

CAVELIER

ABOGADOS

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

Teléfono: (57-1) 347 3611
Telefax: (57-1) 211 8650
(57-1) 700 4814
Fax in U.S.A.: (1-305) 675 7743

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-022158- -00011-0000

Fecha: 2012-04-19 16:32:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 240

Act. 523 RESPUESTA Folios: 257

Señor Director

DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

Trámite : 011

Evento : 379

Actuación : 444

Referencia : Expediente No. 06.022.158

Asunto : Solicitud de Patente para

**RECEPTORES DE SABOR HETERO-OLIGOMÉRICO T1R, LÍNEAS
CELULARES QUE EXPRESAN DICHOS RECEPTORES, Y
COMPUESTOS DE SABOR**

Solicitante : **SENOMYX INCORPORATED**

Fecha de Solicitud : 06 de Marzo de 2006

1. Yo, Luz Clemencia de PAEZ, obrando como apoderada del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al Oficio No. 19411 notificado por fijación en lista del 15 de Diciembre de 2011.

2. Mediante memorial radicado el día 07 de Marzo de 2012 solicité plazo de treinta (30) días para atender el oficio No. 19411.

3. Mediante el Oficio No. 19411 se puso en conocimiento del solicitante el informe del examen de fondo que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente.

4. De la Solicitud de Patente

El Examinador considera que el título no corresponde con el nuevo objeto de la solicitud, porque esta solamente se refiere a los compuestos que se unen específicamente a un receptor T1R/T1R3.

Por otro lado, indica que las expresiones "ocurrencia no natural" y "opcionalmente sustituido" no son claros, y no permiten la comprensión de la materia reclamada. Igualmente, menciona que los

compuestos reivindicados se encuentran definidos de una manera muy amplia, para la cual no existe sustento suficiente en la memoria descriptiva.

5. Unidad de Invención

Adicionalmente, el Examinador menciona que la presente solicitud no cumple con el requisito de Unidad de Invención, ya que en esta se están presentando amidas y oxalamida que se ligan específicamente a un receptor de sabor. Sin embargo, el concepto inventivo único entre dichas clases de compuestos es la estructura amida, previamente divulgada en el documento D1. Por lo tanto, la presente solicitud no cumple con el requisito de unidad de invención

6. Novedad

Para la evaluación de este requisito, se han citado las anterioridades:

- D3: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1989, 37, 737-740; "*Structural correlation between some amides and a taste receptor model*";
- D4: JP 8 103 243, "*Sustainable flavor/scent imparting agent*";
- D5: US 3 959 269, "*2-substituted 3-disubstituted-4.5.6.7 substituted or unsubstituted phthalimides*"; y
- D6: US 4 311 647, "*Process for preparation of (hydrocarbothio)oxamides*"

De acuerdo con el Examinador, las características esenciales de los compuestos reclamados en el pliego reivindicatorio ya habían sido divulgadas previamente en las anterioridades citadas D3, D4, D5 y D6; razón por la cual la materia reclamada no se considera como nueva a partir de las enseñanzas del estado del arte.

7. Respuesta a las objeciones

De este modo y con el objeto de atender las objeciones arriba mencionadas, se pone de presente al Despacho las siguientes modificaciones, aclaraciones y argumentos:

7.1. Modificación a una Solicitud en Trámite

De conformidad con lo establecido en los artículos 34 y 36 de la Decisión 486, que permite al solicitante en cualquier momento del trámite efectuar modificaciones y divisiones sin ampliar el objeto de la invención inicialmente solicitada, me permito presentar un nuevo capítulo reivindicatorio, que comprende 26 reivindicaciones, y que limita el alcance de la presente solicitud de invención al primer grupo inventivo indicado por el Examinador.

Ahora bien, con relación a las objeciones formuladas relacionadas con la falta de claridad y concisión del capítulo reivindicatorio, se desean hacer las siguientes aclaraciones:

Inicialmente, se desea poner de presente que, contrario a lo expresado por el Señor Examinador, la expresión "*de ocurrencia no natural*" resulta clara para una persona medianamente versada en la materia, la cual reconocería que esta se refiere a un compuesto que normalmente no se encuentra en la naturaleza. Dicha expresión es igualmente utilizada en la memoria descriptiva, con el fin de distinguir los compuestos potenciadores normalmente encontrados en la naturaleza, de aquellos de origen sintético, objeto de la presente solicitud. Lo anterior puede ser observado, por ejemplo, en la página 1, segundo párrafo; página 2, último párrafo; página 67, último párrafo; y página 68, segundo párrafo.

Del mismo modo, la expresión "*opcionalmente sustituido*" resulta clara para la persona conocedora de la técnica, la cual se encuentra en capacidad de entender que el sustituyente al cual se hace referencia puede ser sustituidos o no ser sustituidos dentro de su estructura. Aún más, la persona versada en la materia resulta puede identificar el alcance de la sustitución presente, a partir de la estructura química de los compuestos ejemplificados en la tablas 1 a 6 de la memoria descriptiva.

Por consiguiente, se considera que con las aclaraciones efectuadas se debe tener por superadas las objeciones formuladas con base al no cumplimiento de las disposiciones del artículo 30.

Ahora bien, con relación a la afirmación hecha por el Señor Examinador, con respecto al hecho que la descripción no es clara, y esta no divulga la invención de manera suficientemente completa, se llama la atención de su Despacho al hecho que la memoria descriptiva no sólo proporciona un gran número de compuestos a manera de ejemplifico, sino que también describe de manera exhaustiva los protocolos de ensayo biológicos llevados a cabo, así como los resultados de los mismo. Como prueba de lo anterior, se trae a colación las tablas A hasta la E, en las que se especifican alrededor de 250 compuestos químicos de acuerdo a la invención, y 27 cifras que demuestran los resultados de las pruebas biológicas. Dichos ejemplos permiten la generalización estructural incluida en las reivindicaciones.

Así mismo, los documentos provisionales US 60/494,071 y 60/552,064, previamente presentados ante su Despacho, incluyen las definiciones de las fórmulas químicas y la síntesis de compuestos ejemplificados en la memoria descriptiva de la presente solicitud. En este sentido, es de destacar que la descripción de la presente solicitud hace referencia a los dos documentos de prioridad e incorpora el contenido de los mismos en su totalidad.

En vista de lo anterior, resulta claro que la descripción permite a una persona del oficio normalmente versada en la materia a ejecutar y reproducir la materia reclamada.

7.2. Unidad de Invención

Con el fin de superar la objeción formulada por su Despacho a este respecto, respetuosamente manifiesto que la solicitud inicial se ha limitado a la definición de los compuestos amidas de ocurrencia no natural que se ligan específicamente a un receptor de sabor hetero-oligomérico T1R compuesto de las subunidades hTIR1/hT1R3, y los productos comestibles o medicinales que comprende los mismos.

Adicionalmente, se presentan una solicitud divisional, la cual reivindica los compuestos oxalamidas de ocurrencia no natural que se ligan específicamente a un receptor de sabor hetero-oligomérico T1R compuesto de las subunidades hTIR1/hT1R3, y los productos comestibles o medicinales que comprende los mismos

De esta manera, teniendo en cuenta además que, la materia reivindicada en los pliegos reivindicatorios de la solicitud inicial y de la solicitud divisional no se superpone entre sí, la objeción formulada con respecto a la falta de Unidad de Invención queda superada.

Por lo anterior, el título de la solicitud inicial y de la solicitud divisional permanece como: **“RECEPTORES DE SABOR HETERO-OLIGOMÉRICO T1R, LÍNEAS CELULARES QUE EXPRESAN DICHOS RECEPTORES, Y COMPUESTOS DE SABOR”**, ya que este refleja la naturaleza de la materia reclamada en ambas solicitudes.

7.3. Argumentos a favor de la novedad de la presente solicitud

El Examinador cita los documentos D3 a D6, y manifiesta que estos afectan la novedad de las anteriores reivindicaciones 1, 2, 5, 6 y 10 de la presente invención, ya que estos divulgan compuestos amida u oxalamidas que se ligan a receptores de sabor, tal y como son definidas en la presente solicitud. A este respecto manifestamos nuestro desacuerdo con el análisis llevado a cabo y con las conclusiones derivadas del mismo y solicitamos la reconsideración de la objeción, con base en los siguientes argumentos:

Partiendo del nuevo capítulo reivindicatorio, es posible observar que las nuevas reivindicaciones resultan novedosas frente al estado del arte, puesto que estas enseñan compuestos que se unen a un receptor de sabor hetero-oligómero T1R particular, **caracterizadas porque la capacidad de ser activadores, mejoradores o moduladores de sabor está dado por un valor EC_{50} menor a 1mM**. Por el contrario, los compuestos citados por su Despacho no se caracterizan por la capacidad indicada en el nuevo capítulo reivindicatorio. De esta manera, es posible concluir que las anterioridades citadas no pueden ser consideradas como anterioridades válidas capaces de afectar la novedad de la presente solicitud.

8. Conclusiones

Finalmente, puesto que se han atendido a cabalidad las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente, respetuosamente solicito se continúe con su tramitación. Sin embargo, en el evento que el Despacho considere que una reivindicación no cumple con los requisitos de la Decisión 486, respetuosamente le solicito conceder parcialmente la presente solicitud y otorgar el beneficio de patente a las reivindicaciones restantes del nuevo pliego reivindicatorio.

9. Anexos

- Nuevo pliego reivindicatorio correspondiente a la solicitud inicial, conformado por veintiséis (26) reivindicaciones.
- Comprobante de pago por valor de \$ 120.000 por cuatro (4) reivindicaciones adicionales, ya que en el pasado se había realizado el pago de doce (12) reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación.
- Capitulo descriptivo correspondiente a la solicitud divisional.
- Nuevo pliego reivindicatorio correspondiente a la solicitud divisional, conformado por veintisiete (28) reivindicaciones.
- Comprobante de pago por valor de \$ 540.000 por diecisiete (18) reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación.
- Formulario para modificaciones.
- Formulario de división de la solicitud de patente.
- Comprobantes de pago por concepto de presentación de nueva solicitud.
- Copia autenticada del poder otorgado por SENOMYX Inc. al Doctor Emilio Ferrero.
- Copia autenticada de la sustitución del poder otorgado por la Sociedad Solicitante realizadas por el Doctor EMILIO FERRERO a mi favor, y para lo cual solicito me sea reconocida personería para continuar con el trámite del asunto de la referencia.

Señor Director,


LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

T.P.A. No. 23.555

COLO-15159-841-002-6

COLO-15159-841-005-9

LLG\LLG\ID-215306\WPC15159

No. M-2012-215306\LLG



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

1

SOLICITUD DE:

☐ Corrección de Error Material

☒ Modificación a una solicitud

2

SOLICITANTE

Nombre: SENOMYX INCORPORATED

Sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

Dirección: 11099 N. Torrey Pines Road,
La Jolla,
California 92037,
Estados Unidos de América

Domicilio: La Jolla,
California,
Estados Unidos de América

Teléfono: 347 36 11 **Fax:** 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número: _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: Luz Clemencia de PAEZ

Dirección: Carrera 4ª No. 72-35

Teléfono: 347 36 11 **Fax:** 217 92 11

E-mail: cavelier@cavelier.com

IDENTIFICACION

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número: 35.456.344 TP 23.555

4

Número de expediente: 06.022.158

5

Descripción de la corrección o modificación solicitada:

Presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 26 reivindicaciones con el fin de superar las objeciones hechas por Su Despacho a la presente solicitud de patente y pido respetuosamente que el examen de patentabilidad sea realizado sobre estas nuevas reivindicaciones presentadas.

6

Comprobante de pago No. 12-0032498

Fecha: 02 de abril de 2012

7

Anexos

☐ Comprobante de pago de la tasa por \$120.000.00, por concepto de modificaciones.

☒ Comprobante de pago por 4 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$120.000.00

☐ Poderes, si fuere el caso

☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

☐ Copia auténtica de la sustitución que del poder otorgado por la Sociedad Solicitante hizo el Doctor EMILIO FERRERO a mi favor, y para lo cual solicito me sea reconocida personería para continuar con el trámite del asunto de la referencia.

8

NOMBRE:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P.A. 23.555

LLG



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO ÚNICO DE CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1

SOLICITUD DE:

☐ Conversión.

☒ División

☐ Fusión

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquemas de Trazado para Circuitos Integrados

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: SENOMYX INCORPORATED
Sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

Dirección: 11099 N. Torrey Pines Road,
La Jolla,
California 92037,
Estados Unidos de América

Domicilio: La Jolla,
California,
Estados Unidos de América

Teléfono: 546 09 70 Fax: 249 40 70

E-mail: clientes@cavelier.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

C.E. ☐

NIT ☐

Otro ☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11 Fax: 217 92 11

E-mail: cavelier@cavelier.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

C.E. ☐

NIT ☐

Otro ☐

Cual

Número 35.456.344 T.P 23.555

4

CONVERSIÓN

5

DIVISIÓN

6

FUSIÓN

Expediente No:

De:

A:

Expediente No: 06.022.158

No. de Divisionales: 1

Expediente No:

Expediente No:

7

Comprobante de pago No.: 12-0032564

Comprobante de pago No.: 12-0029274

Comprobante de pago No.: 12-0032499

Comprobante de pago No.: 12-0025027

Comprobante de pago No.: 12-0029221

Fecha: 02 de abril de 2012

Fecha: 23 de marzo de 2012

Fecha: 02 de abril de 2012

Fecha: 12 de marzo de 2012

Fecha: 23 de marzo de 2012

8	Anexos ☒ Comprobante de pago de la tasa por \$590.000.oo ☒ Comprobante de pago por 18 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$ 540.000.oo ☒ Poderes, si fuere el caso ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas. ☒ Copia de la Solicitud Divisional.
9	NOMBRE: <u>LUZ CLEMENCIA DE PAEZ</u> FIRMA: <u><i>Luz Clemencia De Paez</i></u> C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

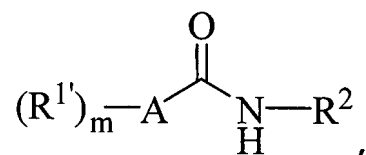
LLG

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. 06.022.158. La solicitud de división de la materia se hace como consecuencia de las observaciones hechas por ese Despacho y que fueron dadas a conocer al solicitante por medio del oficio No. 19411 notificado por fijación en lista del 15 de diciembre de 2011. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 06 de marzo de 2006 y las prioridades que allí se reivindican del 06 de agosto de 2003 y 09 de marzo de 2004.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. 06.022.158

Reivindicaciones

1. Un compuesto de ocurrencia no natural que se liga específicamente a un receptor de sabor hetero-oligomérico T1R compuesto de las subunidades hTIR1/hT1R3, con la capacidad de ser un activador, mejorador, o modulador del sabor umami determinado por un EC₅₀ menor a 1 mM, en donde el compuesto de ocurrencia no natural es un compuesto amida.
2. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el compuesto presenta una proporción EC₅₀, definida como la proporción de la concentración de MSG y la concentración del compuesto más MSG necesaria para elicitarse la respuesta de dosis MSG mayor que 1.
3. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la reducción del EC₅₀ determinada por un ensayo basado en fluorescencia que utiliza un instrumento FLIPR es de al menos dos veces.
4. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la actividad comparada con la actividad máxima de glutamato determinada por un incremento en fluorescencia dependiente del compuesto es de al menos 25% en un ensayo basado en fluorescencia que utiliza un instrumento FLIPR.
5. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el compuesto presenta una capacidad tal que al menos 10 de 100 células transfectadas con el receptor muestran un incremento dependiente del compuesto en fluorescencia.
6. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 1, el cual presenta una potencia tal que el número de células fluorescentes en respuesta a un nivel submáximo de glutamato aumenta al menos dos veces.
7. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 1, el cual muestra un incremento en la respuesta de las células a un nivel submáximo de glutamato de al menos 1,25 veces comparado con la respuesta del endulzante solo, en donde la respuesta se mide por fluorescencia, niveles de calcio, niveles IP₃, niveles cAMP, unión GTPγS, o actividad de gen reportero.
8. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto amida presenta la siguiente fórmula:



o una sal o solvato del mismo;
en donde,

A comprende un anillo arilo o heteroarilo de 5 ó 6 miembros;

m es 0, 1, 2, 3 ó 4;

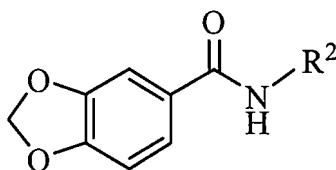
cada R^1 se selecciona independientemente de alquilo, alcoxi, alcoxi-alquilo, hidroxialquilo, OH, CN, SR^6 , halógeno, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, heterociclo, arilo, y heteroarilo;

R^2 se selecciona del grupo compuesto por arilalquenilo, heteroarilalquenilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, alquilo, alcoxi-alquilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, arilo, heteroarilo, $-R^4OH$, $-R^4OR^5$, $-R^4CN$, $-R^4CO_2H$, $-R^4CO_2R^5$, $-R^4COR^5$, $-R^4SR^5$, $-R^4SO_2R^5$, y grupos opcionalmente sustituidos de los mismos;

R^4 y R^5 son independientemente alquilo C_1-C_6 ó alcoxialquilo C_1-C_6 ; y

R^6 es alquilo C_1-C_6 .

9. El compuesto amida de la reivindicación 8, en donde el compuesto amida presenta la fórmula:



en donde,

R^2 se selecciona del grupo compuesto por ariloalquenilo, heteroariloalquenilo, ariloalquilo, heteroariloalquilo, alquilo, alcoxi-alquilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, arilo, heteroarilo, $-R^4OH$, $-R^4OR^5$, $-R^4CN$, $-R^4CO_2H$, $-R^4CO_2R^5$, $-R^4COR^5$, $-R^4SR^5$, $-R^4SO_2R^5$, y grupos opcionalmente sustituidos de los mismos.

10. El compuesto amida de la reivindicación 8, el cual se selecciona de los siguientes compuestos de amida:

3,6-Dicloro-N-(4-etoxi-fenil)-2-metoxi-benzamida

Metil éster de ácido 4-(3,6-Dicloro-2-metoxi-benzoilamino)-benzoico

2,5-dicloro-N-(4-etoxifenil)benzamida

Metil éster de ácido 2-[(Benzo[b]tiofeno-2-carbonil)-amino]-4-metil-pentanoico

Metil éster de ácido 2-[(Benzofuran-2-carbonil)-amino]-4-metil-pentanoico.

Metil éster de ácido 2-[(5-Metoxi-benzofuran-2-carbonil)-amino]-4-metil-pentanoico

(R)-5-metoxi-N-(1-metoxi-4-metilpentan-2-il)benzofuran-2-carboxamida

5-Metil-N-(5-metilhexan-3-il)benzofuran-2-carboxamida

Metil éster de ácido 2-[(Benzofuran-5-carbonil)-amin]-4-metil-pentanoico(R)-metil 2-(benzofuran-5-caboxamido)-4-metilpentanoato

N-(heptan-4-il)-5-metoxibenzofuran-2-carboxamida

5-cloro-N-(1-metoxibutan-2-il)benzofuran-2-carboxamida

5-Metoxi-N-(2-metilhexan-3-il)benzofuran-2-carboxamida

5-Metoxi-N-(pentan-3-il)benzofuran-2-carboxamida

Metil éster de ácido 2-[(5-Metoxi-benzofuran-2-carbonil)-amino]-4-metilsufanil-butírico
2-(5-metoxibenzofuran-2-carboxamido)-4-(metiltio)butanoato

(1R,2R)-etil 2-(5-metoxibenzofuran-2-carboxamido)ciclohexanocarboxilato

5-Metoxi-N-(2-metilpentan-3-il)benzofuran-2-carboxamida
 N-(2,4-dimetilpentan-3-il)-5-metoxibenzofuran-2-carboxamida
 5-metoxi-N-(2-metilheptan-4-il)benzofuran-2-carboxamida
 5-Metoxi-N-(1-metoxipentan-2-il)benzofuran-2-carboxamida
 5-metil-N-(2-metilheptan-4-il)benzofuran-2-carboxamida
 N-(pentan-3-il)benzofuran-2-carboxamida
 Ácido Benzotiazol-6-carboxílico (1-propil-butil)-amida
 2-metil-N-(2-metilheptan-4-il(benzo[d]oxazol-5-carboxamida
 2-metil-N-(2-metilheptan-4-il)benzo[d]oxazol-6-carboxamida
 Metil éster de ácido (R)-4-metil-2-[(2-metil-benzooxazol-6-carbonil)-amino]-petanoico
 2-metil-N-(2-metilhexanil-3-il)benzo[d]oxazol-6-carboxamida
 2-etil-N-(heptan-4-il)benzo[d]oxazol-6-carboxamida
 Metil éster de ácido (R)-4-Metil-2-[(2metil-benzooxazol-5-carbonil)-amino]-pentanoico
 N-(heptan-4-il)benzo[d]oxazol-6-carboxamida
 5-bromo-N-(heptan-4-il)furan-2-carboxamida
 N-(heptan-4-il)-4,5-dimetilfuran-2-carboxamida
 N-(2,3-dimetilciclohexil)-3-metilfuran-2-carboxamida
 4,5-dimetil-N-(2-metilciclohexil)furan-2-carboxamida
 (R)-metil 2-(1H-indol-2-carboxamido)-4-metilpentanoato
 N-heptan-4-il)-1H-indol-6-carboxamida
 (R)-metil 2-(1H-indol-5-carboxamido)-4-metilpentanoato
 (R)-metil-4-metil-2-(quinolino-6-carboxamido)pentanoato
 (1-propil-butil)-amida de ácido 5 metil-tiofenoxílico
 (1,2,3,4-tetrahidro-naftalen-1-il)amida de ácido 5-metil-tiofeno-2-carboxílico
 (R)-metil 2-(2-naftamido)-4-metilpentanoato
 N-(nonan-5-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamido
 (2R,3R)-metil 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamido)-3-metilpentanoato
 Metil éster de ácido 2-[(Benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-amino]hexanoico
 Metil éster de ácido (R) 2-[(Benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-amino]hexanoico
 (R)-etil 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamido)-4-metilpentanoato
 (R)-metil 2-(2,3-dihidrobenzofuran-5-carboxamido)-4-metilpentanoato
 (S)-N-(1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamida
 N-(4-fenilbutal-2-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamida
 Metil éster de ácido 2-[(Benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)amino]-pentanoico
 N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-propilpentanamida
 (R)-propil 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamido)-4-metilpentanoato
 N-(heptan-4-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-carboxamida
 N-(hexan-3-il(benzol[d]1,3]dioxol-5-carboxamida
 N-(hexan-3-il)-3-metil-4-(metiltio)benzamida
 Metil 2-(3-cloro-4-metoxibenzamido)hexanoato
 N-(hexan-3-il)-3,4-imetilbenzamida
 (R)-metil 4-metil-2-(4-vinilbenzamido)pentanoato
 4-metoxi-3-metil-N-(2-metilpentan-3-il)benzamida
 4-metoxi-3-metil-N-(2-metilhexan-3-il)benzamida

(R)-metil-(4-(etiltio)benzamido)-4-metilpentanoato
 N-(heptan-4-il)-4-metoxi-3-metilbenzamida
 (R)-metil-2-(3,4-dimetilbenzamido)-3-metilbutanoato
 (R)-metil 2-(4-metoxi-3-metilbenzamido)-4-metilpentanoato
 4-etoxi-3-metil-N-(pentan-3-il)benzamida
 (R)-N-(1-metoxi-4-metilpentan-2-il)-3-metil-4-(metiltio)benzamida
 N-(2,4-dimetoxibenzil)-3-(1H-pirrol-1-il)isonicotinamida
 Metil 2-(3-cloro-4-metoxibenzamido)pentanoato
 4-etoxi-N-(heptan-4-il)benzamida
 (R)-metil 4-metil-2-(4-metilbenzamido)pentanoato
 N-(heptan-4-il)-3-(trifluorometil)benzamida
 4-etil-N-(heptan-4-il)benzamida
 4-etoxi-3-metil-N-(5-metilhexan-3-il)benzamida
 (R)-metil 2-(3-metoxi-4-metilbenzamido)-4-metilpentanoato
 3-fluoro-N-(heptan-4-il)-4-metoxibenzamida
 N-(heptan-4-il)-4-(metiltio)benzamida
 4-metoxi-3-metil-N-(4-fenilbutan-2-il)benzamida
 3-cloro-4-metoxi-N-(2-metilciclohexil)benzamida
 N-(heptan-4-il)-4-vinilbenzamida
 N-(heptan-4-il)-4-metoxibenzamida
 3-cloro-4-metoxi-N-(pentan-2-il)benzamida
 N-(hexan-3-il)-4-metil-3-(metiltio)benzamida
 (R)-metil 4-metil-2-(4-propoxibenzamido)pentanoato
 N-(heptan-4-il)-3-metilbenzamida
 N-(heptan-4-il)-2-hidroxi-3-metoxibenzamida
 (R)-metil 2-(3,5-dimetilbenzamido)-4-metilpentanoato
 Metil 2-(4-metoxi-3-metilbenzamido)-4-(metiltio)butanoato
 2-hidroxi-3-metoxi-N-(1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)benzamida
 N-(2,4-dimetilpentan-3-il)-3-metil-4-(metiltio)benzamida
 (R)-3-cloro-4-metoxi-N-(1-(4-metoxifenil)etil)benzamida
 N-(heptan-4-il)-3-metoxibenzamida
 (R)-metil 4-metil-2-(4-propilbenzamido)pentanoato
 4-etoxi-3-metil-N-(2-metilheptan-4-il)benzamida
 (S)-2-hidroxi-3-metoxi-N-(1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)benzamida
 (R)-4-metoxi-N-(2-metoxi-1-feniletil)-3-metilbenzamida
 (R)-metil 2-(4-metoxi-3,5-dimetilbenzamido)-4-metilpentanoato
 4-metoxi-N-(1-(4-metoxifenil)propil)-3-metilbenzamida
 4-metoxi-N-(1-metoxipentan-2-il)-3-metilbenzamida
 3-cloro-N-(1-hidroxi-4-metilpentan-2-il)-4-metoxibenzamida
 (R)-metil 4-metil-2-(3-metilbenzamido)pentanoato
 3-cloro-4-metoxi-N-(1-p-toliletil)benzamida
 N-(heptan-4-il)-2-hidroxi-4-metoxibenzamida
 4-hidroxi-3-metil-N-(1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)benzamida
 (1S,2R)-etil 2-(3-cloro-4-metoxibenzamido)ciclohexanocarboxilato

2,4-dimetoxi-benzilamida de ácido Bifenil-2-carboxílico
 (S)-N-(1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)-4-vinilbenzamida
 3-cloro-N-(2,3-dihidro-1H-inden-1-il)-4-metoxibenzamida

11. Un producto comestible o medicinal que comprende el compuesto de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
12. El producto comestible de acuerdo a la reivindicación 11, en donde el producto comestible es seleccionado de un grupo compuesto por: sopas húmedas/líquidas, alimento deshidratado o culinario, y una bebida.
13. Un método para modular el sabor de ajedrea de un producto medicinal o comestible que comprende:
 - Suministrar al menos un producto medicinal o comestible, o un precursor de estos; y
 - Combinar el producto medicinal o comestible o precursor de estos con al menos una cantidad que modula el sabor de ajedrea de al menos un compuesto de ocurrencia no natural de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal comestible aceptable de esta, de tal forma que genera un comestible modificado o producto medicinal; por lo tanto modular el sabor ajedrea de un comestible o producto medicinal.
14. Un compuesto de ocurrencia no natural que se liga específicamente a un a un receptor de sabor hetero-oligomérico T1R compuesto de las subunidades hTIR2/hTIR3, con la capacidad de ser un modulador del receptor T1R2/T1R3 determinado por un EC_{50} inferior a 1 mM o por una relación EC_{50} de al menos 1,20, en donde el compuesto de ocurrencia no natural es un compuesto amida.
15. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 11, el cual es un activador dulce o un mejorador dulce.
16. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 11, en donde el compuesto presenta un tamaño cercano a 12 x 5 x 5 angstroms;
17. El compuesto de acuerdo a las reivindicaciones 11 ó 12 que presenta una o más de las siguientes características en una célula que coexpresa hT1R2 y hT1R3:
 - EC50 reducido comparado con un control de 50%,
 - Niveles de Ca^{2+} intracelular incrementado por al menos aproximadamente 25%,
 - cAMP intracelular incrementado por al menos aproximadamente 25%,
 - cGMP intracelular incrementado por al menos aproximadamente 25%,
 - IP_3 intracelular incrementado por lo menos aproximadamente 25%, o
 - Incremento de GTPγS que se une a la proteína G por al menos aproximadamente 25%.

18. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 13, donde la célula que coexpresa hT1R2 y hT1R3 es una célula HEK que expresa de manera estable $G\alpha 15$.
19. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 14, el cual muestra un incremento en la respuesta de las células para un nivel submáximo de endulzador de al menos 1,25 veces comparado con la respuesta del endulzador solo, en donde la respuesta se mide por fluorescencia, niveles de calcio, niveles IP_3 , niveles cAMP, unión GTP γ S, o actividad de gen reportero.
20. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 15, el cual presenta una actividad comparada con la actividad máxima de la fructosa determinada por un incremento en fluorescencia dependiente del compuesto es de al menos 25% en un ensayo basado en fluorescencia que utiliza un instrumento FLIPR.
21. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 16, en donde la actividad comparada con la actividad máxima de la fructosa determinada por un incremento en fluorescencia dependiente del compuesto muestra una reducción del EC_{50} para la fructosa de al menos dos veces en un ensayo basado en fluorescencia que utiliza un instrumento FLIPR.
22. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 16, en donde el compuesto muestra una capacidad tal que al menos 10 de 100 células transfectadas muestran un incremento dependiente del compuesto en fluorescencia medido con un microscopio de fluorescencia.
23. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 16, en donde el compuesto presenta una capacidad tal que el número de células fluorescentes en respuesta a un nivel submáximo de fructosa muestra un incremento dependiente del compuesto de al menos dos veces.
24. Un producto comestible o medicinal que comprende el compuesto de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19.
25. El comestible de acuerdo a la reivindicación 20, en donde el comestible es seleccionado de un grupo que consiste de: sopas húmedas/líquidas, alimento deshidratado o culinario, y una bebida.
26. Un método para modular el sabor dulce de un producto medicinal o comestible que comprende:
- Suministrar al menos un producto medicinal o comestible, o un precursor de estos; y
 - Combinar el producto medicinal o comestible o precursor de estos con al menos una cantidad que modula el sabor dulce de al menos un compuesto de ocurrencia no natural de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, o una sal comestible aceptable de esta, de tal forma que forme un comestible modificado o producto medicinal; por lo tanto modular el sabor dulce de un comestible o producto medicinal.



Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO ÚNICO DE CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1 SOLICITUD DE: ☐ Conversión.☒ División☐ Fusión		
☒ Patente de Invención☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Registro de Diseño Industrial☐ Esquemas de Trazado para Circuitos Integrados		
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: SENOMYX INCORPORATED Sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América. Dirección: 11099 N. Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037, Estados Unidos de América Domicilio: La Jolla, California, Estados Unidos de América Teléfono: 546 09 70 Fax: 249 40 70 E-mail: clientes@cavelier.com	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 217 92 11 E-mail: cavelier@cavelier.com.	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>35.456.344</u> T.P <u>23.555</u>
4 CONVERSIÓN Expediente No: _____ De: _____ A: _____	5 DIVISIÓN Expediente No: <u>06.022.158</u> No. de Divisionales: <u>1</u>	6 FUSIÓN Expediente No: _____ Expediente No: _____
7 Comprobante de pago No.: <u>12-0032564</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0029274</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0032499</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0025027</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0029221</u> Fecha: <u>02 de abril de 2012</u> Fecha: <u>23 de marzo de 2012</u> Fecha: <u>02 de abril de 2012</u> Fecha: <u>12 de marzo de 2012</u> Fecha: <u>23 de marzo de 2012</u>		

8

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa por \$590.000.00
- ☒ Comprobante de pago por 18 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$ 540.000.00
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.
- ☒ Copia de la Solicitud Divisional.

9

NOMBRE:LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**FIRMA :***Luiz Clemencia Seebier*

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

LLG

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. 06.022.158. La solicitud de división de la materia se hace como consecuencia de las observaciones hechas por ese Despacho y que fueron dadas a conocer al solicitante por medio del oficio No. 19411 notificado por fijación en lista del 15 de diciembre de 2011. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 06 de marzo de 2006 y las prioridades que allí se reivindican del 06 de agosto de 2003 y 09 de marzo de 2004.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. 06.022.158

8 21

15159
7480

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by Sherry Dollins
3. acting in the capacity of Notary Public, State of California
4. bears the seal/stamp of Sherry Dollins, Notary Public,
State of California

CERTIFIED

5. At Sacramento, California
6. the 22nd day of May 2006
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 287748
9. Seal/Stamp:

10. Signature



Bruce M. Sherman

Secretary of State

Jaimie Winkler



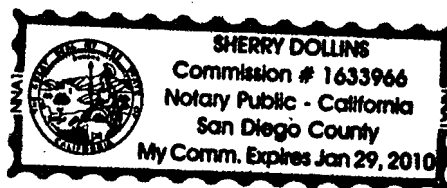
Notary Acknowledgements

STATE OF CALIFORNIA
COUNTY OF SAN DIEGO

On April 10, 2006, before me, Sherry Dollins, Notary Public, personally appeared Kelly J. Knight, personally known to me (or proved to me on the basis of satisfactory evidence) to be the person whose name is subscribed to the within instrument and acknowledged to me that she executed the same in her authorized capacity, and that by her signature on the instrument the person or the entity upon behalf of which the person acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

Sherry Dollins
Signature

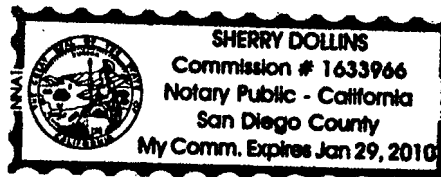


STATE OF CALIFORNIA
COUNTY OF SAN DIEGO

On April 10, 2006, before me, Sherry Dollins, Notary Public, personally appeared Harry J. Leonhardt, personally known to me (or proved to me on the basis of satisfactory evidence) to be the person whose name is subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he executed the same in his authorized capacity, and that by his signature on the instrument the person or the entity upon behalf of which the person acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

Sherry Dollins
Signature



1959

STATEMENT
REGARDING POWER OF ATTORNEY

1. I, Kelly J. Knight, Esq., Senior Corporate Counsel of SENOMYX, INC. do hereby certify that:

1.1. Harry J. Leonhardt, Esq. is the Senior Vice President, General Counsel and Corporate Secretary of SENOMYX, INC. and that he is the officer authorized by SENOMYX, INC. to execute this Power of Attorney on its behalf.

1.2. That SENOMYX, INC. is a corporation legally constituted and in existence in accordance with the laws of Delaware.

1.3. That the domicile of said corporation is

11099 N. Torrey Pines Road
La Jolla, California 92037
United States of America

1.4. That the purpose or purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set forth in the charter of the mentioned corporation.

2. For issuing this certification that I have seen the following documents (please mention the relevant documents):

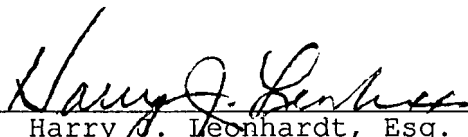
2.1. The Articles of Incorporation of SENOMYX, INC. dated June 25, 2004.

2.2. The Resolution of the Board of Directors of SENOMYX, INC., dated September 12, 2003.



Kelly J. Knight, Esq.
Senior Corporate Counsel
SENOMYX, INC.

April 10, 2006
Date



Harry J. Leonhardt, Esq.
Senior Vice President,
General Counsel and Corporate Secretary
SENOMYX, INC.

April 10, 2006
Date

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

SENOMYX INC., a Delaware corporation

domiciliado (s) en/of 11099 North Torrey Pines Road

La Jolla, California 92037 U.S.A.

hereby ratify the patent applications Nos. 06.022.158 and 06.022.161
filed by Emilio Ferrero on March 6, 2006, and,

en por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929;
GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa.
23555 y DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciliados en la Carrera
4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el
párrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero
como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis
(nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial
con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales
o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al
principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de
aquel. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante
suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En
tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente,
en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la
representación mediante declaración autenticada por Notario Público en
Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de
Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el
certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare
definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia
o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo
suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno
u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla,
cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el
primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados,
para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra
la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos
apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o
personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden
administrativo, contencioso- administrativo y judicial, así como los
tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes
asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y
diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas,
defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres
comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y
denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre
o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de
esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the
Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929;
GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa.
23555 and DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciled at Carrera 4a
N° 72 35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as
alternates, in the order of their appointment, as our representatives for
all industrial property matters with faculty to receive notifications and
to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace
the principal in case of his absence or of temporal or definitive
impediment. The same rule will apply when the second alternate
representative is to replace the first one, or when the third is to replace
the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In
such cases, the principal representative, or the first or second alternates
in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as
representatives through a declaration given before a Notary Public in
Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian
Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate
shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the
following alternate shall take his place. When the absence or
impediment of the principal representative, or of the first or second
alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in
their sequence, by the principal, the first or second alternate depending
on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of
the representation by the first, second or third alternates in their turn
shall end at such time. In addition, we grant a Power of Attorney in
favor of the above named attorneys at law so that they may obtain
the protection of my (our) industrial property and against the unfair
competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to
represent me (us) before any authorities or persons, with or without
jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious
and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters
concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models
and industrial designs; the registration of trademarks, collective,
defensive and service marks, slogans, commercial names, trade
emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin;
its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary
cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights;
b) Actions of unfair competition, protection to the consumer,

consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this April 10, 2006
en/in La Jolla, CA, U.S.A.

por/by Harry J. Leonhardt

Vice President and General Counsel on behalf of
Senomyx Inc.

Firma/Signature

Harry J. Leonhardt

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 06.06/06b realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento mediante el cual **SENOMYX INC.**, una sociedad de Delaware, domiciliada en 11099 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037, Estados Unidos de América, **por medio de la presente ratifica las solicitudes de patente Nos. 06.022.158 y 06.022.161 presentadas por el Doctor Emilio Ferrero el 6 de Marzo de 2006** y otorga derechos de representación y poder a los Doctores EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ, tpa. 23555 y DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogota D.C., Colombia.

Dado y firmado el 10 de abril de 2006 en La Jolla, California por Harry J. Loenhardt, Vicepresidente y Asesor Legal General a nombre de Senomyx Inc.

Firma ilegible

DECLARACIÓN
RELATIVA AL PODER

1. Yo, Kelly J. Knight, Abogada, Asesor Legal Corporativo Principal de SENOMY, INC. por el presente certifico que:

1.1. El señor Harry J. Loenhardt, Abogado, es el Vicepresidente Principal, Asesor Legal General y Secretario Corporativo de SENOMYX, INC. y que él es el funcionario autorizado por SENOMYX, INC. para suscribir este poder a su nombre.

1.2 Que SENOMYX, INC. es una sociedad legalmente constituida y en existencia de conformidad con las leyes de Delaware.

1.3 Que el domicilio de dicha sociedad es

11099 North Torrey Pines Road

La Jolla, California 92037

Estados Unidos de América

1.4 Que el fin o los fines para los cuales se otorga el presente poder están incluidos dentro del objeto social establecido en la escritura de constitución de la mencionada sociedad.

2. Para expedir esta certificación que he visto los siguientes documentos (por favor mencione los documentos relevantes):

2.1 Los Artículos de Constitución de SENOMYX, INC. con fecha del 25 de junio de 2004.

2.2 La Resolución de la Junta Directiva de SENOMYX, INC. con fecha del 12 de septiembre de 2003.

Firma Ilegible
 Kelly J. Knight, Abogada
 Asesor Legal Corporativo Principal
 SENOMYX, INC.

Abril 10 de 2006
 Fecha

Firma Ilegible
 Harry J. Leonhardt, Abogado
 Vicepresidente Principal
 Asesor Legal General y Secretario Corporativo
 SENOMYX, INC.

Abril 10 de 2006
 Fecha

Acta Notarial de Reconocimiento

ESTADO DE CALIFORNIA

CONDADO DE SAN DIEGO

El 10 de abril de 2006, ante mí, Sherry Dollins, Notario Público, compareció personalmente Kelly J. Knight, a quién conozco personalmente (o quién probó ante mí con evidencia satisfactoria) ser la persona cuyo nombre está suscrito en el instrumento anexo y reconoció ante mí que ella suscribió el mismo en su calidad autorizada, y que por medio de su firma en el instrumento, la persona o la entidad a nombre de la cual actuó la persona suscribió el instrumento.

TESTIFICA mí firma y sello.

Firma Ilegible

Firma

SHERRY DOLLINS
Comisión # 1633966
Notario Público - California
Condado de San Diego
Mí Comisión Vence Ene. 29 de 2010

ESTADO DE CALIFORNIA

CONDADO DE SAN DIEGO

El 10 de abril de 2006, ante mí, Sherry Dollins, Notario Público, compareció personalmente Harry J. Loenhardt, a quién conozco personalmente (o quién probó ante mí con evidencia satisfactoria) ser la persona cuyo nombre está suscrito en el instrumento anexo y reconoció ante mí que él suscribió el mismo en su calidad autorizada, y que por medio de su firma en el instrumento, la persona o la entidad a nombre de la cual actuó la persona suscribió el instrumento.

TESTIFICA mí firma y sello.

Firma Ilegible

Firma

SHERRY DOLLINS
Comisión # 1633966
Notario Público - California
Condado de San Diego
Mí Comisión Vence Ene. 29 de 2010

Estado de California



SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: *Estados Unidos de América*

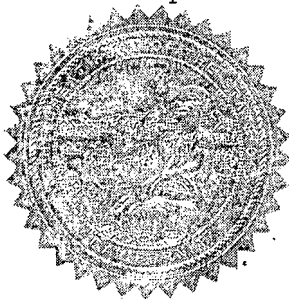
Este documento público

2. ha sido firmado por Sherry Dollins
3. actuando en calidad de Notario, Estado de California
4. lleva el sello/estampilla de Sherry Dollins, Notario Público, Estado de California

CERTIFICADO

5. En Sacramento, California
6. El 22 de Mayo de 2006
7. por el Suplente del Secretario de Estado, Estado de California
8. **No. 287748**

9. Sello/estampilla:



10. Firma

Firma Ilegible
Secretario de Estado

Por Firma ilegible

Sello: EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE CALIFORNIA

Sellos parciales en tinta roja sobre los lados derechos de los dos documentos anteriores con la inscripción. OFICINA DEL SECRETARIO DE ESTADO.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ/ID-7824/WPCL002G/COLO 15159-841-001-8

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 JUN 7 P 2:34

COLEGIO DE ABOGADOS
BOGOTÁ D.C.

MINISTERIO DE
JUSTICIA Y DERECHO

453916
Diego Vargas
COLEGIO DE ABOGADOS
BOGOTÁ D.C.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE

Diego Felipe Vargas Zamora

CONCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
SANTAFE DE BOGOTA, 07 JUN 2006

NOTARIA SEXTA
PARLO MENDEZ
BARAJAS
Notario Sexto Encargado

CAVELIER**ABOGADOS**

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995.

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : **SENOMYX INCORPORATED**

Poder conferido el : 10/04/2006

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.

Señora Jefe,



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:



LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
 Bogotá, D.C. **04 NOV 2009**
 Ante mí AMPARO QUINTERO ARTURO,
 NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE
 BOGOTÁ, D.C.
 Comparado(eron)
Emilio Ferrero
Williamson Luz Clemencia
Suarez de Paez
 Quien(es) exhibió(eron) la(s) C.C.
338019 *31929*
30458344 *23555*
 Y declaró(eron) que la(s) firma(s) que a cese(n)
 en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
 que el contenido del mismo es cierto.
 En constancia se firma esta diligencia.

Emilio Ferrero
Luz Clemencia Suarez de Paez



RECEPTORES DE SABOR HETERO-OLIGOMÉRICO T1R, LÍNEAS
CELULARES QUE EXPRESAN DICHOS RECEPTORES, Y
COMPUESTOS DE SABOR

Referencia Cruzada a Solicitudes Relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional U.S. No. 60/494, 071 presentada en Agosto 6, 2003, y la solicitud provisional U.S. No 60/552,064 presentada en Marzo 9, 2004, las cuales se incorporan ambas como referencia en su totalidad.

Antecedentes del Campo de la Invención

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona en parte con el descubrimiento de que los vectores T1R se ensamblan para formar receptores de sabor funcionales. Particularmente, se ha descubierto que la co-expresión del T1R1 y T1R3 da como resultado un receptor de sabor que responde a los estímulos de sabor umami, que incluyen glutamato de monosodio. También, se ha descubierto que la coexpresión de los receptores T1R2 y T1R3 da como resultado un receptor de sabor que responde a estímulos de sabor dulce que incluyen endulzantes de ocurrencia natural y artificial.

También, la presente invención se relaciona con el uso de receptores de sabor hetero-oligoméricos que comprenden T1R1/T1R3 y T1R2/T1R3 en ensayos para

identificar los compuestos que responden respectivamente a estímulos de sabor umami y a estímulos de sabor dulce.

La invención también se relaciona con quimeras y versiones truncadas de T1R1, T1R2, T1R3, así como también quimeras de receptores T1R1/T1R3 y T1R2/T1R3 que comprenden humanos, ratas, o subunidades de humanas y de rata.

Además, la invención se relaciona con la construcción de líneas celulares que expresan estable o transitoriamente una combinación de T1R1 y T1R3, o T1R2 y T1R3; que incluyen versiones truncadas o quiméricas de aquellas subunidades así como también receptores quiméricos que comprenden subunidades tipo silvestre o quimérico; bajo condiciones constitutivas o inducibles.

También se suministra el uso de estas líneas celulares en ensayos basados en célula para identificar los compuestos moduladores de sabor umami y dulce como, particularmente, ensayos de rastreo de caudal que detectan la actividad del receptor mediante el uso de imágenes fluorométricas

La invención también se relaciona con compuestos que se unen a receptores T1R1/T1R3 y T1R2/T1R3, así como también subunidades quiméricas y truncadas T1R1, T1R2, y T1R3 y a receptores quiméricos.

Descripción de la Técnica Relacionada

El sistema de sabor suministra información sensorial acerca de la composición química del mundo externo. Se cree que los mamíferos tienen cinco modalidades de sabor básicas: dulce, amargo, agrio, salado, y umami. Ver, por ejemplo,

Kawamura et al., Introduction to Umami: A Basic Taste (1987); Kinnamon et al., Ann. Rev. Physiol., 54:715-31 (1992); Lindemann, Physiol. Rev., 76:718-66 (1996); Stewart et al., Am.J. Physiol., 272: 1-26(1997). Cada modalidad de sabor se cree que es mediada por un receptor o receptores de proteína distintos que son expresados en células de receptor de sabor encontradas en la superficie de la lengua (Lindemann, Physiol. Rev. 76: 718-716 (1996). Los receptores de sabor que reconocen los estímulos de sabor amargo, dulce, y umami pertenecen a la superfamilia del receptor acoplado de proteína G (GPCR) (Hoon et al., Cell 96: 451 (1999); Adler et al., Cell 100: 693 (2000). (Otras modalidades de sabor se creen que son mediadas por canales de ión.)

Los receptores acoplados a la proteína G median muchas otras funciones fisiológicas, tal como función endocrina, función exocrina, ritmo cardíaco, lipólisis, y metabolismo de carbohidratos. El análisis bioquímico y la clonación molecular de un número de tales receptores han revelado muchos principios básicos con relación a la función de estos receptores. Por ejemplo, la patente Estadounidense No. 5,691,188 describe como al unirse a un ligando GPCR, el receptor sufre un cambio conformacional que conduce a la activación de una proteína G heterotrimérica al promover el desplazamiento de GDP unido por GTP sobre la superficie de la subunidad $G\alpha$ y subsecuente disociación de la subunidad $G\alpha$ de las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$. Las subunidades $G\alpha$ y los complejos $G\beta\gamma$ activan los elementos corrientes bajo una variedad de celdas de transducción de señal.

Los receptores T1R se consideraban con la hipótesis previa que funcionaban con receptores de sabor dulce (Hoon et al., Cell 96: m541-51 (1999), kitagawa et al., Biochem Biophys Res. Común. 283: 236-42 (2001), Max et al., Nat. Genet. 28; 58-63 (2001); Montmayeur et al., Nat. Neurosci. 4: 412-8 (2001), Sainz et al., J.

Neurochem. 77: 896-903 (2001)), y Nelson et al. (2001) y Li et al (2002) recientemente han demostrado que la rata y el humano, respectivamente, T1R2 y T1R3 actúan en combinación para reconocer los estímulos de sabor dulce.

Sin embargo, subsiste en la técnica la necesidad de nuevos y mejorados agentes saborizantes. Por ejemplo, uno de los cinco sabores básicos conocidos es el "ajedrea" o "umami" de glutamato de monosodio ("MSG"). El MSG es conocido por producir reacciones adversas en algunas personas, pero se ha hecho muy poco progreso para identificar los sustitutos artificiales para MSG. Es conocido que pocos materiales de ocurrencia natural pueden incrementar o mejorar la efectividad del MSG como un agente saborizante de ajedrea, de tal forma que menos MSG serían necesarios para una aplicación de sabor dado. Por ejemplo, los compuestos de nucleótido de ocurrencia natural inosina monofosfato (IMP) o guanosina monofosfato (GMP) son conocidos por tener un efecto multiplicador sobre el sabor de ajedrea de MSG, pero el IMP y el GMP son muy difíciles y costosos de aislar y purificar de fuentes naturales, o sintetizar, y de esta manera solo tienen aplicación práctica limitada a la mayoría de necesidades en composiciones de alimentos o medicinales. Compuestos menos costosos que suministrarían el sabor del MSG mismo, o mejorarían la efectividad de muchos MSG que están presentes podrían ser de muy alto valor. Similarmente, el descubrimiento de compuestos que son nuevos endulzantes "alta intensidad" (es decir, ellos son muchas veces más dulces que la sucrosa) serían de valor.

Lo que se necesita en la técnica es la identificación y caracterización de receptores de sabor que funcionan como receptores de dulce y umami, ensayos para identificar compuestos que modulan (mejoran o bloquean) el sabor dulce y umami, y los compuestos que se unen específicamente a estos receptores.

Resumen de la Invención

La presente invención suministra receptores quiméricos que comprenden varias combinaciones de T1R de humano y de rata, tal como el receptor T1R2/T1R3 quimérico que comprende una subunidad T1R2 humana y una subunidad T1R3 de rata; un receptor T1R2/T1R3 quimérico que comprende una subunidad T1R2 de rata y una subunidad T1R3 humana; una subunidad de receptor T1R2 quimérica que comprende un dominio extracelular humano, un dominio de transmembrana de rata y un dominio intracelular de rata; y una subunidad de receptor T1R3 quimérica que comprende un dominio extracelular de rata, un dominio transmembrana humano y un dominio intracelular humano.

La presente invención también suministra compuestos que se unen específicamente al T1R1, T1R2, T1R3, T1R1/ T1R3 y T1R2/ T1R3, o subunidades aisladas, fragmentos, quimeras o versiones truncadas de estos como se describe aquí.

La presente invención se relaciona con el descubrimiento de que diferentes combinaciones de T1R, que cuando se coexpresan, producen receptores de sabor funcional que responden a estímulos de sabor. Particularmente, la presente invención se relaciona con el descubrimiento de que la coexpresión de T1R2 y T1R3 da como resultado un receptor de sabor hetero-oligomérico que responde a estímulos de sabor dulce. También, la presente invención se relaciona con el descubrimiento de que la coexpresión de T1R1 y T1R3 da como resultado un receptor de sabor hetero-oligomérico que responde a estímulos de sabor umami tal como glutamato de monosodio.

La presente invención también se relaciona con líneas de células que coexpresan T1R1 y T1R3, que incluyen humano o rata, o T1R2 y T1R3, que incluyen humano o rata. En modalidades preferidas estas líneas de células expresarán cantidades elevadas de los receptores, bien sea constitutiva o inducidamente. Estas líneas de células incluyen células que expresan transitoria o establemente T1R1 y T1R3 o T1R2 y T1R3.

También, la presente invención suministra ensayos, preferiblemente ensayos de rastreo de caudal, que utilizan el receptor de sabor T1R2/ T1R3, o el receptor T1R1/ T1R3, preferiblemente ensayos basados en célula de caudal alto, para identificar compuestos que maduran el sabor dulce o umami. La invención también suministra ensayos que incluyen ensayos de sabor para confirmar que estos compuestos modulan el sabor dulce o sabor umami.

La invención también se relaciona con compuestos que se unen al dominio extracelular N-terminal de T1R2, compuestos que se unen al dominio rico en cisteína del T1R2, compuestos que se unen al dominio de transmembrana de T1R3, compuestos que se unen al dominio de transmembrana de T1R3, compuestos que se unen al dominio de transmembrana de T1R2 de un receptor truncado h2TM/H3TM, y compuestos que se unen al dominio de transmembrana de T1R3 de un receptor truncado h2TM/H3TM, por ejemplo.

Breve Descripción de las Figuras

La Figura 1 contiene un alineamiento de secuencia de T1R de humano y rata, receptor que siente el calcio humano y un receptor de glutamato metabotrópico de rata.

La Figura 2 contiene los resultados experimentales de la amplificación RT-PCR que muestran que el hT1R2 y hT1R3 son expresados en tejidos de sabor.

La Figura 3a-3b contiene datos funcionales (respuestas de calcio intracelular) elicitadas por diferentes estímulos de sabor dulce en células HEK que expresan establemente $G_{\alpha 15}$ que son transitoriamente transfectados con T1R2, T1R3 y T1R2/ T1R3 humano en varias concentraciones de estímulos de sabor dulce (Figura 3a), La dosis T1R2/ T1R3 humana responde a varios estímulos de sabor dulce (Figura 3b); respuestas T1R2/ T1R3 a sucrosa en la presencia de gurmarina, y respuestas del receptor $\beta 2$ -adrenérgico endógeno isoproterenol en la presencia de gurmarina. La Figura 3c contiene la respuesta normalizada de diferentes endulzantes.

La Figura 4 contiene respuestas de calcio intracelular en células HEK que expresan establemente $G_{\alpha 15}$, transfectadas transitoriamente con hT1R2/hT1R3, rT1R2 y rT1R3, hT1R2 y rT1R3 en respuesta a 350 mM de sucrosa, 25 mM de triptófano, 15mM de aspartámico, y 0.05% de monelina.

La Figura 5 contiene los resultados de un ensayo basado en un reactor con plato de fluorescencia en donde las células HEK que expresan establemente $G_{\alpha 15}$ que fueron transfectadas transitoriamente con hT1R2 y hT1R3 o hT1R3 solo y puestos

en contacto con tinte de calcio Fluo-4 y estímulo de sabor dulce (12,5 mM de ciclamato).

La Figura 6 contiene curvas de respuesta de dosis normalizada que muestran que la función hT1R2 y hT1R3 en combinación con el receptor de dulce humano basado en su interacción específica de dosis con varios estímulos dulces (trp, ciclamato, sucrosa, neotamo, aspartamo, sacarina y Acek).

La Figura 7 contiene información estructural que se relaciona con mGluR1 y T1R1 que muestra que los residuos clave de acción de unión de ligando son observados en estas moléculas.

