

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 14/47 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380106507.5

[43] 公开日 2006 年 1 月 25 日

[11] 公开号 CN 1726224A

[22] 申请日 2003.12.17

[21] 申请号 200380106507.5

[30] 优先权

[32] 2002.12.18 [33] US [31] 60/434,790

[86] 国际申请 PCT/CH2003/000830 2003.12.17

[87] 国际公布 WO2004/055048 英 2004.7.1

[85] 进入国家阶段日期 2005.6.17

[71] 申请人 吉万奥丹股份有限公司

地址 瑞士韦尔涅

[72] 发明人 J·P·斯莱克

T·S·麦克拉斯基

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所
代理人 刘晓东

权利要求书 2 页 说明书 25 页 序列表 6 页

[54] 发明名称

嵌合 α Q-Gustducin G-蛋白

[57] 摘要

$G_{\alpha q}$ -Gustducin 嵌合 G-蛋白在功能上与 G-蛋白偶联受体相结合。嵌合体可于异源细胞体系中表达并可用作检验的基础来鉴定味觉反应的调节剂，尤其是苦味、甜味或鲜味反应。

1. $G_{\alpha q}$ -Gustducin 嵌合 G-蛋白。
2. 权利要求 1 的嵌合 $G_{\alpha q}$ -Gustducin, 其特征在于它是 $G_{\alpha 15 \text{ or } 16}$ -Gustducin 蛋白。
3. 权利要求 1 或权利要求 2 的嵌合 G 蛋白, 其中 $G_{\alpha q}$ 的至少最后 5 个氨基酸被相应数目的 Gustducin 氨基酸置换。
4. 权利要求 3 的嵌合 G 蛋白, 其中 $G_{\alpha q}$ 的最后 44 个氨基酸被 Gustducin 的 44 个氨基酸单元取代。
5. 依照权利要求 1 的嵌合 G 蛋白, 其具有 SEQ ID 2 中所列的氨基酸序列。
6. 依照权利要求 1 的 G 蛋白, 其由含有 SEQ ID 1 中所示核苷酸序列的核酸编码。
7. 包含 SEQ ID 1 中所示核苷酸序列且编码权利要求 1 中所定义的 G 蛋白的核酸。
8. 含有其中含有 SEQ ID 1 中所示核苷酸序列且编码权利要求 1 所述 G 蛋白的核酸的表达载体。
9. 用权利要求 8 所述表达载体转染的宿主细胞。
10. 稳定表达嵌合 G 蛋白和味觉受体的权利要求 9 的宿主细胞。
11. 产生如权利要求 1 所述嵌合 G 蛋白的方法, 包括以下步骤: 在足以表达所述 G 蛋白的条件下培养其中已含有编码嵌合 G 蛋白的表达载体的宿主细胞, 从而使该蛋白质产生并回收该细胞所产生的蛋白质。
12. 用权利要求 1 所述嵌合蛋白质分析和发现味觉受体调节剂的方法。
13. 用权利要求 1 所述嵌合蛋白质分析和发现味觉受体调节剂的方法, 所述味觉受体选自苦味受体、甜味受体和鲜味受体。
14. 依照权利要求 12 的方法, 其中应用了以哺乳动物细胞为基础的检测法, 该检测法中采用了编码本发明嵌合蛋白和味觉受体的转染

基因或 cDNA，所述方法包括如下步骤：使化合物接触细胞并测定化合物对受体：嵌合 G 蛋白复合物的功能效应。

15. 依照权利要求 12 至 14 中任一项的方法，其中通过检测诸如 IP3 或钙²⁺等细胞内信使的变化而测定功能性效应。

嵌合 α Q-Gustducin G-蛋白

本发明涉及嵌合的 G-蛋白，尤其是介导味觉受体传导途径的那些嵌合 G-蛋白。本发明还涉及基于含所说蛋白质的异源表达体系的检测法，以及它们在筛选人的苦味、甜味和鲜味 (umami taste) 反应调节剂中的用途。

味觉可被分成五种单独的形式：苦、咸、酸、甜和鲜味。Tastants 影响食物和饮料的可口性，从而影响人的营养习性。它们还影响可摄取物质的可口性，诸如口服药物和营养品 (nutraceutical)。了解和调控味觉转导机制对于食品业和制药业而言是有意义的。如果味觉传导途径可以被操纵，就有可能建立以异源表达体系为基础的检测法，它又可用于鉴别能调节味觉反应的化合物，从而使某些食品更可口或提高患者对口服药物和营养品的顺应性。

已有许多文献是关于味觉传导机制的。味觉是由 tastant 分子与定位于味蕾中所存在的细胞的膜上的 tastant 分子受体相互作用引发的，味蕾位于蕈状、叶状和轮廓乳头的舌上皮以及软腭和会厌中。生物医学和生理学研究的最新进展使得研究者推断出甜、旨和苦味的传导主要是由所谓的 G 蛋白偶联受体或 GPCR 所介导的。

GPCR 是能与 tastant 分子结合的细胞表面蛋白质，由此与 G 蛋白偶联，引发产生二级信使、诸如钙离子（使细胞能发送信号至脑部，显示味觉反应）的细胞过程。通常，GPCR 被划分为 G_q -、 G_i -、 G_o -和 G_s -偶联受体，下标反映了在其必需的信号传导途径中主要的 G 蛋白效应器。味觉受体由于与 Gustducin - 一种 G_{qi} -型 G-蛋白相互作用而被归为 G_i -偶联 GPCR。

最近鉴定出了据称与苦、甜和鲜味觉感受有关的 GPCR 的编码基

因,使得有可能开发出可用于鉴定调节味觉传导途径的化学分子的异源表达体系。例如,在异源表达体系中受体的可供利用性和用途使得可以筛选高亲和力的味觉活性激动剂、拮抗剂、反激动剂和调节剂。不过,在基于异源表达体系的可靠测定法的研发中还存在许多技术问题。一个问题是高浓度 GPCR 在异源宿主细胞表面的可靠表达。第二个问题是提供不仅能与许多不同类型的 GPCR (通常,这样的 G-蛋白被称为“混杂的”)偶联、而且偶联效率高的 G 蛋白,从而使得即便 GPCR 的表面浓度相对较低,细胞信号仍然尽可能的强。

至于第二个问题,已知所谓的 $G_{\alpha i}$ 蛋白、 $G_{\alpha 15}$ 和 $G_{\alpha 16}$ 结合许多类型的 GPCRs。此外,它们还将 GPCR 与导致细胞内钙水平增高的磷脂酶 C 的活化相偶联。如本领域众所周知的,此信号级联反应可通过检测细胞中的钙水平而方便快捷的测定出来(参阅例如 WO 0118050)。不过, $G_{\alpha 15}$ 和 $G_{\alpha 16}$ 并未被认为是真正普遍混杂的 G-蛋白,因为有数种不能激活它们的受体,参阅,例如,Offermanns, S. 和 Simon, M., 1995, J. Biol. Chem., 270: 15175-15180; Lee, J.W.M. et al., 1998, J. Neurochem., 70: 2203-2211; Huang, Y. et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 3975-3978.; Wu, D. et al., 1992, J. Biol. Chem. 267: 25798-25802; Wu, D. et al., 1993, Science, 261: 101-103; Zhu, X and Birnbaumer, L., PNAS USA, 93: 2827-2831; Parmentier, M.L. et al., 1998, Mol. Pharmacol., 53: 778-786)。此外,已发表的文献表明,大部分这些在激活 $G_{\alpha 15}$ 和 $G_{\alpha 16}$ G-蛋白中特别无效的 GPCR 是 G_i -型 GPCRs (Mody, S.M. 等, 2000, Mol. Pharmacol., 57: 13-23)。

