

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/566 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710108299.2

[43] 公开日 2007年12月12日

[11] 公开号 CN 101086499A

[22] 申请日 2007.6.7

[21] 申请号 200710108299.2

[30] 优先权

[32] 2006.6.7 [33] EP [31] 06011710.8

[71] 申请人 努特诺瓦营养产品及食品成分有限公司

地址 德国法兰克福

[72] 发明人 迈克尔·克罗恩 霍尔格·津克

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司

代理人 杨青 樊卫民

权利要求书5页 说明书51页 附图4页

[54] 发明名称

调节G蛋白偶联受体活性的化合物的筛选方法

[57] 摘要

本发明涉及用于筛选GPCRs的调节剂的系统。此外它涉及用于在真核宿主细胞中异源表达异源二聚体G蛋白偶联受体(GPCRs)的重组载体系统。其中也包含了优选情况下感受甜味和L-氨基酸味道的工程化GPCRs的功能性表达,或更优选情况下还包括该受体在鉴定功能性配体中的应用。

1. 鉴定 GPCRs 的调节剂的方法，包括下列步骤：

- a、用为一种或多种 GPCR(s)编码的基因序列转化真核宿主细胞，
- b、将转化的宿主细胞在足够使该一种或多种 GPCRs 功能性表达的条件下进行培养，
- c、将培养的以功能性方式表达一种或多种 GPCRs 的宿主细胞与选定的一种或多种 GPCRs 的潜在调节剂相接触，
- d、测量转化的宿主细胞在接触潜在的调节剂时产生的选定的细胞反应，以及
- e、选择诱导特异性反应的鉴定物。

2. 权利要求 1 的方法，其特征在于宿主细胞选自：HEK293（人类胚胎肾脏细胞）、Hela（黑人子宫颈表皮样癌细胞）、HT29（高加索人 II 级结肠腺癌细胞）、A431（人类鳞状上皮细胞癌细胞）、IMR32（高加索人成神经细胞瘤细胞）、K562（高加索人慢性髓性白血病细胞）、U937（高加索人组织细胞淋巴瘤细胞）、MDA-MB-231（高加索人乳腺腺癌细胞）、SK-N-BE(2)（高加索人成神经细胞瘤细胞）、SH-SY5Y（人类成神经细胞瘤细胞）、HL60（人类早幼粒细胞性白血病细胞）、或真核的非人类细胞系例如 CHO-K1（中华仓鼠卵巢细胞）、COS-7（非洲绿猴肾脏细胞，用 SV40 转化）、S49（小鼠淋巴瘤细胞）、Ltk（小鼠 C34/一种结缔组织细胞）、NG108-15（小鼠成神经细胞瘤与大鼠神经胶质瘤的杂交细胞）、B50（大鼠神经组织神经元细胞，ECACC）、C6（大鼠神经胶质瘤细胞）、Jurkat（人类 T 淋巴细胞白血病细胞）、BHK（叙利亚仓鼠肾脏细胞）、Neuro-2a（白化病小鼠成神经细胞瘤细胞）、NIH/3T3（小鼠胚胎成纤维细胞），其中优选为 HEK293（人类胚胎肾脏细胞）、Hela（黑人子宫颈表皮样癌细胞）、CHO-K1（中华仓鼠卵巢细胞）或 Neuro-2a（白化病小鼠成神经细胞瘤细胞）。

3. 前述权利要求中任何一个的方法，其特征在于一种或多种 GPCR(s)是 T1R 类型的 GPCR，特别是 T1R1、T1R2 和/或 T1R3。

4. 前述权利要求中任何一个的方法，其特征在于两种或多种 GPCRs 以至少两种不同的 T1R 类型的 GPCRs 异源共表达的方式表达，优选为 T1R1/T1R3，更优选为 T1R2/T1R3。

5. 前述权利要求中任何一个的方法，其特征在于转化使用多顺反子表达载体来完成，优选为三顺反子或四顺反子克隆载体。

6. 权利要求 5 的方法，其特征在于多顺反子表达载体包含了多顺反子表达单元，所述表达单元含有位于真核宿主表达用启动子的下游、并且在功能上与其相连的下列顺反子：

- a. GPCR₁
- b. GPCR₂，以及
- c. 选择性标记

其中的启动子优选为适合用于选定的宿主细胞的强启动子，更优选情况下选自：巨细胞病毒启动子（P-CMV）、人类延伸因子 1 α 启动子（P-E1 α ）、人类泛素启动子（P-ubi）、猴病毒启动子（P-SV40）、劳氏肉瘤病毒长末端重复序列启动子（P-RSV-LTR）；

其中的 GPCR₁ 和 GPCR₂ 彼此独立，选自 T1R 或 T2R 味觉受体，优选为 T1R 受体组的味觉受体，更优选为 T1R1-T1R3 或 T1R2-T1R3 的组合；

其中的选择性标记选自潮霉素抗性、zeocin 抗性、新霉素抗性、杀稻瘟素抗性或嘌呤霉素抗性；

其中的 GPCR₁ 和 GPCR₂ 以及选择性标记都通过插入 IRES 在功能上相连，IRES 选自：从脑心肌炎病毒衍生的 IRES_{EMCV}（又称 CITE_{EMCV}）、从 GTX 同源域 mRNA 衍生的 IRES_{GTX}、从可冷诱导的 Rbm3 衍生的 IRES_{Rbm3}、从脊髓灰质炎病毒复制原点衍生的 IRES_{PV}、从鼻病毒衍生的 IRES_{RV}、从口蹄疫病毒衍生的 IRES_{FMDV}、从丙型肝炎病毒衍生的

IRE_{HV}、从经典的猪瘟病毒衍生的 IRES_{CSFV}、从牛病毒性腹泻病毒衍生的 IRES_{BVDV}、从弗里德鼠白血病病毒 gag mRNA 衍生的 IRES_{FMLV}、从莫洛尼鼠白血病病毒 gag mRNA 衍生的 IRES_{MMLV}、从人类免疫缺陷病毒 env mRNA 衍生的 IRES_{HIV}、从大豆尺蠖 (*Plautia stali*) 肠病毒衍生的 IRES_{PSIV}、从禾谷缢管蚜 (*Rhopalosiphum padi*) 病毒衍生的 IRES_{RPV}、从卡波西肉瘤相关的疱疹病毒衍生的 IRES_{KSH}，优选为从脑心肌炎病毒衍生的 IRES_{EMCV} (又称 CITE_{EMCV})；

以及其中的多顺反子表达单元被多聚腺苷化信号所终止。

7. 权利要求 5 或 6 的方法，其特征在于多顺反子克隆载体还含有为 G 蛋白、优选为 G- α 15 编码的顺反子，G 蛋白优选位于最后的 GPCR 和选择性标记之间，并且与两者通过权利要求 5 中定义的 IRES 在功能上相连。

8. 前述权利要求中任何一个的方法，其特征在于调节剂选自小分子和/或肽。

9. 前述权利要求中任何一个的方法，其特征在于通过测量细胞内钙水平相对于细胞未与调节剂相接触时的细胞内钙水平的变化来测量细胞反应。

10. 权利要求 9 的方法，其特征在于该变化是增加。

11. 权利要求 9 的方法，其特征在于相对于细胞与甜味化合物而不是调节剂相接触时的细胞内钙水平，该变化是减少，甜味化合物优选选自：葡萄糖、果糖、蔗糖、安赛蜜、糖精、甜蜜素、阿斯巴甜、木糖醇、甜叶菊苷、三氯蔗糖、奇异果甜蛋白、应乐果甜蛋白、植物甜蛋白、紫苏糖、甘草甜素、sucronic acid、P-4000、SC45647、NC174、新橙皮苷芳基丙烯酸酯芳糖和甜味氨基酸。

12. 多参数最适化的核酸分子，该分子编码 GPCR、优选为 T1R 类型的 GPCR、更优选为 T1R1、T1R2 或 T1R3、或功能上等价的受体蛋白。

13. 由 SEQ ID NO: 1 和/或 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列组成的蛋白或功能上等价的蛋白。

14. 权利要求 12 的核酸分子，如 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 之一所述。

15. 与权利要求 14 的分子功能上等价的核酸分子。

16. 含有一个以上为 GPCR 编码的顺反子的多顺反子表达载体。

17. 多顺反子表达载体，其中含有位于真核宿主表达用启动子的下游、并且在功能上与其相连的下列顺反子：

- a. GPCR₁
- b. GPCR₂，以及
- c. 选择性标记

其中的启动子优选为适合用于选定的宿主细胞的强启动子，更优选情况下选自：巨细胞病毒启动子（P-CMV）、人类延伸因子 1 α 启动子（P-E1 α ）、人类泛素启动子（P-ubi）、猴病毒启动子（P-SV40）、劳氏肉瘤病毒长末端重复序列启动子（P-RSV-LTR）；

其中的 GPCR₁ 和 GPCR₂ 彼此独立，选自 T1R 或 T2R 味觉受体，优选为 T1R 受体组的味觉受体，更优选为 T1R1-T1R3 或 T1R2-T1R3 的组合；

其中的选择性标记选自潮霉素抗性、zeocin 抗性、新霉素抗性、杀稻瘟素抗性或嘌呤霉素抗性；

其中的 GPCR₁ 和 GPCR₂ 以及选择性标记都通过插入 IRES 在功能上相连，IRES 选自：从脑心肌炎病毒衍生的 IRES_{EMCV}（又称 CITE_{EMCV}）、

从 GTX 同源域 mRNA 衍生的 IRES_{GTX}、从可冷诱导的 Rbm3 衍生的 IRES_{Rbm3}、从脊髓灰质炎病毒复制原点衍生的 IRES_{Poliovirus}、从鼻病毒衍生的 IRES_{RV}、从口蹄疫病毒衍生的 IRES_{FMDV}、从丙型肝炎病毒衍生的 IRES_{HV}、从经典的猪瘟疫病毒衍生的 IRES_{CSFV}、从牛病毒性腹泻病毒衍生的 IRES_{BVDV}、从弗里德鼠白血病病毒 gag mRNA 衍生的 IRES_{FMLV}、从莫洛尼鼠白血病病毒 gag mRNA 衍生的 IRES_{MMLV}、从人类免疫缺陷病毒 env mRNA 衍生的 IRES_{HIV}、从大豆尺蠖肠病毒衍生的 IRES_{PSIV}、从禾谷缢管蚜病毒衍生的 IRES_{RPV}、从卡波西肉瘤相关的疱疹病毒衍生的 IRES_{KSH}，优选为从脑心肌炎病毒衍生的 IRES_{EMCV}（又称 CITE_{EMCV}）；以及其中的多顺反子表达单元被多聚腺苷化信号所终止。

18. 权利要求 17 的载体，其特征在于多顺反子克隆载体还含有为 G 蛋白或其等价物、优选为 G- α 15 或其等价物编码的顺反子，G 蛋白或其等价物，G 蛋白优选按阅读框架与上述的 GPCR₁ 和/或 GPCR₂ 融合。

19. 用上述权利要求中任何一个的核酸分子、优选为权利要求 16 到 18 中任何一个的载体稳定转染的细胞系。

20. 通过权利要求 1 到 11 的方法鉴定的 GPCR 调节剂。

调节 G 蛋白偶联受体活性的化合物的筛选方法

本发明涉及用于鉴定选定的 G 蛋白偶联受体 (GPCRs) 的调节剂 (刺激剂和拮抗剂) 的筛选方法, 从而鉴定调节剂。在本发明的优选实施方案中, 这些调节剂可以是调味剂。本发明还涉及用于在真核宿主细胞中稳定、异地表达选定的异源二聚体 G 蛋白偶联受体的重组载体系统。本文中公开了工程化 GPCRs 的功能性表达用于感受甜味和 L-氨基酸的味道, 以及该受体在鉴定功能性配体中的应用。

在本说明书中, 引用了大量文件。这些文件、包括制造商的手册和专利申请或专利的内容, 在此以其全文引为参考。

GPCRs 代表了最大的细胞表面受体家族, 在人类基因组中据估计有多达 1000 个基因, 它们的主要特征是具有七次跨膜的构型 (Bockaert 和 Pin, 1999; Pierce 等, 2002)。GPCRs 可以被多种不同的配体激活, 包括肽、蛋白质、脂类、小分子、离子甚至光子。被活化的 GPCRs 改变了其构象, 使其能够催化与 GPCR 偶联的异源三聚体 G 蛋白的 α 亚基上鸟苷二磷酸 (GDP) 与鸟苷三磷酸 (GTP) 的交换。异源三聚体 G 蛋白由 18 种不同的 α 亚基中的一种、5 种不同的 β 亚基中的一种以及 11 种不同的 γ 亚基中的一种组成, 通常按照它们的 α 亚基的性质进行分类, 一般来说分为四种主要的类别: G_s , 它能够活化腺苷环化酶; G_i , 它能够抑制腺苷环化酶; G_q , 它能够活化磷脂酶 C; 以及 $G_{12/13}$, 其具有异源的功能。除了 α 亚基依赖性信号传导之外, β/γ 亚基本身也可以用作信号传导分子。如果考虑到这些受体可以以同源寡聚体或异源寡聚体复合物的形式存在的话, GPCR 依赖性信号传导将变得更加复杂 (George 等, 2002; Milligan 等, 2003; Salahpour 等, 2000)。因此, GPCRs 负责调控广范围的不同的生理过程, 这并不令人吃惊。

最近, GPCRs 在人类的感觉例如视觉、嗅觉和味觉中的作用成为深入研究的主题。尽管 GPCR 视紫红质参与视觉感受感受是近 30 年来了解得最充分的 G 蛋白偶联受体信号传导的例子之一 (Maesa 等, 2003), GPCRs 在嗅觉和苦味以及甜味味觉中的作用在 20 世纪 90 年代才被发现 (Buck 和 Axel, 1991; Firestein, 2001; Lindemann, 1996b; Lindemann, 2001)。