La Figura 8a-8c contiene datos funcionales que muestran las células HEK que expresan establemente $G\alpha 15$ que son transfectados transitoriamente con T1R2/T1R3 que responden al glutamato en un ensayo basado en calcio intracelular. La Figura 8a muestra que el calcio intracelular se incrementa en respuesta al incremento de la concentración de glutamato; la Figura 8b muestra respuestas de calcio intracelular IMP (2 mM), glutamato (0,5 mM) y 0.2 mM IMP; La Figura 8c muestra respuestas T1R1/T1R3 humanas a glutamato en la presencia y ausencia de 0.2 mM IMP.

Las Figuras 9a-9b contienen respectivamente los resultados de un ensayo detenido de inmunofluorescencia que utiliza hT1R2 marcado con Myc y un experimento FACS que muestra la incorporación del péptido PDZIP (ID de Sec No.: 1) mejora la expresión de un T1R (h T1R2) sobre la membrana de plasma.

La Figura 10a a 10b contiene datos de imágenes de calcio que demuestran que el hT1R2/T1R3 responden a diferentes estímulos de dulce.

La Figura 11 muestra las respuestas de líneas celulares que expresan establemente hT1R1/hT1R3 mediante imágenes fluorescentes automatizadas a estímulos de sabor umami.

La Figura 12 muestra la respuesta de una línea celular que expresa establemente hT1R2/hT1R3 mediante imágenes fluorescentes automatizadas a estímulos de sabor dulce.

La figura 13 muestra curvas de respuesta de dosis determinadas utilizando imágenes fluorescentes automatizadas para una línea celular que exprese induciblemente el receptor de sabor T1R1/T1R3 para el L-glutamato en la presencia y la ausencia de 0,2 mM de IMP.

Las figuras 14 y 15 muestran la respuesta de una línea celular que expresan induciblemente el receptor de sabor T1R1/T1R3 (clon I-17) a un panel de L-aminoácidos. En la figura 14 diferentes C-aminoácidos en 10 mM fueron ensayados en la presencia y ausencia de 1 mM IMP. En la figura 15 las respuestas a dosis para aminoácidos se determinaron en la presencia de 0,2 mM de IMP.

La figura 16 muestra que el lactisol inhibe las actividades del receptor del T1R2/T1R3 humano y el T1R1/T1R3 humano.

La figura 17 muestra esquemas de quimeras T1R de humano-rata. Las quimeras son construidas al fusionar los dominios extracelulares de humano o de rata a los dominios de transmembrana de rata o humano, respectivamente, como se muestra en el h2-r2, r2-h2, h3-r3 y r3-h3. .

La Figura 18 muestra neohesperidina dihidrochalcona (NHDC) mejora las actividades del receptor de sabor umami T1R1/T1R3. [neohesperidina dihidrochalcona]= 5 μ M. la curva de respuesta de dosis de glutamato es cambiada a la izquierda por 2,3 veces (panel izquierdo) y la respuesta de dosis de glutamato/IMP es cambiada a la izquierda por 2,1 veces.

La Figura 19 muestra que los endulzantes de control no afectan las actividades del receptor de sabor umami T1R1/T1R3 [esteviocida]=0,5 mM [sacarina]= 1mM. La respuesta de dosis de glutamato es mostrada en el panel izquierdo y la respuesta de dosis de glutamato/IMP es mostrada en el panel derecho.

La figura 20 muestra los mapas NHDC del dominio de transmembrana del T1R3 humano.

La figura 21 muestra el mapeo de un compuesto al dominio de transmembrana T1R2 humano.

Las figuras 22a-d muestran endulzantes que mapean los diferentes dominios/subunidades del receptor de dulce humano. La figura 22a muestra las respuestas de los receptores de dulce en humano y rata a sucrosa (200 mM), aspartamo (10 mM), al neotamo (0,1 mM), ciclamato (10 mM), y sucrosa (200 mM) en la presencia de lactisol (1 mM) (Suc/Lac). Las células HEK-293T fueron

transfectadas transitoriamente con T1R2, T1R3 y $G_{\alpha 15}$ quimera $G_{\alpha 15/il}$ de humano o rata, y ensayado para incremento de calcio intracelular respuesta a endulzantes. La figura 22b muestra que el aspartamo y neotamo fueron mapeados al dominio extracelular N-terminal de T1R2 humano. Las combinaciones de quimeras T1R fueron transfectadas transitoriamente en células HEK-293T con $G_{\alpha 15/il}$, y ensayadas las repuestas a endulzantes a las concentraciones listadas en 23a. La presencia o ausencia de respuesta es lo que es importante. La figura 22c muestra que el ciclamato fue mapeado en el dominio de transmembrana C-terminal de humano T1R3. La Figura 22d muestra que el lactisol fue mapeado al dominio de transmembrana de T1R3 humano. Diferentes combinaciones de quimeras T1R fueron transfectadas transitoriamente en células HEK-293T con $G_{\alpha 15/il}$, y ensayadas para respuestas a sucrosa (200 mM) y a AceK (10 mM) en la ausencia o presencia del lactisol (1 mM). Las actividades en B, C y D representan la media $\pm$ SE del número de células que responden a cuatro campos de imagen de $\sim 1,000$ células confluentes.

La Figura 23 a-d muestra mutaciones en el T1R2 o T1R3 que afectan selectivamente la actividad de diferentes endulzantes. La Figura 23a muestra alineación de secuencia del dominio de unión del ligando N-terminal de GluR5 de rata con los T1R2 de humano y roedor. Los 8 aminoácidos críticos involucrados en la unión de ligando en el mGluR5 son marcadas con *, tres de los 8 aminoácidos se conservan en T1R2 y están subrayados. La Figura 23b muestra dos puntos de mutaciones en el dominio extracelular N-terminal de T1R2 humano que elimina la respuesta a aspartamo y neotamo sin afectar el ciclamato. Las líneas celulares adecuadas de hT1R2/hT1R3 (WT), hT1R2 S144A/hT1R3 (S144A) y hT1R2 E302A/hT1R3 (E302A) se generaron como se describió en los ejemplos. Las respuestas a dosis de estas líneas estables se determinaron sobre FLIPR para

sucrosa, aspartamo, neotamo, y ciclamato. Las actividades representan la media $\pm$ SE de veces de incremento en las intensidades de fluorescencia para cuatro pozos registrados. La Figura 23c muestra el alineamiento de la secuencia de los dominios de transmembrana T1R3 de humano y roedor. Los tres bucles extracelulares están subrayados y marcados EL1, 2, o 3 de acuerdo con su orden en las secuencias de proteína. La Figura 23d muestra mutaciones en el bucle extracelular del hT1R3 que elimina la respuesta a ciclamato sin afectar el aspartamo. Cada uno de los tres bucles extracelulares del hT1R3 se reemplazaron con secuencia de proteína de rata separadamente, y los mutantes hT1R3 resultantes se transfectaron transitoriamente en células HEK-293T junto con $G_{\alpha 15/11}$, se ensayaron para respuestas a sucrosa (200 mM), aspartamo (10 mM), y ciclamato (10 mM). Las actividades representan la media $\pm$ SE del número de células que responden para cuatro campos de imagen de $\sim 1,000$ células confluentes.

La Figura 24a-b muestra que el T1R2 es requerido para el acoplamiento del $G_{\alpha 15}$. La Figura 24a muestra la respuesta de los receptores de dulce humano, de rata y quimérico a sucrosa (200 mM) y AceK (10 mM). Las células $G_{\alpha 15}$ estables fueron transfectadas transitoriamente con los T1R humano, de rata o quiméricos, y ensayados su incremento de calcio intracelular en respuesta a los endulzantes. La Figura 24b muestra que el acoplamiento de $G_{\alpha 15}$ es mediado por T1R2 humano. Las actividades representan la media $\pm$ SE del número de células que responden a los cuatro campos de imagen de $\sim 1,000$ células confluentes.

La figura 25a-f muestra el efecto del lactisol y ciclamato sobre el receptor umami T1R1/T1R3 humano. La figura 25a muestra la respuesta de la línea celular estable T1R1/T1R3 humano al L-glutamato (5 mM) y L-glutamato/IMP (1/0,2 mM) en la

ausencia y presencia del lactisol (5 mM). La figura 25b muestra que las curvas de inhibición de lactisol dependientes de dosis se determinaron para L-glutamato (Glu), y el L-glutamato con 0,2 mM de IMP (Glu/IMP), cada a una a dos diferentes concentraciones. Los IC₅₀ son $0,19 \pm 0,02$ mM y $0,21 \pm 0,01$ mM para el L-glutamato a 8 y 80 mM; a $0,35 \pm 0,03$ mM y $0, \pm$ al 0,06 mM para L-glutamato con IMP en 0,8 y 8 mM respectivamente. La figura 25c muestra la respuesta de dosis para el L-glutamato, con o sin 0,2 mM de IMP, fueron determinados en la presencia de diferentes concentraciones de lactisol. En la presencia de 0,25, o 50 μ M de lactisol, los EC₅₀ son $9,9 \pm 1,5$ mM, $7,9 \pm 0,5$ mM, y $7,0 \pm 0,3$ mM para L-glutamato; en la presencia de 0,100, o 200 μ M de lactisol, los EC₅₀ son $0,53 \pm 0,04$ mM, $0,71 \pm 0,10$ mM, y $0,84 \pm 0,10$ mM para el L-glutamato con IMP. Los valores representan la media $\pm$ SE para cuatro respuestas independientes. La figura 25d muestra el umbral de detección para estímulos de sabor dulce, umami, y salado fueron determinadas en la presencia o ausencia de lactisol. El efecto de inhibición del lactisol se muestra como incrementos de veces en los umbrales de detección. "Umbrales de detección" son definidos como el límite inferior de degustantes detectables. Los valores del umbral de detección fueron promediados sobre cuatro ensayos para tres sujetos. La figura 25e muestra la respuesta de la línea celular estable T1R1/T1R3 de humano a nivel de umbral de L-glutamato (4 mM) y el carbacol agonista receptor M2 endógeno que fueron ensayados sobre el FLIPR en ausencia y presencia de varias concentraciones de ciclamato. La figura 25f muestra las respuestas de dosis de la línea de célula estable T1R1/T1R3 humana que fueron determinadas sobre el FLIPR para L-glutamato con o sin 0,2 mM IMP en ausencia y presencia de ciclamato (8 mM). Las actividades en B, C, E y F representan la media $\pm$ SE de las veces de incremento en las intensidades de fluorescencia para cuatro pozos registrados. Las respuestas de dosis en B, C, E y F se reprodujeron al menos 6 veces independientemente.

La Figura 26 muestra un modelo de trabajo para las relaciones estructura-función del receptor de sabor umami. Las flechas llenas indican la activación directa, las flechas abiertas indican mejoramiento, y las cabezas de barra indican inhibición.

La figura 27a muestra todas las 16 combinaciones de los T1R y las quimeras que fueron ensayadas para respuesta a endulzantes y lactisol. rT1R2/T1R3H-R, rT1R2/hT1R3, y T1R2H-R/T1R3R-H muestran una respuesta significativa al ciclamato y ellos pueden ser inhibidos por lactisol. Las quimeras de T1R fueron transfectadas transitoriamente en células de HEK-293T con $G_{\alpha 15/11}$. Las actividades representan la media $\pm$ SE del número de células que responden a cuatro campos de imagen de $\sim 1,000$ células confluentes, cada unidad sobre el eje Y representa 50 células que responden. Abreviaturas: Suc (sucrosa 100 mM); Suc/Lac (sucrosa 100 mM, lactisol 1 mM); AceK (acesulfamo K 10 mM); AceK/Lac (acesulfamo K 10 mM, lactisol 1 mM); ATM (aspartamo 10 mM); NTM (neotamo 10 mM); Cic (ciclamato 10 mM). La figura 27b muestra las curvas de inhibición dependientes de dosis del lactisol del receptor de dulce de humano que fueron determinadas para sucrosa (Suc), sacarina (Sac), y el D-triptofano (D-Trp), cada una a dos diferentes concentraciones. Los IC₅₀ son $19,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$ y $64,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$ para sucrosa en 50 mM y 120 mM; $22,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$ y $103 \pm 7, \mu\text{M}$ para sacarina a 0,1 y 2 mM; $19,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$ y $168 \pm 9 \mu\text{M}$ para D-triptofano respectivamente. La figura 27c muestra que las respuestas de dosis del receptor de dulce de humano para sucrosa, D-Trp y sacarina fueron determinadas con diferentes concentraciones de lactisol. En la presencia de 0,10, o 20 μM de lactisol, los EC₅₀ son $19,4 \pm 0,9 \text{ mM}$, $24,7 \pm 1,0 \text{ mM}$, y $31,3 \pm 0,3 \text{ mM}$ para sucrosa; $0,37 \pm 0,02 \text{ mM}$, $0,60 \pm 0,03 \text{ mM}$, $0,94 \pm 0,08 \text{ mM}$ para D-Trp; $42 \pm 3 \mu\text{M}$, $67 \pm 6 \mu\text{M}$, $118 \pm 2 \mu\text{M}$ para sacarina. Los valores representan la media $\pm$ SE para cuatro respuestas independientes. Las respuestas

a dosis en B y C fueron determinadas al menos 6 veces independientemente, y generaron resultados similares los demostrados aquí.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las invenciones suministran compuestos que se unen específicamente a los receptores de sabor tipo silvestre y dulce quimérico y umami descritos aquí. Se suministran además compuestos que se unen específicamente a las subunidades T1R2 o T1R3 quiméricas o truncadas de los receptores de dulce y umami.

La construcción del receptor de dulce T1R2/T1R3 define un gran género de moléculas. El receptor responde a cada sabor endulzado, incluyendo azúcares de carbohidrato, aminoácidos y derivados proteínas dulces y endulzantes sintéticos. Mientras tanto, el receptor inhibe la estero-selectividad para ciertos endulzantes, por ejemplo, este responde a D-triptofano y no a L-triptofano, que está en correlación con los datos fisiológicos de sabor.

Así, los compuestos de la invención se unen específicamente a los receptores quiméricos. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, un receptor T1R2/T1R3 quimérico que comprende una subunidad T1R2 humana y una subunidad T1R3 de rata; un receptor T1R2/T1R3 quimérico que comprende una subunidad T1R2 de rata y una subunidad T1R3 de humano; una subunidad receptora T1R2 quimérico que comprende un dominio extracelular humano, un dominio de transmembrana de rata y un dominio intracelular de rata; y una subunidad de receptor T1R3 quimérica que comprende un dominio extracelular de rata, un dominio de transmembrana humano y un dominio intracelular humano. La

invención suministra los receptores de sabor funcionales, preferiblemente receptores de sabor humano, que son producidos mediante la co-expresión de una combinación de diferentes T1R, preferiblemente T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3, y o los correspondientes las secuencias de ácidos nucleicos aisladas, o fragmentos, quimeras, o variantes de estos que luego de la co-expresión dan como resultado un receptor de sabor funcional, es decir, un receptor de sabor dulce (T1R2/T1R3) o un receptor de sabor umami (T1R1/T1R3).

Los T1R, una familia de la clase de los receptores acoplados C G proteínas (GPCRs), son selectivamente expresados en tejido de sabor (Hoon, M. A., et al., Cell, 1999.96 (4): p. 541-51, Bachmanov, A. A., et al., Chem Senses, 2001.26 (7): p. 925-33, Montmayeur, J.P., et al., Nat Neurosci, 2001.4 (5): p. 492-8, Max, M., et al., Nat Genet, 2001. 28 (1): p. 58-63, Kitagawa, M., et al., Biochem Biophys Res Commun, 2001.283 (1): p. 236-42 and Nelson, G., et al., Cell, 2001.106 (3): p. 381-90). La expresión funcional de los T1R en células HEK293 revelaron que diferentes combinaciones de T1R responden a estímulo de sabor umami y dulce (Nelson, G., et al., Cell, 2001.106 (3): p. 381-90, Li, X., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2002.99 (7): p. 4692-6.) T1R2 y T1R3, cuando se co-expresan en 293 células, reconocen diversos endulzantes naturales y sintéticos [por la razón mencionada anteriormente re "diverso", por favor consideres si necesitamos está sección para mejora. Si no, se suprimiría. Lo podemos discutir], aunque T1R1 y T1R3 reconocen los estímulos de sabor umami L-glutamato, y está respuesta es mejorada por 5'.ribonucleótidos, un contraste de sabor umami. Los datos trnasgénicos confirmaron que el T1R de hecho media para el dulce para ratón y los sabores umami (Damak, S., et al., Science, 2003 301 (5634): p. 850-3, Zhao, G. Q., et al., Cell 2003 Oct 31; 115 (3): 255-66).

La clase cGPCR posee un dominio extracelular N-terminal grande, a menudo determinado como el dominio “Venus flytrap” (VFD) (Pin, J. P., Pharmacol Ther, 2003 98 (3): p. 325-54), y son conocidos por funcionar como cualquiera homodímeros, en el caso de los receptores metabotrópico glutamato (mGluRs) y receptor que siente el calcio (CaR), o los heterodímeros, en el caso del receptor ácido γ -aminobutírico (GABA_AR). Los datos de expresión funcional muestran un mecanismo heterodímero para los T1R: tanto el T1R1 como el T1R2 necesitan ser co-expresados con T1R3 para ser funcionales, lo que es soportado por los patrones de expresión translapantes de los T1R en lengua de roedor.

Se establece aquí que los miembros de la familia T1R actúan en combinación con otros miembros de la familia T1R para funcionar como receptores de sabor dulce y umami. Como se describe en detalle adicional infra en los ejemplos experimentales, se ha demostrado que las células heterólogas que co-expresan hT1R2 y hT1R3 son activadas selectivamente mediante estimular el sabor dulce en una manera que semejan el sabor de dulce en humano.

Por ejemplo, las células HEK-293-G_{α15} que co-expresan hT1R2 y hT1R3 responden significativamente al ciclamato, sucrosa, aspartamo, y sacarina, y las respuestas de dosis para estos compuestos se correlacionan con los umbrales de detección de sabor psicofísicos.

También, como se soporta con los datos en los ejemplos experimentales, se ha mostrado que las células que co-expresan hT1R1 y hT1R3 son activadas selectivamente mediante glutamato (glutamato de monosodio) y 5'-ribonucleótidos de una manera que reflejan el sabor umami en humanos. Por ejemplo, las células HEK-293-G_{α15} que co-expresan hT1R1 y hT1R3 responden específicamente al

glutamato y la respuesta de dosis para este compuesto con sabor umami se correlaciona con su umbral de detección de sabor sicofísico. Más aun, los 5'-ribonucleótidos tales como el IMP mejoran la respuesta del glutamato el receptor T1R1/T1R3, una característica de sinergismo del sabor umami.

Además, como se muestran mediante los datos experimentales en los ejemplos se ha mostrado que las células que co-expresan estable e indeciblemente el T1R1/T1R3 responden selectivamente a los estímulos de sabor umami L-glutamato y L-aspartato y solamente responden débilmente a los otros L-aminoácidos y en muchas mayor concentración, suministrando evidencia adicional de que el receptor T1R1/T1R3 se puede utilizar en ensayos para identificar los compuestos que modulan (mejoran o bloquean) los estímulos de sabor umami.

Ejemplos de compuestos que se unen específicamente al receptor dulce y modulan el sabor dulce se pueden encontrar en la tabla 5.

Las tablas 1-4 suministran ejemplos de compuestos que se unen específicamente al receptor umami y modulan el sabor umami.

También, como se soporta mediante los datos experimentales en los ejemplos, se ha mostrado que líneas celulares que co-expresan el T1R1/T1R3 o el T1R2/T1R3 responden respectivamente a los estímulos de sabor umami y dulce y la manera de respuesta a dosis cuantitativa que soporta adicionalmente una conclusión que se une específicamente al receptor T1R1/T1R3 y el T1R2/T1R3 que se puede utilizar para definir agonistas y antagonistas receptores, por ejemplo, MSG sustitutos, bloqueadores umami, endulzantes artificiales y naturales novedosos, y bloqueadores de dulce.

También, como se soporta por los datos en ejemplos experimentales, se ha demostrado que el bloqueador de sabor dulce lactisol inhibe tanto el receptor de dulce T1R2/T1R3 como el receptor de sabor umami T1R1/T1R3. Los compuestos que se suministran aquí mejoran, semejan, modulan o bloquean los sabores dulce o umami. El hecho de que el lactisol inhiba tanto los receptores T1R1/T1R3 como T1R2/T1R3 sugieren que estos receptores pueden compartir una subunidad común que está unida por un lactisol y potencialmente otros moduladores de sabor. Por lo tanto, esto muestra que algunos compuestos que mejoran, semejan, modulan o bloquean el sabor dulce pueden tener un efecto similar sobre el sabor umami o viceversa.

Además, como se soporta por los datos en ejemplos experimentales, se ha demostrado que líneas celulares que co-expresan establemente los T1R, es decir T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3, cuando se ensayan mediante imágenes de fluorescencia automatizada responden muy efectivamente a varios estímulos de sabor dulce y umami, es decir a magnitudes substancialmente mayores que células transfectadas transitoriamente. Así, estas líneas celulares son especialmente bien adecuadas para uso en ensayos de rastreo de caudal alto

para identificar compuestos que modulan, bloquean, semejan, o mejoran el sabor dulce o umami. Sin embargo, la invención también comprende ensayos que utilizan células que expresan transitoriamente un T1R o combinación de estos.

Más aún, aunque la solicitud contiene datos que demuestran que algunos T1R actúan en combinación, particularmente con T1R1/T1R3 y T1R2/T1R3, y que tales combinaciones de receptor se pueden utilizar en ensayos, preferiblemente ensayos de caudal alto, se debe notar que la invención objeto también comprende ensayos que utilizan T1R1, T1R2 y T1R3 solos o en combinación con otras proteínas, por ejemplo, otros GPCRs.

Existen diferencias en el sabor dulce en humanos y roedores en términos de especificidad de ligando, eficiencia que acopla la proteína G, así como también sensibilidad a los inhibidores. Diferencias de especies en la especificidad del ligando T1R se puede utilizar para demostrar que el receptor de sabor dulce funciona de hecho como un complejo heteromérico, y que existe más de un sitio de unión de ligando sobre el receptor. Además, un enlace funcional entre los receptores dulce y umami mediados por el T1R3 se ha mostrado (Ejemplo 16).

Tanto los receptores humanos como de rata pueden acoplarse eficientemente a un $G_{\alpha 15}$ quimérico con la secuencia de cola C-terminal del $G_{\alpha il}$ ($G_{\alpha 15/il}$). Por ejemplo, el T1R2/T1R3 humano pero no de rata responde selectivamente a un grupo de endulzantes que incluyen aspartamo, neotamo, y ciclamato. Este es consistente con los datos fisiológicos de sabor. Estas diferencias en especificidad agonista se pueden utilizar para mapear sus sitios de unión sobre el receptor. Un T1R quimérico se puede generar entre los genes humanos y de rata, con una unión inmediatamente anterior al dominio de transmembrana. Cada una de

quimeras T1R consiste por lo tanto de dos mitades, el dominio extracelular N-terminal, y el dominio de transmembrana intracelular C-terminal, de diferentes especies. Por ejemplo, un T1R2 quimérico, denominado T1R2-R tiene secuencia de N-terminal de T1R2 fusionado a la secuencia C-terminal T1R2 de rata. Respuestas a estas quimeras pueden ser ensayadas (Figura 22).

Los compuestos novedosos y los sabores, saborizantes y mejoradores de dulces novedosos fueron descubiertos en serie químicas de derivados amida. Los compuestos amida también comprenden ciertas subclases de derivados amida o clases de derivados relacionados con amidas tales como por ejemplo, ureas, uretanos, oxalamidas, acrilamidas, y similares. Estos compuestos, cuando se utilizan junto con sucrosa o solos, incrementan una respuesta in vitro o se incrementan concomitantemente la percepción de dulce en el sabor de humanos. Estos compuestos mejoran otros saborizantes de dulces naturales y sintéticos. Ejemplos de estos compuestos se listan en la tabla 5.

En una modalidad, la invención suministra compuestos novedosos, saborizantes, degustantes, mejoradores de sabor, compuestos modificantes de sabor, y/o composiciones que los contienen.

En una modalidad más específica, la invención suministra saborizantes dulces novedosos, degustantes dulces, mejoradores de sabor, dulce y modificadores de sabor dulce y composiciones que los contienen. Más particularmente, en otra modalidad, la invención está dirigida a compuestos que modulan, inducen, mejoran, o inhiben los degustantes dulces naturales o sintéticos, por ejemplo, los de ocurrencia natural y los endulzantes sintéticos.

En otra modalidad, la invención suministra composiciones, preferiblemente composiciones adecuadas para el consumo humano o animal, que contienen al menos un compuesto de la invención. Estas composiciones incluyen alimentos, bebidas y medicinas, y aditivos de alimento que cuando se agregan a los alimentos, bebidas o y medicinas modulan el sabor de estas, particularmente al mejorar el sabor dulce de estos.

Otra modalidad de la invención está dirigida al uso de un compuesto de la invención para modular el sabor dulce de una comida, bebida o medicina deseada, cuya composición puede comprender unos o más de otros compuestos que elicitán un sabor dulce. Estos compuestos, cuando ellos se utilizan juntos con endulzantes de ocurrencia natural o sintéticos, no sólo incrementan una respuesta in vitro sino también intensifican el dulce y otras percepciones de sabor en el sabor de los humanos. Estos compuestos específicos, cuando son utilizados juntos con degustantes de dulce, tal como los endulzantes de ocurrencia natural y sintética, no sólo incrementan la respuesta T1R2/T1R3 in vitro sino también intensifican el sabor dulce y otras percepciones de sabor o en los sabores de humano.

Los compuestos novedosos y el sabor, degustante, y mejoradores umami novedosos y degustantes, tales como amidas, ureas, amino-amidas, amido-amidas, y β -lactamas también son descritos aquí. Estos compuestos, cuando se utilizan juntos con MSG solos, incrementan una respuesta in vitro y la percepción umami en degustantes para humano. Estos compuestos también mejoran otros degustantes umami naturales y sintéticos. Ejemplos de estos compuestos son listados en las tablas 1-4.

En una modalidad, la invención suministra compuestos novedosos, saborizantes, degustantes, mejoradores de sabor, mejoradores de gusto, compuestos que modifican el sabor, y/o composiciones que los contienen.

En una modalidad específica, la invención suministra saborizantes umami, degustantes umami, mejoradores de sabor umami, y modificadores de sabor umami novedosos y las composiciones que los contienen. Más particularmente, en otra modalidad, la invención está dirigida a compuestos que modulan (inducen, mejoran o inhiben) los degustantes naturales o sintéticos umami, por ejemplo, glutamato monosódico (MSG).

En otra modalidad, la invención suministra composiciones, preferiblemente composiciones apropiadas para el consumo humano o animal, que contienen por lo menos un compuesto de la invención. Estas composiciones incluyen comidas, bebidas y medicamentos, y aditivos alimenticios que cuando están agregados a los alimentos, bebidas o medicamentos modulan el sabor de estos, particularmente al mejorar el sabor umami de estos.

Otra modalidad de esta invención se dirige al uso de un compuesto de la invención para modular el sabor umami de una comida, bebida o medicina deseada, cuya composición pueda comprender uno o más de otros compuestos que eliciten un sabor umami, por ejemplo, MSG. Estos compuestos, cuando ellos son utilizados juntos con MSG, no solamente incrementan una respuesta in vitro sino también intensifican el sabor umami y otras percepciones en el sabor de humanos. Estos compuestos específicos, cuando ellos fueron utilizados juntos con los degustantes umami, tal como el MSG, no solamente se incrementa la respuesta T1R1/T1R3 in vitro sino también intensificaron el sabor umami y otros sabores o percepciones de

sabor en sabores de humano. Algunos de los compuestos, cuando ellos fueron ensayados solos, elicitaban percepciones humanas de umami.

Los compuestos definidos por unión específica a receptores específicos utilizando los ensayos de T1R actuales se pueden utilizar para modular el sabor de alimentos y bebidas. Los ensayos adecuados descritos en detalle adicional infra incluyen por vía de ejemplo ensayos de célula completa y ensayos bioquímicos, que incluyen ensayos de unión directa utilizando una de las combinación de diferentes receptores T1R, quimeras o fragmentos de estos, específicamente fragmentos que contienen dominios de unión de ligando N-terminal. Los ejemplos de los ensayo apropiados para uso en la invención son descritos con mayor detalle infra y son conocidos en el campo GPCR.

Los ensayos se pueden diseñar para cuantificar la unión de diferentes compuestos de mezclas de los compuestos de los receptores de sabor T1R o las combinaciones del receptor de sabor T1R o los receptores T1R expresados en combinación con otras proteínas heterólogas (no-T1R), por ejemplo, otros GPCR, o que cuantifican la activación de las células que expresan los receptores de sabor T1R. Esto se puede efectuar al expresar estable o transitoriamente receptores de sabor en células heterólogas tales como HEK-293, células CHO y COS. Así, esta característica fisicoquímica de los compuestos se utiliza para definir un género de compuesto que comparte esta característica.

Los ensayos utilizarán preferiblemente células que también expresan (preferiblemente de manera estable) una proteína G tal como el $G_{\alpha 15}$ o el $G_{\alpha 16}$ u otras proteínas G promiscuas o variantes de proteína G, o una proteína G endógena. Además, las proteínas $G\beta$ y $G\gamma$ también se pueden expresar allí.

El efecto de las células que utilizan sabor dulce o umami o las composiciones que expresan o contienen los receptores o combinaciones de receptor anteriormente identificados se pueden determinar mediante varios medios que incluyen el uso de tintes sensibles al calcio, tintes sensibles al voltaje, ensayos cAMP, ensayos de unión directa utilizando ligandos fluorescentemente marcados o ligandos radioactivos tales como ^3H -glutamato, o ensayos transcripcionales (que utilizan un reportero adecuado tal como luciferasa o β -lactamasa).

Los ensayos que se pueden utilizar con uno o más de un T1R de acuerdo con la invención incluyen por vía de ejemplo ensayos que utilizan una selección genética para células vivas; ensayos que utilizan células o membranas o fragmentos de membranas completos o proteínas T1R purificadas; ensayos que utilizan segundos mensajeros tales como cAMP o IP3, ensayos que detectan la translocación de arrestina a la superficie celular, ensayos que detectan la pérdida del receptor de expresión sobre la superficie de la célula (internalización) mediante los ligandos ensayados, los ensayos directos unidos por ligando, los ensayos de unión competitiva con los inhibidores, ensayos que utilizan proteína traducida in vitro, ensayos que detectan cambios conformacionales luego de la unión de un ligando (por ejemplo, como se evidencia por la proteólisis, fluorescencia o RMN), ensayos de comportamiento que utilizan animales transgénicos no humanos que expresan un T1R o una combinación T1R, tal como moscas, gusanos o ratones, ensayos que utilizan células infectadas con virus recombinantes que contienen los genes T1R.

También dentro del alcance dentro de la invención. Están los análisis basados en estructura en donde la estructura de cristal para los rayos X de T1R o el fragmento

T1R (o la combinación de T1R con otra proteína) se determina y utiliza para predecir mediante los compuestos de técnicas de moderación molecular que se unirán y/o mejoraran, el imitador, el bloqueo o modulan el receptor o la combinación particular T1R. Más particularmente la invención abarca la determinación de la estructura de cristal del T1R1/T1R3 (preferiblemente hTIRI/hT1R3) y/o T1R2/T1R3 (preferiblemente hT1R2/hT1R3) y el uso de tales estructuras de cristal y métodos de diseño basados en estructura para identificar las moléculas que modulan la actividad receptora T1R.

La invención especialmente incluye ensayos bioquímicos conducidos utilizando células, por ejemplo, células de mamífero, levadura, insecto u otras heterólogas que expresan uno o más receptores o fragmentos T1R de longitud completa preferiblemente dominios N-terminales de T1R1, T1R2, y/o T1R3. El efecto de un compuesto en tales ensayos se puede determinar utilizando ensayos de unión competitiva, por ejemplo, utilizando glutamato radiactivo o IMP, fluorescencia (por ejemplo, polarización de fluorescencia FRET) o ensayos de unión $GTP\gamma^{35}s$ como se anotó, en una modalidad preferida tales ensayos utilizaran líneas de células que establemente co-expresan TIRI/T1R3 o T1R2/T1R3 y una proteína G adecuada, tal como la $G_{\alpha15}$. Otras proteínas apropiadas incluyen las proteínas G quiméricas y variantes descritas en al solicitud U.S. serie No. 09/984,292 y 60/243,770, incorporadas como referencia en su totalidad aquí.

Adicionalmente, los receptores alterados se pueden construir y expresar teniendo propiedades mejoradas, por ejemplo, expresión de superficie mejorada o proteína G acoplante. Estos variantes T1R se pueden incorporar en ensayos basados en célula y bioquímicos.

Se prevé que los recientes descubrimientos que se relacionan con T1R humano se extenderán a otras especies, por ejemplo, roedores, cerdo, monos, perros y gatos, y quizás a no mamíferos, tales como los peces. A este respecto, varios fragmentos de T1R de pez son identificados infra en el ejemplo 1. Por lo tanto, la invención objeto tiene aplicación en el rastreo de compuestos para uso en formulaciones de alimentación para animales.

La invención incluye además la utilización de diferentes variantes alélicas de varios de T1R y las combinaciones de estas, posibilitando de esta manera la identificación de los compuestos que elicitán la sensación de sabor específica en los individuos que expresan aquellas variantes alélicas o los compuestos que elicitán la sensación de sabor específica en todos los individuos. Tales compuestos pueden ser utilizados para elaborar alimentos más generalmente saborizables.

Los ácidos nucleicos que codifican T1R también suministran sondas valiosas para la identificación de células de sabor, como los ácidos nucleicos son específicamente expresados en las células de sabor. Por ejemplo, las sondas para los polipéptidos T1R y las proteínas se pueden utilizar para identificar las células de sabor presentes en el foliado, circunvalado, y las papilas fungiformes, así como también las células presentes en la geschmackstreifen, cavidad oral, epitelio gastrointestinal y epiglotis. En particular, los métodos para detectar los T1R se pueden utilizar para identificar células de sabor sensibles al dulce y/o estímulos de sabor umami u otros estímulos de sabor que representan otras modalidades de sabor. Las células que expresan estable o transitoriamente T1R2 y/o T1R3 serían predecibles del trabajo presente por responder a estímulos de sabor dulce. Similarmente, las células que expresan T1R1 y/o T1R3 serían predecibles por

responder a estímulos de sabor umami. Los ácidos nucleicos que codifican las proteínas T1R y los polipéptidos de la invención se pueden aislar de una variedad de fuentes, trabajadas con ingeniería genética, amplificadas, sintetizadas, y/o expresadas recombinantemente de acuerdo con los métodos descritos en la WO 00/035374, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Una lista de los T1R que se pueden expresar de acuerdo con la invención se suministra en los ejemplos. Sin embargo, se debe enfatizar que la invención abarca la expresión y el uso de otros T1R o fragmentos específicos, variantes, o quimeras construidas con base en tales secuencias T1R, y particularmente los T1R de otras especies.

Como se describe, un aspecto importante de la invención es la pluralidad de métodos y rastreos de los moduladores, por ejemplo, activadores, inhibidores, estimuladores, mejoradores, agonistas y antagonistas, de estas células específicas de sabor (GPCR). Tales moduladores de transducción de sabor son útiles para la modulación de las sendas de señalización de sabor. Estos métodos de rastreo se pueden utilizar para identificar agonistas y antagonistas de alta afinidad de la actividad de las células de sabor. Estos compuestos modulatorios pueden ser utilizados en la industria de alimentos para sabores habituales, por ejemplo, modular el dulce y/o los sabores umami de los alimentos.

Esta invención rectifica la falta previa de entendimiento con relación al sabor dulce y umami en la medida que este identifica los T1R específicos y las combinaciones de receptor T1R que median la sensación de sabor dulce y umami. Por lo tanto, en general, esta aplicación se relaciona con los descubrimientos de los inventores que se relacionan con la clase T1R de los receptores acoplados a proteína G específicos de sabor, y su función específica en la percepción de sabor y la

relación de estos descubrimientos con un mejor entendimiento de la base molecular del sabor.

La base molecular del sabor dulce y el sabor umami —el sabor de monosodio glutamato— es enigmática. Recientemente, una clase de tres miembros de receptores acoplados de proteína G específicos de sabor, denominados los T1R, se identificaron. Los patrones de expresión de T1R traslapante y la demostración de que el receptor GABA_β estructuralmente relacionado es heterodimérico sugieren que los T1R funcionan como receptores de sabor heterodiméricos. En los ejemplos infra, los presentes inventores describen la co-expresión funcional de los T1R1, T1R2, y T1R3 de humanos en células heterólogas; células que co-expresan T1R1 y T1R3 que son activadas mediante estímulos de sabor umami; células que co-expresan T1R2 y T1R3 que son activadas mediante estímulos de sabor dulce. La actividad T1R1/T1R3 y T1R2/T1R3 se correlaciona con los umbrales de detección psicofísica. Además, el 5'-ribonucleótido IMP se encuentra que mejora la respuesta de T1R1/T1R3 al glutamato, una característica de sinergismo del sabor umami. Estos hallazgos demuestran que los T1R específicos y las combinaciones particularmente diferentes de los T1R funcionan como receptores de sabor dulce y del umami.

La percepción humana del amargo, dulce, y umami se cree que es mediada por los receptores acoplados a proteína G (Lindemann, B., *Physiol. Res.* 76: 718-66 (1996)). Recientemente, la evaluación del genoma humano reveló la clase T2R de los receptores de sabor amargo (Adler et al., *Cell* 100: 613-702 (2000); Chandrashekar et al., *Cell* 100: 703-11 (2000); Matsunami et al., *Nature* 404: 601-604 (2000)) pero los receptores para el sabor dulce y umami no han sido identificados. Recientemente, otra clase de receptores de sabor candidatos, los

T1R, se identificó. Los T1R fueron primero identificados mediante secuenciación a gran escala de una librería cADN sustraída derivada del tejido de gusto de rata, que identifica el T1R1, y subsecuentemente mediante PCR degenerado basado en T1R1, que condujo a la identificación del T1R2 (Hoon et al., Cell 96 : 541-551 (1999)). Recientemente, los presentes inventores y otros identificaron un tercer y posiblemente miembro final de la familia T1R, el T1R3, en el banco de datos del genoma humano (Kitagawa et al., Biochem Biophys. Res Commun. 283 (1): 236-42 (2001); Max et al., Nat. Genet. 28 (1): 58-63 (2001); Sainz et al., J. Neurochem. 77 (3): 896-903 (2001); Montmayeur et al., Nat. Neurosci. 4, 492-8. (2001)). Sorprendentemente, el T1R3 de ratón mapea en un intervalo genómico que contiene Sac, un locus que influencia el sabor dulce en el ratón (Fuller et al., J. Hered. 65: 33-6 (1974); Li et al., Mamm. Genome 12: 13-16 (2001)). Por lo tanto, el T1R3 se predijo que funciona como un receptor de sabor dulce. Recientes estudios de mapeo genético de alta resolución han formalizado la conexión entre el T1R3 de ratón y el Sac (Fuller T. C., J. Hered. 65 (1): 33-36 (1974); Li et al., Mammal. Genome 12 (1): 13-16 (2001)).

Interesantemente, todos los receptores de familia C que han sido funcionalmente expresados tan lejos –receptores metabotrópicos glutamato, el receptor GABA_B el receptor que siente el calcio (Conigrave, A. D., Quinn, S. J. & Brown, E. M., Proc Natl Acad Sci USA 97, 4814-9. (2000)), y el receptor olfatorio del pez (Specia, D. J. et al., Neuron 23, 487-98. (1999))– han mostrado ser activados por aminoácidos. Esta característica común eleva la posibilidad del que los T1R reconozcan los aminoácidos, y que los T1R puedan estar involucrados en la detección del glutamato además de los aminoácidos de sabor dulce. Alternativamente, una variante transcripcional del receptor glutamato metabotrópico mGluR4 se ha propuesto para ser el receptor de sabor umami en razón a su expresión selectiva

en el tejido de sabor de rata, y la similaridad del umbral de activación del receptor al umbral de detección sicofísica del glutamato (Chaudhari et al., *Nat. Neurosci.* 3: 113-119 (2000)). Esta hipótesis es difícil de reconciliar con el nivel de expresión excesivamente bajo de la variante mGluR4 en tejido de sabor, y el sabor de glutamato mas o menos no alterado del ratón transgénico mGluR4 (Chaudhari and Roper, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 855: 398-406 (1998)). Además, la variante de sabor es estructuralmente inverosímil, faltándole no solo la mayoría de los residuos que forman el bolsillo de unión del glutamato del receptor tipo silvestre, sino también aproximadamente la mitad del dominio de unión glutamato N-terminal globular (Kunishima et al., *Nature* 407: 971-7 (2000)).

El análisis comparativo de los patrones de expresión T1R en roedores ha demostrado que el T1R2 y posiblemente el T1R1 son cada uno co-expresados con el T1R3 (Hoon et al., *Cell* 96: 541-51 (1999); Kitagawa et al., *Biochem Biophys. Res. Commun.* 283: 236-242 (2001); Max et al., *Nat. Genet.* 28: 58-63 (2001); Montmayeur et al., *Nat. Neurosci.* 4: 492-8 (2001); Sainz et al., *J. Neurochem.* 77: 896-903 (2001)). Adicionalmente, la dimerización es emergente como un tema común de los receptores de la familia C; el glutamato metabotrópico y el receptor sensible al calcio son homodímeros (Romomano et al., *J. Biol. Chem.* 271: 28612-6 (1996); Okamoto et al., *J. Biol. Chem.* 273: 13089-96 (1998); Han et al., *R Biol. Chem.* 274: 100008-13 (1999); Bai et al., *J. Biol. Chem.* 273: 23605-10 (1998)), y el receptor GABA_β estructuralmente relacionado es heterodimérico (Jones et al., *Nature* 396: 674-9 (1998); Kaupmann et al., *Nature* 396: 683-687 (1998); White et al., *Nature* 396: 679-682 (1998); Kuner et al., *Science* 283: 74-77 (1999)). Los presentes inventores han demostrado mediante co-expresión funcional de los T1R en células heterólogas que el T1R2 funciona en combinación con el T1R3 humano

como un receptor de sabor dulce y que el T1R1 humano funciona en combinación con el T1R3 humano como un receptor de sabor umami.

Los descubrimientos discutidos aquí son especialmente significativos, como previamente el desarrollo de endulzantes artificiales mejorados se ha impedido por la falta de ensayos del sabor dulce. De hecho, los cinco endulzantes artificiales comerciales comúnmente utilizados, todos los cuales activan el hT1R2/hT1R3 se descubrieron serendipiáticamente. De manera similar, otros ensayos diferentes a los sensoriales, como un proceso laborioso, no existe ensayo para identificar los compuestos que modulan el sabor umami. Estos problemas se alivian ahora en razón, como se establece mediante los resultados experimentales discutidos intra, el dulce en humanos y los receptores umami se han identificado, y ensayos para estos receptores se han desarrollado, particularmente, ensayos que utilizan células que expresan establemente un receptor de sabor T1R funcional, es decir, el receptor de sabor dulce o umami.

Basados en esto la invención suministra ensayos para detectar y caracterizar compuestos moduladores del sabor, en donde los miembros de la familia T1R actúan, como ellos lo hacen en los brotes de sabor, como moléculas reporteras para el efecto sobre el sabor dulce y umami de los compuestos moduladores de sabor. Particularmente, se suministran dentro del alcance de la invención ensayos para identificar compuestos para modular, semejar, mejorar y/o bloquear individualmente, los sabores dulce y umami. Los métodos para ensayar La actividad de los GPCR, y especialmente los compuestos que afectan la actividad GPCR son bien conocidos y son aplicables a los miembros de la familia T1R de la presente invención y las combinaciones funcionales de estos. Los ensayos han sido identificados supra.

La invención también suministra compuestos que unen T1R1, T1R2, T1R3, T1R2/T1R3 o T1R1/T1R3, o cualquier fragmento, porción o subunidad de estos, como se describe completamente.

En particular, los GPCR objeto se pueden utilizar en ensayos con, por ejemplo, cambios de medida en la unión de ligando, concentración de ión, potencial de membrana, flujo de corriente, flujo de iones, transcripción, interacciones de receptor-ligando, concentraciones de segundo mensajero, in vitro e in vivo. En otra modalidad, los miembros de la familia T1R pueden ser recombinantemente expresados en células y la modulación de la transducción del sabor por vía de la actividad GPCR se puede ensayar al medir los cambios en los niveles de Ca^{2+} y otros mensajes intracelulares tales como el cAMP, cGMP o IP_3 .

En ciertos ensayos, un dominio de un polipéptido T1R, por ejemplo, un dominio celular de transmembrana, o intracelular se fusiona con un polipéptido heterólogo, formando de esta manera un polipéptido quimérico, por ejemplo, una proteína quimérica con actividad GPCR. Se contempla particularmente, el uso de fragmentos de T1R1, T1R2, o T1R3 que contengan el dominio de unión de ligando N-terminal. Tales proteínas son útiles, en ensayos para identificar, ligandos, agonistas, antagonistas, u otros moduladores de receptores T1R. Por ejemplo, un polipéptido T1R se puede expresar en una célula eucariótica como un receptor quimérico con una secuencia heteróloga chaperona que facilita traficar la membrana de plasma, o la maduración y el apuntamiento a través de una sonda secretoria. La secuencia heteróloga opcional puede ser un péptido de interacción de dominio PDZ, tal como un fragmento PDZIP C-terminal (ID DE SEC NO: 1). El PDZIP es una señal exportadora ER, la cual, de acuerdo con la presente invención

ha mostrado que facilita la expresión de superficie de las proteínas heterólogas tales como los receptores T1R descritos aquí. Más particularmente, un aspecto de la invención, el PDZIP se puede utilizar para promover el apuntamiento adecuado de las proteínas de membrana problemáticas tales como los receptores olfatorios, los receptores de sabor T2R, y los receptores de sabor T1R descritos aquí.

Ejemplos de tales receptores quiméricos incluyen receptores de especies trans. Cualquier combinación de subunidades receptoras de varias especies se puede utilizar juntas para formar un receptor quimérico, que puede ser entonces utilizado para identificar degustantes, por ejemplo. Por lo tanto, se contempla aquí un receptor T1R2/T1R3 quimérico que comprende una subunidad T1R2 humana y una subunidad T1R3 de rata. También se contempla un receptor T1R2/T1R3 quimérico que comprende, una subunidad T1R2 de rata y una subunidad T1R3 de humano. También se contempla una subunidad receptora T1R2 quimérica que comprende, un dominio extracelular humano, un dominio de transmembrana de rata y un dominio intracelular de rata (ID DE SEC NOs: 16-17. por ejemplo). También se contempla la subunidad receptora T1R3 quimérica que comprende, un dominio extracelular de rata, un dominio de transmembrana de humano y un dominio intracelular humano (ID DE SEC NOs: 16-17. por ejemplo).

Tales receptores T1R quiméricos se pueden expresar en cualquier célula eucariótica, tal como la célula HEK-293. Preferiblemente, las células contienen una proteína G, preferiblemente una proteína G promiscua tal como la $G_{\alpha 15}$ o la $G_{\alpha 15}$ u otro tipo de proteína G promiscua capaz de ligar una rango amplio de GPCRs a una senda de señalización intracelular o a una proteína de señalización tal como la fosfolipasa C. La activación de tales receptores quiméricos en tales células se puede detectar utilizando cualquier método estándar tal como al

detectar los cambios en el calcio intracelular al detectar la fluorescencia dependiente de FURA-2 en la célula. Si las células anfitrionas preferidas no expresan una proteína G apropiada ellas pueden ser transfectadas con un gen que codifica a una proteína G promiscua tal como aquellas descritas en la Solicitud U.S. No. 60/243, 770, Solicitud U.S. No. 09/984,297, presentada en octubre 29, 2001, y la solicitud U.S. No. 09/989, 497 presentada en noviembre 21, 2001 que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Los métodos adicionales para ensayar los moduladores de la transducción de ensayo incluyen ensayos de unión de ligando in vitro que utiliza: polipéptidos T1R, porciones de estos, es decir, el dominio extracelular, la región de transmembrana, o combinaciones de esta, o proteínas quiméricas que comprenden uno o mas dominios de un miembro de familia T1R, células de cultivo de oocito o de tejido que expresan polipéptidos T1R, fragmentos, o proteínas de fusión; fosforilación y desfosforilación de los miembros de la familia T1R; proteína G que se une a los GPCR; ensayos de unión de ligando, voltaje, potencial de membrana y cambios de conductancia; ensayos de flujo de iones; cambios en los segundos mensajeros intracelulares tales como el cGMP, cAMP e inositol trifosfato (IP3), y cambios en los niveles de calcio intracelular.

Además, la invención suministra métodos para detectar ácido nucleico T1R y expresión de proteína, que permite la investigación de la regulación de transducción del sabor y la identificación específica de las células receptoras de sabor. Los miembros de la familia T1R también suministran sondas de ácido nucleico útiles para la paternidad y las investigaciones forenses. Los genes T1R también son útiles como sondas de ácidos nucleicos para identificar las células receptoras de sabor, tales como las células de foliado, fungiformes, circunvaladas,

geschmackstreifen, y receptoras de sabor de epiglotis. Los receptores T1R también se pueden utilizar para generar anticuerpos monoclonales y policlonales utilizados para identificar las células receptoras de sabor.

Funcionalmente, los polipéptidos T1R comprenden una familia de siete receptores acoplados a proteína G de transmembrana, los cuales se cree que se involucran en la transducción del sabor y pueden interactuar con una proteína G para mediar la transducción de señal de sabor (ver, por ejemplo, Fong, Cell Signal, 8: 217 (1996); Baldwin, Curer. Opin. Cell Biol., 6: 180 (1994)). Estructuralmente, las secuencias de nucleótidos de los miembros de la familia T1R codifican los relacionados que comprenden un dominio extracelular, siete dominios de transmembrana, y un dominio de citoplasmático. Los genes de la familia T1R relacionados de otras especies comparten al menos aproximadamente el 50%, y opcionalmente el 60%, 70%, 80%, o 90%, de la identidad de secuencia de nucleótido sobre una región de al menos aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, opcionalmente 100, 200, 500, o más nucleótidos de longitud con las secuencias de ácido nucleico T1R descritas aquí en los ejemplos, o variantes conservadoramente modificadas de estos, o que codifican polipéptidos que comparten al menos aproximadamente 35 a 50%, y opcionalmente 60%, 70%, 80%, o 90% de la identidad de la secuencia del aminoácido sobre una región de aminoácido de al menos aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, opcionalmente 50 a 100 aminoácidos de longitud a una secuencia de polipéptido T1R descrita infra en las variantes de los ejemplos conservadoramente modificadas de estos.

Varias secuencias de dominios de aminoácido de consenso han sido identificadas que caracterizan los miembros de la familia T1R. por ejemplo, los miembros de la

familia T1R comprenden típicamente una secuencia que tiene al menos 50%, opcionalmente 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95-99%, o más, identidad con las secuencias de consenso TR1 1 y 2 (ID DE SEC No: 2 y 3, respectivamente). Estos dominios conservadores pueden ser utilizados para identificar los miembros de la familia T1R al identificar, hibridización específica o amplificación, o unión específica de anticuerpos levantados contra un dominio. Las secuencias de consenso T1R incluyen por vía de ejemplo las siguientes secuencias: secuencia de consenso de familia T1R 1: (ID DE SEC No: 2) (TR)C(FL)(RQP)R(RT)(SPV)(VERKT)FL(AE)(WL)(RHG)ET1R. secuencia de consenso de familia T1R 2: (ID DE SEC No: 3) (LQ)P(EGT)(NRC)YN(RE)A(RK)(CGF)(VLI)T(FL)(AS)(ML).

Estas secuencias de consenso están incluidas en aquellas encontradas en los polipéptidos T1R descritos aquí, pero los miembros de la familia T1R de otros organismos se pueden esperar por comprender secuencias de consenso que tiene aproximadamente 75% de la identidad o más de las secuencias de consenso incluidas descritas específicamente aquí.

Regiones específicas de nucleótido T1R y las secuencias de aminoácido se pueden utilizar para identificar las variantes polimórficas, homólogos interespecies y alelos de los miembros de la familia T1R. Esta identificación se puede hacer in vitro, por ejemplo, bajo condiciones de hibridización estrictas o PCR (por ejemplo, utilizando cebadores que codifican las secuencias de consenso T1R identificadas anteriormente), o al utilizar la información de secuencia en un sistema de computadora por comparación con otras secuencias de nucleótido. Diferentes alelos de los genes T1R dentro de poblaciones de especies simples también serán útiles para determinar si las secuencias alélicas controlan las diferencias en la

percepción del sabor entre miembros de la población. La amplificación tipo PCR clásica y las técnicas de clonación son útiles para aislar el nuevo T1R, por ejemplo, donde los cebadores degenerados son suficientes para detectar especies a través de genes relacionados.

Típicamente, la identificación de las variantes polimórficas y los alelos de los miembros de la familia T1R se puede hacer al comparar una secuencia de aminoácido de aproximadamente 25 aminoácidos o más, 50-100 aminoácidos. La identidad del aminoácido de aproximadamente al menos 35 a 50%, y opcionalmente, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95-99%, o por encima demuestran típicamente que una proteína es una variante polimórfica, homólogos interespecies, o alelo de un miembro de familia T1R. La comparación de las secuencias se puede desarrollar utilizando cualquiera de los algoritmos de comparación de secuencia discutidos adelante. Los anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos T1R o una región conservada de estos pueden ser utilizados para identificar, alelo, homólogos interespecie, y variantes polimórficas.

Las variante polimórficas los, homólogos interespecies, y los alelos de los genes T1R se pueden confirmar, examinar la expresión específica de célula de sabor del gen T1R putativo o la proteína. Típicamente, los polipéptidos T1R que tienen la secuencia de aminoácido descrita aquí se pueden utilizar como un control positivo en comparación del polipéptido putativo para demostrar la identificación de la variante polimórfica o el alelo del miembro de la familia T1R. Las variantes polimórficas, los alelos, los homólogos de interespecies se espera que retengan la estructura de las siete transmembranas de un receptor acoplado a proteína G. Para detalle adicional ver WO 00/06592, que describe los miembros de la familia

T1R relacionados, GPCR-B3s, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia de una manera consistente con la descripción. Los receptores GPCR-B3 son denominados aquí como rT1R1 y mT1R1. Adicionalmente, ver WO 00/06593, que también describe los miembros de la familia T1R relacionados, GPCR-B4s cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia de manera consistente con esta descripción. Los receptores GPCR-B4 son denominados aquí como rT1R2 y mT1R2. Como se discutió previamente la invención también describe ensayos basados en estructura que utilizan la estructura cristalina para rayos X de un T1R o una combinación de T1R, por ejemplo, hT1R2/hT1R3 o hT1R1/hT1R3, para identificar las moléculas que modulan la actividad del receptor T1R, y modular de esa manera el sabor dulce y/o umami.

