Haga and Gabriel Berstein, 1st ed., CRC Press - Boca Raton FL; September 1999]에 기술되어 있다.

<94> 박테리아 시스템에서, GPCR을 암호화시키는 폴리뉴클레오타이드 서열을 사용하고자 하는 용도에 따라 다수의 클로닝 및 발현 벡터를 선택할 수 있다. 예를들면, GPCR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열의 일반적인 클로닝, 서브클로닝 및 증식은 PBLUESCRIPT(스트라타진(Stratagene); 캘리포니아 라 졸라 소재) 또는 PSPORT1 플라스미드(라이프 테크놀로지스(Life Technologies))와 같은 다기능성 대장균 벡터를 사용하여 달성할 수 있다. GPCR을 암호화하는 서열을 벡터의 다수 클로닝 자리로 결합하여 lacZ 유전자를 분해함으로써 재조합 분자를 함유하는 변형된 박테리아를 동정하는 비색계 스크리닝 절차가 가능하다. 또한, 상기 벡터는 시험관내 전사, 다이데옥시 서열분석, 헬퍼(helper) 파지를 갖는 단일 가닥 레스큐(rescue) 및 클론된 서열에서의 네스티드(nested) 결실부의 생성에 유용할 수 있다. 예를들면 항체의 제조를 위해 다량의 GPCR이 필요한 경우, 높은 수준의 GPCR 발현을 지시하는 벡터가 사용될 수 있다. 예를들면, 강한 유도성 SP6 또는 T7 박테리오파지 프로모터를 함유하는 벡터가 사용될 수 있다.

<95> 효모 발현 시스템은 GPCR의 생산에 사용될 수 있다. 구성적 또는 유도성 프로모터, 예컨대 알파 인자, 알콜 옥시다제 및 PGH 프로모터를 함유하는 다수의 벡터가 효모 사카로마이세스 세레비시애(Saccharomyces cerevisiae) 또는 피치아 파스토리스(Pichia pastoris)에 사용될 수 있다. 또한, 이러한 벡터는 발현된 단백질의 분비 또는 세포내 유지를 지시하고, 안전한 증식을 위해 숙주 게놈으로의 외래(foreign) 서열의 통합을 가능하게 한다.

<96> 곤충 세포주에서 이중 단백질의 발현을 위해, 예를들면 레피도프테란 바쿨로바이러스(Lepidopteran baculovirus)의 유도체인 오토그래파 캘리포니카 멀티캡시드 뉴클레오바이러스(Autographa californica multicapsid nucleovirus; AcMNPV)가 사용될 수 있다. 이러한 시스템에서, 외래 유전자 발현은 매우 강한 후발 바이러스성 프로모터(late viral promoter)인 폴리헤드린 또는 p10 프로모터에 의해 지시되며, 재조합 단백질의 발현 및 회수를 최적화시키는 광범위한 벡터의 정렬을 사용할 수 있다. 이러한 벡터로 인해 높은 수준의 막-결합된 단백질 및 분비된 단백질 둘다의 발현 및 또한 N- 및 O-결합된 글라이코실화, 포스포틸화, 아실화, 단백질가수분해 및 분비된 백신 성분을 포함하는 포유류 시스템에서 발생하는 것으로 알려진 많은 번역후 변형(post-translational modification)이 가능하다. 다수의 벡터, 예를들면 인비트로젠(Invitrogen)으로부터 인섹트셀렉트(InsectSelect; 상표명)를 상업적으로 입수할 수 있다.

<97> **발현 시스템:**

<98> 목적하는 단백질(GPCR 및 G-단백질)을 암호화하는 cDNA를 발현시키기 위해, 전형적으로 직접적인 전사에 대한 강한 프로모터, 전사/번역 종결제 및 번역 개시를 위한 리보솜-결합 자리를 함유한 발현 벡터로 적절한 cDNA를 서브클론시킬 수 있다. 적합한 박테리아 프로모터, 예를들면 대장균, 바실러스 종(Bacillus sp.), 및 살모넬라(Salmonella)가 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있으며, 이러한 발현 시스템을 위한 키트를 상업적으로 입수할 수 있다. 유사하게, 포유류 세포, 효모 및 곤충 세포를 위한 진핵 발현 시스템을 상업적으로 입수할 수 있다. 진핵 발현 벡터의 예로서는 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 벡터 또는 레트로바이러스 벡터를 들 수 있다.

<99> 프로모터에 더하여, 발현 벡터는 전형적으로 숙주 세포 중에 단백질-암호화 핵산의 발현에 필요한 부가적인 원소 모두를 함유한 전사 유닛 또는 발현 카세트를 함유한다. 따라서, 전형적인 발현 카세트는 전사, 리보솜-결합 자리 및 번역 종결의 효과적인 폴리아데닐화에 필요한 단백질 및 신호를 암호화하는 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 함유한다. 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 전형적으로 세포-표면 수용체에 유용한 재조합 단백질의 효과적인 세포-표면 발현을 촉진하도록 래트 소마토스타틴(Somatostatin)-3 수용체 서열의 N-말단 45 아미노산과 같은 막-표적 신호에 연결될 수 있다. 부가적인 원소는 예를들면 인헨서(enhancer)를 포함할 수 있다.

<100> 발현 카세트는 효과적인 종결을 제공하기 위해 구조 유전자의 하류에 전사 말단 영역을 또한 함유해야 한다. 종결 영역은 프로모터 서열과 동일한 유전자로부터 얻을 수 있거나 또는 다른 유전자로부터 얻을 수 있다.

<101> 단백질의 발현에 있어서, 당해 기술 분야에 잘 공지된 진핵 또는 원핵 세포에서의 발현을 위한 통상의 벡터가

사용될 수 있다. 벡터의 예로서 박테리아성 발현 벡터, 예를들면 pBR322-기반 플라스미드, pSKF, 및 pET23D를 비롯한 플라스미드, 및 융합 발현 시스템, 예를들면 GST 및 LacZ를 들 수 있다.

- <102> 진핵 바이러스로부터의 조절성 원소를 함유하는 발현 벡터는 전형적으로 진핵 발현 벡터, 예를들면 SV40 벡터, 거대세포 바이러스(cytomegalovirus) 벡터, 유두종 바이러스(papilloma virus) 벡터, 및 엡스타인-바르 (Epstein-Barr) 바이러스로부터 유래된 벡터에 사용된다. 다른 대표적인 진핵 벡터는 pMSG, pAV009/A⁺, pMT010/A⁺, pMAMneo-5, 바콜로바이러스 pDSVE, pcDNA3.1, pIRES 및 SV40 초기 프로모터, SV40 후기 프로모터, 메탈로티오네인(metallothionein) 프로모터, 뮤린 유방 종양 바이러스 프로모터, 라우스(Rous) 육종 바이러스 프로모터, 폴리헤드린 프로모터, 또는 진핵 세포에서의 발현에 효과적인 것으로 보이는 다른 프로모터의 지지 하의 단백질의 발현을 허용하는 임의 다른 벡터를 포함한다.
- <103> 몇몇 발현 시스템은 티미딘 키나제, 하이그로마이신 B 포스포트랜스퍼라제, 및 다이하이드로폴레이트 리덕타제 등과 같은 유전자 증폭을 제공하는 마커(marker)를 갖는다.
- <104> 발현 벡터에 전형적으로 포함되는 원소는 대장균에서 작용하는 레플리콘, 재조합 플라스미드가 잠복되어 있는 박테리아의 선택을 가능하게 하는 내약물 암호화 유전자, 및 진핵 세포 서열의 삽입을 허용하는 플라스미드의 비필수적 영역에서의 독특한 제한 자리를 또한 포함할 수 있다. 선택된 특정 내약물성 유전자는 그다지 중요하지 않으며, 당해 기술 분야에 공지된 다수의 내약물 유전자 중 어떠한 것이라도 적합하다. 원핵 세포 서열은 이것들이 필요에 따라 진핵 세포 중의 DNA의 복제를 방해하지 않도록 임의적으로 선택된다.
- <105> 박테리아 시스템에서, GPCR cDNA 단편은 단독으로 발현되거나, 대상의 GPCR이 대장균 주변세포질 말토즈-결합 단백질(MBP)에 융합된 융합 단백질로서 발현될 수 있는데, MBP(이것의 신호 펩타이드를 포함)는 GPCR의 아미노 말단에 연결된다. 야생형 GPCR cDNA 또는 MBP:GPCR 융합 cDNA는 적합한 플라스미드, 예를들면 pBR322에 서브클론되며, 이때 대장균에서 GPCR 발현은 *lac* 야생형 프로모터에 의해 유인된다. 대장균에서의 GPCR의 발현 방법은 예를들면 문헌["G-protein coupled receptors (Signal Transduction Series)"; Editors: Tatsuya Haga and Gabriel Berstein, 1st ed., pp. 265-280 CRC Press - Boca Raton FL; September 1999]에 기술되어 있다.
- <106> 내인성 GPCR이 부족한 유전공학화 효소 시스템 및 곤충 세포 시스템은 T1R2 활성 스크리닝에 대한 "0" 배경의 이점을 제공한다.
- <107> 유전공학화 효모 시스템은 내인성 효모 페로몬(pheromone) 수용체 경로의 대응하는 성분 대신에 인간의 GPCR 및 G_α 단백질로 대체된다. 하향 신호 경로는 신호에 대한 정상 효모 반응이 선택된 배지에 대한 양성적 성장 또는 리포터 유전자 발현으로 전환되도록 변형된다(문헌[Broach, J. R. and J. Thorner (1996) Nature 384 (supp.):14-16]에 기술되어 있음).
- <108> 유전공학화 곤충 시스템은 포스포리파제 C 신호 경로를 결합시키는 수용체가 가능하도록 인간의 GPCR 및 G_α 단백질을 혼입하고 있다(예를들면 문헌[Knicht and Grigliatti, (2004) J Receptors and Signal Transduction 24: 241-256]을 참조할 수 있다).
- <109> 양서류 세포 시스템, 특히 멜라닌색소포 세포는, 예를들면 GPCR 발현 시스템에 대해 기술하고 있는 국제 특허 출원 공개 제 WO 92/01810 호에 기술되어 있다.
- <110> T1R2-TMD의 과발현
- <111> T1R2-TMD는 이것을 강한 구성적 프로모터, 예를들면 CMV 초기 프로모터의 조절 하에 위치시킴으로써 과발현될 수 있다. 다르게는, 보존된 GPCR 아미노산 또는 아미노산 도메인의 특정 돌연변이를 도입하여 사용된 GPCR을 구성적으로 활성화시킬 수 있다.
- <112> T1R2-TMD 발현 벡터 구조체의 세포에의 감염
- <113> 다량의 단백질을 발현시키는 박테리아, 포유류, 효모 또는 곤충 세포주를 생산하기 위해 표준 감염 방법이 사용될 수 있다.
- <114> 숙주 세포에 뉴클레오타이드 서열을 도입하기 위한 임의 공지된 방법이 사용될 수 있다. 사용된 특정 유전공학화 절차에 의해 대상의 단백질을 발현시킬 수 있는 숙주 세포 중으로 관련 유전자를 성공적으로 도입시킬 수 있는 것만이 필요하다. 이러한 방법은 클론된 게놈 DNA, cDNA, 합성 DNA 또는 다른 외래 유전 물질을 숙주 세포에 도입하는 것을 포함하며, 인산 칼슘 감염, 폴리브렌, 원형질체 융합, 전기천공, 리포솜, 미세주사, 플라즈마

벡터, 바이러스성 벡터 등의 사용을 포함한다.

- <115> 예를들면, 비제한적으로 T-Rex(상표명) 발현 시스템(인비트로젠 코포레이션(Invitrogen Corp.), 캘리포니아주 칼스배드 소재)을 사용할 수 있다. T-Rex(상표명) 시스템은 대장균 Tn10-암호화 테트라사이클린(Tet) 저항성 오페론으로부터 조절성 원소를 사용하는 테트라사이클린-조절된 포유류 발현 시스템이다. T-Rex(상표명) 시스템에서의 테트라사이클린 조절은 테트라사이클린의 Tet 억제물질에의 결합 및 대상의 유전자의 발현을 조절하는 프로모터의 탈억제화에 기초한다.
- <116> 세포 배양
- <117> 감염 후, 감염된 세포는 당해 기술 분야에 잘 공지된 표준 배양 조건을 사용하여 배양될 수 있다. 상이한 세포에서는 적절한 온도 및 세포 배양 배지를 포함하는 상이한 배양 조건을 필요로 한다는 것이 당해 기술 분야의 숙련가에게 잘 알려져 있다.
- <118> T1R2-TMD 수용체 단백질 회수
- <119> 바람직한 경우, 단백질은 표준 기법을 사용하여 세포 배양으로부터 회수될 수 있다. 예를들면, 세포는 침전 및 크로마토그래피 단계로 처리되기 전에 기계적으로 또는 삼투압 충격에 의해 활짝 벌어질 수 있으며, 그의 성질 및 서열은 회수되는 특정 재조합 물질에 따라 좌우될 것이다. 다르게는, 재조합 단백질은 재조합 세포가 배양된 배양 배지로부터 회수될 수 있다.
- <120> **분석에 의해 동정될 수 있는 조절물:**
- <121> T1R2-TMD 수용체 활성의 조절물(리간드, 작용물질, 부분 작용물질, 길항물질, 역 작용물질, 억제제, 인헨서)은 후술되는 바에 따라 동정될 수 있다. 상기 분석에 의해 동정될 수 있는 제제의 정의는 다음과 같다.
- <122> 조절물은 수용체의 세포 표면 발현, 리간드의 수용체에의 결합, 수용체의 활성 형태에 의해 개시된 세포내 반응(작용물질의 존재 또는 부재 하에서) 중 하나 이상의 증가 또는 감소에 영향을 주는 제제이다. 조절물 그 자체는 수용체에 결합하고, 이것을 활성화시키고, 그럼으로써 세포 반응의 증가를 조절하는 작용물질일 수 있다.
- <123> 조절물에는 소분자, 펩타이드, 단백질, 핵산, 항체 또는 이것의 단편을 포함하는 여러 유형의 화합물을 포함한다. 이러한 것들은 합성 또는 천연 물질, 천연 물질의 추출물을 포함하는 여러 공급원, 예컨대 동물, 포유류, 곤충, 식물, 박테리아 또는 진균 세포 물질 또는 배양된 세포 또는 이러한 세포의 조건화된 배지로부터 유래될 수 있다.
- <124> 리간드는 수용체에 결합한 제제이다; 즉 이것은 작용물질, 부분 작용물질, 인헨서, 길항물질 또는 역 작용물질일 수 있다.
- <125> 작용물질(감미 자극물질)이 작용물질의 부재 하에서의 세포내 반응과 비교하여 수용체에 결합하는 경우, 작용물질(감미 자극물질)은 T1R2-TMD 수용체를 활성화시키고 세포내 반응을 증가시키는 T1R2-TMD 수용체의 리간드이다. 부가적으로 또는 대안적으로는, 작용물질의 부재 하에서 세포의 표면에 존재하는 세포 표면 수용체의 수와 비교할 때, 작용물질은 수용체의 세포 표면 발현을 증가시키도록 세포 표면 수용체의 내재화를 감소시킬 수 있다.
- <126> 부분 작용물질은 수용체를 최대로 활성화시키는 다른 작용물질에 비해 수용체를 단지 부분적으로만 활성화시키는 작용물질이다.
- <127> 길항물질은 작용물질과 동일한 자리(경쟁적 길항물질) 또는 상이한 자리(알로스테릭한 길항물질)에서 수용체에 결합하지만, 수용체의 활성 형태에 의해 개시된 세포내 반응을 활성화시키지 않고, 그럼으로써 작용물질의 존재 하 및 길항물질의 부재 하에서 세포내 반응과 비교하여 작용물질에 의해 유발된 세포내 반응을 억제하는 리간드이다.
- <128> 수용체에 결합한 역 작용물질은, 역 작용물질의 부재 하에서의 세포내 반응과 비교하여 수용체에 의해 매개된 구성적 세포내 반응을 감소시킨다.
- <129> 억제제는, 억제제의 부재 하에서의 작용물질의 결합과 비교하여 작용물질의 수용체에의 결합을 감소시키고/시키거나 작용물질에 의해 유발된 세포내 반응을 감소시킨다.
- <130> 인헨서는, 인헨서의 부재 하에서의 작용물질의 결합과 비교하여 작용물질의 수용체에의 결합을 증가시키고/시키거나 작용물질에 의해 유발된 세포내 반응을 증가시킨다.