因而,由于甜味受体、鲜味受体 (umami taste receptor) 和苦味受体被认为与 gustducin (一种 $G_{\alpha i}$ 型 G-蛋白) 相偶联,且上述研究表明 $G_{\alpha 15}$ 和 $G_{\alpha 16}$ 不是 $G_{\alpha i}$ - 型 GPCRs 的最佳配偶体,所以技术熟练人员不会预见到将活化的味觉受体与 $G_{\alpha 15}$ 或 $G_{\alpha 16}$ 有效地偶联。另一方面, Gustducin 本身如不能提供有效的方案,因为此 G 蛋白调控不易检测的环核苷酸 (cNMP) 释放,例如,它不象钙离子的增加那样容易测定。检测 cNMP 存在技术上的困难,且需要一种通常需 4-6 小时、而且只

提供一终点测定值的免疫检测法。此外，在异源细胞表达体系中使用诸如 Gustducin 等专门的 $G_{\alpha i}$ 蛋白是比较复杂的。为此必须将两个额外的 G-蛋白亚基（ β 和 γ 亚基）引入异源宿主细胞中，以完全重建味觉-受体-G 蛋白复合物。另一方面， $G_{\alpha 16}$ 可与诸如 HEK293 细胞系细胞等哺乳动物细胞内源性的 β/γ 亚基复合。应用 $G_{\alpha 16}$ 型 G 蛋白比应用诸如 Gustducin 等 $G_{\alpha i}$ 型 G-蛋白更快捷、方便和灵敏。

仍然需要研发对多种味觉受体，特别是甜、旨和苦味受体显示高亲和力、可加入异源表达体系检测法中以筛选人味觉反应的调节剂从而量化已知味觉分子的活性并发现新分子的 G 蛋白。

在现有技术中已建议使用嵌合 G 蛋白。在 WO 02/36622 中，描述了用来自转导素 C 末端的至少 5 个氨基酸取代的 $G_{\alpha q}$ 嵌合蛋白。所述的嵌合蛋白质被描述为相对于两种化学感受性 GPCR 而言比天然 $G_{\alpha q}$ 更混杂。不过，有必要指出的是，在此文献中试验的唯一一种味觉受体是小鼠苦味受体。因此，尚不清楚是否任何一种所述的嵌合 G 蛋白都会更有效的与人的苦味、甜味或鲜味受体偶联。

Mody S.M. 在分子药理学 (Molecular Pharmacology) 57: 13-23 (2000) 中描述了 $G_{\alpha 16}$ 的嵌合体和 $G_{\alpha 2}$ 的特殊序列以及它们对 G_i -偶联受体而言增高的混杂性。Mody 推断嵌合蛋白不是 GPCR 的通用衔接子，但它们能促进 GPCR 特异亚型的识别。有必要指出的是，在所研究的亚型中没有一种 GPCR 包括味觉受体。

令人惊讶的是，我们现已发现基于 $G_{\alpha q}$ -Gustducin 的嵌合 G 蛋白能以高亲和力结合多种已知和推断的苦味受体、甜味和鲜味受体。

因此，本发明的第一方面提供了 $G_{\alpha q}$ -Gustducin 嵌合 G 蛋白。

在一明确的实施方案中，嵌合 $G_{\alpha q}$ -Gustducin 是 $G_{\alpha 15}$ 或 16 -Gustducin 蛋白，更具体而言是 $G_{\alpha 16}$ -Gustducin 蛋白。

在另一明确的实施方案中，G-蛋白是这样一种蛋白，其中 $G_{\alpha q}$ 的至少最后 5 个氨基酸被相应数目的 Gustducin 氨基酸所置换，更具体而言是 $G_{\alpha q}$ 的最后 44 个氨基酸被 Gustducin 的 44 个氨基酸单元取代。

在优选的实施方案中，提供了具有如 SEQ ID 2 所示氨基酸序列的

蛋白质。

本发明的另一方面提供了编码上文所定义蛋白质的核酸。

在优选的实施方案中,所述核酸包含 SEQ ID 1 所示的核苷酸序列。

尽管本发明的嵌合蛋白质可通过在 Gustducin C-末端进行取代而形成,技术人员应理解其它的取代或突变也可能引入 G 蛋白中,可能影响它们的混杂性和/或它们与给定受体的偶联程度,这些 G 蛋白的变体组成了本发明的另一方面。此外,技术人员可能无需任何发明活动而只通过基因工程的常规技术即可完成所述的取代或突变,诸如 PCR、基因克隆、定位诱变或 cDNA、宿主细胞的转染和体外转录。之后,可针对与受体的功能性偶联来筛选这些变体。

在本发明特殊的实施方案中,提供了与 SEQ ID No. 2 中所示序列具有 80% 同源性,优选 90%,更优选 95% 或更高同源性的多肽变体。

本发明的其它方面是包含本文所定义的嵌合 G 蛋白编码核酸的表达载体以及用所说载体转化或转染的宿主细胞。

在本发明的另一方面,提供了产生所定义的嵌合 G 蛋白的方法,其中包括在所说 G 蛋白足以表达的条件下,培养其中已包含编码嵌合 G 蛋白的表达载体的所述宿主细胞,从而引起该蛋白质产生,并回收该细胞所产生的蛋白质。

本发明的另一方面,提供了用本文所述嵌合蛋白质分析和发现味觉受体(尤其是苦味、甜味和鲜味受体)的调节剂的方法。

在特殊的实施方案中,基于哺乳动物细胞的检测法应用了编码本发明嵌合蛋白质以及味觉受体(具体而言是苦味、甜味或鲜味受体)的瞬时转染基因或 cDNA,所述方法包含以下步骤:将化合物与所述细胞接触,并测定该化合物对受体:嵌合 G 蛋白复合体的功能性影响,诸如胞质第二信使的增加。

在此方面的另一特殊实施方案中,本发明涉及利用稳定表达的基因或 cDNA 进行基于哺乳动物细胞的检测法。

在另一特殊的实施方案中,本发明涉及基于哺乳动物细胞的检测法,其中所述细胞稳定表达受体和嵌合 G 蛋白,优选以可诱导的形式

表达。

在本发明的另一方面，提供了将化合物或含该化合物的化合物集合用于本文所定义的检测法中，该化合物可调节味觉受体，尤其是苦味、甜味或鲜味受体的味觉反应。

在本发明的另一方面，提供了用本文所述检测方法确定为味觉反应调节剂的化合物或含所述化合物的化合物集合，以及含有它们的食物饮料或口服药物或营养品制剂。

本发明的各方面将参考详述、序列表和实施例作更进一步的描述。

发明详述

下文更进一步详述的完全确立的瞬时表达体系可用于使本发明的嵌合 G 蛋白具备与 GPCR 味觉受体(尤其是苦味受体、甜味和鲜味受体)偶联的能力。

可将表达本发明 G 蛋白和 GPCR 二者的细胞与已知的味觉化合物相接触。

可用于本发明的苦味化合物的例子选自：阿克替甙、加率蕚草酮、加蛇麻酮、七叶内酯、七叶甙、L-丙氨酸、L-丙氨酰-L-丙氨酰-L-丙氨酸、L-丙氨酰-L-异亮氨酰-丙氨酸 L-、L-缬氨酰-L-缬氨酰-苦龙苷、Amaropinin 苦樟苷、苦杏仁苷、狭叶香茶菜素、Antiacetylhumulone、Antiisohumulone、精氨酸、L-精氨酰亮氨酸、精氨酰亮氨酰亮氨酸、精氨酰脯氨酸、Asarinaldehyde、天冬氨酰天冬氨酸、Asparasaponin I、阿托品、苯甲基 β -D-阿糖胞苷、苯甲基 β -L-阿糖胞苷、苯甲基 β -D-果糖苷、苯甲基 β -D-半乳糖苷、苯甲基 α -D-葡萄糖苷、苯甲基 β -D-葡萄糖苷、苯甲基 α -D-甘露糖苷、苦味肽、来自大豆蛋白的苦味肽、丁基 α -D-葡萄糖苷、丁基 β -D-葡萄糖苷、咖啡因、Carnosifloside II、Carnosifloside III、Carnosifloside IV、儿茶酚、表儿茶酸、表儿茶鞣酸 (Epicatechin gallate)、卡茄碱、 α -卡茄碱、 β 2-氯霉素、胆酸、野葛苷、辅律草酮、科酒花酮、Cryptochlorogenic Acid、 γ -内酯、葫芦素 B、葫芦素 D、环丙氨酸-甘氨酸、环丙氨酸