在味觉感受中 GPCR 信号传导的发现与脊椎动物味觉细胞中味觉特异性信号传导的发现有着紧密的联系。在电生理学和生物化学研究中, 显然味觉衍生的信号传导导致了典型的 GPCR 依赖性第二信使的诱导, 例如环核苷 (cAMP, cGMP)、肌醇三磷酸 (IP₃) 或钙 (Kinnamon 和 Cummings, 1992; Kinnamon 和 Margolskee, 1996; Lindemann, 1996a)。GPCRs 参与味觉感受被脊椎动物味觉细胞中特异性表达的 G 蛋白味觉素 (gustducin) 的发现进一步证实 (McLaughlin 等, 1992; Wong 等, 1996)。另一方面, 从基因工程小鼠的研究中已经知道, 感受例如糖精的甜味的能力与小鼠 4 号染色体上所谓的 sac 位点有关 (Bachmanov 等, 2001; Lush, 1989; Lush 等, 1995)。基于这些数据, 显然可以在味觉细胞衍生的缩减的 cDNA 文库中搜索 GPCR 序列标签, 或者通过进行基因组序列扫描来进一步缩小小鼠 sac 位点的范围, 以鉴定 GPCR 类似物作为推测的味觉受体。这两种方法导致发现了大鼠、小鼠和人类的味觉 GPCRs 受体 DNA 序列 T1R1 和 T1R2 (Hoon 等, 1999; Hoon 和 Ryba, 1997) 以及 T1R3 (Kitagawa 等, 2001; Li 等, 2001; Max 等, 2001; Montmayeur 等, 2001; Sainz 等, 2001)。同源性比对显示出这些味觉受体例如同源二聚体代谢型谷氨酸受体 (mGluR)、异源二聚体 γ 氨基丁酸 B 型受体 (GABA_BR) 和同源二聚体细胞外钙受体, 是 C 类 GPCRs 小家族的成员。大多数 C 类受体的共同特点是表现出大的细胞外氨基末端结构域, 由所谓的捕蝇夹模块 (VFTM) 和富含半胱氨酸的结构域 (CRD) 组成, 该 CRD 将 VFTM 与七螺旋结构域相连 (Pin 等, 2003)。此外, 对于这些 C 类受体中的几种, 已经描述了同源或异源的寡聚化现象 (Bai 等, 1998; Kaupmann 等, 1998;

Kunishima 等, 2000; White 等, 1998)。因此, 对于推测的甜味受体 T1R1、T1R2 和 T1R3 试验了 C 类受体的 GPCR 寡聚化特征。

通过在真核细胞系统中进行重组异源表达, 通过钙成像证实了人工偶联的 G 蛋白依赖性信号传导级联系统的功能性表达和味觉特异性的活化。T1R 受体集合起来装配成功能性味觉受体。几项研究的结果显示出异源二聚体 T1R1/T1R2 起谷氨酸 (unami) 和 L-氨基酸受体的作用, 而异源二聚体 T1R1/T1R3 起高亲和性的糖和人工甜味剂受体的作用。具体来说, T1R1 和 T1R3 的异源二聚体共表达产生的味觉受体对鲜味和谷氨酸单钠刺激作出反应, 而 T1R2 和 T1R3 的异源二聚体共表达产生的味觉受体对甜味刺激例如各种糖 (例如葡萄糖和蔗糖)、人工甜味剂 (例如 acesulfam K、cyclamat、糖精) 和甜味素例如应乐果甜蛋白 (monellin)、奇异果甜蛋白 (thaumatin)、植物甜蛋白 (brazzein) 作出反应 (Li 等, 2002; Nelson 等, 2002; Nelson 等, 2001; Zhao 等, 2002)。对于感受苦味的 GPCRs 的鉴定也可以产生类似的报告, 只是到目前为止, 尚未报道这些所谓的 T2R-GPCRs 的同聚或寡聚化 (Meyerhof 等, 2005)。

上面讨论的为负责例如味觉感受的受体编码的基因的鉴定、以及将该基因克隆到适当的载体中用于在真核细胞中表达该蛋白、和用该载体转化该细胞以提高用于 GPCR 调节剂、即上面详细描述的爱体的刺激剂和拮抗剂的筛选系统和/或筛选方法可以在合理的时间内容易地开发出来的期望值。

这可以从本领域内大量的和仍然在增长的专利申请的数量反映出来。

T1R1 的克隆被公开在不同的专利申请中, 例如在 WO 03/025137、WO 00/06952 (它在其中被命名为 GPCR-B3)、US020040191862A1 和 WO2005/033125 中。

T1R2 的克隆被公开在专利申请 WO 03/025137、US020040191862A1 和 US020030040045A1 中。

T1R3 的克隆被公开在专利申请 WO 03/025137、WO 03/025137、US020040191862A1 和 US020030040045A1 中。

用于在真核细胞中表达该蛋白的系统被公开在专利申请 WO 03/025137、WO 00/06952、US020040191862A1、WO2004069191 和 US20030040045A1 中。

用于推测的味道调节剂的筛选系统被公开在专利申请 WO/00/06952、WO2004069191 和 US200300400451A1 中。

但是，关于利用这样的筛选方法/系统成功地鉴定新的调节剂、例如新的人工味道调节剂例如新的甜味剂，尚未有报导。

目前，在发达国家中正在进行的关于肥胖的争论和消费者逐渐增长的健康意识，导致了对与完全用糖类例如蔗糖、葡萄糖、果糖或糖浆例如 HFCS 55 或 42 增甜的产品相比含有显著减少的卡路里的食品和饮料的增长的需求。同时，由于消费者通常不愿意对味道作出妥协，产品应该具有与常规用这些糖类增甜的产品相同的甜味强度和味觉质量。

高强度甜味剂是不含或基本上不含卡路里、并且增甜能力比糖高几倍的物质。高强度甜味剂或高强度甜味剂的混合物被用在食品和饮料中，以在不增加产品的卡路里的同时产生甜味。

最常用的高强度甜味剂不是自然来源的；它们是被偶然发现的、化学合成的。它们中的大多数在许多国家中获得了广泛的批准。这些

物质的例子是例如安赛蜜（acesulfam K）、阿力甜（alitame）、阿斯巴甜（aspartame）、甜蜜素（cyclamate）、新橙皮苷芳基丙烯酰芳精（Neohesperidine Dihydrochalcone）、纽甜（neotame）、糖精（saccharin）和三氯蔗糖（sucralose）。

但是，没有高强度甜味剂的味觉谱能够与糖完全吻合。它们在某些特征例如甜味谱、副味（side taste）和后味（off-taste）特征方面有区别。

已经了解到不同的高强度甜味剂的适当混合可以克服单一高强度甜味剂的部分味道限制。但是，即使在只使用高强度甜味剂的产品中获得了更象食糖的甜味谱，由于缺乏口感和香味减少的特点，仍然可以凭感觉将它们与只含有食糖或其它糖类的对应产品区分开来。因此，对于新的高强度甜味剂仍然存在着需求，其单独或与现有甜味剂混合后能够比现有产品提供与食糖更接近的甜味谱和香味性质。

除了减少卡路里之外，今天的许多消费者还寻求不含人工添加剂或甚至是完全有机的食品和饮料产品。理论上说天然的高强度甜味剂可以满足这种需求。在过去几年中发现了许多天然高强度甜味剂，例如甜叶菊苷（stevioside）、新蛇菊苷（rebaudioside）、植物甜蛋白（brazzein）、奇异果甜蛋白（thaumatin）、罗汉果皂苷（mogroside）、甘草甜素（glycyrrhizin）、monatin、相思子苷（abrusoside）、应乐果甜蛋白（monellin）、叶甜素（phyllodulcin）等。它们是在不同植物中天然存在的物质，可以通过选择性提取步骤获得。除了得到批准的非常有限以及在某些情况下难以在工业规模上提取产物之外，这些产品中都没有一种能够宣称提供类似食糖的味道。事实上，所有这些物质都显示出甜味，但是发作比蔗糖慢得多，甜味持续时间长。大多数这些产品具有强的副味和后味特征，例如苦味、薄荷味或甘草味，或者显示强的冰凉或麻木感觉。因此，一些这些产品、例如奇异果甜蛋白（thaumatin），更象一种香味增强剂而不是甜味剂。两种或多种这些

物质的混合不能够克服这些味道限制。因此，在天然甜味剂领域，对味道谱更接近食糖的新的低强度甜味剂的需求甚至比人造甜味剂领域中更为强烈（O'Brien Nabors, 2001; Leatherhead Food RA, 2000; Grenby, 1996; von Rymon Lipinski 和 Schiweck, 1991）。

因此，在本技术领域中之存在着鉴定和分离能够用作味觉调节剂例如甜味剂的新的物质的需求。

尽管存在上述的问题，但由于这些 GPCRs 在体内的高度重要性以及与该受体相关的许多不同的功能，必须假定可以用本发明的方法鉴定的许多 GPCRs 调节剂可能具有实用价值。

因此，用于该受体调节剂的简单而可靠的筛选系统的可用性是非常重要的。

在多顺反子表达载体中，不同蛋白的编码序列是在仅仅一个启动子的控制之下，不同顺反子通过病毒衍生的内部核糖体进入位点（IRES）或不依赖 Cap 的翻译增强子（CITE）而连接。IRES 或 CITE 可以使翻译起始不依赖于信使 RNA 的 5' 末端，该末端在其他情况下是必需的，该末端被真核的核糖体所识别，并开始其扫描过程，以寻找第一个可接近的翻译起始密码子（Fux 等，2004; Hellen 和 Sarnow, 2001）。到目前为止所描述的多顺反子表达载体基本上都是偶联表达目的基因的双顺反子表达单元，该单元通过不依赖 Cap 的翻译起始位点连接到抗性标记（赋予对例如潮霉素、zeocin、新霉素的抗性），能够在异源哺乳动物表达研究中筛选稳定的细胞系。对于这种方法来说，IRES 或 CITE 依赖性表达载体是可以商购的。

关于哺乳动物系统中真正的多顺反子表达研究的报导以及三顺反子或甚至四顺反子异源表达研究的描述相当稀少，大多数其目的是提高可诱导的蛋白表达，例如用于基因治疗应用。但是在这些先驱性工

作中进行多顺反子表达的大多数是小的和可溶性蛋白例如报告基因（绿色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、红色荧光蛋白、分泌性碱性磷酸酶、分泌性淀粉酶）或工程化的反式激活因子例如用于大环内酯或链阳菌素依赖性表达的反式激活因子、或选择性标记。尽管这些研究目的在于基因治疗应用中的潜在治疗蛋白的表达，但在这些研究中只提到了很少几种具有治疗潜力的基因（例如血管内皮生长因子（VEGF）；癌蛋白 bcl-2）（Fussenegger 等，1998；Hartenbach 和 Fussenegger, 2005；Kramer 等，2003；Moser 等，2000；Weber 等，2005）。

关于味觉受体的表达有一篇报道，是关于小鼠味觉受体（mT2R8/5；mT1R3）的双顺反子表达，这些受体每个与绿色荧光蛋白融合，并通过 IRES 元件与红色荧光蛋白相连。该方法被用于追踪和定位味觉受体在神经元中的表达形式（Sugita 和 Shiba, 2005）。

因此，潜伏在本发明下的技术难题是提供用来筛选 GPCRs 的调节剂的基于细胞的筛选系统，即建立能够成功鉴定某些选定的 GPCRs、优选为 T1R 类型味觉 GPCRs 的重要调节剂的方法。潜伏在本发明下的另一个难题是提供用于分离被鉴定的调节剂而不需要过度负担的手段和方法。

上面提到的技术难题的解决通过提供特征如权利要求所述的实施方案而完成。

因此，本发明的具体的优选实施方案是用于表达异源二聚体 T1R 类型的味觉 GPCRs 的手段和方法，其中这些异源二聚体 T1R 类型的味觉 GPCRs 的表达通过调节 GPCR 编码序列以及它们在多顺反子操纵子中的表达而实现。

上述的难题也可以通过提供鉴定 GPCRs 调节剂的方法而令人吃惊地容易地得到解决，该方法包括下列步骤：

- a. 用编码一种或一种以上 GPCR(s)的基因序列转化真核宿主细胞，
- b. 在足够确保该一种或多种 GPCRs 的功能性表达的条件下对转化的宿主细胞进行培养，
- c. 将培养的以功能性方式表达一种或多种 GPCRs 的宿主细胞与选定的一种或多种 GPCRs 的潜在调节剂相接触，
- d. 测量转化的宿主细胞接触潜在的调节剂时产生的特异性细胞反应，以及
- e. 选择诱导特异性反应的鉴定物 (identify)。

在本发明上下文中，术语“GPCRs 的调节剂”是指一种物质，它如果在体内使用时，将 (a) 通过与选定的 GPCR 结合而触发细胞内反应，或 (b) 在存在甜味化合物的情况下抑制这样的反应。例如，在甜味受体作为选定的 GPCR 的情况下，该调节剂将是味道是甜的物质，或能够增强甜味化合物的甜味的物质，但其本身不甜，或能够抑制甜味物质甜味的物质。

术语“足够确保功能性表达的条件”应该被理解为为了确保 GPCRs 的功能性表达而需要的所有条件的汇总，而不仅仅是细胞培养条件。在本发明的优选实施方案中，该术语形容的用于转化的载体是指三顺反子载体。此外，该表达包含了培养含有功能性 G 蛋白的细胞。在任何情况下，必须确保 GPCR(s)的功能性表达。

术语“功能性表达”或“以功能性方式表达”在本发明的文本中是指选定的受体维持了其受体在体内情况相互作用的同样物质特异性相互作用的能力。

“选定的细胞反应”例如细胞内钙水平的变化应该被理解，它可以通过例如使用染料如 Calcium 3、Fura-2、Fluo-4、Indo-1 或钙依赖性报告蛋白水母发光蛋白 (aequorin) 而容易地被测量。任何与选定的

GPCRs 的活性相关的细胞反应都被涵盖。其它测量 GPCRs 的活性的例子是 (i) 第二信使环腺苷单磷酸 (cAMP) 的活化, 它可以在 GPCR 依赖性的基于细胞的分析中使用发光标签或使用 cAMP 依赖性报告基因 (例如荧光素酶、SEAP 等) 的表达、或利用黑色素细胞技术使用蛙皮肤细胞来定量; (ii) 与靶 GPCR 结合的 β -视紫红质抑制蛋白的测定是在配体诱导的 GPCR 的活化之后通过生物发光共振能量转移 (BRET) 测量、或通过 GFP 标记的 β -视紫红质抑制蛋白的移动成像来进行的; (iii) 测量 GPCR 的刺激剂占有及相应的相关 G 蛋白的活化, 这可以通过使用放射性的、不能被水解的 GTP 的类似物 [35S]GTP γ S 来定量; (iv) 使用反应元件控制的报告基因分析来获得 GPCR 活化的相互联系的途径的读出值, 这些途径包括涉及 MAP 激酶、非受体性酪氨酸激酶、受体性酪氨酸激酶、磷脂酰肌醇 3-激酶和 JNKs 的途径 (Eglen, 2005; Filmore, 2004; Milligan, 2003)。