- <131> 리간드를 결합시키고 예를들면 G-단백질을 통해 신호를 전달하는 수용체의 활성화 또는 활성의 변화(즉, 조절물과의 상이한 상호 작용때문에)는 후술되는 분석에 의해 측정될 수 있다.
- <132> **T1R2-TMD 수용체의 조절물을 동정하는 분석:**
- <133> 조절물은 기능적인 효과/파라미터를 측정하고 비교하는 매우 다양한 시험관내 및 생체내 분석을 사용하거나, 또는 다르게는 결합 분석에 의해 동정될 수 있다. 적합한 기능적 파라미터를 조사함으로써 수용체의 기능에 대한 시험 제제의 효과를 측정할 수 있다. 조절물을 동정하기 위해 수용체 활성화에 영향을 주는 임의 생리학적 변화를 사용할 수 있다.
- <134> 이러한 기능적인 분석은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 예로서 제 2 메신저(예를들면 세포내 칼슘(Ca^{2+}), cAMP, cGMP, 이노시톨(inositol) 포스페이트(IP_3), 다이아실글라이세롤/DAG, 아라키노이드 산, MAP 키나제 또는 티로신 키나제)의 농도 또는 활성화 또는 이들의 변화, 이온 플럭스, 포스포릴화 수준, 전사 수준, 및 신경전달물질 수준을 측정하는 것을 기반으로 하는 동물로부터 단리된 비손상 세포 또는 조직을 사용하는 분석, 및 GTP-결합, GTPase, 아데닐레이트 사이클라제, 포스포리피드-분해, 다이아실글라이세롤, 이노시톨 트라이포스페이트, 아라키돈산 방출, PKC, 키나제 및 전사 리포터에 기반한 분석을 들 수 있다. 몇몇 적합한 분석은 예를들면 국제 특허 출원 공개 제 WO 01 18050 호에 기술되어 있다.
- <135> 수용체 활성화는 전형적으로 후속의 세포내 사건을 개시하고, 예를들면 제 2 메신저(예, IP_3)를 증가시켜 칼슘 이온의 세포내 저장물을 방출시킨다. 몇몇 G-단백질 결합된 수용체의 활성화는 포스포티딜이노시톨의 포스포리파제 C-매개 가수분해를 통해 이노시톨 트라이포스페이트(IP_3)의 형성을 자극한다. 이어서, IP_3 는 세포내 칼슘 이온 저장물의 방출을 자극한다. 따라서, 세포질 칼슘 이온 수준의 변화 또는 IP_3 과 같은 제 2 메신저 수준의 변화를 사용하여 G-단백질 결합 수용체의 활성을 측정할 수 있다.
- <136> 수용체를 발현시키는 세포를 이것의 표면상에 또는 단리된 세포 막 단편 상에 함유하는 샘플에 의해 모든 기능적인 분석을 실시할 수 있다. 유용한 세포는 상술되어 있다. 별도의 세포 또는 세포 막을 사용하는 샘플 대신에, 유전자 이식 동물로부터의 조직을 사용할 수 있다.
- <137> 작용물질 그 자체가 아닌 조절물(예, 길항물질, 부분 작용물질, 역 작용물질, 억제제 또는 인헨서)을 동정하기 위해, 시험 제제를 갖는 샘플 및 시험 제제를 갖지 않는 샘플을 비교한다. 예를들면, 대조군(작용물질을 갖지만 조절물을 갖지 않음)을 100의 비교 수용체 활성화 값으로 정한다. 대조군과 비교하여 활성도의 감소는 억제제, 길항물질 또는 역 작용물질이고, 증가는 인헨서이다. 일반적으로, 시험 제제를 갖지 않는 샘플 또는 시험 제제를 갖지만 T1R2-TMD를 발현하지 않는 세포(감염을 가장한(mock-transfected) 세포)에 기초한 샘플과 비교할 때, 시험 제제를 갖는 샘플에서의 10% 이상의 측정된 활성도의 증가 또는 감소는 유의성을 갖는 것으로 간주될 수 있다.
- <138> 작용물질 또는 부분 작용물질의 동정:
- <139> 작용물질 또는 부분 작용물질을 동정하기 위해, 시험 제제를 갖는 샘플을 작용물질(예, 페틸라틴 또는 메틸 차비콜)을 갖는 양성 대조군과 비교하거나, 또는 다르게는/부가적으로 시험 제제를 갖는 샘플 및 시험 제제를 갖지 않는 샘플을 이들의 수용체 활성화도 면에서 비교한다. 예를들면, 작용물질 또는 부분 작용물질은, 작용물질 또는 부분 작용물질이 100mM 이하로 존재할 때 양성 대조군 감미 자극물질의 최대 생물학적 활성도의 10% 이상에 대응하는 생물학적 활성을 가질 것이며, 예를들면 이것은 작용물질과 유사하거나 또는 이보다 높은 최대 생물학적 활성을 가질 수 있다. 최대 생물학적 활성은 소정의 수용체 분석 포맷(format) 내에서 달성될 수 있는 작용물질(예, 페틸라틴 또는 메틸 차비콜)에 대한 최대 달성가능한 수용체의 반응으로서 정의되며, 이러한 반응은 동일한 작용물질의 농도를 증가시킬 수 있음에도 불구하고 추가적으로 증가될 수 없다.
- <140> 다르게는, 시험 제제를 갖는 샘플에서 예를들면 10% 이상의 측정된 활성의 증가를 시험 제제가 없는 샘플과 비교하거나, 또는 시험 제제를 갖지만 T1R2-TMD를 발현시키지 않는 세포(감염을 가장한 세포)에 기초한 샘플과 비교한다.
- <141> 길항물질을 동정하기 위해서는, 시험 제제를 갖는 공지된 작용물질 및 시험 제제를 갖지 않는 공지된 작용물질의 존재 하에서의 수용체 활성을 비교한다. 길항물질은 작용물질-자극 수용체 활성을 예를들면 10% 이상 만큼 감소시킨다.
- <142> 역 작용물질을 동정하기 위해, 시험 제제를 갖는 공지된 작용물질 및 시험 제제를 갖지 않는 공지된 작용물질의

존재 하에서의 수용체 활성을 상술된 바와 같이 수용체를 과발현시키는 동물/세포/막을 포함하는 샘플에서 비교한다. 역 작용물질은 수용체의 구성적 활성을 예를들면 10% 이상 만큼 감소시킨다.

- <143> 본원의 상기에서 기술된 분석에서 T1R2-TMD 수용체 활성도를 측정하는 적합한 검출 방법의 다양한 예는 다음과 같다.
- <144> 세포질 이온 또는 막 전압의 변화 검출 :
- <145> 문헌["G-protein coupled receptors(Signal Transduction Series)", CRC Press 1999; 1st Edition; Eds Haga and Berstein]에 상세하게 기술된 바와 같이, 세포에 리포터 수용체 활성에 대한 이온 감응성 염료를 부하시킨다. 각각 이온 감응성 또는 막 전압 형광 지시제를 사용하여 세포질 또는 막 전압에서의 이온 농도의 변화를 측정한다.
- <146> 칼슘 플럭스:
- <147> 칼슘에 결합한 세포-침투성 염료를 사용하여 GPCR의 활성에 의해 유발된 세포내 칼슘 방출을 검출한다. 칼슘-결합된 염료는 세포내 칼슘의 상승에 비례하는 형광 신호를 발생한다. 상기 방법으로 수용체 활성이 빠르고 정량적으로 측정된다.
- <148> 상술한 바와 같이, 사용된 세포는 T1R2-TMD GPCR 및 포스포리파제 C 경로에 결합하는 G-단백질을 공발현시키는 감염된 세포이다. 음성 대조군은 후보 화합물의 가능한 비특이 효과를 배제하도록 T1R2-TMD를 발현하지 않는 (감염을 가장한) 세포 또는 이들의 막을 포함한다.
- <149> 칼슘 플럭스 검출 프로토콜은 문헌["G-protein coupled receptors(Signal Transduction Series)"; Editors: Tatsuya Haga and Gabriel Berstein, 1st ed., 424pp. CRC Press - Boca Raton FL; September 1999]에 상세히 기술하고 있으며, 개정판이 하기에 요약되어 있다:
- <150> 0일: 96-웰 플레이트를 웰당 8.5K 세포수로 시드화시키고, 영양 성장 배지에서 밤새 37°C의 온도로 유지시킨다.
- <151> 1일: 웰당 150ng의 GPCR DNA 및 0.3 μ l의 리포펙타민(Lipofectamine) 2000 (인비트로젠)을 사용하여 세포들을 감염시킨다. 감염된 세포들을 영양 성장 배지에서 밤새 37°C의 온도로 유지시킨다.
- <152> 2일: 성장 배지를 제거하고, 세포들을 1시간 동안(실온의 암소에서) 10mM 헤페스(Hepes), 200 μ M 염화 칼슘 및 0.1%의 우혈청 알부민으로 보충된 헵크스(Hanks) 균형 염 용액(HBSS)(pH 7.4, 37°C)에 용해된 2.5 μ M 프로베니시드 및 1.5 μ M 플루오(Fluo)-4 AM(몰레큘러 프로브: Molecular Probes)으로 구성된 75 μ l의 칼슘 분석 용액에 의해 배양시킨다.
- <153> 10mM 헤페스, 200 μ M 염화 칼슘 및 0.1%의 우혈청 알부민으로 보충된 헵크스 균형 염 용액(HBSS)(pH 7.4, 37°C)에 용해된 2.5mM 프로베니시드로 구성된 125 μ l의 세척 완충액을 각 웰에 첨가하고, 상기 플레이트를 암소의 실온에서 30분 동안 추가적으로 배양시킨다. 완충액을 제거하고, 플레이트를 100 μ l의 세척 완충액으로 3번 세척한 후, 세포들을 200 μ l의 세척 완충액에서 재구성시키고, 37°C에서 15분 동안 배양시킨다. 플레이트를 형광 마이크로플레이트 판독기, 예를들면 플렉스스테이션(Flexstation; 몰레큘러 디바이스즈(Molecular Devices)) 또는 FLIPR(몰레큘러 디바이스즈)에 놓고 10배로 농축된 리간드 원료 용액 20 μ l의 첨가 후에 수용체의 활성화를 개시한다. 리간드를 첨가하기 전 15초 동안 및 리간드를 첨가한 후 45 내지 110초 동안 형광을 계속하여 모니터링한다. 수용체 활성화 수준은 하기 수학적 1 또는 수학적 2에 의해 정의된다:

수학적 1

- <154> 활성화(%) = (최대 형광 - 기준 형광/기준 형광)*100

수학적 2

- <155> 형광 증가 = 최대 형광 - 기준 형광
- <156> 상기 식에서, 기준 형광은 리간드 첨가 전의 평균적인 형광 수준을 나타낸다.
- <157> 유용한 세포는 상술된 포유류 세포, 예를들면 HEK293T 세포 및 HEK293 T-Rex(상표명) 세포이다. 세포들은 당해 기술 분야에서 잘 공지된 바와 같이 GPCR 및 G-단백질로 일시적으로 또는 안정적으로 감염될 수 있다. 우수한 이종 발현 시스템은 국제 특허 출원 공개 제 WO 2004/055048 호에 상세하게 기술되어 있다.

- <158> 칼슘 플럭스 분석은 예를들면 하기 본원의 실시예 1에서 기술된 바와 같이 실시될 수 있다.
- <159> 조절물의 동정은 하기 개정의 조건 하에 상술된 바와 같이 실시된다. 상기 신호를 작용물질의 존재 및 시험 제제의 부재 하에서 T1R2-TMD를 발현시키는 재조합 세포로부터 얻어진 T1R2-TMD 활성의 기준 수준과 비교한다. 예를들면 2배 이상, 5배 이상, 10배 이상, 100배 이상 또는 이 이상의 T1R2-TMD 활성의 증가 또는 감소로서 조절물을 동정한다.
- <160> 다르게는, 조절물이 없는 샘플에 비교할 때, 또는 조절물을 갖지만 T1R2-TMD 폴리펩타이드를 발현하지 않는 세포(감염을 가장한 세포)에서의 샘플과 비교할 때, 동정은 예를들면 10% 이상의 증가 또는 감소된 형광 세기를 포함한다.
- <161> 아데닐레이트 사이클라제 활성:
- <162> 아데닐레이트 사이클라제 활성의 분석은 예를들면 문헌[Kenimer & Nirenberg, 1981, Mol. Pharmacol. 20: 585-591]에 상세하게 기술된 바에 따라 실시된다. 일반적으로, 반응 혼합물을 10분 미만 동안 37°C에서 배양시킨다. 배양 후, 반응 혼합물을 0.9mℓ의 차거운 6% 트라이클로로아세트산의 첨가에 의해 탈단백질화시킨다. 튜브를 원심분리시키고, 각각의 상정액을 도웁스(Dowex) AG50W-X4 칼럼에 첨가한다. 작용물질에 의한 수용체 활성 후에 생성된 cAMP의 수준을 측정하기 위해 상기 칼럼으로부터의 cAMP 단편을 계수 바이알 증으로 4mℓ의 0.1mM 이미다졸-HCl(pH 7.5)로 용출시킨다. T1R2-TMD 폴리펩타이드를 발현시키지 않는 세포로부터 단백질 호모제네이트(homogenate)를 사용하여 대조군 반응을 또한 실시해야만 한다.
- <163> IP3/Ca²⁺ 신호
- <164> G-단백질을 발현시키는 세포에서, 형광을 사용하여 이노시톨 트라이포스페이트(IP3)/Ca²⁺에 대응하는 신호 및 그에 따른 수용체 활성을 검출할 수 있다. GPCR을 발현시키는 세포는 두개의 세포내 저장물 및 이온 채널의 활성화를 통해 증가된 세포질 칼슘 수준을 나타내며, 이러한 경우 꼭 필요한 것은 아니지만 EDTA와 같은 킬레이팅제로 임의적으로 보충된 칼슘-부재 완충액에서 상기 분석을 실시하여 칼슘 방출로부터 초래된 형광 반응을 내부 저장물과 구별하는 것이 바람직할 수 있다.
- <165> 포스포리파제 C/세포내 Ca²⁺ 신호
- <166> 포스포리파제 C 신호 전달 경로에 수용체를 연결시키는 G-단백질을 갖는 세포에서 T1R2-TMD를 발현시킨다. 예를들면 형광 Ca²⁺ 지시제 염료 및/또는 형광계 이미징을 사용하여 세포내 Ca²⁺ 농도의 변화를 측정한다.
- <167> GTPase/GTP 결합:
- <168> T1R2-TMD를 포함하는 GPCR에 있어서, 수용체 활성의 측정은 GPCR을 함유하는 세포 막에 의한 GTP의 결합과 관련된다. 표지된 GTP의 결합을 검출함으로써 막의 G-단백질의 결합이 측정된다.
- <169> 수용체를 발현시키는 세포로부터 단리된 막을 35S-GTP γ S 및 비표지화 GDP를 함유한 완충액에서 배양시킨다. 활성 GTPase는 표지물을 무기 인산염으로서 방출하며, 이것은 20mM H₃PO₄ 중의 활성탄의 5% 현탁액에서 유리 무기 인산염의 분리 후 섬광 계수에 의해 검출된다. 혼합물을 배양시키고, 결합되지 않은 표지화 GTP를 GF/B 필터 상의 여과에 의해 제거한다. 결합 및 표지화된 GTP를 액체 섬광 계수에 의해 측정한다. 시험 제제의 가능한 비특이 효과를 배제시키기 위해, 대조군은 T1R2-TMD를 발현시키지 않는(감염을 가장한) 세포로부터 단리된 막을 사용하는 분석을 포함한다. 이러한 방법은 문헌[Traynor and Nahorski, 1995, Mol. Pharmacol. 47: 848-854]에 상세하게 기술되어 있다.
- <170> 조절물을 동정하기 위해서는, 상술된 바와 같이, GTP 결합 또는 GTPase 활성이 10% 이상 변화(증가 또는 감소)되는 것으로 일반적으로 충분하다. 그러나, 작용물질의 동정을 위해서는, 본원의 상기에서 기술된 분석을 하기 개정의 조건 하에 실시한다. 화합물이 100mM 이하, 예를들면 10 내지 500 μM, 예를들면 약 100 μM로 존재할 때 활성이 공지된 작용물질(예들들면, 페릴라틴)의 활성의 50% 이상이라면, 또는 공지된 작용물질에 의해 유발된 활성과 동일하거나 이 보다 높은 수준을 유발한다면 제제는 일반적으로 작용물질로서 동정된다.
- <171> 마이크로피지오미터(Microphysiometer) 또는 바이오센서
- <172> 본 분석은 문헌[Hafner, 2000, Biosens. Bioelectron. 15:149-158]에 상세하게 기술된 바와 같이 수행될 수 있다.

- <173> 아라키노이드 산
- <174> 아라키노이드 산의 세포내 수준은 수용체 활성의 지시자로서 사용된다. 이러한 방법은 문헌[Gijon et al., 2000, J. Biol. Chem., 275:20146-20156]에 상세하게 기술되어 있다.
- <175> cAMP/cGMP:
- <176> 예를들면 문헌[Horton & Baxendale, 1995, Methods Mol. Biol. 41: 91-105]에 의해 기술된 바와 같이, cAMP 방사면역분석(RIA) 또는 cAMP 결합 단백질을 사용하여 세포내 또는 세포외 cAMP를 측정한다. 다르게는, cAMP 측정용의 다수의 키트, 예를들면 엘제이엘 바이오시스템스(LJL Biosystems) 및 엔이엔 라이프 사이언스 프로덕츠(NEN Life Science Products)에 의해 고효율 형광 극성-기반 균일 분석을 상업적으로 입수할 수 있다. 다르게는, 면역분석을 사용하여 cGMP의 세포내 또는 세포외 수준을 측정할 수 있다. 예를들면, 문헌[Felley-Bosco et al., Am. J. Resp. Cell and Mol. Biol., 11:159-164 (1994)]에 기술된 방법을 사용하여 cGMP의 수준을 측정할 수 있다. 다르게는, 미국 특허 제 4,115,538 호에 기술된 바와 같이 cAMP 및/또는 cGMP 측정용 분석 키트를 사용할 수 있다.
- <177> 시험 제제의 가능한 비특이 효과를 배제하기 위해 감염을 가장한 세포 또는 이것의 추출물을 갖는 음성 대조군을 사용할 수 있다.
- <178> DAG/IP3:
- <179> 수용체 활성화에 의해 유발된, 포스포리피드 분해에 의해 방출된 제 2 메신저 다이아실글라이세롤(DAG) 및/또는 이노시톨 트라이포스페이트(IP3)를 예를들면 문헌[Phospholipid Signalling Protocols, edited by Ian M. Bird, Totowa, N.J., Humana Press, 1998]에 기술된 바와 같이 T1R2-TMD 활성의 지시자로서 검출하고 사용할 수 있다. 다르게는, 이노시톨 트라이포스페이트의 측정용 키트를 퍼킨 엘머(Perkin Elmer) 및 시스바이오 인터내셔널(CisBio International)로부터 상업적으로 입수할 수 있다.
- <180> 시험 제제의 가능한 비특이 효과를 배제시키기 위해 감염을 가장한 세포 또는 이것의 추출물을 갖는 음성 대조군을 사용할 수 있다.
- <181> PKC 활성화:
- <182> 성장 인자 수용체 티로신 키나제는 포스포리피드- 및 칼슘-활성화 단백질 키나제 과인 단백질 키나제 C(PKC)의 활성화에 관련된 경로를 통해 신호를 보낼 수 있다.
- <183> PKC에 의해 유발된 유전자 생산물의 증가는 PKC 활성을 보여주며, 따라서 수용체 활성을 보여준다. 이러한 유전자 생산물은 예를들면 원종양 유전자 전사 인자-암호화 유전자(c-fos, c-myc 및 c-jun 포함), 프로테아제(protease), 프로테아제 억제제(콜라게나제(collagenase) 유형 I 및 플라스미노겐(plasminogen) 활성 억제제 포함) 및 접착 분자(세포내 접착 분자 I(ICAM I) 포함)를 포함한다.
- <184> PKC 활성화는 문헌[Kikkawa et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 13341]에 기술된 바와 같이 직접적으로 측정될 수 있으며, 이때 상기 포스포셀룰로즈 종이에 결합함으로써 후속적으로 분리된 PKC 기질 펩타이드의 포스포릴화가 측정된다. 이것은 정제된 키나제의 활성을 측정하는데 사용되거나 또는 조직의 세포 추출에서 사용될 수 있다. 단백질 키나제 C 샘플은 분석 직전에 20mM HEPES/2mM DTT에서 희석될 수 있다.
- <185> 판베라(PanVera)에 의해 상업적으로 입수할 수 있는 프로테인 키나제 C 어세이 키트(Protein Kinase C Assay Kit)를 사용하여 또 다른 분석을 실시할 수 있다.
- <186> 상술된 PKC 분석은 T1R2-TMD를 발현시키는 세포로부터의 추출물 상에서 실시된다.
- <187> 다르게는, PKC 활성화에 의해 활성화된 유전자의 대조군 서열에 의해 유도된 리포터 유전자 구조체를 사용하여 활성을 측정할 수 있다.
- <188> 시험 제제의 가능한 비특이 효과를 배제시키기 위해 감염을 가장한 세포 또는 이것의 추출물을 갖는 음성 대조군을 사용할 수 있다.
- <189> MAP 키나제 활성화:
- <190> MAP 키나제 활성화는 상업적으로 입수할 수 있는 키트, 예를들면 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)의 p38 MAP 키나제 분석 키트, 또는 퍼킨-엘머 라이프 사이언스(Perkin-Elmer Life Sciences)의 플래시플레이트

(FlashPlate; 상표명) MAP 키나제 분석을 사용하여 측정할 수 있다. Gq 및 Gi 결합된 GPCR을 갖는 세포를 사용하는 경우, T1R2-TMD 활성을 확인하기 위해 p42/44 MAP 키나제 또는 ERK1/2를 측정할 수 있으며, ERK1/2 분석 키트는 TGR 바이오사이언스(TGR Biosciences)에 의해 상업적으로 입수할 수 있으며, 이것은 GPCR 활성 후에 내인성 ERK1/2 키나제의 포스포릴화를 측정하는 것이다.