- 苯丙氨酸、环丙氨酸-缬氨酸、环 (L-精氨酸甘氨酸-L-脯氨酸-L-脯氨酸-L-苯丙氨酸-L-异亮氨酸-L-缬氨酸)、环天冬氨酸-苯丙氨酸、环甘氨酸-苯丙氨酸、环己酰亚胺、环亮氨酸-色氨酸、环戊(b)氮杂革-8(1H)-酮、7-甲基-2,3,6,7-四氢-环戊(b)氮杂革-8(1H)-酮、2,3,6,7-四氢-7-羟基-7-甲基-环戊-2-烯-1-酮、2,5-二羟基-5-甲基-3-(1-哌啶基)-环戊-2-烯-1-酮、2,5-二羟基-5-甲基-3-(1-吡咯烷基)环戊-2-烯-1-酮、2,3-二-1-吡咯烷基-环戊-2-烯-1-酮、5-羟基-5-甲基-2,3-二-1-哌啶基-环戊-2-烯-1-酮、5-羟基-5-甲基-2,3-二-1-吡咯烷基-环戊-2-烯-1-酮、5-甲基-2,3-二-1-吡咯烷基-环戊-2-烯-1-酮、5-亚甲基-2,3-二-1-吡咯烷基-环戊-2-烯-1-酮、3-甲基-2-(1-吡咯烷基)-环苯丙氨酸-天冬氨酸、环脯氨酸-丙氨酸、环脯氨酸-天冬酰胺、环脯氨酸-甘氨酸、环脯氨酸-异亮氨酸、环脯氨酸-亮氨酸、环脯氨酸-甲硫氨酸、环脯氨酸-苯丙氨酸、环脯氨酸-脯氨酸、环脯氨酸-缬氨酸、环缬氨酸-苯丙氨酸、Cynaratriol、莱蓟苦素、莱蓟苦素、大豆黄素、大豆黄甙地那铵苯甲酸盐、Denatonium saccharide、蜀黍氰苷、二羟基苯甲酸、2,3-二羟基苯甲酸、2,4-乙基 b-L-阿糖胞苷、乙基- α -D-葡萄糖苷、乙基 β -D-葡萄糖苷、Eustomoside、Eustomoside、没食子酸、表没食子儿茶精、表焙儿茶素没食子酸(Epigallocatechin gallate)、Gaudichaudioside F、Gelidoside、染料木黄酮、染料木甙、龙胆苦苷、龙胆酸、Gentomioside、Geshoidin、6'-O- β -D-Glucosylgentiopicricoside、ucozaluzanin C、谷氨酰天冬氨酸、谷氨酰谷氨酸、甘氨酰亮氨酸、致甲状腺肿素、芦竹碱、大海米菊素、苏木素四甲基醚水杨醛葡萄糖(Haematoxylin Tetramethyl Ether Helicin)、十七烷-16-烯、1-乙酰基-2,4-二羟基-十七烷-16-烯、1,2,4-三羟基-组氨酸、L-Hulupone、律草灵酮、律草酮、羟基苯甲酸、4-Hymenoside A、Hymenoside B、Hymenoside C、Hymenoside D、Hymenoside E、Hymenoside F、Isohumulone、顺式-Isohumulone、反式异亮氨酸、L-异羽扇豆烷、异金雀花碱、 β -异金雀花碱、10,17-二氧代- β -异金雀花碱、10-氧代- β -葛苣苦素、

L-亮氨酸、L-丙氨酸-L-丙氨酸-L-亮氨酸、N-[(2R)-6-氨基-2-[(4S)-2,5-二氧代-4-(苯基甲基)-1-咪唑烷基]-1-氧代乙基]-L-亮氨酸-L-甲硫氨酸-N-甲基-L-苯丙氨酸-, (4-1)-内酰胺、L-亮氨酸、甘氨酸-L-丙氨酸-亮氨酸、L-L-亮氨酸、N-(N2-L-亮氨酸-L-谷氨酰胺酰)-L-亮氨酸、N-(N-L-亮氨酸-L-a-谷氨酰)-L-亮氨酸、N-[N2-[N2-[N-(1-L-亮氨酸-L-脯氨酸)-L-苯丙氨酸]-L-天冬酰胺酰]-L-谷氨酰胺酰]-L-亮氨酸、N-[N2-[N-[N-(1-L-亮氨酸-L-脯氨酸)-L-苯丙氨酸]-L-丝氨酸]-L-谷氨酰胺酰]-L-亮氨酸、L-亮氨酸-L-缬氨酸-亮氨酸-亮氨酸、亮氨酸苯丙氨酸、柠檬碱、柠檬碱单内酯 (Limoninmonolactone)、亚麻苦苷、百脉根苷、Lupine、羽扇豆碱、13-羟基-羽扇豆碱、7-羟基-羽扇豆碱、表羽扇豆碱 (Epilupinine), Lupoxes B、Lupoxes C、蛇麻酮、Luputrine、蜂蜜曲菌素、6-甲氧基-甲硫氨酸、L-甲基 α -L-阿糖胞苷、甲基 β -L-阿糖胞苷、甲基 β -D-葡萄糖苷、甲基 α -D-葡萄糖苷 2,3-二-异亮氨酸、甲基 α -D-葡萄糖苷 2,3-二-亮氨酸、甲基 α -D-葡萄糖苷 2,3-二-L-苯丙氨酸、甲基 α -D-葡萄糖苷 2,3-二-苏氨酸、甲基 α -D-葡萄糖苷 2,3-二-酪氨酸、甲基 α -D-甘露糖苷、甲基 β -L-木糖吡喃糖苷、甲基 α -D-木糖苷、柚皮素、新氯原酸、 γ -内酯、新陈皮苷、Nuezhenide、Oleonuezhenide、洋橄榄苦甙、Olivieroside A、Olivieroside B、Olivieroside C、Perrottetin H、苯丙氨酸、L-苯基 α -D-葡萄糖苷、苯基 α -D-葡萄糖苷、苯基 β -D-葡萄糖苷、苯硫脲、糙苏甙 II、吡啶-2-羧酸、4-[(2-羧基-2-羟乙基)硫]-吡啶羧酸-2,4-[(2-羧基-2-羟乙基)硫]-Prehumulone、Prelupulone、丙基 β -D-果糖苷、丙基 α -D-葡萄糖苷、丙基 β -D-葡萄糖苷、原儿茶酸、野黑樱苷、Pulcherrimine、奎尼丁、奎宁、Quinolizinium-7-olate、雷尼替丁、甜叶菊甙 C、水杨苷、柳得洛苷、Scabraside、Scandenoside R5、Sclareolide、东莨菪苷、Septemfidoside、丝氨酸赖氨酸甘氨酸亮氨酸、芥子酸胆碱、茄碱、 α -金雀花碱、金雀花碱、17-氧代-Stevioside A、士的宁、Suavioside C1、Suavioside D2、Suavioside F、蔗糖八乙酸酯、獐牙菜苷、獐牙菜苦苷、

Swertiapunimarin、Taxiphyllin、TFI(呋甾烷、 β -D-半乳糖吡喃糖苷)、茶黄素、茶黄素没食子酸酯A、茶黄素没食子酸酯B、番茄碱、番茄素, α -三环脱氢异律草酮(α -Tricyclodehydroisohumulone)、三叶苷、三羟基苯甲酸、2,4,6-色氨酸、L-尿嘧啶、6-丙基-2-硫-L-缬氨酸、L-精氨酸甘氨酸-L-脯氨酸-L-脯氨酸-L-苯丙氨酸-L-异亮氨酸-(BPIa)缬氨酸、和L-育亨宾。