术语“鉴定物”是指在被鉴定为是 GPCR 或 GPCR 特异性信号传导级联反应的真正调节剂之后的潜在调节剂。

在优选实施方案中, 方法的特点是宿主细胞选自: HEK293 (人类胚胎肾脏细胞)、Hela (黑人子宫颈表皮样癌细胞)、HT29 (高加索人 II 级结肠腺癌细胞)、A431 (人类鳞状上皮细胞癌细胞)、IMR32 (高加索人成神经细胞瘤细胞)、K562 (高加索人慢性髓性白血病细胞)、U937 (高加索人组织细胞淋巴瘤细胞)、MDA-MB-231 (高加索人乳腺腺癌细胞)、SK-N-BE(2) (高加索人成神经细胞瘤细胞)、SH-SY5Y (人类成神经细胞瘤细胞)、HL60 (人类早幼粒细胞性白血病细胞)、或真核的非人类细胞系例如 CHO-K1 (中华仓鼠卵巢细胞)、COS-7 (非洲绿猴肾脏细胞, 用 SV40 转化)、S49 (小鼠淋巴瘤细胞)、Ltk (小鼠 C34/一种结缔组织细胞)、NG108-15 (小鼠成神经细胞瘤与大鼠神经胶质瘤的杂交细胞)、B50 (大鼠神经组织神经元细胞, ECACC)、C6 (大鼠神经胶质瘤细胞)、Jurkat (人类 T 淋巴细胞白血病细胞)、BHK (叙利亚仓鼠肾脏细胞)、Neuro-2a (白化病小鼠成

神经细胞瘤细胞)、NIH/3T3(小鼠胚胎成纤维细胞),其中优选为HEK293(人类胚胎肾脏细胞)、Hela(黑人子宫颈表皮样癌细胞)、CHO-K1(中华仓鼠卵巢细胞)或Neuro-2a(白化病小鼠成神经细胞瘤细胞)。

重要的是宿主细胞表达功能性的G蛋白、优选为G- α 15,这可以是天然的,也可以通过宿主细胞的遗传改变来实现。对真核细胞进行遗传改变的手段在本技术领域内是众所周知的,不需要在此深入讨论。G蛋白例如G- α 15的DNA序列在本技术领域已经被描述了。

本发明的方法的另一个优选实施方案的特点在于一种或多种GPCR(s),其选自T1R或T2R味觉受体,优选为T1R类型的GPCR,特别是T1R1、T1R2和/或T1R3。

本发明的方法的另一个优选实施方案的特点在于两种或多种GPCRs以至少两种不同的T1R类型的GPCRs的异源共表达的形式表达,优选为T1R1/T1R3,更优选为T1R2/T1R3。

本发明的方法的另一个优选实施方案的特点在于使用多顺反子载体实现,优选为三顺反子载体进行转化。

本发明的载体是一种表达载体。术语“表达载体”是指用于转化选定的真核宿主细胞的载体,在转化后表达了该载体编码的一个或多个基因。表达载体可以是例如克隆载体、二元载体或整合载体。表达包括了编码的核酸转录成功能性的(能够翻译的)mRNA。因此,应该存在相应的控制元件,例如促进信使转录的序列(启动子)和(可选的)多聚腺苷化信号。在真核细胞中表达异源基因的手段已经被很好地研究了。

为了增殖这些载体,通常使用原核细胞例如大肠杆菌。因此,尽

管本发明的载体被设计为作为真核细胞中的表达载体而工作，它们也带有在原核细胞中增殖所需的元件，例如复制起点（ori）和抗生素抗性基因，例如 amp^r 、 kan^r 等。在原核细胞中增殖载体的手段在本技术领域内是众所周知的。

可用于本发明的已经商业化的可能的真核表达载体、任选用来在原核宿主中增殖的载体包括：pCR1000、pCDM8、pcDNA1、pcDNA1.1、pcDNA1/Amp、pcDNA1.1/Amp 和 pcDNA1/Neo、pcDNA3、pcDNA3.1、pCDNA3.2、pCDNA6.2、pDEST26、pDEST27、pCR3.1、pCDNA3.1 His、pDisplay（Invitrogen）、pTriEx（pTriEx-2-Hygro）（Novagen）、pSI、pCI（pCI-neo）、pTarget（Promega）、pERV3、pFB-ERV、pCFB-EGSH、pDual、pCMV-Script（Stratagene）、pNEBR（New England Biolabs）、pEAK（Edge Biosystems）。

本发明的方法的另一个优选实施方案的特点在于多顺反子载体包含了多顺反子表达单元，其中含有在真核宿主中表达的启动子的下游，以及在功能上与其相连的下列顺反子：

- a. GPCR_1
- b. GPCR_2 ，以及
- c. 选择性标记

其中的启动子优选为适合用于选定的宿主细胞的强启动子，更优选情况下选自：巨细胞病毒启动子（P-CMV）、人类延伸因子 1α 启动子（P-E 1α ）、人类泛素启动子（P-ubi）、猴病毒启动子（P-SV40）、劳氏肉瘤病毒长末端重复序列启动子（P-RSV-LTR）等；其中的 GPCR_1 和 GPCR_2 彼此独立，选自 T1R 或 T2R 味觉受体，优选为 T1R 受体组的味觉受体，更优选为 T1R1-T1R3 或 T1R2-T1R3 的组合；其中的选择性标记选自潮霉素抗性、zeocin 抗性、新霉素抗性、杀稻瘟素抗性 or 嘌呤霉素抗性；其中的 GPCR_1 和 GPCR_2 以及选择性标记都通过插入的 IRES 在功能上相连，IRES 选自：从脑心肌炎病毒衍生的 IRES_{EMCV}（又称 CITE_{EMCV}）、从 GTX 同源域 mRNA 衍生的 IRES_{GTX}、从可以冷诱

导的 Rbm3 衍生的 IRES_{Rbm3}、从脊髓灰质炎病毒复制原点衍生的 IRES_{PV}、从鼻病毒衍生的 IRES_{RV}、从口蹄疫病毒衍生的 IRES_{FMDV}、从丙型肝炎病毒衍生的 IRES_{HV}、从经典的猪瘟病毒衍生的 IRES_{CSFV}、从牛病毒性腹泻病毒衍生的 IRES_{BVDV}、从弗里德鼠白血病病毒 gag mRNA 衍生的 IRES_{FMLV}、从莫洛尼鼠白血病病毒 gag mRNA 衍生的 IRES_{MMLV}、从人类免疫缺陷病毒 env mRNA 衍生的 IRES_{HIV}、从大豆尺蠖 (*Plautia stali*) 肠病毒衍生的 IRES_{SIV}、从禾谷缢管蚜 (*Rhopalosiphum padi*) 病毒衍生的 IRES_{RPV}、从卡波西肉瘤相关的疱疹病毒衍生的 IRES_{KSH}，优选为从脑心肌炎病毒衍生的 IRES_{EMCV} (又称 CITE_{EMCV})；其中的多顺反子表达单元被多聚腺苷化信号所终止。

术语“功能上与其相连”在本发明的文本中是指被描述的元件被连接在一起以其所希望的方式发挥作用。

本发明的方法的另一个优选实施方案的特点在于多顺反子载体还含有为 G 蛋白或其等价物、优选为 G- α 15 或其等价物编码的基因序列，它被编码为单顺反子单元，由启动子、选定的 G 蛋白的基因和多聚腺苷化位点组成。

本发明的方法的另一个优选实施方案的特点在于多顺反子载体还含有为 G 蛋白或其等价物、优选为 G- α 15 或其等价物编码的基因序列，它被编码为通过附加的 IRES 元件形成的四顺反子排列中的第四个顺反子。

本发明的方法的另一个优选实施方案的特点在于多顺反子载体还含有为 G 蛋白或其等价物、优选为 G- α 15 或其等价物编码的基因序列，其中 G 蛋白优选按阅读框架与上述的 GPCR₁ 和/或 GPCR₂ 融合。

在本发明中，可以使用 G 蛋白例如 G- α 15 或 G- α 16 或其它不加选择的 G 蛋白或 G 蛋白变异体，或内源的 G 蛋白例如味导素 (*gustducin*)，

或其它当与多顺反子编码的 GPCR(s)结合在一起表达时能够产生功能性读出值的 G 蛋白。此外，G- β 和 G- γ 蛋白也可以使用。

带有修饰的 N 末端的 G- α 15 和/或 G- α 16 亚变异体 (subvariant) 在本技术领域内也是众所周知的，因此也可以使用。

基本上任何化学物质都可以在本发明的分析测试中用作潜在的调节剂或配体。被测试用作 G 蛋白偶联受体调节剂的化合物可以是任何小的化学化合物或生物学实体 (例如蛋白、糖 (sugar)、核酸、脂类)。测试化合物一般来说是小的化学分子和肽。通常，用作潜在调节剂的化合物可以溶解在水性或有机 (例如基于 DMSO) 溶液中。通过自动化测试步骤并提供来自任何方便来源的化合物，将测试设计成可以筛选大的化合物文库。典型情况下，分析测试平行地进行，例如在自动化分析测试中在微孔板上以微量形式进行。有许多化学化合物供应商，包括例如 Sigma (St. Louis, Mo.)、Aldrich (St. Louis, Mo.)、Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo.)、Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Switzerland)。化合物也可以通过本技术领域内已知的方法合成。

所谓的高通量筛选方法一般包括提供含有大量潜在治疗化合物 (例如配体或调节剂化合物) 的组合化合物或肽文库。然后将这样的组合化合物文库或配体文库在一个或多个分析测试中进行筛选，以鉴定显示出所需特征活性的文库成员 (例如特定的化学物质种类或亚类)。这样鉴定的化合物可以用作常规的先导化合物，或它们自身可以用作潜在的或实际上的治疗物。

组合化学文库是通过化学合成或生物学合成方法、通过将大量化学建筑模块 (即例如氨基酸这样的试剂) 进行组合而产生的各种不同化学化合物的总和。例如，线性组合文库如多肽或肽文库，可以通过将一组化学建筑模块以每种可能的方式组合成给定的化合物长度 (即多肽或肽化合物中氨基酸的数量) 而形成。通过这种化学建筑模块的

组合混合，可以合成数以百万计的化学化合物。

组合化学文库的制备和筛选对于相关技术领域的专业人员在说是熟知的。组合文库包括但不限于肽文库（例如美国专利 No. 5,010,175; Furka, 1991, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 37:487-493; 以及 Houghton 等, 1991, *Nature*, 354:84-88）。其它用于产生化学多样性文库的化学物质也可以使用。非限制性的化学多样性文库化学物质的例子包括肽（PCT 申请 No. WO 91/019735）、编码肽（PCT 申请 No. WO93/20242）、随机生物寡聚物（PCT 申请 No. WO 92/00091）、苯二氮杂草（美国专利 No. 5,288,514）、diversomer 例如乙内酰脲、苯二氮杂草和二肽（Hobbs 等, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6909-6913）、插烯多肽（vinylogous polypeptide）（Hagihara 等, 1992, *J. Amer. Chem. Soc.*, 114:6568）、带有葡萄糖支架的非肽类的肽模拟物（Hirschmann 等, 1992, *J. Amer. Chem. Soc.*, 114:9217-9218）、小化合物文库的模拟有机合成（Chen 等, 1994, *J. Amer. Chem. Soc.*, 116:2661）、寡聚氨基甲酸酯（Cho 等, 1993, *Science*, 261:1303）、和/或肽基磷酸酯（Campbell 等, 1994, *J. Org. Chem.*, 59:658）、核酸文库（参见 Ausubel、Berger 和 Sambrook, 同前）、肽核酸文库（美国专利 No. 5,539,083）、抗体文库（例如 Vaughn 等, 1996, *Nature Biotechnology*, 14(3):309-314 和 PCT/US96/10287）、碳水化合物文库（例如 Liang 等, 1996, *Science*, 274:1520-1522 和美国专利 No. 5,593,853）、有机小分子文库（例如苯二氮杂草, Baum *C&EN*, 1993 年 1 月 18 日, 33 页; 以及美国专利 No. 5,288,514; 类异戊二烯, 美国专利 No. 5,569,588; 噻唑烷酮和 metathiazanone, 美国专利 No. 5,549,974; 吡咯烷, 美国专利 Nos. 5,525,735 和 5,519,134; 吗啉代化合物, 美国专利 No. 5,506,337; 等）。

用于制备组合文库的装置可以商业购买（例如 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville Ky.; Symphony, Rainin, Woburn, Mass.; 433A Applied Biosystems, Foster City, Calif.; 9050 Plus, Millipore, Bedford, Mass.）。此外,大量的组合文库可以商业购买（例如 ComGenex,

Princeton, N.J.; Asinex, Moscow, Russia; Tripos, Inc., St. Louis, Mo.; ChemStar, Ltd., Moscow, Russia; 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa.; Martek Biosciences, Columbia, Md., 等)。

在一个实施方案中, 本发明以高通量的方式提供了基于固相的体外测试分析, 其中将表达离子通道的细胞或组织连接到固相底物上。在这种高通量测试分析中, 在一天内可能筛选多达几千种不同的调节物或配体。具体来说, 微孔板上的每个孔可以被用来针对选定的潜在调节剂进行单独的测试, 或者, 如果需要观察浓度或保温时间的影响, 每 5 到 10 个孔可以测试一种调节剂。因此, 单个标准微孔板可以测试大约 96 种调节剂。如果使用 1536 孔板, 那么一块板可以容易地测试大约 100 到大约 1500 种不同的化合物。每天有可能分析测试几块不同的板, 因此, 使用上述整合的系统, 测试筛选例如多达 6000 到 20000 种不同的化合物是可能的。

另一方面, 本发明包括了筛选和小分子(例如药物)检测分析测试, 其中包括了能够与给定蛋白、即味道受体多肽或肽结合的小分子的检测或鉴定。特别优选的是适合用于高通量筛选方法的分析测试。

在这种基于结合的检测、鉴定或筛选分析测试中, 功能性测试一般不需要。所有必需的是靶蛋白、优选为基本上纯的, 以及被筛选或测试与蛋白靶结合的化合物(例如配体、药物、小分子)或生物学实体的文库或组。优选情况下, 大多数与靶蛋白结合的小分子由于与蛋白上的功能性区域或位点发生倾向性的、具有较高亲和性的结合, 将以某种方式调节活性。

这样的分析测试的一个例子是基于荧光的热迁移分析(3-Dimensional Pharmaceuticals, Inc., 3DP, Exton, Pa.)在 Pantoliano 等的美国专利 Nos. 6,020,141 和 6,036,920 中有描述;也参见 J. Zimmerman, 2000, Gen. Eng. News, 20(8))。该测试允许检测能够与表达的、优选为

纯化的离子通道多肽结合的小分子（例如药物、配体），检测是基于结合亲和性的测定，而这种测定是通过分析蛋白-药物或配体复合物的热解折叠曲线来进行的。通过这种技术确定的药物或结合分子，如果需要的话，可以进一步通过例如在本文中描述的方法进行分析测试，以确定分子是否影响或调节了靶蛋白的功能或活性。