La presente invención también suministra ensayos, preferiblemente ensayos de caudal alto para identificar moléculas que mejoran, semejan, bloquean y/o modulan los receptores T1R. En algunos ensayos, un dominio particular de un miembro de la familia T1R se utiliza en combinación con un dominio particular de otro miembro de la familia T1R, por ejemplo, un dominio o región extracelular, de transmembrana, o intracelular. En otras modalidades, un dominio extracelular, una región de transmembrana o una combinación de estos se puede unir a un sustrato sólido, y utilizar, por ejemplo, para aislar ligandos, agonistas, antagonistas, y cualquiera otra molécula que se puedan unir y/o modular la actividad de un polipéptido T1R.

Varias mutaciones y sustituciones conservadoras se prevén que estén dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, esta en el alcance de la persona mediadamente versada en la materia desarrollar sustituciones de aminoácidos que utilizan protocolos conocidos de tecnología genética recombinante que incluyen

PCR, clonación de gen, mutagénesis dirigida de sitio de cADN, transfección de células huésped, y transcripción in vitro. Las variantes podrían ser rastreadas para actividad.

Definiciones

Como se utilizan aquí, los siguientes términos tienen los significados adscritos a ellos a menos que se especifique otra cosa.

"Células de sabor" incluyen células neuroepiteliales que están organizadas en grupos para formar yemas de sabor de la lengua por ejemplo, células foliadas, fungiformes y circunvaladas (ver, por ejemplo, Roper et al., Ann. Rev. Neurosci. 12: 329-353 (1989)). las células de sabor también se encuentran en el paladar y otros tejidos, tal como el esófago y el estómago.

"T1R" se refiere a una o más membranas de la familia de los receptores acoplados a proteína G que son expresados en células de sabor tal como las células foliadas, fungiformes y circunvalares, así como también células del paladar y el esófago (ver por ejemplo, Hoon et al., Cell, 96: 541-551 (1999), incorporadas aquí como referencia en su totalidad). Los miembros de esta familia también se denominan como GPCR-B3 y TR1 en la WO 00/06592 así como también GPCR-B4 y TR2 en la WO 00/06593. GPCR-B3 también se denomina aquí como rT1R1, y GPCR-B4 se denomina como rT1R2. Las células receptoras de sabor también se pueden identificar sobre la base de morfología (ver por ejemplo, Roper, supra), o por la expresión de proteínas expresadas específicamente en células de sabor. Los miembros de la familia T1R pueden tener la capacidad de actuar como receptores

para transducción de sabor dulce o para distinguir entre varias otras modalidades de sabor. Las secuencias T1R representativas, incluyen hT1R1, hT1R2 y hT1R3 se identifican infra en los ejemplos.

Los ácidos nucleicos "T1R" codifican una familia de GPCR con siete regiones de transmembrana que tienen "receptor de actividad acoplada a proteína G", por ejemplo, ellas se pueden unir a las proteínas G en respuesta a estímulos extracelulares y promover la producción de segundos mensajeros tales como IP3, cAMP, cGMP, y Ca^{2+} vías de estimulación de enzimas tal como fosfolipasa C y adenilato ciclasa (para una descripción de estructura y función de los GPCRs, ver, por ejemplo, Fong, supra, y Baldwin, supra). una célula de sabor simple puede contener muchos diferentes polipéptidos T1R.

El término familia "T1R" se refiere por lo tanto a variantes polimórficas, alelos, mutantes, y homólogos interespecies que: 1) tengan al menos aproximadamente 35 a 50% de identidad de secuencia de aminoácido, opcionalmente aproximadamente 60, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% de identidad de secuencia de aminoácido con un polipéptido T1R, preferiblemente aquellos identificados en el ejemplo 1, sobre una ventana de aproximadamente 25 aminoácidos, opcionalmente 50 a 100 aminoácidos; 2) se unen específicamente a anticuerpos generados contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácido preferiblemente seleccionada del grupo que consiste de la secuencia de polipéptido T1R descrita en el ejemplo 1 y las variantes conservadoramente modificadas de esta; 3) se codifican mediante una molécula de ácido nucleico que se hibridiza específicamente (con un tamaño de aproximadamente 100, opcionalmente al menos aproximadamente 500-1,000 nucleótidos) bajo condiciones de hibridización estrictas a una secuencia seleccionada del grupo que

consiste de las secuencias de aminoácido T1R contenidas en el ejemplo 1, y variantes conservadoramente modificadas de esta; o 4) comprende una secuencia al menos 35 a 50% idéntica con la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de la secuencia de aminoácido T1R identificada en el ejemplo 1.

Topológicamente, los T1R, descritos aquí tienen un "dominio N-terminal" también denominado "dominio extracelular" que comprende un "dominio "Venus flytrap") y un "dominio rico en cisteína"; "dominios de transmembrana" que comprenden siete regiones de transmembrana, y bucles citoplasmáticos y extracelulares correspondientes; y un "dominio C-terminal" (ver por ejemplo, Hoon et al., Cell, 96: 541-551 (1999); Buck & Axel, Cell, 65: 175-187 (1991)). Estos dominios se han identificado estructuralmente utilizando métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, tal como los programas de análisis de secuencia que identifican dominios hidrófobos e hidrofílicos (Stryer, Biochemistry, (3rd ed. 1988). Tales dominios son útiles para elaborar proteínas quiméricas y para ensayos in vitro de la invención, por ejemplo, ensayos de unión de ligando. La unión específica de un compuesto a estos dominios estructuralmente definidos suministran definición estructural para el compuesto.

"Dominios extracelulares" se refieren por lo tanto a los dominios de los polipéptidos T1R que sobresalen de la membrana celular y se exponen a la cara extracelular de la célula. Tales dominios incluyen generalmente el "dominios N-terminal" que está expuesto a la cara extracelular de la célula, y opcionalmente pueden incluir porciones de los bucles extracelulares de los dominios de transmembrana que son expuestos a la cara extracelular de la célula, es decir, los

bucles entre regiones de transmembrana 2 y 3, entre las regiones de transmembrana 4 y 5, y entre las regiones de transmembrana 6 y 7.

La región "de dominio N-terminal" inicia en el N-terminal y se extiende a una región cercana al inicio del primer dominio de transmembrana. Más particularmente, en una modalidad de la invención, ese dominio inicia en el N-terminal y termina aproximadamente en el ácido glutámico conservado en la posición de aminoácido 563 más o menos aproximadamente 20 aminoácidos. Estos dominios extracelulares son útiles para ensayos de unión de ligando in vitro tanto soluble como de fase sólida. Además las regiones de transmembrana, descritas adelante también pueden unir ligandos en combinación con el dominio extracelular y son por lo tanto también útiles para ensayos de unión in vitro.

"El dominio rico en cisteína" se refiere al dominio de los polipéptidos. Estas secuencias conservadas contienen varios residuos Cys altamente conservados que forman puentes disulfuro, y descansan al exterior de la membrana celular. Esta región corresponde al dominio de los miembros de la familia T1R y se encuentra en todas las tres subunidades T1R1-T1R3. La secuencia rica en cisteína se encuentra en los aminoácidos 510-566 del T1R1, 508-565 del T1R2, y 512-568 del T1R3.

"Dominio de transmembrana" que comprende las siete "regiones de transmembrana", se refiere al dominio de los polipéptidos T1R que descansa dentro de la membrana de plasma y también puede incluir los correspondientes bucles citoplasmáticos (intracelular y extracelular). En una modalidad, corresponde al dominio de los miembros de la familia T1R que inicia aproximadamente en el residuo de ácido glutámico conservado en la posición de aminoácido 563 mas o

menos 20 aminoácidos y finalizan aproximadamente en el residuo aminoácido de tirosina conservado en la posición 812 mas o menos aproximadamente 10 aminoácidos. Las siete regiones de transmembrana y los bucles extracelular y citoplasmático se pueden identificar utilizando métodos estándar, como se describe en Kyte & Doolittle, J. Mol. Biol., 157: 105-32 (1982)), o in Stryer, supra.

“Dominios citoplasmáticos” se refieren a los dominios de los polipéptidos T1R que enfrentan el interior de la célula, por ejemplo, el “dominio C-terminal” y los bucles intracelulares del dominio de transmembrana, por ejemplo, el bucle intracelular entre las regiones de transmembrana 1 y 2, el bucle intracelular entre las regiones 3 y 4 y el bucle intracelular entre las regiones de transmembrana 5 y 6.

“Dominio C-terminal” se refiere a la región que abarca el extremo del último dominio de transmembrana y el C-terminal de la proteína, y que está normalmente localizado dentro del citoplasma. En una modalidad esta región inicia en el residuo de aminoácido de tirosina conservado en la posición 812 más o menos aproximadamente 10 aminoácidos y continúa en el C-terminal del polipéptido.

El término “región de unión de ligandos” o “dominio de unión de ligando” se refiere a las secuencias derivadas de un receptor de sabor, particularmente un receptor que se incorpora substancialmente al menos al dominio extracelular del receptor. En una modalidad, el dominio extracelular de la región de unión de ligando puede incluir el dominio N-terminal y opcionalmente, porciones del dominio de transmembrana, tal como, los bucles extracelulares del dominio de transmembrana. La región de unión de ligando puede ser capaz de unir un ligando, y mas particularmente, un compuesto que mejora, semeja, bloquea y/o modula el sabor, por ejemplo, sabor dulce o umami.

La frase “heteromultímero” o “complejo heteromultimérico” en el contexto de los receptores o polipéptidos T1R de la invención se refiere a una asociación funcional de al menos un receptor T1R y otro receptor, típicamente, otro polipéptido receptor T1R (o, alternativamente otro polipéptido receptor T1R). Para claridad, la co-dependencia funcional de los T1R como se describe en esta solicitud que refleja su posible función como complejos receptores de sabor heterodimérico. Sin embargo, como se discutió previamente la co-dependencia funcional puede reflejar alternativamente una interacción indirecta. Por ejemplo, el T1R3 puede ser funcional solamente para facilitar la expresión de superficie del T1R1 y el T1R2, que puede actuar independientemente como receptores del sabor. Alternativamente, un receptor de sabor funcional puede estar comprendido de solamente T1R3, que es diferencialmente procesado bajo el control de T1R1 o T1R2, análogo al proceso dependiente de RAMP del receptor relacionado con calcio.

La frase “efectos funcionales” en el contexto de los ensayos para probar los compuestos que modulan la transducción del sabor mediada por la membrana de la familia de T1R incluye la determinación de cualquier parámetro que esté indirectamente o directamente bajo la influencia del receptor, por ejemplo, efectos funcionales, físicos y químicos. Este incluye la unión de ligando, el cambio en el flujo del ión, potencial de membrana, el flujo de corriente, la transcripción, la unión de proteína de G, la fosforilación o desfosforilación GPCR, la conformación de ensayos basados en cambios, la transducción de señal, las interacciones del receptor-ligando, las concentraciones de segundo mensajero (por ejemplo, cAMP, GMP, IP3, o Ca^{2+} intracelular), in vitro, in vivo, y ex vivo y también incluye otros

efectos fisiológicos tal como incremento o disminución de la liberación neurotransmisora o de hormona.

Por "determinar el efecto funcional" en el contexto de los ensayos y significa ensayos para un compuesto que incrementa o disminuye en un parámetro que está indirecta o directamente bajo la influencia de un miembro de la familia T1R, por ejemplo, efectos funcionales físicos y químicos. Tales efectos funcionales se pueden medir mediante cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, cambios en características espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice de refracción), hidrodinámica (por ejemplo, formas) cromatográficas, o propiedades de solubilidad, sujeción de parche, tintes sensibles a voltaje, corrientes de célula completa, el flujo de radioisótopos, marcadores inducibles, expresión de gen T1R de oocito; expresión T1R de célula ce cultivo de tejido; activación transcripcional de los genes T1R; ensayos de unión de ligando; voltaje, potencial de membrana y cambios de conductancia, ensayos de flujo ión; cambios en los segundos mensajeros intracelulares tales como cADP, cGMP, e inositol trifosfato (IP3); cambios en los niveles de calcio intracelular; liberación de neurotransmisor, ensayos conformacionales y similares.

Un "sabor o degustante" se refiere aquí a un compuesto o a una sal biológicamente aceptable de esta que induce, en un sujeto la percepción de olor y/o sabor, que incluye dulce, agrio, salado, amargo, y umami, y otros. El sujeto puede ser humano, animales y/o un ensayo biológico, tal como aquellos descritos y citados en esta solicitud.

Un "modificador de sabor" se refiere aquí a un compuesto o a una sal biológicamente aceptable de esta que modula, incluyendo mejorar o potenciar,

inhibir e inducir, el olor y/o sabor, de degustantes naturales o sintéticos en un sujeto.

Un “mejorador de sabor” se refiere aquí a un compuesto o a una sal biológicamente aceptable de esta que mejora los sabores o el olor de degustantes naturales o sintéticos, por ejemplo, glutamato de monosodio (MSG) para sabor de umami y fructuosa para sabor dulce.

Un “degustante umami” o “compuesto umami” se refiere aquí a un compuesto o a una sal biológicamente activa de este que elicitaba un sabor umami detectable en un sujeto., por ejemplo, MSG.

“Degustante dulce” o “compuesto dulce” se refiere aquí a un compuesto o a una sal biológicamente aceptable de esta que elicitaba un sabor dulce detectable en un sujeto., por ejemplo, fructuosa.

Un “modificador de sabor dulce” se refiere aquí a un compuesto o a una sal biológicamente aceptable de esta que modula, incluyendo mejorar y potenciar, inhibir, e inducir el sabor dulce de un degustante natural o sintético dulce, por ejemplo, glutamato de monosodio (MSG) en un sujeto.

Un “modificador de sabor dulce” se refiere aquí a un compuesto o a una sal biológicamente aceptable de esta que modula, incluyendo mejorar y potenciar, inhibir, e inducir el sabor dulce de un degustantes dulces naturales o sintéticos dulce, por ejemplo, fructuosa en un sujeto.

Una "cantidad mejorada de sabor" se refiere aquí a una cantidad de un compuesto que es suficiente para mejorar el sabor de unos degustantes naturales o sintéticos, por ejemplo, glutamato de monosodio (MSG) para sabor umami o fructuosa para sabor dulce.

"Categoría de sopa húmeda" significa sopas húmedas/líquidas sin importar la concentración o el recipiente, incluyendo sopas congeladas. Para el propósito de esta definición sopa (s) significa un alimento preparado de carne, pollo, pescado, vegetales, granos, frutas y otros ingredientes, cocinados en un líquido que puede incluir varias piezas de algunos o todos estos ingredientes. Puede ser claro (como un caldo) o espeso (como un estofado), suave, en puré o pedazos, listo para servir, semi-condensada o condensada y se puede servir caliente o fría, como plato principal de una comida o como un pasabocas entre comidas (sorbida como una bebida). La sopa se puede utilizar como un ingrediente para preparar otros componentes de comida y puede variar desde un caldo (consomé) a salsas (crema o sopas basadas en quesos).

"Categoría de alimento deshidratado y culinario" significa: (i) Cocinar productos de ayuda tales como: polvos, gránulos, pastas, productos líquidos concentrados, incluyendo caldo concentrado, caldo y productos similares a caldos en la presencia de cubos, tabletas o polvos forma granulada, que son vendidos separadamente como producto terminado o como un ingrediente dentro de un producto, salsas y mezclas recetas (sin importar la tecnología); (ii) Productos de soluciones de comida tales como: sopas secas, deshidratadas y congeladas, que incluyen mezclas de sopas deshidratadas, sopas instantáneas deshidratadas, sopas listas para cocinar deshidratada, preparaciones deshidratadas o ambiente y paltos listos, comidas y entradas de servicio simple que incluyen pastas, papas y

platos arroz; y (iii) productos embellecedores de comida tales como: los condimentos, marinadas, salsas para ensalada, aderezos para ensalada, "dips", paneados, mezclas "batter", esparcidos estable en estante, salsas barbiquiú, mezclas de recetas líquidas, concentrados, salsas o mezclas de salsa, incluyendo mezclas de recetas para ensaladas, vendidas como producto terminado o como un ingrediente dentro de un producto, sea deshidratado, como líquido o congelado.

"categoría de bebida" significa bebidas, mezclas de bebidas y concentrados que, que incluyen pero no están limitados a, alcohólicas y no alcohólicas listas para beber y bebidas en polvo. Otros ejemplos de comidas y bebidas en donde los compuestos de acuerdo con la invención se pueden incorporar incluyen por vía de ejemplo bebidas carbonatadas y no carbonatadas, por ejemplo, gaseosas, jugos, bebidas alcohólicas y no alcohólicas, productos de confitería, por ejemplo, tortas, galletas, "pies", dulces, gomas de mascar, gelatinas, helados, sorbetes, pudines, jamones, jaleas, salsas para ensalada, y otros condimentos, cereales y otros alimentos para el desayuno, frutas enlatadas y salsas de fruta, y similares.

Adicionalmente, los compuestos objeto se pueden utilizar en preparaciones de sabor para ser agregadas a alimentos y bebidas. En casos preferidos la composición comprenderá otro sabor o modificador de sabor tal como degustantes dulces.

En algunos casos las sales biológicamente aceptables de los compuestos objeto se pueden utilizar. Ejemplos de tales sales incluyen sales de metales alcalinos y alcalinotérreos, sales orgánicas, y similares. Ejemplos específicos incluyen sales de potasio, sodio, calcio y magnesio, sales de ácido clorhídrico o sulfúrico, sales

de etanolamina, y similares. La sal se seleccionará de tal forma que está sea biológicamente segura para ingestión y afecte adversamente las propiedades modulatorias del sabor dulce del compuesto.

Como se utiliza aquí, el término "producto medicinal" incluye tanto sólidos como líquidos que son materiales no tóxicos ingeribles que tienen valor medicinal tal como jarabes para la tos, gotas para tos, aspirina y tabletas medicinales masticables. Un producto de higiene oral incluye sólidos y líquidos tales como pasta dental o enjuague bucal.

Un "portador o excipiente comestible o medicinalmente aceptable" es un medio que se utiliza para preparar una forma de dosis deseada del compuesto de la invención. Un portador comestible o medicinalmente aceptable incluye solventes, diluyentes, u otro vehículos; dispersiones o ayudas de suspensión; agentes de superficie activa; agentes isotónicos; espesantes o agentes emulsificantes, preservativos; ligadores sólidos; lubricantes y similares.

"Inhibidores", "activadores", "mejoradores", y "moduladores" de genes T1R y proteínas son utilizadas para referirse a moléculas inhibitorias, activantes, mejoradoras, o modulantes utilizando ensayos in vitro e in vivo para transducción de sabor, por ejemplo, ligando, agonistas, antagonistas, y sus homólogos y miméticos.

Los inhibidores son compuestos que, por ejemplo, se unen a, parcial o totalmente bloquean la estimulación, disminuyen, evitan, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan o sobregulan la transducción de sabor, por ejemplo, antagonistas. Los activadores y mejoradores son compuestos que por ejemplo, se unen a,

mejoran, estimulan, incrementan, abren, activan, facilitan, mejoran la activación, sensibilizan, o sobrerregulan la transducción de sabor, por ejemplo, agonistas. Los moduladores incluyen compuestos que, por ejemplo, alteran la interacción de un receptor con proteínas extracelulares que se unen a activadores o inhibidores (por ejemplo, ebnerina y otros miembros de la familia portadora hidrófoba); proteína G, cilasas (por ejemplo, homólogos de rodopsina cinasa y cinasas receptoras beta adrenérgicas que están involucradas en la activación y desensibilización del receptor); y arrestinas, que también desactivan y desensibilizan receptores. Los moduladores pueden incluir versiones genéticamente modificadas de miembros de la familia T1R, por ejemplo, con actividad alterada, así como también ligandos de ocurrencia natural y sintética, antagonistas, agonistas, moléculas químicas pequeñas y similares. Tales ensayos para inhibidores y activadores incluyen, por ejemplo, expresar miembros de la familia T1R en células o membranas de células, aplicar compuestos moduladores putativos, en la presencia o ausencia de degustantes, por ejemplo, degustantes de dulce, y luego determinar los efectos funcionales sobre la transducción del sabor, como se describe anteriormente. Las muestras o ensayos comprenden miembros de la familia T1R que son tratados con un mejorador potencial, activador, inhibidor, o modulador son comparados para controlar muestras sin el inhibidor, activador, o modulador para examinar la extensión de la modulación. Las muestras de control positivas, (por ejemplo, un degustante dulce sin moduladores agregados) se les asignan un valor de actividad T1R del 100%.

"EC₅₀" se define como la cantidad de compuesto que elicit el 50% de la respuesta máxima que el compuesto puede elicit, sea como un activador, mejorador, o modulador. Una curva de respuesta dependiente de dosis

determinada por un compuesto, y la concentración del compuesto que corresponde al 50% de la respuesta máxima se deriva de la curva, en un ejemplo.

"IC₅₀" se define como la cantidad de compuesto que elicit a en 50% del efecto máximo del compuesto puede elicit a como un inhibidor.

Sin importar los degustantes y mejoradores de dulce, después de que se identifica un compuesto, las calificaciones de sus actividades son dadas como en porcentaje de la intensidad de fructuosa máxima (%). En una respuesta de dosis de compuesto, un EC₅₀ se puede calcular para reflejar la potencia del compuesto como un agonista de dulce. En la presente invención, un EC₅₀ de menos de aproximadamente 100 mM es indicativo de compuestos que inducen a actividad T1R2/T1R3 como agonista endulzante. Preferiblemente, un golpe positivo para un agonista dulce tiene un valor EC₅₀ de menos de 1 mM: más preferiblemente menos de aproximadamente 10 μM.

En experimentos de ensayo de mejoramiento de dulce, se procede con una respuesta de dosis de fructosa y una segunda respuesta de dosis de fructosa se desarrollo con una cierta cantidad de compuesto candidato en cada una de las concentraciones de fructosa al mismo tiempo. Luego, la proporción de EC₅₀ se puede calcular con base en las siguientes definiciones:

$$\text{Proporción EC}_{50} = \text{EC}_{50}(\text{fructosa}) / \text{EC}_{50}(\text{fructosa} + [\text{compuesto}])$$

En donde "[compuesto]" se refiere a la concentración del compuesto utilizada para elicit a (o mejorar o potenciar) la respuesta de dosis de fructosa. Estas concentraciones podían variar desde un pM. a un mM, más preferido, desde

un nM a un μ M bajo. Un mejorador de dulce potente tendría una proporción de EC_{50} alta a concentración baja del compuesto utilizado.

En la presente invención, una proporción de EC_{50} de mayor de 1 es indicativa de un compuesto que modula (potencia) la actividad T1R2/T1R3 y es un mejorador de dulce. Preferiblemente, un golpe positivo tendrá valores de proporción EC_{50} de al menos 1,20, preferiblemente variando desde al menos 1,50 a 100 o aún mayor.

Como contraste, los agonistas competitivos (aquellos degustantes de dulce que unen mutuamente de manera exclusiva) o inhibidores que siempre producen valores de proporción EC_{50} menores de 1, tal como 0 a 1.

Con relación a los degustantes y mejoradores umami, las calificaciones de sus actividades se pueden dar como porcentaje de la intensidad MSG máxima (%). En una respuesta de dosis de compuesto, un EC_{50} se puede calcular para reflejar la potencia del compuesto como un agonista umami. En la presente invención, un EC_{50} de menos de aproximadamente 10 mM es indicativo de compuestos que inducen a actividad T1R2/T1R3 y un agonista umami. Preferiblemente, un golpe positivo para un agonista umami tendrá valor EC_{50} de menos de aproximadamente 1 mM: más preferiblemente que varían desde aproximadamente un pM a aproximadamente un μ M bajo.

En experimentos de ensayos mejorados una respuesta de dosis MSG se desarrolla y una segunda respuesta de dosis MSG con una cierta cantidad de compuestos candidatos en cada una de las concentraciones MSG al mismo tiempo. Luego, la proporción EC_{50} se calcula con base en las siguientes definiciones:

$$\text{Proporción EC}_{50} = \text{EC}_{50}(\text{MSG}) / \text{EC}_{50}(\text{MSG} + [\text{compuesto}])$$

En donde "[compuesto]" se refiere a la concentración del compuesto utilizada para elicitarse (o mejorar o potenciar) la respuesta de dosis MSG. Aquellas concentraciones pueden variar desde un pM. a un mM, más preferido, desde un nM a μ M bajo. Un mejorador potente umami tiene una proporción EC_{50} alta a concentración baja del compuesto utilizado.

En la presente invención, una proporción EC_{50} de más de 1 es indicativa de un compuesto que modula (potencia) la actividad T1R2/T1R3 y es un mejorador umami. Preferiblemente, un golpe positivo tiene valores en proporción EC_{50} de al menos 1,20, preferiblemente que varían desde al menos 1,50 a 100 o aún mayor.

Las mezclas de control negativo (por ejemplo, amortiguador sin un estímulo de sabor agregado) se les asignan un valor de actividad T1R relativo de 0%. La inhibición de un T1R se logra cuando la mezcla de control positiva y un resultado modulador en el valor de actividad T1R con relación al control positivo es de aproximadamente 80%, opcionalmente 50% o 25-0%. La activación de un T1R por un modulador solo se logra cuando el valor de la actividad T1R con relación a la muestra de control positiva 10%, 25%, 50%, 75%, opcionalmente 100%, opcionalmente 150%, opcionalmente 200-500%, o 1,000-3,000% mayor.

Los términos "purificado", "substancialmente purificado", y "aislados" como se utilizan aquí se refieren al estado de ser libre de otros, compuestos no similares con los cuales el compuesto de la invención está normalmente asociado en su estado natural, de tal forma que el sujeto "purificado" "substancialmente

purificado", y "aislados" comprende al menos 0,5%, 1%, 5%, 10%, o 20%, y más preferiblemente al menos 50% o 75% de la masa, en peso, de una muestra dada. En una modalidad preferida, estos términos se refieren al compuesto de la invención que comprende al menos 95% de la masa, en peso, de una muestra dada. Como se utiliza aquí los términos "purificado", "substancialmente purificado", y "aislados" cuando se refieren a un ácido nucleico o proteína, también se refieren a un estado de purificación o concentración diferente a aquella que ocurre naturalmente en el mamífero, especialmente el cuerpo humano. Cualquier grado de purificación o concentración mayor que aquella que ocurre naturalmente en los mamíferos, especialmente humano, cuerpo, incluyendo (1) purificación de las otras estructuras o compuestos asociados o (2) el asocio con las estructuras o compuestos a los cuales no está normalmente asociado en el cuerpo del mamífero especialmente humano, están dentro del significado "aislado". El ácido nucleico o proteína o clases de ácidos nucleicos o proteínas, descritos aquí, pueden ser aislados, o también asociados con estructuras o compuestos a los cuales ellos no están normalmente asociados en la naturaleza, de acuerdo con una variedad de métodos y procesos conocidos por los versados en la técnica.

El término "ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" se refiere a un ribonucleótido desoxi- o a un oligonucleótido ribonucleótido en cualquier forma sola o de cadena doble. El término que involucra ácidos nucleicos es decir, oligonucleótidos, que contiene análogos conocidos de nucleótidos naturales. El término también involucra estructuras similares a ácido nucleico con estructuras principales sintéticas (ver por ejemplo, Oligonucleotides y Analogues, a Practical Approach, ed. F. Eckstein, Oxford Univ. Press (1991); Estrategias Antisentido, Annals of the N. Y. Academy of Sciences, Vol. 600, Eds. Baserga et al. (NYAS 1992); Milligan J. Med. Chem. 36: 1923-1937 (1993); Antisense Research y

Applications (1993, CRC Press), WO 97/03211; WO 96/39154; Mata, Toxicol. Appl. Pharmacol. 144: 189-197 (1997); Strauss-Soukup, Biochemistry 36: 8692-8698 (1997); Samstag, Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 6: 153-156 (1996)).

A menos que se indique de otra manera, una secuencia de ácido nucleico particular también involucra implícitamente variantes modificadas conservadoramente de las mismas (por ejemplo, sustituciones degeneradas de codones) y secuencias complementarias, lo mismo que la secuencia implícitamente indicada. Específicamente, las sustituciones degeneradas de codones pueden ser logradas por medio de generar, por ejemplo, secuencias, en las cuales la tercera posición de uno o más codones seleccionados es sustituido con residuos mezclados con base y/o desoxinosina (Batzer et al., Nucleic Acid Res., 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem., 260: 2605-2608 (1985); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes, 8: 91-98 (1994)). El término ácido nucleico es usado de manera intercambiable con gen, cADN, mARN, oligonucleótido y polinucleótido.

Los términos "polipéptidos", "péptido" y "proteína" son usados de manera intercambiable aquí para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos aplican a polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más residuos de aminoácido es una copia química artificial de un aminoácido de ocurrencia natural correspondiente, lo mismo que los polímeros de aminoácidos de ocurrencia natural y polímeros de aminoácidos de ocurrencia no natural.

El término "dominio de translocación de plasma de membrana" o simplemente "dominio de translocación" significa un dominio de polipéptido que es incorporado en una secuencia de codificación de polipéptido, puede con mayor eficacia "vigilar"

o “translocar” la proteína híbrida (“fusión”) a la membrana de plasma de la célula sin el dominio. Por ejemplo, un “dominio de translocación” puede ser derivado del terminal amino del polipéptido receptor de rodopsina bobina, un receptor 7-transmembrana. Sin embargo, la rodopsina de cualquier animal puede ser usada, como otras secuencias facilitadoras de la translocación. Así, el dominio de translocación es eficiente particularmente en la translocación de proteínas de fusión 7-transmembrana a la membrana del plasma, y una proteína (por ejemplo, un polipéptido receptor del gusto) que comprende un dominio de translocación de terminal amino que puede ser transportado a la membrana de plasma más eficientemente que sin el dominio. Sin embargo, si el dominio del N-terminal del polipéptido está activo en el ligado, como con los receptores T1R de la presente invención, el uso de otros dominios de translocación puede ser preferido. Por ejemplo, un péptido que interactúa con el dominio PDZ como se describe aquí, puede ser usado.

El “dominio de translocación”, “dominio de unión de ligando”, y composiciones de receptores quiméricos descritos aquí, también incluyen “análogos” o “variantes conservadoras” y “miméticos” (“péptido miméticos”) con estructuras y actividad que corresponden substancialmente a las secuencias ilustradas. Así, los términos “variante conservadora o conservadora” o “análogos” o “miméticos” se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido modificada, de modo que los cambios no alteran substancialmente la estructura del polipéptido (la variante conservadora) y/o su actividad, como se define aquí. Estos incluyen variaciones modificadas de manera conservadora de una secuencia de aminoácido, es decir sustituciones de aminoácido, adiciones o eliminaciones de aquellos residuos que no son críticos para la actividad de la proteína, o sustitución de aminoácidos con residuos que tiene propiedades similares (por ejemplo, acídicos, básicos,

cargados positivo o negativamente, polares o no polares, etc.) de modo que las sustituciones de aminoácidos críticos no alteran substancialmente la estructura y/o actividad.

Más particularmente, "las variantes modificadas conservadoramente" aplican tanto a aminoácido y a secuencia de ácido nucleico. Con respecto a la secuencia de ácido nucleico particulares, las variantes modificadas conservadoramente se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácido a unas secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente codifican cualquier proteína dada.

Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU todos codifican el aminoácido alanina. Así, en cada posición en donde una alanina es especificada por un codón, el codón puede ser alterado a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado.

Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas conservadoramente. Cada secuencia de ácido nucleico aquí, que codifica un polipéptido, también describe cada variación silenciosa posible del ácido nucleico. Una persona versada reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es usualmente el único codón para la metionina, y el TGG, que es ordinariamente el único codón para el triptofano) puede ser modificado para proporcionar una molécula funcionalmente idéntica. De acuerdo a lo anterior, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido, está implícito en cada secuencia descrita.

Las tablas de sustitución conservadora suministran aminoácidos funcionalmente similares que son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, una guía ilustrativa para seleccionar sustituciones conservadoras incluye (el residuo original seguido por la sustitución ilustrativa): ala/gli o ser; arg/lis; asn/gln o his; asp/glu; cis/ser; gln/asn ; gli/asp; gli/ala o pro; his/asn o gln ; ile/leu o val; leu/ile o val; lis/arg o gln o glu; met/leu o tir o ile; phe/met o leu o tir; ser/thr; thr/ser; trp/tir; tir/trp o phe; val/ile o leu. Una vía ilustrativa alternativa usa los siguientes seis grupos, cada uno contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras para el otro: 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); 2) ácido Aspártico (D), ácido Glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (I) ; 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (I), Triptofan (W); (ver también, por ejemplo, Creighton, Proteins, W. H. Freeman y Company (1984); Schultz y Schimer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag (1979)). Uno versado en la técnica apreciará que las sustituciones identificadas anteriormente no solo son las únicas sustituciones conservadoras posibles. Por ejemplo, para algunos propósitos uno puede tener en cuenta todos los aminoácidos cargados como sustituciones conservadoras para cada uno con respecto al otro en donde ellos son positivos o negativos. En adición, las sustituciones individuales, eliminaciones o adiciones que alteran agregan o eliminan un aminoácido único o un porcentaje pequeño de aminoácido en una secuencia codificada también puede ser considerado, "variaciones modificadas conservadoramente".

Los términos "miméticos" y "péptido miméticos" se refiere a un compuesto químico sintético que tiene substancialmente la misma estructura y/o características funcionales de los polipéptidos, por ejemplo, dominios de translocación, dominios de unión de ligando o receptores quiméricos de la invención. El mimético puede

ser compuesto enteramente de análogos no naturales, o sintéticos de aminoácidos, o puede ser una molécula quimérica de aminoácidos de péptido parcialmente natural y aminoácidos de análogos parcialmente no naturales. El mimético puede también incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservadoras de aminoácidos naturales siempre que tales sustituciones tampoco alteren substancialmente la estructura y/o actividad del mimético.

Como con los polipéptidos de la invención que son variantes conservadoras, la experimentación de rutina determina si un mimético está dentro del alcance de la invención, es decir, que su estructura y/o función no este alterada substancialmente. Las composiciones miméticas de polipéptidos pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales no naturales, que son típicamente de tres grupos estructurales: a) grupos de enlace de residuos diferente de los enlaces amida naturales ("enlace de péptido"); b) residuos no naturales en lugar de residuos de aminoácido de ocurrencia natural; o c) residuos que inducen imitación secundaria estructural, es decir para inducir o estabilizar una estructura secundaria, por ejemplo, una vuelta beta, vuelta gama, hoja beta, conformación de hélice alfa y similar. Un polipéptido puede estar caracterizado como un mimético cuyo todo o algunos de sus residuos están unidos por medios químicos a otros que no son enlaces naturales de péptido. Los residuos péptidos miméticos individuales pueden ser unidos por enlaces de péptido, otros enlaces químicos o por medio de acoplamiento, tales como, por ejemplo; glutaraldehido, ésteres N-hidroxisuccinimida, maleimidas bifuncionales, N, N'-díciclohexilcarbodiimida (DCC) o N, N'-diisopropilcarbodiimida (DIC). Los grupos enlazados que pueden ser una alternativa al enlace amida tradicional ("enlace de péptido") incluye, por ejemplo, ketometileno (por ejemplo, $-C(=O)-CH_2-$ para $-C(=O)-NH-$), aminometileno (CH_2-NH), etileno, olefina ($CH=CH$), éter (CH_2-O),

tioéter ($\text{CH}_2\text{-S}$), tetrazol (CN_4), tiazol, retroamida, o éster (ver por ejemplo, Spatola, Chemistry y Biochemistry of Amino Acids, Peptides y Proteins, Vol. 7, pp 267-357, "Peptide Backbone Modifications," Marcell Dekker, NY (1983)). Un polipéptido también puede ser caracterizado como un mimético si contiene todos o algunos de los residuos no naturales en lugar de los residuos de aminoácido de ocurrencia natural; residuos no naturales son bien descritos en la literatura científica y de patentes

Una "etiqueta" o una "parte detectable" es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos bioquímicos, inmunoquímicos, o químicos. Por ejemplo, etiquetas útiles incluye la ^{32}P , las tintas fluorescentes, los reactivos densos en electrones, las enzimas (por ejemplo, como es usado comúnmente en un ELISA), la biotina, la digoxigenina, o haptenos y proteínas que pueden ser hechas detectables, por ejemplo, por medio de incorporar una radioetiqueta en el péptido o usada para detectar anticuerpos especialmente reactivos con el péptido.

Una "probeta de ácido nucleico oligonucleótido marcado" es uno que está ligado, sea de manera covalente, por medio de un ligador o un enlace químico o de manera no covalente por medio de enlaces iónicos, de Van der Waals, electrostático, o de hidrógeno a una etiqueta tal que la presencia de la probeta pueda ser detectada por medios de detectar la presencia de la etiqueta ligada a la probeta.

Como se usa aquí "una probeta de ácido nucleico u oligonucleótido" es definido como un ácido nucleico capaz de ligar a un ácido nucleico objetivo de secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos, usualmente por medio de emparejar bases complementarias, usualmente por medio de la

formación de enlaces de hidrógeno. Como se usa aquí una probeta puede incluir bases naturales (por ejemplo, A, G, C, o T) o modificada (7-deazaguanosina, inosina, etc.). Adicionalmente, las bases en una probeta pueden estar unidas por un enlace diferente a un enlace de fosforiéster, siempre que este no interfiera con la hibridización. Así, por ejemplo, las probetas pueden ser ácido nucleico de péptido en el cual las bases constituyentes son unidas por enlaces de péptido en vez de vínculos de fosforiéster. Será entendido por aquellos versados en la técnica que las probetas pueden ligar secuencias objetivo que carecen completamente de complementariedad con la secuencia de probeta dependiendo de lo estricto de las condiciones de hibridización. Las probetas son marcadas de manera opcional directamente como con isótopos, cromóforos, lumiforas, cromogenes, o marcados indirectamente tal como con biotina, a la cual un complejo de estreptavidina puede ligarse más tarde. Por medio de ensayar en cuanto a presencia o ausencia de la probeta, uno puede detectar la presencia o ausencia de la secuencia o subsecuencia seleccionada.

El término "heterólogo" que se usa con referencia a porciones de un ácido nucleico indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación la una con la otra en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico es típicamente producido de manera recombinante, tiene dos o mas secuencias de genes no relacionados dispuestos para hacer un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor desde una fuente y una región de codificación desde otra fuente,. Similarmente, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se han encontrado en la misma relación la una con la otra en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

Un "promotor" es definido como un arreglo de secuencias de ácido nucleico que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Como se usa aquí, un promotor incluye las secuencias necesarias de ácido nucleico cerca del sitio de partida de la transcripción, de modo que, en el caso de un promotor tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente un promotor distante o elementos represores, que pueden ser localizados tanto como varios miles de pares de base desde el sitio de partida de la transcripción. Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo bajo la mayoría de las condiciones ambientales y de desarrollo.

Un promotor "inducible" es un promotor que está activo bajo regulación ambiental o de desarrollo. El término "enlazado operativamente" se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de expresión de ácido nucleico (por ejemplo, un promotor, o una disposición o arreglo de sitios de enlace del factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la secuencia de control de expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

Como se usa aquí "recombinante" se refiere a un polinucleótido sintetizado o de otra manera manipulado in vitro (por ejemplo, "polinucleótido recombinante"), o métodos de usar polinucleótidos recombinantes para producir productos de genes en células u otros sistemas biológicos, o a un polipéptido ("proteínas recombinantes") codificado por un polinucleótido recombinante. "recombinante significa" también involucrar el ligado de ácidos nucleicos que tiene diversas regiones de codificación o dominios de codificación o secuencias promotoras de diferentes fuentes en un casete de expresión o vector para expresión de, por ejemplo, la expresión inducible o constitutiva de una proteína de fusión que

comprende un dominio de translocación de la invención y una secuencia de ácido nucleico amplificada como un cebador de la invención.

Como se usa aquí, una "línea celular estable" se refiere a una línea celular, que de manera estable, es decir durante un periodo prolongado, expresa una secuencia nucleica heteróloga es decir una T1R o proteína G. en las modalidades preferidas, tales líneas estables celulares pueden ser producidas por la transfección apropiada de las células, típicamente células de mamíferos, por ejemplo, células HEK-293, con un vector linearizado que contiene una construcción de expresión T1R, es decir T1R1, T1R2 y/o T1R3. más preferiblemente, tales líneas celulares estables serán producidas por cotransfectar dos plásmidos linearizados que expresan hTIR1 y hT1R3 o hT1R2 y hT1R3 y un procedimiento de selección apropiado para generar líneas celulares que tienen estos genes integrados de manera estable allí. Más preferiblemente, la línea celular expresa de manera estable una proteína G, tal como la $G_{\alpha 15}$.

La frase "hibridiza de manera selectiva (o específicamente)" se refiere al ligado, duplexado, o hibridizado de una molécula solamente a una secuencia de nucleótido particular bajo condiciones de hibridización estrictas cuya esa secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, celular total o librería de ADN o ARN).

La frase "condiciones de hibridización estrictas" se refiere a condiciones bajo las cuales una probeta hibridizará en su subsecuencia objetivo, típicamente en una mezcla compleja de ácido nucleico, pero no en otras secuencias. Las condiciones estrictas son dependientes de secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas hibridizan específicamente a temperaturas

mayores. Una guía extensiva a la hibridización de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology- Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization y the strategy of nucleic acid assays" (1993). Generalmente, las condiciones estrictas son seleccionadas entre 5 a 10 °C inferiores a el punto térmico de fusión (T_m) para la secuencia específica de una resistencia iónica definida de pH, la T_m es la temperatura (bajo la resistencia iónica definida, pH, y concentración nucleica) en la cual el 50% de las probetas complementarias al objetivo hibridizan a la secuencia objetivo en equilibrio (ya que las secuencias objetivo están presentes en exceso, en la T_m , 50% de las probetas son ocupadas en equilibrio). Las condiciones estrictas también serán aquellas en las cuales la concentración de sal es menor que cerca de 1,0 M de ión de sodio, típicamente cerca de 0,01 a 1,0 M de concentración de ión de sodio (u otras sales) a un pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de por lo menos cerca de 30 °C para probetas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y por lo menos cerca de 60 °C para probetas largas (por ejemplo, mayores a 50 nucleótidos). Las condiciones estrictas también pueden ser logradas con la adición de agentes de desestabilización tales como la formamida. Para la hibridización selectiva o específica, una señal positiva es por lo menos un fondo de dos veces, opcionalmente de fondo de 10 veces. Las condiciones estrictas ilustrativas de hibridización pueden ser como sigue: 50% de formamida, 5x SSC, y 1% de SDS, incubado a 42°C, o, 5x SSC, 1% de SDS, incubado a 65°C, con un lavado en 0.2x SSC, y 0.1 % de SDS a 65°C. Tales hibridaciones y etapas de lavado pueden llevarse a cabo, para, por ejemplo, 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60; o más minutos.

Los ácidos nucleicos que no hibridizan uno al otro bajo condiciones estrictas son relacionados todavía substancialmente, si los polipéptidos que ellos codifican están substancialmente. Esto ocurre, por ejemplo, cuando una copia de un ácido

nucleico es creada usando la degeneración de codón máxima permitida por el código genético. En tales casos, los ácidos nucleicos hibridizan típicamente bajo condiciones de hibridización moderadamente estrictas. Ilustrativamente "las condiciones de hibridización moderadamente estrictas" incluyen una hibridización en un amortiguador de 40% de formamida, 1 M NaCL, 1% de SDS a 37°C, y un lavado 1X SSC a 45°C. Tales hibridizaciones y etapas de lavado pueden llevarse a cabo para, por ejemplo, 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60, o más minutos. Una hibridización positiva es por lo menos dos veces soportada. Aquellos versados en la técnica reconocerán fácilmente que la hibridización alternativa y las condiciones de lavado pueden ser utilizadas para suministrar condiciones que son similarmente estrictas.

"Anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende una región de estructura de un gen de inmunoglobulina o fragmentos del que liga específicamente y reconoce un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes kappa, lambda, alfa, gama, delta, ypsilon, y de región constante mu, lo mismo que los genes de región variable miriad de inmunoglobulina. Las cadenas livianas son clasificadas sea kappa o lambda. Las cadenas pesadas son clasificadas como gama, mu, alfa, delta, o ypsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Una unidad estructural de inmunoglobulina ilustrativa (anticuerpos) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadena de polipéptido, cada par tiene una cadena "liviana" (cerca de 25 kDa) y una cadena "pesada" (cerca de 50 a 70 kDa). El N-terminus de cada cadena define unas región variable de cerca de 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables por el reconocimiento del antígeno. El término "cadena liviana

variable" (VL) y "cadena pesada variable" (VH) se refiere a estas cadenas liviana y pesada respectivamente.

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la cual (a) la región constante, o una porción de ellas es alterada, reemplazada o intercambiada de modo que el sitio de ligando del antígeno (región variable) está ligado a una región constante de una clase alterada o diferente, función efectora y/o especie, o a una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, droga, etc.; o (b) la región variable, o una porción de ella, es alterada, reemplazada o intercambiada con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada.

Un anticuerpo "anti-T1R" es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que liga específicamente un polipéptido codificado por un gen T1R, cADN, o una subsecuencia del mismo.

El término "inmunoensayo" es un ensayo que utiliza un anticuerpo para ligar específicamente un antígeno. El inmunoensayo está caracterizado por el uso de propiedades de ligando específicas de un anticuerpo particular para aislar, tomar como objetivo y/o cuantificar el antígeno.

La frase "liga específicamente (o selectivamente)" o "reacciona específicamente (o selectivamente)" se refiere a una molécula o composición, se refiere a una reacción de ligando que es determinativa de la presencia de la molécula en una población heterogénea de otros biológicos. Así, bajo condiciones designadas, las moléculas especificadas se ligan a un receptor particular al menos dos veces al

antecedente y no se liga substancialmente en una cantidad significativa a otras moléculas presentes en la muestra. El ligado específico a un receptor bajo tales condiciones puede requerir un receptor que sea seleccionado por su especificidad para una molécula particular.

Con respecto a los anticuerpos una variedad de formatos de inmunoensayo pueden ser usados para seleccionar los anticuerpos especialmente inmunoreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA de fase sólida son usados rutinariamente para seleccionar anticuerpos que tiene una inmunoreacción específica con una proteína (ver, por ejemplo, Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, (1988), para una descripción de formato de inmunoensayo y condiciones que pueden ser usadas para determinar inmunoreactividad específica). Típicamente una reacción específica o selectiva puede ser por lo menos dos veces una señal o ruido antes de antecedente y más típicamente más de 10 a 100 veces el antecedente.

La frase "asociados selectivamente con" se refiere a la habilidad de un ácido nucleico para "hibridizar selectivamente" con otro como se definió anteriormente, o la habilidad de un anticuerpo para "ligar selectivamente (o específicamente)" a una proteína como se diseño anteriormente.

El término "vector de expresión" se refiere a cualquier sistema de expresión recombinante para el propósito de expresar una secuencia de ácido nucleico de la invención in vitro o in vivo constitutiva o indeciblemente en cualquier célula, incluyendo células procarióticas, de levadura, de hongos, de plantas, de insectos o de mamíferos. El término incluye sistemas de expresión lineal o circular. El término incluye sistemas de expresión que permanecen episomales o integradas dentro

del genoma de la célula anfitriona. Los sistemas de expresión pueden tener la habilidad de auto replicarse o no, es decir, manejar solo expresión transitoria en una célula. El término incluye la expresión recombinante "de casetes" que contengan solamente los elementos mínimos necesarios para la transcripción del ácido nucleico recombinante.

Por "célula anfitriona" se quiere significar una célula que contiene un vector de expresión y soporta la replicación o expresión del vector de expresión. Las células anfitrionas pueden ser células procarióticas tales como *E. coli*, o células eucarióticas tales como levadura, insectos, anfibios, gusanos o células de mamíferos tales como CHO, Hela, HEK-293 y similares, por ejemplo, células cultivadas, explantadas, y células in vivo.

COMPUESTOS

Como se discutió anteriormente, hay diferentes dominios en los receptores T1R. T1R1, T1R2, y T1R3 cada uno contiene un dominio extracelular de terminal N (también conocido como el dominio Venus flytrap), dominios de transmembrana que comprenden siete regiones de transmembrana, y correspondientemente citoplásmico, y lasos extracelulares; una cisteína de dominio rico, y un dominio de terminal C. Cada región define un conjunto específico de compuestos que ligan específicamente a esa región.

En humanos, el dominio extracelular de Terminal N comprende aminoácidos C-termina con aminoácidos de 1 a 560 de hT1R2 y aminoácidos 1 a 563 de hT1R3. En de ratas, el dominio extracelular de terminal N comprende aminoácidos 1 a 564 de rT1R2, y aminoácidos 1 a 568 de rT1R3.

En humanos, el dominio de transmembrana de terminal C. y el dominio intracelular comprenden aminoácidos 561 a 839 de hT1R2, y aminoácidos 564 a 852 de hT1R3. En de ratas el dominio de transmembrana de terminal C y el dominio intracelular comprenden aminoácidos 565 a 842 de rT1R2, y aminoácidos 569 a 858 de rT1R3.

Los receptores glutamato metabotrópico (mGluR) son otra clase de receptores acoplados a proteína G clase C que responden al glutamato. Estos se encuentran principalmente en el cerebro y en el tejido neuronal en donde ellos juegan un papel en la señalización neuronal. El dominio extracelular del terminal N mGluR puede ser ligado covalentemente a un T1R para poder crear receptores quiméricos. El receptor de mGluR puede ser cualquiera de mGluR1-mGluR8, por ejemplo. Los diferentes ligandos se ligan a diferentes dominios sobre subunidades diferentes tanto de receptores umami y dulce. Por ejemplo, la aspartamo y la neotamo se ligan al dominio extracelular de terminal N del T1R2, mientras que el ciclamato, dihidrochalcona neohesperidina (NHDC), y el lactisol se ligan al dominio de transmembrana de T1R3. Debido a que T1R3 es una de las dos subunidades en el receptor del gusto umami T1R1/T1R, el ciclamato, el NHDC y el lactisol pueden interactuar con el T1R3 en el receptor de gusto umami T1R1/T1R3 también. El ciclamato y el NHDC promueven la actividad del receptor del gusto umami, mientras que el lactisol inhibe el receptor umami.

Los compuestos de ligado específico de la invención como están relacionados a los gustos umami comprenden amidas. Los compuestos de amida también comprenden ciertas clases de derivados de amida o clases de derivado

relacionados con amidas tales como ureas, uretanos, oxalamidas, archilamidas, y similares.

Las moléculas que interactúan con el dominio de transmembrana de T1R2, por ejemplo, pueden ser moduladores del gusto del dulce, y las moléculas que interactúan con el dominio de transmembrana de T1R3 pueden ser moduladores del gusto del dulce y/o del gusto umami.

El T1R2/T1R3 reconoce un grupo de endulzantes que no son reconocidos por el T1R2/T1R3 de rata, y el T1R2/T1R3 humano pero no de rata es inhibido por el lactisol. Cuyo dominio extracelular del T1R2 humano fue reemplazado por su contraparte de rata, el receptor humano perdió la habilidad para reconocer la aspartamo, indicó que esta parte del T1R2 humano se requiere para ligarse a la aspartamo. Contrariamente, cuyo el dominio extracelular de T1R2 de rata fue reemplazado por su contraparte human, el receptor de rata adquiere la habilidad para reconocer al aspartamo, indicando que esta parte del T1R2 es suficiente para ligar la aspartamo. Por el mismo principio, el dominio de transmembrana del T1R3 fue requerido y suficiente.

La tabla 6 muestra las abreviaciones utilizadas para representar diversos receptores quiméricos de rata/humano y subunidades de receptor.

TABLA 6

hT1R2- T1R2 humano
hT1R3- T1R3 humano
rT1R2- T1R2 de rata
rT1R3- T1R3 de rata
hT1R2/rT1R3- un receptor compuesto de T1R2 humano y T1R3 de rata
rT1R2/hT1R3- un receptor compuesto de un T1R2 de rata y un T1R3 humano
hT1R2/h3-r3-un receptor compuesto de T1R2 humano y un T1R3 quimérico con dominio extracelular de terminal N humano y transmembrana de rata y dominio terminal C
rT1R2/r3-h3- un receptor compuesto de T1R2 de rata y un T1R3 quimérico con dominio extracelular de terminal N de rata y transmembrana humana y el dominio de terminal C.
h2-r2/rT1R3- un receptor compuesto de T1R2 quimérico con dominio extracelular de terminal N humano y transmembrana de rata y dominio de terminal C y T1R3 de rata.
r2-h2/rT1R3- un receptor compuesto de un T1R2 quimérico de rata dominio extracelular de terminal N de rata y transmembrana humana y dominio de terminal C y T1R3 de rata
h2-hI/hT1R3- un receptor compuesto de un T1R quimérico con dominio extracelular de terminal N de T1R2 humano y transmembrana T1R1 humana y dominio de terminal C y T1R3 humano.
hI-h2/hT1R3- un receptor compuesto de un T1R quimérico con dominio extracelular de terminal N de T1R1 humano y transmembrana de T1R2 humana y dominio de terminal C y T1R3 humano.
h2-mGluRI/h3-mGluRI- un receptor compuesto de un dominio extracelular de terminal N de hT1R2 ligado covalentemente a la transmembrana y el dominio de terminal C del mGluRI y un dominio extracelular de terminal N de hT1R3 ligado covalentemente a la transmembrana y el dominio de terminal C del mGluRI.
hI-mGluRI/h3-mGluRI- un receptor compuesto de un dominio extracelular de terminal N de hTIR1 ligado covalentemente a la transmembrana y el dominio de terminal C del mGluRI y un dominio extracelular de terminal N de hT1R3 ligado covalentemente a la transmembrana y el dominio de terminal C del

mGluRI.
mGluRI-h2/mGluRI-h3- un receptor compuesto de un dominio extracelular de terminal N del mGluRI ligado covalentemente a la transmembrana y el dominio de terminal C de hT1R2 y un dominio extracelular de terminal N de un mGluRI ligado covalentemente a la transmembrana y al dominio de terminal C de hT1R3
mGluRI-h1/mGluRI-h3- un receptor compuesto de un dominio extracelular de terminal N del mGluRI ligado covalentemente a la transmembrana y el dominio de terminal C de hT1R1 y un dominio extracelular de terminal N del mGluRI ligado covalentemente a la transmembrana y el dominio de terminal C de hT1R3.

Se describe aquí compuestos de ocurrencia no natural que ligan específicamente al receptor T1R2/T1R3 que comprende hT1R2/hT1R3 pero no el rT1R2/rT1R3. Ejemplos de tales compuestos incluyen, pero no se limitan al neotamo, al aspartamo, el ciclamato, lactisol, Compuesto 883360, Compuesto 6542888, Compuesto 403249, Compuesto 6364395, ácido dihidroxibenzoico (DHB), Compuesto 6542888, y dihidrochalcona de neohesperidina (NHDC). Ejemplos adicionales se encuentran en la tabla 1-4. Los compuestos orgánicos no péptidos que pueden ser de aproximadamente del tamaño de una caja de dimensiones 15x8x8 ángstrom, más preferiblemente la dimensión debería ser 12x5x5 ángstrom.

También se han descrito compuestos que ligan específicamente a un receptor T1R2/T1R3 que comprende hT1R2/rT1R3 pero no rT1R2/hT1R3. Ejemplos de tales compuestos incluyen pero no se limitan al aspartamo, y el neotamo. Ejemplos adicionales se encuentran en la tabla 5.