可能被提及的甜味物质的例子或改变甜味的化合物有茶皂苷E1、乙酰舒泛K、阿力甜、阿司帕坦、CH 401、甘素、赤藻糖醇、胍甜味剂、Isomalt、异麦芽糖基果糖苷、异棉子糖(isoraffinose)、NC 174、Neotame、紫苏糖、苯乙酰甘氨酸-L-赖氨酸、糖精、SC 45647、环己氨基磺酸钠、山梨醇、Sucralose、Sucrononic Acid、Suosan、超阿斯巴甜糖(superaspartame)、甲基 α -L-阿糖胞苷、甲基 β -L-阿糖胞苷、甲基 β -D-葡萄糖苷、甲基 α -D-甘露糖苷、甲基 β -L-吡喃木糖苷、甲基 α -D-木糖苷、甲基 α -D-葡萄糖苷 2,3-二-苏氨酸、甲基 α -D-葡萄糖苷 2,3-二-异亮氨酸、原儿茶酸、洋蓟甙、菝葜苷、甜叶菊甙C、Abrusoside A、Abrusoside B、Abrusoside C、Abrusoside D、Abrusoside E、Apioglycyrrhizin、Araboglycyrrhizin、白元参甙、Brazzein、异株泻根甜味甙、Carnosifloside V、Carnosifloside VI、D. cumminsii、甜茶树甙A、甜茶树甙I、甜甙A、芴-4- α , 6-二羧酸、4- β , 10- α -二甲基-1,2,3,4,5,10-六氢-Gaudichaudioside A、甘草酸、Hernandulcin、Hernandulcin、4 β -羟基-Hesperitin-7-葡萄糖苷二氢查耳酮、Huangqioside E、Huangqioside E、3-羟基根皮苷(3-Hydroxy Phloridzin)、山奈酚、2,3-二氢-6-甲氧基 3-O-醋酸盐、马槟榔甜素、麦芽糖基- α -(1,6)-新桔皮苷二氢查尔酮、罗汉果甙IIE、罗汉果甙III、罗汉果甙IIIE、罗汉果甙IV、罗汉果甙V、11-氧代罗汉果甙V、Monatin、莫尼糖蛋白、甘草酸单铵酯(Monoammonium Glycyrrhizinate, Mag)、Mukurozioside Iib、柑桔苷二氢查尔酮、Neoastilbin、新橙皮苷二氢查尔酮(NHDHC)、

Neomogroside、奥斯拉津、戊二烯、巴西甘草甜素 I、巴西甘草甜素 II、巴西甘草甜素 III、巴西甘草甜素 IV、巴西甘草甜素 V、糙苏甙 I、根皮苷、叶甜素、Polypodoside A、钾镁钙甘草甜素、Pterocaryosides A、Pterocaryosides B、槲皮素、2,3-二氢-3-O-醋酸盐、槲皮素、2,3-二氢-6-甲氧基-槲皮素、2,3-二氢-6-甲氧基-3-O-醋酸盐、甜叶菊甙 A、甜叶菊甙 B、悬钩子甙、Scandenoside R6、赛门甙 I、甘草酸钠 (Sodium glycyrrhizinate)、Steviolbioside、斯替维苷、斯替维苷、 α -糖基 Suavioside A、Suavioside B、Suavioside G、Suavioside H、Suavioside I、Suavioside J、竹芋蛋白、甘草酸三铵 (Triammonium Glycyrrhizinate, TAG)、三叶苷、Selligueain A、苏木精、麦芽糖醇、甘露醇、甲基 α -D-葡萄糖苷 2,3-二-天冬氨酸、苯甲酸、2-(4-二甲基氨基苯甲酰基)-苯甲酸、2-羟基-4-氨基苯甲酸、2-(3-羟基-4-甲氧基苯甲酰基)-甲基 β -D-果糖苷、甲基 α -D-半乳糖苷、甲基 β -D-半乳糖苷、仙茅甜蛋白、Strogin 1、Strogin 2、Strogin 4、奇果甜素、苯乙酸、3,4-二甲氧基-氨基苯甲酸、3-对甲氧基苯甲酸、苯甲醇、3-氨基-4-正丙氧基、3,4-咖啡酸、肉桂酸、二羟基肉桂酸、2,4-阿魏酸、水解瓜尔胶、羟基氨基苯甲酸、2,4-黑曲霉寡糖、甘蔗渣提取物、二羟基苯甲酸、2,3-二羟基苯甲酸、2,4-香豆酸、对二羟基苯甲酸、3,5-羟基苯甲酸、3-Gurmarin、Gymnemasaponin III、Gymnemasaponin IV、Gymnemasaponin V、森林匙羹藤酸 I、森林匙羹藤酸 II、森林匙羹藤酸 III、森林匙羹藤酸 IV、勿甜素、Jujubasaponin II、Jujubasaponin III、丙酸、(-)-2-(4-甲氧基苯氧基)-Ziziphin、乙基麦芽醇、麦芽醇、丁酸、2-氧代-3-甲基-丙氨酸、N-(1-甲基-4-氧代-2-咪唑啉-2-基)肌氨酸苷、Abrusoside E、单甲酯、拉克替醇、Periandrinic acid I 单葡萄糖醛酸化物、Periandrinic acid II (monoglycuronide)、木糖醇、塔格糖、d-苯甲酰氧基乙酸、4-甲氧基 Hoduloside I、4-硝基苯基 α -D-半乳糖苷、4-硝基苯基 α -D-葡萄糖苷、4-硝基苯基 β -D-葡萄糖苷、4-硝基苯基 α -D-吡喃甘露糖苷、尿素、(N-(4-氟基苯基)-N'-((sodiosulfo)甲基)-氯霉素、氯原酸、甲基 α

-D-葡萄糖苷、甲基 α -D-葡萄糖苷 2,3-二-丙氨酸、甲基 α -D-葡萄糖苷 2,3-二-甘氨酸、甲基 α -D-葡萄糖苷 2,3-二-脯氨酸、甲基 α -D-葡萄糖苷 2,3-二-缬氨酸、苯胺、2-丁氧基-5-硝基-苯胺、2-乙氧基-5-硝基-苯胺、2-甲氧基-5-硝基-苯胺、3-硝基-(+)-Baileyanol- β -D-葡萄糖苷- α -D-葡萄糖苷、苯胺、1,3-羟基-4-甲氧基苄基苯胺、2-丙氧基-5-硝基-(P4000) 苯并-1,4-二氧杂环己烷 2-(3-羟基-4-甲氧基苄基)-苯并-1,3-二氧杂环己烷-4-酮 2-(3-羟基-4-甲氧基苄基)-苯甲酸、2-苯甲酰基-4-甲氧基-苯甲酸、2-(4-甲氧基苯甲酰基)-苯并-1,3(4H)-xathiane、2-(3-羟基-4-甲氧基苄基)-苯并-1,4-xathiane 3-(3-羟基-4-甲氧基苄基)-丁酸、4-[3,5-二羟基-4-[3-(3-羟基-4-甲氧基苄基)-1-氧代丙基]苯氧基]-2-羟基-单钠盐、丁酸、4-[3,5-二羟基-4-[3-(3-羟基-4-甲氧基苄基)-1-氧代丙基]苯氧基]-3-氧代-单钠盐、环己二烯-1,4 1-Carboxaldehyde-4-(甲氧基甲基)-、(E) 肟乙苯、 β -(1,3-羟基-4-甲氧基苄基)-Hespertin 二氢查尔酮、3'-羧基-Hespertin 二氢查尔酮、3'-甲酰基-异香豆素、3,4-二氢-3-(3-羟基-4-甲氧基)-紫苏糖、8,9-环氧-苄基 3-羟基-4-甲氧基苯甲基醚、麟酸、[3-[3,5-二羟基-4-[3-(3-羟基-4-甲氧基苄基)-1-氧代丙基]苯氧基]丙基]单钾盐、斯替维苷类似物、氨基磺酸、[2-[3,5-二羟基-4-[3-(3-羟基-4-甲氧基苄基)-1-氧代丙基]苯氧基]乙基]-单钾盐、尿素和 N-(4-氰基苄基)-N'-(2-羧乙基)-L-茶氨酸。