按照本文描述的方法鉴定的、能够调节或调控本发明的 T1R 多肽的生物学活性或生理学的化合物是本发明的优选实施方案。预计这样的调节化合物可以象上面描述的那样使用。

可以使用本发明的一种或多种 T1Rs 进行的测试另外还包括例如对活细胞使用遗传选择的分析测试、使用全细胞或膜片段或纯化的味觉受体蛋白的分析测试、使用第二信使例如 cAMP 和 IP3 的测试分析、检测视紫红质抑制蛋白在细胞表面的易位的分析、检测由被测试的配体引起的细胞表面受体表达的损失（内化作用）的分析测试、直接的配体结合分析测试、使用抑制剂的竞争性结合分析测试、使用体外翻译蛋白的分析测试、检测结合配体后构象变化的分析测试（例如由蛋白水解作用、荧光或 NMR 所显示）、利用表达味觉 GPCR 或其组合的转基因非人类动物，例如蝇、蠕虫或小鼠的行为学分析测试、利用含有味觉 GPCR 基因的重组病毒感染的细胞进行的分析测试，其中优选测量相对于细胞未与调节剂接触时的细胞内钙水平的细胞内钙水平的变化。

本发明的方法的另一个优选实施方案的特点在于这种变化是增加。

本发明的方法的另一个优选实施方案的特点在于，与当细胞在存在甜味化合物的情况下与调节剂相接触、从而使细胞内钙水平升高到高于只由甜味化合物产生的细胞内钙水平时相比，这种变化是增加。在这种情况下调节剂可以本身是甜的，也可以是无甜味的化合物，其

本身没有能够活化 T1Rs 或其组合的生物活性潜力。甜味化合物优选选自：葡萄糖、果糖、蔗糖、安赛蜜（acesulfam K）、糖精、甜蜜素（cyclamate）、阿斯巴甜、木糖醇、甜叶菊苷、三氯蔗糖、奇异果甜蛋白（thaumatin）、应乐果甜蛋白（monellin）、植物甜蛋白（brazzein）、紫苏糖、甘草甜素、sucronic acid、P-4000、SC45647、NC174、新橙皮苷芳基丙烯酰芳樟（Neohesperidine）和甜味氨基酸，更优选从含有葡萄糖、果糖、蔗糖或木糖醇的组中选择。

本发明的方法的另一个优选实施方案的特点在于，相对于细胞与甜味化合物而不是调节剂接触时的细胞内钙水平，这种变化是减少；甜味化合物优选选自非排他性的下列化合物：葡萄糖、果糖、蔗糖、安赛蜜（acesulfam K）、糖精、甜蜜素（cyclamate）、阿斯巴甜、木糖醇、甜叶菊苷、三氯蔗糖、奇异果甜蛋白（thaumatin）、应乐果甜蛋白（monellin）、植物甜蛋白（brazzein）、紫苏糖、甘草甜素、sucronic acid、P-4000、SC45647、NC174、新橙皮苷芳基丙烯酰芳樟（Neohesperidine）和甜味氨基酸。

本发明的另一个优选实施方案是多种参数最适化的为 GPCR 编码的核酸分子，该 GPCR 优选为 T1R 类型的 GPCR、更优选为 T1R1、T1R2 或 T1R3、或功能上等价的受体蛋白，更优选为由 SEQ ID NO: 1 和/或 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列组成的蛋白或功能上等价的蛋白编码。

优选实施方案中的这些核酸分子具有 SEQ ID NOs 3 和 4 中描述的序列。

与 SEQ ID NOs 3 和 4 中描述的分子功能上等价的核酸分子也包含在本发明中。

在本发明的上下文中，功能上等价的蛋白在体内具有同样的或者非常类似的功能。优选情况下，功能上等价的蛋白在其氨基酸序列中

享有至少 60%、更优选至少 80%、特别是至少 90%、更有利至少 99% 的一致性。

功能上等价的核酸为功能上等价的蛋白编码，并且被最优化以便在真核细胞中表达。根据多参数最优化，密码子用法采用人类基因的密码子偏好。此外，具有非常高 (>80%) 或非常低 (<30%) 的 GC 含量的区域被尽可能避免。在最优化过程中，下列的反式作用序列基元被避免：

- a) 内部 TATA 盒、chi 位点和核糖体进入位点
- b) 富含 AT 或 GC 的序列段
- c) ARE、INS、CRS 序列元件
- d) 重复序列和 RNA 二级结构，以及
- e) (隐蔽的) 剪接供体和受体位点、分支点。

从人类野生型序列 (Wt_hT1R) 开始的最优化过程产生了几种序列；令人吃惊的是在多顺反子表达方法的基础上在产生功能稳定的细胞系方面提供了最好的性能的序列 (sh_T1R) 既不是理论上最适的序列 (opt_hT1R) 也不是野生型序列。这里列举的序列的差别在图 1 中显示为系统发育比对 (使用生物信息学软件 clustal X 产生)，并伴有相关距离矩阵。

本发明的非常优选的实施方案是含有为 GPCR 编码的一个以上顺反子的多顺反子表达载体。

该多顺反子表达载体优选含有在真核宿主细胞中表达的启动子的下游序列，以及在功能上与其相连的下列顺反子：

- a. GPCR₁
- b. GPCR₂，以及
- c. 选择性标记

其中的启动子优选为强启动子，更优选情况下选自：巨细胞病毒

启动子 (P-CMV)、人类延伸因子 1 α 启动子 (P-E1 α)、人类泛素启动子 (P-ubi)、猴病毒启动子 (P-SV40)、劳氏肉瘤病毒长末端重复序列启动子 (P-RSV-LTR) 等；其中的 GPCR₁ 和 GPCR₂ 彼此独立，选自 T1R 或 T2R 味觉受体，优选选自 T1R 受体，更优选为 T1R1-T1R3 或 T1R2-T1R3 的组合；其中的选择性标记选自潮霉素抗性、zeocin 抗性、新霉素抗性、杀稻瘟素抗性 or 嘌呤霉素抗性；其中的 GPCR₁ 和 GPCR₂ 以及选择性标记都通过插入的 IRES 在功能上相连，IRES 选自：从脑心肌炎病毒衍生的 IRES_{EMCV} (又称 CITE_{EMCV})、从 GTX 同源域 mRNA 衍生的 IRES_{GTX}、从可以冷诱导的 Rbm3 衍生的 IRES_{Rbm3}、从脊髓灰质炎病毒复制原点衍生的 IRES_{PV}、从鼻病毒衍生的 IRES_{RV}、从口蹄疫病毒衍生的 IRES_{FMDV}、从丙型肝炎病毒衍生的 IRES_{HV}、从经典的猪瘟病毒衍生的 IRES_{CSFV}、从牛病毒性腹泻病毒衍生的 IRES_{BVDV}、从弗里德鼠白血病病毒 gag mRNA 衍生的 IRES_{FMLV}、从莫洛尼鼠白血病病毒 gag mRNA 衍生的 IRES_{MMLV}、从人类免疫缺陷病毒 env mRNA 衍生的 IRES_{HIV}、从大豆尺蠖 (*Plautia stali*) 肠病毒衍生的 IRES_{PSIV}、从禾谷缢管蚜 (*Rhopalosiphum padi*) 病毒衍生的 IRES_{RPV}、从卡波西肉瘤相关的疱疹病毒衍生的 IRES_{KSH}，优选为从脑心肌炎病毒衍生的 IRES_{EMCV} (又称 CITE_{EMCV})；其中的多顺反子表达单元被多聚腺苷化信号所终止。

本发明的另一个优选实施方案是上面定义的多顺反子载体，此外载体还含有为 G 蛋白、优选为 G- α 15 编码的顺反子，G 蛋白优选位于最后的 GPCR 和选择性标记之间，并且与二者通过上面定义的 IRES 元件功能上相连。

另一个优选实施方案是用本发明的载体转化的细胞系。相应的真核细胞系是两栖动物、蠕虫、昆虫或哺乳动物细胞、例如 CHO、Hela、Hek-293 等的培养细胞、外植体和体内细胞。

优选情况下，宿主细胞选自：HEK293 (人类胚胎肾脏细胞)、Hela

(黑人子宫颈表皮样癌细胞)、HT29(高加索人 II 级结肠腺癌细胞)、A431(人类鳞状上皮细胞癌细胞)、IMR32(高加索人成神经细胞瘤细胞)、K562(高加索人慢性髓性白血病细胞)、U937(高加索人组织细胞淋巴瘤细胞)、MDA-MB-231(高加索人乳腺腺癌细胞)、SK-N-BE(2)(高加索人成神经细胞瘤细胞)、SH-SY5Y(人类成神经细胞瘤细胞)、HL60(人类早幼粒细胞性白血病细胞)、或真核的非人类细胞系例如 CHO-K1(中华仓鼠卵巢细胞)、COS-7(非洲绿猴肾脏细胞,用 SV40 转化)、S49(小鼠淋巴瘤细胞)、Ltk(小鼠 C34/一种结缔组织细胞)、NG108-15(小鼠成神经细胞瘤与大鼠神经胶质瘤的杂交细胞)、B50(大鼠神经组织神经元细胞, ECACC)、C6(大鼠神经胶质瘤细胞)、Jurkat(人类 T 淋巴细胞白血病细胞)、BHK(叙利亚仓鼠肾脏细胞)、Neuro-2a(白化病小鼠成神经细胞瘤细胞)、NIH/3T3(小鼠胚胎成纤维细胞),其中优选为 HEK293(人类胚胎肾脏细胞)、Hela(黑人子宫颈表皮样癌细胞)、CHO-K1(中华仓鼠卵巢细胞)或 Neuro-2a(白化病小鼠成神经细胞瘤细胞)。

此外,本发明的优选实施方案是可以通过本发明的方法鉴定、并通过选自以下的化合物进一步定性的 GPCRs 的调节剂:糖类、甾类化合物、丹宁酸和木酚素、萜烯、醌、大环化合物、杂环化合物、N-杂环化合物和 O-杂环化合物、脂族化合物和聚酮、黄酮类、蛋白、肽和氨基酸、生物碱和芳烃,如前所述。

对本发明进行的导致建立了本发明的方法的深入研究显示出,该味觉受体重组共表达作为真核宿主细胞的稳定成分受到共同的不稳定性的阻碍。尽管对这种现象还远远不能解释,但可能这些 T1R 类型的受体的表达和特异性信号传导以负面方式干扰了这些稳定的宿主细胞的细胞生理学。

在本发明中,不稳定的整合的特征在于在选定的重组细胞系克隆中在前 10 次传代中功能快速丧失。在这前 10 代中,显然越来越多的

选定的重组克隆细胞失去了它们特征性的功能性味觉 GPCR 表达，这由甜味剂诱导的钙诱导作用（由 Fluo-4 测定）的传代依赖性增加降低所证明。与此相反，本发明的稳定的整合子的特征在于它们在至少超过 50 代的过程中显示出该味觉受体的功能性表达，这由选定的表达味觉受体的细胞系克隆中稳定的甜味剂诱导的钙诱导作用（由 Fluo-4 测定）所证明。

根据本发明的说明，很显然，在味剂(tastant)领域中使用和异源多聚体表达味觉受体组合 T1R1/T1R3、更优选为 T1R2/T1R3 来鉴定作为甜味调节剂的化合物，是本发明的特别优选实施方案。

因此，本发明涉及在基于细胞的味剂分析测试中具有活性的重组工程化 T1R 类型的 GPCRs，它们可以通过如下方法获得：（a）改良人类甜味受体（T1Rs）的编码序列；和/或（b）将它们克隆在多顺反子表达单元中以协同表达并同时筛选稳定的真核细胞系统的产生；和/或（c）在与 G 蛋白或 G 蛋白嵌合体形成的异源二聚体表达复合物中标记一个或两个 GPCRs，以确保改善荧光读出值，用于鉴定 GPCR 调节剂、优选为甜味调节化合物。

用于本发明的受体序列在实施例 1 中进一步示例。通过加上前缀将最适化的受体命名为 shT1R2 和 shT1R3。相应的氨基酸序列描述在 SEQ ID NOs1 和 2 中，相应的核酸序列显示在 SEQ ID NOs3 和 4 中。

本发明中克服共表达 GPCRs、优选为在稳定的细胞系生长中的味道受体 T1R2 和 T1R3 的不稳定性的方法是构建多顺反子转录单元。获得用于同时表达本发明的味觉受体和选择性标记的多顺反子表达载体的方法在实施例 2 中进一步示例。如上所述，T1R2/T1R3 表达稳定的细胞系例如 Hek293、CHO、Hela，在发展它们在基于细胞的测试系统中的应用时，受到了即将来临的在持续的真核细胞培养过程和传代数量中的不稳定性的阻碍。在本技术领域内，为了产生稳定的细胞系，

最经常使用的表达载体带有选择性标记，赋予其对例如新霉素、潮霉素、zeocin、杀稻瘟素或嘌呤霉素的抗性，这些选择性标记事实上被编码在同样的质粒载体中，并在独立的启动子控制之下。

如果受体和选择性标记被编码在多顺反子转录单元中，这种情况可以被避免。

但是，到目前为止，已经描述的多顺反子表达载体只是为了用于可诱导的蛋白表达，例如用于基因治疗应用（Fussenegger 等，1998；Moser 等，2000）。

对于本发明来说，两个味觉受体 shT1R2 和 shT1R3 已经被克隆在三顺反子表达单元的第一和第二个位置，同时赋予对选择性标记杀稻瘟素抗性的脱氨基酶基因被克隆在表达单元的第三个位置。三顺反子单元处于强的人类延伸因子 1 α 启动子的控制之下，在第二和第三位置的基因之前有 IRES 元件，以便于它们在产生的 mRNA 中的翻译起始。

到目前为止，用于稳定地功能性地表达膜定位的 GPCRs 的 8kb 的多顺反子表达系统还没有被描述过。通常这些多顺反子系统——已经用于表达更小的基因产物例如荧光素蛋白——的特点是而非化学定量的，随着与启动子距离的增加表达降低。由于味觉 GPCRs 的大小极大地超过 GFP 或目前为止用于三或四顺反子表达系统中的基因的大小，并且 GPCRs 必须被共表达以形成异源二聚体蛋白复合物来作为甜味剂反应受体，因此只使用多顺反子载体、即三或四顺反子载体就在建立本发明的筛选方法中获得了满意的结果，这是深入研究获得的不可预见的和令人吃惊的结果。

在另一个实施方案中，本发明涉及了使用前面提到的多顺反子表达载体产生适合于表达 T1R 多肽的稳定的细胞系，以构建基于细胞的筛选工具，用于在甜味调节剂领域中搜索新的化合物。优选情况下，