- <191> 또한, 공지된 합성 또는 천연 티로신 키나제 기질 및 표지화 인산염에 의해 티로신 키나제 활성을 직접적으로 측정하는 방법이 잘 알려져 있으며; 다른 유형의 키나제(예, 세린/트레오닌 키나제)의 활성도 유사하게 측정될 수 있다.
- <192> 정제된 키나제 및 T1R2-TMD 폴리펩타이드를 발현시키는 세포로부터 제조된 조질 추출물 둘다를 사용하여 모든 키나제 분석을 실시할 수 있다.
- <193> 사용되는 키나제 기질은 상기 기질을 나타내는 전장 단백질 또는 합성 펩타이드일 수 있다. 핀나(Pinna) 및 루젠(Ruzzene)(문헌[1996, Biochem. Biophys. Acta 1314:191-225])은 키나제 활성을 검출하는데 유용한 다수의 포스포릴화 기질 자리를 열거하고 있다. 다수의 키나제 기질 펩타이드를 상업적으로 입수할 수 있다. 특히 유용한 것은 많은 수용체 및 비수용체 티로신 키나제용 기질인 "Src-관련 펩타이드"(RRLIEDAEYAARG; 시그마(Sigma)로부터 상업적으로 입수가능)이다. 몇몇 방법은 필터에 펩타이드 기질을 결합시키는 것을 필요로 하며, 따라서 결합을 용이하게 하기 위해 펩타이드 기질은 순 양성 전하를 가져야 한다. 일반적으로, 펩타이드 기질은 2 이상의 염기성 잔기 및 유리 아미노 말단을 가져야 한다. 일반적으로, 반응에는 0.7 내지 1.5mM의 펩타이드 농도를 사용한다.
- <194> 시험 제제의 가능한 비특이 효과를 배제시키기 위해 감염을 가장한 세포 또는 이것의 추출물을 갖는 음성 대조군을 사용할 수 있다.
- <195> 전사 리포터/T1R2-TMD-반응성 프로모터/리포터 유전자
- <196> 리포터 유전자 분석으로 조절물을 동정하기 위해서, 2배 이상의 신호의 증가 또는 10%의 신호의 감소가 중요하다. 시험 제제의 존재 및 부재 하에서의 활성을 비교하는 경우, 작용물질은 예를들면 2배 이상, 5배 이상, 10배 이상 또는 이 이상으로 자극한다.
- <197> T1R2-TMD에 작용물질을 결합함으로써 개시된 세포내 신호가 캐스케이드 식으로 세포내 사건을 촉진하며, 이것의 최종적인 결과로서 하나 이상의 유전자의 전사 또는 번역이 빠르고 검출가능하게 변한다.
- <198> 그러므로, 수용체의 활성은 T1R2-TMD 활성에 반응하는 프로모터에 의해 유도되는 리포터 유전자의 발현을 측정함으로써 결정될 수 있다.
- <199> 본원에 사용된 "프로모터"는 수용체-관련 발현에 필요한 하나 이상의 기본적인 프로모터, 인핸서 및 전사-인자 결합 자리를 비롯한, 유전자 발현의 수용체-매개 조절에 필요한 하나 이상의 전사 대조군 원소 또는 서열이다. T1R2-TMD에 결합하는 작용물질로부터 비롯된 세포내 신호에 반응하는 프로모터가 선택되어 전사, 번역 또는 최종적인 활성이 쉽게 검출가능하고 측정가능한 대응하는 프로모터-조절 리포터 유전자에 작동적으로 연결된다.
- <200> 리포터 유전자는 예를들면 루시페라제(luciferase), CAT, GFP, β-락타마제(lactamase), β-갈락토시다제(galactosidase), 및 소위 "조기 발현(immediate early)" 유전자, c-fos 원종양 유전자, 전사 인자 CREB, 혈관 활성 장관 펩타이드(VIP) 유전자, 소마토스타틴 유전자, 프로엔케팔린(proenkephalin) 유전자, 포스포엔올피루베이트 카복시-키나제(PEPCK) 유전자, NF-κB에 반응하는 유전자, 및 AP-1-반응성 유전자(Fos 및 Jun, Fos-관련 항원(Fra) 1 및 2, IκBα, 오르니틴 데카복실라제 및 아넥신 I 및 II에 대한 유전자 포함)로부터 선택될 수 있다.
- <201> 당해 기술 분야에서 분명한 바와 같이, 프로모터는 선택된 리포터 유전자에 따라 선택될 것이다.
- <202> 루시페라제, CAT, GFP, β-락타마제, β-갈락토시다제 및 이들의 생산물을 검출하기 위한 분석은 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있다. 추가적인 리포터 유전자의 예는 후술된다.
- <203> "조기 발현" 유전자가 적합하며, 빠르게 유도된다(예를들면, 수용체와 이펙터(effector) 단백질 또는 리간드가 접촉하는 수분 내에). 리포터 유전자의 바람직한 특성은 하기 중 하나 이상을 포함한다: 리간드 결합에 대한 빠른 반응성; 휴지기 세포에서의 낮은 발현 또는 검출가능하지 않은 발현; 새로운 단백질 합성의 일시적이고 독립적인 유도; 새로운 단백질 합성을 필요로 하는 후속의 전사 정지; 및 수분 내지 수시간의 짧은 반감기를 갖는 상기 유전자로부터 전사된 mRNA. 마찬가지로, 프로모터는 상기 특성 중 하나, 수개 또는 모두를 가질 수 있다.

- <204> c-fos 원종양 유전자가 다수의 상이한 자극에 반응하고 빠른 유도를 갖는 유전자의 예이다. c-fos 조절 원소는 전사 개시에 필요한 TATA 박스, 즉 기본적인 전사를 위한 두 개의 상류 원소, 및 이분 대칭성을 갖는 원소를 포함하며 TPA, 혈청, EGF, 및 PMA에 의한 유도에 필요한 인헨서를 포함한다. 혈청 결핍 NIH 3T3 세포에서 c-fos mRNA 캡 자리로부터 상류의 -317과 -298 bp 사이에 위치하는 20bp c-fos 전사 인헨서 원소가 혈청 유도에 필수적이다. 두 개의 상류 원소 중 하나는 -63 내지 -57에 위치하며, 이것은 cAMP 조절을 위한 공통 서열과 유사하다.
- <205> 전사 인자 CREB(사이클릭 AMP 반응성 원소 결합 단백질)는 세포내 cAMP의 수준에 반응한다. 그러므로, cAMP 수준의 조절에 의해 신호를 보내는 수용체의 활성화는 전사 인자의 결합 또는 CREB-결합 원소(CRE, 또는 cAMP 반응 원소로 지칭됨)에 연결된 리포터 유전자의 발현을 검출함으로써 측정될 수 있다. CRE의 DNA 서열은 TGACGTC이다. CREB 결합 활성화에 반응하는 리포터 구조체는 미국 특허 제 5,919,649 호에 기술되어 있다.
- <206> 다른 적합한 리포터 유전자 및 이들의 프로모터는 cAMP 반응성인 혈관활성 장관 펩타이드(VIP) 유전자 및 이것의 프로모터; cAMP 반응성인 소마토스타틴 유전자 및 이것의 프로모터; cAMP, 니코틴 작용물질, 및 포볼(phorbol) 에스테르에 반응성인 프로엔케팔린 및 이것의 프로모터; 및 cAMP 반응성인 포스포엔올피루베이트 카복시-키나제(PEPCK) 유전자 및 이것의 프로모터를 포함한다.
- <207> GPCR 활성의 변화에 반응성인 리포터 유전자 및 이것의 프로모터의 부가적인 예는 AP-1 전사 인자 및 NF-κB를 포함한다.
- <208> AP-1 프로모터는 팰린드롬(palindrome) TGA(C/G)TCA인 공통의 AP-1 결합 자리를 특징으로 한다. AP-1 자리는 또한 포볼 에스테르 12-O-테트라데카노일포볼-β-아세테이트(TPA)를 포함하는 중앙 프로모터에 의한 유도의 매개에 원인이 되며, 따라서 이것은 때때로 TPA-반응 원소에서 TRE로서 지칭된다. AP-1은 성장 자극에 대해 세포의 초기 반응과 관련된 여러 유전자를 활성화시킨다. AP-1-반응성 유전자의 예는 Fos 및 Jun(이것의 단백질 그 자체가 AP-1 활성을 형성함), Fos-관련 항원(Fra) 1 및 2, IκBα, 오르니틴 데카복실라제 및 아넥신 I 및 II에 대한 유전자를 포함한다.
- <209> NF-κB 프로모터/결합 원소는 공통 서열 GGGGACTTTC를 갖는다. 다수의 유전자들은 NF-κB 반응성으로서 확인되었으며, 이것의 대조군 원소는 리포터 유전자에 결합되어 GPCR 활성을 모니터링할 수 있다. NF-κB에 반응성인 유전자는 예를들면 IL-1β, TNF-α, CCR5, P-선택션(selection), Fas 리간드, GM-CSF 및 IκBα를 암호화하는 것들을 포함한다. NF-κB-반응성 리포터를 암호화하는 벡터는 당해 기술 분야에 공지되어 있거나, 당해 기술 분야에서 통상적인 기술, 예를들면 합성 NF-κB 원소 및 최소 프로모터를 사용하거나 또는 NF-κB 조절에 적용되는 것으로 공지된 유전자의 NF-κB-반응성 서열을 사용하여 쉽게 형성할 수 있다. 추가적으로, NF-κB 반응성 리포터 구조체는 예를들면 클론테크(CLONTECH)로부터 상업적으로 입수할 수 있다.
- <210> 소정의 프로모터 구조체는 이 구조체로 감염된 T1R2-TMD-발현 세포를 작용물질(예, 페릴라틴)에 노출시킴으로써 용이하게 시험될 수 있다. 작용물질에 반응하여 리포터 유전자의 발현이 2배 이상 증가하는 것은, 리포터가 T1R2-TMD 활성을 측정하는데 적합하다는 것을 시사한다.
- <211> 전사 분석에서의 대조군은 T1R2-TMD를 발현하지 않지만 리포터 구조체를 포함하는 세포 및 프로모터가 없는 리포터 구조체를 갖는 세포 둘다를 포함한다.
- <212> 리포터 유전자 활성화에 의해 확인된 바와 같이, T1R2-TMD 활성을 조절하는 제제는 신호의 T1R2-TMD 특이성을 증명하고 이것의 활성 스펙트럼을 측정하는 다른 프로모터 및/또는 다른 수용체를 사용하여 확인될 수 있고, 그럼으로써 임의의 비특이 신호, 예를들면 리포터 유전자 경로를 통한 비특이 신호를 배제시킬 수 있다.
- <213> 이노시톨 포스페이트(IP) 측정:
- <214> 포스파티딜 이노시톨(PI) 가수 분해는, 48시간 이상 또는 그 이상 동안 3H-미오이노시톨을 사용하여 세포를 표지화하는 것을 포함하는 미국 특허 제 5,436,128 호에 기술된 바에 따라 측정될 수 있다. 표지화 세포를 1시간 동안 시험 제제와 접촉시킨 후, 이러한 세포를 용해시키고 클로로포름-메탄올-물에서 추출시킨다. 이후, 이온 교환 크로마토그래피에 의해 이노시톨 포스페이트를 분리시키고 섬광 계수에 의해 이것을 정량화시킨다. 작용물질에 있어서, 배수(fold) 자극은 완충액 대조군의 존재 하에서의 분당 계수(counts per minute; cpm)에 대한 시험된 제제의 존재 하에서의 cpm의 비를 계산함으로써 측정된다. 유사하게, 억제제, 길항물질 및 역 작용물질에 있어서, 배수 억제제는 완충액 대조군(이는 작용물질을 함유하거나 함유하지 않을 수 있다)의 존재 하에서의 cpm에 대한 시험 제제의 존재 하에서의 cpm의 비를 계산함으로써 측정된다.

- <215> **결합 분석:**
- <216> 리간드 결합에 대한 기능성 반응에 의해 유발된 파라미터의 변화를 측정하는 상술한 기능적 분석에 대한 대안으로, 리간드의 T1R2-TMD 수용체로의 결합을 측정하는 결합 분석에 의해 리간드 결합을 결정할 수 있다.
- <217> 결합 분석은 당해 분야에 널리 알려져 있으며, 용액, 2층 막, 임의적으로 고체 상에 부착된 막, 지질 단층 또는 소포에서 시험할 수 있다. T1R2-TMD 폴리펩타이드로의 조절물의 결합은 분광학적 특성(예를들면, 형광, 흡광도 또는 굴절률)의 변화, 유체역학적 방법(예를들면, 형태를 사용함), 크로마토그래피, T1R2-TMD 폴리펩타이드의 용해도의 측정에 의해 결정될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 결합 분석은 생화학적이며, 재조합 T1R2-TMD 폴리펩타이드를 발현하는 세포/조직으로부터의 막 추출물을 사용한다.
- <218> 예를들면, 결합 분석은 미국 특허 제 20050032158 호에서 소위 "세포에 기초한 결합 분석"의 기능적 분석과 구별되는 미국 특허 제 20050032158 호의 문단[0169] 내지 [0198]의 소위 "시험관내 결합 분석"에서 아들러(Adler) 등에 의해 T1R에 대해 기재된 바와 같이 수행될 수 있다.
- <219> **T1R2-TMD 수용체 폴리펩타이드 및 핵산, 및 실질적으로 상동의 폴리펩타이드 및 핵산:**
- <220> 본 발명에 따른 방법에 유용한 T1R2-TMD 수용체는 서열 식별 번호: 2의 수용체, 또는 다르게는 실질적으로 상동성이고 기능이 유지되는(즉, 리간드에 결합하고 리간드에 의해 활성화된) 수용체(또는 T1R2-TMD 수용체를 형성하는 뉴클레오타이드 서열)일 수 있다. 이러한 상동성 수용체는 예를들면 서열 식별 번호: 2의 대립 변이체, 또는 래트(약 77.9%의 아미노산 서열 동일성 및 약 81.2%의 핵산 동일성), 마우스(약 76.2%의 아미노산 서열 동일성 및 약 80.9%의 핵산 동일성), 개(약 74.4%의 아미노산 서열 동일성 및 약 82.6%의 핵산 동일성)를 포함하는 상이한 종 또는 인간의 수용체에 대해 충분한 아미노산 서열 동일성을 갖는 임의 다른 종의 상응하는 상동성 서열일 수 있다.
- <221> 추가적으로, 실질적으로 상동성의 T1R2-TMD 뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열은 보존적 돌연변이 및/또는 점 돌연변이에 의해 형성될 수 있으며, 후술되는 바와 같이 임의의 보존적으로 변형된 변이체를 포함할 수 있다.
- <222> 핵산 서열과 관련하여, 보존적으로 변형된 변이체는 동일하거나 또는 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 핵산(보존적으로 치환된 아미노산, 즉 아르기닌과 교환된 리신 및 본원의 하기에서 설명되는 추가적인 예들)을 의미한다.
- <223> 유전 암호의 겹침 때문에, 서열은 다르지만 기능적으로 동일한 많은 수의 핵산이 임의의 소정의 폴리펩타이드/단백질을 암호화한다. 이러한 핵산 변종은 보존적으로 변형된 변종의 하나의 종인 "침묵 변종(silent variations)"이다. 폴리펩타이드를 암호화하는 각각의 핵산 서열은 또한 핵산의 모든 가능한 침묵 변종을 기술한다. 그러므로, 핵산에서의 각각의 코돈(일반적으로 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG 및 일반적으로 트립토판의 유일한 코돈인 TGG 제외)은 변형되어 동일한 폴리펩타이드를 생산하는 기능적으로 동일한 핵산 서열을 생산할 수 있다. 따라서, 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 각각의 침묵 변종은 각각의 소정의 핵산 서열에 내재되어 있다.
- <224> 아미노산 서열과 관련하여, PCR, 유전자 클로닝, cDNA의 특정 자리-지향 돌연변이화, 숙주 세포의 감염, 및 시험관내 전사를 포함하는 재조합 유전자 기술의 공지된 프로토콜을 사용하여 아미노산 치환이 유도될 수 있는데, 이러한 것들은 T1R2-TMD 서열에 상기 변화를 도입하는데 사용될 수 있다. 이어서, 변이체는 미각-세포-특이 GPCR 기능 활성을 위해 스크린될 수 있다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있다. 예를들면, 보존적 치환을 선택하는 하나의 대표적인 가이드라인은 다음을 포함한다(원래의 잔기 다음에 전형적인 치환이 음): ala/gly 또는 ser; arg/lys; asn/gln 또는 his; asp/glu; cys/ser; gln/asn; gly/asp; gly/ala 또는 pro; his/asn 또는 gln; ile/leu 또는 val; leu/ile 또는 val; lys/arg 또는 gin 또는 glu; met/leu 또는 tyr 또는 ile; phe/met 또는 leu 또는 tyr; ser/thr; thr/ser; trp/tyr; tyr/trp 또는 phe; val/ile 또는 leu.
- <225> 또 다른 전형적인 가이드라인에서는 하기 6개의 균을 사용하고 있으며, 이들 각각은 서로 보존적으로 치환되는 아미노산을 함유한다: 1) 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T); 2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E); 3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q); 4) 아르기닌(R), 리신(L); 5) 아이소류신(I), 루신(L), 메티오닌(M), 발린(V); 및 6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W).
- <226> 또 다른 가이드라인에서는 서로 보존적인 치환으로서 양성 또는 음성의 모든 하전된 아미노산을 허용한다. 또

한, 단일 아미노산 또는 암호화된 서열에서 작은 백분율(예를들면, 26% 이하, 또는 20% 이하, 또는 10% 이하)의 아미노산을 변경, 첨가 또는 삭제하는 각개의 치환, 삭제 또는 첨가가 보존적으로 변형된 변종인 것으로 간주된다.