可能提及的鲜味剂有谷胱甘十二碳肽、谷氨酰谷氨酸、(Z)-6-十二碳烯-4-交酯、肌苷酸、十二碳-Z6-烯-4-交酯、谷氨酸、L-乌头酸、N-(1-脱氧-果糖-1-基)谷氨酸盐、水解的植物蛋白质、甲基 α -D-葡萄糖苷、2,3-二-赖氨酸、甲基 α -D-葡萄糖苷 2,3-二-鸟氨酸、L-天冬酰胺、L-a-谷氨酰-L-a-谷氨酰-L-谷氨酸、L-a-天冬氨酰-L-a-谷氨酰-谷氨酰缬氨酸、小麦麸质水解物、天冬氨酸 L-、L-a-天冬氨酰-L-a-天冬氨酰-L-a-天冬氨酰-二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid) 和 (4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z)-L-茶氨酸。

依照本领域已知的技术，通过检测诸如细胞内 IP3 和 Ca^{2+} 等传导

途径参数的变化,或通过诸如用 GTP γ S 标记等其它 G 蛋白特异检测试验,可测定味觉分子对 G 蛋白的功能性影响,这在下文有更充分的描述。

许多功能性的孤儿苦味受体以及甜味和鲜味受体能与本发明的嵌合 G 蛋白偶联。就苦味受体而言,可提及的有那些所谓的 T2Rs 或 TAS2Rs,参阅 Bufo 等, *Nature Genetics* 32: 397-401 或 Chandrashekar 等, *Cell*, 100: 703-711 或 Matsunami, *Nature*, 404: 601-604。同时,就甜味或鲜味受体而言,可提及的有已知的 T1R 受体,参阅 Li, X. 等, 2002, *PNAS USA*, 99: 4692-4696; Nelson, G. et al., 2002, *Nature*, 416: 199-202; 和 Nelson, G. et al., 2001, *Cell*, 101: 381-390。更进一步的,与天然 G α_q 蛋白和上文所提及的那些嵌合 G α_q 蛋白相比较,本发明的嵌合 G 蛋白在配体与给定 GPCR 相结合时能引起更强的细胞应答。

为了说明这一点,可以将用已知为 TAS2R16 并被 Bufo (见上述文献)所描述和定义的已知功能性苦味受体和本发明的嵌合 G-蛋白 G α_{16} -gustducin⁴⁴ 转染了的哺乳动物细胞,如 HEK293T 细胞,按以下流程与 5mM 水杨苷或 5mM 苯基- β -D-葡萄糖吡喃糖苷(二者都是已知的苦味剂)接触,以产生强荧光信号(利用 Flexstation),所述信号比参照的嵌合 G 蛋白(G α_{16-244})强 3 倍,而比野生型 G α_{16} 强约 7 倍。

所述流程参阅“G 蛋白偶联受体(信号传导系列)”编辑: Tatsuya Haga 和 Gabriel Berstein,第一版,第 424 页, CRC Press - Boca Raton FL; 1999 年 9 月,且可总结如下:

1. 第 0 天:每孔用 20K 细胞的量接种 96 孔板并将其在营养型生长培养基中 37℃ 培养过夜。
2. 第 1 天:每孔用 300 ng GPCR DNA 和 0.6 μ l Lipofectamine 2000 (Invitrogen)的量转染细胞。被转染细胞在营养型生长培养基中 37℃ 培养过夜。
3. 第 2 天:丢弃生长培养基,并将细胞用 75 μ l 钙检测溶液保

温1小时(室温黑暗中),所述溶液由溶于在37℃已补充了10 mM Hepes、200 μ M 氯化钙和0.1%牛血清白蛋白, pH 7.4 的 Hanks 平衡盐溶液(HBSS)中的1.5 μ M Fluo-4 AM(Molecular Probes)和2.5mM probenidicid组成。

4. 将溶于 Hanks 平衡盐溶液(HBSS)的2.5 mM probenidicid组成的、且在37℃补充有10 mM Hepes、200 μ M 氯化钙和0.1%牛血清白蛋白, pH 7.4 的125 μ l 漂洗缓冲液加入各孔中,并将平板在室温下黑暗中进一步保温30分钟。

5. 丢弃缓冲溶液并用100 μ l 漂洗缓冲液漂洗平板3次,细胞重悬于200 μ l 漂洗缓冲液中并在37℃保温15分钟。

6. 将平板放置于荧光微量滴定板读数器,例如 Flexstation (Molecular Devices)或 FLIPR (Molecular Devices)上,在加入20 μ l 10X 浓度的配体贮液后起始受体的活化作用。在加入配体前持续监测荧光15秒,在加入配体后监测45-75秒。受体活化水平通过以下两个等式确定为:%活化率=(最大荧光-基线荧光/基线荧光) $\times$ 100 或荧光增加量=最大荧光量-基线荧光量,其中的基线荧光量代表配体加入前的平均荧光水平。

在另一实施例中,使经过已知为小鼠 T2R5 的已知功能性苦味受体和本发明的嵌合 G-蛋白 $G_{\alpha 16}$ -gustducin⁴⁴ 转染的 HEK293T 细胞(参阅 Chandreshekar 等, Cell, 卷100, 70-711, March 17 2000)与10 μ M 环己酰亚胺接触,后者能引起比野生型 $G_{\alpha 16}$ 强5倍的强荧光信号。

在另一实施例中,使经已知的功能性人苦味受体 TAS2R10 和本发明的嵌合 G 蛋白 G_{16} -gustducin⁴⁴ 稳定转染的 HEK293 T-RexTM 细胞(参阅 Bufe 等, Nature Genetics 32: 397-401)接触250 μ M 马钱子碱,后者能引起强荧光信号。

在另一实施例中,使经 TAS2R38 (苯基硫脲的推测苦味受体,参阅 Kim 等, Science 299, 1221-5 和 Bufe 等, Nature Genetics 32: 397-401)和本发明的嵌合 G 蛋白 G_{16} -gustducin⁴⁴ 稳定转染的 HEK293 T-RexTM 细胞接触250 μ M 苯基硫脲,后者能引起强荧光信号。同样的,

250 μ M 丙硫尿嘧啶 (propylthiouracil) 引起了强烈的应答。

在另一实施例中, 使经 TAS2R43 和本发明的嵌合 G 蛋白 G16-gustducin 44 稳定转染的 HEK293 T-Rex™ 细胞接触 10 μ M 马兜铃酸, 后者能引起强荧光信号。

在另一实施例中, 使经 TAS2R44 和本发明的嵌合 G 蛋白 G16-gustducin 44 稳定转染的 HEK293 T-Rex™ 细胞接触 10 μ M 马兜铃酸, 后者能引起强荧光信号。

在更进一步的实施例中, 使经过由人 TAS1R2 和 TAS1R3 的杂二聚体形成的已知功能性甜味受体复合物 (Li, X. et al., 2002, PNAS USA, 99: 4692-4696; Nelson, G. et al., 2001, Cell, 101: 381-390.) 和嵌合 G 蛋白 G $_{\alpha 16}$ -gustducin 44 转染的 HEK293T 细胞接触 2.5 mM 天冬甜素、丁磺氨 K 或 sucralose, 所有这些都能引起比野生型 G $_{\alpha 16}$ 强 2 倍的荧光信号。

所述嵌合构建体可用聚合酶链式反应以本身已知的形式产生。在某一实施方案中, 可使用桥重叠 PCR 诱变策略生产嵌合构建体 (参阅 Mody S. M. et al, 2000, Mol. Pharmacol., 57: 13-23), 为此将引物设计成与 G $_{\alpha q}$ 的一个末端 (如 C 末端) 退火, 并且编码至少 5 个 gustducin 来源的氨基酸。PCR 的嵌合产物可克隆入适当的载体, 例如 pCR2.1-Topo (可购自 Invitrogen) 中, 并进行 DNA 测序, 以证实 G $_{\alpha q}$ 末端的正确置换。