También se han descrito compuestos que ligan específicamente al dominio extracelular de terminal N del T1R2 del receptor hT1R2/hT1R3. Ejemplos de tales compuestos incluyen pero no son limitados a neotamo, azúcares de carbohidrato

de aspartamo, (por ejemplo, sucrosa, fructosa, glucosa, tagatosa, eritritol, sorbitol, maltosa, xilitol, lactosa y galactosa, lo mismo que todos de los otros azúcares de carbohidrato). Ejemplos adicionales se encuentran en la tabla 5.

También se describen compuestos que ligan específicamente al dominio de Venus flytrap (VFD) del T1R2 del hT1R2/hT1R3 y el receptor hT1R2/rT1R3.

También se han descritos compuestos que ligan específicamente al terminal N del dominio de la Venus flytrap de la subunidad T1R2 del receptor T1R2/T1R3. Más específicamente, también se describen compuestos que ligan específicamente a los residuos de aminoácido 144 y 302 del terminal N del dominio Venus flytrap humano de la subunidad T1R2 del receptor T1R2/T1R3. Ejemplos de tales compuestos incluyen pero no se limitan al aspartamo, neotamo, carbohidratos, y aminoácidos de dulce tales como D-Trp, Ala, y Gli.

También se han descrito compuestos que ligan específicamente a región rica de cisteína del T1R2 del receptor hT1R2/hT1R3. También se han descrito compuestos que ligan específicamente al Dominio de Transmembrana (TM) del T1R2 del receptor hT1R2/hT1R3.

También se han descrito compuestos que ligan específicamente a un receptor de T1R2/T1R3 que comprende rT1R2/hT1R3 pero no el hT1R2/rT1R3. Ejemplos de tales compuestos incluyen pero no están limitados al ciclamato, NHDC, lactisol, Compuesto 883360, Compuesto 403249, y Compuesto 6364395. Ejemplos adicionales se han encontrado en la tabla 5.

También se han descrito compuestos que ligan específicamente al hT1R2/hT1R3 y rT1R2/r3-h3 pero no al rT1R2/rT1R3 o al hT1R2/h3-r3. Ejemplos de tales compuestos incluyen pero no se limitan al ciclamato, NHDC, lactisol, Compuesto 883360, Compuesto 403249 y Compuesto 6364395.

También se describen compuestos que ligan específicamente al bucle extracelular 2 y al bucle extracelular 3 del dominio de terminal C humano de la subunidad T1R3 del receptor T1R2/T1R3. También se describen compuestos que ligan específicamente al hT1R2/hT1R3 y r2-h2/rT1R3 pero no al rT1R2/rT1R3 o al h2-r2/hT1R3.

También se describen compuestos que ligan específicamente al dominio extracelular de terminal N humano de la subunidad T1R3 del receptor T1R2/T1R3. También se describen compuestos que ligan específicamente al dominio de Venus flytrap (VFD) del T1R3 del receptor hT1R2/hT1R3. Ejemplos de tales compuestos incluyen pero no se limitan al aspartamo, neotamo, carbohidratos, y aminoácidos de dulce tales como D-Trp, Ala, y Gli.

También se describen compuestos que ligan específicamente al dominio de transmembrana de T1R3 del receptor hT1R2/hT1R3. También se describen compuestos que ligan específicamente al bucle extracelular 2 y al bucle extracelular 3 del dominio de terminal C humano de la subunidad T1R3 del T1R2/T1R3. Ejemplos de tales compuestos incluyen pero no se limitan al ciclamato.

El compuesto de la invención no incluye sucrosa, fructosa, glucosa, eritritol, isomaltosa, lactitol, manitol, sorbitol, xilitol, ciertos terpenoides naturales

conocidos, flavonoides, o endulzarores de proteína, di-péptidos, tri-péptidos, aspartamo, sacarina, sucralosa, sacáridos halogenados, acesulfama-K, ciclamato, sucralosa, y alitama. neotamo, perillartina, SC-45647, SC-40014, monelina, NC-002740-01, taumatina, CC- 00100, NC-00420, alitama, SC-44102, dulcina, NC-00576, ácido slicirrizico, esteviosida, Na-Sacarina, D-triptofan, ciclamato, DHB, ácido glicólico, glicina, D (-) fructosa, homofuronol, D (-) tagatosa, maltosa, D (+) glucosa, D-sorbitol, D (+) galactosa, a- lactosa, L () fructosa, L (+) Compuesto 403249, y glucosa.

Opcionalmente, un compuesto de la invención no es también el Compuesto 6364395. También se describen aquí compuestos que ligan regiones truncadas de un dominio T1R. Por ejemplo, se describen compuestos que ligan específicamente al dominio TM del receptor T1R2 de un receptor de dulce truncado que comprende h2TM/h3TM, compuestos que ligan específicamente a el dominio TM del T1R3 de un receptor de dulce truncado que comprende h2TM/h3TM, compuestos que ligan específicamente a el dominio TM de T1R2 de un receptor quimérico que comprende mGluR-h2/mGluR-h3, compuestos que ligan específicamente a el dominio TM de T1R3 de un receptor quimérico que comprende mGluR-h2/mGluR-h3, compuestos que ligan al dominio TM del T1R1 de un receptor de saborización truncado que comprende h1TM/h3TM, compuestos que ligan al dominio TM del T1R3 de un receptor de dulce truncado que comprende h1TM/h3TM, compuestos que ligan al dominio TM de T1R1 de un receptor quimérico que comprende mGluR-h1/mGluR-h3, y compuestos que ligan al dominio TM del T1R3 de un receptor quimérico que comprende mGluR-h1/mGluR-h3. Las ID DE SEC No: 29-33 representan estos receptores truncados.

Los compuestos de la invención no incluyen el glutamato de monosodio ("MSG"), monofosfato de inosina (IMP) o monofosfato de guanosina (GMP), sucrosa, fructosa, glucosa, eritritol, isomalta, lactitol, manitol, sorbitol, xilitol, ciertos terpenoides, naturales conocidos flavonoides, o ensulzadores de proteína, di-péptidos, tri-péptidos de aspartamo, sacarina, sucralosa, sacáridos halogenados, acesulfama-K, ciclamato, sucralosa, alitama, glutamato de monosodio ("MSG"), monofosfato de inosina (IMP) o monofosfato de guanosina (GMP), o monofosfato de adenosina.

El Compuesto 403249 es (5- (4H-benzo[d][1,3] oxatiin-2-il)-2-metioxifenol, mientras que el Compuesto 6364395 es 3-(3-hidroxi-4-metoxifenetil)benzo[d]isoxiazol-4,6-diol.

Los compuestos descritos anteriormente pueden demostrar una dependencia de compuesto incrementada en fluorescencia con una actividad comparada con la actividad máxima para la fructuosa o por lo menos 25% en un ensayo con base en fluorescencia usando un instrumento FLIPR (Lector de Placa de Intensidad Fluorométrica, Dispositivos Moleculares, Sunnivale, CA). Como ejemplo, de este protocolo, ver ejemplos 12 y 18 los compuestos también pueden demostrar una disminución de dependencia de compuesto en el EC50 para endulzantes pero por lo menos dos veces en un ensayo con base en fluorescencia usando un instrumento FLIPR (Molecular Devices). Más aún, en un ensayo con base en células, el compuesto puede resultar en por lo menos 10 a 100 células transfectadas con tipos silvestres o receptores quiméricos que muestran un incremento de dependencia al compuesto en fluorescencia. Un ejemplo de un ensayo con base en células puede encontrarse en el ejemplo 24. El compuesto también puede demostrar un incremento en dependencia al compuesto por lo

menos 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, y 1,9, a dos veces o mayor, o cualquier número en medio, en el número de células fluorescentes en respuesta a un nivel máximo de un endulzante. La respuesta puede ser medida por fluorescencia, niveles de calcio, niveles IP₃, niveles de cAMP, ligado de GPT γ S, o actividad de gen reportero (por ejemplo, luciferasa, beta-galactosidasa).

Más aún, los compuestos descritos aquí pueden tener uno o más de las siguientes características en una célula: un EC₅₀ disminuido comparado con un control de por lo menos aproximadamente 50%, nivel de Ca²⁺ intracelular incrementado por al menos aproximadamente 25%, cAMP intracelular incrementado por al menos aproximadamente 25%, cGMP intracelular incrementado por al menos aproximadamente 25%, IP₃ intracelular incrementado por al menos aproximadamente 25%, o ligado a la proteína G incrementado del GTP λ S por al menos aproximadamente 25%.

Métodos de Uso de los Compuestos

También se describen métodos que modulan en el gusto de la saborización de un comestible o de un producto medicinal que comprende suministrar por lo menos un producto comestible o medicinal, o un precursor del mismo, y combinar el producto comestible o medicinal o precursor del mismo con por lo menos una cantidad moduladora de sabor a ajedrea común de por lo menos un compuesto de ocurrencia no natural como se describe aquí, o una sal comestiblemente aceptable del mismo, de modo que se forma un producto comestible o medicinal modificado; modulando así el sabor a ajedrea de un producto comestible o medicinal.

También se describen métodos para inhibir el gusto a ajedrea de un comestible o producto medicinal que comprende suministrar por lo menos un producto comestible o medicinal, o un precursor del mismo, y combinar el producto comestible o medicinal o precursor del mismo con por lo menos una cantidad inhibidora de sabor a ajedrea de por lo menos un compuesto de ocurrencia no natural según se describieron aquí, o una sal comestiblemente aceptable del mismo, de modo que se forme un producto comestible o medicinal modificado; inhibiendo así el sabor a ajedrea de un producto comestible o medicinal.

También se describen métodos para incrementar el gusto a ajedrea de un producto comestible o medicinal que comprende suministrar por lo menos un producto comestible o medicinal, o un precursor del mismo, y combinar el producto comestible o medicinal o precursor del mismo con por lo menos una cantidad incrementante de sabor a ajedrea de por lo menos un compuesto de ocurrencia no natural como se describe aquí, o una sal comestiblemente aceptable del mismo, de modo que se forma un producto comestible o medicinal modificado; incrementando así el sabor a ajedrea de un producto comestible o medicinal.

También se describen métodos para modular el gusto del dulce de un producto comestible o medicinal que comprende suministrar por lo menos un producto comestible o medicinal, o un precursor del mismo, y combinar el producto comestible o medicinal o precursor del mismo con por lo menos una cantidad moduladora de sabor a dulce de por lo menos un compuesto de ocurrencia no natural según se describe aquí, o una sal comestiblemente aceptable del mismo, de modo que se forme un producto comestible o medicinal modificado; modulando así el sabor a dulce de un producto comestible o medicinal.

También se describen métodos para inhibir el gusto a dulce de un producto comestible o medicinal que comprende suministrar por lo menos un producto comestible o medicinal, o un precursor del mismo, y combinar el producto comestible o medicinal o precursor del mismo con por lo menos una cantidad inhibidora de sabor a dulce de por lo menos un compuesto de ocurrencia no natural según se describe aquí, o una sal comestiblemente aceptable del mismo, de modo que se forme un producto comestible o medicinal modificado; inhibiendo así el sabor a dulce de un producto comestible o medicinal.

También se describen métodos para incrementar el gusto a dulce de un producto comestible o medicinal que comprende suministrar por lo menos un producto comestible o medicinal, o un precursor del mismo, y combinar el producto comestible o medicinal o precursor del mismo con por lo menos una cantidad incrementadora de sabor a dulce de por lo menos un compuesto de ocurrencia no natural según se describe aquí, o una sal comestiblemente aceptable del mismo, de modo que se forme un producto comestible o medicinal modificado; incrementando así el sabor a dulce de un producto comestible o medicinal.

También se describen métodos para mejorar la percepción del gusto del umami que comprende poner en contacto un receptor de umami con ciclamato y NHDC, y sus derivados, lo mismo que métodos para mejorar la percepción del gusto del umami que comprende poner un receptor de umami con derivados del lactisol. También se describen métodos para mejorar el gusto al dulce que comprende poner en contacto un receptor de dulce con ciclamato y NHDC, y sus derivados. También se describen métodos para mejorar la percepción del gusto dulce que comprende poner en contacto un receptor de dulce con derivados del lactisol.

Aislamiento y expresión de polipéptidos T1R

El aislamiento y la expresión de los T1R, o fragmentos o variantes de él, de la invención, pueden llevarse a cabo como se describe aquí. Los cebadores PCR pueden ser usados para la amplificación de ácido nucleico que codifican regiones de unión de ligando del receptor del gusto, y librerías de estos ácidos nucleicos que pueden ser generadas opcionalmente. Los vectores de expresión individuales o librerías de vectores de expresión que pueden ser usados para infectar o transfectar células anfitrionas para la expresión funcional de estos ácidos nucleicos o librerías. Estos genes y vectores pueden ser hechos y expresados in vitro o in vivo. Una persona versada en la técnica reconocerá que los fenotipos deseados para alterar y controlar la expresión de ácido nucleico pueden ser obtenidos por medio de modular la expresión o la actividad de los genes y los ácidos nucleicos (por ejemplo, promotores, mejoradores y similares) dentro de los vectores de la invención. Cualquiera de los métodos conocidos descritos para incrementar o disminuir la expresión o actividad pueden ser usadas. La invención puede ser practicada en conjunto con cualquier método o protocolo conocido en la técnica, al igual que están bien descritos en la literatura científica y de patentes.

Las secuencias de ácidos nucleicos de la invención y otros ácidos nucleicos usados para practicar esta invención, sean ARN, cADN, ADN genómico, vectores, virus o híbridos de los mismos, pueden ser aislados a partir de una variedad de fuentes, logrados por ingeniería genética, amplificados, y/o recombinantemente expresados. Cualquier sistema de expresión recombinante puede ser usado, incluyendo, en adición a las células de mamíferos, por ejemplo, sistemas bacterianos de levadura, insectos o plantas.

Alternativamente, estos ácidos nucleicos pueden ser sintetizados in vitro por técnicas de síntesis químicas bien conocidas, como se describe en, por ejemplo, Carruthers, Cold Spring Harbor Sump. Quant. Biol. 47: 411-418 (1982); Adams, Am. Chem. Soc. 105: 661 (1983); Belousov, Nucleic Acids Res. 25: 3440-3444 (1997); Frenkel, Free Radic. Biol. Med. 19: 373-380 (1995); Blommers, Biochemistry 33: 7886-7896 (1994); Narang, Meth. Enzymol. 68: 90 (1979); Brown, Meth. Enzymol. 68: 109 (1979); Beaucage, Tetra. Lett. 22: 1859 (1981); la patente Estadounidense No. 4,458,066. Los fragmentos de ADN de doble cadena pueden ser obtenidos sea por medio de sintetizar la cadena complementaria y templat los hilos juntos bajo condiciones apropiadas, por medio de agregar hilos complementarios usando polimerasa de ADN con una secuencia apropiada.

Las técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, para las mutaciones generativas en secuencias, subclonación, probetas de marcación, secuenciamiento, hibridización, y similares son bien descritas en la literatura científica y de patentes. Ver por ejemplo, Sambrook, ed., Molecular Cloning: a Laboratory manual (segunda edición), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Parte I, Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N. Y. (1993).

Los ácidos nucleicos, vectores, cápsidos, polipéptidos, y similares pueden ser analizados y cuantificados por cualquiera de un número generales bien conocidos por aquellos versados en la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, métodos analíticos bioquímicos tales como NMR, espectrometría, radiografía, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC), cromatografía de capa

delgada (TLC) y cromatografía de hiperdifusión, diversos métodos inmunológicos, por ejemplo, reacciones de precipitado de fluido o geles, inmunodifusión, inmunoelectroforesis, radioinmunoensayos (RIA), ensayos inmunosorbentes ligados encima (ELISA), ensayos de inmunofluorescencia, análisis Southern, análisis Northern, análisis dot-blot, electroforesis de gel (por ejemplo, SDS-PAGE), RT.PCR, PCR cuantitativo, u otros métodos de amplificación de señal u objetivo de ácidos nucleicos, radiomarcado, cintilación, conteo y cromatografía de afinidad.

Los cebadores de oligonucleótidos pueden ser usados para amplificar fragmentos de ácido nucleico que codifican regiones de unión de ligando del receptor del gusto. Los ácidos nucleicos descritos aquí también pueden ser clonados o medidos cuantitativamente usando técnicas de amplificación. Los métodos de amplificación son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, reacción de cadena de polimerasa PCR (PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications, ed. munis. Academic Press, N. Y. (1990) y PCR Strategies, ed. Innis, Academic Press, Inc., N. Y. (1995), reacción de cadena de ligasa (LCR) (ver, por ejemplo, Wu, Genomics 4: 560 (1989); Landegren, Science 241: 1077, (1988); Banger, Gene 89: 117 (1990)); amplificación de transcripción (ver por ejemplo, Kwoh, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173 (1989)); y, replicación de secuencia autosostenida (ver, por ejemplo, Guatelli, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874 (1990)); amplificación de replicasa de beta Q (ver, por ejemplo, Smith, J Clin. Microbiol. 35: 1477-1491 (1997)); ensayo de amplificación de replicasa Q-beta automatizada (ver, por ejemplo, Burg, Mol. Cell. Probes 10: 257-271 (1996)) y otras técnicas mediadas por polimerasa ARN (por ejemplo, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario); ver también Berger, Methods Enzymol. 152: 307-316 (1987); Sambrook; Ausubel; patente estadounidense Nos. 4,683, 195 y 4, 683, 202; Sooknanan,

Biotechnology 13: 563-564 (1995). Los cebadores pueden ser diseñados para retener la secuencia original del "donador" del receptor de 7 membranas. Alternativamente, los cebadores pueden codificar residuos de aminoácidos que son sustituciones conservadoras (por ejemplo, hidrofóbicas para residuos hidrofóbicos, ver discusión anterior) o sustituciones funcionalmente benignas (por ejemplo, que no impidan la inserción del plasma en membrana, que cause división por peptidasa, que causen doblamiento anormal del receptor, y similares. Una vez amplificados los ácidos nucleicos, sea individualmente o como librerías, pueden ser clonados de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, y si se desea, en cualquiera de una variedad de lectores usando métodos moleculares biológicos; métodos para clonación in vitro de ácidos nucleicos amplificados como se describe en la patente estadounidense No. 5,426,039.

Los pares de cebadores pueden ser diseñados para amplificar de manera selectiva regiones de unión de ligando de los miembros de la familia T1R. Estas regiones pueden variar para diferentes ligandos o gustadores. Así, lo que puede ser una región de ligado mínima para un gustador puede ser muy limitante para un segundo gustador. De acuerdo a lo anterior, las regiones unión de ligando de diferentes tamaños comprenden diferentes estructuras de dominio extracelular que pueden ser amplificadas.

Los paradigmas de diseños de pares de cebadores degenerados son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un Cebador COnsensus-DEgenerado Híbrido de Oligonucleótido (CODEHOP) en programa de computador de estrategia es accesible como <http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>, y está vinculado directamente del sitio de alineamiento de secuencia múltiple BlockMaker para la predicción de cebador híbrido iniciando con un conjunto de secuencias de

proteínas relacionadas, como se conoce a las regiones de unión de ligando del receptor del gusto (ver, por ejemplo, Rose, *k Res.* 26: 1628-1635 (1998); Singh, *Biotechniques* 24: 318-319 (1998)).

Medios para sintetizar pares de cebadores de oligonucleótidos son bien conocidos en la técnica. Los pares de base "natural" o pares de base sintética pueden ser usados. Por ejemplo, el uso de nucleobases artificiales ofrecen una enseñanza versátil para manipular la secuencia de cebadores y generar una mezcla más compleja de productos de amplificación. Diversas familias de nucleobases son capaces de asumir múltiples orientaciones de enlace de hidrógeno por medio de rotaciones de enlace interno para suministrar un medio para el reconocimiento molecular degenerado. La incorporación de estos análogos en una posición única de un cebador de PCR permite la generación de una librería compleja de productos de amplificación. Ver, por ejemplo, Hoops, *Nucleic Acids Res.* 25: 4866-4871 (1997). Las moléculas no polares también pueden ser usadas para imitar la forma de las bases de ADN naturales. Una imitación de forma de un enlace no hidrógeno para la adenina puede replicarse eficientemente y selectivamente contra una imitación de forma no polar para timina (ver, por ejemplo, Morales, *Nat. Struct. Biol.* 5: 950-954 (1998)). Por ejemplo, dos bases degeneradas pueden ser la base de pirimidina 6H, 8H-3, 4-dihidropirimido[4,5-c] [1, 2]oxazin-7-ona o la base depurina N6-metoxi-2, 6-diaminopurina (ver, por ejemplo, Hill, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4258-4263 (1998)). Cebadores degenerados ilustrativos de la invención incorporan la nucleasa análoga 5'-dimetoxitritil-N-benzoil-2'-desoxi-Citidina, 3'-[(2cianoetil)- (N, N-diisopropil)]fosforamidita (el término "P" en las secuencias, ver anteriormente). Estos enlaces de hidrógeno análogo de pirimidina con purinas, incluyen los residuos A y G.

Las variantes polimórficas, alelos y homólogos de interespecies que son substancialmente idénticas a un receptor del gusto descrito aquí, pueden ser aisladas usando las probetas de ácidos nucleicos descritas aquí. Alternativamente, las librerías de expresión pueden ser usadas para clonar polipéptidos de T1R y variantes polimórficas, alelos y homólogos de interespecie del mismo, por medio de detectar homólogos expresados inmunológicamente con antisuero o anticuerpos purificados hechos contra un polipéptido T1R que también reconoce y liga selectivamente al homólogo T1R.

Los ácidos nucleicos que codifican regiones ligando, ligado de receptores del gusto pueden ser generados por amplificación (por ejemplo, PCR) de la secuencia de ácido nucleico apropiadas usando pares de cebadores degenerados. El ácido nucleico amplificado puede ser ADN genómico de cualquier célula o tejido o mRNA o cADN derivado de las células que expresan el receptor del gusto. En una modalidad, las secuencias de codificación de proteína híbridas que comprenden ácidos nucleicos que codifican T1R fusionados para translocar secuencias pueden ser construidas. También se han suministrado T1R híbridos que comprenden motivos de translocación y dominios de ligado gustativos y otras familias de receptores quimiosensoriales, particularmente receptores del gusto. Estas secuencias de ácido nucleico pueden ser ligadas operativamente a elementos de control transcripcional o de traducción, por ejemplo, secuencias de iniciación de transcripción y traducción, promotores y mejoradores determinadores de transcripción y traducción, secuencias de poliadenilación y otras secuencias útiles para transcribir ADN en ARN. En la constitución de casetes de expresión recombinante, vectores y transgénicos, un fragmento promotor puede ser empleado para dirigir la expresión del ácido nucleico deseado en todas las células o tejidos.

En otra modalidad, las proteínas de fusión pueden incluir secuencias de translocación de terminal C o terminal N. Adicionalmente, las proteínas de función pueden comprender elementos adicionales, por ejemplo, para detección de proteína, purificación u otras aplicaciones. La detección y purificación que facilita los dominios incluye, por ejemplo, péptidos quelantes de metal tales como extractos de polistidina, módulos de histidina-triptofano, y otros dominios que permiten purificación sobre metales inmovilizados; proteína que liga la maltosa; dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada; o el dominio utilizado en la extensión de FLAGS/sistema de purificación de afinidad (Inmunex Corp., Seattle, WA).

La inclusión de unas secuencias ligadoras de división tales como el factor XA (ver, ejemplo, Ottavi, *Biochimie* 80: 289-293 (1998)), el motivo de reconocimiento de proteasa de subtilisina (ver, ejemplo, Polyak, *Protein Eng.* 10: 615-619 (1997)); enterocinasa (Invitrogen, San Diego, CA), y similares, entre el dominio de translocación (para una expresión de membrana de plasma eficiente) y el resto del polipéptido traducido recientemente pueden ser útiles para facilitar la purificación. Por ejemplo, una construcción puede incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido ligado a seis residuos de histidina seguido por una tioredoxina, un sitio de división de enterocinasa (ver, por ejemplo, Williams, *Biochemistry* 34: 1787-1797 (1995)), y un dominio de translocación de terminal C. Los residuos de histidina facilitan la detección y la purificación mientras que el sitio de división de enterocinasa suministra un medio para purificar las proteínas deseadas del resto de la proteína de fusión. La tecnología perteneciente a las proteínas de fusión que codifican vectores y aplicación de proteínas de fusión son

bien descritas en la literatura científica y de patentes, ver, por ejemplo, Kroll, DNA Cell. Biol. 12: 441-53 (1993).

Los vectores de expresión, sea como vectores de expresión individuales o como librerías de vectores de expresión, comprenden las secuencias que codifican los dominios unión de ligando que pueden ser introducidos en un genoma o dentro de un citoplasma o un núcleo de una célula y expresadas por una variedad de técnicas convencionales, bien descritas en la literatura científica y de patentes. Ver, por ejemplo, Roberts, Nature 328: 731 (1987); Berger supra; Schneider, Protein Expr. Purif. 6435: 10 (1995); Sambrook; Tijssen; Ausubel. La información del producto de los fabricantes de reactivos biológicos y de equipo experimental también suministran información con respecto a métodos biológicos conocidos. Los vectores pueden ser aislados a partir de fuentes naturales, obtenidos de dichas fuentes como librerías ATCC o de GenBank, o preparadas por métodos sintéticos o recombinantes.

Los ácidos nucleicos pueden ser expresados usando casetes de expresión, vectores o virus que son expresados establemente o transitoriamente en células (por ejemplo, sistemas expresión episomal). La selección de marcadores puede ser incorporada en casetes de expresión y vectores para conferir un fenotipo seleccionable sobre células y secuencias transformadas. Por ejemplo, los marcadores de selección pueden codificar en el mantenimiento episomal y la replicación tal que la integración en el genoma del anfitrión no sea requerida. Por ejemplo, el marcador puede codificar la resistencia antibiótica (por ejemplo, cloranfenicol, canamicina, G418, blasticidina, higromicina) o resistencia a herbicida (por ejemplo, clorosulfuron o Basta) para permitir la selección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (ver, ejemplo Blondelet-

Rouault, Gene 190: 315-317. 1997); Aubrecht, J. Pharmacol. Exp. Ther. 281: 992-997 (1997)).

Debido a que los genes marcadores seleccionables que contiene resistencia a sustratos tales como neomicina o higromicina puede ser solamente utilizado en cultivos de tejido, genes de quimioresistencia y también usados como marcadores seleccionable in vitro e in vivo.

Una secuencia de ácido nucleico quimérica puede codificar un dominio de unión de ligando de T1R dentro de cualquier polipéptido de transmembrana 7. Debido a que los polipéptidos del receptor 7-transmembrana tienen secuencias principales similares y estructuras secundarias y terciarias, dominios estructurales (por ejemplo, dominio extracelular, dominios TM, dominio citoplásmico, etc.) pueden ser identificadas fácilmente por análisis de secuencia. Por ejemplo, el modelado de homología, el análisis de Fourier y la detección de periodicidad helicoidal pueden identificar y caracterizar los siete dominios con una secuencia de receptor 7-transmembrana. Los algoritmos de la transformación de Fourier rápida (FFT) pueden ser usados para obtener los períodos dominantes que caracterizan los perfiles de la hidrofobicidad y de la variabilidad de las secuencias analizadas. La detección de periodicidad y el mejoramiento y el índice de periodicidad alfa helicoidal pueden ser hechos como por ejemplo, Donnelly, Protein Sci. 2: 55-70 (1993). Otros algoritmos de alineación y modelado son bien conocidos en la técnica, ver por ejemplo, Peitsch, Receptors Channels 4: 161-164 (1996); Kyte & Doolittle, J. Med. Bio., 157: 105-132 (1982); Cronet, Protein Eng. 6: 59-64 (1993).

La presente invención también incluye no solamente el ADN y las proteínas que tienen las secuencias de aminoácidos y nucleicas especificadas, sino también

fragmentos de ADN particularmente, fragmentos de, por ejemplo, 40, 60, 80, 100, 150, 200, o 250 nucleótidos o más, lo mismo que fragmentos de proteínas de, por ejemplo, 10, 20, 30, 50, 70, 100, o 150 aminoácidos o más. Opcionalmente, los fragmentos de ácido nucleico pueden codificar un polipéptido antigénico, que es capaz de ligarse a un anticuerpo surgido contra un miembro de la familia T1R. Adicionalmente, un fragmento de proteína de la invención puede ser opcionalmente un fragmento antigénico, que es capaz de ligarse a un anticuerpo surgido contra un miembro de la familia T1R.

También se contemplan proteínas quiméricas, que comprenden por lo menos 10, 20, 30, 50, 70, 100, o 150 aminoácidos, o más, o uno de por lo menos uno de los polipéptidos de T1R descritos aquí, acoplados a aminoácidos adicionales que representan todo o parte de otro GPCR, preferiblemente un miembro de la superfamilia de 7 transmembranas. Estas quimeras pueden ser hechas a partir de receptores instantáneos y otros GPCR, o ellas pueden ser hechas combinando dos o más de los receptores T1R presentes. En una modalidad, una porción de la quimera corresponde a, o se deriva del dominio extracelular de un polipéptido T1R de la invención. En otra modalidad, una porción de la quimera corresponde a, o se deriva del dominio extracelular y uno o más de los dominios de transmembrana de un polipéptido de T1R descrito aquí, y el resto de la porción o porciones puede venir de otro GPCR. Los receptores quiméricos son bien conocidos en la técnica, y las técnicas para crearlos y la selección y límites de dominios o fragmentos de receptores acoplados a proteína G para la incorporación allí también son bien conocidos. Por lo tanto, este conocimiento de aquellos versados en la técnica puede ser fácilmente usado para crear tales receptores quiméricos. El uso de tales receptores quiméricos puede suministrar, por ejemplo, una característica de selectividad de gusto de uno de los receptores específicamente descritos aquí,

acoplado con las características de la señal de traducción de otro receptor, tal como el receptor bien conocido usado en sistemas de ensayo del estado de la técnica.

Como se anotó anteriormente, tales quimeras, análogos al receptor T1R nativo, o la combinación o asociación del receptor T1R nativo ligará a y/o será activado por moléculas que afectan normalmente el gusto al dulce o gusto al umami. Los receptores funcionales T1R quiméricos o las combinaciones de receptores son moléculas que cuando se expresan solas o en combinación con otros T1R u otros GPCR (que pueden ellos mismos ser quiméricos) se ligan a, o son activados por el estímulo del gusto, particularmente el dulce (T1R2/3) o el estímulo al gusto umami (T1R1/3). Las moléculas que dividen el gusto del dulce incluyen endulzantes naturales y artificiales tales como sucrosa, aspartamo, xilitol, ciclamato, etc. Moléculas que dividen el gusto umami incluyen el glutamato y análogos de glutamato y otros componentes que ligan al T1R1 nativo y/o al T1R3, tales como 5'-nucleótidos

Por ejemplo, un dominio tal como un dominio de unión de ligando, un dominio extracelular, un dominio de transmembrana, un dominio de transmembrana, un dominio citoplásmico, un dominio N-terminal, un dominio C-terminal, o cualquier combinación de ellos, puede ser ligado covalentemente a una proteína heteróloga, por ejemplo, un dominio extracelular de T1R puede ser ligado a un dominio de transmembrana GPCR heterólogo, o un dominio extracelular GPCR puede ser ligado a un dominio de transmembrana T1R. Otras proteínas heterólogas de escogencia pueden ser usadas, por ejemplo, proteína fluorescente verde.

También dentro del alcance de la invención están las células anfitrionas para la expresión de los fragmentos T1R, las quimeras y variantes de la invención. Para obtener altos niveles de expresión de un gen clonado o un ácido nucleico, tales como los cADN que codifican el T1R, fragmentos, o variantes de la invención, una persona versada en la técnica típicamente subclona la secuencia de ácido nucleico de interés en un vector de expresión que contiene un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un terminador de transcripción/traducción, y para el ácido nucleico que codifica una proteína, un sitio de ligado de ribosoma para la iniciación translacional. Los promotores bacteriales adecuados son bien conocidos en la técnica y descritos, por ejemplo, en Sambrook et al. Sin embargo, sistemas de expresión bacteriana o eucariótica pueden ser usados.

Cualquiera de los procedimientos bien conocidos para introducir secuencias de nucleótidos extrañas en células anfitrionas pueden ser usadas. Estos incluyen el uso de transfección calcio fosfato, molibdeno, fusión de protoplasto, electroporación, liposomas, microinyección, vectores de plasma, vectores virales y cualesquier otros métodos bien conocidos para introducir ADN genómico clonado, cADN, ADN sintético u otro material genético extraño dentro de la célula anfitriona (ver por ejemplo, Sambrook et al.). Solamente es necesario que el procedimiento de ingeniería genética particular usado sea capaz de introducir exitosamente por lo menos una molécula de ácido nucleico dentro de una célula anfitriona capaz de expresar el T1R, fragmento o variante de interés.

Después de que el vector de expresión es introducido dentro de las células, las células transfectadas son cultivadas bajo condiciones que favorezcan la expresión del receptor, o fragmento o variante de interés, el cual es entonces recuperado del cultivo usando técnicas estándar. Ejemplos de tales técnicas son bien conocidas

en la técnica. Ver por ejemplo, WO 00/06593, que es incorporada como referencia en una manera consistente con esta descripción.

Detección de polipéptidos T1R

En adición a la detección de genes de expresión T1R de gen usando tecnología de hibridación de ácido nucleico, uno puede también usar inmunoensayos para detectar los T1R, por ejemplo, para identificar las células receptoras del gusto, y variantes de los miembros de la familia T1R. Los inmunoensayos pueden ser usados para analizar cualitativa o cuantitativamente los T1R. Una vista general de la tecnología aplicable se puede encontrar en Harlow&Lane, *Antibodies A Laboratory Manual* (1988).

1. Anticuerpos para los miembros de la familia T1R

Los métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionen específicamente con un miembro de la familia T1R son conocidos por aquellos versados en la técnica (ver, por ejemplo, Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow & Lane, *supra*; Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2d ed. 1986); y Kohler & Milstein, *Nature*, 256: 495-497 (1975)). Tales técnicas incluyen la preparación de anticuerpos por medio de selección de los anticuerpos de librerías de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, lo mismo que la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales por medio de inmunizar conejos o ratones (ver, por ejemplo, Huse et al., *Science*, 246: 1275-1281 (1989); Ward et al., *Nature*, 341: 544-546 (1989)).

Un número de inmunógenos comprendidos en el T1R- pueden ser usados para producir anticuerpos específicamente reactivos con un miembro de la familia T1R. Por ejemplo, un polipéptido de T1R recombinante o un fragmento antigénico del mismo puede ser aislado como se describe aquí. Las regiones antigénicas adecuadas incluyen, por ejemplo, las secuencias de consenso que son usadas para identificar los miembros de la familia de T1R. Las proteínas recombinantes pueden ser expresadas en células eucarióticas o procarióticas como se describe anteriormente, y purificadas como se describe generalmente anteriormente. La proteína recombinante es el inmunógeno preferido para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales. Alternativamente, por ejemplo, un péptido sintético derivado de las secuencias descritas aquí y conjugado a una proteína portadora pueden ser usadas como inmunógeno. La proteína de ocurrencia natural también puede ser usada en forma pura o impura. El producto entonces se inyecta dentro de un animal capaz de producir anticuerpos. Cualquiera de los anticuerpos monoclonales o policlonales pueden ser generados, para su uso subsecuente en inmunoensayos para medir la proteína.

Los métodos de producción de anticuerpos policlonales son conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, una cepa consanguínea de ratón (por ejemplo, el ratón BALB/C) o de conejos se inmuniza con la proteína usando un ayudante estándar tal como el ayudante de Freund, y un protocolo de inmunización estándar. La respuesta inmune del animal a la preparación del inmunógeno es monitoreada por medio de ensayos de sangre y se determina el título de reactividad para el T1R. Cuando los títulos apropiadamente altos del anticuerpo al inmunógeno son obtenidos, la sangre es recolectada del animal y se prepara el antisuero. El fraccionamiento adicional del antisuero para enriquecer la

reacción de anticuerpos a la proteína puede ser hecho si se desea (ver Harlow & Lane, *supra*).

Los anticuerpos monoclonales pueden ser obtenidos por diversas técnicas familiares para aquellos versados en la técnica. Brevemente, células de unión de un animal inmunizado con un antígeno deseado puede ser immortalizadas comúnmente por fusión con una célula de mieloma (ver Kohler & Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6: 511-519 (1976)). Métodos alternativos de immortalización incluyen la transformación con el virus de Epstein Barr, oncogenes, o retrovirus u otros métodos bien conocidos en la técnica. Las colonias que surgen de células únicas immortalizadas son tamizadas o escogidas para la producción de anticuerpos de la especificidad y afinidad deseadas para el antígeno, y que llevan y producen los anticuerpos monoclonales por tales células que pueden ser mejoradas por diversas técnicas, incluyendo inyección de la cavidad peritoneal de un anfitrión vertebrado. Alternativamente, uno puede aislar las secuencias de ADN que codifican un anticuerpo monoclonal o un fragmento de ligado del mismo por medio de tamizar una librería de ADN de células B humanas de acuerdo con el protocolo general plasmado por Huse et al., *Science*, 246: 1275-1281 (1989).

Los anticuerpos y monoclonales y el suero policlonal son recolectados y titulados contra la proteína de inmunogen en un inmunoensayo, por ejemplo, en un inmunoensayo de fase sólida con el inmunogen inmovilizado sobre un soporte sólido. Típicamente, el antisuero policlonal con un título de 10^4 o mayor es seleccionado y ensayado en cuanto a su reactividad cruzada contra polipéptidos no-TIR, o aún otros miembros de la familia del T1R u otras proteínas relacionadas de otros organismos, usando un inmunoensayo de ligado competitivo. El antisuero policlonal específico y los anticuerpos monoclonales se ligaran usualmente con un

Kd de por lo menos cerca de 0,1 mM, o más usualmente por lo menos cerca de 1 pM, opcionalmente por lo menos cerca de 0,1 pM o mejor, y opcionalmente 0,01 pM o mejor. Una vez los anticuerpos específicos para miembros de la familia de T1R están disponibles, las proteínas y fragmentos individuales de T1R pueden ser detectados por una variedad de métodos inmunoensayo. Para una revisión de los procedimientos inmunológicos y de inmunoensayo, ver Basic and Clinical Immunology (Stites y Terr eds., séptima ed. 1991). Más aún, los inmunoensayos de la presente invención pueden ser llevados a cabo en cualquiera de diversas configuraciones, que son revisadas extensivamente en inmunoensayo de enzima (Maggio. Ed., 1980); y Hardlow & Lane supra.

2. Ensayos de ligado inmunológico

Las proteínas, fragmentos y variantes de T1R pueden ser detectadas y/o cuantificadas usando cualquiera de un número de ensayo inmunológico bien reconocido ((ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses No. 4,366,241; 4,376,110; 4,517,288; y 4,837, 168). Para una revisión de los inmunoensayos generales, ver también Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology, volume 37 (Asai, ed. 1993); Basic and Clinical Immunology (Stites & Terr, ediciones séptima ed. 1991) los ensayos de ligado inmunológico (o inmunoensayos) usan típicamente un anticuerpo que se liga específicamente a una proteína o antígeno de escogencia (en este caso un miembro de la familia T1R o una subsecuencia antigénica del mismo). El anticuerpo (por ejemplo, anti-T1R) puede ser producido por cualquiera de un número de medios bien conocidos por aquellos versados en la técnica y como se describe anteriormente.

Los inmunoensayos usan también frecuentemente un agente de etiquetado para ligar específicamente a, y etiquetar el complejo formado por el anticuerpo y el antígeno. El agente de etiquetado puede en sí mismo ser una de las partes que comprenden el complejo anticuerpo/antígeno. Así, el agente de etiquetado puede ser un polipéptido de T1R etiquetado o un anticuerpo anti-T1R etiquetado. Alternativamente, el agente de etiquetado puede ser una tercera parte, tal como un anticuerpo secundario que se liga específicamente al complejo de anticuerpo/T1R (un anticuerpo secundario es típicamente específico a los anticuerpos de la especie de la cual el primer anticuerpo se deriva). Otras proteínas capaces de ligar específicamente regiones constantes de inmunoglobulina, tales como proteína A o proteína G también pueden ser usados como agentes de etiquetado. Estas proteínas exhiben una fuerte reactividad no-inmunogénica con las regiones constantes de inmunoglobulina a partir de una variedad de especies (ver, por ejemplo, Kronval et al., J. Immunol., 111: 1401-1406 (1973); Akerstrom et al., J. Immunol., 135: 2589-2542 (1985)). El agente de etiquetado puede ser modificado con una parte detectable, tal como la biotina, a la cual otra molécula puede ligarse específicamente, tal como la estreptavidina. Una variedad de partes detectables son bien conocidas por aquellos versados en la técnica.

Por medio de los ensayos, incubación y/o etapas de lavado pueden ser requeridas después de cada combinación de reactivos. Las etapas de incubación pueden variar entre cerca de 5 segundos a varias horas, opcionalmente entre cerca de 5 minutos a cerca de 24 horas. Sin embargo, el tiempo de incubación dependerá del formato de ensayo, el antígeno, el volumen de la solución, las concentraciones, y similares. Usualmente, los ensayos se llevarán acabo a temperatura ambiente,

aunque ellos también pueden ser conducidos dentro de un rango de temperatura, tal como 10°C a 40°C.

A. Formatos de ensayo no competitivo

Los inmunoensayos para detectar un polipéptido T1R en una muestra pueden ser competitivos o no competitivos. Los inmunoensayos no competitivos son ensayos en los cuales la cantidad de antígeno es medida directamente. En un ensayo "de sándwich" preferido, por ejemplo, los anticuerpos anti-T1R pueden ser ligados directamente a un sustrato sólido sobre el cual ellos son inmovilizados. Estos anticuerpos inmovilizados entonces capturan al polipéptido de T1R presente en la muestra de ensayo. El polipéptido de T1R es entonces inmovilizado y luego ligado por un agente de etiquetado, tal como un segundo anticuerpo de T1R que lleva una etiqueta. Alternativamente, el segundo anticuerpo puede carecer de una etiqueta pero puede a su vez, ser ligado por un tercer anticuerpo etiquetado específico para anticuerpos de las especies de las cuales el segundo anticuerpo se ha derivado. El segundo o tercer anticuerpo es modificado típicamente con una parte detectable tal como biotina, a la cual otra molécula se liga específicamente, por ejemplo, estreptavidina, para suministrar una parte detectable.

B. Formato de ensayo competitivo

En los ensayos competitivos, la cantidad de polipéptido de T1R presente en la muestra es medida indirectamente por medio de medir la cantidad de un polipéptido de T1R agregado conocido (exógeno), desplazado (por competencia) de un anticuerpo anti-T1R por el polipéptido de T1R desconocido presente en una muestra. En un ensayo competitivo, una cantidad conocida del polipéptido de T1R

se agrega a una muestra y la muestra es entonces puesta en contacto con un anticuerpo que se liga específicamente al T1R. La cantidad de polipéptido de T1R exógeno ligado al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración del polipéptido de T1R presente en la muestra. En una modalidad particularmente preferida, el anticuerpo es inmovilizado sobre un sustrato sólido. La cantidad del polipéptido T1R ligado al anticuerpo puede ser determinado sea por medio de medir la cantidad de polipéptido de T1R presente en un complejo de T1R/anticuerpo, o alternativamente por medio de medir la cantidad de la proteína no complejada restante. La cantidad de polipéptido de T1R puede ser detectada por medio de suministrar una molécula de T1R etiquetada.

Un ensayo de inhibición de hapteno es otro ensayo competitivo preferido. En este ensayo el polipéptido de T1R conocido es inmovilizado sobre un sustrato sólido. Una cantidad conocida de anticuerpo anti-T1R se agrega a la muestra, y la muestra es entonces puesta en contacto con el T1R inmovilizado. La cantidad de anticuerpo anti-T1R ligado al polipéptido T1R inmovilizado conocido es inversamente proporcional a la cantidad del polipéptido de T1R presente en la muestra. Nuevamente, la cantidad de anticuerpo inmovilizado puede ser detectada por medio de detectarse sea la fracción inmovilizada del anticuerpo o la fracción del anticuerpo que queda en la solución. La detección puede ser directa en donde el anticuerpo es etiquetado, o indirecta por la adición subsecuente de una parte etiquetada que se liga específicamente al anticuerpo como se describe anteriormente.

C. Determinaciones de actividad cruzada

Los inmunoensayos en el formato de ligado competitivo pueden también ser usados para las determinaciones de reactividad cruzada. Por ejemplo, una proteína es por lo menos parcialmente codificada por las secuencias de ácido nucleico descritas aquí, puede ser inmovilizada en un soporte sólido. Las proteínas (por ejemplo, polipéptidos y homólogos de T1R) son agregadas al ensayo que compite en cuanto al ligado del antisuero al antígeno inmovilizado, la habilidad de las proteínas agregadas para competir en cuanto al ligado del antisuero con respecto a las proteínas inmovilizadas es comparado a la habilidad del polipéptido de T1R codificado por las secuencias de ácido nucleico descritas aquí para competir con el mismo. El porcentaje de reactividad cruzada para las proteínas anteriores es calculado, usando cálculos estándar. Aquellos antisueros con menos de 10% de reactividad cruzada con cada una de las proteínas agregadas listadas anteriormente son seleccionados y agrupados. Los anticuerpos de reacción cruzada son removidos opcionalmente del antisuero agrupado por inmunoabsorción con las proteínas agregadas consideradas, por ejemplo, homólogos relacionados distantemente. En adición, los péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos que representan motivos conservados que son usados para identificar miembros de la familia de T1R pueden ser usados en determinaciones de reactividad cruzada.

El antisuero inmunoabsorbido y agrupado es entonces usado en un inmunoensayo de ligado competitivo como se describe anteriormente para comparar una segunda proteína, pensando que sea quizás un alelo o una variante polimórfica de un miembro de la familia T1R, a un con respecto a una proteína de inmunogen (es decir el polipéptido T1R codificado por las secuencias de ácido nucleico descritas aquí). Para poder hacer esta comparación las dos proteínas son cada una ensayadas en un rango amplio de concentraciones y la cantidad de cada proteína

para inhibir 50% del ligado del antisuero a la proteína inmovilizada se determina. Si la cantidad de la segunda proteína requerida para inhibir el 50% del ligado es menos de 10 veces la cantidad de la proteína codificada por las secuencias de ácido nucleico descritas aquí, requeridas para inhibir el 50% del ligado, entonces la segunda proteína se dice que liga específicamente a los anticuerpos policlonales generados para un inmunogen de T1R:

Los anticuerpos surgidos contra el T1R conservaron motivos que también pueden ser usados para preparar anticuerpos que se ligan específicamente solo al GPCR de la familia de T1R, pero no al GPCR de otras familias.

Los anticuerpos policlonales que se ligan específicamente a un miembro particular de la familia de T1R pueden ser hechos por medio de sustraer fuera los anticuerpos de reacción cruzada usando otros miembros de la familia T1R. Los anticuerpos policlonales específicos a especies que pueden ser hechos de una manera similar. Por ejemplo, los anticuerpos específicos al T1R humano pueden ser hechos por medio de sustraer o retirar los anticuerpos que son de reacción cruzada con secuencias ortólogas, por ejemplo, el T1R de rata o el T1R de ratón.

D. Otros formatos de ensayo

El análisis Western blot (inmunoblot) es usado para detectar y cuantificar la presencia de polipéptidos de T1R en la muestra. La técnica generalmente comprende separar proteínas de la muestra por electroforesis de gel sobre la base de peso molecular transfiriendo las proteínas separadas a un soporte sólido adecuado (tal como un filtro de microcelulosa, un filtro de nylon, o un filtro de nylon derivado), e incubar la muestra con los anticuerpos que se ligan específicamente

al polipéptido T1R. Los anticuerpos anti-T1R del polipéptido se ligan específicamente al polipéptido de T1R sobre un soporte sólido. Estos anticuerpos pueden ser etiquetados o marcados directamente o alternativamente pueden ser detectados subsecuentemente usando anticuerpos marcados o etiquetados (por ejemplo, anticuerpos marcados anti-ratón de oveja) que se ligan específicamente a los anticuerpos anti-T1R.

Otros, formatos de ensayo incluyen los inmunoensayos de liposoma (LIA), que usan liposomas diseñados para ligarse específicamente a moléculas (por ejemplo, anticuerpos) y liberan reactivos o marcadores encapsulados. Los químicos liberados son entonces detectados de acuerdo a técnicas estándar (ver Monroe et al., Amer. Clin. Prod. Rev., 5: 34-41 (1986)).

E. Reducción de ligado no específico

Una persona versada en la técnica podrá apreciar que es frecuentemente deseable minimizar el ligado no específico en inmunoensayos. Particularmente, en donde el ensayo involucra un antígeno o un anticuerpo inmovilizado sobre un sustrato sólido es deseable minimizar la cantidad de ligado no específico al sustrato. Medios para reducir tal ligado no específico son bien conocidos por aquellos versados en la técnica. Típicamente, esta técnica involucra el recubrimiento del sustrato con una composición proteinasea. En particular, las composiciones de proteína tales como albúmina de suero bovino (BSA), leche en polvo descremada, y gelatina son ampliamente usadas con leche, siendo la leche en polvo la más preferida.

F. Etiquetas

La etiqueta particular o grupo detectable usado en el ensayo no es un aspecto crítico de la invención, siempre que este no interfiera significativamente con el ligado específico del anticuerpo usado en el ensayo. El grupo detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Tales etiquetas detectables han sido bien desarrolladas en el campo de los inmunoensayos y, en general, la mayoría de cualquier etiqueta útil en tales métodos puede ser aplicada en la presente invención. Así, una etiqueta es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, de inmunoquímica, eléctrica, óptica, o químico. Las etiquetas útiles en la presente invención incluyen granos magnéticos (por ejemplo, DYNABEAD^{STM}), tintes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina, y similares), radioetiquetas (por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{14}C , ^{35}S), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatos alcalinos y otros comúnmente usados en un ELISA), y etiquetas colorimétricas tales como oro coloidal o vidrio coloreado bolitas plásticas (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

La etiqueta puede ser acoplada directa o indirectamente al componente deseado del ensayo de acuerdo con los métodos bien conocidos en la técnica. Como se indicó anteriormente, una amplia variedad de etiquetas puede ser usada, con la escogencia de la etiqueta dependiendo de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con el compuesto, los requerimientos de estabilidad, la instrumentación disponible, y las provisiones de disposición.

Etiquetas no radiactivas son fijadas frecuentemente por medios indirectos. Generalmente, una molécula de ligando (por ejemplo, biotina) es ligada covalentemente a la molécula. El ligando entonces se liga a otras moléculas (por

ejemplo, estreptavidina) la cual es detectable sea inherentemente o ligada covalentemente a un sistema de señal, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente. Los ligandos y sus objetivos pueden ser usados en cualquier combinación adecuada con anticuerpos que reconocen un polipéptido de T1R o anticuerpos secundarios que reconocen el anti-T1R.

Las moléculas también pueden ser conjugadas directamente a compuestos que generan señal, por ejemplo, por conjugación con una enzima o fluorofora. Las enzimas de interés como etiquetas son principalmente hidrolasas, particularmente fosfatasas, esterasas y glucosilasas, u oxidotasas particularmente peroxidasas. Los compuestos fluorescentes incluyen la fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansila, umbeliferola, etc. Los compuestos quimioluminiscentes incluyen la luciferina, y 2,3-dihidroftalazinedinonas, por ejemplo, luminol. Para una revisión de diversos sistemas de etiquetado o productores de señal que pueden ser usados, ver la patente estadounidense No. 4,391,904.

Los medios para detectar etiquetas son bien conocidos por aquellos versados en la técnica. Así, por ejemplo, en donde la etiqueta es una etiqueta radioactiva, los medios para la detección incluyen un contador de cintilación o película fotográfica como una autoradiografía. En donde la etiqueta es una etiqueta fluorescente, esta puede ser detectada por medio de excitar el fluorocromo con la longitud de onda de luz apropiada y detectar la fluorescencia resultante. La fluorescencia puede ser detectada visualmente, por medios de película fotográfica, por el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos acoplados en carga (CCD) o fotomultiplicadores y similares. Similarmente, las etiquetas enzimáticas pueden ser detectadas por medio de suministrar los sustratos apropiados para la enzima y

detectar el producto de reacción resultante. Finalmente las etiquetas colorimétricas pueden ser detectadas simplemente observando el color asociado con la etiqueta. Así, en diversos ensayos de varilla aforadora, el oro conjugado frecuentemente aparece rosado, mientras que diversas bolitas conjugadas aparecen igual al color de la bolita.

Algunos formatos de ensayo no requieren el uso de componentes etiquetados. Por ejemplo, los ensayos de aglutinación pueden ser usados para detectar la presencia de anticuerpos objetivo. En este caso, las partículas recubiertas de antígeno son aglutinadas por muestras que comprenden el anticuerpo objetivo. En este formato, ninguno de los componentes requiere ser etiquetado o marcado y la presencia del anticuerpo objetivo es detectada por simple inspección visual.

Detección de moduladores

Las composiciones y métodos para determinar si un compuesto de ensayo se liga específicamente a un receptor de T1R de la invención, tanto in vitro como in vivo, son descritos enseguida. Muchos aspectos de la fisiología de la célula pueden ser monitoreados para lograr u obtener el efecto de unión de ligando a un polipéptido de T1R de la invención. Estos ensayos pueden ser llevados a cabo sobre células intactas que expresan un receptor quimiosensorial, sobre células permeabilizadas, sobre fracciones de membrana producidas por métodos estándar o in vitro de nuevas proteínas sintetizadas.

In vivo, los receptores del gusto ligan los gustantes e inician la traducción de los estímulos químicos en señales eléctricas. Una proteína G activada o inhibida a su vez alterará las propiedades de las enzimas, canales y otras proteínas efectoras

objetivo. Algunos ejemplos son la activación de la fosfodiesterasa cGMP por traducción en el sistema visual, la ciclase de adenilato por la estimulación de la proteína G, la fosfolipasa C por Gq y otro contacto de proteínas G, y la modulación por diversos canales de proteínas G y otras proteínas G. las consecuencias más adelante también pueden ser examinadas tales como la generación de diacil glicerol e IP3 por la fosfolipasa C, y a su vez, por la movilización del calcio IP3.

Las proteínas de T1R o polipéptidos del ensayo preferiblemente serán seleccionados a partir del polipéptido que tiene la secuencia del polipéptido T1R seleccionada de aquellas en el ejemplo 1, o fragmentos o variantes modificadas conservadoramente del mismo. Opcionalmente, los fragmentos y variantes pueden ser fragmentos antigénicos, y variantes antigénicas que ligan a un anticuerpo anti-T1R. Opcionalmente, los fragmentos y variantes pueden ligarse o estar activados por endulzantes o gustantes umami.

Alternativamente, las proteínas o polipéptidos de T1R del ensayo pueden ser derivados de una célula anfitriona eucariótica y pueden incluir una subsecuencia de aminoácido que tengan la identidad de secuencia aminoácido a los polipéptidos T1R descritos en el ejemplo 1, o fragmentos o variantes conservadoramente modificadas del mismo. Generalmente, la identidad de la secuencia de aminoácido será de por lo menos 35 a 50% u opcionalmente 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%. Opcionalmente las proteínas o polipéptidos del T1R de los ensayos pueden comprender un dominio de una proteína T1R, tal como un dominio extracelular, una región de transmembrana, un dominio de transmembrana, dominios citoplásmico, dominio de unión de ligando y similares. Adicionalmente, como se describe anteriormente, la proteína de T1R o el dominio

de la misma puede ser ligado covalentemente a una proteína heteróloga para crear una proteína quimérica usada en los ensayos descritos aquí.