- <227> 실질적으로 상동의 뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열은 어느 정도의 서열 동일성을 갖거나 또는 후술되는 바와 같은 특징의 엄격한 하이브리드화 조건 하에서 하이브리드화된다.
- <228> 서열 동일성(%):
- <229> 실질적으로 상동의 뉴클레오타이드 서열은 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상의 서열 동일성(%)을 갖는다.
- <230> 실질적으로 상동의 폴리펩타이드 서열은 74% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 98% 이상의 서열 동일성(%)을 갖는다.
- <231> 서열 동일성(%)의 계산치는 다음과 같이 측정된다.
- <232> BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>에서 입수할 수 있는 Blastn 프로그램에 의해 사용된 지식 검색 알고리즘(heuristic search algorithm)이다. 또 다른 뉴클레오타이드 서열에 대한 뉴클레오타이드 쿼리(query) 서열의 동일성(%)을 측정하기 위해서, 10의 EXPECT(데이터베이스 서열에 대한 매치를 기록하는 통계적으로 유의한 임계값) 및 DUST 필터링을 포함하는 BLAST 버전 2.2.1.3.의 디폴트(default) 파라미터를 사용하는 Blastn을 사용한다. 또 다른 폴리펩타이드 서열에 대한 폴리펩타이드 쿼리 서열의 동일성(%)을 측정하기 위해서, 10의 EXPECT 및 DUST 필터링을 포함하는 BLAST 버전 2.2.1.3.의 디폴트 파라미터를 사용하는 Blastp를 사용한다.
- <233> 엄격한 하이브리드화 조건:
- <234> 뉴클레오타이드 서열은, 이것들이 후술되는 엄격한 하이브리드화 조건 하에 본원에서 제시된 뉴클레오타이드 서열, 또는 이것의 보체에 선택적으로 하이브리드화될 수 있다면 실질적으로 상동성인 것으로 간주된다. 엄격한 조건은 50%의 폼아미드, 5×SSC 및 1% SDS로 이루어진 용액 중의 42℃의 온도이며, 0.2×SSC 및 0.1% SDS로 이루어진 용액 중에 65℃에서 세척된다 (1×SSC = 0.15M NaCl, 0.015M Na₃ 시트레이트 pH 7.0).
- <235> 배경 하이브리드화는 예를들면 스크린된 cDNA 또는 게놈 DNA 라이브러리에 존재하는 다른 뉴클레오타이드 서열 때문에 발생할 수 있다. 배경의 신호 세기의 2배 이상, 임의적으로 배경 하이브리드화 신호 세기의 10배의 양성 신호는 표적 DNA와 특이적으로 상호작용(즉, 선택적으로 하이브리드화)하는 것으로 생각된다. 임의적으로, 표적 DNA에서 관측된 특이 상호작용의 10배 미만의 세기를 갖는 신호는 배경으로서 간주된다. 상호작용의 세기는 예를들면 32P로 프로브를 방사표지화함으로써 측정될 수 있다.
- <236> **조절물을 동정하기 위한 키트:**
- <237> T1R2-TMD 단일체, 또는 실질적으로 이것의 상동성인 서열을 발현하지만 T1R3을 발현하지 않는 재조합 세포를 포함하고, T1R2-TMD 단일체의 작용물질(예, 페릴라틴 또는 메틸 차비콜)을 포함하는 키트, 예를들면 스크리닝 키트 또는 고성능 스크리닝 키트가 또한 제공된다.
- <238> 임의적으로, 상기 세포는 추가적으로 칼슘 신호를 위한 G-단백질을 포함한다. 적합한 G-단백질은 공지되어 있으며, 본원의 상기에 기술되어 있고, 당해 기술 분야의 숙련가들은 필요에 따라 상기 세포에 상기 G-단백질을 도입하는 방법을 잘 알고 있다. 매우 유용한 키메라성 G-단백질은 G 알파 16-구스트듀신 44이다.
- <239> 작용물질은 적합한 농도, 예를들면 1nM 내지 10mM, 또는 0.1 μM 내지 1mM, 예를들면 0.1 μM 내지 100 μM로 제공된다.
- <240> 임의적인 키트 성분은, 제조된 재조합 세포를 배양하기 위한 적합한 배지, 및 예를들면 세포 배양 접시 또는 마이크로적정 플레이트 상에 세포들을 성장시키는 고체 지지체를 포함할 수 있으며, 이러한 임의적인 성분은 당해 기술 분야의 숙련가가 용이하게 이용할 수 있을 것이다.
- <241> 키트는 다음과 같이 사용할 수 있다:
- <242> (i) 재조합 세포를 고체 지지체 상에서 성장시킨다.
- <243> (ii) 약 1nM 내지 100mM 또는 이 이상의 농도의 시험 체제를 적합한 농도의 작용물질의 존재 하에서 한정된 플

레이트 또는 웰의 배양 배지에 첨가한다.

- <244> (iii) 시험 제제의 존재 및 부재 하에서의 반응을 비교함으로써 세포의 기능적인 반응의 변화를 측정하고, 그럼으로써 시험 제제가 조절물로서 동정된다.
- <245> 예를들면, 단계 (iii)은 본원의 상기에서 기술된 수용체의 활성을 기록하는 검출 방법중 어느 하나와 조합하여 본원의 상기에서 기술된 분석법 중 어느 하나에 따라 실시될 수 있다. 이러한 것은 본원의 상기에서 또한 기술된 구체적으로 선택되고 개정된 재조합 세포를 필요로 할 수 있다. 적합한 분석은 예를들면 시험 제제에 반응하는 T1R2-TMD의 활성 또는 이것의 변화를 측정하는 칼슘 플럭스 분석이다.
- <246> 동정된 조절물의 확인
- <247> 본원의 상기에서 기술된 방법에 의해 동정된 조절물은 플라보리스트(flavorists) 또는 시험자의 심사위원단이 동정된 조절물의 맛을 보는 단순한 감각적 실험에 의해 용이하게 확인할 수 있다. 화합물은, 단맛을 확인하기 위해 물 중에서 맛을 보거나 또는 단맛을 증진시키는 조절물을 확인하기 위해 조절물이 없는 음성 대조군과 비교하여 감미 자극물질과 함께 맛을 보게 된다.
- <248> 대규모 스크리닝 분석
- <249> 본원의 상기에서 기술된 전사 리포터 분석 및 대부분 세포를 기본으로 하는 분석은 T1R2-TMD 활성을 조절하는 제제의 라이브러리를 스크리닝하는데 매우 적합하다.
- <250> 분석은 분석 단계를 자동화하고, 임의 편리한 공급원으로부터의 화합물을 분석에 제공하여 대규모 화학 라이브러리를 스크리닝하는 것으로 설계되어 있으며, 이러한 분석은 전형적으로 평행식(예를들면 로보트 분석에서 마이크로적정 플레이트 상의 마이크로적정 포맷)으로 실시된다.
- <251> 다수의 유효한 조절물을 함유하는 조합적인 화합물 또는 펩타이드 라이브러리를 제공하는 것을 포함하는 고성능 스크리닝 방법으로 분석을 실시할 수 있다. 이어서, 상기 라이브러리는 상술된 활성을 보여 주는 그러한 라이브러리 제제(특히, 화학종 또는 아강)을 동정하기 위해 상술된 하나 이상의 분석에서 스크리닝된다. 따라서, 동정된 조절물은 직접적으로 사용되거나 또는 유도체를 제조하고 시험함으로써 추가의 조절물을 동정하는 선도 물질로서 작용할 수 있다.
- <252> 합성 화합물 라이브러리는 메이브리지 케미칼 컴파니(Maybridge Chemical Co.; 영국 콘월 트레빌레트), 콤지넥스(Congenex; 뉴저지 프린스턴), 브랜드 어쏘시에이트(Brandon Associates; 뉴햄프셔 메리마크) 및 마이크로소스(Microsource; 코네티컷 뉴 밀포드)를 비롯한 여러 회사로부터 상업적으로 입수할 수 있다.
- <253> 시험 제제의 라이브러리:
- <254> 조합적인 화합물 라이브러리는 시약과 같은 다수의 화합물 "기본 단위(building block)"들을 조합하여 화학적 합성 또는 생물학적 합성에 의해 생성된 다양한 화합물을 모아 놓은 것이다. 예를들면, 폴리펩타이드 라이브러리와 같은 선형 조합 화합물 라이브러리는 소정의 화합물의 길이(즉, 폴리펩타이드 화합물에서의 아미노산의 수)에서 모든 가능한 방식의 일련의 화합물 기본 단위(아미노산)를 조합함으로써 형성된다. 수백만의 화합물이 화합물 기본 단위의 조합적인 혼합을 통해 합성될 수 있다.
- <255> 희귀 화합물 라이브러리는 알드리치(Aldrich; 위스콘신 밀워키)로부터 입수할 수 있다.
- <256> 박테리아, 진균, 식물 및 동물 추출물 형태의 천연 화합물의 라이브러리는 예를들면 판 래보러토리스(Pan Laboratories; 워싱턴 보텔) 또는 미코서치(Mycosearch; 노스 캘리포니아)로부터 상업적으로 입수할 수 있거나, 또는 당해 기술 분야에 잘 공지된 방법에 의해 용이하게 제조할 수 있다. 부가적으로, 천연 및 합성적으로 생성된 라이브러리 및 화합물은 통상의 화학, 물리 및 생화학 수단에 의해 용이하게 변형된다.
- <257> 다른 라이브러리는 단백질/발현 라이브러리, 예를들면 식품, 식물, 동물, 박테리아를 포함하는 천연 공급원으로부터의 cDNA 라이브러리, 하나 이상의 폴리펩타이드의 불규칙적으로 또는 계통적으로 돌연변이된 변이체를 발현하는 라이브러리, 하나의 세포 또는 조직의 mRNA 함유물을 발현시키는데 사용된 바이러스성 벡터에서의 게놈 라이브러리를 포함한다.
- <258> 고성능 분석에서, 하루에 수천까지의 상이한 조절물 또는 리간드를 스크리닝하는 것이 가능하다. 특히, 마이크로적정 플레이트의 각각의 웰을 사용하여 선택된 유효한 조절물에 대한 별개의 분석을 실시할 수 있거나, 또는 농도 또는 배양 시간 효과가 관측되는 것이라면, 매 5 내지 10웰이 하나의 조절물을 시험할 수 있다. 따라서, 하

나의 표준 마이크로적정 플레이트에서는 약 100개의 조절물을 분석할 수 있다. 만일 1536개의 웰 플레이트가 사용되는 경우, 하나의 플레이트에서는 약 100 내지 약 1500개의 상이한 화합물을 용이하게 분석할 수 있다. 1 일 당 수 개의 상이한 플레이트를 분석할 수 있다; 따라서 약 6,000 내지 20,000개까지의 상이한 화합물에 대한 분석 스크린이 가능하다.

<259> 분석 방법에서 T1R2-TMD 조절 효과를 시험할 수 있는 시험 제제의 유형:

<260> 시험 제제는 소 화합물, 화학 중합체, 생물학적 중합체, 펩타이드, 단백질, 당, 탄수화물, 핵산 및 지질을 비롯한 임의 제제일 수 있다. 제제는 합성 화합물, 화합물의 혼합물, 천연 생산물 또는 천연 샘플, 예를들면 식물 추출물, 배양 상청액, 또는 조직 샘플일 수 있다.

<261> 감미 자극물질의 화합물 또는 단맛을 변형하는 화합물의 예로서, 테아사포닌(Theasaponin) E1, 아세설팜(Acesulfame) K, 알리탐(Alitame), 아스파르탐(Aspartame), CH 401, 둘신(Dulcin), 에리트리톨, 구아니딘 감미료, 아이소말트(Isomalt), 아이소말토실프럭토시드(Isomaltosylfructoside), 아이소라피노즈(Isoraffinose), NC 174, 네오탐(Neotame), 페닐아세틸글라이실-L-라이신, 사카린, SC 45647, 소디움 사이클라메이트, 소비톨, 슈크라로스, 슈크로논산(Sucronic Acid), 슈오산(Suosan), 슈퍼아스파르탐, 메틸 알파-L-아라비노시드, 메틸 베타-L-아라비노시드, 메틸 베타-D-글루코시드, 메틸 α-D-만노시드, 메틸 베타-L-자일로피라노시드, 메틸 알파-D-자일로시드, 메틸 알파-D-글루코시드 2,3-다이-트레오닌, 메틸 알파-D-글루코시드 2,3-다이-아이소루신, 프로토키테추산(Protocatechuic Acid), 사이나린(Cynarin), 글라이시필린(Glycyphyllin), 레바우다이오시드(Rebaudioside) C, 아브루소시드(Abrusoside) A, 아브루소시드 B, 아브루소시드 C, 아브루소시드 D, 아브루소시드 E, 아피오글라이시르히진(Apioglycyrrhizin), 아라보글라이시르히진(Araboglycyrrhizin), 바이유노시드(Baiyunoside), 브라제인, 브리우돌코시드(Bryodulcoside), 카르노시플로시드(Carnosifloside) V, 카르노시플로시드 VI, D. 콤민시(cumminsi), 사이클로카리오시드(Cyclocarioside) A, 사이클로카리오시드(Cyclocarioside) I, 둘코시드 A, 플루오렌-4-알파,6-다이카복실산, 4-베타,10-알파-다이메틸-1,2,3,4,5,10-헥사하이드로-가우다이차우다이오시드(Gaudichaudioside) A, 글라이시르히즈산(Glycyrrhizic Acid), 헤르난둘신(Hernandulcin), 4-베타-하이드록시-헤스페리딘-7-글루코시드 다이하이드로칼콘, 휴양퀴오시드(Huangqioid) E, 휴양퀴오시드 E, 3-하이드록시플로리드진, 캠프페롤, 2,3-다이하이드로-6-메톡시 3-O-아세테이트, 마빈린 말토실-알파-(1,6)-네오헤스페리딘 다이하이드로칼콘, 모그로시드(Mogroside) IIE, 모그로시드 III, 모그로시드 IIIE, 모그로시드 IV, 모그로시드 V, 11-옥소 모그로시드 V, 모나틴(Monatin), 모넨린, 모노암모늄 글라이시르히진에이트(Mag), 뮤쿠로지오시드 lib, 나링긴 다이하이드로칼콘, 네오아스틸빈, 네오헤스페리딘 다이하이드로칼콘 (NHDHC), 네오모그로시드, 오스라딘, 펜타딘, 페리안드린 I, 페리안드린 II, 페리안드린 III, 페리안드린 IV, 페리안드린 V, 플로미소시드(Phlomisoid) I, 플로리진(Phlorizin), 필로둘신(Phyllodulcin), 폴리포도시드(Polypodoside) A, 포타슘 마그네슘 칼슘 글라이시르히진, 프테로카리오시드 A, 프테로카리오시드 B, 쿼세틴(Quercetin), 2,3-다이하이드로-3-O-아세테이트, 쿼세틴, 2,3-다이하이드로-6-메톡시-쿼세틴, 2,3-다이하이드로-6-메톡시-3-O-아세테이트, 레바우다이오시드 A, 레바우다이오시드 B, 루버소시드(Rubusoside), 스칸데노시드(Scandenoside) R6, 시아메노시드(Siamenoside) I, 소디움 글라이시르히진에이트, 스테비올비오시드(Steviolbioside), 스테비오시드(Stevioside), 스테비오시드, 알파-글라이코실 수아비오시드 A, 수아비오시드 B, 수아비오시드 G, 수아비오시드 H, 수아비오시드 I, 수아비오시드 J, 타우마틴(Thaumatococin), 트라이암모늄 글라이시르히진에이트(TAG), 트릴로바틴 셀리구에아인(Trilobatin Selliguaein) A, 헤마톡실린(Haematoxylin), 말티톨(Maltitol), 만니톨, 메틸 알파-D-글루코시드 2,3-다이-아스파르트산, 벤조산, 2-(4-다이메틸아미노벤조일)-벤조산, 2-하이드록시-4-아미노메틸-벤조산, 2-(3-하이드록시-4-메톡시벤조일)-메틸 베타-D-프럭토시드, 메틸 알파-D-갈락토시드, 메틸 베타-D-갈락토시드, 큐르쿨린(Curculin), 스트로긴(Strogin) 1, 스트로긴 2, 스트로긴 4, 미라쿨린(Miraculin), 페닐아세트산, 3,4-다이메톡시-아미노벤조산, 3-아니스산, 벤질 알콜, 3-아미노-4-n-프로폭실, 3,4-카페산, 신남산, 다이하이드록시신남산, 2,4-페룰산, 가수분해된 구아검, 하이드록시아미노벤조산, 2,4-니케로울리코사카라이드, 사탕수수 찌꺼기 추출물, 다이하이드록시벤조산, 2,3-다이하이드록시벤조산, 2,4-코우마르산, p-다이하이드록시벤조산, 3,5-하이드록시벤조산, 3-구르마린, 짐네마사포닌(Gymnemasaponin) III, 짐네마사포닌 IV, 짐네마사포닌 V, 짐넨산(Gymnemic acid) I, 짐넨산 II, 짐넨산 III, 짐넨산 IV, 호둘신, 주주바사포닌(Jujubasaponin) II, 주주바사포닌 III, 프로피온산, (-)-2-(4-메톡시페녹시)-지피핀, 에틸 말톨, 말톨, 뷰탄산, 2-옥소-3-메틸-알라닌, N-(1-메틸-4-옥소-2-이미다졸린-2-일) 크레아티닌, 아브루소시드 E, 모노-메틸 에스터, 락티톨, 페리안드린산 I, 모노글루쿠로니드, 페리안드린산 II, 모노글라이쿠로니드, 자일리톨, 타가토스, d-벤조일옥시아세트산, 4-메톡시 호둘로시드 I, 4-나이트로페닐 α-D-갈락토시드, 4-나이트로페닐 알파-D-글루코시드, 4-나이트로페닐 베타-D-글루코시드, 4-나이트로페닐 알파-D-만노피라노시드, 유레아, (N-(4-시아노페닐)-N'-((소디오설포)메틸)-클로르암페니콜, 클로로젠산, 메틸 알파-D-글루코시드