在序列证实后, 可将嵌合 G $_{\alpha q}$ -Gustducin cDNA 片段亚克隆入适当的载体, 如 pcDNA 3.1 哺乳动物表达载体中, 并瞬时转染入哺乳动物宿主细胞 (例如 HEK293T 或 HEK T-Rex™) 中以证实转基因的正确表达。

在后转染期后, 如 48 小时后, 可以制备细胞裂解物, 经蛋白质印迹分析, 以证实嵌合蛋白质的正确表达。一旦证实到正确的蛋白质表达, 就可依照本领域众所周知的技术转染合适的哺乳动物细胞, 如 HEK293T 细胞或 HEK T-Rex™, 从而产生稳定表达的嵌合 G $_{\alpha q}$ -Gustducin。

在实施本发明有关克隆、阐明配体-受体对和发现苦味、甜味或鲜味反应调制器的各个方面和实施方案中, 可以借助分子生物学、微

生物学中的常规技术和重组技术。因此，技术人员完全了解这些技术，下文对这些技术只概略的提及，以便更完整的描述本发明的内容。

为了表达编码 G 蛋白或受体的 cDNAs，通常需将适当的 cDNA 亚克隆入含有指导转录的强启动子、转录/翻译终止子和用于翻译起始的核糖体结合位点的表达载体中。合适的细菌启动子在本领域中是众所周知的，例如大肠杆菌、芽孢杆菌属和沙门氏菌属，而用于这些表达体系的试剂盒已有商品化。类似的，用于哺乳动物细胞、酵母和昆虫细胞的真核表达体系是本领域众所周知的并且也是商品化的。真核表达载体可以是例如腺病毒载体、腺伴随病毒载体或逆转录病毒载体。

除了启动子之外，表达载体通常包含含有在宿主细胞中 G 蛋白或受体编码核酸表达所需的所有附加元件的转录单元或表达盒。因此典型的表达盒包含与编码 G 蛋白或受体的核酸序列可操作性连接的启动子以及转录物有效聚腺苷酸化、核糖体结合位点和翻译终止所需的信号。视具体情况而定，编码 G 蛋白或受体的核酸序列通常可以与膜定向信号连接，诸如大鼠生长激素抑制素-3 受体序列的 N 末端 45 个氨基酸，从而促进重组 G 蛋白或受体的有效的细胞表面表达。额外的元件可以包括，例如增强子。

表达盒还应包含位于结构基因下游的转录终止区，以提供有效的终止。终止区可以与启动子序列获自同一基因或者可以获自不同的基因。

对于 G 蛋白或受体的表达而言，可以使用本领域众所周知用于真核或原核细胞表达的常规载体。载体的例子包括，但不局限于标准细菌表达载体，包括诸如基于 pBR322 的质粒、pSKF、pET23D 等质粒以及诸如 GST 和 LacZ 等融合表达体系。

包含来自真核病毒的调控元件的表达载体通常用于真核表达载体中，如 SV40 载体、巨细胞病毒载体、乳头瘤病毒载体和来自 Epstein-Barr 病毒的载体。其它例证性的真核载体包括 pMSG、pAV009/A. sup.+、pMT010/A. sup.+、pMAMneo-5、杆状病毒 pDSVE、pcDNA3.1、pIRES 和允许在以下启动子指导下进行蛋白质表达的任何

其它载体：SV40 早期启动子、SV40 晚期启动子、金属硫蛋白启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒启动子、劳氏肉瘤病毒启动子、多角体蛋白启动子或显示在真核细胞中对表达有效的启动子。

某些表达体系具有供基因扩增的标记物，诸如胸苷激酶、潮霉素 B 磷酸转移酶和二氢叶酸还原酶。或者，不涉及基因扩增的高效表达体系也是合适的。

表达载体中通常包含的元件也含有能在大肠杆菌中起作用的复制子、编码药物抗性从而便于选择含重组质粒的细菌的基因以及位于质粒的非必需区便于真核序列插入的独特限制性位点。所选择的具体药物抗性基因不是关键的，本领域已知的许多药物抗性基因中任一种都是合适的。非必要地，可以选择原核序列，以便在有必要时使它们不与真核细胞中的 DNA 复制相互干扰。

可使用标准转染方法产生表达大量 G 蛋白或受体的细菌、哺乳动物、酵母或昆虫细胞系，然后用标准方法纯化 G 蛋白或受体。

任何用于将核苷酸序列引入宿主细胞的众所周知的方法都可使用。这些方法包括使用磷酸钙转染、聚凝胺、原生质体融合、电穿孔、脂质体、显微注射、原生质载体、病毒载体和将克隆基因组 DNA、cDNA、合成 DNA 或其它外源遗传物质引入宿主细胞的其它众所周知的任何方法。唯一必需的是所用的具体遗传工程步骤应能将至少一个基因成功的引入能表达受体的宿主细胞中。

例如，可以使用 T-Rex™ 表达体系 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)。T-Rex™ 体系是四环素调控的哺乳动物表达体系，它使用了来自大肠杆菌 Tn10 编码的四环素 (Tet) 抗性操纵子的调控元件 (Hillen and Berens 1994, *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 345-369 ; Hillen et al., 1983, *Control*, *J. Mol. Biol.* 169, 707-721)。在 T-Rex™ 体系中的四环素调控基于的是四环素与 Tet 阻遏子的结合和控制目的基因表达的启动子的去抑制 (Yao et al. 1998, *Hum. Gene Ther.* 9, 1939-1950)。

在将表达载体引入细胞中后，可在标准培养条件下培养被转染的

细胞。可用标准技术从培养物中回收 G 蛋白或受体蛋白。例如，在进行沉淀和层析步骤前，可通过机械方法或渗透休克突然破裂细胞，该方案的特征和顺序将取决于具体的待回收重组物质。或者，可以从已在其中培养过重组细胞的培养基中回收重组 G 蛋白或受体。

受体与配体的结合活性以及 G 蛋白与受体的偶联都可用各种体外和体内检测法检测，以确定功能、化学和物理作用，如，检测配体的结合、第二信使（如 cAMP、cGMP、IP₃、DAG 或 Ca²⁺）、离子流、磷酸化水平、转录水平、神经递质水平，等等。此外，正如本领域众所周知的，这样的检测法可用于测试受体的抑制剂。

可以将经潜在受体抑制剂处理的样品或检测物与不含待测化合物的对照样品比较，以检查调节的程度。对对照样品（未用抑制剂处理）假设相对受体活性值为 100。当受体活性值相对于对照而言更低时即达到了对受体活性的抑制作用，相反，当活性相对于对照而言更高时，受体的活性被增强。

待测化合物对受体功能的影响可通过检查上述任何参数而被测定。任何影响受体活性的适当生理学变化都可用于评估待测化合物对受体与本发明 G 蛋白的偶联的影响。当用完整细胞或动物来测定功能性因果关系时，我们可以检测各种影响，诸如 Ca²⁺、IP₃或 cAMP 等细胞内第二信使的变化。用于进行所述测定的适当检测法参阅在此收编作为参考的 WO 01 18050。

优选用于 G 蛋白偶联受体的检测法包括装载了离子敏感染料以报道受体活性的细胞，在收编于此作为参考的下述文献中对此有更完整的描述：“G 蛋白偶联受体（信号传导系列）G-protein coupled receptors (Signal Transduction Series)”，CRC Press 1999；第一版；编辑 Haga 和 Berstein。在用于鉴定调节性化合物的检测法中，将分别用离子敏感性或膜电压荧光指示剂监测细胞质中离子水平或膜电压的变化。