Los moduladores de la actividad del receptor de T1R son ensayados usando proteínas T1R o polipéptidos de T1RT como se describe anteriormente, sea recombinantes o de ocurrencia natural. Las proteínas o polipéptidos del T1R pueden ser aisladas, coexpresadas en una célula, coexpresadas en una membrana derivada de una célula, coexpresadas en un tejido o en un animal, sea recombinantemente o por ocurrencia natural. Por ejemplo, tajada de lengua, células disociadas de una lengua, células transformadas, o membranas pueden ser usadas. La modulación puede ser ensayada usando uno de los ensayos in vitro o in vivo descritos aquí.

Por ejemplo, como se describe en los ejemplos del experimento infra, se ha descubierto que ciertos nucleótidos 5', por ejemplo, 5' IMP o 5' GMP, promueven la actividad del L-glutamato para activar el receptor del gusto del umami, o bloquea la activación del receptor del gusto umami por el estímulo del gusto umami tal como L-glutamato y L-aspartato.

1. Ensayos de ligado in vitro

La transducción del gusto también puede ser examinada in vitro con reacciones solubles o de estado sólido, usando los polipéptidos T1R de la invención. En una modalidad particular, los dominios unión de ligando del T1R pueden ser usados in vitro en reacciones solubles o de estado sólido para ensayar en cuanto a ligar ligandos. Por ejemplo, el dominio del terminal N del T1R está predicho que se involucra en unir ligandos. Más particularmente, los T1R pertenecen a una

subfamilia GPCR que está caracterizada por segmentos de N-terminal extracelulares grandes, de aproximadamente 600 aminoácidos. Estos segmentos de N-terminal se piensa que forman los dominios ligando, ligado, y por lo tanto son útiles en ensayo de bioquímica para identificar agonistas y antagonistas del T1R. Es posible que el dominio unión de ligando pueda ser formado por porciones adicionales del dominio extracelular, tales como los lazos extracelulares del dominio transmembrana. Los ensayos de ligado in vitro han sido usados con otros GPCR que están relacionan a los T1R, tales como los receptores metabotrópicos del glutamato (ver, ejemplo Han y Hampson, J. Biol. Chem. 274: 10008-10013 (1999)). Estos ensayos pueden involucrar el desplazar un ligando etiquetado radioactiva o fluorescentemente, medir cambios en fluorescencia intrínseca o cambios en susceptibilidad proteolítica etc.

Unir el ligando a un complejo heteromultimérico de polipéptido T1R de la invención puede ser ensayado en solución, en una membrana bicapa, opcionalmente sujeta a una fase sólida, en una monocapa de lípido, o en ampollas. El ligado de un modulador puede ser ensayado usando por ejemplo, cambios en características espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice refractivo) hidrodinámica (por ejemplo, forma), cromatográfica, o propiedades de solubilidad.

[0207] En otra modalidad de la invención, un ensayo $GTP\gamma^{35}S$ puede ser usado. Como se describe anteriormente, luego de la activación de un GPCR, la subunidad de $G\alpha$ del complejo de proteína G es estimulada para intercambiar el enlace GDP por GTP. La estimulación mediada por el ligando de la actividad intercambio de proteína G puede ser medida en un ensayo bioquímico midiendo el ligado de $GTP\gamma^{35}S$ radiactivamente etiquetado ligado a la proteína G en la presencia de un ligando putativo. Típicamente, las membranas que contienen el

receptor quimiosensorial de interés se mezclan con un complejo de proteínas G. Los inhibidores potenciales y/o activadores potenciales de $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ son agregados al ensayo, y el ligado del $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ a la proteína G es medido. El ligado puede ser medido por la cuenta de cintilación líquida o por cualquier otro medio conocido en la técnica, incluyendo ensayos de proximidad de cintilación (SPA). En otros formatos de ensayos, el $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ marcado fluorescentemente puede ser utilizado.

2. Ensayo de fluorescencia por polarización

En otra modalidad, los ensayos basados en fluorescencia por polarización ("FP") puede ser usado para detectar y monitorear el ligado del ligando. La fluorescencia por polarización es una técnica de laboratorio versátil para medir el equilibrio del ligado, la hibridización de ácido nucleico, y la actividad enzimática. El ensayo de polarización de la fluorescencia es homogéneo en que ellos no requieren una etapa de separación tal como centrifugación, filtración, cromatografía, precipitación o electroforesis. Estos ensayos se hacen en tiempo real, directamente en solución y no requieren una fase de inmovilización. Los valores de polarización pueden ser medidos repetidamente y después de la adición de reactivos ya que medir la polarización es rápido y no destruye la muestra. Generalmente, esta técnica puede ser usada para medir los valores de polarización de los fluoróforos de niveles bajos picomolar a micromolar. Esta sección describe como la polarización de la fluorescencia puede ser usada de una manera simple y cuantitativa para medir la unión de ligandos a los polipéptidos T1R de la invención.

Cuando una molécula etiquetada fluorescentemente es excitada con luz polarizada en un plano, este emite luz que tiene un grado de polarización que es

inversamente proporcional a su rotación molecular. Las moléculas grandes marcadas fluorescentemente permanecen relativamente estacionarias durante el estado excitado. (4 nanosegundos en el caso de la fluoresceína) y la polarización de la luz permanece relativamente constante entre la excitación y la emisión. Moléculas pequeñas etiquetadas fluorescentemente giran rápidamente durante el estado excitado y la polarización cambia significativamente entre excitación y emisión. Por lo tanto, las moléculas pequeñas tienen valores de polarización bajos y las moléculas grandes tienen valores de polarización altos. Por ejemplo, un oligonucleótido marcado con fluoresceína de cadena única tiene un valor de polarización pero cuando es hibridizado a una cadena complementaria, este tiene un valor de polarización más alto. Cuando se usa FP para detectar y monitorear el ligado del gustador que puede activar o inhibir los receptores quimiosensoriales de la invención, los gustadores marcados con fluorescencia o gustadores autofluorescentes pueden ser usados.

La polarización de fluorescencia (P) se define como:

$$P = \frac{Int_{\parallel} - Int_{\perp}}{Int_{\parallel} + Int_{\perp}}$$

En donde $\parallel$ es la intensidad de la emisión paralela de luz al plano de luz de excitación e $Int_{\perp}$ es la intensidad de la emisión perpendicular de luz al plano de luz de excitación. P, es una proporción de intensidades de luz, y por lo tanto es un número sin dimensión. Por ejemplo, el sistema Beacon® y Beacon 2000™ pueden ser usados en conexión con estos ensayos. Tales sistemas típicamente expresan la polarización en unidades de milipolarización (1 unidad de polarización = a 1,000 mil mP unidades).

La relación entre la rotación molecular y el tamaño se describe por la ecuación de Perrin y el lector se le hace referencia a Jolley, M.E. 1991) en Journal of Analytical Toxicology, pp. 236-240, que da una explicación general de esta ecuación. En resumen, la ecuación de Perrin establece que la polarización es directamente proporcional al tiempo de relajación rotacional, el tiempo que le toma a una molécula rotar en un ángulo de aproximadamente 68,5° tiempo de relajación Rotacional está relacionado con la viscosidad (η), temperatura absoluta (T), volumen molecular (Dispensadora), y la constante de gas (R) por la siguiente ecuación:

$$\text{Tiempo de relajación rotacional} = \frac{3\eta V}{RT}$$

El tiempo de relajación rotacional es pequeño (≈ 1 nanosegundo) para moléculas pequeñas (por ejemplo, fluoresceína) y grandes (≈ 100 nanosegundos) para moléculas grandes (por ejemplo, inmunoglobulina). Si la viscosidad y la temperatura se mantienen constantes, el tiempo de relajación rotacional, y por lo tanto la polarización esta directamente relacionado con el volumen molecular. Los cambios en volumen molecular pueden ser debidos a interacciones con otras moléculas, disociación, polimerización, degradación, hibridización, o cambios conformacionales de la molécula marcada fluorescentemente. Por ejemplo, la polarización de florescencia ha sido usada para medir la división enzimática de grandes polímeros marcados con fluoresceína por proteasas, DNasas, y RNasas. También se han usado para medir el equilibrio de ligado para interacciones proteína/proteína, anticuerpo/ligado de antígeno y ligado de proteína/ADN.

A. Ensayos de alto rendimiento de estado sólido y soluble

Todavía en otra modalidad la invención suministra ensayos solubles usando un complejo de polipéptido de T1R hetero-oligomérico; o una célula o tejido que co-expresa a los polipéptidos T1R. Preferiblemente, la célula comprenderá una línea celular que co-expresa de manera estable un receptor del gusto (umami) T1R/T1R3 funcional o un receptor de gusto (dulce) T1R/T1R3. En otra modalidad la invención suministra los ensayos in vitro con base en fase sólida en un formato de alto rendimiento, en donde los polipéptidos T1R, o las células o el tejido que expresa los polipéptidos T1R se sujetan a un sustrato de fase sólida o aún compuesto estimulante del gusto y se ponen en contacto con un receptor de T1R, y el ligado es detectado usando una etiqueta apropiada o anticuerpo surgido contra el receptor T1R.

En los ensayos de alto rendimiento de la invención, es posible visualizar hasta varios miles de moduladores o ligandos diferentes en un solo día. En particular, cada pozo de una placa microtítulo puede ser usado para correr un ensayo separado contra un modulador potencial seleccionado o, si los efectos del tiempo de concentración o incubación son observados, cada 5 a 10 pozos pueden ser ensayados para un único modulador. Así, una placa microtítulo estándar única puede ensayar cerca de 100 moduladores, (por ejemplo, 96). Si se usan 1,536 placas de pozo, entonces una placa única puede fácilmente ensayar entre 1,000 a cerca 1,500 diferentes compuestos. También es posible ensayar múltiples compuestos en cada pozo de placa. Es posible ensayar varias diferentes placas por día; los ensayos hacen visualizar hasta cerca de 6,000 a 20,000 compuestos diferentes es posible usando los sistemas integrados de la invención. Más recientemente, las enseñanzas microfluídicas para la manipulación de reactivos han sido desarrolladas. La molécula de interés puede ser ligada al componente de estado sólido, directa o indirectamente, vía enlaces covalentes o no covalentes,

por ejemplo, vía una etiqueta. La etiqueta puede ser cualquiera de una variedad de componentes. En general, una molécula que se liga a la etiqueta (un ligador de etiqueta) se fija aún soporte sólido, y la molécula etiquetada de interés (por ejemplo, la molécula de transducción del gusto de interés) se sujeta al soporte sólido por interacción de la etiqueta y del ligador de etiqueta.

Un número de etiquetas y ligadores de etiquetas pueden ser usados con base en interacciones moleculares conocidas bien descritas en la literatura, por ejemplo, en donde una etiqueta tiene un ligador natural, por ejemplo, biotina, proteína A, o proteína G, esta puede ser usada en conjunto con ligadores de etiqueta apropiados (avidina, estreptavidina, neutravidina, la región Fc de una inmunoglobulina, etc.). Los anticuerpos para las moléculas con ligadores naturales tales como biotina están ampliamente disponibles y los ligadores de etiqueta apropiados (ver, SIGMA Immunochemicals 1998 catalogue SIGMA, St Louis MO).

Similarmente, cualquier compuesto hapténico o antigénico puede ser usado en combinación con un anticuerpo apropiado para formar un par de etiqueta/ligador de etiqueta. Miles de anticuerpos están disponibles comercialmente y muchos anticuerpos adicionales están descritos en la literatura. Por ejemplo, en una configuración común, la etiqueta es un primer anticuerpo y el ligador de etiqueta es un segundo anticuerpo que reconoce al primer anticuerpo. En adición a las interacciones anticuerpo/antígeno, las interacciones receptor-ligando también son apropiadas como par etiqueta y ligador de etiqueta. Por ejemplo, agonistas y antagonistas de receptores de membrana celular (por ejemplo, interacciones celulares receptor-ligando tales como transferrina, c-kit, ligando de receptor viral, receptores de citoquina, receptores de quimiocina, receptores de interleucina, receptores de inmunoglobulina y anticuerpos, la familia de cadherine, la familia de

integrina, la familia de selectina, y similares; ver, por ejemplo, Pigott & Power, *The Adhesion Molecule Facts Book I* (1993)). Similarmente las toxinas y venenos, epítopes virales, hormonas, (por ejemplo, opiatos, esteroides, etc.), receptores intracelulares (por ejemplo, los que median el efecto de diversos ligandos pequeños, incluyendo esteroides, la hormona tiroidea, retinoides y la vitamina D; péptidos), drogas, lectinas, azúcares, ácidos nucleicos (tanto como configuraciones de polímero lineal y cíclico) oligosacaridos, proteínas, fosfolípidos y anticuerpos pueden todos interactuar con diversos receptores celulares.

Los polímeros sintéticos, tales como poliuretanos, poliésteres, policarbonatos, poliureas, poliamidas, polietileneiminas, sulfuros de poliarileno, polisiloxanos, poliimidas, y poliacetatos también pueden formar una etiqueta o ligador de etiqueta apropiado. Muchos de otros pares de etiqueta/ligador de etiqueta también son útiles en sistemas de ensayo descritos aquí, como será evidente para aquellos versados en la técnica luego de la revisión de esta descripción.

Los enlazadores comunes tales como péptidos, poliéteres, y similares también pueden servir como etiquetas, e incluyen secuencias de polipéptidos, tales como secuencias poli gli de entre cerca de 5 y 200 aminoácidos. Tales enlazadores flexibles son conocidos para las personas versadas en la técnica. Por ejemplo, (los enlazadores de poli (etilen glicol) están disponibles de Shearwater Polymers, Inc. Huntsville, Alabama. Estos enlazadores opcionales tienen enlaces de amida, enlaces de sulfidrido, o enlaces heterofuncionales.

Los ligadores de etiqueta están fijos a sustratos sólidos usando cualquiera de una variedad de métodos actualmente disponibles. Los sustratos sólidos son derivados comúnmente o funcionalizados por medio de la exposición de todos o de una

porción del sustrato a un reactivo químico el cual fija un grupo químico a una superficie que es reactiva con una porción del ligador de etiqueta. Por ejemplo, los grupos que son adecuados para sujetar a una porción de cadena larga incluirían las aminas, hidroxilos, tiol, y grupos carboxilo. Los aminoalquilsilanos y los hidroxialquilsilanos pueden ser usados para funcionalizar una variedad de superficies, tales como superficies de vidrio. El constitutivo de tales arreglos de biopolímero de fase sólida es bien descrito en la literatura. Ver por ejemplo, Merrifield, J; Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963) (que describen síntesis de fase sólida de, por ejemplo, péptidos); Geysen et al., J. Immun. Meth., 102: 259-274 (1987) (que describen la síntesis de componentes de fase sólida sobre pasadores); Frank & Doring, Tetrahedron, 44: 60316040 (1988) (que describen la síntesis de varias secuencias de péptidos sobre discos de celulosa); Fodor et al., Science, 251: 767-777 (1991); Sheldon et al., Clinical Chemistry, 39 (4): 718-719 (1993); y Kozal et al., Nature Medicine, 2 (7): 753759 (1996) (todos describen arreglos de biopolímeros fijados a sustratos sólidos). Las enseñanzas de no químicos para fijar los ligadores de etiqueta a sustratos incluyen otros métodos comunes tal como calor, reticulación por medio de radiación UV y similares.

3. Ensayos con base en células

En una modalidad preferida de tratamiento, una combinación de proteínas o polipéptidos de T1R son co-expresados transitorio o establemente en una célula eucariótica sea en formas no modificadas o como quiméricos, variantes o receptores truncados con o preferiblemente sin una secuencia chaperona heteróloga que facilitan suma duración y objetivado por medio de un trayecto secretorio. Tales polipéptidos de T1R pueden ser expresados en cualquier célula

eucariótica, tal como las células HEK-293. Preferiblemente, las células comprenden una proteína G funcional, por ejemplo, la $G\alpha_{15}$ o la proteína G quimérica previamente identificada, u otra proteína G que sea capaz de acoplar el receptor quimérico a un trayecto de señalización intracelular o a una proteína de señalización tal como una fosfolipasa C. también, preferiblemente una célula será producida la cual co-expresa de manera estable el T1R1/T1R3 o T1R2/T1R3, como tales células que han sido encontradas (como se muestra en los ejemplos experimentales) para exhibir respuestas mejoradas al estímulo del gusto (relación a las células que expresan de manera transitorio la misma combinación de T1R). La activación de receptores T1R en tales células puede ser detectado usando cualquier método estándar, tal como por medio de detección de cambios en el calcio intracelular por medio de detectar la fluorescencia dependiente de fluor-4 en la célula. Tal ensayo es la base de los hallazgos experimentales presentados en esta solicitud.

Los receptores GPCR activados frecuentemente son sustratos para cinasas que fosforilan la cola del terminal C del receptor (o posiblemente otros sitios también). Así, los activadores promocionaran la transferencia de ^{32}P desde el ATP radiomarcado al receptor, lo que puede ser ensayado con un contador de cintilización. La fosforilación de la cola del terminal C promoverá el ligado de proteínas similares a la arrestina e interferirá con el ligado de las proteínas G. para una revisión general de transducción de señal GPCR y métodos de ensayo de transducción de señal ver, por ejemplo, *Methods in Enzymology*, vols. 237 y 238 (1994) y volumen 96 (1983); Boume et al., *Nature*, 10: 349: 117-27 (1991); Bourne et al., *Nature*, 348: 125-32 (1990); Pitcher et al., *Annu. Rev. Biochem.*, 67: 653-92 (1998).

La modulación del T1R puede ser ensayada por medio de comparar la respuesta de los polipéptidos de T1R tratados con un modulador de T1R putativo frente a la respuesta de una muestra de control no tratada o una muestra que contiene un control "positivo" conocido. Tales moduladores de T1R putativos pueden incluir moléculas que inhiben o activan la actividad del polipéptido de T1R. En una modalidad, las muestras de control (no tratadas con activadores o inhibidores) se les asignan una actividad de T1R relativa con valor de 100. La inhibición de un polipéptido T1R se logra cuando el valor de actividad de T1R en relación al control está cerca del 90%, opcionalmente 50%, opcionalmente 25 a 0%. La activación de un polipéptido de T1R se logra cuando el valor de actividad de T1R en relación al control es de 110%, opcionalmente 150%, 200 a 500%, o 1,000 a 2,000%.

Los cambios en flujo de ión pueden ser logrados por medio de determinar cambios en la polarización iónica (es decir, potencial eléctrico) de la célula o membrana que expresa un polipéptido T1R. Un medio para determinar cambios en la polarización celular es por medio de medir cambios en la corriente (por lo tanto medir cambios en la polarización) con técnicas de fijación de voltaje y fijación de parche (ver, por ejemplo, el modo de "célula sujeta", el modo "adentro-afuera" y el modo de "célula completa", por ejemplo, Ackerman et al., *New Engl. J. Med.*, 336: 1575-1595 (1997)). las corrientes de las células complejas son determinadas convenientemente usando el estándar. Otros ensayos conocidos incluyen: ensayos de flujo de iones radiomarcados y ensayos de fluorescencia usando tintas sensibles al voltaje (ver, por ejemplo, Vestergaard-Bogind et al., *J. Membrane Biol.*, 88: 67-75 (1988); Gonzales & Tsien, *Chem. Biol.*, 4: 269-277 (1997); Daniel et al., *J. Pharmacol. Meth.*, 25: 185-193 (1991); Holevinsky et al., *J. Membrane Biology*, 137: 59-70 (1994)).

FIGURA 1: Catálogo de TIR humano y derata

[illegible]

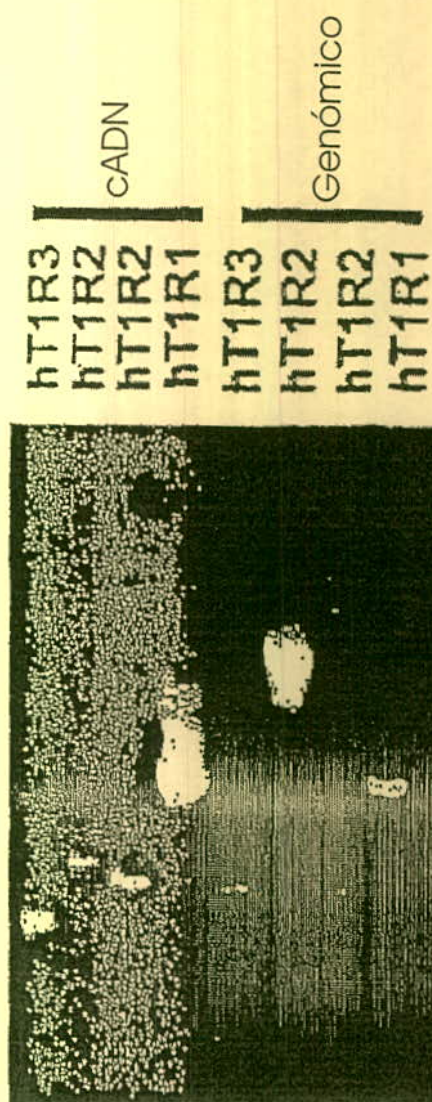


Figura 2. hT1R2 y hT1R3 se expresan en epitelio de lengua humana. Los productos de amplificación de cADN específico se pueden amplificar del cADN preparado desde la papila circunvalar humana resecada.

Figura 3. Funciones T1R2/T1R3 como un receptor de sabor dulce

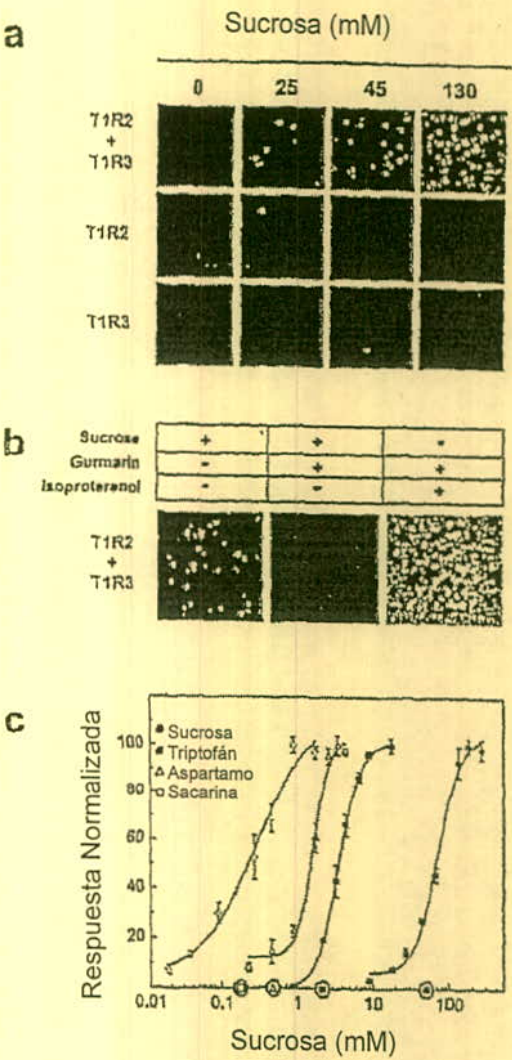
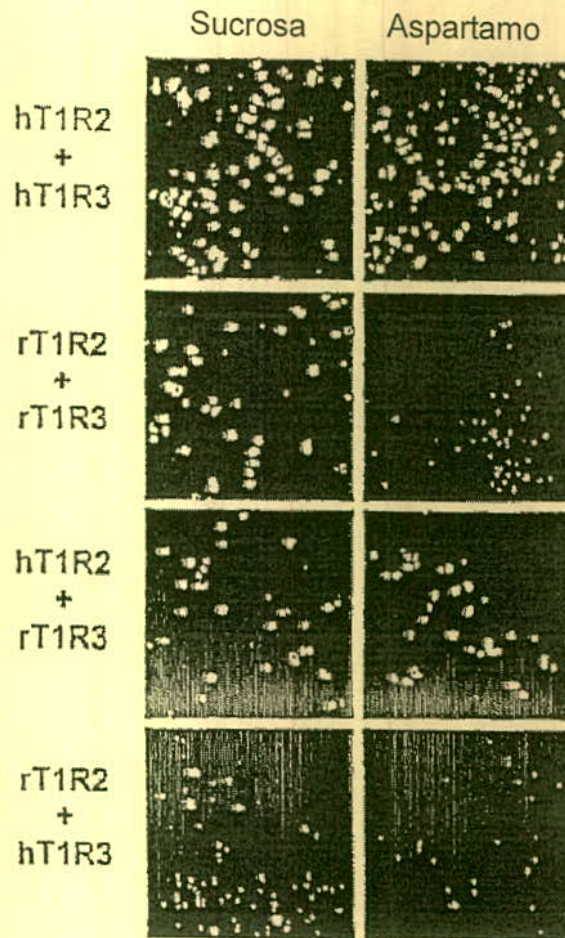


Figura 4. El T1R2 puede controlar la especificidad del ligando T1R2/T1R3



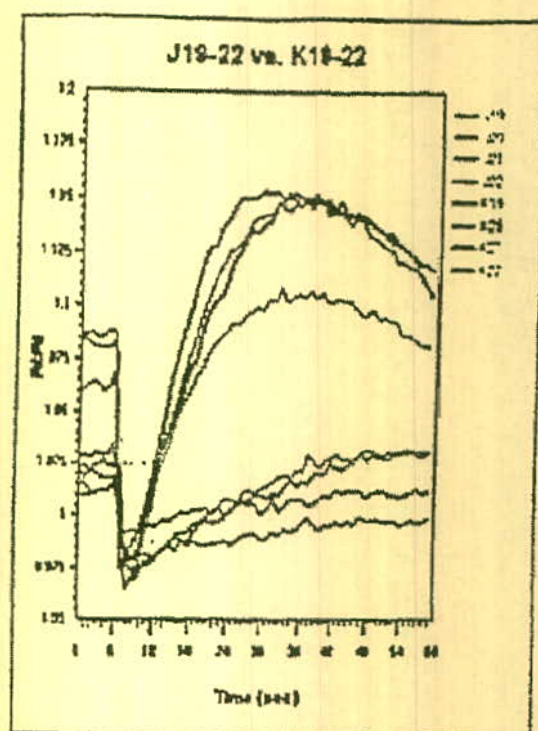


Figura 5

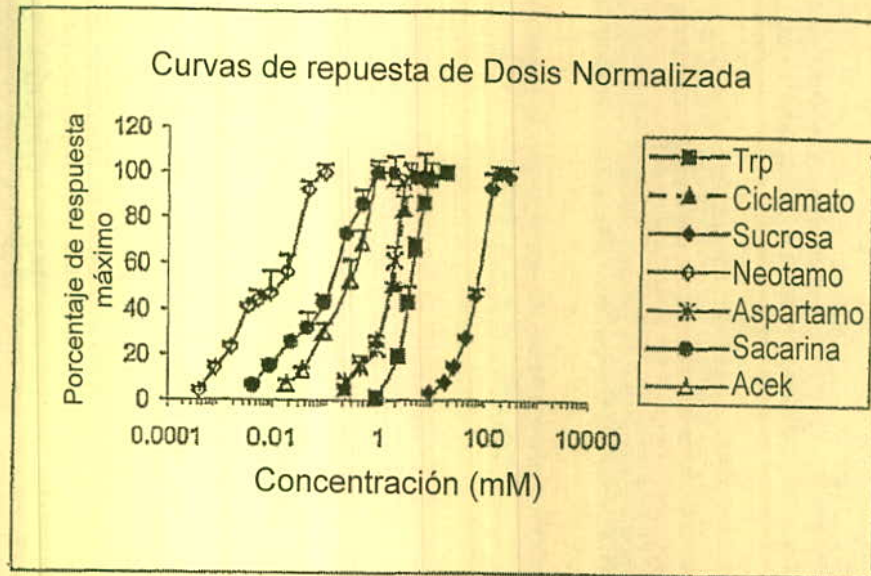


Figura 6

Figura 7. Residuos de unión de ligando clave de mGluR1 se conservan en T1R1

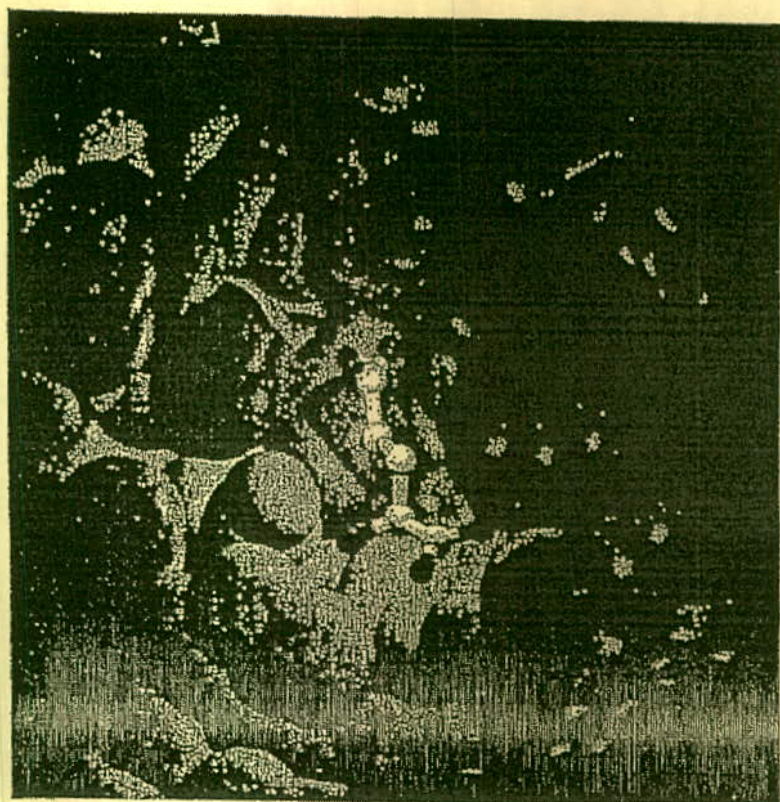
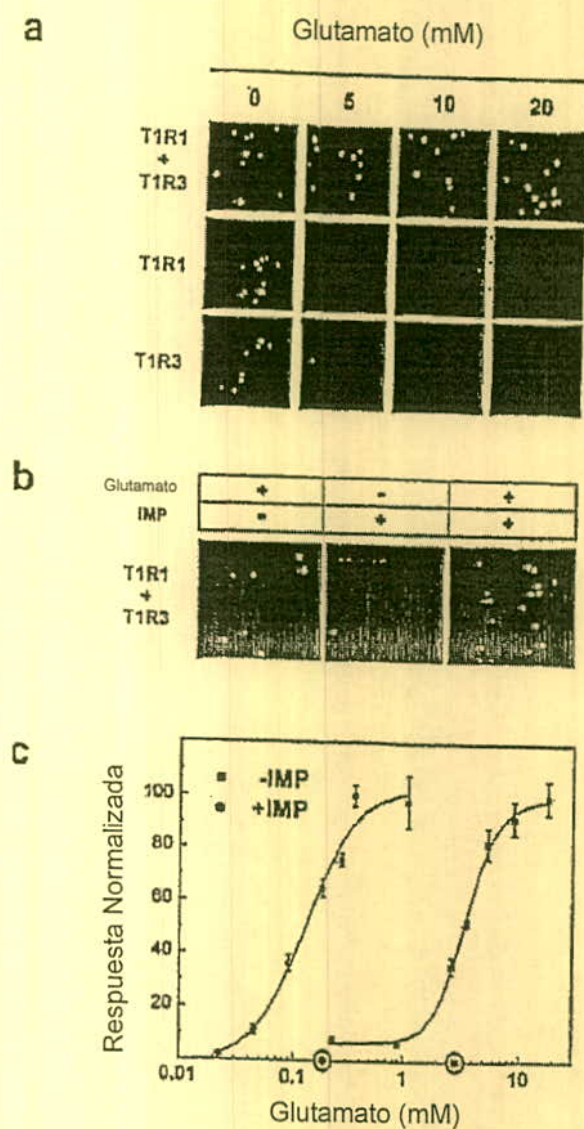


Figura 8. Funciones T1R1/T1R3 humanas como un receptor de sabor umami



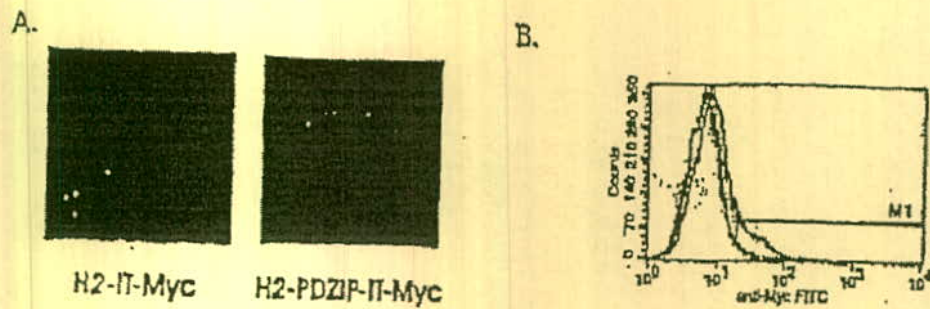


Figura 9. El PDZIP facilita la expresión de superficie del T1R2.

- A. Teñido de inmunofluorescencia de hT1R2 Myc-etiquetado indica que el PDZIP incrementa significativamente la cantidad de proteína T1R2 humana en la membrana de plasma
- B. Los datos de análisis FACS demuestran el mismo resultado. Línea T1R2:Verde humana Myc-etiquetada
- C. Línea T1R2 humano con PDZIP:Negro

Figura 10. Datos de imágenes de calcio que demuestran respuestas hT1R2/hT1R3 para un número de estímulos dulces

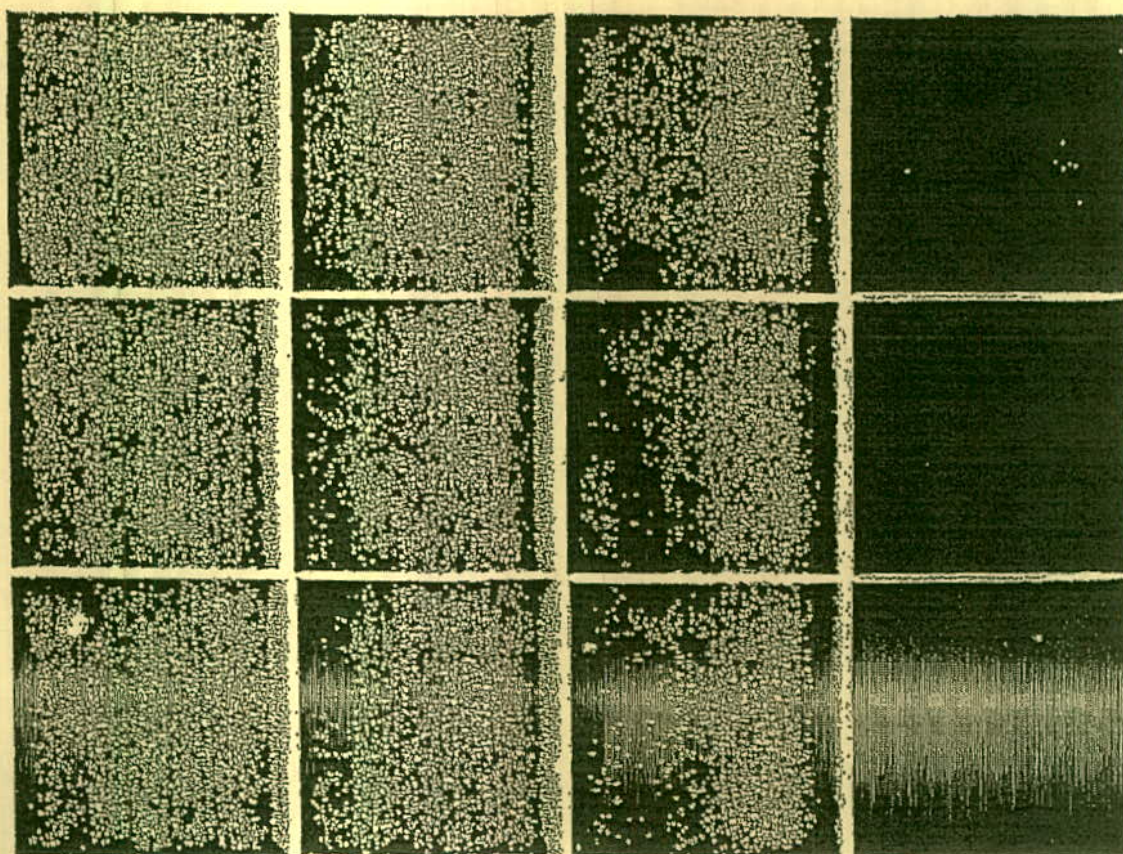


Figura 11

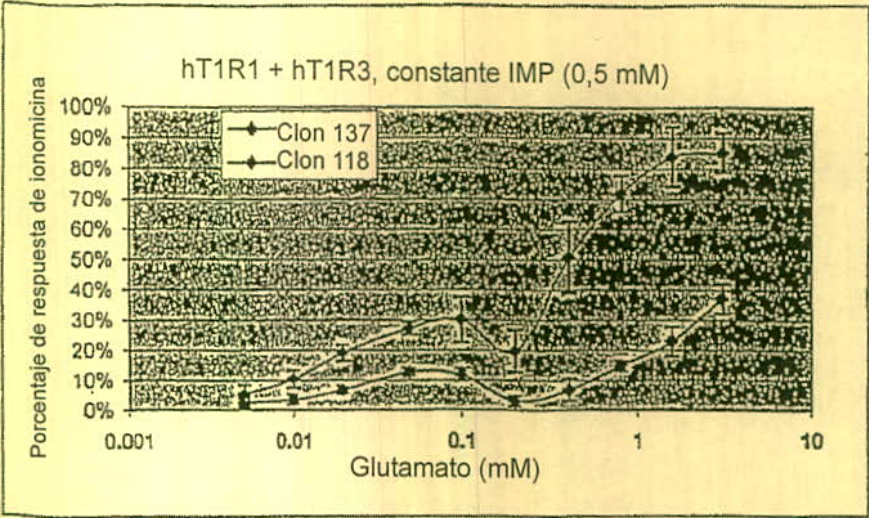


Figura 12

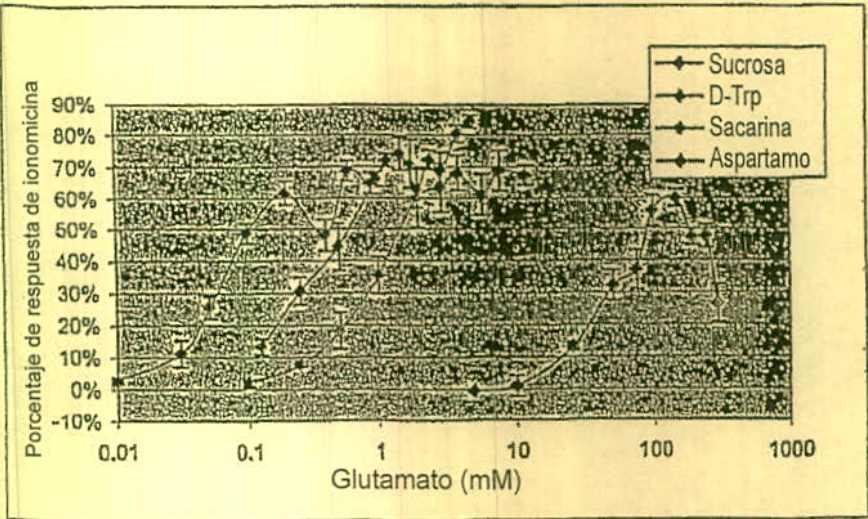
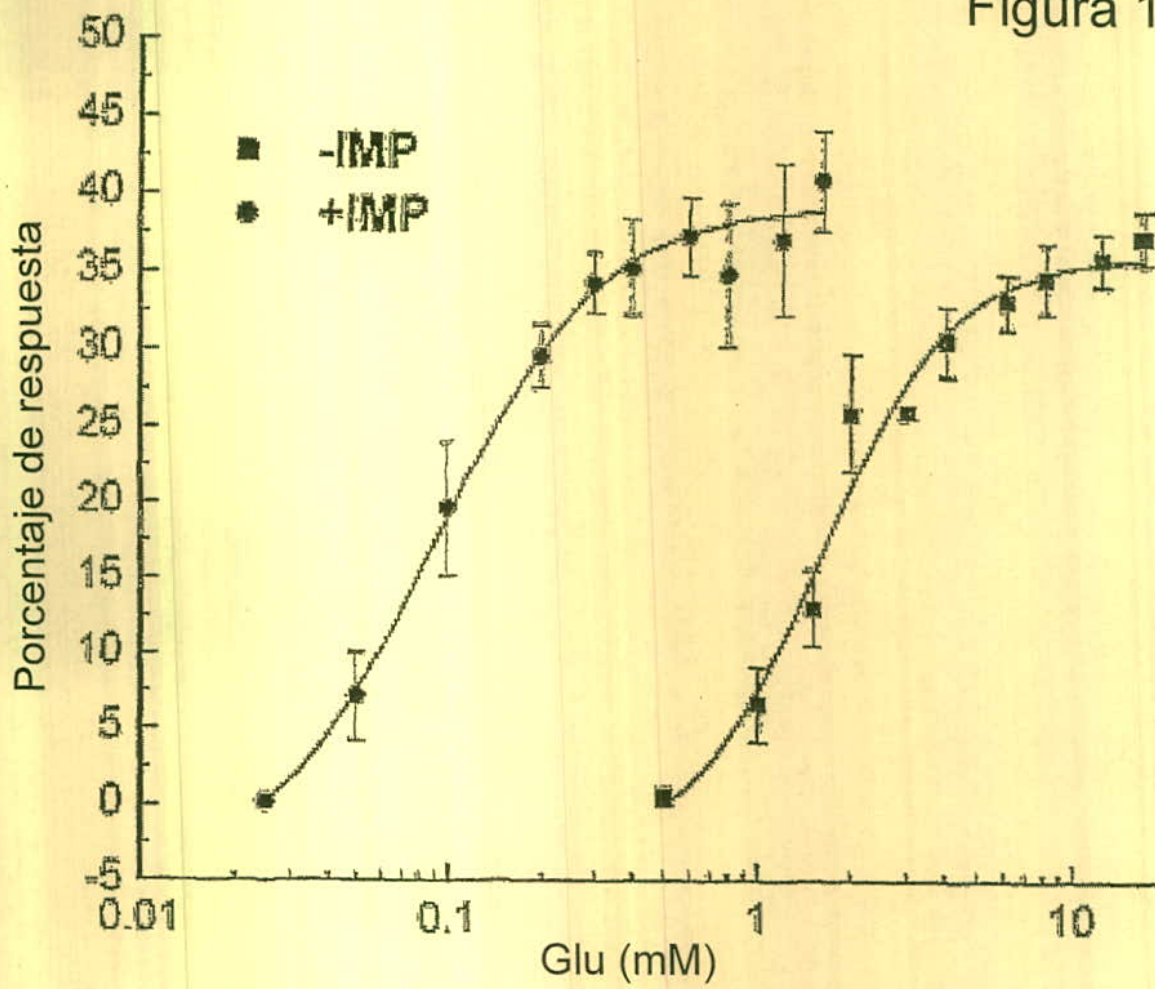


Figura 13



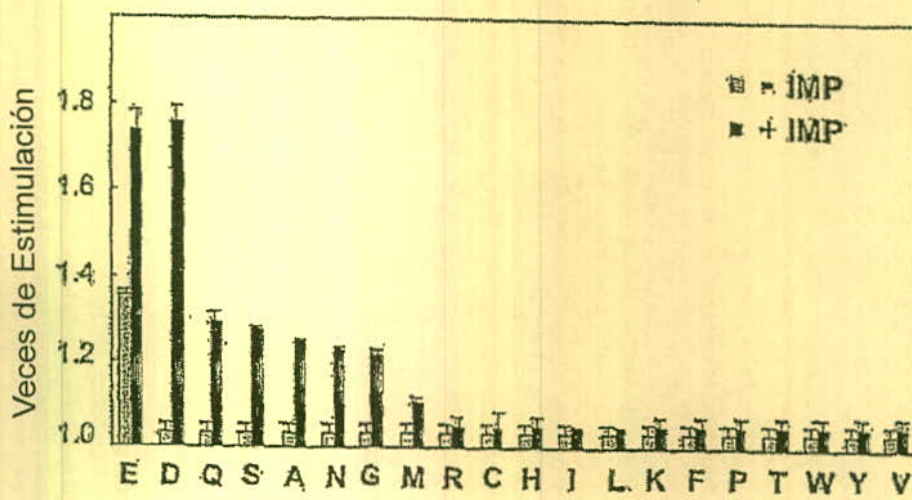


Figura 14

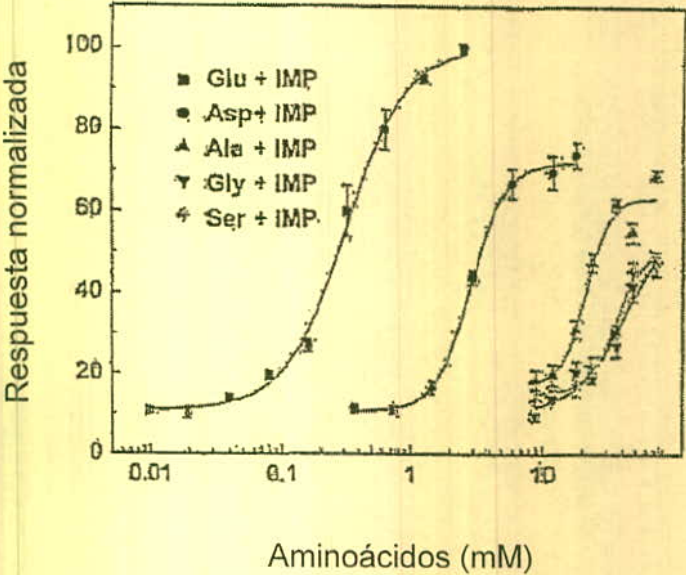


Figura 15

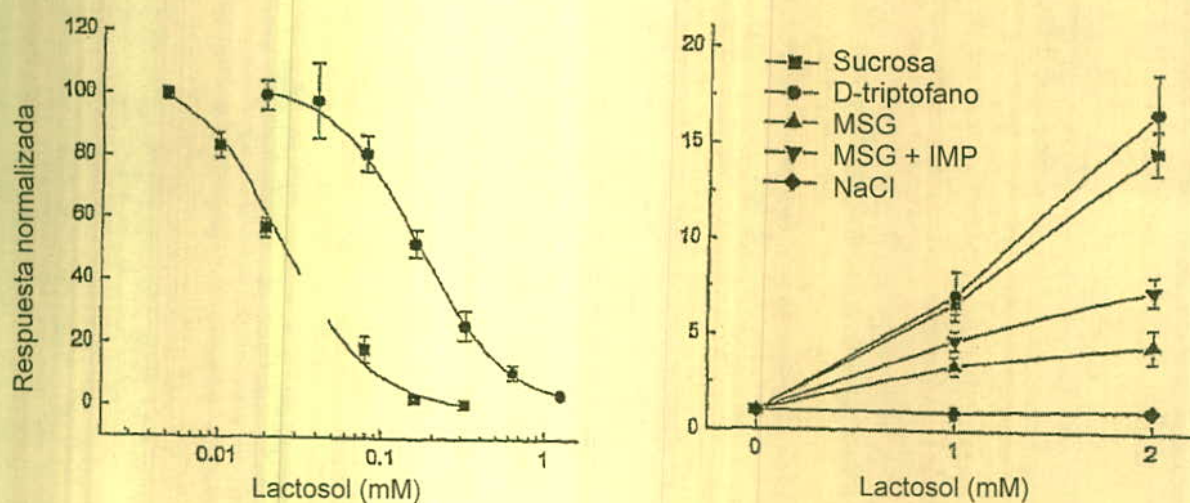


Figura 16. El lactosil inhibe los receptores de dulce T1R2/T1R3 y umami T1R1/T1R3 y el sabor dulce y umami (panel izquierdo) respuestas de células HEK- $G_{\alpha 15}$ transfectadas transitoriamente con T1R1/T1R3 (círculos) a 10 mM de L-glutamato y células HEK- $G_{\alpha 15}$ transfectadas transitoriamente con T1R2/T1R3 (cuadrados) a 150 mM de sucrosa en la presencia de concentraciones variables de lactisol se muestran para la sucrosa que estimula el sabor dulce y D-triptofano, el L-glutamato que estimula el sabor umami (MSG) y L-glutamato más 0.2 mM IMP, y cloruro de sodio. Se determinaron los umbrales de detección siguiendo el método de Schiffman et al.

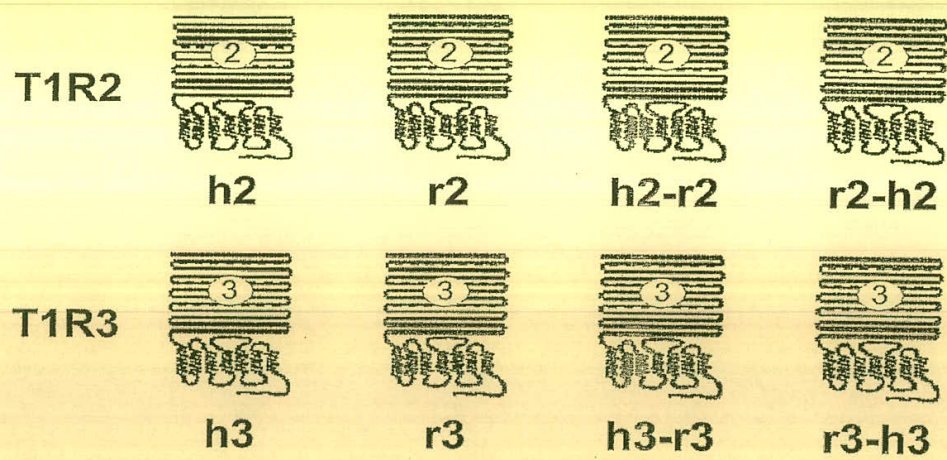


Fig. 17

Figura 18

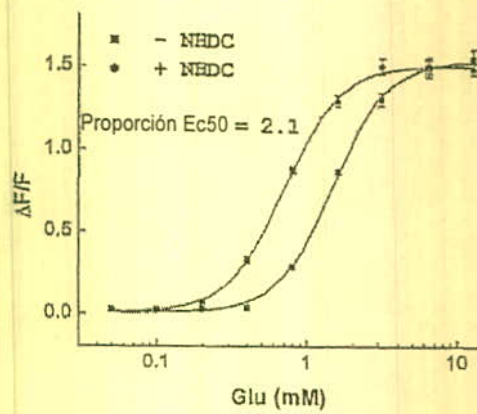
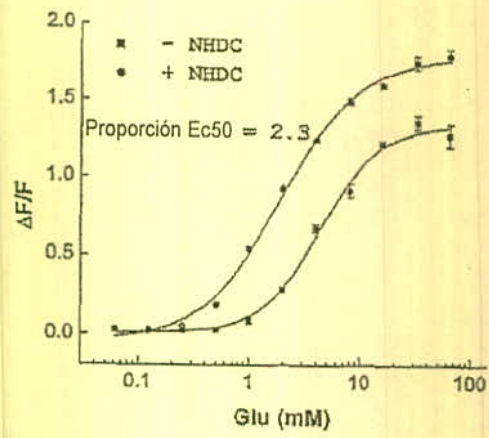


Figura 19

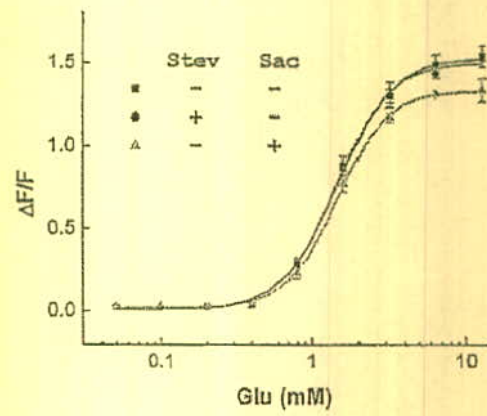
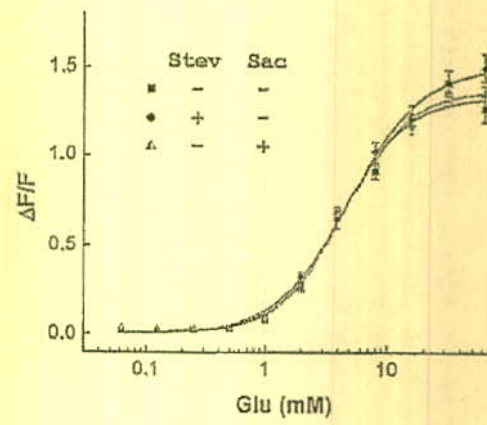


Figura 20

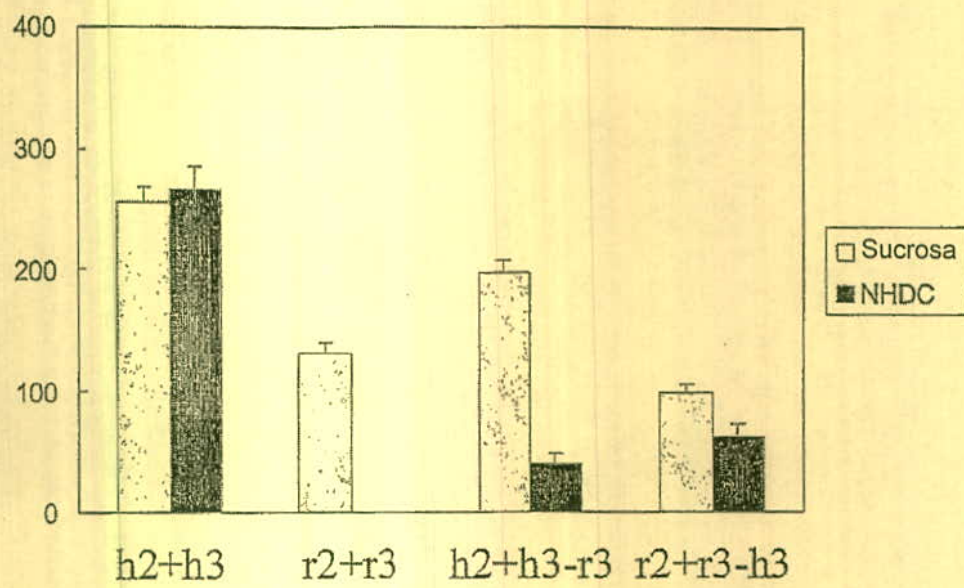


Figura 21A

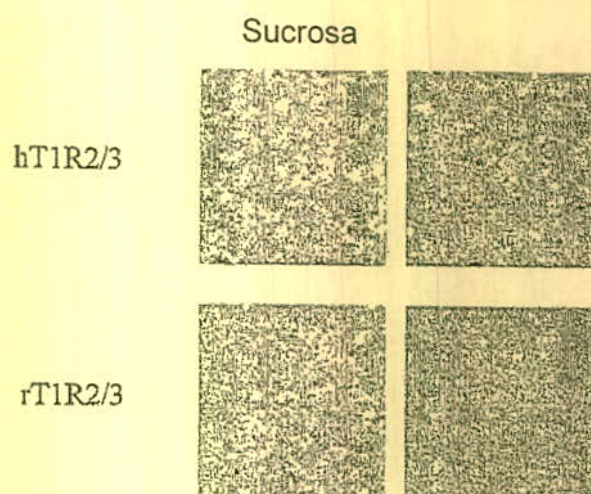
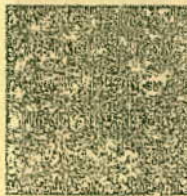


Figura 21B

 $h2-r2 + h3$  $r2-h2 + r3$ 

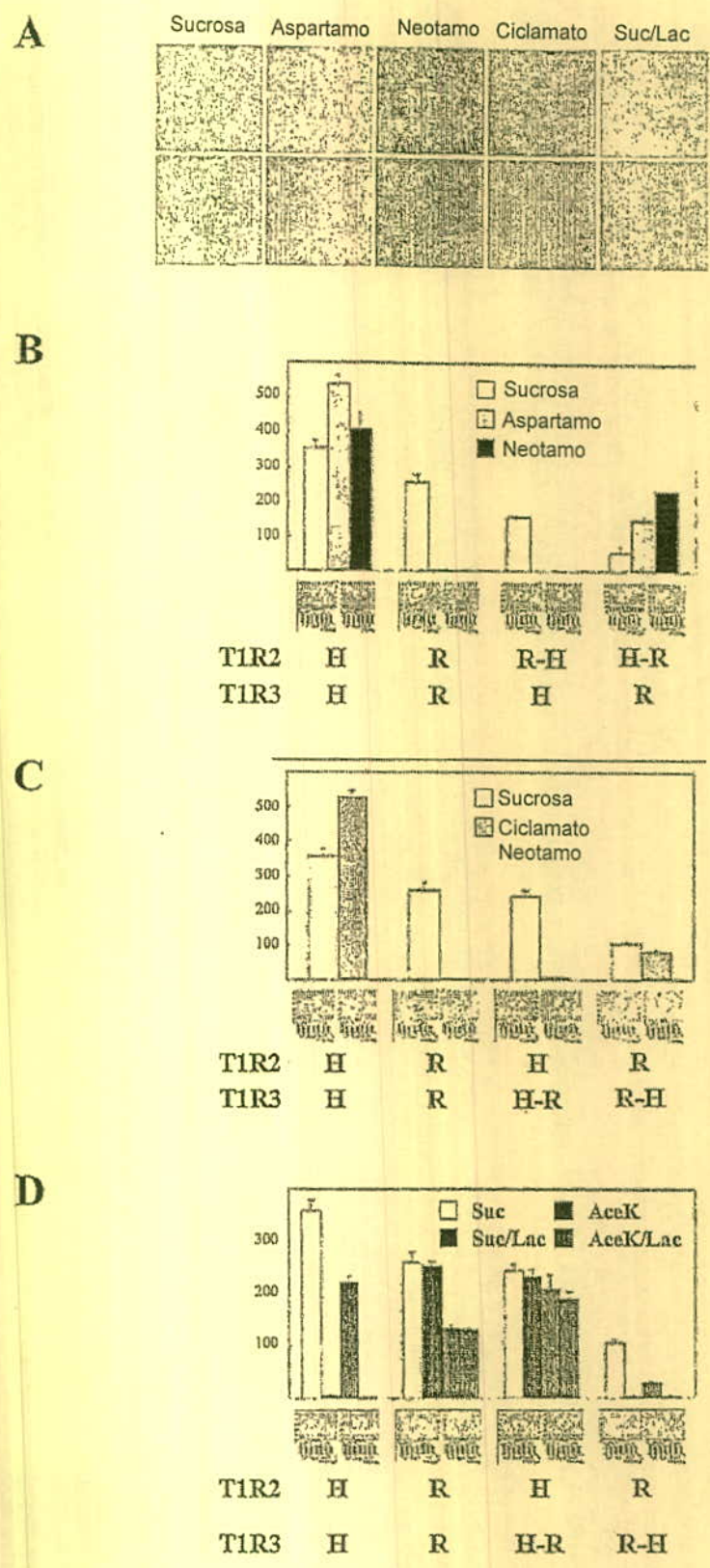
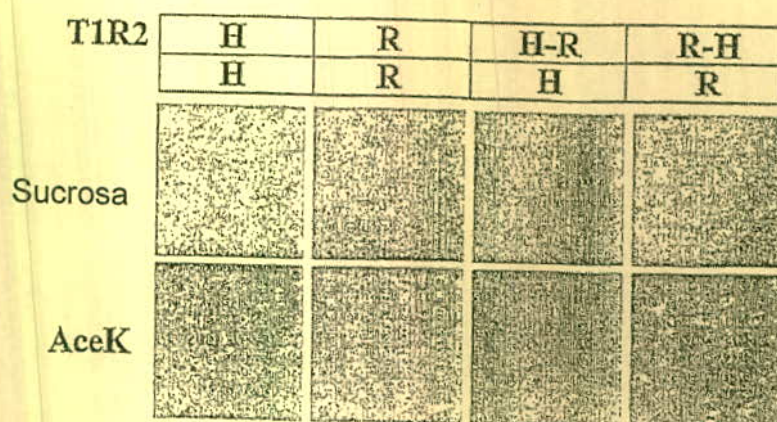


Fig. 22

A.