드, 메틸 알파-D-글루코시드 2,3-다이-알라닌, 메틸 알파-D-글루코시드 2,3-다이-글라이신, 메틸 알파-D-글루코시드 2,3-다이-프로린, 메틸 알파-D-글루코시드 2,3-다이-발린, 아닐린, 2-뷰톡시-5-나이트로-아닐린, 2-에톡시-5-나이트로-아닐린, 2-메톡시-5-나이트로-아닐린, 3-나이트로-(+)-바이유놀-베타-D-글루코시드-알파-D-글루코시드, 아닐린, 1,3-하이드록시-4- 메톡시벤질아닐린, 2-프롭시-5-나이트로-(P4000)벤조-1,4-다이옥산 2-(3-하이드록시-4-메톡시페닐)-벤조-1,3-다이옥산-4-온 2-(3-하이드록시-4-메톡시페닐)-벤조산, 2-벤조일-4-메톡시-벤조산, 2-(4-메톡시벤조일)-벤조-1,3(4H)-자티안, 2-(3-하이드록시-4-메톡시페닐)-벤조-1,4-자티안 3-(3-하이드록시-4-메톡시페닐)-뷰탄산, 4-[3,5-다이하이드록시-4-[3-(3-하이드록시-4-메톡시페닐)-1-옥소프로필]페녹시]-2-하이드록시-모노소디움 염, 뷰탄산, 4-[3,5-다이하이드록시-4-[3-(3-하이드록시-4-메톡시페닐)-1-옥소프로필]페녹시]-3-옥소-모노소디움 염, 사이클로헥사다이엔-1,4 1-카복스알데하이드-4-(메톡시메틸)-, (E)옥심 에틸 벤젠, 베타-(1,3-하이드록시-4-메톡시벤질)-헤스페르틴 다이하이드로칼콘, 3'-카복시-헤스페르틴 다이하이드로칼콘, 3'-폼일-아이소코우마린, 3,4-다이하이드로-3-(3-하이드록시-4-메톡시)-페틸라틴, 8,9-에폭시-페닐 3-하이드록시-4-메톡시벤질 에터, 포스폰산, [3-[3,5-다이하이드록시-4-[3-(3-하이드록시-4-메톡시페닐)-1-옥소프로필]페녹시]프로필]모노포타슘 염, 스테비오시드 유사물, 설팜산, [2-[3,5-다이하이드록시-4-[3-(3-하이드록시-4-메톡시페닐)-1-옥소프로필]페녹시]에틸]-모노포타슘 염, 유레아, 및 N-(4-시아노페닐)-N'-(2-카복시에틸)-L-테아닌을 열거할 수 있다.

<262> 동정된 감미 자극물질은 예를들면 단맛의 감각을 발휘할 수 있는 인공 감미료를 포함할 수 있다. 이것들은 당 화합물을 대체하여 예를들면 칼로리를 감소시키거나 또는 치아의 건강에 더욱 도움이 되는 소비재를 제공하도록 사용되는 경우 특히 관심이 되고 있다. 소비재는 식품, 음료, 경구 위생 제품, 및 이러한 제품의 혼합을 위한 조성물, 특히 향미 조성물을 포함한다. 향미 조성물은 가공동안 가공된 식품 또는 음료에 첨가될 수 있거나, 또는 이것들은 실질적으로 그 자체의 소비재, 예를들면 소스 등과 같은 양념일 수 있다. 감미 자극물질은 과자류 및 디저트를 비롯한 다른 단맛 소비재 뿐만 아니라 짠맛 및 단맛-신맛 소비재에서 특히 관심이 되고 있다. 소비재의 예로서 과자류 제품, 케익, 시리얼 제품, 제과류 제품, 빵 제품, 김, 추잉검, 소스(양념), 스프, 가공된 식품, 조리된 과일 및 식물성 제품, 육류 및 육류 제품, 계란 제품, 우유 및 유제품, 치즈 제품, 버터 및 버터 대용 제품, 우유 대용 제품, 콩 제품, 식용 오일 및 지방 제품, 의약품, 음료, 알콜 음료, 맥주, 소프트 드링크, 식품 추출물, 식물성 추출물, 육류 추출물, 양념, 감미료, 기능성 식품, 의료 및 비의료성 검, 정제, 로젠지, 드립, 유화제, 엘릭시르, 시럽, 및 음료, 인스턴트 음료 및 발포정을 제조하는 다른 체제를 포함한다.

<263> T1R2-TMD 서열

<264> 본 서열은 본원의 하기 서열 목록에 기재되어 있다. 서열 식별 번호: 1은 T1R2-TMD 수용체를 암호화하는 뉴클레오타이드/핵산 서열에 대응하고, 서열 식별 번호: 2는 T1R2-TMD 수용체 단백질의 폴리펩타이드/아미노산 서열에 대응한다.

<265> 감염된 구조체에서, SST TAG(서열 식별 번호: 3)에 이어서 신규한 T1R2-TMD(서열 식별 번호: 1)에 대해 암호화하는 핵산이 따르고, 이어서 HSV TAG 핵산(서열 식별 번호: 5)이 따른다.

<266> 따라서, 생성된 단백질은 다음과 같이 나타낸 순서의 아미노산을 포함한다: 서열 식별 번호: 4, 서열 식별 번호: 2 및 서열 식별 번호: 6의 아미노산.

<267> 서열 식별 번호: 1+2: T1R2-TMD 핵산 및 단백질;

<268> 서열 식별 번호: 3+4: SST TAG 핵산 및 단백질;

<269> 서열 식별 번호: 5+6: HSV TAG 핵산 및 단백질;

<270> 서열 식별 번호: 7+8: T1R2-TMD 벡터 구조체에 대한 순방향 프라이머 및 역방향 프라이머;

<271> 서열 식별 번호: 9+10: T1R2 전장(핵산 및 단백질);

<272> 서열 식별 번호: 11+12: T1R3 전장(핵산 및 단백질).

<273> 상술된 방법을 예시하는 일련의 실시예가 하기에 기술된다. 하기 실시예는 단지 예시적인 것으로 어떠한 방식으로든 상기 방법 또는 키트를 제한하는 것으로 해석되어서는 않된다.

실시예

<274> 모든 실시예는 인간의 수용체를 사용하고 있다.

- <275> 실시예 1
- <276> Fluo-4 칼슘 분석
- <277> Fluo-4는 세포내 칼슘 대한 형광 지시자이며, 이것은 칼슘 농도의 변화, 특히 리간드(예를 들면, 페틸라틴 또는 메틸 차비콜)의 첨가 후 발생하는 수용체 활성화에 반응한 농도의 증가를 측정하는 것이다.
- <278> G 알파 16-구스트듀신 44를 안정하게 발현시키고 실시예 3에 기술된 바에 따라 T1R2-TMD로 감염된 HEK293 세포를 숙주 세포로서 사용하였다.
- <279> 흑색의 깨끗한 바닥을 갖는 96-웰 플레이트를 모든 분석에서 사용하였다. 분석 전날에 이것들을 웰당 8500의 감염 세포수로 시드화시키고, 사용된 세포에 적절한 성장 배지에서 밤새 37°C로 유지시켰다. HEK293 세포를 위해, 높은 글루코스, L-글루타민, 피록시딘 하이드로클로라이드를 함유하고, 10% 우태 혈청으로 보충된 돌베코 개정 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle medium)를 HEK293 세포의 성장 및 유지를 위해 사용하였다.
- <280> 분석할 때, 성장 배지를 제거하고, 세포들을 C1 완충액에 용해된 1.5 μM Fluo-4 AM(몰레클러 프로브(상표명), 인비트로젠(미국)) 및 2.5 μM의 프로베니시드(시그마-알드리치(Sigma-Aldrich))로 구성되는 50 μl의 칼슘 분석 용액과 함께 1시간 동안(37°C 온도의 암소에서) 배양시켰다. C1 완충액은 130mM NaCl, 5mM KCl, 10mM 헤페스, 2mM CaCl₂ 및 10mM 글루코스(pH 7.4)를 함유한다.
- <281> 처음 1 시간 동안의 부하 후, 자동화 플레이트 세척기(바이오 텍(Bio Tek))를 사용하여 웰당 100 μl의 C1 완충액으로 5번 플레이트를 세척하고, 세척 후 플레이트를 실온의 암소에서 30분 동안 추가적으로 배양시켜 Fluo-4-AM의 완전한 탈에스터화를 실시하였다. 완충액을 제거하고, 플레이트를 100 μl C1 세척 완충액으로 5번 세척하고, 최종적으로 세포를 180 μl의 C1 세척 완충액에서 재구성하였다.
- <282> 분석 판독을 위하여, 플레이트를 FLIPR(형광 이미징 플레이트 판독기; fluorescence imaging plate reader(FLIPR-Tetra, 몰레클러 디바이스즈))에 위치시키고, 10배로 농축된 리간드 원료 용액 20 μl를 첨가한 후 수용체의 활성화를 개시하였다.
- <283> 리간드의 첨가 전의 15초 동안 및 리간드의 첨가 후 105초 동안 형광을 계속하여 모니터링하였다(45 내지 105초가 충분할 수 있다).
- <284> 수용체의 활성화를 비교 형광 단위(RFU)로 주어지며, 하기 수학적 2에 의해 정의된다:
- <285> 수학적 2
- <286> 형광 증가 = 최대 형광 - 기준 형광
- <287> 상기 식에서, 기준 형광은 리간드의 첨가 전 처음 10 내지 15초 동안 계산된 형광 평균치를 의미한다.
- <288> 음성 대조군으로서, 감염을 가장한 세포들을 동일 농도의 리간드에 노출시키고, 신호에 대응하지 않는 미량 칼슘의 농도를 측정하였다.
- <289> 활성화된 수용체를 갖는 세포들은 상기 음성 대조군보다 상당히 큰 신호(RFU)에 의해 동정되었다.
- <290> 실시예 2
- <291> T1R2-TMD 벡터 구조체의 제조
- <292> Pfu 폴리머라제(인비트로젠)를 사용하는 PCR를 이용하여 하기 기재된 특이적 프라이머를 사용하는 T1R2-TMD 구조체를 발생시켰다:
- <293> T1R2-TMD 순방향 프라이머:
- <294> 5'-TAT AGA ATT CGC ACC CAC CAT CGC TGT GGC C-3'
- <295> T1R2-TMD 역방향 프라이머:
- <296> 5'-ATA TGC GGC CGC AGT CCC TCC TCA TGG T-3'
- <297> PCR 증폭을 위한 주형은 인간 버섯 유두 미각 조직으로부터 발생된 cDNA 라이브러리로부터 단리된 인간 T1R2에 대한 전장 cDNA이다. 반응 파라미터는 5분간의 94°C에 이은 45초간의 94°C, 15초간의 54°C 및 1분간의 68°C의 35주기 후에 10분간의 68°C의 최종 연장 주기이다.

<298> 생성된 핵산 단편(서열 식별 번호: 1 비교)을 겔 전기영동에 의해 분리하고, 정제하고, pCR-Topo-II 벡터(인비트로젠)로 서브클론하고, 생성된 클론을 DNA 서열분석에 의해 확인하여 PCR 증폭으로부터 발생한 돌연변이체가 부재함을 확실하게 하였다. 서열분석 후에, T1R2-TMD 삽입물을, pcDNA4-TO(인비트로젠)를 기초로 하는 발현 카세트로 서브클론하였다. 클로닝 카세트는 형질전환 유전자(transgene)의 세포 표면 막 표적화를 촉진하도록 N-말단에서 래트 소마토스타틴 유형 3 수용체의 제 1의 45개의 아미노산을 미리 함유하였다(부페(Bufe) 등의 문헌 [Nat Genet, 32(3), 397-401, 2002]에 기재됨). 이러한 벡터의 C-말단은 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 당단백질 D 에피토프를 암호화하고, 이는 상기 에피토프에 결합하는 특이적 항체를 이용하는 면역세포화학 연구에 사용될 수 있다. 생성된 벡터 구조체는 서열 식별 번호: 4(래트 소마토스타틴의 45개의 아미노산)에 앞서고 6(HSV 에피토프)(C 말단 방향에 대한 아미노 말단에서)이 뒤를 잇는 서열 식별 번호: 2(T1R2-TMD)의 결합된 아미노산 서열의 T1R2-TMD 단백질의 발현을 허용한다.

<299> 실시예 3

<300> 세포, 즉 T1R2-TMD 및 G16구스트44를 안정하게 발현하는 세포로의 T1R2-TMD의 감염

<301> hT1R2-TMD(실시예 2에서 기재된 바와 같이 형성됨)를 함유하는 선형화된 pCDNA 4-TO 벡터(인비트로젠)를 G16구스트44 발현 세포주(국제 특허 출원 공개 제 WO2004/055048 호에 기재된 바와 같이 형성됨)로 감염시킴으로써 인간 T1R2-TMD를 안정하게 발현하는 인간 세포주를 발생시켰다. 이러한 세포주는 미각 수용체에의 연결이 강화된 것으로 보였으며, 테트라사이클린 유도성이며, 안정하게 G16구스트44 뒤섞인 G-단백질을 발현하고, HEK-293-T-Rex 세포주(미국 소재의 인비트로젠으로부터 시판됨)를 기반으로 한다.

<302> 감염은 다음과 같이 수행하였다:

<303> 0일째, HEK293T/G16구스트44세포를 웰 당 900,000 세포의 밀도에서 6-웰 흑색의 깨끗한 바닥을 갖는 플레이트에 평판배양하고 선택적인 성장 배지에서 밤새 성장시켰다.

<304> 1일째, 배지를 항생제-부재 및 혈청-부재 성장 배지로 바꾸고, 세포를 선형화된 T1R2 TMD 벡터 구조체 DNA 4 μ g 및 리포펙타민 2000(인비트로젠) 0.3 l 를 사용하여 감염시켰다. 리포펙타민/DNA 혼합물을 3 내지 4시간 동안 세포상에서 배양한 후, 항생제-부재, 혈청-함유 성장 배지로 교환하였다. 24시간 후에, 세포를 37°C에서 10% FBS, 0.005mg/ml 블라스티시딘, 0.36mg/ml G418 및 0.1mg/ml 제오신(zeocin)(인비보젠(Invivogen))이 보충된 DMEM을 함유하는 선택적인 배지에서 다시 평판배양하였다. 2 내지 4주 후에, 제오신-내성 콜로니를 선택하고, 증량시키고, 50M 페틸라틴에 대한 반응을 위해 실시예 1에 기재된 바와 같이 칼슘 이미징에 의해 시험하였다.

<305> 내성 콜로니를 증량시키고, 50 μ M 페틸라틴에 대한 반응에 의해 T1R2-TMD를 함유하는 것으로서 동정되었으며, 이는 10 μ g/ml 테트라사이클린에 의한 T1R2-TMD 발현의 유도가 뒤따르는 실시예 1에 기재된 방법을 사용하여 FLIPR-테트라 계측기(몰레큘러 디바이스즈) 상에서 자동화된 형광계 이미징에 의해 결정되었다.

<306> 또한, 테트라사이클린 유도의 부재 하에 50 μ M 페틸라틴의 기능성 반응에 대하여 모든 잠재성 클론을 평가하여 기본적으로는 낮은 수준으로 발현하지만 기능적으로는 충분한 수준의 T1R2-TMD 수용체인 임의의 클론을 동정하였다(테트라사이클린-조절된 시스템, 예컨대 T-Rex HEK-293(인비트로젠)은 시스템의 고유 누설로 인해 형질전환 유전자의 기본 발현이 낮은 수준인 것으로 공지되어 있다).

<307> 이러한 평가 결과, 이들 세포주가 페틸라틴에 노출되는 경우 다수의 세포 클론은 음성 대조군(오직 G16구스트44 뒤섞인 G-단백질을 발현하고 T1R2-TMD를 발현하지 않는 세포)의 신호와 비교하여 신호의 10배보다 큰 형광의 상당한 증가와 함께 이러한 자극에 반응하는 것으로 결정되었다.

<308> 신호는 T1R2-TMD의 과발현을 유도하도록 테트라사이클린으로 처리된 세포에서 상당히 낮았다.

<309> 테트라사이클린-유도된 T1R2-TMD 세포에서의 반응의 결핍은 T1R2-TMD의 테트라사이클린-유도된 과발현으로부터 발생한 세포 독성에 기인하는 것일 수 있다.