细胞含有功能性的 G 蛋白，例如 G- α -15、G- α -16，或嵌合的 G 蛋白、例如具有改变了的 C 末端的 G 蛋白：

a) 置换置换了 G- α 15 的最后 5 个氨基酸：

G- α _15 (EINLL)，用 EYNLV (G- α q 和 G- α 11)、EFNLV (G- α 14)、QYELL (G- α s 和 G- α olf)、DCGLF (G- α i1, G- α i2, G- α t1, G- α t2, 和 G- α gust)、ECGLY (G- α i3)、GCGLY (G- α o1 和 G- α o2)、YIGLC (G- α z)、DIMLQ (G- α 12)、QLMLQ (G- α 13) 置换，或用 ECGLY (G- α 16 i3) 代替的 G- α 16

b) 置换 G- α -16 的最后 44 个羧基末端氨基酸：

G- α 16gust44 (G 蛋白味导素的 44 个氨基酸)

G- α 16z44 (G- α -z 的 44 个氨基酸)

G- α 16C44i2 (G- α -i2 的 44 个氨基酸)

G- α 16C44i3 (G- α -i3 的 44 个氨基酸)

或另一种能够将嵌合受体与细胞内 信号途径或信号蛋白例如磷脂酶 C 偶联的 G 蛋白 (Li 等, 2002; Offermanns, 2003; Offermanns 和 Simon, 1995; Ueda 等, 2003)。为此, 含有功能性 G 蛋白的 HEK 293 细胞用载体 pTrix-Eb_R2R3 转染, 在存在杀稻瘟素的情况下培养, 然后筛选稳定的细胞系。正如实施例 3 中所示, 已经发现这样的细胞对味道刺激表现出反应, 此外, 与用单顺反子 T1R 表达载体衍生的细胞系相比, 这些细胞系能够明显稳定地表达 T1R 多肽。基于表达载体 pTrix-Eb_R2R3 的稳定的细胞系 (参见实施例 3) 对几种人造的甜味剂和天然的甜味导素显示出钙反应。在用杀稻瘟素和 G418 选择的情况下克隆经过 50 代后, 这些反应仍然能够被测量。用单顺反子或双顺反子表达时不能获得这样的结果。单顺反子克隆的 RT-PCR 结果表明在选择性条件下在最初的 5 到 10 代中两种受体都丢失了。稳定的细胞系 HEK_Ga15#17R2R3b #8 也对上面显示的与生理味觉反应相关的甜味剂显示出剂量依赖性的钙反应。

另一个没有预料到的结果是, 这些多顺反子的稳定的味觉受体表

达细胞系非常适合于使用复合微生物提取制备物进行天然化合物筛选。为了分离和制备这样的复合筛选样品，可以使用标准的微生物方法，包括微生物的培养。从这些培养获得的所需的生物活性代谢物可以包括细胞内分子以及分泌到培养基中的分子。取决于所处理的样品的数量，通常可以从下面的不同选项中作出选择：(i) 将整个培养液加热；(ii) 将培养上清液通过高分子量排阻滤膜进行过滤，然后将滤液冷冻干燥；(iii) 用具有不同极性的有机溶剂（例如氯仿、丙酮、甲醇或乙酸乙酯）抽提总培养液（超声、French 压力、细胞破碎高压罐或类似装置）或培养上清液，然后将抽提液蒸发干燥；(iv) 将总培养液或培养上清液与树脂（例如 Amberlite®、XAD-2、XAD-4、XAD-9 等）混合，随后用有机溶剂（例如丙酮、乙酸、丁醇、乙醇、乙酸乙酯、甲醇、聚乙二醇等）进行固相提取，可以通过使用增加的溶剂浓度进行分级，也可以通过使用纯溶剂整批提取而不分级。固相提取物可以直接用于适当的分析测试系统，也可以进一步蒸干，然后在标准的条件下溶解，用于后面的测试，例如在基于细胞的测试中激活味觉受体。这样的细胞中 T1R 受体的激活可以使用任何标准的方法来检测，例如通过检测细胞中 Fluo-4 依赖性的荧光来检测细胞内钙的变化。这种分析测试是本申请中提出的实验发现的基础。

本领域的专业技术人员所熟知的植物提取物也可以以同样的方式来使用。

在图 3 中描述了在 G- α 15 G 蛋白背景中从多顺反子表达质粒 pTrix-Eb-R2R3 衍生的稳定的细胞系的活性。图 3 的数据记录了与其它几种分离的细胞系相比，这些细胞系在基于细胞的测试中，对几种甜味剂例如甜蜜素、D-苯丙氨酸、糖精、安赛蜜、阿斯巴甜和奇异果甜蛋白显示出了 T1R2/T1R3 依赖性的活力。

在另一个实施方案中，本发明涉及了使用 T1R-G 蛋白融合基因来发展 T1R 依赖性的基于细胞的分析测试。已经显示 GPCRs 可以按照阅

读框与不同的多肽融合，而不失去它们的功能性活性（Milligan 等，2003）。从目前的数据不能预见到功能性 G 蛋白与任何 GPCR 的融合会导致比野生型未融合情况下活性提高。但是计划开发 T1R2 和/或 T1R3 融合蛋白，其中 T1R-GPCR 与功能性的 G 蛋白融合，它能够将 T1R 依赖性的信号传导与钙诱导途径相关联，用于实施例 3 中所示例的基于细胞的测试中进行 T1R 依赖性的活性测量。在优选情况下，T1R 融合蛋白含有功能性的 G 蛋白，例如 G- α -15 或前面所定义的那样的嵌合 G 蛋白，或者其它能够将嵌合受体与细胞内信号传导途径或信号蛋白例如磷脂酶 C 相偶联的 G 蛋白（Offermanns, 2003; Offermanns 和 Simon, 1995; Ueda 等，2003）。为了开发这样的基于细胞的分析测试方法，将融合蛋白亚克隆到多顺反子表达载体骨架中，产生了图 4 中描述的表达载体类型 pTriX-Eb-R2Gq-R3。

附图说明：

图 1、使用 Clustal X 软件进行的生物信息比对：比对分析中显示了 T1R 类型的不同的 GPCR 的核苷酸序列。人类的野生型 cDNA 序列被描述为 wt_hT1Rs；在多参数最优化后理论上最适的 cDNA 序列被描述为 opt_hT1Rs；用于稳定细胞系发育的部分最优化 cDNAs 被命名为 sh_T1Rs。核苷酸比对被显示为系统发育树，其中 wt_T1R1 被定义为外群。其中隐含的距离矩阵在下方显示。

图 2、多顺反子真核表达载体 pTriX-Eb-R2R3：味觉受体基因 shT1R2、shT1R3 和杀稻瘟素 S 脱氨基酶 (bsd) 基因的表达处于人类延伸因子 1 α 启动子 (PEF1 α) 的控制之下。为了在翻译水平上进行多顺反子表达，插入了两个内部核糖体进入位点 (Cite I 和 Cite II)。多顺反子单元被猴病毒 40 的多聚腺苷化位点所终止。原核复制原点 (ori) 和卡那霉素抗性基因用于在大肠杆菌中增殖、扩增和选择质粒载体。

图 3、在用 pTriX_Eb_R2R3 转染稳定的 HEK_Ga15#17 (G418) 后，用杀稻瘟素和 G418 筛选了稳定的 HEK_Ga15#17R2R3b #8。该三顺反子的表达对和回收是必需的。于稳定克隆的筛选 8#克隆对几种人工甜味剂和天然甜味蛋白显示出钙反应。

图 4: 多顺反子真核表达载体 pTrix-Eb-R2R3: 味觉受体基因 shT1R2-Gq、shT1R3 和杀稻瘟素 S 脱氨基酶 (bsd) 基因的表达处于人类延伸因子 1 α 启动子 (PEF1 α) 的控制之下。为了在翻译水平上进行多顺反子表达, 插入了两个内部核糖体进入位点 (Cite I 和 Cite II)。多顺反子单元被猴病毒 40 的多聚腺苷化位点所终止。原核复制原点 (ori) 和卡那霉素抗性基因用于在大肠杆菌中增殖、扩增和选择质粒载体。

实验材料和方法

细胞培养

稳定的 HEK293 细胞的瞬时转染/筛选——瞬时和稳定转染可以使用脂类复合物例如磷酸钙沉淀、Lipofectamine/PLUS 试剂 (Invitrogen)、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 或 MIRUS TransIT293 (Mirus Bio Corporation) 按照说明书进行。电穿孔也可以作为真核细胞稳定转染的一种可选方法。

细胞以 4×10^5 细胞/孔的浓度接种在 6 孔板中。用线性化的质粒转染 HEK293 细胞以稳定地表达所需的基因。24 小时后, 用选定的试剂例如 zeocin、潮霉素、新霉素或杀稻瘟素开始进行筛选。将来自 6 孔板的大约 50 到 300 胰蛋白酶消化的转染细胞接种到 100mm 平皿中, 以适合的浓度加入必需的抗生素。细胞在 100mm 细胞培养板上培养, 直到可以看见克隆。这些克隆被筛选用于进一步培养和钙成像。需要花费 4 到 8 周来筛选能够稳定表达所需基因的细胞克隆。

钙成像

使用稳定的 HEK293 细胞进行的 Fluo-4 AM 分析测试: 将稳定的细胞维持在添加了 10%胎牛血清 (Biochrom) 和 4mM L-谷氨酰胺 (Invitrogen) 的 DMEM 高葡萄糖培养基中 (Invitrogen)。用于钙成像的细胞在接种前维持在添加了 10%FBS 和 1x Glutamax (Invitrogen) 的 DMEM 低葡萄糖培养基中 48 小时。48 小时后将这些稳定的细胞用

胰蛋白酶处理（可以用胰蛋白酶-EDTA、Accutase 或 TrypLE），然后以 45000 个细胞/孔的浓度接种在聚 D-赖氨酸包被的 96 孔测试板中（Corning），培养基为添加了 10%FBS 和 1x Glutamax 的 DMEM 低葡萄糖培养基。

24 小时后，细胞上样到另外含有 100 nM Fluo-4（钙感受染料，终浓度为 2 nM ，Molecular Probes）的 Krebs-HEPES（KH）缓冲液的 100 μl 培养基中，放置 1 小时。每个孔中的载样试剂然后用 80 μl KH 缓冲液替换。Krebs-HEPES 缓冲液是一种含有 1.2mM CaCl_2 、 4.2mM NaHCO_3 和 10mM HEPES 的生理盐水溶液。

板中结合了染料的稳定细胞被放置载荧光微孔板读板器中，在加入 20 μl 含有 5x 甜味剂的 KH 缓冲液后监测荧光的变化（激发波长 488nm，发射波长 520nm）。在每次示踪中，在开始扫描后 11.5 秒加入甜味剂，用缓冲液混合两次，继续扫描 32 秒，在每秒收集数据。

数据分析/数据记录——钙的移动被定量为基线水平（F）之上的峰值荧光的变化（ ΔF ）。数据被表示为重复的独立样品的 $\Delta F/F$ 值的平均 S.E.。分析使用微孔板读板器的软件进行。

实施例

提供了下面的实施例来说明优选实施方案，其目的是说明性的，并不对本发明的范围构成限制。在本文提供的 DNA 序列中，单个字母代码 N 或 n 代表四种常用的核苷酸碱基 A、T、C 或 G 中的任何一种。在本文提供的蛋白序列中，单个字母代码 X 或 Xaa 代表了 20 种常用氨基酸残基中的任何一种。

实施例 1：合成的无内含子的 hT1R2 和 hT1R3 cDNA 的合成和设计

人类受体 hT1R2 和 hT1R3 的核苷酸序列是基于它们的野生型编码

DNA_s 设计的，已经按照多参数分析进行了最优化，在最优化中考虑了最适的密码子使用、假设的隐蔽剪接位点、假设的重复序列、以及富含 AT 或 CG 的序列段。基因最优化通常对增强 mRNA 的稳定性、翻译的效率、以及减少 RNA 二级结构以防止转录中止或转录延伸的未成熟的终止等有有利的效果。

到目前为止，仅仅知道甜味异源二聚体受体 T1R2/T1R3 的几个配体的结合位点。因此，编码的受体野生型氨基酸序列在该多参数最优化中保留未变，以保留受体的结合性质。

受体 cDNA_s 的合成和构建是通过装配合成的寡聚核苷酸、然后克隆到标准的 pUC-18 质粒载体中以进一步扩增来进行的。此外，这些核酸也可以通过众所周知的克隆技术在体外克隆（Ausubel 等，1998；Pachuk 等，2000；Sambrook 等，1989；Stemmer 等，1995）。然后通过合成互补链并将链放在一起在适合条件下退火、或利用 DNA 聚合酶使用适合的引物序列加入互补链来获得双链的 DNA 片段。

由于 cDNA_s 是合成产生的，本发明的受体被描述成带有前缀“s”，命名为 shT1R2 和 shT1R3。上述的 T1R 克隆序列以及其它全长和部分 T1R 序列的核酸和氨基酸序列被显示在序列表中。

实施例 2：用于表达味觉受体的多顺反子载体

为了构建多顺反子表达单元，使用了实施例 1 中显示的味觉受体序列。如图 2 所示，三顺反子表达单元处于人类延伸因子 1 α 启动子的控制之下。使用标准的克隆技术克隆了受体 shT1R2 和 shT1R3 的 cDNA 和杀稻瘟素 S 脱氨基酶基因的 cDNA。为了确保该三顺反子单元的每个基因的翻译起始，插入了两个 EMC 病毒衍生的内部核糖体进入位点（IRES，也被称为不依赖 Cap 的翻译增强子（CITE））（Jackson 等，1990；Jang 等，1988）。三顺反子表达单元由猴病毒 40 的多聚腺苷化信号序列所终止。该组成方式允许在仅仅一个启动子的控制之下同时

表达所有 3 个基因。与在稳定的细胞系发育过程中互相独立地整合到不同的染色体位点中的单顺反子转录单元相反，三顺反子转录单元将所有包含的基因整合到一个相同的染色体位点中。由于基因的排列，杀稻瘟素 S 脱氨基酶基因只有在发生全长的转录时才被转录。此外，多顺反子转录单元的极性（Moser 等，2000）可能导致受体基因的平衡的化学计量，在前两个位置上它们的表达比率在 1: 0.7 到 1: 1 的范围内，而第三个位置上的杀稻瘟素 S 脱氨基酶基因与受体基因相比表达程度较低。假定对于功能性异源二聚体受体 shT1R2/shT1R3 来说需要 1: 1 的化学计量比，对受体基因的较小的极性影响将促进所需的化学计量比，而脱氨基酶表达的减少将促进具有增强的转录活性的整合位点。