受体活化通常会起随后的细胞内活动，如，IP₃等第二信使的增加，它将细胞内钙离子的贮备释放出来。某些 G 蛋白偶联受体的活化

通过磷脂酶 C 介导的磷脂酰肌醇的水解刺激了三磷酸肌醇(IP₃)的形成(Berridge & Irvine, Nature 312: 315-21 (1984))。IP₃随后刺激细胞内钙离子贮备的释放。因此,细胞质钙离子水平的变化或诸如 IP₃等第二信使水平的变化都可用于评估 G 蛋白偶联受体的作用。表达所述 G 蛋白偶联受体的细胞可能因细胞内贮备和通过离子通道的活化二者导致呈现提高了的细胞质钙水平,在这样的情况下,尽管不是必需的,但可能期望在任选补充有 EDTA 等螯合剂的无钙缓冲液中进行所述的检测,从而区别释放自内部贮备的钙所产生的荧光反应。

在优选的实施方案中,通过在具有将所述受体与磷脂酶 C 信号转导途径联系起来的上述 G 蛋白的细胞内表达该受体来检测受体活性。任选地,细胞系是 HEK-293,尽管其它的哺乳动物细胞也是优选的,诸如 CHO 和 COS 细胞。通过检测细胞内 Ca²⁺水平的变化来测定味觉传导的调控作用,通过施用与受体相关的分子,胞内 Ca²⁺水平响应于对受体信号传导途径的调控而发生变化。任选用荧光 Ca²⁺指示剂染料和荧光测定成像法测定 Ca²⁺水平的变化。

在另一实施方案中,受体的配体结合结构域可在体外应用于可溶性或固态反应中,以检测配体的结合。可在溶液中,在附着于脂单层或囊泡中固相的双层膜中检测受体或受体结构域中的配体结合。这样,调节剂与受体或结构域的结合可利用分光计数值的变化来进行观察,如荧光、吸收或折射指数;或流体力学(如,形状)、色谱或溶解特性,这在本领域中是普遍已知的。

作为受体调节剂的待测化合物可以是任何小的化学化合物或生物学实体,诸如蛋白质、糖、核酸或脂类。通常,待测化合物是小化学分子。尽管根据各个受体的配体特异性的有关知识,技术人员可以预先选择感兴趣的化合物,但基本上任何化学化合物都可用作本发明检测法中的潜在调节剂或配体。某些优选的化合物已在上文提出。测定法可设计成通过使检测步骤自动化并提供来自任何方便来源的化合物用于检测来筛选大的化学文库,该方法通常以平行的方式进行(如,以微量滴定的形式在微量滴定板上自动检测)。技术人员应了解有许多化

学化合物的供应商。

检测可以用高流通量的筛选方法进行，其中包括提供组合的化学文库或肽文库，所述文库中含有大量潜在的治疗剂或味觉化合物（潜在的配体化合物）。然后如本文所述在一个或多个试验中筛选所说的文库以鉴定展示预期特征性活性的文库成员（具体的化合物种类或亚类）。由此鉴定的化合物可用作前导化合物以进一步研发终产物的调节剂，或自身可用作实际的调节剂。

组合化学文库是化学合成或生物学合成，通过组合诸如试剂等许多化学“构建块”而产生的多样化化合物的集合。例如，线性组合化学文库，诸如多肽文库是通过以所有可能的方式组合一套化学构建块（氨基酸）达到给定的化合物长度（即，在多肽化合物中的氨基酸数目）而形成的。数百万的化学化合物可通过这种化学结构块的组合型混合而合成。

组合型化学文库的制备和筛选对于本领域的技术人员而言是众所周知的，因而在此无需详述。

在本发明的高流通量检测中，可能在一天内筛选多达数千种的不同调节剂或配体。具体而言，微量滴定板的各孔可用于进行针对选定潜在调节剂的独立试验，或，如果要观察浓度或保温时间效应，每 5 - 10 个孔可测试一种调节剂。因此，一个标准微量滴定板可检测约 100（如 96）种调节剂。如果使用 1536 孔平板，那么一个平板就可容易的检测约 100 至约 1500 种不同的化合物。有可能每天检测数个不同的平板；使用本发明的综合体系可能检测筛选多达约 6000 - 20000 种不同的化合物。

上述检测技术所发现的前导化合物或由所说前导化合物形成的研发化合物可直接施用于人受试者以调节味觉。或者，可用制剂的其它成分配制所述化合物以便用于口服，例如，食品和饮料、药品或营养品或顺势疗法制剂（homeopathic preparations）。

待口服化合物的量必须足以在人受试者内产生有益的反应，这可由具体味觉调制器的功效和与具体化合物的施用有关的任何不利副作

用的存在、特性和程度而确定。

以下实施例用于说明本发明。

所有实施例均使用了 HEK293 细胞；对于受体的瞬时转染而言，使用 HEK293T 细胞，而对于受体的稳定转染而言，使用 T-Rex™ HEK293 细胞 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)。

实施例 1:

G_{α16}-gustducin44 嵌合体的产生

用 pcDNA3.1 中的人 G_{α16} 和大鼠 gustducin cDNA 为模板，以 T7 和 SP6 启动子序列作为外侧引物区，通过桥重叠 PCR 诱变构建 G_{α16}gustducin44。所用的基因特异性引物是：

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

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

首先，扩增相应于 G_{α16} 和 gustducin 的两个重叠 PCR 片段。用 16gust44-AS 引物和 T7 引物制备 5' G_{α16} 片段，而 3' gustducin 片段则用 16gust44-S 引物和 SP6 引物制备。将各 PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳分离和纯化。将已纯化的 PCR 产物混合、一起退火并随后用 T7 和 SP6 引物扩增全长的嵌合片段。PCR 混合物中含 1.5mM MgCl₂ 使用来自 Applied Biosystems 的 GeneAmp PCR System 9700，用以下热循环参数扩增 PCR 产物：94°C 45 秒，50°C 90 秒和 72°C 120 秒。将装配好的嵌合 PCR 片段亚克隆入 pcDNA3.1 并通过 DNA 测序和限制性作图检查其完整性。通过用抗 G_{α16} 多克隆抗体 (Torrey Pines Biolabs) 对来自转染细胞的完整细胞裂解物进行蛋白质印迹分析，证实了融合蛋白质的正确表达。

实施例 2

Fluo-4 钙检测

用前一天在每孔中已接种了 20K 被转染细胞且在适当的生长培养基中 37°C 保温过夜的亮底黑色 96 孔平板进行所有的试验。测定时，丢弃生长培养基，并将细胞在于 37°C 已补充了 10 mM Hepes、200μM

氯化钙和 0.1%牛血清白蛋白, pH 7.4 的 Hanks 平衡盐溶液 (HBSS) 中的 1.5 μ M Fluo-4 AM (Molecular Probes) 和 2.5 mM probenid (Sigma-Aldrich) 组成的 75 μ l 钙检测溶液中保温 1 小时 (室温下, 黑暗中)。在装载期开始 1 小时后, 将由溶于在 37°C 已补充了 10 mM Hepes、200 μ M 氯化钙和 0.1%牛血清白蛋白, pH 7.4 的 Hanks 平衡盐溶液 (HBSS) 中的 2.5 mM probenid 组成的 125 μ l 漂洗缓冲液加入各孔中, 将平板进一步在室温下黑暗中保温 30 分钟, 以便使 Fluo-4-AM 完全去酯化。丢弃缓冲液, 平板用 100 μ l 漂洗缓冲液洗 3 次, 最后将细胞重溶于 200 μ l 洗涤缓冲液中, 并在 37°C 保温 15 分钟。为了测试读数, 将平板放置于荧光微量滴定板读数器, 例如 Flexstation (Molecular Devices) 上, 在添加 20 μ l 10X 浓缩的配体贮液后启动受体的活化作用。在加入配体前 15 秒至加入配体后 45 - 75 秒持续监测荧光。受体活化水平用以下两个等式确定: 活化百分数 = (最大荧光读数 - 基线荧光读数 / 基线荧光读数) $\times$ 100, 或者荧光增加值 = 最大荧光读数 - 基线荧光读数, 其中基线荧光值代表配体加入前的平均荧光水平。