B.

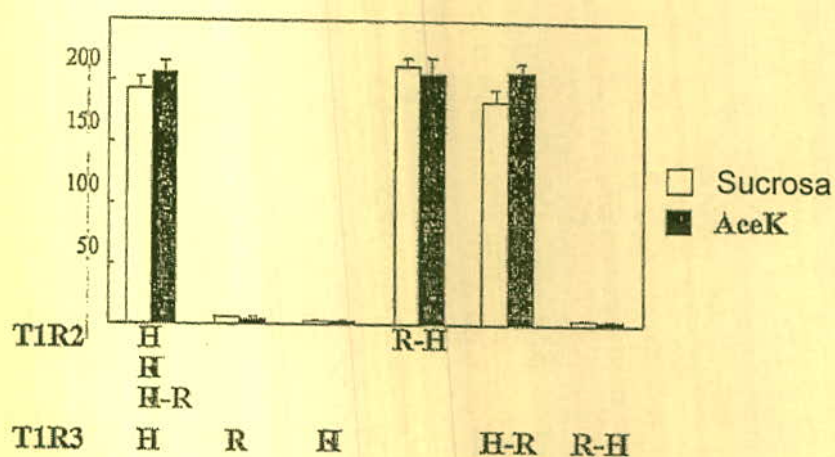


Figura 24

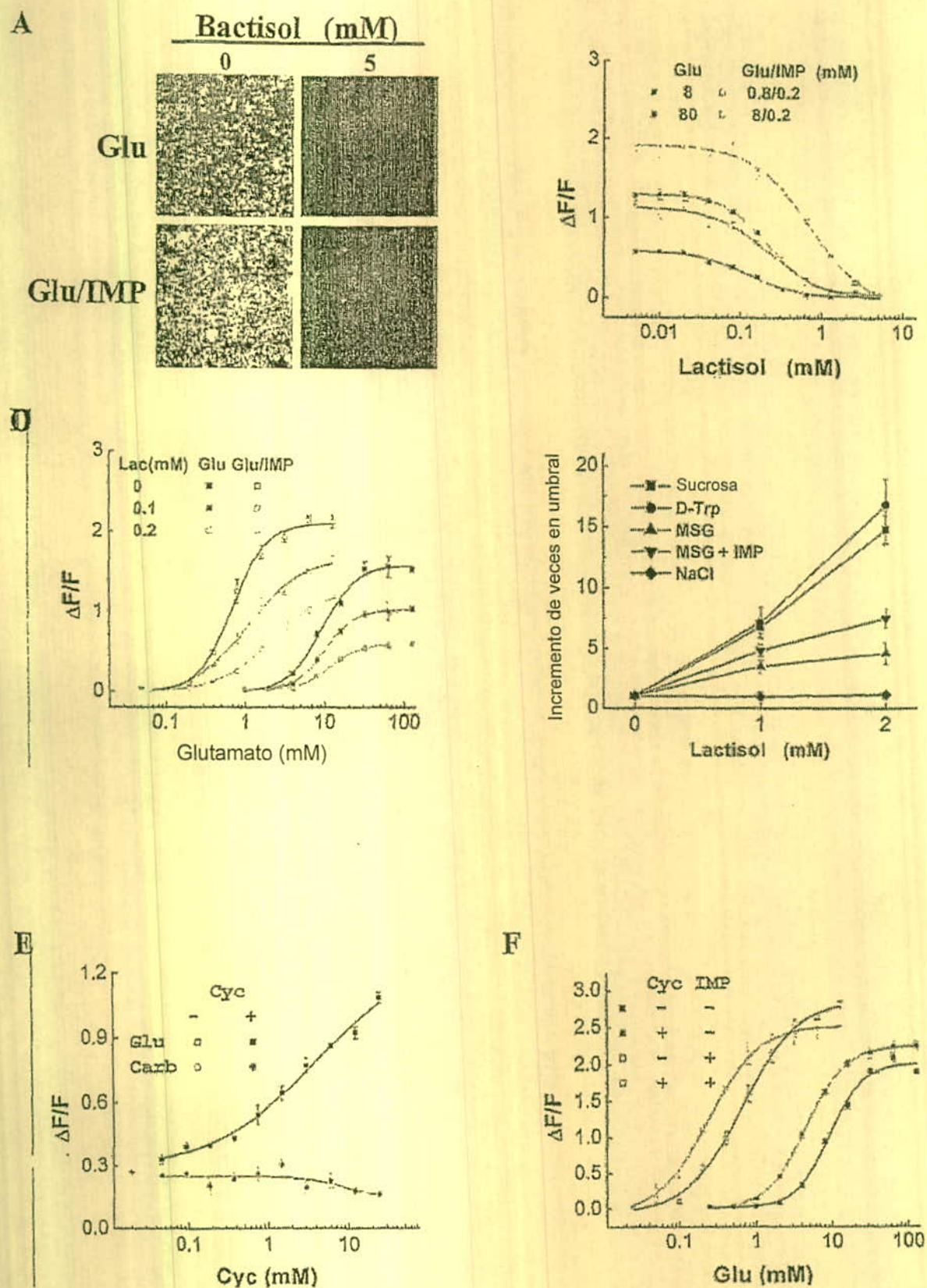


Figura 25

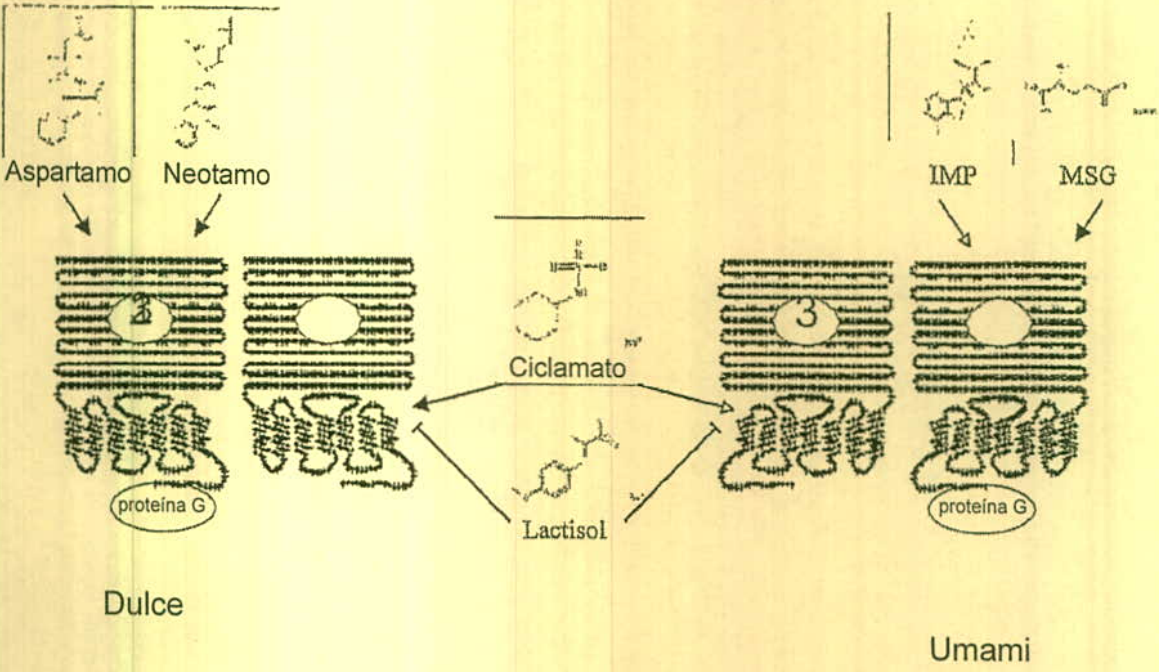
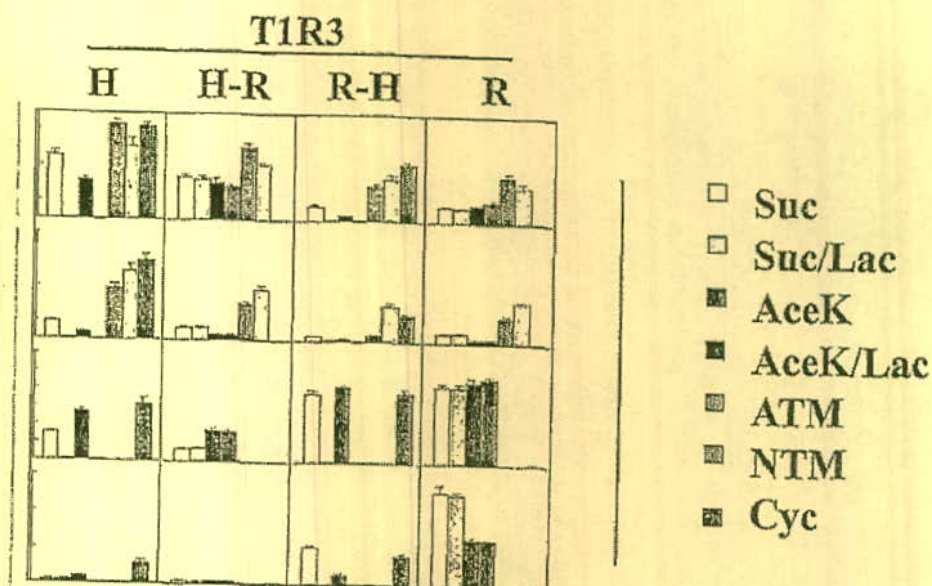
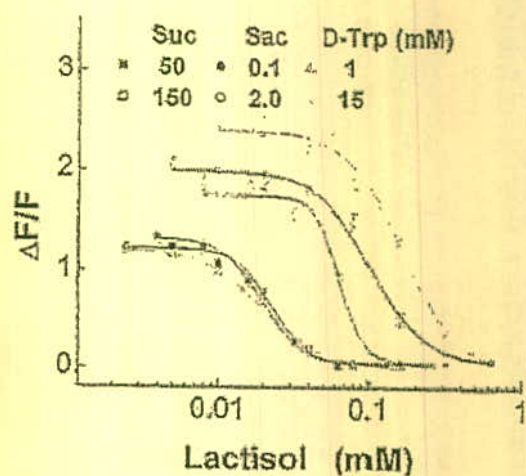


Fig. 26

A



B



C

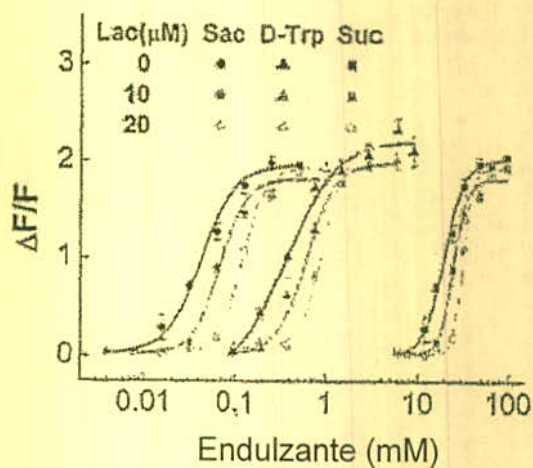


Figura 27

WO 2005/015158

PCT/US2004/025459

SEQUENCE LISTING

<110> Senomyx, Inc.

<120> T1R HETERO-OLIGOMERIC TASTE RECEPTORS,
CELL LINES THAT EXPRESS SAID RECEPTORS, AND TASTE COMPOUNDS

<130> 19328.0001u1

<140> Unassigned

<141> 2004-08-06

<150> 60/494,071

<151> 2003-08-06

<150> 60/552,064

<151> 2004-03-09

<160> 33

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 1

Ser Val Ser Thr Trp

1 5

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<221> VARIANT

<222> 1,3,4,6,7,8,11,12,13

<223> At position 1, Xaa can be either Thr or Arg
At position 3, Xaa can be either Phe or Leu
At position 4, Xaa can be either Arg, Gln, or Pro
At position 6, Xaa can be either Arg or Thr
At position 7, Xaa can be either Ser, Pro or Val
At position 8, Xaa can be either Val, Glu, Arg,
Lys or Thr
At position 11, Xaa can be either Ala or Glu
At position 12, Xaa can be either Trp or Leu

At position 13, Xaa can be either Arg, His or Gly

<400> 2

Xaa Cys Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Phe Leu Xaa Xaa Xaa Glu
1 5 10

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<221> VARIANT

<222> 1,3,4,7,9,10,11,13,14,15

<223> At position 1, Xaa can be either Leu or Gln
At position 3, Xaa can be either Glu, Gly or Thr
At position 4, Xaa can be either Asn, Arg or Cys
At position 7, Xaa can be either Arg or Glu
At position 9, Xaa can be either Arg or Lys
At position 10, Xaa can be either Cys, Gly or Phe
At position 11, Xaa can be either Val, Leu or Ile
At position 13, Xaa can be either Phe or Leu
At position 14, Xaa can be either Ala or Ser
At position 15, Xaa can be either Met or Leu

<400> 3

Xaa Pro Xaa Xaa Tyr Asn Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

<210> 4

<211> 858

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 4

Met Pro Gly Leu Ala Ile Leu Gly Leu Ser Leu Ala Ala Phe Leu Glu
1 5 10 15
Leu Gly Met Gly Ser Ser Leu Cys Leu Ser Gln Gln Phe Lys Ala Gln
20 25 30
Gly Asp Tyr Ile Leu Gly Gly Leu Phe Pro Leu Gly Thr Thr Glu Glu
35 40 45
Ala Thr Leu Asn Gln Arg Thr Gln Pro Asn Gly Ile Leu Cys Thr Arg
50 55 60
Phe Ser Pro Leu Gly Leu Phe Leu Ala Met Ala Met Lys Met Ala Val
65 70 75 80
Glu Glu Ile Asn Asn Gly Ser Ala Leu Leu Pro Gly Leu Arg Leu Gly
85 90 95
Tyr Asp Leu Phe Asp Thr Cys Ser Glu Pro Val Val Thr Met Lys Pro
100 105 110
Ser Leu Met Phe Met Ala Lys Val Gly Ser Gln Ser 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 Leu Ile Thr Gly Lys Phe Phe Ser Phe Phe
 145 150 155 160
 Leu Met Pro Gln Val Ser Tyr Ser Ala Ser Met Asp Arg Leu Ser Asp
 165 170 175
 Arg Glu Thr Phe Pro Ser Phe Phe Arg Thr Val Pro Ser Asp Arg Val
 180 185 190
 Gln Leu Gln Ala Val Val Thr Leu Leu Gln Asn Phe Ser Trp Asn Trp
 195 200 205
 Val Ala Ala Leu Gly Ser Asp Asp Asp Tyr Gly Arg Glu Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ile Phe Ser Gly Leu Ala Asn Ser Arg Gly Ile Cys Ile Ala His Glu
 225 230 235 240
 Gly Leu Val Pro Gln His Asp Thr Ser Gly Gln Gln Leu Gly Lys Val
 245 250 255
 Val Asp Val Leu Arg Gln Val Asn Gln Ser Lys Val Gln Val Val Val
 260 265 270
 Leu Phe Ala Ser Ala Arg Ala Val Tyr Ser Leu Phe Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Leu His Asp Leu Ser Pro Lys Val Trp Val Ala Ser Glu Ser Trp Leu
 290 295 300
 Thr Ser Asp Leu Val Met Thr Leu Pro Asn Ile Ala Arg Val Gly Thr
 305 310 315 320
 Val Leu Gly Phe Leu Gln Arg Gly Ala Leu Leu Pro Glu Phe Ser His
 325 330 335
 Tyr Val Glu Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ala Asp Pro Thr Phe Cys Ala
 340 345 350
 Ser Leu Lys Ala Glu Leu Asp Leu Glu Glu Arg Val Met Gly Pro Arg
 355 360 365
 Cys Ser Gln Cys Asp Tyr Ile Met Leu Gln Asn Leu Ser Ser Gly Leu
 370 375 380
 Met Gln Asn Leu Ser Ala Gly Gln Leu His His Gln Ile Phe Ala Thr
 385 390 395 400
 Tyr Ala Ala Val Tyr Ser Val Ala Gln Ala Leu His Asn Thr Leu Gln
 405 410 415
 Cys Asn Val Ser His Cys His Thr Ser Glu Pro Val Gln Pro Trp Gln
 420 425 430
 Leu Leu Glu Asn Met Tyr Asn Met Ser Phe Arg Ala Arg Asp Leu Thr
 435 440 445
 Leu Gln Phe Asp Ala Lys Gly Ser Val Asp Met Glu Tyr Asp Leu Lys
 450 455 460
 Met Trp Val Trp Gln Ser Pro Thr Pro Val Leu His Thr Val Gly Thr
 465 470 475 480
 Phe Asn Gly Thr Leu Gln Leu Gln His Ser Lys Met Tyr Trp Pro Gly
 485 490 495
 Asn Gln Val Pro Val Ser Gln Cys Ser Arg Gln Cys Lys Asp Gly Gln
 500 505 510
 Val Arg Arg Val Lys Gly Phe His Ser Cys Cys Tyr Asp Cys Val Asp
 515 520 525
 Cys Lys Ala Gly Ser Tyr Arg Lys His Pro Asp Asp Phe Thr Cys Thr
 530 535 540
 Pro Cys Gly Lys Asp Gln Trp Ser Pro Glu Lys Ser Thr Thr Cys Leu
 545 550 555 560
 Pro Arg Arg Pro Lys Phe Leu Ala Trp Gly Glu Pro Ala Val Leu Ser
 565 570 575

```

Leu Leu Leu Leu Leu Cys Leu Val Leu Gly Leu Thr Leu Ala Ala Leu
      580      585      590
Gly Leu Phe Val His Tyr Trp Asp Ser Pro Leu Val Gln Ala Ser Gly
      595      600      605
Gly Ser Leu Phe Cys Phe Gly Leu Ile Cys Leu Gly Leu Phe Cys Leu
      610      615      620
Ser Val Leu Leu Phe Pro Gly Arg Pro Arg Ser Ala Ser Cys Leu Ala
      625      630      635      640
Gln Gln Pro Met Ala His Leu Pro Leu Thr Gly Cys Leu Ser Thr Leu
      645      650      655
Phe Leu Gln Ala Ala Glu Ile Phe Val Glu Ser Glu Leu Pro Leu Ser
      660      665      670
Trp Ala Asn Trp Leu Cys Ser Tyr Leu Arg Gly Pro Trp Ala Trp Leu
      675      680      685
Val Val Leu Leu Ala Thr Leu Val Glu Ala Ala Leu Cys Ala Trp Tyr
      690      695      700
Leu Met Ala Phe Pro Pro Glu Val Val Thr Asp Trp Gln Val Leu Pro
      705      710      715      720
Thr Glu Val Leu Glu His Cys Arg Met Arg Ser Trp Val Ser Leu Gly
      725      730      735
Leu Val His Ile Thr Asn Ala Val Leu Ala Phe Leu Cys Phe Leu Gly
      740      745      750
Thr Phe Leu Val Gln Ser Gln Pro Gly Arg Tyr Asn Arg Ala Arg Gly
      755      760      765
Leu Thr Phe Ala Met Leu Ala Tyr Phe Ile Ile Trp Val Ser Phe Val
      770      775      780
Pro Leu Leu Ala Asn Val Gln Val Ala Tyr Gln Pro Ala Val Gln Met
      785      790      795      800
Gly Ala Ile Leu Phe Cys Ala Leu Gly Ile Leu Ala Thr Phe His Leu
      805      810      815
Pro Lys Cys Tyr Val Leu Leu Trp Leu Pro Glu Leu Asn Thr Gln Glu
      820      825      830
Phe Phe Leu Gly Arg Ser Pro Lys Glu Ala Ser Asp Gly Asn Ser Gly
      835      840      845
Ser Ser Glu Ala Thr Arg Gly His Ser Glu
      850      855

```

<210> 5

<211> 841

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 5

```

Met Leu Leu Cys Thr Ala Arg Leu Val Gly Leu Gln Leu Leu Ile Ser
  1      5      10      15
Cys Cys Trp Ala Phe Ala Cys His Ser Thr Glu Ser Ser Pro Asp Phe
      20      25      30
Thr Leu Pro Gly Asp Tyr Leu Leu Ala Gly Leu Phe Pro Leu His Ser
      35      40      45
Gly Cys Leu Gln Val Arg His Arg Pro Glu Val Thr Leu Cys Asp Arg
      50      55      60
Ser Cys Ser Phe Asn Glu His Gly Tyr His Leu Phe Gln Ala Met Arg
      65      70      75      80

```

Leu Gly Val Glu Glu Ile Asn Asn Ser Thr Ala Leu Leu Pro Asn Ile
 85 90 95
 Thr Leu Gly Tyr Gln Leu Tyr Asp Val Cys Ser Asp Ser Ala Asn Val
 100 105 110
 Tyr Ala Thr Leu Arg Val Leu Ser Leu Pro Gly Gln His His Ile Glu
 115 120 125
 Leu Gln Gly Asp Leu Leu His Tyr Ser Pro Thr Val Leu Ala Val Ile
 130 135 140
 Gly Pro Asp Ser Thr Asn Arg Ala Ala Thr Thr Ala Ala Leu Leu Ser
 145 150 155 160
 Pro Phe Leu Val Pro Met Ile Ser Tyr Ala Ala Ser Ser Glu Thr Leu
 165 170 175
 Ser Val Lys Arg Gln Tyr Pro Ser Phe Leu Arg Thr Ile Pro Asn Asp
 180 185 190
 Lys Tyr Gln Val Glu Thr Met Val Leu Leu Leu Gln Lys Phe Gly Trp
 195 200 205
 Thr Trp Ile Ser Leu Val Gly Ser Ser Asp Asp Tyr Gly Gln Leu Gly
 210 215 220
 Val Gln Ala Leu Glu Asn Gln Ala Thr Gly Gln Gly Ile Cys Ile Ala
 225 230 235 240
 Phe Lys Asp Ile Met Pro Phe Ser Ala Gln Val Gly Asp Glu Arg Met
 245 250 255
 Gln Cys Leu Met Arg His Leu Ala Gln Ala Gly Ala Thr Val Val Val
 260 265 270
 Val Phe Ser Ser Arg Gln Leu Ala Arg Val Phe Phe Glu Ser Val Val
 275 280 285
 Leu Thr Asn Leu Thr Gly Lys Val Trp Val Ala Ser Glu Ala Trp Ala
 290 295 300
 Leu Ser Arg His Ile Thr Gly Val Pro Gly Ile Gln Arg Ile Gly Met
 305 310 315 320
 Val Leu Gly Val Ala Ile Gln Lys Arg Ala Val Pro Gly Leu Lys Ala
 325 330 335
 Phe Glu Glu Ala Tyr Ala Arg Ala Asp Lys Lys Ala Pro Arg Pro Cys
 340 345 350
 His Lys Gly Ser Trp Cys Ser Ser Asn Gln Leu Cys Arg Glu Cys Gln
 355 360 365
 Ala Phe Met Ala His Thr Met Pro Lys Leu Lys Ala Phe Ser Met Ser
 370 375 380
 Ser Ala Tyr Asn Ala Tyr Arg Ala Val Tyr Ala Val Ala His Gly Leu
 385 390 395 400
 His Gln Leu Leu Gly Cys Ala Ser Gly Ala Cys Ser Arg Gly Arg Val
 405 410 415
 Tyr Pro Trp Gln Leu Leu Glu Gln Ile His Lys Val His Phe Leu Leu
 420 425 430
 His Lys Asp Thr Val Ala Phe Asn Asp Asn Arg Asp Pro Leu Ser Ser
 435 440 445

 Tyr Asn Ile Ile Ala Trp Asp Trp Asn Gly Pro Lys Trp Thr Phe Thr
 450 455 460
 Val Leu Gly Ser Ser Thr Trp Ser Pro Val Gln Leu Asn Ile Asn Glu
 465 470 475 480
 Thr Lys Ile Gln Trp His Gly Lys Asp Asn Gln Val Pro Lys Ser Val
 485 490 495
 Cys Ser Ser Asp Cys Leu Glu Gly His Gln Arg Val Val Thr Gly Phe
 500 505 510
 His His Cys Cys Phe Glu Cys Val Pro Cys Gly Ala Gly Thr Phe Leu
 515 520 525

Asn	Lys	Ser	Asp	Leu	Tyr	Arg	Cys	Gln	Pro	Cys	Gly	Lys	Glu	Glu	Trp
530						535					540				
Ala	Pro	Glu	Gly	Ser	Gln	Thr	Cys	Phe	Pro	Arg	Thr	Val	Val	Phe	Leu
545					550					555					560
Ala	Leu	Arg	Glu	His	Thr	Ser	Trp	Val	Leu	Leu	Ala	Ala	Asn	Thr	Leu
				565					570					575	
Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Ala	Gly	Leu	Phe	Ala	Trp	His	Leu
				580				585					590		
Asp	Thr	Pro	Val	Val	Arg	Ser	Ala	Gly	Gly	Arg	Leu	Cys	Phe	Leu	Met
		595					600					605			
Leu	Gly	Ser	Leu	Ala	Ala	Gly	Ser	Gly	Ser	Leu	Tyr	Gly	Phe	Phe	Gly
	610					615					620				
Glu	Pro	Thr	Arg	Pro	Ala	Cys	Leu	Leu	Arg	Gln	Ala	Leu	Phe	Ala	Leu
625					630					635					640
Gly	Phe	Thr	Ile	Phe	Leu	Ser	Cys	Leu	Thr	Val	Arg	Ser	Phe	Gln	Leu
				645					650					655	
Ile	Ile	Ile	Phe	Lys	Phe	Ser	Thr	Lys	Val	Pro	Thr	Phe	Tyr	His	Ala
			660					665					670		
Trp	Val	Gln	Asn	His	Gly	Ala	Gly	Leu	Phe	Val	Met	Ile	Ser	Ser	Ala
			675				680					685			
Ala	Gln	Leu	Leu	Ile	Cys	Leu	Thr	Trp	Leu	Val	Val	Trp	Thr	Pro	Leu
	690					695					700				
Pro	Ala	Arg	Glu	Tyr	Gln	Arg	Phe	Pro	His	Leu	Val	Met	Leu	Glu	Cys
705					710					715					720
Thr	Glu	Thr	Asn	Ser	Leu	Gly	Phe	Ile	Leu	Ala	Phe	Leu	Tyr	Asn	Gly
			725						730					735	
Leu	Leu	Ser	Ile	Ser	Ala	Phe	Ala	Cys	Ser	Tyr	Leu	Gly	Lys	Asp	Leu
			740					745					750		
Pro	Glu	Asn	Tyr	Asn	Glu	Ala	Lys	Cys	Val	Thr	Phe	Ser	Leu	Leu	Phe
		755					760					765			
Asn	Phe	Val	Ser	Trp	Ile	Ala	Phe	Phe	Thr	Thr	Ala	Ser	Val	Tyr	Asp
	770					775					780				
Gly	Lys	Tyr	Leu	Pro	Ala	Ala	Asn	Met	Met	Ala	Gly	Leu	Ser	Ser	Leu
785					790					795					800
Ser	Ser	Gly	Phe	Gly	Gly	Tyr	Phe	Leu	Pro	Lys	Cys	Tyr	Val	Ile	Leu
			805						810					815	
Cys	Arg	Pro	Asp	Leu	Asn	Ser	Thr	Glu	His	Phe	Gln	Ala	Ser	Ile	Gln
			820					825					830		
Asp	Tyr	Thr	Arg	Arg	Cys	Gly	Ser	Thr							
		835					840								

<210> 6
 <211> 839
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
 synthetic construct

<400> 6
 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
Glu Ile Asn Asn Asp Ser Ser Leu Leu Pro Gly Val Leu Leu Gly Tyr		80
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 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
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
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		
305	310	315
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
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
Ile Ser Trp His Thr Val 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
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> 7
<211> 852
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 7
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 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
 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

<210> 8

<211> 2526

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 8

atgctgctct	gcacggctcg	cctggctcggc	ctgcagcttc	tcatttcctg	ctgctggggc	60
tttgctgccc	atagcacgga	gtctttctcct	gacttcaccc	tccccggaga	ttacctcctg	120
gcaggcctgt	tccctctcca	ttctggctgt	ctgcaggtga	ggcacagacc	cgaggtgacc	180
ctgtgtgaca	ggtctttag	cttcaatgag	catggctacc	acctcttcca	ggctatgcgg	240
cttgggggtg	aggagataaa	caactccacg	gccctgctgc	ccaacatcac	cctgggggtac	300
cagctgtatg	atgtgtgttc	tgactctgcc	aatgtgtatg	ccacgctgag	agtgtctctc	360
ctgccagggc	aacaccacat	agagctccaa	ggagaccttc	tccactattc	ccctacgggtg	420
ctggcagtga	ttgggcctga	cagcaccaac	cgtgctgcca	ccacagccgc	cctgctgagc	480
cctttcctgg	tgcccatgat	tagctatgcy	gccagcagcg	agacgctcag	cgtgaagcgg	540
cagtatccct	ctttcctgcy	caccatcccc	aatgacaagt	accaggtgga	gaccatgggtg	600
ctggtcctag	agaagtctcg	gtggacctgg	atctctctgg	ttggcagcag	tgacgactat	660
gggcagctag	gggtgcaggc	actggagaa	caggccactg	gtcaggggat	ctgcattgct	720
ttcaaggaca	tcatgccctt	ctctgcccag	gtgggcgatg	agaggatgca	gtgcctcatg	780
cgccacctgg	cccaggccgg	ggccaccgtc	gtggttggtt	tttcagccg	gcagttggcc	840
aggggtgttt	togagtccgt	ggtgctgacc	aacctgactg	gcaaggtgtg	ggtgcgctca	900
gaagcctggg	ccctctccag	gcacatcaact	ggggtgccc	ggatccagcg	cattgggatg	960
gtgctggggc	tggccatcca	gaagagggt	gtccctggcc	tgaaggcgtt	tgaagaagcc	1020
tatgcccggg	cagacaagaa	ggcccctagg	ccttgccaca	agggctcctg	gtgcagcagc	1080
aatcagctct	gcagagaatg	ccaagctttc	atggcacaca	cgatgcccaa	gctcaaagcc	1140
ttctccatga	gttctgccta	caacgcatac	cgggctgtgt	atgcggtggc	ccatggcctc	1200
caccagctcc	tgggctgtgc	ctctggagct	tgttccagg	gccgagtcta	cccctggcag	1260
cttttggagc	agatccacaa	ggtgcatttc	cttctacaca	aggacactgt	ggcgtttaat	1320
gacaacagag	atccccctcag	tagctataac	ataattgcct	gggactggaa	tggacccaag	1380
tggaccttca	cggtcctcgg	ttctctccaca	tggctctccag	ttcagctaaa	cataaatgag	1440
accaaatacc	agtggcacgg	aaaggacaac	cagggtgccta	agtctgtgtg	ttccagcgac	1500
tgtcttgaag	ggcaccagcg	agtggttacg	ggtttccatc	actgctgctt	tgagtgtgtg	1560
ccctgtgggg	ctgggacctt	cctcaacaag	agtgcctct	acagatgcca	gccttgtggg	1620
aaagaagagt	gggcacctga	gggaagccag	acctgcttcc	cgcgactgt	ggtgtttttg	1680
gctttgcgtg	agcacacctc	ttgggtgctg	ctggcagcta	acacgctgct	gctgctgctg	1740
ctgcttggga	ctgctggcct	gtttgcctgg	cacctagaca	cccctgtggg	gaggtcagca	1800
gggggcccgc	tgtgctttct	tatgctgggc	tccctggcag	caggtagtgg	cagcctctat	1860
ggcttctttg	gggaacccac	aaggcctcgc	tgcttgcctac	gccaggccct	ctttgccctt	1920
ggtttcacca	tcttctgtgc	ctgcctgaca	gttgcctcat	tccaaactaat	catcatcttc	1980
aagttttcca	ccaaggtacc	tacattctac	cacgcctggg	tccaaaacca	cggtgctggc	2040
ctgtttgtga	tgatcagctc	agcggcccag	ctgcttatct	gtctaacttg	gctgggtggg	2100
tggaccccac	tgcctgctag	ggaataccag	cgcttccccc	atctgggtgat	gcttgagtgc	2160
acagagacca	actccctggg	cttcatactg	gccttccctc	acaatggcct	cctctccatc	2220
agtgcctttg	cctgcagcta	cctgggtaag	gacttgccag	agaactacaa	cgaggccaaa	2280
tgtgtcacct	tcagcctgct	cttcaacttc	gtgcctgga	tgccttctt	caccacggcc	2340
agcgtctacg	acggcaagta	cctgcctgcg	gccaacatga	tggctgggct	gagcagcctg	2400
agcagcggct	tcgggtgggt	ttttctgcct	aagtgcctacg	tgatcctctg	ccgcccagac	2460
ctcaacagca	cagagcactt	ccaggcctcc	attcaggact	acacgaggcg	ctgcggctcc	2520
acctga						2526

<210> 9

<211> 2559

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

```

<400> 9
atgctggggc ctgctgtcct gggcctcagc ctctgggctc tectgcaccc tgggacgggg 60
gccccattgt gcctgtcaca gcaacttagg atgaaggggg actacgtgct ggggggggctg 120
ttccccctgg gcgagggcga ggaggtggtc ctccgcagcc ggacacggcc cagcagccct 180
gtgtgcacca ggttctcctc aaacggcctg ctctgggcac tggccatgaa aatggcctg 240
gaggagatca acaacaagtc ggatctgctg cccgggctgc gcctgggcta cgacctcttt 300
gatacgtgct cggagcctgt ggtggccatg aagcccagcc tcatgttcct ggccaaggca 360
ggcagcccg ccatcgccgc ctactgcaac tacacgcagt accagccccg tgtgctggct 420
gtcatcgggc cccactcgtc agagctcgcc atggtcaccg gcaagttctt cagcttcttc 480
ctcatgcccc aggtcagcta cgggtctagc atggagctgc tgagcgcccc ggagaccttc 540
ccctctttct tccgcaccgt gcccagcgac cgtgtgcagc tgacggccgc cgcggagctg 600
ctgcaggagt tcggctggaa ctgggtggcc gccctgggca ggcacgacga gtacggccgg 660
cagggcctga gcatcttctc gggcctggcc ggggcacgcg gcatctgcat cgcgcacgag 720
ggcctggtgc cgtgccccg tggcgtgac tgcgggctgg ggaaggtgca ggacgtcctg 780
caccaggtga accagagcag cgtgcagggt gtgctgctgt tgcctcctg gcacgccgcc 840
cacgcctct tcaactacag catcagcagc gggctcctgc ccaaggtgtg ggtggccagc 900
gaggcctggc tgacctctga cctggctcatg gggctgcccg gcatggccca gatgggacg 960
gtgcttggct tccctccagag ggggtgccag ctgcacagt tccccagta cgtgaagacg 1020
cacctggccc tggccaccga cccggccttc tgctctgccc tgggcgagag ggagcagggt 1080
ctggaggagg acgtggtggg ccagcgtgc cgcaggtgt actgcatcac gctgcagaac 1140
gtgagcgtag ggctaaatca ccaccagacg ttctctgtct acgcagctgt gtatagcgtg 1200
gcccaggccc tgcacaacac tcttcagtgc aacgcctcag gctgccccgc gcaggacccc 1260
gtgaagccct ggcagctcct ggagaacatg tacaacctga ccttccacgt gggcgggctg 1320
ccgctgcggc tcgacagcag cggaaacgtg gacatggagt acgacctgaa gctgtgggtg 1380
tggcagggtc cagtgcctcag gctccacgac gtgggcaggt tcaacggcag cctcaggaca 1440
gagcgccctga agatccgctg gcacacgtct gacaaccaga agcccgctg cgggtgctcg 1500
cggcagtgcc aggaggggcca ggtgcgcgg gtcaaggggt tccactcctg ctgctacgac 1560
tgtgtggact gcgagggcgg cagctaccgg caaaacccag acgacatgc ctgcaccttt 1620
tgtggccagg atgagtggtc cccggagcga agcacacgct gcttccgccc caggctctcg 1680
ttcctggcat ggggcgagcc ggctgtgctg ctgctgctcc tgctgctgag cctggcgctg 1740
ggccttgtgc tggctgcttt ggggtgttcc gttaccatc gggacagccc actggttcag 1800
gcctcggggg ggcctctggc ctgctttggc ctggtgtgct tgggcctggt ctgcctcagc 1860
gtcctcctgt tccctggcca gcccagccct gcccgatgct tggcccagca gcccttgtcc 1920
cacctccccg tcacgggctg cctgagcaca ctcttcctg aggcggccga gatcttcgtg 1980
gagtcagaac tgcctctgag ctgggcagac cggctgagtg gctgcctgag ggggccctgg 2040
gcctggctgg tgggtgctgt ggcctatgct gtggaggtcg cactgtgcac ctgggtacctg 2100
gtggccttcc cgcgggaggt ggtgacggac tggcacatgc tgcccacgga ggcgctgggtg 2160
cactgcgcga cagctcctg ggtcagcttc ggcctagcgc acgccaccaa tgccacgctg 2220
gcccttctct gcttctggg cactttcctg gtgcggagcc agccgggctg ctacaacctg 2280
gcccgtggcc tcacctttgc catgctggcc tacttcatca cctgggtctc ctttgtgccc 2340
ctcctggcca atgtgcagg ggtcctcagg cccgcctgct agatgggcgc cctcctgctc 2400
tgtgtcctgg gcatcctggc tgccttccac ctgcccagg gttacctgct catgcggcag 2460
ccagggctca acacccccga gttcttctg ggagggggcc ctggggatgc ccaaggccag 2520
aatgacggga acacaggaaa tcaggggaaa catgagtga 2559

```

<210> 10

<211> 2518

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 10

```

atggggccca gggcaaagac catctgctcc ctgttcttcc tcctatgggt cctggctgag 60
ccggctgaga actcggactt ctacctgctt ggggattacc tcctgggtgg cctcttctcc 120

```

ctccatgcc	acatgaagg	cattgttcac	cttaacttcc	tgcaggtgcc	catgtgcaag	180
gagtatgaag	tgaaggatgat	aggctacaac	ctcatgcagg	ccatgcgctt	cgcgggtggag	240
gagatcaaca	atgacagcag	cctgtcgctt	gggtgtgctgc	tgggctatga	gatcgtggat	300
gtgtgctaca	tctccaacaa	tgtccagccg	gtgctctact	tccctggcaca	cgaggacaac	360
ctccttccca	tccaagagga	ctacagtaac	tacatttccc	gtgtgggtggc	tgtcattggc	420
cctgacaact	ccgagtctgt	catgactgtg	gccaattcct	ctccctattt	ctccttccac	480
agatcaccta	cagcgccatc	agcgatgagc	tgcgagacaa	gggtgcgcttc	ccggctttgc	540
tgcgtaccac	acccagcgcc	gaccaccacg	tgcaggccat	gggtgcagctg	atgctgcact	600
tccgctggaa	ctggatcatt	gtgctgggtga	gcagcgacac	ctatggccgc	gacaatggca	660
gctgcttggc	gagcgcgtgg	cccggcgcg	catctgcac	gccttccagg	agacgctgcc	720
cacactgcag	cccaaccaga	acatgacgtc	agaggagcgc	cagcgcctgg	tgaccattgt	780
ggacaagctg	cagcagagca	cagcgcgcgt	cgtggctcgtg	ttctcgcccg	acctgaccct	840
gtaccacttc	ttcaatgagg	tgtgtgcgca	gaacttcacg	ggcgcgctgt	ggatcgctc	900
cgagtccctg	gccatcgacc	cggctcctgca	caacctcacg	gagctggggc	acttggggc	960
cttctctggg	atcaccatcc	agagcgtgcc	catcccgggc	ttcagtggat	tccgcgagtg	1020
gggcccacag	gctggggcgc	cacccctcag	caggaccagc	cagagctata	cctgcaacca	1080
ggagtgcgac	aactgcctga	acgccacctt	gtccttcaac	accattctca	ggctctctgg	1140
ggagcgtgtc	gtctacagcg	tgtactctgc	ggtctatgct	gtggcccatg	ccctgcacag	1200
cctcctcggc	tgtgacaaaa	gcacctgcac	caagagggtg	gtctaccctt	ggcagctgct	1260
tgaggagatc	tgggaaggtca	acttctactct	cctggaccac	caaatcttct	tgcaccgcga	1320
aggggacgtg	gctctgcact	tggagattgt	ccagtggcaa	tgggaccgga	gccagaatcc	1380
cttcagagc	gtcgcctcct	actacccctt	gcagcgacag	ctgaagaaca	tccaagacat	1440
ctcctggcac	accgtcaaca	acacgatccc	tatgtccatg	tgttccaaga	ggtgccagtc	1500
agggcaaaa	aagaagcctg	tgggcatcca	cgtctgctgc	ttcagtgca	tgcactgcct	1560
tcccggcacc	ttcctcaacc	acactgaaga	tgaatatgaa	tgccaggcct	gcccgaataa	1620
cgagtggctc	taccagatg	agacctcctg	cttcaaggcg	cagctgggtct	tcctggaatg	1680
gcatgaggca	cccaccatcg	ctgtggccct	gctggccgcc	ctgggcttcc	tcagcacctt	1740
ggccatcctg	gtgatattct	ggaggcactt	ccagacaccc	atagttcgct	cggctggggg	1800
ccccatgtgc	ttcctgatgc	tgacactgct	gctggtggca	tacatgggtg	tcccgggtgta	1860
cgtggggcgc	cccaaggtct	ccacctgcct	ctgccgccag	gccctcttcc	ccctctgctt	1920
cacaatttgc	atctcctgta	tgcgcgtgcg	ttctttccag	atcgtctgcg	ccttcaagat	1980
ggccagccgc	ttcccacgcg	cctacagcta	ctgggtccgc	taccaggggc	cctacgtctc	2040
tatggcattt	atcacgggtac	tcaaaatggg	cattgtggta	attggcatgc	tggccacggg	2100
cctcagtccc	accacccgta	ctgacccoga	tgaccccaag	atcacatttg	tctcctgtaa	2160
ccccaaactac	cgcaacagcc	tgtgttcaa	caccagcctg	gacctgctgc	tctcagtggg	2220
gggtttcagc	ttcgcctaca	tgggcaaaaga	gctgcccacc	aactacaacg	aggccaagtt	2280
catcacccctc	agcatgacct	tctatttccac	ctcatccgtc	tccctctgca	ccttcatgtc	2340
tgcctacagc	gggtgtgctg	tcaccatcgt	ggacctcttg	gtcactgtgc	tcaacctcct	2400
ggccatcagc	ctgggctact	tcggcccca	gtgctacatg	atcctcttct	accgggagcg	2460
caacacgccc	gcctacttca	acagcatgat	ccagggttac	acctgagga	gggactag	2518

<210> 11

<211> 2577

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 11

atgccgggtt	tggtatcttt	gggcctcagt	ctggctgctt	tccctggagct	tgggatgggg	60
tccctctttgt	gtctgtcaca	gcaattcaag	gcacaagggg	actatatatt	gggtggacta	120
tttcccctgg	gcacaactga	ggaggccact	ctcaaccaga	gaacacagcc	caacggcatc	180
ctatgtacca	ggttctcgcc	ccttgggttg	ttcctggcca	tggctatgaa	gatggctgta	240
gaggagatca	acaatggatc	tgccttgctc	cctgggctgc	gactgggcta	tgacctgttt	300
gacacatgct	cagagccagt	ggtcaccatg	aagcccagcc	tcatgttcat	ggccaagggtg	360

```

ggaagtcaaa gcattgctgc ctactgcaac tacacacagt accaaccggt tgtgctggct 420
gtcattgggtc cccactcatc agagcttgcc ctcattacag gcaagttctt cagcttcttc 480
ctcatgccac aggtcagcta tagtgccagc atggatcggc taagtgaccg ggaaacattt 540
ccatccttct tccgcacagt gccagtgac cgggtgcagc tgcaggccgt tgtgacactg 600
ttgcagaatt tcagctggaa ctgggtggct gccttaggta gtgatgatga ctatggccgg 660
gaaggtctga gcatcttttc tggcttgcc aactcacgag gtatctgcat tgcacacgag 720
ggcctgggtgc cacaacatga cactagtggc caacaattgg gcaaggtggg ggatgtgcta 780
cgccaagtga accaaagcaa agtacagggt gtgggtgctgt ttgcatctgc ccgtgctgtc 840
tactcctttt ttagctacag catccttcat gacctctcac ccaaggtatg ggtggccagt 900
gagtcctggc tgacctctga cctggctatg acacttccca atattgcccg tgtgggcaact 960
gttcttgggt ttctgcagcg cgggtgcccta ctgcctgaat tttcccatta tgtggagact 1020
cgccttgccc tagctgctga cccaacattc tgtgcctccc tgaaagctga gttggatctg 1080
gaggagcgcg tgatggggcc acgctgttca caatgtgact acatcatgct acagaacctg 1140
tcacttgggc tgatgcagaa cctatcagct gggcagttgc accaccaaat atttgcaacc 1200
tatgcagctg tgtacagtgt ggctcaggcc cttoacaaca ccctgcagtg caatgtctca 1260
cattgccaca catcagagcc tggccaaccc tggcagctcc tggagaacat gtacaatatg 1320
agtttccgtg ctcgagactt gacactgcag tttgatgcca aaggagtggt agacatggaa 1380
tatgacctga agatgtgggt gtggcagagc cctacacctg tactacatac tgtaggcacc 1440
ttcaacggca ccttcagct gcagcactcg aaaatgtatt ggccaggcaa ccaggtgcca 1500
gtctccagct gctcccgcca gtgcaaagat ggccagggtg gcagagtaaa gggctttcat 1560
tcctgctgct atgactgtgt ggactgcaag gcaggagct accggaagca tccagatgac 1620
ttcacctgta ctocatgtg caaggatcag tgggtcccag aaaaaagcac aacctgctta 1680
cctcgcaggc ccaagtttct ggcttggggg gagccagctg tgctgtcact tctcctgctg 1740
ctttgectgg tgctgggcct gacactggct gccctggggc tctttgtcca ctactgggac 1800
agccctcttg ttcaggcctc aggtgggtca ctgttctgct ttggcctgat ctgcctaggc 1860
ctcttctgcc tcagtgtcct tctgttccca ggacgaccac gctctgccag ctgccttgcc 1920
caacaaccaa tggctcacct cctctcaca ggctgcctga gcacactctt cctgcaagca 1980
gccgagatct ttgtggagtc tgagctgcca ctgagttggg caaactggct ctgcagctac 2040
cttcggggcc cctgggcttg gctggtggtg ctgctggcca ctcttggtga ggctgacta 2100
tgtgcctggg acttgatggc tttccctoca gaggtggtga cagattggca ggtgctgccc 2160
acggaggtac tggaaactg ccgcatgctg tcctgggtca gcctgggctt ggtgcacatc 2220
accaatgcag tgttagcttt cctctgcttt ctgggcactt tcctggtaca gagccagcct 2280
ggtoctata accgtgcccg tggcctcacc ttcccatgct tagcttattt catcatctgg 2340
gtctcttttg tgccctcct ggctaagtgt caggtyggct accagccagc tgtgcagatg 2400
ggtgctatct tattctgtgc cctgggcac cctggccact tccacctgcc caaatgctat 2460
gtacttctgt ggctgccaga gctcaacacc caggagttct tcctgggaag gagccccaag 2520
gaagcatcag atgggaatag tggtagtagt gaggcaactc ggggacacag tgaatga 2577

```

<210> 12

<211> 137

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 12

```

Pro Ser Pro Phe Arg Asp Ile Val Ser Tyr Pro Asp Lys Ile Ile Leu
 1             5             10             15
Gly Cys Phe Met Asn Leu Lys Thr Ser Ser Val Ser Phe Val Leu Leu
             20             25             30
Leu Leu Leu Cys Leu Leu Cys Phe Ile Phe Ser Tyr Met Gly Lys Asp
             35             40             45
Leu Pro Lys Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Ala Ile Thr Phe Cys Leu Leu
             50             55             60
Leu Leu Ile Leu Thr Trp Ile Ile Phe Thr Thr Ala Ser Leu Leu Tyr

```

WO 2005/015158

PCT/US2004/025459

```

65              70              75              80
Gln Gly Lys Tyr Ile His Ser Leu Asn Ala Leu Ala Val Leu Ser Ser
              85              90              95
Ile Tyr Ser Phe Leu Leu Trp Tyr Phe Leu Pro Lys Cys Tyr Ile Ile
              100              105              110
Ile Phe Gln Pro Gln Lys Asn Thr Gln Lys Tyr Phe Gln Gly Leu Ile
              115              120              125
Gln Asp Tyr Thr Lys Thr Ile Ser Gln
              130              135

```

<210> 13
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence; note =
 synthetic construct

```

<400> 13
Phe Ala Val Asn Tyr Asn Thr Pro Val Val Arg Ser Ala Gly Gly Pro
  1              5              10              15
Met Cys Phe Leu Ile Leu Gly Cys Leu Ser Leu Cys Ser Ile Ser Val
              20              25              30
Phe Phe Tyr Phe Glu Arg Pro Thr Glu Ala Phe Cys Ile Leu Arg Phe
              35              40              45
Met Pro Phe Leu Leu Phe Tyr Ala Val Cys Leu Ala Cys Phe Ala Val
              50              55              60
Arg Ser Phe Gln Ile Val Ile Ile Phe Lys Ile Ala Ala Lys Phe Pro
65              70              75              80
Arg Val His Ser Trp Trp Met Lys Tyr His Gly Gln Trp Leu Val Ile
              85              90              95
Ser Met Thr Phe Val Leu Gln Ala Val Val Ile Val Ile Gly Phe Ser
              100              105              110
Ser Asn Pro Pro Leu Pro Tyr Xaa Xaa Phe Val Ser Tyr Pro Asp Lys
              115              120              125
Ile Ile Leu Gly Cys Asp Val Asn Leu Asn Met Ala Ser Thr Ser Phe
              130              135              140
Phe Leu Leu Leu Leu Cys Ile Leu Cys Phe Thr Phe Ser Tyr Met
145              150              155              160
Gly Lys Asp Leu Pro Lys Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Ala Ile Thr Phe
              165              170              175
Cys Leu Leu Leu Leu Ile Leu Thr Trp Ile Ile Phe Ala Thr Ala Phe
              180              185              190
Met Leu Tyr His Gly Lys Tyr Ile His Thr Leu Asn Ala Leu Ala Val
              195              200              205
Leu Ser Ser Ala Tyr Cys Phe Leu Leu Trp Tyr Phe Leu Pro Lys Cys
              210              215              220
Tyr Ile Ile Ile Phe Gln Pro His Lys Asn Thr Gln Lys Tyr Phe Gln
              225              230              235              240
Leu Ser