实施例 3: T1R2/T1R3 依赖性活性的检测

在野生型味觉细胞、例如人类味蕾中，信号转导被推测是通过 G 蛋白味导素（Gustducin）和/或 G- α -i 类型的 G 蛋白转导的。遇到甜味配体时，异源二聚体味觉受体 T1R2/T1R3 与其反应，诱导第二信使分子；或者是对大多数糖类作出反应诱导 cAMP 水平，或者是对大多数人工甜味剂作出反应诱导钙水平（Margolskee, 2002）。

为了分析异源二聚体 T1R2/T1R3 味觉受体的功能和活性，使用了钙依赖性的基于细胞的分析。简单来说，用质粒载体 pTrix-Eb-R2R3（参见实施例 2）在稳定表达小鼠 G- α -15G 蛋白的 HEK293 细胞系中转染了合成的 T1R 类型的的味觉受体（如实施例 1 所示）。将转染的细胞在存在杀稻瘟素的情况下进行培养来筛选表达 T1R2/T1R3 的细胞。

为了测量 T1R2/T1R3 味觉受体依赖性活性，将稳定表达 G- α -15、shT1R2 和 shT1R3 的 HEK293 细胞以 4×10^4 的浓度接种在 96 孔板中，用含有钙敏感性荧光染料 Fluo4-AM (2 μ M) 的 DMEM 培养基在 37°C 下标记 1 小时。为了在荧光读板器中进行测量，培养基更换为 KH 缓冲液，在 37°C 下再保温 15 分钟。标记的细胞的荧光测量在 Novostar 荧

光读板器 (BMG, Offenburg, Germany) 中进行。图 3 中描述的对不同甜味剂的反应被记录为通过第二信使钙的 T1R2/T1R3 依赖性增长所启动的 Fluo4-AM 荧光的增加。在获得每个样品的钙信号后, 钙对甜味剂作出反应产生的移动被定量为从其自身基线荧光水平 (标为 F0) 发生的相对变化 (峰值荧光 F1 - 基线荧光水平 F0, 标为 dF)。相对 RFU 是 dF/F_0 。峰值荧光强度在加入味剂后大约 20-30 秒出现。显示的数据从两次独立的实验获得, 每个数据三份平行样。

参考文献:

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1998)./ 《现代分子生物学手册》 Current protocols in molecular biology.// V. B. Chanada, series ed.// New York: Wiley & Sons./

Bachmanov, A. A., Tordoff, M. G., and Beauchamp, G. K. (2001). “C57BL/6ByJ 和 129P3/J 小鼠的甜味剂偏好性” Sweetener preference of C57BL/6ByJ and 129P3/J mice. /Chem Senses/ 26, 905-13.

Bai, M., Trivedi, S., and Brown, E. M. (1998). “CaR 转染的 HEK293 细胞的细胞表面上细胞外钙感应受体(CaR)的二聚化” Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells./ J Biol Chem/ 273, 23605-10.

Bockaert, J., and Pin, J. P. (1999). “G 蛋白偶联受体的分子修补: 进化上的成功” Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success./ Embo J/ 18, 1723-9.

Buck, L., and Axel, R. (1991). “新的可以编码气味受体的多基因家族: 气味识别的分子基础” A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition./ Cell/ 65, 175-87.

Eglen, R. (2005) “G 蛋白偶联受体的高通量筛选概述” An Overview of High Throughput Screening at G Protein Coupled Receptors./ Frontiers in Drug Design & Discovery/ 1, 97-111.

Filmore, D. (2004). “这是 GPCR 的世界” It's a GPCR world./ Modern Drug Discovery/ , 24-28.

Firestein, S. (2001). “嗅觉系统如何产生嗅觉” How the olfactory system makes sense of scents./ Nature/ 413, 211-8.

Fussenegger, M., Mazur, X., and Bailey, J. E. (1998). “pTRIDENT , 用于哺乳动物细胞中三顺反子基因表达的新的载体家族” pTRIDENT, a novel vector family for tricistronic gene expression in

mammalian cells./ *Biotechnol Bioeng*/ 57, 1-10.

Fux, C., Langer, D., Kelm, J. M., Weber, W., and Fussenegger, M. (2004). “新一代多顺反子表达平台：含有大小最适化的 IRES 元件、能够引导基于核酸内切酶的顺反子交换到慢病毒表达载体中的 pTRIDENT 载体” New-generation multicistronic expression platform: pTRIDENT vectors containing size-optimized IRES elements enable homing endonuclease-based cistron swapping into lentiviral expression vectors./ *Biotechnol Bioeng*/ 86, 174-87.

George, S. R., O’Dowd, B. F., and Lee, S. P. (2002). “G 蛋白偶联受体的寡聚化及其在药物发掘中的潜力” G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery./ *Nat Rev Drug Discov*/ 1, 808-20.

Grenby, T. H. (1996): 《甜味剂进展》（第一版） *Advances in Sweeteners*, 1st edition, Blackie Academic & Professional, London.

Hartenbach, S., and Fussenegger, M. (2005). “自身调控的、双向的、多顺反子的、可用 gas 诱导的哺乳动物以及慢病毒表达载体” Autoregulated, bidirectional and multicistronic gas-inducible mammalian as well as lentiviral expression vectors./ *J Biotechnol*/ 120, 83-98.

Hellen, C. U., and Sarnow, P. (2001). “真核 mRNA 分子中的内部核糖体进入位点” Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules./ *Genes Dev*/ 15, 1593-612.

Hoon, M. A., Adler, E., Lindemeier, J., Battey, J. F., Ryba, N. J., and Zuker, C. S. (1999). “推定的哺乳动物味觉受体：一类具有独特的拓扑选择性的味觉特异性的 GPCR” Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. /*cell*/ 96, 541-51

Hoon, M. A., Ryba, N. J., (1997) “来自味蕾富集的 cDNA 文库的克隆的部分序列的分析和比较” Analysis and comparison of partial sequences of clones from a taste-bud-enriched cDNA library./ *J Dent Res*/

76, 831-8.

Jackson, R. J., Howell, M. T., and Kaminski, A. (1990). “微小 RNA 病毒 RNA 翻译起始的新机制” The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation./ *Trends Biochem Sci*/ 15, 477-83.

Jang, S. K., Krausslich, H. G., Nicklin, M. J., Duke, G. M., Palmenberg, A. C., and Wimmer, E. (1998). “脑心肌炎病毒 RNA 的 5' 非翻译区的片段在体外翻译中指导核糖体的内部进入” A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation./ *J Virol*/ 62, 2636-43.

Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., Karschin, A., Bettler, B. (1998). “GABA(B)受体亚型装配成功能性异源多聚体复合物” GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes./ *Nature*/ 396, 683-7.

Kinnamon, S. C., and Cummings, T. A. (1992). “味觉中的化学感受转导机制” Chemosensory transduction mechanisms in taste./ *Annu Rev Physiol*/ 54, 715-31.

Kinnamon, S. C. and Margolskee, R. F. (1996). “味觉转导的机制” Mechanisms of taste transduction./ *Curr Opin Neurobiol*/ 6, 506-13.

Kitagawa, M., Kusakabe, Y., Miura, H., Ninomiya, Y., and Hino, A. (2001). “候选的甜味受体基因的分子遗传学鉴定” Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste./ *Biochem Biophys Res Commun*/ 283, 236-42.

Kramer, B. P., Weber, W., and Fussenegger, M. (2003). “哺乳动物细胞中用于不连续的多水平的转基因控制的人工调控网络和级联反应” Artificial regulatory networks and cascades for discrete multilevel transgene control in mammalian cells./ *Biotechnol Bioeng*/ 83, 810-20.

Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H., and Morikawa, K. (2000). “二聚体代谢型谷氨酸受体识别谷氨酸的结构基础” Structural basis of

glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor./ *Nature*/ 407, 971-7.

Leatherhead Food RA (2000). 《甜味剂成分手册》（第二版）
Ingredients Handbook Sweeteners, 2nd edition, Leatherhead Publishing,
Leatherhead, Surrey.

Li, X., Inoue, M., Reed, D. R., Huque, T., Puchalski, R. B., Tordoff,
M. G., Ninomiya, Y., Beauchamp, G. K., and Bachmanov, A. A. (2001).
“小鼠远端 4 号染色体上糖精喜好位点 (Sac) 和假设的甜味受体
(T1R1) 基因 (Gpr70) 的高分辨率遗传作图” High-resolution genetic
mapping of the saccharin preference locus (Sac) and the putative sweet
taste receptor (T1R1) gene (Gpr70) to mouse distal Chromosome 4./
Mamm Genome/ 12, 13-6.

Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M., and Adler, E.
(2002). “人类的甜味和鲜味受体” Human receptors for sweet and umami
taste./ *Proc Natl Acad Sci USA*/ 99, 4692-6.

Lindemann, B. (1996a). “化学感受：品尝甜味和苦味”
Chemoreception: tasting the sweet and the bitter./ *Curr Biol*/ 6, 1234-7.

Lindemann, B. (1996b). “味道感受” Taste reception./ *Physiol Rev*/
76, 718-66.

Lindemann, B. (2001). “味觉中的受体和转导” Receptors and
transduction in taste./ *Nature*/ 413, 219-25.

Lush, I. E. (1989). “小鼠中味觉的遗传学，VI、糖精、安赛蜜、
对乙氧基苯胺和蔗糖” The genetics of tasting in mice. VI. Saccharin,
acesulfame, dulcin and sucrose./ *Genet Res*/ 53, 95-9.

Lush, I. E., Hornigold, N., King, P., and Stoye, J. P. (1995). “小鼠中
味觉的遗传学，VII、重访甘氨酸，以及 Sac 和 Soa 的染色体定位” The
genetics of tasting in mice. VII. Glycine revisited, and the chromosomal
location of Sac and Soa./ *Genet Res*/ 66, 167-74.

Maeda, T., Imanishi, Y., and Palczewski, K. (2003). “视紫红质的磷
酸化：30 年后” Rhodopsin phosphorylation: 30years later./ *Prog Retin Eye*

Res/ 22, 417-34.

Margolskee, R. F. (2002). “苦味和甜味转导的分子机制”Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction./ *J Biol Chem*/ 277, 1-4.

Max, M., Shanker, Y. G., Huang, L., Rong, M., Liu, Z., Campagne, F., Weinstein, H., Damak, S., and Margolskee, R. F. (2001). “编码一种新的候选味觉受体的 Tas1r3 与甜味反应性位点 Sac 是等位的” Tas1r3, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus Sac./ *Nat Genet*/ 28, 58-63.

McLaughlin, S. K., McKinnon, P. J., and Margolskee, R. F. (1992). “味导素是与转导蛋白相近的味觉细胞特异性 G 蛋白” Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins./ *Nature*/ 357, 563-9.

Meyerhof, W., Behrens, M., Brockhoff, A., Bufe, B., and Kuhn, C. (2005). “人类的苦味感觉” Human bitter taste perception./ *Chem Senses*/ 30 Suppl 1, i14-i15.

Milligan, G. (2003). “配体调控的 G 蛋白偶联受体的高浓度测试” High-content assays for ligand regulation of G-protein-coupled receptors./ *Drug Discov Today*/ 8, 579-85.

Milligan, G., Ramsay, D., Pascal, G., and Carrillo, J. J. (2003). “GPCR 的二聚体化” GPCR dimerisation./ *Life Sci*/ 74, 181-8.

Montmayeur, J. P., Liberles, S. D., Matsunami, H., and Buck, L. B. (2001). “临近甜味位点的候选味觉受体基因” A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus./ *Nat Neurosci*/ 4, 492-8.

Moser, S., Schlatter, S., Fux, C., Rimann, M., Bailey, J. E., and Fussenegger, M. (2000). “pTRIDENT 多顺反子表达载体更新：含有新的杀链霉素反应性启动子的 pTRIDENT ” An update of pTRIDENT multicistronic expression vectors: pTRIDENTs containing novel streptogramin-responsive promoters./ *Biotechnol Prog*/ 16, 724-35.

Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N. J., and Zuker, C. S. (2002). “氨基酸味觉受体” An amino-acid

taste receptor./ *Nature*/ 419, 199-202.

Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J., and Zuker, C. S. (2001). “哺乳动物甜味受体” Mammalian sweet taste receptors./ *Cell*/ 106, 381-90.

O'Brien Nabors, L. (2001). 《可以选择的甜味剂》（第三版）*Alternative Sweeteners*, 3rd edition, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.

Offermanns, S. (2003). “G 蛋白在跨膜信号传导中作为转导者” G-protein as transducers in transmembrane signaling./ *Prog Biophys Mol Biol*/ 83, 101-30.

Offermanns, S., and Simon, M. I. (1995). “G α 15 和 G α 16 将广泛的受体与磷脂酶 C 偶联” G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C./ *J Biol Chem*/ 270, 15175-80.

Pachuk, C. J., Samuel, M., Zurawski, J. A., Snyder, L., Phillips, P., and Satishchandran, C. (2000). “链反应克隆：定向连接多个 DNA 片段的一步法” Chain reaction cloning: a one-step method for directional ligation of multiple DNA fragments./ *Gene*/ 243, 19-25.

Pierce, K. L., Premont, R. T., and Lefkowitz, R. J. (2002). “七次跨膜的受体” Seven-transmembrane receptors./ *Nat Rev Mol Cell Biol*/ 3, 639-50.

Pin, J. P., Galvez, T., and Prezeau, L. (2003). “3/C G 蛋白偶联受体家族的进化、结构和活化机制” Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors./ *Pharmacol Ther*/ 98, 325-54.

Sainz, E., Korley, J. N., Battey, J. F., and Sullivan, S. L. (2001). “鉴定 T1R 家族的假设的味觉受体的新成员” Identification of a novel member of the T1R family of putative taste receptors./ *J Neurochem*/ 77, 896-903.

Salahpour, A., Angers, S., and Bouvier, M. (2000). “G 蛋白偶联受体寡聚化的功能重要性” Functional significance of oligomerization of G-protein-coupled receptors./ *Trends Endocrinol Metab*/ 11, 163-8.

Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). 《分子克隆实验指南》（第二版）Molecular cloning. A Laboratory Manual. /In: second ed.//Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. NY./

Stemmer, W. P., Cramer, A., Ha, K. D., Brennan, T. M., and Heyneker, H. L. (1995). “从大量寡聚脱氧核苷酸中一步装配基因和整个质粒” Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides./ *Gene*/ 164, 49-53.

Sugita, M., and Shiba, Y. (2005). “遗传示踪显示出苦味和甜味神经通路的隔离” Genetic tracing shows segregation of taste neuronal circuitries for bitter and sweet./ *Science*/ 309, 781-5.