<310>

	평균[RFU]	STD[RFU]
T1R2-TMD/G16구스트44	973.06	69.48
오직 G16구스트44 (음성 대조군)	73.78	55.43

<311> 실시예 4

- <312> T1R2/T1R3 감미 수용체 헤테로이량체 및 G16구스트44를 안정하게 발현하는 세포의 감염
- <313> T1R3은 테트라사이클린-조절된 T1R2의 존재 하에 구성적으로 과발현되어 두 단백질의 구성적 과발현의 가능한 세포독성 효과를 방지한다. 테트라사이클린-조절된 벡터 중에 헤테로이량체(T1R2)의 하나의 서브유니트를 배치하는 것은 안정한 클론 주의 생존력 및 기능성이 그에 따라 최적화될 수 있도록 그의 발현 수준을 조절하게 한다.
- <314> 인간 T1R3을 함유하는 선형화된 pIRES-Puro 벡터(클론테크)를 G16구스트44 발현 세포주(국제 특허 출원 공개 제 W02004/055048 호에 기재된 바와 같이 형성됨)로 먼저 감염시킴으로써 인간 T1R2/T1R3 감미 헤테로이량체를 안정하게 발현하는 인간 세포주를 발생시켰다. 이러한 세포주는 미각 수용체와의 연결이 강화된 것으로 보였으며, 테트라사이클린 유도성이며, 안정하게 G16구스트44 뒤섞인 G-단백질을 발현하고, HEK-293-T-Rex 세포주(미국 소재의 인비트로젠으로부터 시판됨)를 기반으로 한다. T1R3을 안정하게 발현하는 세포의 불균질 집단의 발생 후에, 인간 T1R2 cDNA를 함유하는 선형화된 pcDNA4-TO 벡터(인비트로젠)를 감염시켰다.
- <315> 24시간 후에, 세포를 37°C에서 10% FBS, 0.005mg/ml 블라스티시딘, 0.36mg/ml G418 및 0.4µg/ml 푸로마이신이 보충된 글루타막스(Glutamax) DMEM(인비트로젠)을 함유하는 선택적인 배지에서 1:150,000 이하의 10배 희석 하에 다시 평판배양하였다. 2주 후에, 이어서 T1R3-발현 세포의 푸로마이신-내성 불균질 집단을 선형화된 T1R2 벡터 구조체 DNA 4µg 및 리포펙타민 2000(인비트로젠) 0.3 l 로 감염시켰다. 리포펙타민/DNA 혼합물을 3 내지 4 시간 동안 세포상에서 배양한 후, 항생제-부재, 혈청-함유 성장 배지로 교환하였다. 24시간 후에, 세포를 37°C에서 10% FBS, 0.005mg/ml 블라스티시딘, 0.36mg/ml G418, 0.4g/ml 푸로마이신 및 0.1mg/ml 제오신이 보충된 글루타막스 DMEM을 함유하는 선택적인 배지에서 다시 평판배양하였다.
- <316> 내성 콜로니를 증량시키고, 자당, 슈크라로스, 아스파르탐 및 아세실팜 K를 비롯한 다양한 감미료 화합물에 대한 그들의 반응에 의해 T1R2/T1R3 감미 헤테로이량체를 함유하는 것으로서 동정되었으며, 이는 실시예 1에 기재된 방법을 사용하여 FLIPR-테트라 계측기(몰레큘러 디바이시스) 상에서 자동화된 형광계 이미징에 의해 결정하였다. 또한, (T1R2의 과발현을 유도하기 위한) 테트라사이클린 10µg/ml의 존재 및 테트라사이클린 유도의 부재 하에 감미 자극물질에 대한 기능성 반응에 대하여 모든 잠재성 클론을 평가하여 기본적으로는 낮은 수준으로 발현하지만 T1R3과의 조립을 허용하여 기능성 감미 헤테로이량체 착체를 생성시키기에 충분한 T1R2 수용체의 발현인 임의의 클론을 동정하였다(테트라사이클린-조절된 시스템, 예컨대 T-Rex HEK-293(인비트로젠)은 시스템의 고유 누설로 인해 형질전환 유전자의 기본 발현이 낮은 수준인 것으로 공지되어 있다).
- <317> 이러한 평가 결과, 테트라사이클린으로 처리되지 않은 이들 세포주가 감미 자극물질에 노출되는 경우 다수의 세포 클론은 형광의 상당한 증가(음성 대조군에서의 신호 10배보다 큼)와 함께 이러한 자극에 반응하는 것으로 결정되었다.
- <318> 신호는 T1R2의 과발현을 유도하도록 테트라사이클린으로 처리된 세포에서 낮았다. 테트라사이클린-유도된 T1R2/T1R3 세포에서의 낮은 반응은 T1R2의 테트라사이클린-유도된 과발현으로부터 발생한 세포 독성에 기인하는 것일 수 있다. 감미 자극물질에 대한 가장 큰 반응을 보이는 하나의 클론 세포주는 증식되었고 T1R2-TMD 안정한 세포주에 대한 연이은 비교를 위해 사용하였다.
- <319> 실시예 5
- <320> T1R2-TMD 작용물질로서의 페틸라틴의 동정
- <321> 사용되는 세포는 G16구스트44를 안정하게 발현하고 T1R2-TMD에 의해 안정하게 감염된 HEK293T 세포이며, 이는 실시예 3에 기재된 바와 같이 형성되었다.
- <322> 50 µM 페틸라틴에 대한 세포내 칼슘 반응을 결정하였다.
- <323> 세포를 8500세포/웰의 밀도에서 흑색의 깨끗한 바닥을 갖는 플레이트(코스타(Costar))에 평판배양하고 실시예 1에 기재된 바와 같이 수용체 활성을 결정하기 전에 48시간 동안 선택적인 성장 배지(실시예 3에 기재됨)에서 유지하였다.
- <324> 선택된 특정한 클론이 이미 기본적으로 충분한 수준의 T1R2-TMD를 발현하여 리간드 자극이 따르는 세포내 칼슘의 뚜렷한 증가를 발생시키기 때문에 세포는 테트라사이클린으로 유도되지 않는다.
- <325> 실시예 1에 기재된 바와 같이 데이터를 계산하였고, 50 µM 페틸라틴과 세포의 자극에 이어서 기준선에 대한 형광의 순 증가를 설명하였다. 데이터는 6번의 반복 실험의 평균 ± 표준 편차를 나타낸다.

<326> 인간 T1R2-TMD를 안정하게 발현하는 세포에서 페틸라틴에 의한 자극 시에 칼슘 신호의 상당한 증가가 관찰되었지만, 음성 대조군(오직 G16구스트44 키메라성 G-단백질만을 발현하는 숙주 세포)에서는 그렇지 않았다.

<327>

	평균[RFU]	STD[RFU]
T1R2-TMD/G16구스트44	973.06	69.48
오직 G16구스트44 (음성 대조군)	73.78	55.43

<328> 실시예 6

<329> 페틸라틴에 대한 T1R2-TMD 단일체 및 T1R2/T1R3 헤테로이량체의 투여량 반응 곡선

<330> 본 방법은 T1R2-TMD 활성의 양을 평가하고, 예컨대 감미 자극물질을 포함한 동정된 조절물의 효능을 예측하게 한다.

<331> G16구스트44 및 T1R2-TMD(실시예 3에 기재된 바와 같이 형성됨)를 안정하게 발현하는 HEK293T 세포를 칼슘 염료 Fluo-4로 부하시키고, 페틸라틴에 대한 이들의 반응을 실시예 1에 기재된 형광성 칼슘 신호를 사용하여 측정하였다. 데이터를 실시예 1에 기재된 바와 같이 계산하였다(0.1 내지 200마이크로몰 범위에 대한 페틸라틴의 투여량 증가에 따른 세포의 자극이 따르는 기준선에 대한 형광의 순 증가). 데이터는 3번의 반복 실험의 평균 ± 표준 편차(STD)를 포함한다.

<332> 생체내 관련성을 확인하기 위해, T1R2-TMD 발현 세포에서 페틸라틴에 의해 유도된 신호의 투여량-반응 곡선을 T1R2/T1R3 헤테로이량체를 안정하게 발현하는 세포에서 획득된 신호와 비교하였다. 두가지 투여량-반응 곡선이 밀접하게 일치함을 발견하였다(도 1 참조).

<333> 결과를 하기 표에 제시하였고, 투여량-반응 곡선을 도 1에 도시하였다. 표에서의 데이터는 하기 수학적 3과 같이 4-파라미터의 로지스틱 비선형 회귀 방정식을 사용하는 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 소프트웨어 패키지(그래프패드 소프트웨어 인코포레이티드(GraphPad Software, Inc.))를 사용하여 곡선-일치시켰다:

수학적 3

<334> $Y = \text{바닥} + (\text{상부} - \text{바닥}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50}-X) \cdot \text{힐}(\text{Hil}))})$ 경사)

<335> 상기 식에서,

<336> X는 농도의 로그이고, Y는 반응이며, Y는 바닥에서 시작하여 s자 모양으로 상부로 간다.

<337> 최대 반응의 50%를 유도하는 작용물질 농도를 나타내고 수용체 민감성의 지표인 상기 데이터로부터의 EC50 값(보다 낮은 EC50 값은 작용물질에 대해 민감성이 보다 높음을 나타낸다)을 회귀 분석으로부터 계산하였다.

<338> T1R2-TMD에 대해 계산된 EC50 값은 6.2마이크로몰이고, T1R2/T1R3 헤테로이량체는 3.5마이크로몰이다.

<339> 동일한 민감성 범위 내의 유사한 투여량-반응 및 유사한 EC50은 T1R2-TMD가 생물학적 관련 수용체임을 나타낸다.

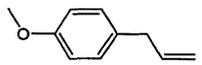
<340>

T1R2-TMD		T1R2/T1R3 헤테로이량체	
평균[RFU]	STD[RFU]	평균[RFU]	STD[RFU]
1093.24	64.88	929.14	68.45
1019.61	68.83	902.95	82.16
1010.79	73.23	874.83	87.04
953.94	63.83	840.69	87.40
768.43	84.59	730.81	54.59
489.68	45.02	735.04	100.86
399.58	119.53	385.13	24.38
178.86	68.37	140.21	38.04
61.96	7.16	45.33	3.76
20.53	4.77	15.15	7.73

33.09	7.03	28.38	7.75
18.18	2.70	14.90	2.53

- <341> 실시예 7
- <342> T1R2-TMD를 활성화시키지만 T1R2/T1R3 헤테로이량체는 활성화시키지 않는 화합물의 동정
- <343> 실시예 1에 기재된 칼슘 플럭스 분석을 사용하여, 88개의 시험 제제의 패널을 T1R2-TMD 수용체-의존성 반응에 대해서 평가하였다.
- <344> 시험 제제를 100마이크로몰의 최종 농도에서 2번씩 시험하였다.
- <345> G16구스트44 및 T1R2-TMD 함유 세포(실시예 3에 기재된 바와 같이 형성됨)를 안정하게 발현하는 세포에서의 시험 제제에 의해 유도된 신호를 G16구스트44 및 T1R2/T1R3 헤테로이량체를 안정하게 발현하는 세포(실시예 4에 기재된 바와 같이 형성됨)에서 취득된 신호와 비교하였고, 음성 대조군으로서 G16구스트44를 안정하게 발현하는 세포를 사용하였다.
- <346> 데이터를 실시예 1에 기재된 바와 같이 계산하였고(시험 작용물질에 따른 세포의 자극이 따르는 기준선에 대한 형광의 순 증가), T1R2-TMD를 강하게 활성화시켰지만 T1R2/T1R3 헤테로이량체 또는 음성 대조군의 활성화를 거의 유도하지 않거나 전혀 유도하지 않는 동정된 제제에 대한 칼슘 신호의 결과를 하기 표에 제시하였다. 데이터는 하나의 대표적인 실험으로부터 2번의 반복의 평균치에 상응하며, 이는 후속 시험에 의해 확인되었다.
- <347> 하기 표에 나타난 동정된 화합물에 대해서, 칼슘 신호의 상당한 증가는 T1R2-TMD를 안정하게 발현하는 세포에서 상기 화합물에 의한 자극시에 관찰되었다.
- <348> T1R2/T1R3 헤테로이량체를 발현하는 세포는 상기 음성 대조군보다 현저하게 높은 신호가 없는 것으로 보였다.
- <349> 이 결과는 T1R2-TMD가 T1R2/T1R3 헤테로이량체를 활성화시키지 않는 화합물에 의해 활성화되고, 따라서, T1R2-TMD 단일체를 기초로 하는 분석이, T1R3의 존재하에 수행되고 T1R2/T1R3 헤테로이량체를 기초로 하는 분석을 사용하여 동정될 수 없는 조절물을 동정하는데 도움이 됨을 보여준다.
- <350> 메틸 차비콜(FEMA # 2411, 이스트라골(Estragole); p-메톡시알릴벤젠)은 단 맛을 갖는 것으로 기재된 공지된 향미제이며, 상기 맛은 다음과 같이 묘사된다: 10ppm에서 "단맛의, 풀 같은, 아니스-펜넬 향", "단맛의, 페놀성, 아니스, 거친, 향신료의, 그린, 풀 같은, 민트의" 향 및 "단맛의, 감초, 페놀성, 잡초의, 향신료의, 셀러리-같은" 맛.

<351>

메틸 차비콜	T1R2 TMD[RFU]	T1R2/T1R3[RFU]	음성 대조군[RFU]
	7372.615	777.765	732.195

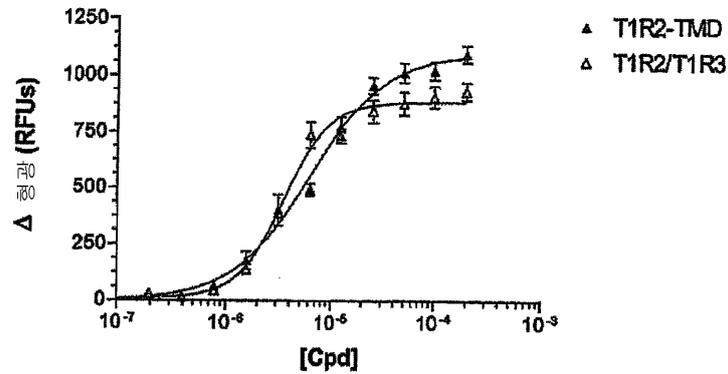
<352> 감미 수용체 단백질, 핵산, 방법 및 키트가 특정의 예시적인 실시양태와 결부하여 상기에 기재되어 있지만, 다른 유사한 실시양태가 사용될 수 있고, 동일한 기능을 수행하기 위해 기재된 실시양태에 변경 및 부가가 이루어질 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 추가적으로, 다양한 실시양태가 목적하는 특성을 제공하도록 조합될 수 있으므로 기재된 모든 실시양태가 반드시 대안적인 필요는 없다. 당해 기술 분야의 통상의 기술을 가진 자들은 본 기재의 진의 및 범위로부터 벗어남이 없이 여러 변경을 실시할 수 있다. 그러므로, 본 방법 및 키트는 어떤 하나의 실시양태로 한정되어서는 않되며, 첨부된 청구범위의 기재에 따라 폭과 범위가 해석되어야 한다.

도면의 간단한 설명

<80> 도 1은 T1R2-TMD 단일체(채워진 삼각형) 및 T1R2/T1R3 헤테로이량체(채워지지 않은 삼각형)의 투여량-반응 곡선이다.

도면

도면1



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Givaudan SA

Slack, Jay Patrick

<120> Nucleic acid, polypeptide and its use

<130> 30239/PCT

<140> PCT/CH2007/000186

<141> 2007-04-19

<150> US 60/793,521

<151> 2006-04-20

<160> 12

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 828

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(828)

<400> 1
 gca ccc acc atc gct gtg gcc ctg ctg gcc gcc ctg ggc ttc ctc agc 48
 Ala Pro Thr Ile Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Leu Gly Phe Leu Ser
 1 5 10 15

acc ctg gcc atc ctg gtg ata ttc tgg agg cac ttc cag aca ccc ata 96
 Thr Leu Ala Ile Leu Val Ile Phe Trp Arg His Phe Gln Thr Pro Ile
 20 25 30

gtt cgc tcg gct ggg gcc ccc atg tgc ttc ctg atg ctg aca ctg ctg 144
 Val Arg Ser Ala Gly Gly Pro Met Cys Phe Leu Met Leu Thr Leu Leu
 35 40 45

ctg gtg gca tac atg gtg gtc ccg gtg tac gtg ggg ccg ccc aag gtc 192
 Leu Val Ala Tyr Met Val Val Pro Val Tyr Val Gly Pro Pro Lys Val
 50 55 60

tcc acc tgc ctc tgc cgc cag gcc ctc ttt ccc ctc tgc ttc aca att 240
 Ser Thr Cys Leu Cys Arg Gln Ala Leu Phe Pro Leu Cys Phe Thr Ile
 65 70 75 80

tgc atc tcc tgt atc gcc gtg cgt tct ttc cag atc gtc tgc gcc ttc 288
 Cys Ile Ser Cys Ile Ala Val Arg Ser Phe Gln Ile Val Cys Ala Phe
 85 90 95

aag atg gcc agc cgc ttc cca cgc gcc tac agc tac tgg gtc cgc tac 336
 Lys Met Ala Ser Arg Phe Pro Arg Ala Tyr Ser Tyr Trp Val Arg Tyr
 100 105 110

cag ggg ccc tac gtc tct atg gca ttt atc acg gta ctc aaa atg gtc 384
 Gln Gly Pro Tyr Val Ser Met Ala Phe Ile Thr Val Leu Lys Met Val
 115 120 125

att gtg gta att ggc atg ctg gcc acg ggc ctc agt ccc acc acc cgt 432
 Ile Val Val Ile Gly Met Leu Ala Thr Gly Leu Ser Pro Thr Thr Arg
 130 135 140

act gac ccc gat gac ccc aag atc aca att gtc tcc tgt aac ccc aac 480
 Thr Asp Pro Asp Asp Pro Lys Ile Thr Ile Val Ser Cys Asn Pro Asn
 145 150 155 160

tac cgc aac agc ctg ctg ttc aac acc agc ctg gac ctg ctg ctc tca 528
 Tyr Arg Asn Ser Leu Leu Phe Asn Thr Ser Leu Asp Leu Leu Leu Ser

165	170	175	
gtg gtg ggt ttc agc ttc gcc tac atg ggc aaa gag ctg ccc acc aac Val Val Gly Phe Ser Phe Ala Tyr Met Gly Lys Glu Leu Pro Thr Asn			576
180	185	190	
tac aac gag gcc aag ttc atc acc ctc agc atg acc ttc tat ttc acc Tyr Asn Glu Ala Lys Phe Ile Thr Leu Ser Met Thr Phe Tyr Phe Thr			624
195	200	205	
tca tct gtc tcc ctc tgc acc ttc atg tct gcc tac agc ggg gtg ctg Ser Ser Val Ser Leu Cys Thr Phe Met Ser Ala Tyr Ser Gly Val Leu			672
210	215	220	
gtc acc atc gtg gac ctc ttg gtc act gtg ctc aac ctc ctg gcc atc Val Thr Ile Val Asp Leu Leu Val Thr Val Leu Asn Leu Leu Ala Ile			720
225	230	235	240
agc ctg ggc tac ttc ggc ccc aag tgc tac atg atc ctc ttc tac ccg Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Pro Lys Cys Tyr Met Ile Leu Phe Tyr Pro			768
245	250	255	
gag cgc aac acg ccc gcc tac ttc aac agc atg atc cag ggc tac acc Glu Arg Asn Thr Pro Ala Tyr Phe Asn Ser Met Ile Gln Gly Tyr Thr			816
260	265	270	
atg agg agg gac Met Arg Arg Asp			828
275			
<210> 2 <211> 276 <212> PRT <213> Homo sapiens			
<400> 2			
Ala Pro Thr Ile Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Leu Gly Phe Leu Ser			
1	5	10	15
Thr Leu Ala Ile Leu Val Ile Phe Trp Arg His Phe Gln Thr Pro Ile			
	20	25	30