```

<210> 14
 <211> 165
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 14

Lys	Lys	Gln	Gly	Pro	Glu	Val	Asp	Ile	Phe	Ile	Val	Ser	Val	Thr	Ile
1				5					10					15	
Leu	Cys	Ile	Ser	Val	Leu	Gly	Val	Ala	Val	Gly	Pro	Pro	Glu	Pro	Ser
			20					25					30		
Gln	Asp	Leu	Asp	Phe	Tyr	Met	Asp	Ser	Ile	Val	Leu	Glu	Cys	Ser	Asn
		35					40					45			
Thr	Leu	Ser	Pro	Gly	Ser	Phe	Ile	Glu	Leu	Cys	Tyr	Val	Cys	Val	Leu
	50					55				60					
Ser	Val	Leu	Cys	Phe	Phe	Phe	Ser	Tyr	Met	Gly	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala
65					70					75				80	
Asn	Tyr	Asn	Glu	Ala	Lys	Cys	Val	Thr	Phe	Ser	Leu	Met	Val	Tyr	Met
				85					90					95	
Ile	Ser	Trp	Ile	Ser	Phe	Phe	Thr	Val	Tyr	Leu	Ile	Ser	Arg	Gly	Pro
			100					105					110		
Phe	Thr	Val	Ala	Ala	Tyr	Val	Cys	Ala	Thr	Leu	Val	Ser	Val	Leu	Ala
		115					120					125			
Phe	Phe	Gly	Gly	Tyr	Phe	Leu	Pro	Lys	Ile	Tyr	Ile	Ile	Val	Leu	Lys
	130					135				140					
Pro	Gln	Met	Asn	Thr	Thr	Ala	His	Phe	Gln	Asn	Cys	Ile	Gln	Met	Tyr
145					150					155				160	
Thr	Met	Ser	Lys	Gln											
				165											

<210> 15

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 15

Ala	Pro	Lys	Ser	Ser	Gln	Arg	Xaa	Leu	Arg	Arg	Thr	Arg	Leu	Xaa	Leu
1				5				10					15		
Glu	Trp	Asp	His	Pro	Met	Ser	Val	Ala	Leu	Leu	Phe	Phe	Leu	Val	Cys
			20					25					30		
Cys	Leu	Leu	Met	Thr	Ser	Ser	Ser	Ala	Val	Ile	Leu	Leu	Leu	Asn	Ile
		35					40					45			
Asn	Thr	Pro	Val	Ala	Lys	Ser	Ala	Gly	Gly	Xaa	Thr	Cys	Xaa	Leu	Lys
	50					55				60					
Leu	Ala	Ala	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	Met	Ser	Ser	Xaa	Cys	His	Phe	Gly
65					70					75				80	
Gln	Pro	Ser	Pro	Leu	Ala	Ser	Lys	Leu	Lys	Gln	Pro	Gln	Phe	Thr	Phe
				85					90					95	
Ser	Phe	Thr	Val	Cys	Leu	Ala	Cys	Asn	Arg	Cys	Ala	Leu	Ala	Thr	Gly
		100						105				110			
His	Leu	His	Phe	Xaa	Ile	Arg	Val	Ala	Leu	Pro	Pro	Ala	Tyr	Asn	Xaa
		115					120					125			
Trp	Ala	Lys	Asn	His	Gly	Pro	Xaa	Ala	Thr	Ile	Phe	Ile	Ala	Ser	Ala

```

      130              135              140
Ala Ile Leu Cys Val Leu Cys Leu Arg Val Ala Val Gly Pro Pro Gln
145              150              155              160
Pro Ser Gln Asx Leu Asx Phe Xaa Thr Asn Ser Ile Xaa Leu Xaa Xaa
      165              170              175
Ser Asn Thr Leu Ser Pro Gly Ser Phe Val Glu Leu Cys Asn Val Ser
      180              185              190
Leu Leu Ser Ala Val Cys Phe Val Phe Ser Xaa Met Gly Lys Asx Leu
      195              200              205
Pro Ala Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Cys Val Thr Phe Ser Leu Met Val
      210              215              220
Asn Xaa Ile Ser Trp Ile Ser Phe Phe Thr Val Tyr
225              230              235

```

<210> 16
 <211> 838
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence; note =
 synthetic construct

```

<400> 16
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
 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 Val 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
 His Glu Val Pro Thr Ile Val Val Ala Ile Leu Ala Ala Leu Gly Phe
 565 570 575
 Phe Ser Thr Leu Ala Ile Leu Phe Ile Phe Trp Arg His Phe Gln Thr
 580 585 590
 Pro Met Val Arg Ser Ala Gly Gly Pro Met Cys Phe Leu Met Leu Val
 595 600 605
 Pro Leu Leu Leu Ala Phe Gly Met Val Pro Val Tyr Val Gly Pro Pro
 610 615 620
 Thr Val Phe Ser Cys Phe Cys Arg Gln Ala Phe Phe Thr Val Cys Phe
 625 630 635 640
 Ser Ile Cys Leu Ser Cys Ile Thr Val Arg Ser Phe Gln Ile Val Cys
 645 650 655
 Val Phe Lys Met Ala Arg Arg Leu Pro Ser Ala Tyr Ser Phe Trp Met
 660 665 670
 Arg Tyr His Gly Pro Tyr Val Phe Val Ala Phe Ile Thr Ala Ile Lys
 675 680 685
 Val Ala Leu Val Val Gly Asn Met Leu Ala Thr Thr Ile Asn Pro Ile
 690 695 700
 Gly Arg Thr Asp Pro Asp Asp Pro Asn Ile Met Ile Leu Ser Cys His

```

705          710          715          720
Pro Asn Tyr Arg Asn Gly Leu Leu Phe Asn Thr Ser Met Asp Leu Leu
          725          730          735
Leu Ser Val Leu Gly Phe Ser Phe Ala Tyr Met Gly Lys Glu Leu Pro
          740          745          750
Thr Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Phe Ile Thr Leu Ser Met Thr Phe Ser
          755          760          765
Phe Thr Ser Ser Ile Ser Leu Cys Thr Phe Met Ser Val His Asp Gly
          770          775          780
Val Leu Val Thr Ile Met Asp Leu Leu Val Thr Val Leu Asn Phe Leu
785          790          795          800
Ala Ile Gly Leu Gly Tyr Phe Gly Pro Lys Cys Tyr Met Ile Leu Phe
          805          810          815
Tyr Pro Glu Arg Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Asn Ser Met Ile Gln Gly
          820          825          830
Tyr Thr Met Arg Lys Ser
          835

```

```

<210> 17
<211> 844
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence; note =
        synthetic construct

```

```

<400> 17
Met Gly Pro Gln Ala Arg Thr Leu Cys Leu Leu Ser Leu Leu Leu His
 1          5          10          15
Val Leu Pro Lys Pro Gly Lys Leu Val Glu Asn Ser Asp Phe His Leu
          20          25          30
Ala Gly Asp Tyr Leu Leu Gly Gly Leu Phe Thr Leu His Ala Asn Val
          35          40          45
Lys Ser Ile Ser His Leu Ser Tyr Leu Gln Val Pro Lys Cys Asn Glu
          50          55          60
Phe Thr Met Lys Val Leu Gly Tyr Asn Leu Met Gln Ala Met Arg Phe
65          70          75          80
Ala Val Glu Glu Ile Asn Asn Cys Ser Ser Leu Leu Pro Gly Val Leu
          85          90          95
Leu Gly Tyr Glu Met Val Asp Val Cys Tyr Leu Ser Asn Asn Ile His
          100          105          110
Pro Gly Leu Tyr Phe Leu Ala Gln Asp Asp Asp Leu Leu Pro Ile Leu
          115          120          125
Lys Asp Tyr Ser Gln Tyr Met Pro His Val Val Ala Val Ile Gly Pro
          130          135          140
Asp Asn Ser Glu Ser Ala Ile Thr Val Ser Asn Ile Leu Ser His Phe
145          150          155          160
Leu Ile Pro Gln Ile Thr Tyr Ser Ala Ile Ser Asp Lys Leu Arg Asp
          165          170          175
Lys Arg His Phe Pro Ser Met Leu Arg Thr Val Pro Ser Ala Thr His
          180          185          190
His Ile Glu Ala Met Val Gln Leu Met Val His Phe Gln Trp Asn Trp
          195          200          205
Ile Val Val Leu Val Ser Asp Asp Asp Tyr Gly Arg Glu Asn Ser His
          210          215          220
Leu Leu Ser Gln Arg Leu Thr Lys Thr Ser Asp Ile Cys Ile Ala Phe

```

225	230										235										240
Gln	Glu	Val	Leu	Pro	Ile	Pro	Glu	Ser	Ser	Gln	Val	Met	Arg	Ser	Glu						
				245					250					255							
Glu	Gln	Arg	Gln	Leu	Asp	Asn	Ile	Leu	Asp	Lys	Leu	Arg	Arg	Thr	Ser						
			260					265						270							
Ala	Arg	Val	Val	Val	Val	Phe	Ser	Pro	Glu	Leu	Ser	Leu	Tyr	Ser	Phe						
			275					280						285							
Phe	His	Glu	Val	Leu	Arg	Trp	Asn	Phe	Thr	Gly	Phe	Val	Trp	Ile	Ala						
			290				295				300										
Ser	Glu	Ser	Trp	Ala	Ile	Asp	Pro	Val	Leu	His	Asn	Leu	Thr	Glu	Leu						
305					310					315					320						
Arg	His	Thr	Gly	Thr	Phe	Leu	Gly	Val	Thr	Ile	Gln	Arg	Val	Ser	Ile						
				325					330					335							
Pro	Gly	Phe	Ser	Gln	Phe	Arg	Val	Arg	Arg	Asp	Lys	Pro	Gly	Tyr	Pro						
			340					345						350							
Val	Pro	Asn	Thr	Thr	Asn	Leu	Arg	Thr	Thr	Cys	Asn	Gln	Asp	Cys	Asp						
			355				360					365									
Ala	Cys	Leu	Asn	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Asn	Ile	Leu	Ile	Leu	Ser						
			370			375					380										
Gly	Glu	Arg	Val	Val	Tyr	Ser	Val	Tyr	Ser	Ala	Val	Tyr	Ala	Val	Ala						
385					390					395					400						
His	Ala	Leu	His	Arg	Leu	Leu	Gly	Cys	Asn	Arg	Val	Arg	Cys	Thr	Lys						
				405					410					415							
Gln	Lys	Val	Tyr	Pro	Trp	Gln	Leu	Leu	Arg	Glu	Ile	Trp	His	Val	Asn						
			420					425					430								
Phe	Thr	Leu	Leu	Gly	Asn	Arg	Leu	Phe	Phe	Asp	Gln	Gln	Gly	Asp	Met						
			435				440					445									
Pro	Met	Leu	Leu	Asp	Ile	Ile	Gln	Trp	Gln	Trp	Asp	Leu	Ser	Gln	Asn						
			450			455					460										
Pro	Phe	Gln	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Ser	Pro	Thr	Ser	Lys	Arg	Leu	Thr						
465					470					475					480						
Tyr	Ile	Asn	Asn	Val	Ser	Trp	Tyr	Thr	Pro	Asn	Asn	Thr	Val	Pro	Val						
				485					490					495							
Ser	Met	Cys	Ser	Lys	Ser	Cys	Gln	Pro	Gly	Gln	Met	Lys	Lys	Ser	Val						
			500					505				510									
Gly	Leu	His	Pro	Cys	Cys	Phe	Glu	Cys	Leu	Asp	Cys	Met	Pro	Gly	Thr						
			515				520					525									
Tyr	Leu	Asn	Arg	Ser	Ala	Asp	Glu	Phe	Asn	Cys	Leu	Ser	Cys	Pro	Gly						
			530			535					540										
Ser	Met	Trp	Ser	Tyr	Lys	Asn	Asp	Ile	Thr	Cys	Phe	Gln	Arg	Arg	Pro						
545					550					555					560						
Thr	Phe	Leu	Glu	Trp	Trp	His	Glu	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Val	Ala	Leu						

Phe Ile Thr Val Leu Lys Met Val Ile Val Val Ile Gly Met Leu Ala
 690 695 700
 Thr Gly Leu Ser Pro Thr Thr Arg Thr Asp Pro Asp Asp Pro Lys Ile
 705 710 715 720
 Thr Ile Val Ser Cys Asn Pro Asn Tyr Arg Asn Ser Leu Leu Phe Asn
 725 730 735
 Thr Ser Leu Asp Leu Leu Leu Ser Val Val Gly Phe Ser Phe Ala Tyr
 740 745 750

 Met Gly Lys Glu Leu Pro Thr Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Phe Ile Thr
 755 760 765
 Leu Ser Met Thr Phe Tyr Phe Thr Ser Ser Val Ser Leu Cys Thr Phe
 770 775 780
 Met Ser Ala Tyr Ser Gly Val Leu Val Thr Ile Val Asp Leu Leu Val
 785 790 795 800
 Thr Val Leu Asn Leu Leu Ala Ile Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Pro Lys
 805 810 815
 Cys Tyr Met Ile Leu Phe Tyr Pro Glu Arg Asn Thr Pro Ala Tyr Phe
 820 825 830
 Asn Ser Met Ile Gln Gly Tyr Thr Met Arg Arg Asp
 835 840

<210> 18

<211> 855

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 18

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 Glu Leu Ala Trp Gly Glu Pro Ala Val Leu Ser Leu Leu Leu
 565 570 575
 Leu Leu Cys Leu Val Leu Gly Leu Thr Leu Ala Ala Leu Gly Leu Phe
 580 585 590
 Val His Tyr Trp Asp Ser Pro Leu Val Gln Ala Ser Gly Gly Ser Leu
 595 600 605
 Phe Cys Phe Gly Leu Ile Cys Leu Gly Leu Phe Cys Leu Ser Val Leu
 610 615 620
 Leu Phe Pro Gly Arg Pro Arg Ser Ala Ser Cys Leu Ala Gln Gln Pro
 625 630 635 640
 Met Ala His Leu Pro Leu Thr Gly Cys Leu Ser Thr Leu Phe Leu Gln

```

        645          650          655
Ala Ala Glu Ile Phe Val Glu Ser Glu Leu Pro Leu Ser Trp Ala Asn
        660          665          670
Trp Leu Cys Ser Tyr Leu Arg Gly Pro Trp Ala Trp Leu Val Val Leu
        675          680          685
Leu Ala Thr Leu Val Glu Ala Ala Leu Cys Ala Trp Tyr Leu Met Ala
        690          695          700
Phe Pro Pro Glu Val Val Thr Asp Trp Gln Val Leu Pro Thr Glu Val
705          710          715          720
Leu Glu His Cys Arg Met Arg Ser Trp Val Ser Leu Gly Leu Val His
        725          730          735
Ile Thr Asn Ala Val Leu Ala Phe Leu Cys Phe Leu Gly Thr Phe Leu
        740          745          750
Val Gln Ser Gln Pro Gly Arg Tyr Asn Arg Ala Arg Gly Leu Thr Phe
        755          760          765
Ala Met Leu Ala Tyr Phe Ile Ile Trp Val Ser Phe Val Pro Leu Leu
        770          775          780
Ala Asn Val Gln Val Ala Tyr Gln Pro Ala Val Gln Met Gly Ala Ile
785          790          795          800
Leu Phe Cys Ala Leu Gly Ile Leu Ala Thr Phe His Leu Pro Lys Cys
        805          810          815
Tyr Val Leu Leu Trp Leu Pro Glu Leu Asn Thr Gln Glu Phe Phe Leu
        820          825          830
Gly Arg Ser Pro Lys Glu Ala Ser Asp Gly Asn Ser Gly Ser Ser Glu
        835          840          845
Ala Thr Arg Gly His Ser Glu
        850          855

```

<210> 19

<211> 859

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 19

```

Met Pro Gly Leu Ala Ile Leu Gly Leu Ser Leu Ala Ala Phe Leu Glu
 1          5          10          15
Leu Gly Met Gly Ser Ser Leu Cys Leu Ser Gln Gln Phe Lys Ala Gln
        20          25          30
Gly Asp Tyr Ile Leu Gly Gly Leu Phe Pro Leu Gly Thr Thr Glu Glu
        35          40          45
Ala Thr Leu Asn Gln Arg Thr Gln Pro Asn Gly Ile Leu Cys Thr Arg
        50          55          60
Phe Ser Pro Leu Gly Leu Phe Leu Ala Met Ala Met Lys Met Ala Val
65          70          75          80
Glu Glu Ile Asn Asn Gly Ser Ala Leu Leu Pro Gly Leu Arg Leu Gly
        85          90          95
Tyr Asp Leu Phe Asp Thr Cys Ser Glu Pro Val Val Thr Met Lys Pro
        100          105          110
Ser Leu Met Phe Met Ala Lys Val Gly Ser Gln Ser 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 Leu Ile Thr Gly Lys Phe Phe Ser Phe Phe

```

145 150 155 160
Leu Met Pro Gln Val Ser Tyr Ser Ala Ser Met Asp Arg Leu Ser Asp
165 170 175
Arg Glu Thr Phe Pro Ser Phe Phe Arg Thr Val Pro Ser Asp Arg Val
180 185 190
Gln Leu Gln Ala Val Val Thr Leu Leu Gln Asn Phe Ser Trp Asn Trp
195 200 205
Val Ala Ala Leu Gly Ser Asp Asp Asp Tyr Gly Arg Glu Gly Leu Ser
210 215 220
Ile Phe Ser Gly Leu Ala Asn Ser Arg Gly Ile Cys Ile Ala His Glu
225 230 235 240
Gly Leu Val Pro Gln His Asp Thr Ser Gly Gln Gln Leu Gly Lys Val
245 250 255
Val Asp Val Leu Arg Gln Val Asn Gln Ser Lys Val Gln Val Val Val
260 265 270
Leu Phe Ala Ser Ala Arg Ala Val Tyr Ser Leu Phe Ser Tyr Ser Ile
275 280 285
Leu His Asp Leu Ser Pro Lys Val Trp Val Ala Ser Glu Ser Trp Leu
290 295 300
Thr Ser Asp Leu Val Met Thr Leu Pro Asn Ile Ala Arg Val Gly Thr
305 310 315 320
Val Leu Gly Phe Leu Gln Arg Gly Ala Leu Leu Pro Glu Phe Ser His
325 330 335
Tyr Val Glu Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ala Asp Pro Thr Phe Cys Ala
340 345 350
Ser Leu Lys Ala Glu Leu Asp Leu Glu Glu Arg Val Met Gly Pro Arg
355 360 365
Cys Ser Gln Cys Asp Tyr Ile Met Leu Gln Asn Leu Ser Ser Gly Leu
370 375 380
Met Gln Asn Leu Ser Ala Gly Gln Leu His His Gln Ile Phe Ala Thr
385 390 395 400
Tyr Ala Ala Val Tyr Ser Val Ala Gln Ala Leu His Asn Thr Leu Gln
405 410 415
Cys Asn Val Ser His Cys His Thr Ser Glu Pro Val Gln Pro Trp Gln
420 425 430
Leu Leu Glu Asn Met Tyr Asn Met Ser Phe Arg Ala Arg Asp Leu Thr
435 440 445
Leu Gln Phe Asp Ala Lys Gly Ser Val Asp Met Glu Tyr Asp Leu Lys
450 455 460
Met Trp Val Trp Gln Ser Pro Thr Pro Val Leu His Thr Val Gly Thr
465 470 475 480
Phe Asn Gly Thr Leu Gln Leu Gln His Ser Lys Met Tyr Trp Pro Gly
485 490 495
Asn Gln Val Pro Val Ser Gln Cys Ser Arg Gln Cys Lys Asp Gly Gln
500 505 510
Val Arg Arg Val Lys Gly Phe His Ser Cys Cys Tyr Asp Cys Val Asp
515 520 525
Cys Lys Ala Gly Ser Tyr Arg Lys His Pro Asp Asp Phe Thr Cys Thr
530 535 540
Pro Cys Gly Lys Asp Gln Trp Ser Pro Glu Lys Ser Thr Thr Cys Leu
545 550 555 560
Pro Arg Arg Pro Lys Phe Leu Glu Leu Ala Trp Gly Glu Pro Ala Val
565 570 575
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu Ala Leu Gly Leu Val Leu Ala
580 585 590
Ala Leu Gly Leu Phe Val His His Arg Asp Ser Pro Leu Val Gln Ala
595 600 605

Ser Gly Gly Pro Leu Ala Cys Phe Gly Leu Val Cys Leu Gly Leu Val
610 615 620
Cys Leu Ser Val Leu Leu Phe Pro Gly Gln Pro Ser Pro Ala Arg Cys
625 630 635 640
Leu Ala Gln Gln Pro Leu Ser His Leu Pro Leu Thr Gly Cys Leu Ser
645 650 655
Thr Leu Phe Leu Gln Ala Ala Glu Ile Phe Val Glu Ser Glu Leu Pro
660 665 670
Leu Ser Trp Ala Asp Arg Leu Ser Gly Cys Leu Arg Gly Pro Trp Ala
675 680 685
Trp Leu Val Val Leu Leu Ala Met Leu Val Glu Val Ala Leu Cys Thr
690 695 700
Trp Tyr Leu Val Ala Phe Pro Pro Glu Val Val Thr Asp Trp His Met
705 710 715 720
Leu Pro Thr Glu Ala Leu Val His Cys Arg Thr Arg Ser Trp Val Ser
725 730 735
Phe Gly Leu Ala His Ala Thr Asn Ala Thr Leu Ala Phe Leu Cys Phe
740 745 750
Leu Gly Thr Phe Leu Val Arg Ser Gln Pro Gly Arg Tyr Asn Arg Ala
755 760 765
Arg Gly Leu Thr Phe Ala Met Leu Ala Tyr Phe Ile Thr Trp Val Ser
770 775 780
Phe Val Pro Leu Leu Ala Asn Val Gln Val Val Leu Arg Pro Ala Val
785 790 795 800
Gln Met Gly Ala Leu Leu Leu Cys Val Leu Gly Ile Leu Ala Ala Phe
805 810 815
His Leu Pro Arg Cys Tyr Leu Leu Met Arg Gln Pro Gly Leu Asn Thr
820 825 830
Pro Glu Phe Phe Leu Gly Gly Gly Pro Gly Asp Ala Gln Gly Gln Asn
835 840 845
Asp Gly Asn Thr Gly Asn Gln Gly Lys His Glu
850 855

<210> 20

<211> 841

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 20

Met Leu Leu Cys Thr Ala Arg Leu Val Gly Leu Gln Leu Leu Ile Ser
1 5 10 15
Cys Cys Trp Ala Phe Ala Cys His Ser Thr Glu Ser Ser Pro Asp Phe
20 25 30
Thr Leu Pro Gly Asp Tyr Leu Leu Ala Gly Leu Phe Pro Leu His Ser
35 40 45
Gly Cys Leu Gln Val Arg His Arg Pro Glu Val Thr Leu Cys Asp Arg
50 55 60
Ser Cys Ser Phe Asn Glu His Gly Tyr His Leu Phe Gln Ala Met Arg
65 70 75 80
Leu Gly Val Glu Glu Ile Asn Asn Ser Thr Ala Leu Leu Pro Asn Ile
85 90 95
Thr Leu Gly Tyr Gln Leu Tyr Asp Val Cys Ser Asp Ser Ala Asn Val
100 105 110

Tyr Ala Thr Leu Arg Val Leu Ser Leu Pro Gly Gln His His Ile Glu
 115 120 125
 Leu Gln Gly Asp Leu Leu His Tyr Ser Pro Thr Val Leu Ala Val Ile
 130 135 140
 Gly Pro Asp Ser Thr Asn Arg Ala Ala Thr Thr Ala Ala Leu Leu Ser
 145 150 155 160
 Pro Phe Leu Val Pro Met Ile Ser Tyr Ala Ala Ser Ser Glu Thr Leu
 165 170 175
 Ser Val Lys Arg Gln Tyr Pro Ser Phe Leu Arg Thr Ile Pro Asn Asp
 180 185 190
 Lys Tyr Gln Val Glu Thr Met Val Leu Leu Leu Gln Lys Phe Gly Trp
 195 200 205
 Thr Trp Ile Ser Leu Val Gly Ser Ser Asp Asp Tyr Gly Gln Leu Gly
 210 215 220
 Val Gln Ala Leu Glu Asn Gln Ala Thr Gly Gln Gly Ile Cys Ile Ala
 225 230 235 240
 Phe Lys Asp Ile Met Pro Phe Ser Ala Gln Val Gly Asp Glu Arg Met
 245 250 255
 Gln Cys Leu Met Arg His Leu Ala Gln Ala Gly Ala Thr Val Val Val
 260 265 270
 Val Phe Ser Ser Arg Gln Leu Ala Arg Val Phe Phe Glu Ser Val Val
 275 280 285
 Leu Thr Asn Leu Thr Gly Lys Val Trp Val Ala Ser Glu Ala Trp Ala
 290 295 300
 Leu Ser Arg His Ile Thr Gly Val Pro Gly Ile Gln Arg Ile Gly Met
 305 310 315 320
 Val Leu Gly Val Ala Ile Gln Lys Arg Ala Val Pro Gly Leu Lys Ala
 325 330 335
 Phe Glu Glu Ala Tyr Ala Arg Ala Asp Lys Lys Ala Pro Arg Pro Cys
 340 345 350
 His Lys Gly Ser Trp Cys Ser Ser Asn Gln Leu Cys Arg Glu Cys Gln
 355 360 365
 Ala Phe Met Ala His Thr Met Pro Lys Leu Lys Ala Phe Ser Met Ser
 370 375 380
 Ser Ala Tyr Asn Ala Tyr Arg Ala Val Tyr Ala Val Ala His Gly Leu
 385 390 395 400
 His Gln Leu Leu Gly Cys Ala Ser Gly Ala Cys Ser Arg Gly Arg Val
 405 410 415
 Tyr Pro Trp Gln Leu Leu Glu Gln Ile His Lys Val His Phe Leu Leu
 420 425 430
 His Lys Asp Thr Val Ala Phe Asn Asp Asn Arg Asp Pro Leu Ser Ser
 435 440 445
 Tyr Asn Ile Ile Ala Trp Asp Trp Asn Gly Pro Lys Trp Thr Phe Thr
 450 455 460
 Val Leu Gly Ser Ser Thr Trp Ser Pro Val Gln Leu Asn Ile Asn Glu
 465 470 475 480
 Thr Lys Ile Gln Trp His Gly Lys Asp Asn Gln Val Pro Lys Ser Val
 485 490 495
 Cys Ser Ser Asp Cys Leu Glu Gly His Gln Arg Val Val Thr Gly Phe
 500 505 510
 His His Cys Cys Phe Glu Cys Val Pro Cys Gly Ala Gly Thr Phe Leu
 515 520 525
 Asn Lys Ser Asp Leu Tyr Arg Cys Gln Pro Cys Gly Lys Glu Glu Trp
 530 535 540
 Ala Pro Glu Gly Ser Gln Thr Cys Phe Pro Arg Thr Val Val Phe Leu
 545 550 555 560
 Glu Trp His Glu Pro Ile Ser Leu Val Leu Ile Ala Ala Asn Thr Leu

```

                    565                    570                    575
Leu Leu Leu Leu Leu Val Gly Thr Ala Gly Leu Phe Ala Trp His Phe
                    580                    585                    590
His Thr Pro Val Val Arg Ser Ala Gly Gly Arg Leu Cys Phe Leu Met
                    595                    600                    605
Leu Gly Ser Leu Val Ala Gly Ser Cys Ser Phe Tyr Ser Phe Phe Gly
                    610                    615                    620
Glu Pro Thr Val Pro Ala Cys Leu Leu Arg Gln Pro Leu Phe Ser Leu
625                    630                    635                    640
Gly Phe Ala Ile Phe Leu Ser Cys Leu Thr Ile Arg Ser Phe Gln Leu
                    645                    650                    655
Val Ile Ile Phe Lys Phe Ser Thr Lys Val Pro Thr Phe Tyr Arg Thr
                    660                    665                    670
Trp Ala Gln Asn His Gly Ala Gly Leu Phe Val Ile Val Ser Ser Thr
                    675                    680                    685
Val His Leu Leu Ile Cys Leu Thr Trp Leu Val Met Trp Thr Pro Arg
690                    695                    700
Pro Thr Arg Glu Tyr Gln Arg Phe Pro His Leu Val Ile Leu Glu Cys
705                    710                    715                    720
Thr Glu Val Asn Ser Val Gly Phe Leu Leu Ala Phe Thr His Asn Ile
                    725                    730                    735
Leu Leu Ser Ile Ser Thr Phe Val Cys Ser Tyr Leu Gly Lys Glu Leu
                    740                    745                    750
Pro Glu Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Cys Val Thr Phe Ser Leu Leu Leu
                    755                    760                    765
Asn Phe Val Ser Trp Ile Ala Phe Phe Thr Met Ala Ser Ile Tyr Gln
770                    775                    780
Gly Ser Tyr Leu Pro Ala Val Asn Val Leu Ala Gly Leu Thr Thr Leu
785                    790                    795                    800
Ser Gly Gly Phe Ser Gly Tyr Phe Leu Pro Lys Cys Tyr Val Ile Leu
                    805                    810                    815
Cys Arg Pro Glu Leu Asn Asn Thr Glu His Phe Gln Ala Ser Ile Gln
                    820                    825                    830
Asp Tyr Thr Arg Arg Cys Gly Thr Thr
                    835                    840

```

<210> 21

<211> 840

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 21

```

Met Leu Phe Trp Ala Ala His Leu Leu Leu Ser Leu Gln Leu Val Tyr
 1                    5                    10                    15
Cys Trp Ala Phe Ser Cys Gln Arg Thr Glu Ser Ser Pro Gly Phe Ser
                    20                    25                    30
Leu Pro Gly Asp Phe Leu Leu Ala Gly Leu Phe Ser Leu His Gly Asp
                    35                    40                    45
Cys Leu Gln Val Arg His Arg Pro Leu Val Thr Ser Cys Asp Arg Pro
                    50                    55                    60
Asp Ser Phe Asn Gly His Gly Tyr His Leu Phe Gln Ala Met Arg Phe
65                    70                    75                    80
Thr Val Glu Glu Ile Asn Asn Ser Ser Ala Leu Leu Pro Asn Ile Thr

```

28

```

Met Ser Glu Leu His Ile Cys Gln Pro Cys Gly Thr Glu Glu Trp Ala
  530                      535                      540
Pro Lys Glu Ser Thr Thr Cys Phe Pro Arg Thr Val Glu Phe Leu Glu
545                      550                      555                      560
Leu Arg Glu His Thr Ser Trp Val Leu Leu Ala Ala Asn Thr Leu Leu
                      565                      570                      575
Leu Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Gly Leu Phe Ala Trp His Leu Asp
                      580                      585                      590
Thr Pro Val Val Arg Ser Ala Gly Gly Arg Leu Cys Phe Leu Met Leu
                      595                      600                      605
Gly Ser Leu Ala Ala Gly Ser Gly Ser Leu Tyr Gly Phe Phe Gly Glu
                      610                      615                      620
Pro Thr Arg Pro Ala Cys Leu Leu Arg Gln Ala Leu Phe Ala Leu Gly
625                      630                      635                      640
Phe Thr Ile Phe Leu Ser Cys Leu Thr Val Arg Ser Phe Gln Leu Ile
                      645                      650                      655
Ile Ile Phe Lys Phe Ser Thr Lys Val Pro Thr Phe Tyr His Ala Trp
                      660                      665                      670
Val Gln Asn His Gly Ala Gly Leu Phe Val Met Ile Ser Ser Ala Ala
                      675                      680                      685
Gln Leu Leu Ile Cys Leu Thr Trp Leu Val Val Trp Thr Pro Leu Pro
                      690                      695                      700
Ala Arg Glu Tyr Gln Arg Phe Pro His Leu Val Met Leu Glu Cys Thr
705                      710                      715                      720
Glu Thr Asn Ser Leu Gly Phe Ile Leu Ala Phe Leu Tyr Asn Gly Leu
                      725                      730                      735
Leu Ser Ile Ser Ala Phe Ala Cys Ser Tyr Leu Gly Lys Asp Leu Pro
                      740                      745                      750
Glu Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Cys Val Thr Phe Ser Leu Leu Phe Asn
                      755                      760                      765
Phe Val Ser Trp Ile Ala Phe Phe Thr Thr Ala Ser Val Tyr Asp Gly
                      770                      775                      780
Lys Tyr Leu Pro Ala Ala Asn Met Met Ala Gly Leu Ser Ser Leu Ser
785                      790                      795                      800
Ser Gly Phe Gly Gly Tyr Phe Leu Pro Lys Cys Tyr Val Ile Leu Cys
                      805                      810                      815
Arg Pro Asp Leu Asn Ser Thr Glu His Phe Gln Ala Ser Ile Gln Asp
                      820                      825                      830
Tyr Thr Arg Arg Cys Gly Ser Thr
                      835                      840

```

<210> 22

<211> 838

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 22

```

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
 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 Val 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
His Glu Val Pro Thr Ile Val Val Ala Ile Leu Ala Ala Leu Gly Phe
565 570 575
Phe Ser Thr Leu Ala Ile Leu Phe Ile Phe Trp Arg His Phe Gln Thr
580 585 590
Pro Met Val Arg Ser Ala Gly Gly Pro Met Cys Phe Leu Met Leu Val
595 600 605
Pro Leu Leu Leu Ala Phe Gly Met Val Pro Val Tyr Val Gly Pro Pro
610 615 620
Thr Val Phe Ser Cys Phe Cys Arg Gln Ala Phe Phe Thr Val Cys Phe
625 630 635 640
Ser Ile Cys Leu Ser Cys Ile Thr Val Arg Ser Phe Gln Ile Val Cys
645 650 655
Val Phe Lys Met Ala Arg Arg Leu Pro Ser Ala Tyr Ser Phe Trp Met
660 665 670
Arg Tyr His Gly Pro Tyr Val Phe Val Ala Phe Ile Thr Ala Ile Lys
675 680 685
Val Ala Leu Val Val Gly Asn Met Leu Ala Thr Thr Ile Asn Pro Ile
690 695 700
Gly Arg Thr Asp Pro Asp Asp Pro Asn Ile Met Ile Leu Ser Cys His
705 710 715 720
Pro Asn Tyr Arg Asn Gly Leu Leu Phe Asn Thr Ser Met Asp Leu Leu
725 730 735
Leu Ser Val Leu Gly Phe Ser Phe Ala Tyr Met Gly Lys Glu Leu Pro
740 745 750
Thr Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Phe Ile Thr Leu Ser Met Thr Phe Ser
755 760 765
Phe Thr Ser Ser Ile Ser Leu Cys Thr Phe Met Ser Val His Asp Gly
770 775 780
Val Leu Val Thr Ile Met Asp Leu Leu Val Thr Val Leu Asn Phe Leu
785 790 795 800
Ala Ile Gly Leu Gly Tyr Phe Gly Pro Lys Cys Tyr Met Ile Leu Phe
805 810 815
Tyr Pro Glu Arg Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Asn Ser Met Ile Gln Gly
820 825 830
Tyr Thr Met Arg Lys Ser
835

<210> 23
<211> 843
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 23
Met Gly Pro Gln Ala Arg Thr Leu Cys Leu Leu Ser Leu Leu Leu His
1 5 10 15
Val Leu Pro Lys Pro Gly Lys Leu Val Glu Asn Ser Asp Phe His Leu

Ala	Gly	Asp	Tyr	Leu	Leu	Gly	Gly	Leu	Phe	Thr	Leu	His	Ala	Asn	Val
			20					25					30		
Lys	Ser	Ile	Ser	His	Leu	Ser	Tyr	Leu	Gln	Val	Pro	Lys	Cys	Asn	Glu
			35					40					45		
Phe	Thr	Met	Lys	Val	Leu	Gly	Tyr	Asn	Leu	Met	Gln	Ala	Met	Arg	Phe
			50					55					60		
Ala	Val	Glu	Glu	Ile	Asn	Asn	Cys	Ser	Ser	Leu	Leu	Pro	Gly	Val	Leu
				85					90					95	
Leu	Gly	Tyr	Glu	Met	Val	Asp	Val	Cys	Tyr	Leu	Ser	Asn	Asn	Ile	His
			100					105					110		
Pro	Gly	Leu	Tyr	Phe	Leu	Ala	Gln	Asp	Asp	Asp	Leu	Leu	Pro	Ile	Leu
			115					120					125		
Lys	Asp	Tyr	Ser	Gln	Tyr	Met	Pro	His	Val	Val	Ala	Val	Ile	Gly	Pro
			130					135					140		
Asp	Asn	Ser	Glu	Ser	Ala	Ile	Thr	Val	Ser	Asn	Ile	Leu	Ser	His	Phe
			145					150					155		160
Leu	Ile	Pro	Gln	Ile	Thr	Tyr	Ser	Ala	Ile	Ser	Asp	Lys	Leu	Arg	Asp
				165					170					175	
Lys	Arg	His	Phe	Pro	Ser	Met	Leu	Arg	Thr	Val	Pro	Ser	Ala	Thr	His
			180						185					190	
His	Ile	Glu	Ala	Met	Val	Gln	Leu	Met	Val	His	Phe	Gln	Trp	Asn	Trp
			195					200					205		
Ile	Val	Val	Leu	Val	Ser	Asp	Asp	Asp	Tyr	Gly	Arg	Glu	Asn	Ser	His
			210					215					220		
Leu	Leu	Ser	Gln	Arg	Leu	Thr	Lys	Thr	Ser	Asp	Ile	Cys	Ile	Ala	Phe
			225					230					235		240
Gln	Glu	Val	Leu	Pro	Ile	Pro	Glu	Ser	Ser	Gln	Val	Met	Arg	Ser	Glu
				245					250					255	
Glu	Gln	Arg	Gln	Leu	Asp	Asn	Ile	Leu	Asp	Lys	Leu	Arg	Arg	Thr	Ser
			260						265					270	
Ala	Arg	Val	Val	Val	Val	Phe	Ser	Pro	Glu	Leu	Ser	Leu	Tyr	Ser	Phe
				275					280					285	
Phe	His	Glu	Val	Leu	Arg	Trp	Asn	Phe	Thr	Gly	Phe	Val	Trp	Ile	Ala
			290					295					300		
Ser	Glu	Ser	Trp	Ala	Ile	Asp	Pro	Val	Leu	His	Asn	Leu	Thr	Glu	Leu
			305					310					315		320
Arg	His	Thr	Gly	Thr	Phe	Leu	Gly	Val	Thr	Ile	Gln	Arg	Val	Ser	Ile
				325					330					335	
Pro	Gly	Phe	Ser	Gln	Phe	Arg	Val	Arg	Arg	Asp	Lys	Pro	Gly	Tyr	Pro
			340						345					350	
Val	Pro	Asn	Thr	Thr	Asn	Leu	Arg	Thr	Thr	Cys	Asn	Gln	Asp	Cys	Asp
			355					360					365		
Ala	Cys	Leu	Asn	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Asn	Ile	Leu	Ile	Leu	Ser
			370					375					380		
Gly	Glu	Arg	Val	Val	Tyr	Ser	Val	Tyr	Ser	Ala	Val	Tyr	Ala	Val	Ala
			385					390					395		400
His	Ala	Leu	His	Arg	Leu	Leu	Gly	Cys	Asn	Arg	Val	Arg	Cys	Thr	Lys
				405					410					415	
Gln	Lys	Val	Tyr	Pro	Trp	Gln	Leu	Leu	Arg	Glu	Ile	Trp	His	Val	Asn
			420						425				430		
Phe	Thr	Leu	Leu	Gly	Asn	Arg	Leu	Phe	Phe	Asp	Gln	Gln	Gly	Asp	Met
			435					440					445		
Pro	Met	Leu	Leu	Asp	Ile	Ile	Gln	Trp	Gln	Trp	Asp	Leu	Ser	Gln	Asn
			450					455					460		
Pro	Phe	Gln	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Ser	Pro	Thr	Ser	Lys	Arg	Leu	Thr
			465				470				475				480

Tyr Ile Asn Asn Val Ser Trp Tyr Thr Pro Asn Asn Thr Val Pro Val
485 490 495
Ser Met Cys Ser Lys Ser Cys Gln Pro Gly Gln Met Lys Lys Ser Val
500 505 510
Gly Leu His Pro Cys Cys Phe Glu Cys Leu Asp Cys Met Pro Gly Thr
515 520 525
Tyr Leu Asn Arg Ser Ala Asp Glu Phe Asn Cys Leu Ser Cys Pro Gly
530 535 540
Ser Met Trp Ser Tyr Lys Asn Asp Ile Thr Cys Phe Gln Arg Arg Pro
545 550 555 560
Thr Phe Leu Glu Trp His Glu Ala Pro Thr Ile Ala Val Ala Leu Leu
565 570 575
Ala Ala Leu Gly Phe Leu Ser Thr Leu Ala Ile Leu Val Ile Phe Trp
580 585 590
Arg His Phe Gln Thr Pro Ile Val Arg Ser Ala Gly Gly Pro Met Cys
595 600 605
Phe Leu Met Leu Thr Leu Leu Leu Val Ala Tyr Met Val Val Pro Val
610 615 620
Tyr Val Gly Pro Pro Lys Val Ser Thr Cys Leu Cys Arg Gln Ala Leu
625 630 635 640
Phe Pro Leu Cys Phe Thr Ile Cys Ile Ser Cys Ile Ala Val Arg Ser
645 650 655
Phe Gln Ile Val Cys Ala Phe Lys Met Ala Ser Arg Phe Pro Arg Ala
660 665 670
Tyr Ser Tyr Trp Val Arg Tyr Gln Gly Pro Tyr Val Ser Met Ala Phe
675 680 685
Ile Thr Val Leu Lys Met Val Ile Val Val Ile Gly Met Leu Ala Thr
690 695 700
Gly Leu Ser Pro Thr Thr Arg Thr Asp Pro Asp Asp Pro Lys Ile Thr
705 710 715 720
Ile Val Ser Cys Asn Pro Asn Tyr Arg Asn Ser Leu Leu Phe Asn Thr
725 730 735
Ser Leu Asp Leu Leu Leu Ser Val Val Gly Phe Ser Phe Ala Tyr Met
740 745 750
Gly Lys Glu Leu Pro Thr Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Phe Ile Thr Leu
755 760 765
Ser Met Thr Phe Tyr Phe Thr Ser Ser Val Ser Leu Cys Thr Phe Met
770 775 780
Ser Ala Tyr Ser Gly Val Leu Val Thr Ile Val Asp Leu Leu Val Thr
785 790 795 800
Val Leu Asn Leu Leu Ala Ile Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Pro Lys Cys
805 810 815
Tyr Met Ile Leu Phe Tyr Pro Glu Arg Asn Thr Pro Ala Tyr Phe Asn
820 825 830
Ser Met Ile Gln Gly Tyr Thr Met Arg Arg Asp
835 840

<210> 24
<211> 853
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 24

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 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
Glu Arg Leu Lys Ile Arg Trp His Thr Ser Asp Asn Gln Lys Pro Val		480
	485	490
Ser Arg Cys Ser Arg Gln Cys Gln Glu Gly Gln Val Arg Arg Val Lys		495
	500	505
Gly Phe His Ser Cys Cys Tyr Asp Cys Val Asp Cys Glu Ala Gly Ser		510
	515	520
Tyr Arg Gln Asn Pro Asp Asp Ile Ala Cys Thr Phe Cys Gly Gln Asp		525
	530	535
Glu Trp Ser Pro Glu Arg Ser Thr Arg Cys Phe Arg Arg Arg Ser Arg		540
545	550	555
Phe Leu Glu Trp Gly Glu Pro Ala Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu Leu		560
	565	570
Cys Leu Val Leu Gly Leu Thr Leu Ala Leu Gly Leu Phe Val His		575
	580	585
Tyr Trp Asp Ser Pro Leu Val Gln Ala Ser Gly Gly Ser Leu Phe Cys		590
	595	600
Phe Gly Leu Ile Cys Leu Gly Leu Phe Cys Leu Ser Val Leu Leu Phe		605
	610	615
Pro Gly Arg Pro Arg Ser Ala Ser Cys Leu Ala Gln Gln Pro Met Ala		620
625	630	635
His Leu Pro Leu Thr Gly Cys Leu Ser Thr Leu Phe Leu Gln Ala Ala		640
	645	650
Glu Ile Phe Val Glu Ser Glu Leu Pro Leu Ser Trp Ala Asn Trp Leu		655
	660	665
Cys Ser Tyr Leu Arg Gly Pro Trp Ala Trp Leu Val Val Leu Leu Ala		670
	675	680
Thr Leu Val Glu Ala Ala Leu Cys Ala Trp Tyr Leu Met Ala Phe Pro		685
	690	695
Pro Glu Val Val Thr Asp Trp Gln Val Leu Pro Thr Glu Val Leu Glu		700
705	710	715
His Cys Arg Met Arg Ser Trp Val Ser Leu Gly Leu Val His Ile Thr		720
	725	730
Asn Ala Val Leu Ala Phe Leu Cys Phe Leu Gly Thr Phe Leu Val Gln		735
	740	745
Ser Gln Pro Gly Arg Tyr Asn Arg Ala Arg Gly Leu Thr Phe Ala Met		750
	755	760
Leu Ala Tyr Phe Ile Ile Trp Val Ser Phe Val Pro Leu Leu Ala Asn		765
	770	775
Val Gln Val Ala Tyr Gln Pro Ala Val Gln Met Gly Ala Ile Leu Phe		780
785	790	795
Cys Ala Leu Gly Ile Leu Ala Thr Phe His Leu Pro Lys Cys Tyr Val		800
	805	810
Leu Leu Trp Leu Pro Glu Leu Asn Thr Gln Glu Phe Phe Leu Gly Arg		815
	820	825
Ser Pro Lys Glu Ala Ser Asp Gly Asn Ser Gly Ser Ser Glu Ala Thr		830
	835	840
Arg Gly His Ser Glu		845
850		

<210> 25
<211> 857
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 25

```

Met Pro Gly Leu Ala Ile Leu Gly Leu Ser Leu Ala Ala Phe Leu Glu
 1           5           10           15
Leu Gly Met Gly Ser Ser Leu Cys Leu Ser Gln Gln Phe Lys Ala Gln
           20           25           30
Gly Asp Tyr Ile Leu Gly Gly Leu Phe Pro Leu Gly Thr Thr Glu Glu
           35           40           45
Ala Thr Leu Asn Gln Arg Thr Gln Pro Asn Gly Ile Leu Cys Thr Arg
           50           55           60
Phe Ser Pro Leu Gly Leu Phe Leu Ala Met Ala Met Lys Met Ala Val
65           70           75           80
Glu Glu Ile Asn Asn Gly Ser Ala Leu Leu Pro Gly Leu Arg Leu Gly
           85           90           95
Tyr Asp Leu Phe Asp Thr Cys Ser Glu Pro Val Val Thr Met Lys Pro
           100          105          110
Ser Leu Met Phe Met Ala Lys Val Gly Ser Gln Ser 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 Leu Ile Thr Gly Lys Phe Phe Ser Phe Phe
145          150          155          160
Leu Met Pro Gln Val Ser Tyr Ser Ala Ser Met Asp Arg Leu Ser Asp
           165          170          175
Arg Glu Thr Phe Pro Ser Phe Phe Arg Thr Val Pro Ser Asp Arg Val
           180          185          190
Gln Leu Gln Ala Val Val Thr Leu Leu Gln Asn Phe Ser Trp Asn Trp
           195          200          205
Val Ala Ala Leu Gly Ser Asp Asp Asp Tyr Gly Arg Glu Gly Leu Ser
           210          215          220
Ile Phe Ser Gly Leu Ala Asn Ser Arg Gly Ile Cys Ile Ala His Glu
225          230          235          240
Gly Leu Val Pro Gln His Asp Thr Ser Gly Gln Gln Leu Gly Lys Val
           245          250          255
Val Asp Val Leu Arg Gln Val Asn Gln Ser Lys Val Gln Val Val Val
           260          265          270
Leu Phe Ala Ser Ala Arg Ala Val Tyr Ser Leu Phe Ser Tyr Ser Ile
           275          280          285
Leu His Asp Leu Ser Pro Lys Val Trp Val Ala Ser Glu Ser Trp Leu
           290          295          300
Thr Ser Asp Leu Val Met Thr Leu Pro Asn Ile Ala Arg Val Gly Thr
305          310          315          320
Val Leu Gly Phe Leu Gln Arg Gly Ala Leu Leu Pro Glu Phe Ser His
           325          330          335
Tyr Val Glu Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ala Asp Pro Thr Phe Cys Ala
           340          345          350
Ser Leu Lys Ala Glu Leu Asp Leu Glu Glu Arg Val Met Gly Pro Arg
           355          360          365
Cys Ser Gln Cys Asp Tyr Ile Met Leu Gln Asn Leu Ser Ser Gly Leu
           370          375          380
Met Gln Asn Leu Ser Ala Gly Gln Leu His His Gln Ile Phe Ala Thr
385          390          395          400

```

Tyr Ala Ala Val Tyr Ser Val Ala Gln Ala Leu His Asn Thr Leu Gln
 405 410 415
 Cys Asn Val Ser His Cys His Thr Ser Glu Pro Val Gln Pro Trp Gln
 420 425 430
 Leu Leu Glu Asn Met Tyr Asn Met Ser Phe Arg Ala Arg Asp Leu Thr
 435 440 445
 Leu Gln Phe Asp Ala Lys Gly Ser Val Asp Met Glu Tyr Asp Leu Lys
 450 455 460
 Met Trp Val Trp Gln Ser Pro Thr Pro Val Leu His Thr Val Gly Thr
 465 470 475 480
 Phe Asn Gly Thr Leu Gln Leu Gln His Ser Lys Met Tyr Trp Pro Gly
 485 490 495
 Asn Gln Val Pro Val Ser Gln Cys Ser Arg Gln Cys Lys Asp Gly Gln
 500 505 510
 Val Arg Arg Val Lys Gly Phe His Ser Cys Cys Tyr Asp Cys Val Asp
 515 520 525
 Cys Lys Ala Gly Ser Tyr Arg Lys His Pro Asp Asp Phe Thr Cys Thr
 530 535 540
 Pro Cys Gly Lys Asp Gln Trp Ser Pro Glu Lys Ser Thr Thr Cys Leu
 545 550 555 560
 Pro Arg Arg Pro Lys Phe Leu Glu Trp Gly Glu Pro Ala Val Leu Leu
 565 570 575
 Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu Ala Leu Gly Leu Val Leu Ala Ala Leu
 580 585 590
 Gly Leu Phe Val His His Arg Asp Ser Pro Leu Val Gln Ala Ser Gly
 595 600 605
 Gly Pro Leu Ala Cys Phe Gly Leu Val Cys Leu Gly Leu Val Cys Leu
 610 615 620
 Ser Val Leu Leu Phe Pro Gly Gln Pro Ser Pro Ala Arg Cys Leu Ala
 625 630 635 640
 Gln Gln Pro Leu Ser His Leu Pro Leu Thr Gly Cys Leu Ser Thr Leu
 645 650 655
 Phe Leu Gln Ala Ala Glu Ile Phe Val Glu Ser Glu Leu Pro Leu Ser
 660 665 670
 Trp Ala Asp Arg Leu Ser Gly Cys Leu Arg Gly Pro Trp Ala Trp Leu
 675 680 685
 Val Val Leu Leu Ala Met Leu Val Glu Val Ala Leu Cys Thr Trp Tyr
 690 695 700
 Leu Val Ala Phe Pro Pro Glu Val Val Thr Asp Trp His Met Leu Pro
 705 710 715 720
 Thr Glu Ala Leu Val His Cys Arg Thr Arg Ser Trp Val Ser Phe Gly
 725 730 735
 Leu Ala His Ala Thr Asn Ala Thr Leu Ala Phe Leu Cys Phe Leu Gly
 740 745 750
 Thr Phe Leu Val Arg Ser Gln Pro Gly Arg Tyr Asn Arg Ala Arg Gly
 755 760 765
 Leu Thr Phe Ala Met Leu Ala Tyr Phe Ile Thr Trp Val Ser Phe Val
 770 775 780
 Pro Leu Leu Ala Asn Val Gln Val Val Leu Arg Pro Ala Val Gln Met
 785 790 795 800
 Gly Ala Leu Leu Leu Cys Val Leu Gly Ile Leu Ala Ala Phe His Leu
 805 810 815
 Pro Arg Cys Tyr Leu Leu Met Arg Gln Pro Gly Leu Asn Thr Pro Glu
 820 825 830
 Phe Phe Leu Gly Gly Gly Pro Gly Asp Ala Gln Gly Gln Asn Asp Gly
 835 840 845
 Asn Thr Gly Asn Gln Gly Lys His Glu