Ueda, T., Ugawa, S., Yamamura, H., Imaizumi, Y., and Shimada, S. (2003). “味觉受体细胞中 T2R 味觉受体与表达的 G 蛋白 α 亚基之间的功能性相互作用” Functional interaction between T2R taste receptors and G-protein alpha subunits expressed in taste receptor cells./ *J Neurosci*/ 23, 7376-80.

Von Rymon Lipinski, G.-W., Schiweck, H. (1991). Handbuch Süßungsmittel-Eigenschaften und Anwendung, Behr's Verlag, Hamburg.

Weber, W., Malphettes, L., de Jesus, M., Schoenmakers, R., El-Baba, M. D., Spielmann, M., Keller, B., Weber, C. C., van de Wetering, P., Aibel, D., Wurm, F. M., and Fussenegger, M. (2005). “工程化的链霉菌密度感应元件能够在哺乳动物细胞中实现可诱导的 siRNA 介导的翻译控制,并能够在小鼠中实现可调节的转录控制” Engineered Streptomyces quorum-sensing components enable inducible siRNA-mediated translation control in mammalian cells and adjustable transcription control in mice./ *J Gene Med*/ 7, 518-25.

White, J. H., Wise, A., Main, M. J., Green, A., Fraser, N. J., Disney, G. H., Barnes, A. A., Emson, P., Foord, S. M., and Marshall, F. H. (1998). “异源二聚体化对于功能性 GAGA (B) 受体的形成是必需的” Heterodimerization is required for the formation of a functional GAGA(B) receptor./ *Nature*/ 396, 679-82.

Wong, G. T., Gannon, K. S., and Margolskee, R. F. (1996). “味导素介导的苦味和甜味的转导” Transduction of bitter and sweet taste by gustducin./ *Nature*/ 381, 796-800.

Zhao, F. L., Lu, S. G., and Herness, S. (2002). “咖啡因对味觉受体细胞中电压依赖性的电流和细胞内的钙的双重作用” Dual action of caffeine on voltage-dependent currents and intracellular calcium in taste receptor cells./ *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*/ 283, R115-29.

 序列表

<110> 努特诺瓦营养产品及食品成分有限公司 (Nutrinova Nutrition Specialties & Food Ingredients GmbH)

<120> 调节 G 蛋白偶联受体活性的化合物的筛选方法 (Screening methods for compounds that modulate the activity of G-protein coupled receptors)

<130> SPI072427-47

<140> EP06011710.8

<141> 2006-06-07

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 839

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Pro Arg Ala Lys Thr Ile Cys Ser Leu Phe Phe Leu Leu Trp
1 5 10 15

Val Leu Ala Glu Pro Ala Glu Asn Ser Asp Phe Tyr Leu Pro Gly Asp
20 25 30

Tyr Leu Leu Gly Gly Leu Phe Ser Leu His Ala Asn Met Lys Gly Ile
35 40 45

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 Val 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 Gly His Leu Gly

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

Pro Lys Val Ser Thr Cys Leu Cys Arg Gln Ala Leu Phe Pro Leu Cys
625 630 635 640

Phe Thr Ile Cys Ile Ser Cys Ile Ala Val Arg Ser Phe Gln Ile Val
645 650 655

Cys Ala Phe Lys Met Ala Ser Arg Phe Pro Arg Ala Tyr Ser Tyr Trp
660 665 670

Val Arg Tyr Gln Gly Pro Tyr Val Ser Met Ala Phe Ile Thr Val Leu
675 680 685

Lys Met Val Ile Val Val Ile Gly Met Leu Ala Thr Gly Leu Ser Pro
690 695 700

Thr Thr Arg Thr Asp Pro Asp Asp Pro Lys Ile Thr Ile Val Ser Cys
705 710 715 720

Asn Pro Asn Tyr Arg Asn Ser Leu Leu Phe Asn Thr Ser Leu Asp Leu
725 730 735

Leu Leu Ser Val Val Gly Phe Ser Phe Ala Tyr Met Gly Lys Glu Leu
740 745 750

Pro Thr Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Phe Ile Thr Leu Ser Met Thr Phe
755 760 765

Tyr Phe Thr Ser Ser Val Ser Leu Cys Thr Phe Met Ser Ala Tyr Ser
770 775 780

Gly Val Leu Val Thr Ile Val Asp Leu Leu Val Thr Val Leu Asn Leu
785 790 795 800

Leu Ala Ile Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Pro Lys Cys Tyr Met Ile Leu
805 810 815

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> 2

<211> 852

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

<210> 3

<211> 2523

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Multiparameter optimized nucleic acid molecule

<400> 3

```

atgggcccta gagccaagac aatctgcagc ctgtttttcc tgctgtgggt gctggccgag      60
cccgccgaga atagcgactt ttacctgcc ggcgactatc tgctgggcgg cctgttcagc      120
ctgcacgcca atatgaagg gatcgtgcac ctgaattttc tgcaagtccc aatgtgtaaa      180
gaatacgaag taaaagtgat cggctacaat ctgatgcagg ctatgagatt tgccgtggag      240
gaaatcaata acgactcctc cctgctgcc ggcgtgctcc tcggctacga gattgtggac      300
gtctgttaca tcagcaaca cgtgcagccc gtctgttatt ttctggcca cgaggataat      360
ctgctgccta tccaggagga ttactccaac tacatcagcc gcgtgggtggc cgtgatcggc      420
cccgacaaca gcgagagcgt gatgaccgtg gccaattttc tgagcctggt cctgctgcc      480
cagatcacat actccgccat ctccgacgag ctgagggaca aagtgagatt ccccgccctg      540
ctgagaacca ccccttctgc cgatcacat gtggaagcta tggccagct catgctccat      600
ttccgctgga attggattat cgtcctggtg tcctccgata cctacggcag agataacgga      660
cagctgctgg gagagcgcgt ggccagacgg gatatctgta ttgccttca ggaaaccctg      720
cctaccctgc agcctaata gaatatgacc agcaggagc ggagagact cgtgacaatc      780
gtgataaac tccagcagtc caccgccaga gtggtgggtg tggtcagccc cgatctgaca      840
ctgtatcatt tttttaacga agtgctgagg caaaatttca ccggggctgt gtggattgcc      900
agcgaagct gggccattga tcccgtgctg cacaatctga ccgaactggg gcacctgggc      960
acatttctcg ggatcacaat ccagtcctg cctatccctg gcttttccga gttcaggag      1020
tggggacctc aggccggacc cccccactg agcagaacct ccagtccta cacctgtaat      1080
caggagtgtg ataattgtct gaatgccacc ctgagcttca ataccatcct gcggctgagc      1140
ggcgagagag tgggtgtactc cgtgtacagc gccgtgtacg ccgtggcca cgctctgcac      1200
tcctgctgg gctgcgataa gtccacctgc acaaagcgcg tgggttatcc ttggcagctc      1260

```

ctggaggaaa tttggaaagt gaacttcacc ctgctggatc atcagatctt ctttgacccc 1320
cagggcgatg tggcactgca cctggaaatc gtgcaatggc agtgggacag atcccagaac 1380
ccctttcagt ccgtggccag ctactatcct ctccagaggc agctcaagaa tatccaggat 1440
atcagctggc acacagtgaa taataccatc cccatgagca tgtgcagcaa gagatgccag 1500
agcggccaga agaagaaacc cgtggggatt cacgtgtgct gttttgagtg tattgattgc 1560
ctgcctggga ccttcctgaa tcacaccgag gacgagtacg agtgtcaggc ctgtcccaac 1620
aatgagtgga gctaccagtc cgagaccagc tgctttaagc gccagctcgt gtttctggag 1680
tggcacgagg ccctacaat tgccgtggca ctgctggctg ctttgggctt tctgtccaca 1740
ctggctatc tggatgatctt ttggagacac tttcagacc ccatcgtgag aagcgcgga 1800
ggccctatgt gttttctcat gctcacctg ctgctcgtcg cctatatggt ggtgcccgtg 1860
tatgttggcc ctcccaaagt gagcacctgc ctgtgtagac aggccctgtt cccctgtgt 1920
ttcaccatct gcatcagctg catcgccgtg aggagcttc agatcgtgtg tgcctttaag 1980
atggcctccc ggttccccag agcctactcc tactgggtga gataccaggg cccttacgtg 2040
agcatggcct tcataccgt gctgaagatg gtgatcgtgg tcatacggat gctggctacc 2100
ggcctgagcc ctaccaccag aaccgacccc gacgatccta agattacat cgtgagctgc 2160
aaccccaatt acaggaactc cctgctgttt aatacctctc tggatctgct gctgagcgtg 2220
gtgggcttct ctttcgcta tatggggaag gaactgccta ccaattacaa tgaagctaag 2280
tttatacccc tgtccatgac cttttacttc acaagcagcg tgagcctgtg cacctttatg 2340
agcgcctact ccggcgtgct ggtgacaatc gtcgatctgc tggtgaccgt gctgaatctg 2400
ctggccatct ctctgggcta ttttgggctt aagtgttaca tgattctgtt ttaccccag 2460
aggaacacc ctgcctactt taattccatg attcagggt acacaatgcg gcgcgactga 2520
taa 2523

<210> 4
<211> 2582
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Multiparameter optimized nucleic acid molecule

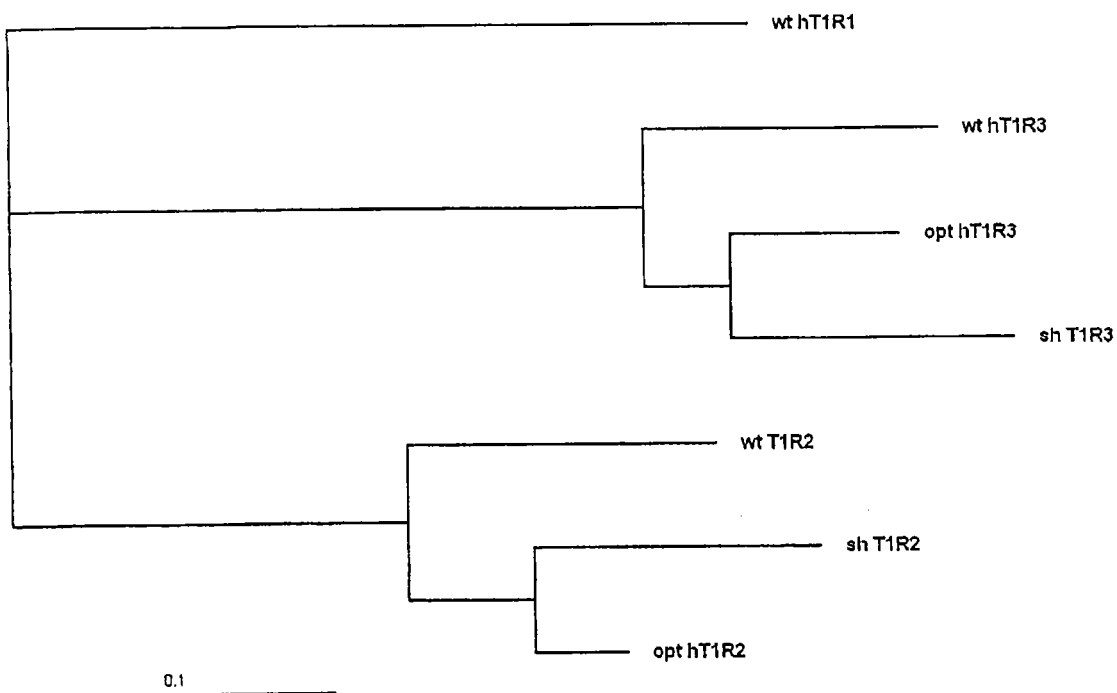
<400> 4

```

atgctgggac cgcctgtct gggcctgtcc ctgtgggac tgctgcaccc cggcacaggc      60
gccctctgt gcctgagcca gcagctgaga atgaagggcg attatgtgct cggcggcctg     120
ttcctctgg gcgaagccga agaagccggc ctgaggagca gaaccagacc tagctcccc      180
gtgtgcacaa gattcagcag caacgggctg ctgtgggccc tcgctatgaa gatggccgtc     240
gaggaaatca ataataagag cgacctgtg cctggcctga gactgggcta tgacctgtc     300
gacacctgca gcgaaccctg ggtggctatg aaacctccc tgatgtttct ggccaaagcc     360
ggcagcagag atattgccgc ctattgtaat tacaccagc atcagcctag agtgctggcc     420
gtgatcggcc ctcacagcag cgagctggcc atggtgacag ggaagttttt cagctttttt     480
ctgatgcccc aagtgagcta tggcgcctcc atggaactgc tgcgccag agagacattc     540
cccagcttct tcaggacagt gccctccgat agagttcagc tgaccgccgc tgccgaactg     600
ctgcaggaat ttggatggaa ttgggtcgca gctctgggct ccgatgatga gtacggcaga     660
caggggctga gcattttcag cgccctggct gccgccagag gcatctgtat tgcccatgag     720
ggactgggtc ccctgcctag agccgatgat agccggctgg gcaaagtcca ggatgtgctg     780
caccaagtga atcagtcctc cgtgcaagtg gtctgtctct ttgccagcgt gcatgccgcc     840
catgccctgt tcaattactc catcagcagc cgctgagcc ctaaagtgtg ggttgcctcc     900
gaggcttggc tgacaagcga tctggtgatg ggctgcctg ggatggctca aatgggcacc     960
gtgctgggct ttctgcagag aggcgctcag ctccacgaat ttctcagta tgtgaaaacc    1020
catctggccc tcgccacaga tctgccttc tgcagcggcc tgggagaaag agaacagggc    1080
ctggaggaag atgtggtcgg acagagatgc ctcagtgcg attgtattac cctgcagaac    1140
gtgtctgccg gcctgaatca ccatcagacc ttcagcgtgt acgccgccgt gtactccgtg    1200
gctcaggctc tgcacaatac cctgcagtgt aacgccagcg gctgccctgc ccaggatcct    1260
gtgaaacctt ggcagctgct cgagaatatg tataatctga catttcacgt gggaggcctg    1320
cccctgagat tcgatagctc cggcaatgtg gatatggaat atgatctgaa actgtgggtc    1380
tggcaaggca gcgtgcctag actgcacgat gtgggccgct ttaacggctc tctgcccacc    1440