Val Arg Ser Ala Gly Gly Pro Met Cys Phe Leu Met Leu Thr Leu Leu
 35 40 45

Leu Val Ala Tyr Met Val Val Pro Val Tyr Val Gly Pro Pro Lys Val
 50 55 60

Ser Thr Cys Leu Cys Arg Gln Ala Leu Phe Pro Leu Cys Phe Thr Ile
 65 70 75 80

Cys Ile Ser Cys Ile Ala Val Arg Ser Phe Gln Ile Val Cys Ala Phe
 85 90 95

Lys Met Ala Ser Arg Phe Pro Arg Ala Tyr Ser Tyr Trp Val Arg Tyr
 100 105 110

Gln Gly Pro Tyr Val Ser Met Ala Phe Ile Thr Val Leu Lys Met Val
 115 120 125

Ile Val Val Ile Gly Met Leu Ala Thr Gly Leu Ser Pro Thr Thr Arg
 130 135 140

Thr Asp Pro Asp Asp Pro Lys Ile Thr Ile Val Ser Cys Asn Pro Asn
 145 150 155 160

Tyr Arg Asn Ser Leu Leu Phe Asn Thr Ser Leu Asp Leu Leu Leu Ser
 165 170 175

Val Val Gly Phe Ser Phe Ala Tyr Met Gly Lys Glu Leu Pro Thr Asn
 180 185 190

Tyr Asn Glu Ala Lys Phe Ile Thr Leu Ser Met Thr Phe Tyr Phe Thr
 195 200 205

Ser Ser Val Ser Leu Cys Thr Phe Met Ser Ala Tyr Ser Gly Val Leu

210

215

220

Val Thr Ile Val Asp Leu Leu Val Thr Val Leu Asn Leu Leu Ala Ile
 225 230 235 240

Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Pro Lys Cys Tyr Met Ile Leu Phe Tyr Pro
 245 250 255

Glu Arg Asn Thr Pro Ala Tyr Phe Asn Ser Met Ile Gln Gly Tyr Thr
 260 265 270

Met Arg Arg Asp
 275

<210> 3
 <211> 144
 <212> DNA
 <213> rat

<220>
 <221> CDS
 <222> (4)..(144)

<400> 3
 acc atg gcc gct gtt acc tat cct tca tcc gtg cct acg acc ttg gac 48
 Met Ala Ala Val Thr Tyr Pro Ser Ser Val Pro Thr Thr Leu Asp
 1 5 10 15

cct ggg aat gca tcc tca gcc tgg ccc ctg gac acg tcc ctg ggg aat 96
 Pro Gly Asn Ala Ser Ser Ala Trp Pro Leu Asp Thr Ser Leu Gly Asn
 20 25 30

gca tct gct ggc act agc ctg gca gga ctg gct gtc agt ggc gaa ttc 144
 Ala Ser Ala Gly Thr Ser Leu Ala Gly Leu Ala Val Ser Gly Glu Phe
 35 40 45

<210> 4
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> rat

<400> 4

Met Ala Ala Val Thr Tyr Pro Ser Ser Val Pro Thr Thr Leu Asp Pro
 1 5 10 15

Gly Asn Ala Ser Ser Ala Trp Pro Leu Asp Thr Ser Leu Gly Asn Ala
 20 25 30

Ser Ala Gly Thr Ser Leu Ala Gly Leu Ala Val Ser Gly Glu Phe
 35 40 45

<210> 5
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> herpes simplex

<220>
 <221> CSD
 <222> (1)..(45)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(45)

<400> 5
 tgc ggc cgc cag cct gaa ctc gct cct gaa gac ccg gaa gat taa 45
 Cys Gly Arg Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp
 1 5 10

<210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> herpes simplex

<400> 6

Cys Gly Arg Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp
 1 5 10

<210> 7
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthesized primer sequence

<400> 7
 tatagaattc gcaccacca tcgctgtggc c 31

<210> 8
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> synthesized primer sequence

<400> 8
 atatgcggcc gcagtcctc ctcatggt 28

<210> 9
 <211> 2520
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2520)

<400> 9
 atg ggg ccc agg gca aag acc atc tcc tcc ctg ttc ttc ctc cta tgg 48
 Met Gly Pro Arg Ala Lys Thr Ile Ser Ser Leu Phe Phe Leu Leu Trp
 1 5 10 15

gtc ctg get gag ccg gct gag aac tcg gac ttc tac ctg cct ggg gat 96
 Val Leu Ala Glu Pro Ala Glu Asn Ser Asp Phe Tyr Leu Pro Gly Asp
 20 25 30

tac ctc ctg ggt ggc ctc ttc tcc ctc cat gcc aac atg aag ggc att 144
 Tyr Leu Leu Gly Gly Leu Phe Ser Leu His Ala Asn Met Lys Gly Ile

35	40	45	
gtt cac ctt aac ttc ctg cag gtg ccc atg tgc aag gag tat gaa gtg			192
Val His Leu Asn Phe Leu Gln Val Pro Met Cys Lys Glu Tyr Glu Val			
50	55	60	
aag gtg ata ggc tac aac ctc atg cag gcc atg cgc ttt gcg gtg gag			240
Lys Val Ile Gly Tyr Asn Leu Met Gln Ala Met Arg Phe Ala Val Glu			
65	70	75	80
gag atc aac aat gac agc agc ctg ctg cct ggt gtg ctg ctg ggc tat			288
Glu Ile Asn Asn Asp Ser Ser Leu Leu Pro Gly Val Leu Leu Gly Tyr			
85	90	95	
gag atc gtg gat gtg tgc tac atc tcc aac aat gtc cag ccg gtg ctc			336
Glu Ile Val Asp Val Cys Tyr Ile Ser Asn Asn Val Gln Pro Val Leu			
100	105	110	
tac ttc ctg gca cac gag gac aac ctc ctt ccc atc caa gag gac tac			384
Tyr Phe Leu Ala His Glu Asp Asn Leu Leu Pro Ile Gln Glu Asp Tyr			
115	120	125	
agt aac tac att tcc cgt gtg gtg gct gtc att ggc cct gac aac tcc			432
Ser Asn Tyr Ile Ser Arg Val Val Ala Val Ile Gly Pro Asp Asn Ser			
130	135	140	
gag tct gtc atg act gtg gcc aac ttc ctc tcc cta ttt ctc ctt cca			480
Glu Ser Val Met Thr Val Ala Asn Phe Leu Ser Leu Phe Leu Leu Pro			
145	150	155	160
cag atc acc tac agc gcc atc agc gat gag ctg cga gac aag gtg cgc			528
Gln Ile Thr Tyr Ser Ala Ile Ser Asp Glu Leu Arg Asp Lys Val Arg			
165	170	175	
ttc ccg gct ttg ctg cgt acc aca ccc agc gcc gac cac cac atc gag			576
Phe Pro Ala Leu Leu Arg Thr Thr Pro Ser Ala Asp His His Ile Glu			
180	185	190	
gcc atg gtg cag ctg atg ctg cac ttc cgc tgg aac tgg atc att gtg			624
Ala Met Val Gln Leu Met Leu His Phe Arg Trp Asn Trp Ile Ile Val			
195	200	205	
ctg gtg agc agc gac acc tat ggc cgc gac aat ggc cag ctg ctt ggc			672
Leu Val Ser Ser Asp Thr Tyr Gly Arg Asp Asn Gly Gln Leu Leu Gly			

210	215	220	
gag cgc gtg gcc cgg cgc gac atc tgc atc gcc ttc cag gag acg ctg 720			
Glu Arg Val Ala Arg Arg Asp Ile Cys Ile Ala Phe Gln Glu Thr Leu			
225	230	235	240
ccc aca ctg cag ccc aac cag aac atg acg tca gag gag cgc cag cgc 768			
Pro Thr Leu Gln Pro Asn Gln Asn Met Thr Ser Glu Glu Arg Gln Arg			
	245	250	255
ctg gtg acc att gtg gac aag ctg cag cag agc aca gcg cgc gtc gtg 816			
Leu Val Thr Ile Val Asp Lys Leu Gln Gln Ser Thr Ala Arg Val Val			
	260	265	270
gtc gtg ttc tgc ccc gac ctg acc ctg tac cac ttc ttc aat gag gtg 864			
Val Val Phe Ser Pro Asp Leu Thr Leu Tyr His Phe Phe Asn Glu Val			
	275	280	285
ctg cgc cag aac ttc act ggc gcc gtg tgg atc gcc tcc gag tcc tgg 912			
Leu Arg Gln Asn Phe Thr Gly Ala Val Trp Ile Ala Ser Glu Ser Trp			
	290	295	300
gcc atc gac cgg gtc ctg cac aac ctc acg gag ctg cgc cac ttg ggc 960			
Ala Ile Asp Pro Val Leu His Asn Leu Thr Glu Leu Arg His Leu Gly			
305	310	315	320
acc ttc ctg ggc atc acc atc cag agc gtg ccc atc ccg ggc ttc agt 1008			
Thr Phe Leu Gly Ile Thr Ile Gln Ser Val Pro Ile Pro Gly Phe Ser			
	325	330	335
gag ttc cgc gag tgg ggc cca cag gct ggg ccg cca ccc ctc agc agg 1056			
Glu Phe Arg Glu Trp Gly Pro Gln Ala Gly Pro Pro Pro Leu Ser Arg			
	340	345	350
acc agc cag agc tat acc tgc aac cag gag tgc gac aac tgc ctg aac 1104			
Thr Ser Gln Ser Tyr Thr Cys Asn Gln Glu Cys Asp Asn Cys Leu Asn			
	355	360	365
gcc acc ttg tcc ttc aac acc att ctc agg ctc tct ggg gag cgt gtc 1152			
Ala Thr Leu Ser Phe Asn Thr Ile Leu Arg Leu Ser Gly Glu Arg Val			
	370	375	380
gtc tac agc gtg tac tct gcg gtc tat gct gtg gcc cat gcc ctg cac 1200			
Val Tyr Ser Val Tyr Ser Ala Val Tyr Ala Val Ala His Ala Leu His			

385	390	395	400	
agc ctc ctc ggc tgt gac aaa agc acc tgc acc aag agg gtg gtc tac				1248
Ser Leu Leu Gly Cys Asp Lys Ser Thr Cys Thr Lys Arg Val Val Tyr				
	405	410	415	
ccc tgg cag ctg ctt gag gag atc tgg aag gtc aac ttc act ctc ctg				1296
Pro Trp Gln Leu Leu Glu Glu Ile Trp Lys Val Asn Phe Thr Leu Leu				
	420	425	430	
gac cac caa atc ttc ttc gac cgc caa ggg gac gtg gct ctg cac ttg				1344
Asp His Gln Ile Phe Phe Asp Pro Gln Gly Asp Val Ala Leu His Leu				
	435	440	445	
gag att gtc cag tgg caa tgg gac cgg agc cag aat ccc ttc cag agc				1392
Glu Ile Val Gln Trp Gln Trp Asp Arg Ser Gln Asn Pro Phe Gln Ser				
	450	455	460	
gtc gcc tcc tac tac ccc ctg cag cga cag ctg aag aac atc caa gac				1440
Val Ala Ser Tyr Tyr Pro Leu Gln Arg Gln Leu Lys Asn Ile Gln Asp				
	465	470	475	480
atc tcc tgg cac acc atc aac aac acg atc cct atg tcc atg tgt tcc				1488
Ile Ser Trp His Thr Ile Asn Asn Thr Ile Pro Met Ser Met Cys Ser				
	485	490	495	
aag agg tgc cag tca ggg caa aag aag aag cct gtg ggc atc cac gtc				1536
Lys Arg Cys Gln Ser Gly Gln Lys Lys Lys Pro Val Gly Ile His Val				
	500	505	510	
tgc tgc ttc gag tgc atc gac tgc ctt ccc ggc acc ttc ctc aac cac				1584
Cys Cys Phe Glu Cys Ile Asp Cys Leu Pro Gly Thr Phe Leu Asn His				
	515	520	525	
act gaa gat gaa tat gaa tgc cag gcc tgc ccg aat aac gag tgg tcc				1632
Thr Glu Asp Glu Tyr Glu Cys Gln Ala Cys Pro Asn Asn Glu Trp Ser				
	530	535	540	
tac cag agt gag acc tcc tgc ttc aag cgg cag ctg gtc ttc ctg gaa				1680
Tyr Gln Ser Glu Thr Ser Cys Phe Lys Arg Gln Leu Val Phe Leu Glu				
	545	550	555	560
tgg cat gag gca ccc acc atc gct gtg gcc ctg ctg gcc gcc ctg ggc				1728
Trp His Glu Ala Pro Thr Ile Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Leu Gly				

565	570	575	
ttc ctc agc acc ctg gcc atc ctg gtg ata ttc tgg agg cac ttc cag			1776
Phe Leu Ser Thr Leu Ala Ile Leu Val Ile Phe Trp Arg His Phe Gln			
580	585	590	
aca ccc ata gtt cgc tgc gct ggg ggc ccc atg tgc ttc ctg atg ctg			1824
Thr Pro Ile Val Arg Ser Ala Gly Gly Pro Met Cys Phe Leu Met Leu			
595	600	605	
aca ctg ctg ctg gtg gca tac atg gtg gtc ccg gtg tac gtg ggg ccg			1872
Thr Leu Leu Leu Val Ala Tyr Met Val Val Pro Val Tyr Val Gly Pro			
610	615	620	
ccc aag gtc tcc acc tgc ctc tgc cgc cag gcc ctc ttt ccc ctc tgc			1920
Pro Lys Val Ser Thr Cys Leu Cys Arg Gln Ala Leu Phe Pro Leu Cys			
625	630	635	640
ttc aca atc tgc atc tcc tgt atc gcc gtg cgt tct ttc cag atc gtc			1968
Phe Thr Ile Cys Ile Ser Cys Ile Ala Val Arg Ser Phe Gln Ile Val			
645	650	655	
tgc gcc ttc aag atg gcc agc cgc ttc cca cgc gcc tac agc tac tgg			2016
Cys Ala Phe Lys Met Ala Ser Arg Phe Pro Arg Ala Tyr Ser Tyr Trp			
660	665	670	
gtc cgc tac cag ggg ccc tac gtc tct atg gca ttt atc acg gta ctc			2064
Val Arg Tyr Gln Gly Pro Tyr Val Ser Met Ala Phe Ile Thr Val Leu			
675	680	685	
aaa atg gtc att gtg gta att ggc atg ctg gcc acg ggc ctc agt ccc			2112
Lys Met Val Ile Val Val Ile Gly Met Leu Ala Thr Gly Leu Ser Pro			
690	695	700	
acc acc cgt act gac ccc gat gac ccc aag atc aca att gtc tcc tgt			2160
Thr Thr Arg Thr Asp Pro Asp Asp Pro Lys Ile Thr Ile Val Ser Cys			
705	710	715	720
aac ccc aac tac cgc aac agc ctg ctg ttc aac acc agc ctg gac ctg			2208
Asn Pro Asn Tyr Arg Asn Ser Leu Leu Phe Asn Thr Ser Leu Asp Leu			
725	730	735	
ctg ctc tca gig gtg ggt ttc agc ttc gcc tac atg ggc aaa gag ctg			2256
Leu Leu Ser Val Val Gly Phe Ser Phe Ala Tyr Met Gly Lys Glu Leu			

Val His Leu Asn Phe Leu Gln Val Pro Met Cys Lys Glu Tyr Glu Val
 50 55 60

Lys Val Ile Gly Tyr Asn Leu Met Gln Ala Met Arg Phe Ala Val Glu
 65 70 75 80

Glu Ile Asn Asn Asp Ser Ser Leu Leu Pro Gly Val Leu Leu Gly Tyr
 85 90 95

Glu Ile Val Asp Val Cys Tyr Ile Ser Asn Asn Val Gln Pro Val Leu
 100 105 110

Tyr Phe Leu Ala His Glu Asp Asn Leu Leu Pro Ile Gln Glu Asp Tyr
 115 120 125

Ser Asn Tyr Ile Ser Arg Val Val Ala Val Ile Gly Pro Asp Asn Ser
 130 135 140

Glu Ser Val Met Thr Val Ala Asn Phe Leu Ser Leu Phe Leu Leu Pro
 145 150 155 160

Gln Ile Thr Tyr Ser Ala Ile Ser Asp Glu Leu Arg Asp Lys Val Arg
 165 170 175

Phe Pro Ala Leu Leu Arg Thr Thr Pro Ser Ala Asp His His Ile Glu
 180 185 190

Ala Met Val Gln Leu Met Leu His Phe Arg Trp Asn Trp Ile Ile Val
 195 200 205

Leu Val Ser Ser Asp Thr Tyr Gly Arg Asp Asn Gly Gln Leu Leu Gly
 210 215 220

Glu Arg Val Ala Arg Arg Asp Ile Cys Ile Ala Phe Gln Glu Thr Leu
 225 230 235 240

Pro Thr Leu Gln Pro Asn Gln Asn Met Thr Ser Glu Glu Arg Gln Arg
 245 250 255

Leu Val Thr Ile Val Asp Lys Leu Gln Gln Ser Thr Ala Arg Val Val
 260 265 270

Val Val Phe Ser Pro Asp Leu Thr Leu Tyr His Phe Phe Asn Glu Val
 275 280 285

Leu Arg Gln Asn Phe Thr Gly Ala Val Trp Ile Ala Ser Glu Ser Trp
 290 295 300

Ala Ile Asp Pro Val Leu His Asn Leu Thr Glu Leu Arg His Leu Gly
 305 310 315 320

Thr Phe Leu Gly Ile Thr Ile Gln Ser Val Pro Ile Pro Gly Phe Ser
 325 330 335

Glu Phe Arg Glu Trp Gly Pro Gln Ala Gly Pro Pro Pro Leu Ser Arg
 340 345 350

Thr Ser Gln Ser Tyr Thr Cys Asn Gln Glu Cys Asp Asn Cys Leu Asn
 355 360 365

Ala Thr Leu Ser Phe Asn Thr Ile Leu Arg Leu Ser Gly Glu Arg Val
 370 375 380

Val Tyr Ser Val Tyr Ser Ala Val Tyr Ala Val Ala His Ala Leu His
 385 390 395 400

Ser Leu Leu Gly Cys Asp Lys Ser Thr Cys Thr Lys Arg Val Val Tyr
 405 410 415

Pro Trp Gln Leu Leu Glu Glu Ile Trp Lys Val Asn Phe Thr Leu Leu
 420 425 430

Asp His Gln Ile Phe Phe Asp Pro Gln Gly Asp Val Ala Leu His Leu
 435 440 445

Glu Ile Val Gln Trp Gln Trp Asp Arg Ser Gln Asn Pro Phe Gln Ser
 450 455 460

Val Ala Ser Tyr Tyr Pro Leu Gln Arg Gln Leu Lys Asn Ile Gln Asp
 465 470 475 480

Ile Ser Trp His Thr Ile Asn Asn Thr Ile Pro Met Ser Met Cys Ser
 485 490 495

Lys Arg Cys Gln Ser Gly Gln Lys Lys Lys Pro Val Gly Ile His Val
 500 505 510

Cys Cys Phe Glu Cys Ile Asp Cys Leu Pro Gly Thr Phe Leu Asn His
 515 520 525

Thr Glu Asp Glu Tyr Glu Cys Gln Ala Cys Pro Asn Asn Glu Trp Ser
 530 535 540

Tyr Gln Ser Glu Thr Ser Cys Phe Lys Arg Gln Leu Val Phe Leu Glu
 545 550 555 560

Trp His Glu Ala Pro Thr Ile Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Leu Gly
 565 570 575