850 855

<210> 26
<211> 840
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 26
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
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 Val 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
Leu Arg Glu His Thr Ser Trp Val Leu Leu Ala Ala Asn Thr Leu Leu
      565      570      575
Leu Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Gly Leu Phe Ala Trp His Leu Asp
      580      585      590
Thr Pro Val Val Arg Ser Ala Gly Gly Arg Leu Cys Phe Leu Met Leu
      595      600      605
Gly Ser Leu Ala Ala Gly Ser Gly Ser Leu Tyr Gly Phe Phe Gly Glu
      610      615      620
Pro Thr Arg Pro Ala Cys Leu Leu Arg Gln Ala Leu Phe Ala Leu Gly
  625      630      635      640
Phe Thr Ile Phe Leu Ser Cys Leu Thr Val Arg Ser Phe Gln Leu Ile
      645      650      655
Ile Ile Phe Lys Phe Ser Thr Lys Val Pro Thr Phe Tyr His Ala Trp
      660      665      670
Val Gln Asn His Gly Ala Gly Leu Phe Val Met Ile Ser Ser Ala Ala
      675      680      685
Gln Leu Leu Ile Cys Leu Thr Trp Leu Val Val Trp Thr Pro Leu Pro
      690      695      700
Ala Arg Glu Tyr Gln Arg Phe Pro His Leu Val Met Leu Glu Cys Thr
  705      710      715      720
Glu Thr Asn Ser Leu Gly Phe Ile Leu Ala Phe Leu Tyr Asn Gly Leu
      725      730      735
Leu Ser Ile Ser Ala Phe Ala Cys Ser Tyr Leu Gly Lys Asp Leu Pro
      740      745      750
Glu Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Cys Val Thr Phe Ser Leu Leu Phe Asn
      755      760      765
Phe Val Ser Trp Ile Ala Phe Phe Thr Thr Ala Ser Val Tyr Asp Gly
      770      775      780
Lys Tyr Leu Pro Ala Ala Asn Met Met Ala Gly Leu Ser Ser Leu Ser
  785      790      795      800

```

Ser Gly Phe Gly Gly Tyr Phe Leu Pro Lys Cys Tyr Val Ile Leu Cys
805 810 815
Arg Pro Asp Leu Asn Ser Thr Glu His Phe Gln Ala Ser Ile Gln Asp
820 825 830
Tyr Thr Arg Arg Cys Gly Ser Thr
835 840

<210> 27
<211> 840
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 27
Met Leu Leu Cys Thr Ala Arg Leu Val Gly Leu Gln Leu Leu Ile Ser
1 5 10 15
Cys Cys Trp Ala Phe Ala Cys His Ser Thr Glu Ser Ser Pro Asp Phe
20 25 30
Thr Leu Pro Gly Asp Tyr Leu Leu Ala Gly Leu Phe Pro Leu His Ser
35 40 45
Gly Cys Leu Gln Val Arg His Arg Pro Glu Val Thr Leu Cys Asp Arg
50 55 60
Ser Cys Ser Phe Asn Glu His Gly Tyr His Leu Phe Gln Ala Met Arg
65 70 75 80
Leu Gly Val Glu Glu Ile Asn Asn Ser Thr Ala Leu Leu Pro Asn Ile
85 90 95
Thr Leu Gly Tyr Gln Leu Tyr Asp Val Cys Ser Asp Ser Ala Asn Val
100 105 110
Tyr Ala Thr Leu Arg Val Leu Ser Leu Pro Gly Gln His His Ile Glu
115 120 125
Leu Gln Gly Asp Leu Leu His Tyr Ser Pro Thr Val Leu Ala Val Ile
130 135 140
Gly Pro Asp Ser Thr Asn Arg Ala Ala Thr Thr Ala Ala Leu Leu Ser
145 150 155 160
Pro Phe Leu Val Pro Met Ile Ser Tyr Ala Ala Ser Ser Glu Thr Leu
165 170 175
Ser Val Lys Arg Gln Tyr Pro Ser Phe Leu Arg Thr Ile Pro Asn Asp
180 185 190
Lys Tyr Gln Val Glu Thr Met Val Leu Leu Leu Gln Lys Phe Gly Trp
195 200 205
Thr Trp Ile Ser Leu Val Gly Ser Ser Asp Asp Tyr Gly Gln Leu Gly
210 215 220
Val Gln Ala Leu Glu Asn Gln Ala Thr Gly Gln Gly Ile Cys Ile Ala
225 230 235 240
Phe Lys Asp Ile Met Pro Phe Ser Ala Gln Val Gly Asp Glu Arg Met
245 250 255
Gln Cys Leu Met Arg His Leu Ala Gln Ala Gly Ala Thr Val Val Val
260 265 270
Val Phe Ser Ser Arg Gln Leu Ala Arg Val Phe Phe Glu Ser Val Val
275 280 285
Leu Thr Asn Leu Thr Gly Lys Val Trp Val Ala Ser Glu Ala Trp Ala
290 295 300
Leu Ser Arg His Ile Thr Gly Val Pro Gly Ile Gln Arg Ile Gly Met
305 310 315 320

Val Leu Gly Val Ala Ile Gln Lys Arg Ala Val Pro Gly Leu Lys Ala
 325 330 335
 Phe Glu Glu Ala Tyr Ala Arg Ala Asp Lys Lys Ala Pro Arg Pro Cys
 340 345 350
 His Lys Gly Ser Trp Cys Ser Ser Asn Gln Leu Cys Arg Glu Cys Gln
 355 360 365
 Ala Phe Met Ala His Thr Met Pro Lys Leu Lys Ala Phe Ser Met Ser
 370 375 380
 Ser Ala Tyr Asn Ala Tyr Arg Ala Val Tyr Ala Val Ala His Gly Leu
 385 390 395 400
 His Gln Leu Leu Gly Cys Ala Ser Gly Ala Cys Ser Arg Gly Arg Val
 405 410 415
 Tyr Pro Trp Gln Leu Leu Glu Gln Ile His Lys Val His Phe Leu Leu
 420 425 430
 His Lys Asp Thr Val Ala Phe Asn Asp Asn Arg Asp Pro Leu Ser Ser
 435 440 445
 Tyr Asn Ile Ile Ala Trp Asp Trp Asn Gly Pro Lys Trp Thr Phe Thr
 450 455 460
 Val Leu Gly Ser Ser Thr Trp Ser Pro Val Gln Leu Asn Ile Asn Glu
 465 470 475 480
 Thr Lys Ile Gln Trp His Gly Lys Asp Asn Gln Val Pro Lys Ser Val
 485 490 495
 Cys Ser Ser Asp Cys Leu Glu Gly His Gln Arg Val Val Thr Gly Phe
 500 505 510
 His His Cys Cys Phe Glu Cys Val Pro Cys Gly Ala Gly Thr Phe Leu
 515 520 525
 Asn Lys Ser Asp Leu Tyr Arg Cys Gln Pro Cys Gly Lys Glu Glu Trp
 530 535 540
 Ala Pro Glu Gly Ser Gln Thr Cys Phe Pro Arg Thr Val Val Phe Leu
 545 550 555 560
 Glu Trp His Glu Ala Pro Thr Ile Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Leu
 565 570 575
 Gly Phe Leu Ser Thr Leu Ala Ile Leu Val Ile Phe Trp Arg His Phe
 580 585 590
 Gln Thr Pro Ile Val Arg Ser Ala Gly Gly Pro Met Cys Phe Leu Met
 595 600 605
 Leu Thr Leu Leu Leu Val Ala Tyr Met Val Val Pro Val Tyr Val Gly
 610 615 620
 Pro Pro Lys Val Ser Thr Cys Leu Cys Arg Gln Ala Leu Phe Pro Leu
 625 630 635 640
 Cys Phe Thr Ile Cys Ile Ser Cys Ile Ala Val Arg Ser Phe Gln Ile
 645 650 655
 Val Cys Ala Phe Lys Met Ala Ser Arg Phe Pro Arg Ala Tyr Ser Tyr
 660 665 670
 Trp Val Arg Tyr Gln Gly Pro Tyr Val Ser Met Ala Phe Ile Thr Val
 675 680 685
 Leu Lys Met Val Ile Val Val Ile Gly Met Leu Ala Thr Gly Leu Ser
 690 695 700
 Pro Thr Thr Arg Thr Asp Pro Asp Asp Pro Lys Ile Thr Ile Val Ser
 705 710 715 720
 Cys Asn Pro Asn Tyr Arg Asn Ser Leu Leu Phe Asn Thr Ser Leu Asp
 725 730 735
 Leu Leu Leu Ser Val Val Gly Phe Ser Phe Ala Tyr Met Gly Lys Glu
 740 745 750
 Leu Pro Thr Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Phe Ile Thr Leu Ser Met Thr
 755 760 765
 Phe Tyr Phe Thr Ser Ser Val Ser Leu Cys Thr Phe Met Ser Ala Tyr

770	775	780
Ser Gly Val Leu Val Thr Ile Val Asp Leu Leu Val Thr Val Leu Asn		
785	790	795
Leu Leu Ala Ile Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Pro Lys Cys Tyr Met Ile		800
	805	810
Leu Phe Tyr Pro Glu Arg Asn Thr Pro Ala Tyr Phe Asn Ser Met Ile		815
	820	825
Gln Gly Tyr Thr Met Arg Arg Asp		830
	835	840

<210> 28
 <211> 1123
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence; note =
 synthetic construct

<400> 28

Leu Gln Val Arg His Arg Pro Glu Val Thr Leu Cys Asp Arg Ser Cys		
1	5	10
Ser Phe Asn Glu His Gly Tyr His Leu Phe Gln Ala Met Arg Leu Gly		15
	20	25
Val Glu Glu Ile Asn Asn Ser Thr Ala Leu Leu Pro Asn Ile Thr Leu		30
	35	40
Gly Tyr Gln Leu Tyr Asp Val Cys Ser Asp Ser Ala Asn Val Tyr Ala		45
	50	55
Thr Leu Arg Val Leu Ser Leu Pro Gly Gln His Ile Glu Leu Gln		60
	65	70
Gly Asp Leu Leu His Tyr Ser Pro Thr Val Leu Ala Val Ile Gly Pro		75
	80	85
Asp Ser Thr Asn Arg Ala Ala Thr Thr Ala Ala Leu Leu Ser Pro Phe		90
	95	100
Leu Val Pro Met Ile Ser Tyr Ala Ala Ser Ser Glu Thr Leu Ser Val		105
	110	115
Lys Arg Gln Tyr Pro Ser Phe Leu Arg Thr Ile Pro Asn Asp Lys Tyr		120
	125	130
Gln Val Glu Thr Met Val Leu Leu Leu Gln Lys Phe Gly Trp Thr Trp		135
	140	145
Ile Ser Leu Val Gly Ser Ser Asp Asp Tyr Gly Gln Leu Gly Val Gln		150
	155	160
Ala Leu Glu Asn Gln Ala Thr Gly Gln Gly Ile Cys Ile Ala Phe Lys		165
	170	175
Asp Ile Met Pro Phe Ser Ala Gln Val Gly Asp Glu Arg Met Gln Cys		180
	185	190
Leu Met Arg His Leu Ala Gln Ala Gly Ala Thr Val Val Val Val Phe		195
	200	205
Ser Ser Arg Gln Leu Ala Arg Val Phe Phe Glu Ser Val Val Leu Thr		210
	215	220
Asn Leu Thr Gly Lys Val Trp Val Ala Ser Glu Ala Trp Ala Leu Ser		225
	230	235
Arg His Ile Thr Gly Val Pro Gly Ile Gln Arg Ile Gly Met Val Leu		240
	245	250
Gly Val Ala Ile Gln Lys Arg Ala Val Pro Gly Leu Lys Ala Phe Glu		255
	260	265
Glu Ala Tyr Ala Arg Ala Asp Lys Lys Ala Pro Arg Pro Cys His Lys		270
	275	280
	285	

290		295		300
Gly Ser Trp Cys Ser Ser Asn Gln Leu Cys Arg Glu Cys Gln Ala Phe				
305		310		315
Met Ala His Thr Met Pro Lys Leu Lys Ala Phe Ser Met Ser Ser Ala				320
		325		330
Tyr Asn Ala Tyr Arg Ala Val Tyr Ala Val Ala His Gly Leu His Gln				335
		340		345
Leu Leu Gly Cys Ala Ser Gly Ala Cys Ser Arg Gly Arg Val Tyr Pro				350
		355		360
Trp Gln Leu Leu Glu Gln Ile His Lys Val His Phe Leu Leu His Lys				365
		370		375
Asp Thr Val Ala Phe Asn Asp Asn Arg Asp Pro Leu Ser Ser Tyr Asn				380
385		390		395
Ile Ile Ala Trp Asp Trp Asn Gly Pro Lys Trp Thr Phe Thr Val Leu				400
		405		410
Gly Ser Ser Thr Trp Ser Pro Val Gln Leu Asn Ile Asn Glu Thr Lys				415
		420		425
Ile Gln Trp His Gly Lys Asp Asn Gln Val Pro Lys Ser Val Cys Ser				430
		435		440
Ser Asp Cys Leu Glu Gly His Gln Arg Val Val Thr Gly Phe His His				445
		450		455
Cys Cys Phe Glu Cys Val Pro Cys Gly Ala Gly Thr Phe Leu Asn Lys				460
465		470		475
Ser Asp Leu Tyr Arg Cys Gln Pro Cys Gly Lys Glu Glu Trp Ala Pro				480
		485		490
Glu Gly Ser Gln Thr Cys Phe Pro Arg Thr Val Val Phe Leu Glu Trp				495
		500		505
Ser Asp Ile Glu Ser Ile Ile Ala Ile Ala Phe Ser Cys Leu Gly Ile				510
		515		520
Leu Val Thr Leu Phe Val Thr Leu Ile Phe Val Leu Tyr Arg Asp Thr				525
		530		535
Pro Val Val Lys Ser Ser Ser Arg Glu Leu Cys Tyr Ile Ile Leu Ala				540
545		550		555
Gly Ile Phe Leu Gly Tyr Val Cys Pro Phe Thr Leu Ile Ala Lys Pro				560
		565		570
Thr Thr Thr Ser Cys Tyr Leu Gln Arg Leu Leu Val Gly Leu Ser Ser				575
		580		585
Ala Met Cys Tyr Ser Ala Leu Val Thr Lys Thr Asn Arg Ile Ala Arg				590
		595		600
Ile Leu Ala Gly Ser Lys Lys Lys Ile Cys Thr Arg Lys Pro Arg Phe				605
		610		615
Met Ser Ala Trp Ala Gln Val Ile Ile Ala Ser Ile Leu Ile Ser Val				620
625		630		635
Gln Leu Thr Leu Val Val Thr Leu Ile Ile Met Glu Pro Pro Met Pro				640
		645		650
Ile Leu Ser Tyr Pro Ser Ile Lys Glu Val Tyr Leu Ile Cys Asn Thr				655
		660		665
Ser Asn Leu Gly Val Val Ala Pro Val Gly Tyr Asn Gly Leu Leu Ile				670
		675		680
Met Ser Cys Thr Tyr Tyr Ala Phe Lys Thr Arg Asn Val Pro Ala Asn				685
		690		695
Phe Asn Glu Ala Lys Tyr Ile Ala Phe Thr Met Tyr Thr Thr Cys Ile				700
705		710		715
Ile Trp Leu Ala Phe Val Pro Ile Tyr Phe Gly Ser Asn Tyr Lys Ile				720
		725		730
Ile Thr Thr Cys Phe Ala Val Ser Leu Ser Val Thr Val Ala Leu Gly				735
		740		745
				750

Cys Met Phe Thr Pro Lys Met Tyr Ile Ile Ile Ala Lys Pro Glu Arg
 755 760 765
 Asn Val Arg Ser Ala Phe Thr Thr Ser Asp Val Val Arg Met His Val
 770 775 780
 Gly Asp Gly Lys Leu Pro Cys Arg Ser Asn Thr Phe Leu Asn Ile Phe
 785 790 795 800
 Arg Arg Lys Lys Pro Gly Ala Gly Asn Ala Asn Ser Asn Gly Lys Ser
 805 810 815
 Val Ser Trp Ser Glu Pro Gly Gly Arg Gln Ala Pro Lys Gly Gln His
 820 825 830
 Val Trp Gln Arg Leu Ser Val His Val Lys Thr Asn Glu Thr Ala Cys
 835 840 845
 Asn Gln Thr Ala Val Ile Lys Pro Leu Thr Lys Ser Tyr Gln Gly Ser
 850 855 860
 Gly Lys Ser Leu Thr Phe Ser Asp Ala Ser Thr Lys Thr Leu Tyr Asn
 865 870 875 880
 Val Glu Glu Glu Asp Asn Thr Pro Ser Ala His Phe Ser Pro Pro Ser
 885 890 895
 Ser Pro Ser Met Val Val His Arg Arg Gly Pro Pro Val Ala Thr Thr
 900 905 910
 Pro Pro Leu Pro Pro His Leu Thr Ala Glu Glu Thr Pro Leu Phe Leu
 915 920 925
 Ala Asp Ser Val Ile Pro Lys Gly Leu Pro Pro Pro Leu Pro Gln Gln
 930 935 940
 Gln Pro Gln Gln Pro Pro Pro Gln Gln Pro Pro Gln Gln Pro Lys Ser
 945 950 955 960
 Leu Met Asp Gln Leu Gln Gly Val Val Thr Asn Phe Gly Ser Gly Ile
 965 970 975
 Pro Asp Phe His Ala Val Leu Ala Gly Pro Gly Thr Pro Gly Asn Ser
 980 985 990
 Leu Arg Ser Leu Tyr Pro Pro Pro Pro Pro Gln His Leu Gln Met
 995 1000 1005
 Leu Pro Leu His Leu Ser Thr Phe Gln Glu Glu Ser Ile Ser Pro Pro
 1010 1015 1020
 Gly Glu Asp Ile Asp Asp Asp Ser Glu Arg Phe Lys Leu Leu Gln Glu
 1025 1030 1035 1040
 Phe Val Tyr Glu Arg Glu Gly Asn Thr Glu Glu Asp Glu Leu Glu Glu
 1045 1050 1055
 Glu Glu Asp Leu Pro Thr Ala Ser Lys Leu Thr Pro Glu Asp Ser Pro
 1060 1065 1070
 Ala Leu Thr Pro Pro Ser Pro Phe Arg Asp Ser Val Ala Ser Gly Ser
 1075 1080 1085
 Ser Val Pro Ser Ser Pro Val Ser Glu Ser Val Leu Cys Thr Pro Pro
 1090 1095 1100
 Asn Val Thr Tyr Ala Ser Val Ile Leu Arg Asp Tyr Lys Gln Ser Ser
 1105 1110 1115 1120
 Ser Thr Leu

<210> 29

<211> 1172

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

 <223> Description of Artificial Sequence; note =
 synthetic construct

<400> 29
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
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	Val	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	Ser	Asp	Ile	Glu	Ser	Ile	Ile	Ala	Ile	Ala	Phe	Ser	Cys	Leu	Gly
			565						570					575	
Ile	Leu	Val	Thr	Leu	Phe	Val	Thr	Leu	Ile	Phe	Val	Leu	Tyr	Arg	Asp
		580						585					590		
Thr	Pro	Val	Lys	Ser	Ser	Ser	Arg	Glu	Leu	Cys	Tyr	Ile	Ile	Leu	
	595					600					605				
Ala	Gly	Ile	Phe	Leu	Gly	Tyr	Val	Cys	Pro	Phe	Thr	Leu	Ile	Ala	Lys
	610					615				620					
Pro	Thr	Thr	Thr	Ser	Cys	Tyr	Leu	Gln	Arg	Leu	Leu	Val	Gly	Leu	Ser
625					630					635				640	
Ser	Ala	Met	Cys	Tyr	Ser	Ala	Leu	Val	Thr	Lys	Thr	Asn	Arg	Ile	Ala
			645						650					655	
Arg	Ile	Leu	Ala	Gly	Ser	Lys	Lys	Lys	Ile	Cys	Thr	Arg	Lys	Pro	Arg
		660					665						670		
Phe	Met	Ser	Ala	Trp	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Ala	Ser	Ile	Leu	Ile	Ser
	675						680					685			
Val	Gln	Leu	Thr	Leu	Val	Val	Thr	Leu	Ile	Ile	Met	Glu	Pro	Pro	Met
	690					695					700				
Pro	Ile	Leu	Ser	Tyr	Pro	Ser	Ile	Lys	Glu	Val	Tyr	Leu	Ile	Cys	Asn
705					710					715				720	
Thr	Ser	Asn	Leu	Gly	Val	Val	Ala	Pro	Val	Gly	Tyr	Asn	Gly	Leu	Leu
			725						730					735	
Ile	Met	Ser	Cys	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Phe	Lys	Thr	Arg	Asn	Val	Pro	Ala
		740						745					750		
Asn	Phe	Asn	Glu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Ala	Phe	Thr	Met	Tyr	Thr	Thr	Cys
	755						760					765			
Ile	Ile	Trp	Leu	Ala	Phe	Val	Pro	Ile	Tyr	Phe	Gly	Ser	Asn	Tyr	Lys
	770					775					780				
Ile	Ile	Thr	Thr	Cys	Phe	Ala	Val	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Val	Ala	Leu
785					790					795				800	
Gly	Cys	Met	Phe	Thr	Pro	Lys	Met	Tyr	Ile	Ile	Ile	Ala	Lys	Pro	Glu
			805						810					815	
Arg	Asn	Val	Arg	Ser	Ala	Phe	Thr	Thr	Ser	Asp	Val	Val	Arg	Met	His
		820						825					830		
Val	Gly	Asp	Gly	Lys	Leu	Pro	Cys	Arg	Ser	Asn	Thr	Phe	Leu	Asn	Ile
	835						840					845			
Phe	Arg	Arg	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Gly	Asn	Ala	Asn	Ser	Asn	Gly	Lys
	850					855				860					
Ser	Val	Ser	Trp	Ser	Glu	Pro	Gly	Gly	Arg	Gln	Ala	Pro	Lys	Gly	Gln
865					870					875				880	
His	Val	Trp	Gln	Arg	Leu	Ser	Val	His	Val	Lys	Thr	Asn	Glu	Thr	Ala
			885						890					895	

Cys Asn Gln Thr Ala Val Ile Lys Pro Leu Thr Lys Ser Tyr Gln Gly
 900 905 910
 Ser Gly Lys Ser Leu Thr Phe Ser Asp Ala Ser Thr Lys Thr Leu Tyr
 915 920 925
 Asn Val Glu Glu Glu Asp Asn Thr Pro Ser Ala His Phe Ser Pro Pro
 930 935 940
 Ser Ser Pro Ser Met Val Val His Arg Arg Gly Pro Pro Val Ala Thr
 945 950 955 960
 Thr Pro Pro Leu Pro Pro His Leu Thr Ala Glu Glu Thr Pro Leu Phe
 965 970 975
 Leu Ala Asp Ser Val Ile Pro Lys Gly Leu Pro Pro Pro Leu Pro Gln
 980 985 990
 Gln Gln Pro Gln Gln Pro Pro Pro Gln Gln Pro Pro Gln Gln Pro Lys
 995 1000 1005
 Ser Leu Met Asp Gln Leu Gln Gly Val Val Thr Asn Phe Gly Ser Gly
 1010 1015 1020
 Ile Pro Asp Phe His Ala Val Leu Ala Gly Pro Gly Thr Pro Gly Asn
 1025 1030 1035 1040
 Ser Leu Arg Ser Leu Tyr Pro Pro Pro Pro Pro Gln His Leu Gln
 1045 1050 1055
 Met Leu Pro Leu His Leu Ser Thr Phe Gln Glu Glu Ser Ile Ser Pro
 1060 1065 1070
 Pro Gly Glu Asp Ile Asp Asp Asp Ser Glu Arg Phe Lys Leu Leu Gln
 1075 1080 1085
 Glu Phe Val Tyr Glu Arg Glu Gly Asn Thr Glu Glu Asp Glu Leu Glu
 1090 1095 1100
 Glu Glu Glu Asp Leu Pro Thr Ala Ser Lys Leu Thr Pro Glu Asp Ser
 1105 1110 1115 1120
 Pro Ala Leu Thr Pro Pro Ser Pro Phe Arg Asp Ser Val Ala Ser Gly
 1125 1130 1135
 Ser Ser Val Pro Ser Ser Pro Val Ser Glu Ser Val Leu Cys Thr Pro
 1140 1145 1150
 Pro Asn Val Thr Tyr Ala Ser Val Ile Leu Arg Asp Tyr Lys Gln Ser
 1155 1160 1165
 Ser Ser Thr Leu
 1170

<210> 30

<211> 1175

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 30

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 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 Glu Trp Ser Asp Ile Glu Ser Ile Ile Ala Ile Ala Phe Ser
565 570 575
Cys Leu Gly Ile Leu Val Thr Leu Phe Val Thr Leu Ile Phe Val Leu
580 585 590
Tyr Arg Asp Thr Pro Val Val Lys Ser Ser Ser Arg Glu Leu Cys Tyr
595 600 605
Ile Ile Leu Ala Gly Ile Phe Leu Gly Tyr Val Cys Pro Phe Thr Leu
610 615 620
Ile Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ser Cys Tyr Leu Gln Arg Leu Leu Val
625 630 635 640
Gly Leu Ser Ser Ala Met Cys Tyr Ser Ala Leu Val Thr Lys Thr Asn
645 650 655
Arg Ile Ala Arg Ile Leu Ala Gly Ser Lys Lys Lys Ile Cys Thr Arg
660 665 670
Lys Pro Arg Phe Met Ser Ala Trp Ala Gln Val Ile Ile Ala Ser Ile
675 680 685
Leu Ile Ser Val Gln Leu Thr Leu Val Val Thr Leu Ile Ile Met Glu
690 695 700
Pro Pro Met Pro Ile Leu Ser Tyr Pro Ser Ile Lys Glu Val Tyr Leu
705 710 715 720
Ile Cys Asn Thr Ser Asn Leu Gly Val Val Ala Pro Val Gly Tyr Asn
725 730 735
Gly Leu Leu Ile Met Ser Cys Thr Tyr Tyr Ala Phe Lys Thr Arg Asn
740 745 750
Val Pro Ala Asn Phe Asn Glu Ala Lys Tyr Ile Ala Phe Thr Met Tyr
755 760 765

Thr Thr Cys Ile Ile Trp Leu Ala Phe Val Pro Ile Tyr Phe Gly Ser
770 775 780
Asn Tyr Lys Ile Ile Thr Thr Cys Phe Ala Val Ser Leu Ser Val Thr
785 790 795 800
Val Ala Leu Gly Cys Met Phe Thr Pro Lys Met Tyr Ile Ile Ile Ala
805 810 815
Lys Pro Glu Arg Asn Val Arg Ser Ala Phe Thr Thr Ser Asp Val Val
820 825 830
Arg Met His Val Gly Asp Gly Lys Leu Pro Cys Arg Ser Asn Thr Phe
835 840 845
Leu Asn Ile Phe Arg Arg Lys Lys Pro Gly Ala Gly Asn Ala Asn Ser
850 855 860
Asn Gly Lys Ser Val Ser Trp Ser Glu Pro Gly Gly Arg Gln Ala Pro
865 870 875 880
Lys Gly Gln His Val Trp Gln Arg Leu Ser Val His Val Lys Thr Asn
885 890 895
Glu Thr Ala Cys Asn Gln Thr Ala Val Ile Lys Pro Leu Thr Lys Ser
900 905 910
Tyr Gln Gly Ser Gly Lys Ser Leu Thr Phe Ser Asp Ala Ser Thr Lys
915 920 925
Thr Leu Tyr Asn Val Glu Glu Glu Asp Asn Thr Pro Ser Ala His Phe
930 935 940
Ser Pro Pro Ser Ser Pro Ser Met Val Val His Arg Arg Gly Pro Pro
945 950 955 960
Val Ala Thr Thr Pro Pro Leu Pro Pro His Leu Thr Ala Glu Glu Thr
965 970 975

Pro Leu Phe Leu Ala Asp Ser Val Ile Pro Lys Gly Leu Pro Pro Pro
 980 985 990
 Leu Pro Gln Gln Gln Pro Gln Gln Pro Pro Pro Gln Gln Pro Pro Gln
 995 1000 1005
 Gln Pro Lys Ser Leu Met Asp Gln Leu Gln Gly Val Val Thr Asn Phe
 1010 1015 1020
 Gly Ser Gly Ile Pro Asp Phe His Ala Val Leu Ala Gly Pro Gly Thr
 1025 1030 1035 1040
 Pro Gly Asn Ser Leu Arg Ser Leu Tyr Pro Pro Pro Pro Pro Gln
 1045 1050 1055
 His Leu Gln Met Leu Pro Leu His Leu Ser Thr Phe Gln Glu Glu Ser
 1060 1065 1070
 Ile Ser Pro Pro Gly Glu Asp Ile Asp Asp Asp Ser Glu Arg Phe Lys
 1075 1080 1085
 Leu Leu Gln Glu Phe Val Tyr Glu Arg Glu Gly Asn Thr Glu Glu Asp
 1090 1095 1100
 Glu Leu Glu Glu Glu Glu Asp Leu Pro Thr Ala Ser Lys Leu Thr Pro
 1105 1110 1115 1120
 Glu Asp Ser Pro Ala Leu Thr Pro Pro Ser Pro Phe Arg Asp Ser Val
 1125 1130 1135
 Ala Ser Gly Ser Ser Val Pro Ser Ser Pro Val Ser Glu Ser Val Leu
 1140 1145 1150
 Cys Thr Pro Pro Asn Val Thr Tyr Ala Ser Val Ile Leu Arg Asp Tyr
 1155 1160 1165
 Lys Gln Ser Ser Ser Thr Leu
 1170 1175

<210> 31

<211> 867

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 31

Met Val Arg Leu Leu Leu Ile Phe Phe Pro Met Ile Phe Leu Glu Met
 1 5 10 15
 Ser Ile Leu Pro Arg Met Pro Asp Arg Lys Val Leu Leu Ala Gly Ala
 20 25 30
 Ser Ser Gln Arg Ser Val Ala Arg Met Asp Gly Asp Val Ile Ile Gly
 35 40 45
 Ala Leu Phe Ser Val His His Gln Pro Pro Ala Glu Lys Val Pro Glu
 50 55 60
 Arg Lys Cys Gly Glu Ile Arg Glu Gln Tyr Gly Ile Gln Arg Val Glu
 65 70 75 80
 Ala Met Phe His Thr Leu Asp Lys Ile Asn Ala Asp Pro Val Leu Leu
 85 90 95
 Pro Asn Ile Thr Leu Gly Ser Glu Ile Arg Asp Ser Cys Trp His Ser
 100 105 110
 Ser Val Ala Leu Glu Gln Ser Ile Glu Phe Ile Arg Asp Ser Leu Ile
 115 120 125
 Ser Ile Arg Asp Glu Lys Asp Gly Leu Asn Arg Cys Leu Pro Asp Gly
 130 135 140
 Gln Thr Leu Pro Pro Gly Arg Thr Lys Lys Pro Ile Ala Gly Val Ile
 145 150 155 160

Gly Pro Gly Ser Ser Ser Val Ala Ile Gln Val Gln Asn Leu Leu Gln
165 170 175
Leu Phe Asp Ile Pro Gln Ile Ala Tyr Ser Ala Thr Ser Ile Asp Leu
180 185 190
Ser Asp Lys Thr Leu Tyr Lys Tyr Phe Leu Arg Val Val Pro Ser Asp
195 200 205
Thr Leu Gln Ala Arg Ala Met Leu Asp Ile Val Lys Arg Tyr Asn Trp
210 215 220
Thr Tyr Val Ser Ala Val His Thr Glu Gly Asn Tyr Gly Glu Ser Gly
225 230 235 240
Met Asp Ala Phe Lys Glu Leu Ala Ala Gln Glu Gly Leu Cys Ile Ala
245 250 255
His Ser Asp Lys Ile Tyr Ser Asn Ala Gly Glu Lys Ser Phe Asp Arg
260 265 270
Leu Leu Arg Lys Leu Arg Glu Arg Leu Pro Lys Ala Arg Val Val Val
275 280 285
Cys Phe Cys Glu Gly Met Thr Val Arg Gly Leu Leu Ser Ala Met Arg
290 295 300
Arg Leu Gly Val Val Gly Glu Phe Ser Leu Ile Gly Ser Asp Gly Trp
305 310 315 320
Ala Asp Arg Asp Glu Val Ile Glu Gly Tyr Glu Val Glu Ala Asn Gly
325 330 335
Gly Ile Thr Ile Lys Leu Gln Ser Pro Glu Val Arg Ser Phe Asp Asp
340 345 350
Tyr Phe Leu Lys Leu Arg Leu Asp Thr Asn Thr Arg Asn Pro Trp Phe
355 360 365
Pro Glu Phe Trp Gln His Arg Phe Gln Cys Arg Leu Pro Gly His Leu
370 375 380
Leu Glu Asn Pro Asn Phe Lys Lys Val Cys Thr Gly Asn Glu Ser Leu
385 390 395 400
Glu Glu Asn Tyr Val Gln Asp Ser Lys Met Gly Phe Val Ile Asn Ala
405 410 415
Ile Tyr Ala Met Ala His Gly Leu Gln Asn Met His His Ala Leu Cys
420 425 430
Pro Gly His Val Gly Leu Cys Asp Ala Met Lys Pro Ile Asp Gly Arg
435 440 445
Lys Leu Leu Asp Phe Leu Ile Lys Ser Ser Phe Val Gly Val Ser Gly
450 455 460
Glu Glu Val Trp Phe Asp Glu Lys Gly Asp Ala Pro Gly Arg Tyr Asp
465 470 475 480
Ile Met Asn Leu Gln Tyr Thr Glu Ala Asn Arg Tyr Asp Tyr Val His
485 490 495
Val Gly Thr Trp His Glu Gly Val Leu Asn Ile Asp Asp Tyr Lys Ile
500 505 510
Gln Met Asn Lys Ser Gly Met Val Arg Ser Val Cys Ser Glu Pro Cys
515 520 525
Leu Lys Gly Gln Ile Lys Val Ile Arg Lys Gly Glu Val Ser Cys Cys
530 535 540
Trp Ile Cys Thr Ala Cys Lys Glu Asn Glu Phe Val Gln Asp Glu Phe
545 550 555 560
Thr Cys Arg Ala Cys Asp Leu Gly Trp Trp Pro Asn Ala Glu Leu Thr
565 570 575
Gly Cys Glu Pro Ile Pro Val Arg Tyr Leu Glu Leu Arg Glu His Thr
580 585 590
Ser Trp Val Leu Leu Ala Ala Asn Thr Leu Leu Leu Leu Leu Leu
595 600 605
Gly Thr Ala Gly Leu Phe Ala Trp His Leu Asp Thr Pro Val Val Arg

610 615 620
 Ser Ala Gly Gly Arg Leu Cys Phe Leu Met Leu Gly Ser Leu Ala Ala
 625 630 635 640
 Gly Ser Gly Ser Leu Tyr Gly Phe Phe Gly Glu Pro Thr Arg Pro Ala
 645 650 655
 Cys Leu Leu Arg Gln Ala Leu Phe Ala Leu Gly Phe Thr Ile Phe Leu
 660 665 670
 Ser Cys Leu Thr Val Arg Ser Phe Gln Leu Ile Ile Ile Phe Lys Phe
 675 680 685
 Ser Thr Lys Val Pro Thr Phe Tyr His Ala Trp Val Gln Asn His Gly
 690 695 700
 Ala Gly Leu Phe Val Met Ile Ser Ser Ala Ala Gln Leu Leu Ile Cys
 705 710 715 720
 Leu Thr Trp Leu Val Val Trp Thr Pro Leu Pro Ala Arg Glu Tyr Gln
 725 730 735
 Arg Phe Pro His Leu Val Met Leu Glu Cys Thr Glu Thr Asn Ser Leu
 740 745 750
 Gly Phe Ile Leu Ala Phe Leu Tyr Asn Gly Leu Leu Ser Ile Ser Ala
 755 760 765
 Phe Ala Cys Ser Tyr Leu Gly Lys Asp Leu Pro Glu Asn Tyr Asn Glu
 770 775 780
 Ala Lys Cys Val Thr Phe Ser Leu Leu Phe Asn Phe Val Ser Trp Ile
 785 790 795 800
 Ala Phe Phe Thr Thr Ala Ser Val Tyr Asp Gly Lys Tyr Leu Pro Ala
 805 810 815
 Ala Asn Met Met Ala Gly Leu Ser Ser Leu Ser Ser Gly Phe Gly Gly
 820 825 830
 Tyr Phe Leu Pro Lys Cys Tyr Val Ile Leu Cys Arg Pro Asp Leu Asn
 835 840 845
 Ser Thr Glu His Phe Gln Ala Ser Ile Gln Asp Tyr Thr Arg Arg Cys
 850 855 860
 Gly Ser Thr
 865

<210> 32

<211> 866

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

<400> 32

Met Val Arg Leu Leu Leu Ile Phe Phe Pro Met Ile Phe Leu Glu Met
 1 5 10 15
 Ser Ile Leu Pro Arg Met Pro Asp Arg Lys Val Leu Leu Ala Gly Ala
 20 25 30
 Ser Ser Gln Arg Ser Val Ala Arg Met Asp Gly Asp Val Ile Ile Gly
 35 40 45
 Ala Leu Phe Ser Val His His Gln Pro Pro Ala Glu Lys Val Pro Glu
 50 55 60
 Arg Lys Cys Gly Glu Ile Arg Glu Gln Tyr Gly Ile Gln Arg Val Glu
 65 70 75 80
 Ala Met Phe His Thr Leu Asp Lys Ile Asn Ala Asp Pro Val Leu Leu
 85 90 95
 Pro Asn Ile Thr Leu Gly Ser Glu Ile Arg Asp Ser Cys Trp His Ser

53

Thr Cys Arg Ala Cys Asp Leu Gly Trp Trp Pro Asn Ala Glu Leu Thr
565 570 575
Gly Cys Glu Pro Ile Pro Val Arg Tyr Leu Glu Trp His Glu Ala Pro
580 585 590
Thr Ile Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Leu Gly Phe Leu Ser Thr Leu
595 600 605
Ala Ile Leu Val Ile Phe Trp Arg His Phe Gln Thr Pro Ile Val Arg
610 615 620
Ser Ala Gly Gly Pro Met Cys Phe Leu Met Leu Thr Leu Leu Val
625 630 635 640
Ala Tyr Met Val Val Pro Val Tyr Val Gly Pro Pro Lys Val Ser Thr
645 650 655
Cys Leu Cys Arg Gln Ala Leu Phe Pro Leu Cys Phe Thr Ile Cys Ile
660 665 670
Ser Cys Ile Ala Val Arg Ser Phe Gln Ile Val Cys Ala Phe Lys Met
675 680 685
Ala Ser Arg Phe Pro Arg Ala Tyr Ser Tyr Trp Val Arg Tyr Gln Gly
690 695 700
Pro Tyr Val Ser Met Ala Phe Ile Thr Val Leu Lys Met Val Ile Val
705 710 715 720
Val Ile Gly Met Leu Ala Thr Gly Leu Ser Pro Thr Thr Arg Thr Asp
725 730 735
Pro Asp Asp Pro Lys Ile Thr Ile Val Ser Cys Asn Pro Asn Tyr Arg
740 745 750
Asn Ser Leu Leu Phe Asn Thr Ser Leu Asp Leu Leu Leu Ser Val Val
755 760 765
Gly Phe Ser Phe Ala Tyr Met Gly Lys Glu Leu Pro Thr Asn Tyr Asn
770 775 780
Glu Ala Lys Phe Ile Thr Leu Ser Met Thr Phe Tyr Phe Thr Ser Ser
785 790 795 800
Val Ser Leu Cys Thr Phe Met Ser Ala Tyr Ser Gly Val Leu Val Thr
805 810 815
Ile Val Asp Leu Leu Val Thr Val Leu Asn Leu Leu Ala Ile Ser Leu
820 825 830
Gly Tyr Phe Gly Pro Lys Cys Tyr Met Ile Leu Phe Tyr Pro Glu Arg
835 840 845
Asn Thr Pro Ala Tyr Phe Asn Ser Met Ile Gln Gly Tyr Thr Met Arg
850 855 860
Arg Asp
865

<210> 33
<211> 876
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence; note =
synthetic construct

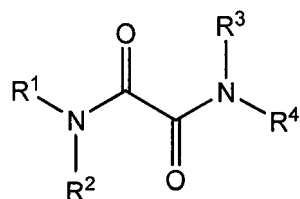
<400> 33
Met Val Arg Leu Leu Leu Ile Phe Phe Pro Met Ile Phe Leu Glu Met
1 5 10 15
Ser Ile Leu Pro Arg Met Pro Asp Arg Lys Val Leu Leu Ala Gly Ala
20 25 30
Ser Ser Gln Arg Ser Val Ala Arg Met Asp Gly Asp Val Ile Ile Gly
35 40 45

Ala Leu Phe Ser Val His His Gln Pro Pro Ala Glu Lys Val Pro Glu
 50 55 60
 Arg Lys Cys Gly Glu Ile Arg Glu Gln Tyr Gly Ile Gln Arg Val Glu
 65 70 75 80
 Ala Met Phe His Thr Leu Asp Lys Ile Asn Ala Asp Pro Val Leu Leu
 85 90 95
 Pro Asn Ile Thr Leu Gly Ser Glu Ile Arg Asp Ser Cys Trp His Ser
 100 105 110
 Ser Val Ala Leu Glu Gln Ser Ile Glu Phe Ile Arg Asp Ser Leu Ile
 115 120 125
 Ser Ile Arg Asp Glu Lys Asp Gly Leu Asn Arg Cys Leu Pro Asp Gly
 130 135 140
 Gln Thr Leu Pro Pro Gly Arg Thr Lys Lys Pro Ile Ala Gly Val Ile
 145 150 155 160
 Gly Pro Gly Ser Ser Ser Val Ala Ile Gln Val Gln Asn Leu Leu Gln
 165 170 175
 Leu Phe Asp Ile Pro Gln Ile Ala Tyr Ser Ala Thr Ser Ile Asp Leu
 180 185 190
 Ser Asp Lys Thr Leu Tyr Lys Tyr Phe Leu Arg Val Val Pro Ser Asp
 195 200 205
 Thr Leu Gln Ala Arg Ala Met Leu Asp Ile Val Lys Arg Tyr Asn Trp
 210 215 220
 Thr Tyr Val Ser Ala Val His Thr Glu Gly Asn Tyr Gly Glu Ser Gly
 225 230 235 240
 Met Asp Ala Phe Lys Glu Leu Ala Ala Gln Glu Gly Leu Cys Ile Ala
 245 250 255
 His Ser Asp Lys Ile Tyr Ser Asn Ala Gly Glu Lys Ser Phe Asp Arg
 260 265 270
 Leu Leu Arg Lys Leu Arg Glu Arg Leu Pro Lys Ala Arg Val Val Val
 275 280 285
 Cys Phe Cys Glu Gly Met Thr Val Arg Gly Leu Leu Ser Ala Met Arg
 290 295 300
 Arg Leu Gly Val Val Gly Glu Phe Ser Leu Ile Gly Ser Asp Gly Trp
 305 310 315 320
 Ala Asp Arg Asp Glu Val Ile Glu Gly Tyr Glu Val Glu Ala Asn Gly
 325 330 335
 Gly Ile Thr Ile Lys Leu Gln Ser Pro Glu Val Arg Ser Phe Asp Asp
 340 345 350
 Tyr Phe Leu Lys Leu Arg Leu Asp Thr Asn Thr Arg Asn Pro Trp Phe
 355 360 365
 Pro Glu Phe Trp Gln His Arg Phe Gln Cys Arg Leu Pro Gly His Leu
 370 375 380
 Leu Glu Asn Pro Asn Phe Lys Lys Val Cys Thr Gly Asn Glu Ser Leu
 385 390 395 400
 Glu Glu Asn Tyr Val Gln Asp Ser Lys Met Gly Phe Val Ile Asn Ala
 405 410 415
 Ile Tyr Ala Met Ala His Gly Leu Gln Asn Met His His Ala Leu Cys
 420 425 430
 Pro Gly His Val Gly Leu Cys Asp Ala Met Lys Pro Ile Asp Gly Arg
 435 440 445
 Lys Leu Leu Asp Phe Leu Ile Lys Ser Ser Phe Val Gly Val Ser Gly
 450 455 460
 Glu Glu Val Trp Phe Asp Glu Lys Gly Asp Ala Pro Gly Arg Tyr Asp
 465 470 475 480
 Ile Met Asn Leu Gln Tyr Thr Glu Ala Asn Arg Tyr Asp Tyr Val His
 485 490 495
 Val Gly Thr Trp His Glu Gly Val Leu Asn Ile Asp Asp Tyr Lys Ile

56

Reivindicaciones

1. Un compuesto de ocurrencia no natural que se liga específicamente a un receptor de sabor hetero-oligomérico T1R compuesto de las subunidades hTIR1/hT1R3, con la capacidad de ser un activador, mejorador, o modulador del sabor umami determinado por un EC_{50} menor a 1 mM, en donde el compuesto de ocurrencia no natural es un compuesto oxalamida.
2. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el compuesto presenta una proporción EC_{50} , definida como la proporción de la concentración de MSG y la concentración del compuesto más MSG necesaria para elicitar la respuesta de dosis MSG mayor que 1.
3. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la reducción del EC_{50} determinada por un ensayo basado en fluorescencia que utiliza un instrumento FLIPR es de al menos dos veces.
4. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la actividad comparada con la actividad máxima de glutamato determinada por un incremento en fluorescencia dependiente del compuesto es de al menos 25% en un ensayo basado en fluorescencia que utiliza un instrumento FLIPR.
5. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el compuesto presenta una capacidad tal que al menos 10 de 100 células transfectadas con el receptor muestran un incremento dependiente del compuesto en fluorescencia.
6. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 1, el cual presenta una potencia tal que el número de células fluorescentes en respuesta a un nivel submáximo de glutamato aumenta al menos dos veces.
7. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 1, el cual muestra un incremento en la respuesta de las células a un nivel submáximo de glutamato de al menos 1,25 veces comparado con la respuesta del endulzante solo, en donde la respuesta se mide por fluorescencia, niveles de calcio, niveles IP_3 , niveles cAMP, unión GTPyS, o actividad de gen reportero.
8. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el compuesto oxalamida presenta la fórmula:



o una sal o solvato del mismo;

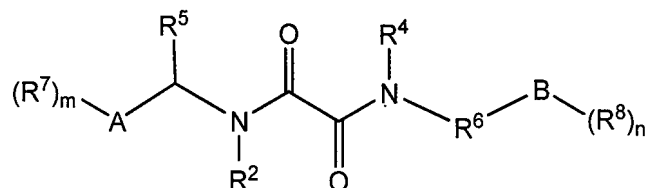
en donde,

R^1 se selecciona del grupo compuesto por ariloalquilo, heteroariloalquilo, heterocicloalquilo, y grupos opcionalmente sustituidos de los mismos;

R^3 se selecciona independientemente del grupo compuesto por ariloalquilo, heteroariloalquilo, heterocicloalquilo, y grupos opcionalmente sustituidos de los mismos; y

R^2 y R^4 se seleccionan independientemente del grupo compuesto por H, y alquilo C_1-C_3 ó grupos opcionalmente sustituidos de los mismos.

9. El compuesto oxalamida de la reivindicación 8, el cual presenta la fórmula:



en donde,

R^2 y R^4 se seleccionan independientemente del grupo compuesto por H, y alquilo C_1-C_3 ó grupos opcionalmente sustituidos de los mismos.

A es un arilo, heteroarilo, cicloalquilo, o un heterociclo;

B es un heteroarilo, o un heterociclo

m y n son independientemente 0, 1, 2, 3 ó 4-8;

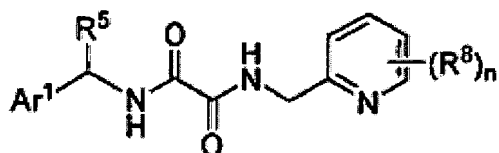
R^5 es hidrógeno o un residuo de hidrocarbano;

R^6 está ausente, es alquilenos C_1-C_5 , o un alquilenos C_1-C_5 sustituido;

R^7 y R^8 se seleccionan independientemente del grupo compuesto de hidrógeno, alquilo, alcóxido, alcóxi-alquilo, OH, SR^9 , halógeno, CN, NO_2 , CO_2R^9 , COR^9 , $CONR^9R^{10}$, NR^9R^{10} , NR^9COR^{10} , SOR^9 , SO_2R^9 , $SO_2NR^9R^{10}$, $NR^9SO_2R^{10}$, alquénilo, cicloalquilo, cicloalquénilo, arilo, heteroarilo, y heterociclo; y

R^9 y R^{10} se seleccionan independientemente del grupo compuesto de H, alquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , y alquénilo C_1-C_6 .

10. El compuesto oxalamida de la reivindicación 8, el cual presenta la fórmula:



en donde,

Ar^1 es un anillo arilo o heteroarilo sustituido;

n es 0, 1, 2, 3 o 4;

R^5 es hidrógeno o metilo; y

R^8 se seleccionan del grupo compuesto de hidrógeno, alquilo, alcóxido, alcóxi-alquilo, OH, SR^9 , halógeno, CN, NO_2 , CO_2R^9 , COR^9 , $CONR^9R^{10}$, NR^9R^{10} , NR^9COR^{10} , SOR^9 , SO_2R^9 , $SO_2NR^9R^{10}$, $NR^9SO_2R^{10}$, alquénilo, cicloalquilo, cicloalquénilo, arilo, heteroarilo, y heterociclo.

11. El compuesto oxalamida de la reivindicación 10, en donde Ar¹ se selecciona del grupo compuesto por 2-, 3-, ó 4-fenilo monosustituido; 2,4-, 2,3-, 2,5, 2,6, 3,5-, ó 3,6-fenilo disustituido; 3-alkilo-4-fenilo sustituido, una combinación de tri- y más-sustituyentes fenilo; y un anillo heteroarilo sustituido.

12. El compuesto oxalamida de la reivindicación 8, el cual se selecciona de los siguientes compuestos:

N1-(2,4-Dimetoxibenzil)-N2-(2-(furan-2-il)etoxi)oxalamida,
 N1-(4-etoxi-2-metoxibenzil)-N2-(2-(5-metilpiridin-2-il)etil)oxalamida,
 N-(3-Metil-benzo[b]tiofen-2-ilmetil)-N'-(2-piridin-2-il-etil)-oxalamida,
 N1-(2-isopropoxibenzil)-N2-(2-(piridin-2-il)etil)oxalamida,
 N-(2-Metoxibenzil)-N'-(2-piridin-2-il-etil)-oxalamida,
 N-(2,4-Dimetoxi-benzil)-N'-(2-piridin-2-il-etil)-oxalamida,
 N-(3-Metil-tiofen-2-ilmetil)-N'-(2-piridin-2-il-etil)-oxalamida,
 N-(4-Metilbenzil)-N'-(2-piridin-2-il-etil)-oxalamida,
 N-(2-Metil-4-metoxibenzil)-N'-(2-piridin-2-il-etil)-oxalamida,
 N-(4-Metoxibenzil)-N'-(2-piridin-2-il-etil)-oxalamida,
 N-(2,4-Dimetoxibenzil)-N'-(2-(3-metilpiridin-2-il)etil)-oxalamida,
 N-(2,5-Dimetil-furan-3-ilmetil)-N'-(2-piridin-2-il-etil)-oxalamida,
 N-(1,5-Dimetil-1H-pirrolo-2-ilmetil)-N'-(2-piridin-2-il-etil)-oxalamida.

13. Un producto comestible o medicinal que comprende el compuesto de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

14. El comestible de acuerdo a la reivindicación 13, en donde el comestible es seleccionado de un grupo compuesto por: sopas húmedas/líquidas, alimento deshidratado o culinario, y una bebida.

15. Un método para modular el sabor de ajedrea de un producto medicinal o comestible que comprende:

Suministrar al menos un producto medicinal o comestible, o un precursor de estos; y

Combinar el producto medicinal o comestible o precursor de estos con al menos una cantidad que modula el sabor de ajedrea de al menos un compuesto de ocurrencia no natural de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal comestible aceptable de esta, de tal forma que genera un comestible modificado o producto medicinal; por lo tanto modular el sabor ajedrea de un comestible o producto medicinal.

16. Un compuesto de ocurrencia no natural que se liga específicamente a un a un receptor de sabor hetero-oligomérico T1R compuesto de las subunidades hTIR2/hTIR3, con la capacidad de ser un modulador del receptor T1R2/T1R3 determinado por un EC₅₀ inferior a 1

mM o por una relación EC_{50} de al menos 1,20, en donde el compuesto de ocurrencia no natural es un compuesto oxalamida.

17. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 11, el cual es un activador dulce o un mejorador dulce.

18. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 11, en donde el compuesto presenta un tamaño cercano a 12 x 5 x 5 angstroms;

19. El compuesto de acuerdo a las reivindicaciones 11 ó 12 que presenta una o más de las siguientes características en una célula que coexpresa hT1R2 y hT1R3:

EC₅₀ reducido comparado con un control de 50%,

Niveles de Ca²⁺ intracelular incrementado por al menos aproximadamente 25%,

cAMP intracelular incrementado por al menos aproximadamente 25%,

cGMP intracelular incrementado por al menos aproximadamente 25%,

IP₃ intracelular incrementado por lo menos aproximadamente 25%, o

Incremento de GTPγS que se une a la proteína G por al menos aproximadamente 25%.

20. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 13, donde la célula que coexpresa hT1R2 y hT1R3 es una célula HEK que expresa de manera estable Gα15.

21. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 14, el cual muestra un incremento en la respuesta de las células para un nivel submáximo de endulzador de al menos 1,25 veces comparado con la respuesta del endulzador solo, en donde la respuesta se mide por fluorescencia, niveles de calcio, niveles IP₃, niveles cAMP, unión GTPγS, o actividad de gen reportero.

22. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 15, el cual presenta una actividad comparada con la actividad máxima de la fructosa determinada por un incremento en fluorescencia dependiente del compuesto es de al menos 25% en un ensayo basado en fluorescencia que utiliza un instrumento FLIPR.

23. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 16, en donde la actividad comparada con la actividad máxima de la fructosa determinada por un incremento en fluorescencia dependiente del compuesto muestra una reducción del EC_{50} para la fructosa de al menos dos veces en un ensayo basado en fluorescencia que utiliza un instrumento FLIPR.

24. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 16, en donde el compuesto muestra una capacidad tal que al menos 10 de 100 células transfectadas muestran un incremento dependiente del compuesto en fluorescencia medido con un microscopio de fluorescencia.

25. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 16, en donde el compuesto presenta una capacidad tal que el número de células fluorescentes en respuesta a un nivel submáximo de fructosa muestra un incremento dependiente del compuesto de al menos dos veces.

26. Un producto comestible o medicinal que comprende el compuesto de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19.

27. El comestible de acuerdo a la reivindicación 20, en donde el comestible es seleccionado de un grupo que consiste de: sopas húmedas/líquidas, alimento deshidratado o culinario, y una bebida.

28. Un método para modular el sabor dulce de un producto medicinal o comestible que comprende:

Suministrar al menos un producto medicinal o comestible, o un precursor de estos; y

Combinar el producto medicinal o comestible o precursor de estos con al menos una cantidad que modula el sabor dulce de al menos un compuesto de ocurrencia no natural de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, o una sal comestible aceptable de esta, de tal forma que forme un comestible modificado o producto medicinal; por lo tanto modular el sabor dulce de un comestible o producto medicinal.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0032564

Bogotá D.C., Abril 02 de 2012 - 08:09:04

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	157713566	30/03/2012	42.925.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
				\$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-022158- -00011-0000

Fecha: 2012-04-19 16:32:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 240

Act. 523 RESPUESTA Folios: 257

C/O. 15159-841-005-9.

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 2 de 2012 - 08:09:17

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0029274

Bogotá D.C., Marzo 23 de 2012 - 17:18:08

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	185803214	23/03/2012	75.635.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1642 S.DISTINTIVO CAMBIO TITULARIDAT-TRANSFERENCIA INSCRIPC	370.000.00	370.000.00
				\$370.000.00

SON: **TRESCIENTOS SETENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-022158- -00011-0000

Fecha: 2012-04-19 16:32:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 240

1121111 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 257

Colo: 15159- 841- 005- 9.

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 23 de 2012 - 17:18:26

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0025027

Bogotá D.C., Marzo 12 de 2012 - 07:29:37

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	157717630	09/03/2012	64.070.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	20.000.00	20.000.00
				\$20.000.00

SON: **VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-022158- -00011-0000

Fecha: 2012-04-19 16:32:15 Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASE NACIONAL I
Act. 523 RESPUESTA Folios: 240

Act. 523 RESPUESTA Folios: 257

Cob. 15159-841-005-9.

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 12 de 2012 - 07:29:53

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0029221

Bogotá D.C., Marzo 23 de 2012 - 17:18:08

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	185803214	23/03/2012	75.635.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				\$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-022158- -00011-0000

Fecha: 2012-04-19 16:32:15

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 523 RESPUESTA

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 240

Folios: 257

Colo: 15159-841-005-9.

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 23 de 2012 - 17:18:24



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____
RECEPTORES DE SABOR HETERO-OLIGOMÉRICO TIR,
LÍNEAS CELULARES QUE EXPRESAN DICHOS RECEPTORES ,
Y COMPUESTOS DE SABOR

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____
SENOMYX INCORPORATED

DOMICILIO _____
LA JOLLA, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO _____
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., _____