实施例 3

针对 T2R 苦味受体的转染

在第 0 天, 将稳定表达 G 蛋白的细胞以每孔 20000 个细胞的量接种于黑色亮底 96 孔板中并在选择性生长培养基中培养过夜。在第 1 天, 将培养基换成无抗生素的生长培养基并用 300 ng GPCR DNA 和 0.6 μ l Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 转染细胞。将细胞培养过夜并于次日用上文实施例 2 中所述的 Fluo-4 钙检测条件进行处理。

实施例 4

针对 T1R 甜味受体的转染

在第 0 天, 将稳定表达 G 蛋白的细胞以每孔 800,000-950,000 个细胞的密度接种于 6 孔板中并在选择性培养基中培养过夜。第 1 天,

将培养基换成无抗生素的生长培养基并用 2 μg T1R2 和 2 μg T1R3 cDNA 以及 10 μl Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 转染细胞。将细胞在无抗生素的生长培养基中维持过夜。第 2 天, 将细胞以每孔 20,000 个细胞的量接种于黑色亮底 96 孔板中, 并培养过夜。进行钙测定的早晨, 用补充了 Glutamax 和透析过的 FBS 的低葡萄糖培养基置换原培养基以使糖和谷氨酸盐的受体脱敏作用最小化。将细胞于 37℃ 在此培养基中再保温 6 小时。在此阶段的最后, 按上述条件处理细胞用于进行钙测定。

实施例 5

在表达不同 G 蛋白的细胞中苦味葡萄糖苷对人 TAS2R16 的活化作用

将 5 mM 苯基-β-D-葡萄糖吡喃糖苷加入表达 hTAS2R16 以及野生型 G_{α16}、本发明 G_{α16gustducin44} 的嵌合体和对照嵌合体 G_{α16z44} 中任一种的细胞中。用人 TAS2R16 苦味受体瞬时转染稳定表达不同 G 蛋白的细胞 24 小时。转染后, 用 Fluo-4 处理细胞, 并按上文实施例 2 中所述检测细胞内钙荧光。持续监测细胞荧光, 并将配体加入前 15 秒中测量的平均荧光值设定为基线, 即未刺激水平的荧光。表达 G_{α16gustducin44} 嵌合体的细胞在经配体刺激后呈现出强于表达 G_{α16} 的细胞的受体活化作用。

表 1: 具有 G 蛋白变体的人苦味受体的功能活性
混杂 G 蛋白

味觉受体	G _{α16gustducin44}	G _{α16}	G _{α16z44}
假转染 (对照)	2162	1024	1541
人 TAS2R16	23821	3494	8296

所有数据均用相对荧光单位(RFUs)表示,并代表了加入配体后基线以上的平均荧光值的增加。配体和所用的终浓度是5 mM 苯基-β-D-葡萄糖吡喃糖苷。用5 mM D-水杨苷也得到类似的结果。

实施例 6

G 蛋白对小鼠苦味受体 (T2R5) 的功能活性

依照实施例 5 中所述的方法得到以下的结果:

表 2: 混杂的 G 蛋白

味觉受体	G _{α16gustducin44}	G _{α16}
假转染 (对照)	3989	1705
小鼠 T2R5	10407	2569

所有数据均以相对荧光单位(RFUs)表示,并代表配体加入后基线以上的平均荧光值的增加。配体和所用的终浓度是10 μM 环己酰亚胺。

实施例 7

在稳定表达 G_{α16gustducin44} 和 TAS2R10 的细胞中马钱子碱对人苦味受体 TAS2R10 的活化作用

本实施例基本上按实施例 5 中所述进行,只是用稳定表达人

TAS2R10 和 G16gust44 的四环素可诱导细胞系代替瞬时转染。细胞保持在 75-80%的密度。获得了以下结果：

表 3 混杂的 G 蛋白

味觉受体	G _{α16gustducin44}
只加入 G 蛋白（对照 w/o 四环素）	13238
G 蛋白+人 TAS2R10（具四环素）	24280

所有数据均以相对荧光单位(RFUs)表示，代表了配体加入后超过基线的平均荧光值的增加。配体和所用的终浓度是 250 μM 马钱子碱。

实施例 8
在稳定表达 G_{α16gustducin44} 和 TAS2R38 的细胞中苯基硫脲或丙硫尿嘧啶对人苦味受体 TAS2R38 的活化作用

本实施例基本上按实施例 5 中所述进行，只是用稳定表达人 TAS2R38 和 G16gust44 的四环素可诱导型细胞系代替瞬时转染。细胞保持在 75-80%的密度。获得了以下结果：

表 4 混杂的 G 蛋白

味觉受体	G _{α16gustducin44}
只加入 G 蛋白（对照 w/o 四环素）	3422
G-蛋白 + 人 TAS2R38（含四环素）	8989

所有数据均以相对荧光单位(RFUs)表示,代表了配体加入后超过基线的平均荧光值的增加。配体和所用的终浓度是 250 μM 苯基硫脲。用 250 μM 丙硫尿嘧啶获得了类似的结果。

实施例 9

具有 G 蛋白的人苦味受体(TAS2R43)的功能活性

本实施例基本上按实施例 5 中所述进行,只是用稳定表达人 TAS2R43 和 G16gust44 的四环素可诱导型细胞系代替瞬时转染。细胞保持在 75-80%的密度。获得了以下结果:

表 5 混杂的 G 蛋白

味觉受体	G _{α16gustducin44}
只加入 G-蛋白	3955
G 蛋白 + 人 TAS2R43	26766

所有数据均以相对荧光单位(RFUs)表示,代表了配体加入后超过基线的平均荧光值的增加。配体和所用的终浓度是 10 μM 的马兜铃酸。

实施例 10

具有 G 蛋白的人苦味受体(TAS2R44)的功能活性

本实施例基本上按实施例 5 中所述进行,只是用稳定表达人 TAS2R44 和 G16gust44 的四环素可诱导型细胞系代替瞬时转染。细胞保持在 75-80%的密度。获得了以下结果:

表 6

混杂的 G 蛋白

味觉受体	G _{α16gustducin44}
只加入 G-蛋白	5700
G 蛋白+ 人 TAS2R44	17254

所有数据均以相对荧光单位 (RFUs) 表示，代表了配体加入后超过基线的平均荧光值的增加。配体和所用的终浓度是 10 μM 的马兜铃酸。

实施例 11

具有 G 蛋白的人甜味受体的功能活性

依照实施例 5 中所述方法获得以下结果：

表 7

混杂的 G 蛋白

味觉受体	G _{α16gustducin44}	G _{α15}
假转染(对照)	1370	643
人 TAS1R2/TAS1R3	4617	1300

所有数据均以相对荧光单位 (RFUs) 表示，代表了配体加入后超过基线的平均荧光值的增加。配体和所用的终浓度是 2.5 μM sucralose。用 2.5 μM 的天冬甜素或丁磺氨 K 获得了类似的结果。

<110> Givaudan SA

<120> G-蛋白

<130> 30069PCT

<150> US 60/434,790

<151> 2002-12-18

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1122

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1122)

<223>

<400> 1

atg gcc cgc tgc ctg acc tgg cgc tgc tgc ccc tgg tgc ctg acg gag 48

1 5 10 15

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

20 25 30

ttg gag cag aag aag cag gac cgc ggg gag ctg aag ctg ctg ctt ttg 144

35 40 45

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

50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

31

<210> 2

<211> 374

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290	295	300	
Ala Glu Ala Ala Lys Arg Phe Ile Leu Asp Met Tyr Thr Arg Met Tyr			
305	310	315	320
Thr Gly Cys Val Asp Gly Pro Glu Gly Ser Asn Leu Lys Lys Glu Asp			
	325	330	335
Lys Glu Ile Tyr Ser His Met Thr Cys Ala Thr Asp Thr Gln Asn Val			
	340	345	350
Lys Phe Val Phe Asp Ala Val Thr Asp Ile Ile Ile Lys Glu Asn Leu			
	355	360	365
Lys Asp Cys Gly Leu Phe			
	370		