Phe Leu Ser Thr Leu Ala Ile Leu Val Ile Phe Trp Arg His Phe Gln
 580 585 590

Thr Pro Ile Val Arg Ser Ala Gly Gly Pro Met Cys Phe Leu Met Leu
 595 600 605

Thr Leu Leu Leu Val Ala Tyr Met Val Val Pro Val Tyr Val Gly Pro
 610 615 620

Phe Tyr Pro Glu Arg Asn Thr Pro Ala Tyr Phe Asn Ser Met Ile Gln
 820 825 830

Gly Tyr Thr Met Arg Arg Asp
 835

<210> 11
 <211> 2559
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2559)

<400> 11
 atg ctg ggc cct gct gtc ctg ggc ctc agc ctc tgg gct ctc ctg cac 48
 Met Leu Gly Pro Ala Val Leu Gly Leu Ser Leu Trp Ala Leu Leu His
 1 5 10 15

cct ggg acg ggg gcc cca ttg tgc ctg tca cag caa ctt agg atg aag 96
 Pro Gly Thr Gly Ala Pro Leu Cys Leu Ser Gln Gln Leu Arg Met Lys
 20 25 30

ggg gac tac gtg ctg ggg ggg ctg ttc ccc ctg ggc gag gcc gag gag 144
 Gly Asp Tyr Val Leu Gly Gly Leu Phe Pro Leu Gly Glu Ala Glu Glu
 35 40 45

gct ggc ctc cgc agc cgg aca cgg ccc agc agc cct gtg tgc acc agg 192
 Ala Gly Leu Arg Ser Arg Thr Arg Pro Ser Ser Pro Val Cys Thr Arg
 50 55 60

ttc tcc tca aac ggc ctg ctc tgg gca ctg gcc atg aaa atg gcc gtg 240
 Phe Ser Ser Asn Gly Leu Leu Trp Ala Leu Ala Met Lys Met Ala Val
 65 70 75 80

gag gag atc aac aac aag tcg gat ctg ctg ccc ggg ctg cgc ctg ggc 288
 Glu Glu Ile Asn Asn Lys Ser Asp Leu Leu Pro Gly Leu Arg Leu Gly
 85 90 95

tac gac ctc ttt gat acg tgc tgc gag cct gtg gtg gcc atg aag ccc 336
 Tyr Asp Leu Phe Asp Thr Cys Ser Glu Pro Val Val Ala Met Lys Pro
 100 105 110

agc ctc atg ttc ctg gcc aag gca ggc agc cgc gac atc gcc gcc tac Ser Leu Met Phe Leu Ala Lys Ala Gly Ser Arg Asp Ile Ala Ala Tyr 115 120 125	384
tgc aac tac acg cag tac cag ccc cgt gtg ctg gct gtc atc ggg ccc Cys Asn Tyr Thr Gln Tyr Gln Pro Arg Val Leu Ala Val Ile Gly Pro 130 135 140	432
cac tcg tca gag ctc gcc atg gtc acc ggc aag ttc ttc agc ttc ttc His Ser Ser Glu Leu Ala Met Val Thr Gly Lys Phe Phe Ser Phe Phe 145 150 155 160	480
ctc atg ccc cag gtc agc tac ggt gct agc atg gag ctg ctg agc gcc Leu Met Pro Gln Val Ser Tyr Gly Ala Ser Met Glu Leu Leu Ser Ala 165 170 175	528
cgg gag acc ttc ccc tcc ttc ttc cgc acc gtg ccc agc gac cgt gtg Arg Glu Thr Phe Pro Ser Phe Phe Arg Thr Val Pro Ser Asp Arg Val 180 185 190	576
cag ctg acg gcc gcc gcg gag ctg ctg cag gag ttc ggc tgg aac tgg Gln Leu Thr Ala Ala Ala Glu Leu Leu Gln Glu Phe Gly Trp Asn Trp 195 200 205	624
gtg gcc gcc ctg ggc agc gac gac gag tac ggc cgg cag ggc ctg agc Val Ala Ala Leu Gly Ser Asp Asp Glu Tyr Gly Arg Gln Gly Leu Ser 210 215 220	672
atc ttc tcg gcc ctg gcc gcg gca cgc ggc atc tgc atc gcg cac gag Ile Phe Ser Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Ile Cys Ile Ala His Glu 225 230 235 240	720
ggc ctg gtg ccg ctg ccc cgt gcc gat gac tcg cgg ctg ggg aag gtg Gly Leu Val Pro Leu Pro Arg Ala Asp Asp Ser Arg Leu Gly Lys Val 245 250 255	768
cag gac gtc ctg cac cag gtg aac cag agc agc gtg cag gtg gtg ctg Gln Asp Val Leu His Gln Val Asn Gln Ser Ser Val Gln Val Val Leu 260 265 270	816
ctg ttc gcc tcc gtg cac gcc gcc cac gcc ctc ttc aac tac agc atc Leu Phe Ala Ser Val His Ala Ala His Ala Leu Phe Asn Tyr Ser Ile 275 280 285	864

agc agc agg ctc tcg ccc aag gtg tgg gtg gcc agc gag gcc tgg ctg 912
 Ser Ser Arg Leu Ser Pro Lys Val Trp Val Ala Ser Glu Ala Trp Leu
 290 295 300

acc tct gac ctg gtc atg ggg ctg ccc ggc atg gcc cag atg ggc acg 960
 Thr Ser Asp Leu Val Met Gly Leu Pro Gly Met Ala Gln Met Gly Thr
 305 310 315 320

gtg ctt ggc ttc ctc cag agg ggt gcc cag ctg cac gag ttc ccc cag 1008
 Val Leu Gly Phe Leu Gln Arg Gly Ala Gln Leu His Glu Phe Pro Gln
 325 330 335

tac gtg aag acg cac ctg gcc ctg gcc acc gac ccg gcc ttc tgc tct 1056
 Tyr Val Lys Thr His Leu Ala Leu Ala Thr Asp Pro Ala Phe Cys Ser
 340 345 350

gcc ctg ggc gag agg gag cag ggt ctg gag gag gac gtg gtg ggc cag 1104
 Ala Leu Gly Glu Arg Glu Gln Gly Leu Glu Glu Asp Val Val Gly Gln
 355 360 365

cgc tgc ccg cag tgt gac tgc atc acg ctg cag aac gtg agc gca ggg 1152
 Arg Cys Pro Gln Cys Asp Cys Ile Thr Leu Gln Asn Val Ser Ala Gly
 370 375 380

cta aat cac cac cag acg ttc tct gtc tac gca gct gtg tat agc gtg 1200
 Leu Asn His His Gln Thr Phe Ser Val Tyr Ala Ala Val Tyr Ser Val
 385 390 395 400

gcc cag gcc ctg cac aac act ctt cag tgc aac gcc tca ggc tgc ccc 1248
 Ala Gln Ala Leu His Asn Thr Leu Gln Cys Asn Ala Ser Gly Cys Pro
 405 410 415

gcg cag gac ccc gtg aag ccc tgg cag ctc ctg gag aac atg tac aac 1296
 Ala Gln Asp Pro Val Lys Pro Trp Gln Leu Leu Glu Asn Met Tyr Asn
 420 425 430

ctg acc ttc cac gtg ggc ggg ctg ccg ctg cgg ttc gac agc agc gga 1344
 Leu Thr Phe His Val Gly Gly Leu Pro Leu Arg Phe Asp Ser Ser Gly
 435 440 445

aac gtg gac atg gag tac gac ctg aag ctg tgg gtg tgg cag ggc tca 1392
 Asn Val Asp Met Glu Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Val Trp Gln Gly Ser
 450 455 460

cac ctc ccg ctc acg ggc tgc ctg agc aca ctc ttc ctg cag gcg gcc 1968
His Leu Pro Leu Thr Gly Cys Leu Ser Thr Leu Phe Leu Gln Ala Ala
645 650 655

gag atc ttc gtg gag tca gaa ctg cct ctg agc tgg gca gac cgg ctg 2016
Glu Ile Phe Val Glu Ser Glu Leu Pro Leu Ser Trp Ala Asp Arg Leu
660 665 670

agt ggc tgc ctg cgg ggg ccc tgg gcc tgg ctg gtg gtg ctg ctg gcc 2064
Ser Gly Cys Leu Arg Gly Pro Trp Ala Trp Leu Val Val Leu Leu Ala
675 680 685

atg ctg gtg gag gtc gca ctg tgc acc tgg tac ctg gtg gcc ttc ccg 2112
Met Leu Val Glu Val Ala Leu Cys Thr Trp Tyr Leu Val Ala Phe Pro
690 695 700

ccg gag gtg gtg acg gac tgg cac atg ctg ccc acg gag gcg ctg gtg 2160
Pro Glu Val Val Thr Asp Trp His Met Leu Pro Thr Glu Ala Leu Val
705 710 715 720

cac tgc cgc aca cgc tcc tgg gtc agc ttc ggc cta gcg cac gcc acc 2208
His Cys Arg Thr Arg Ser Trp Val Ser Phe Gly Leu Ala His Ala Thr
725 730 735

aat gcc acg ctg gcc ttt ctc tgc ttc ctg ggc act ttc ctg gtg cgg 2256
Asn Ala Thr Leu Ala Phe Leu Cys Phe Leu Gly Thr Phe Leu Val Arg
740 745 750

agc cag ccg ggc cgc tac aac cgt gcc cgt ggc ctc acc ttt gcc atg 2304
Ser Gln Pro Gly Arg Tyr Asn Arg Ala Arg Gly Leu Thr Phe Ala Met
755 760 765

ctg gcc tac ttc atc acc tgg gtc tcc ttt gtg ccc ctc ctg gcc aat 2352
Leu Ala Tyr Phe Ile Thr Trp Val Ser Phe Val Pro Leu Leu Ala Asn
770 775 780

gtg cag gtg gtc ctc agg ccc gcc gtg cag atg ggc gcc ctc ctg ctc 2400
Val Gln Val Val Leu Arg Pro Ala Val Gln Met Gly Ala Leu Leu Leu
785 790 795 800

tgt gtc ctg ggc atc ctg gct gcc ttc cac ctg ccc agg tgt tac ctg 2448
Cys Val Leu Gly Ile Leu Ala Ala Phe His Leu Pro Arg Cys Tyr Leu
805 810 815

ctc atg cgg cag cca ggg ctc aac acc ccc gag ttc ttc ctg gga ggg 2496
 Leu Met Arg Gln Pro Gly Leu Asn Thr Pro Glu Phe Phe Leu Gly Gly
 820 825 830

ggc cct ggg gat gcc caa ggc cag aat gac ggg aac aca gga aat cag 2544
 Gly Pro Gly Asp Ala Gln Gly Gln Asn Asp Gly Asn Thr Gly Asn Gln
 835 840 845

ggg aaa cat gag tga 2559
 Gly Lys His Glu
 850

<210> 12
 <211> 852
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Met Leu Gly Pro Ala Val Leu Gly Leu Ser Leu Trp Ala Leu Leu His
 1 5 10 15

Pro Gly Thr Gly Ala Pro Leu Cys Leu Ser Gln Gln Leu Arg Met Lys
 20 25 30

Gly Asp Tyr Val Leu Gly Gly Leu Phe Pro Leu Gly Glu Ala Glu Glu
 35 40 45

Ala Gly Leu Arg Ser Arg Thr Arg Pro Ser Ser Pro Val Cys Thr Arg
 50 55 60

Phe Ser Ser Asn Gly Leu Leu Trp Ala Leu Ala Met Lys Met Ala Val
 65 70 75 80

Glu Glu Ile Asn Asn Lys Ser Asp Leu Leu Pro Gly Leu Arg Leu Gly
 85 90 95

Tyr Asp Leu Phe Asp Thr Cys Ser Glu Pro Val Val Ala Met Lys Pro
 100 105 110

Ser Leu Met Phe Leu Ala Lys Ala Gly Ser Arg Asp Ile Ala Ala Tyr
 115 120 125

Cys Asn Tyr Thr Gln Tyr Gln Pro Arg Val Leu Ala Val Ile Gly Pro
 130 135 140

His Ser Ser Glu Leu Ala Met Val Thr Gly Lys Phe Phe Ser Phe Phe
 145 150 155 160

Leu Met Pro Gln Val Ser Tyr Gly Ala Ser Met Glu Leu Leu Ser Ala
 165 170 175

Arg Glu Thr Phe Pro Ser Phe Phe Arg Thr Val Pro Ser Asp Arg Val
 180 185 190

Gln Leu Thr Ala Ala Ala Glu Leu Leu Gln Glu Phe Gly Trp Asn Trp
 195 200 205

Val Ala Ala Leu Gly Ser Asp Asp Glu Tyr Gly Arg Gln Gly Leu Ser
 210 215 220

Ile Phe Ser Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Ile Cys Ile Ala His Glu
 225 230 235 240

Gly Leu Val Pro Leu Pro Arg Ala Asp Asp Ser Arg Leu Gly Lys Val
 245 250 255

Gln Asp Val Leu His Gln Val Asn Gln Ser Ser Val Gln Val Val Leu
 260 265 270

Leu Phe Ala Ser Val His Ala Ala His Ala Leu Phe Asn Tyr Ser Ile
 275 280 285

Ser Ser Arg Leu Ser Pro Lys Val Trp Val Ala Ser Glu Ala Trp Leu

290

295

300

Thr Ser Asp Leu Val Met Gly Leu Pro Gly Met Ala Gln Met Gly Thr
305 310 315 320

Val Leu Gly Phe Leu Gln Arg Gly Ala Gln Leu His Glu Phe Pro Gln
325 330 335

Tyr Val Lys Thr His Leu Ala Leu Ala Thr Asp Pro Ala Phe Cys Ser
340 345 350

Ala Leu Gly Glu Arg Glu Gln Gly Leu Glu Glu Asp Val Val Gly Gln
355 360 365

Arg Cys Pro Gln Cys Asp Cys Ile Thr Leu Gln Asn Val Ser Ala Gly
370 375 380

Leu Asn His His Gln Thr Phe Ser Val Tyr Ala Ala Val Tyr Ser Val
385 390 395 400

Ala Gln Ala Leu His Asn Thr Leu Gln Cys Asn Ala Ser Gly Cys Pro
405 410 415

Ala Gln Asp Pro Val Lys Pro Trp Gln Leu Leu Glu Asn Met Tyr Asn
420 425 430

Leu Thr Phe His Val Gly Gly Leu Pro Leu Arg Phe Asp Ser Ser Gly
435 440 445

Asn Val Asp Met Glu Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Val Trp Gln Gly Ser
450 455 460

Val Pro Arg Leu His Asp Val Gly Arg Phe Asn Gly Ser Leu Arg Thr
465 470 475 480

Glu Arg Leu Lys Ile Arg Trp His Thr Ser Asp Asn Gln Lys Pro Val
485 490 495

Ser Arg Cys Ser Arg Gln Cys Gln Glu Gly Gln Val Arg Arg Val Lys
 500 505 510

Gly Phe His Ser Cys Cys Tyr Asp Cys Val Asp Cys Glu Ala Gly Ser
 515 520 525

Tyr Arg Gln Asn Pro Asp Asp Ile Ala Cys Thr Phe Cys Gly Gln Asp
 530 535 540

Glu Trp Ser Pro Glu Arg Ser Thr Arg Cys Phe Arg Arg Arg Ser Arg
 545 550 555 560

Phe Leu Ala Trp Gly Glu Pro Ala Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 565 570 575

Ser Leu Ala Leu Gly Leu Val Leu Ala Ala Leu Gly Leu Phe Val His
 580 585 590

His Arg Asp Ser Pro Leu Val Gln Ala Ser Gly Gly Pro Leu Ala Cys
 595 600 605

Phe Gly Leu Val Cys Leu Gly Leu Val Cys Leu Ser Val Leu Leu Phe
 610 615 620

Pro Gly Gln Pro Ser Pro Ala Arg Cys Leu Ala Gln Gln Pro Leu Ser
 625 630 635 640

His Leu Pro Leu Thr Gly Cys Leu Ser Thr Leu Phe Leu Gln Ala Ala
 645 650 655

Glu Ile Phe Val Glu Ser Glu Leu Pro Leu Ser Trp Ala Asp Arg Leu
 660 665 670

Ser Gly Cys Leu Arg Gly Pro Trp Ala Trp Leu Val Val Leu Leu Ala
 675 680 685

Met Leu Val Glu Val Ala Leu Cys Thr Trp Tyr Leu Val Ala Phe Pro
 690 695 700

Pro Glu Val Val Thr Asp Trp His Met Leu Pro Thr Glu Ala Leu Val
 705 710 715 720

His Cys Arg Thr Arg Ser Trp Val Ser Phe Gly Leu Ala His Ala Thr
 725 730 735

Asn Ala Thr Leu Ala Phe Leu Cys Phe Leu Gly Thr Phe Leu Val Arg
 740 745 750

Ser Gln Pro Gly Arg Tyr Asn Arg Ala Arg Gly Leu Thr Phe Ala Met
 755 760 765

Leu Ala Tyr Phe Ile Thr Trp Val Ser Phe Val Pro Leu Leu Ala Asn
 770 775 780

Val Gln Val Val Leu Arg Pro Ala Val Gln Met Gly Ala Leu Leu Leu
 785 790 795 800

Cys Val Leu Gly Ile Leu Ala Ala Phe His Leu Pro Arg Cys Tyr Leu
 805 810 815

Leu Met Arg Gln Pro Gly Leu Asn Thr Pro Glu Phe Phe Leu Gly Gly
 820 825 830

Gly Pro Gly Asp Ala Gln Gly Gln Asn Asp Gly Asn Thr Gly Asn Gln
 835 840 845

Gly Lys His Glu
 850