```

gagaggctga agattagatg gcacaccagc gacaatcaga agcctgtgag ccggtgcagc 1500
agacagtgtc aggagggaca agtgcggaga gtgaaggct tccacagctg ctgttacgac 1560
tgcgtggatt gtgaggccgg ctctacaga cagaaccccg atgatatcgc ctgtacctc 1620
tgcggacagg acgagtggag ccctgagaga agcaccagat gcttccggcg gaggagcaga 1680
tttctggcct ggggagaacc cgctgtgctg cttctgctgt tgctgctctc tctggccctg 1740
ggactgggtgc tggccgcact gggcctgttt gtgcaccaca gagacagccc cctgggtgcag 1800
gccagcggcg gacctctggc ctgtttcggg ctctgtgtgc tgggccttgt gtgtctgagc 1860
gtgctgctct ttccaggcca gccttcccca gctagatgtc tggctcagca acccctgagc 1920
cacctgcccc tgaccggctg tctgagcacc ctgtttctcc aggccgctga gatctttgtg 1980
gagagcgagc tgcccctgtc ttgggcccag agactgagcg gctgtctgag aggcccctgg 2040
gcttggctgg ttgtcctcct ggctatgctg gttgaagtgg ccctgtgtac ctggtatctg 2100
gtcgccttc caccggaagt ggtgaccgat tggcatatgt tgccaccga ggccctggtg 2160
cactgtagaa ccaggagctg ggtgagcttt ggactggccc acgccacaaa cgccaccctg 2220
gccttctgt gtttctggg gacctttctg gtgagaagcc agcccggcag atacaataga 2280
gccaggggcc tgacattcgc catgctcgct tactttatta catgggtgag cttcgtgcct 2340
ctgctggcca acgtgcaagt tgtgctgcgc cctgccgtgc aatgggagc actgctgctg 2400
tgcgtgctgg gcattctggc cgcttttcat ctgccccgct gctatctgct gatgagacag 2460
cccggcctga ataccctga gtttttctg ggcggaggcc ctggcgacgc ccaggacag 2520
aacgacggca acaccgcaa ccaggcaag cacgagtgat aagagaccgc ggccgctgat 2580
ca 2582



1	2	3	4	5	6	7	距离矩阵	
0.00	11.85	14.64	44.88	48.59	51.61	49.96	1	opt_hT1R2
	0.00	24.48	46.94	52.21	52.54	52.90	2	sh_T1R2
		0.00	44.61	51.67	54.01	51.59	3	wt_hT1R2
			0.00	52.04	54.57	51.91	4	wt_hT1R1
				0.00	14.05	14.19	5	opt_hT1R3
					0.00	23.56	6	sh_T1R3
						0.00	7	wt_hT1R3

图1

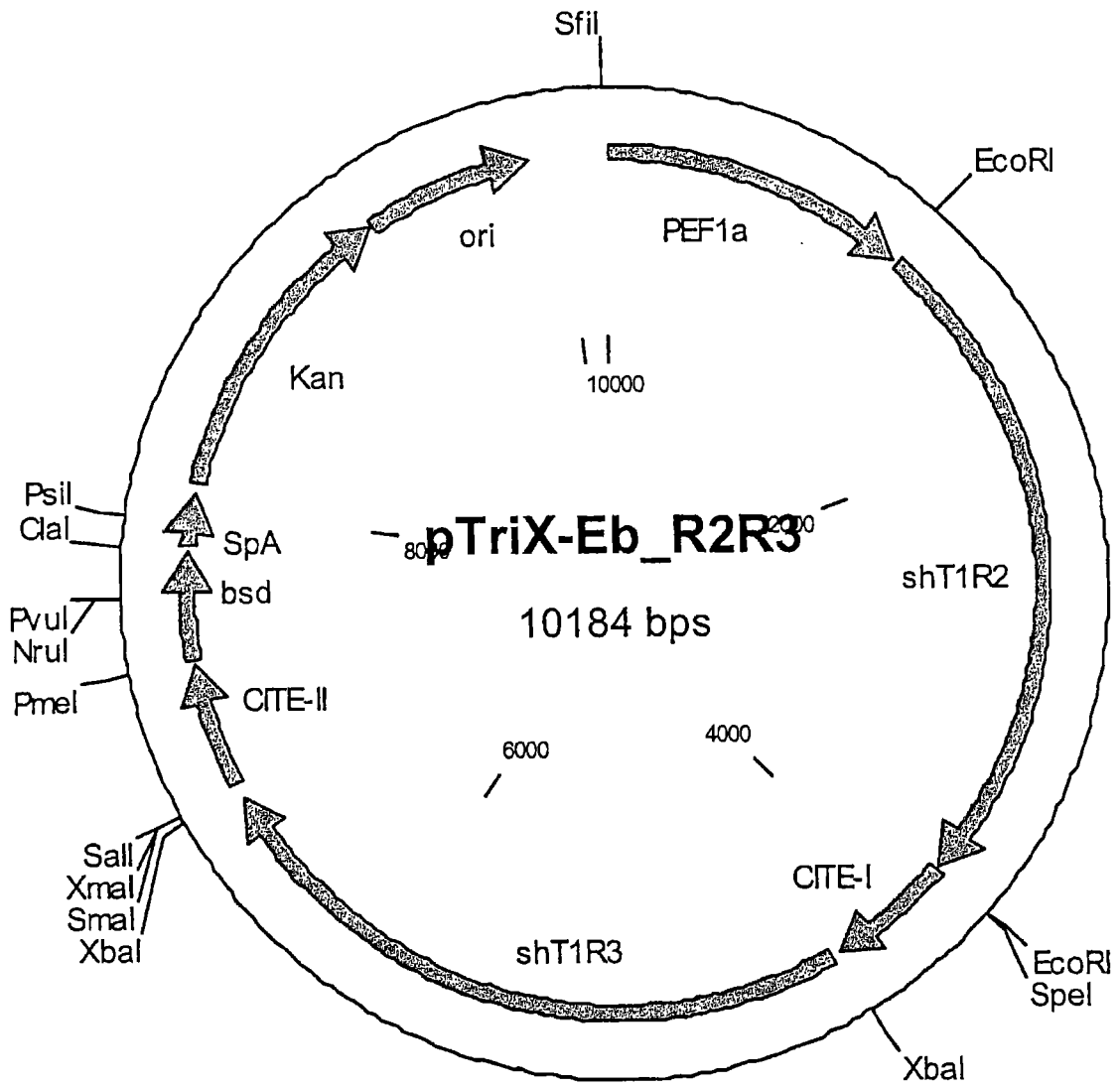


图2

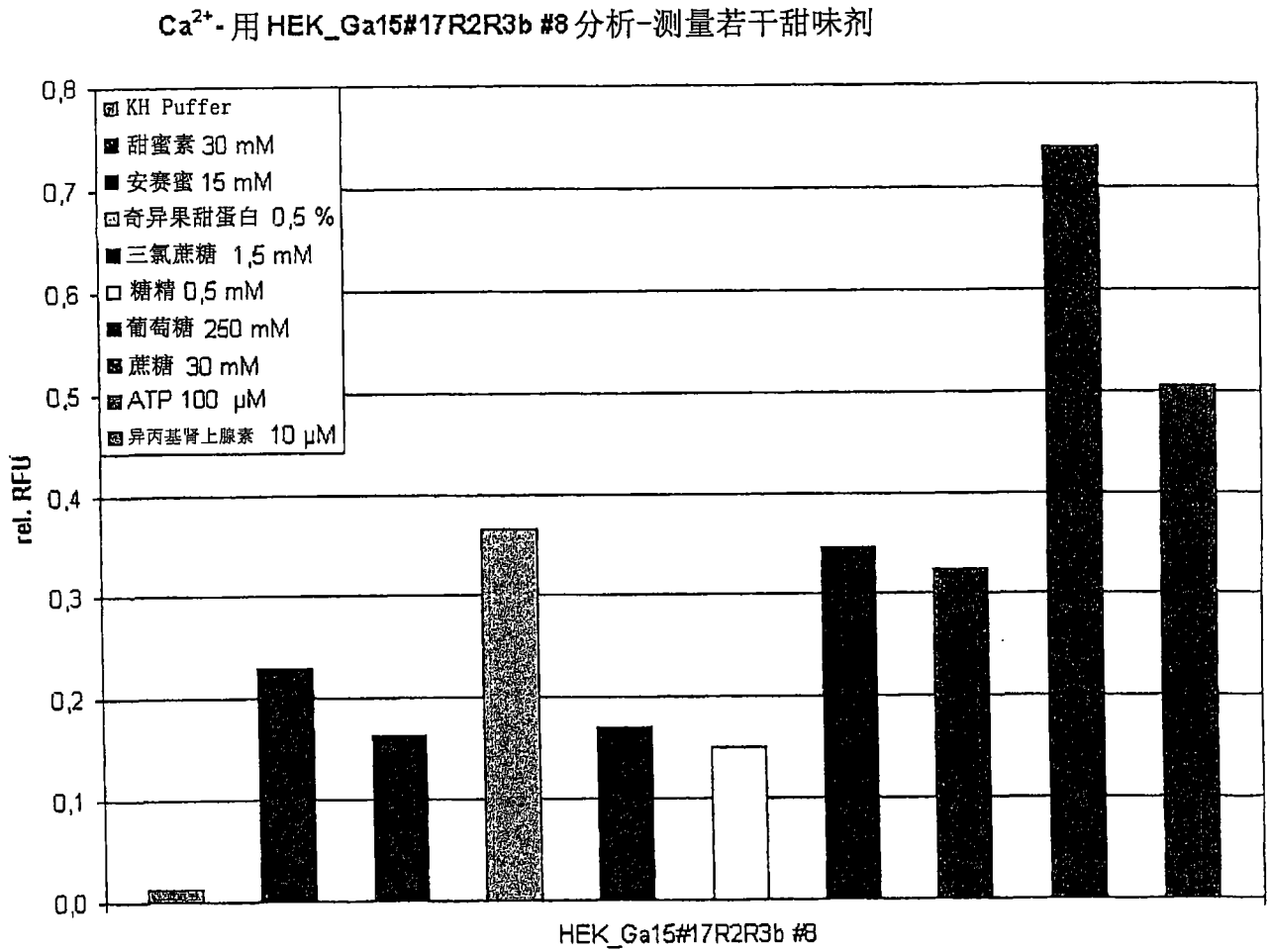


图3

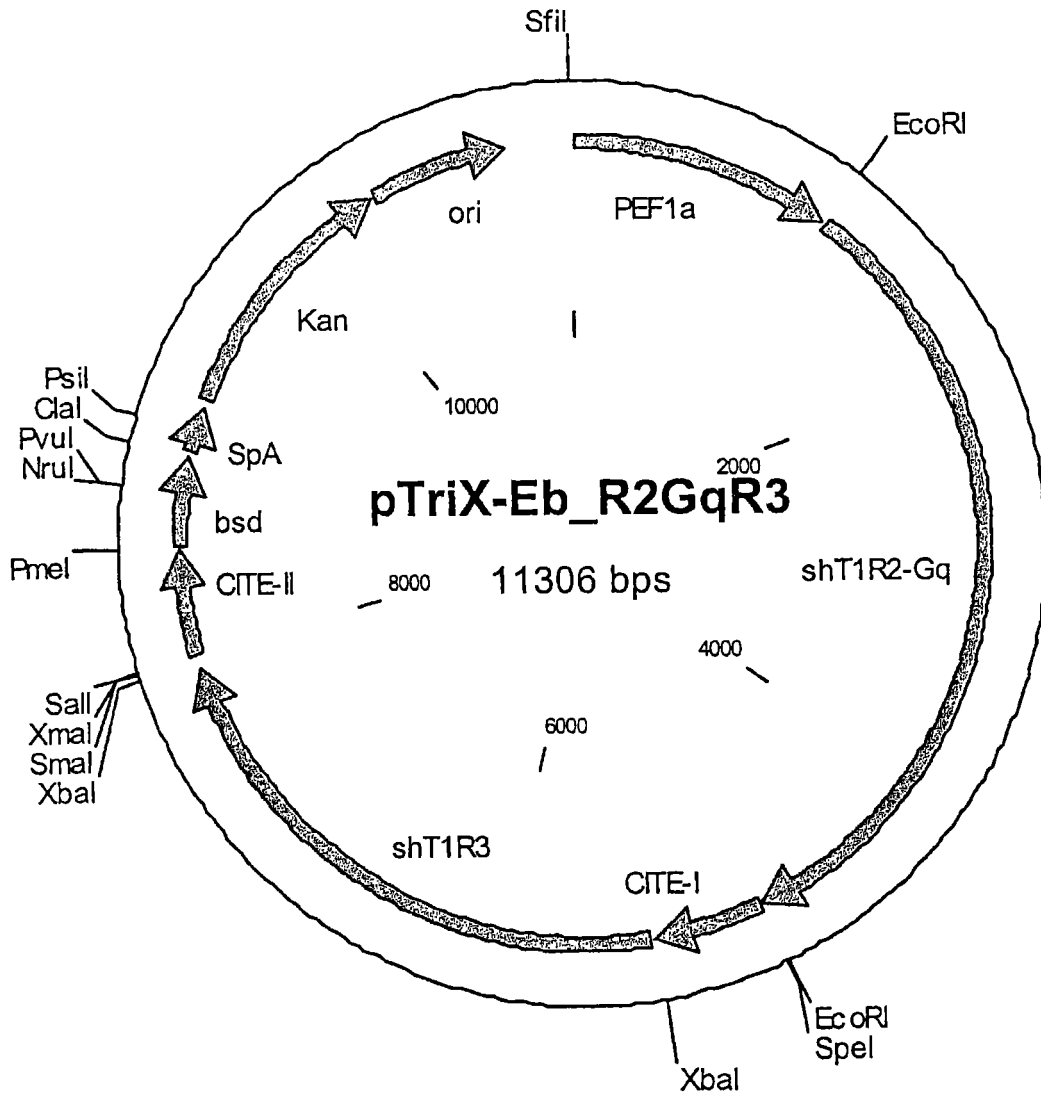


图4

专利名称(译)	调节G蛋白偶联受体活性的化合物的筛选方法		
公开(公告)号	CN101086499A	公开(公告)日	2007-12-12
申请号	CN200710108299.2	申请日	2007-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	努特诺瓦营养产品及食品成分有限公司		
申请(专利权)人(译)	努特诺瓦营养产品及食品成分有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	努特诺瓦营养产品及食品成分有限公司		
[标]发明人	迈克尔克罗恩 霍尔格津克		
发明人	迈克尔·克罗恩 霍尔格·津克		
IPC分类号	G01N33/566 G01N33/53		
CPC分类号	G01N2500/10 C12Q1/025 G01N2333/705 C12N15/79 G01N33/566		
代理人(译)	杨青		
优先权	2006011710 2006-06-07 EP		
其他公开文献	CN101086499B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于筛选GPCRs的调节剂的系统。此外它涉及用于在真核宿主细胞中异源表达异源二聚体G蛋白偶联受体(GPCRs)的重组载体系统。其中也包含了优选情况下感受甜味和L - 氨基酸味道的工程化GPCRs的功能性表达，或更优选情况下还包括该受体在鉴定功能性配体中的应用。