



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
1-0019645

(51)⁷ **G01N 33/566, C12P 21/06, G01N 33/74** (13) **B**

(21)	1-2006-00343	(22)	06.08.2004		
(86)	PCT/US2004/025459	06.08.2004	(87)	WO2005/015158A2	17.02.2005
(30)	60/494,071	06.08.2003 US			
	60/552,064	09.03.2004 US			
(45)	27.08.2018	365	(43)	27.11.2006	224
(73)	Senomyx Inc. (US)				
	4767 Nexus Centre Drive, San Diego, California 92121, United States of America				
(72)	LI, Xiaodong (CN), STASZEWSKI, Lena (SE), XU, Hong (CN)				
(74)	Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Vàng (GINTASSET CO., LTD.)				

(54) **PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHỈNH VỊ SAVORY VÀ VỊ NGỌT CỦA SẢN PHẨM ĂN ĐƯỢC HOẶC SẢN PHẨM THUỐC**

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất gắn kết đặc hiệu với thụ thể T1R1/T1R3 hoặc T1R2/T1R3 hoặc đoạn hoặc cấu trúc dưới phân tử của nó. Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng thụ thể vị giác hetero-oligome và thể khảm chứa T1R1/T1R3 và T1R2/T1R3 trong thử nghiệm để nhận biết hợp chất có đáp ứng tương ứng với chất kích thích có vị umami và chất kích thích có vị ngọt. Hơn nữa, sáng chế đề cập đến các dòng tế bào cơ bản đồng biểu hiện ổn định hoặc tạm thời tổ hợp T1R1 và T1R3; hoặc T1R2 và T1R3; trong các điều kiện cơ bản hoặc cảm ứng. Việc sử dụng các dòng tế bào này trong thử nghiệm trên cơ sở tế bào để nhận biết các hợp chất điều chỉnh vị umami và vị ngọt cũng được đề xuất, cụ thể là thử nghiệm sàng lọc năng suất cao dùng để phát hiện hoạt tính thụ thể bằng cách sử dụng phương pháp chụp ảnh huỳnh quang. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp điều chỉnh vị savory và vị ngọt của sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Một phần sáng chế đề cập đến việc phát hiện ra rằng các thụ thể T1R phối hợp với nhau để tạo thành thụ thể vị giác chức năng. Cụ thể, đã phát hiện ra rằng sự đồng biểu hiện các thụ thể T1R1 và T1R3 tạo ra thụ thể vị giác đáp ứng với các chất kích thích có vị umami, bao gồm mononatri glutamat. Ngoài ra, đã phát hiện ra rằng sự đồng biểu hiện các thụ thể T1R2 và T1R3 tạo ra thụ thể vị giác đáp ứng với các chất kích thích có vị ngọt bao gồm các chất tạo vị ngọt có trong tự nhiên và nhân tạo.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến việc sử dụng các thụ thể vị giác hetero-oligome bao gồm T1R1/T1R3 và T1R2/T1R3 trong thử nghiệm để nhận biết các hợp chất có đáp ứng tương ứng với chất kích thích có vị umami và chất kích thích có vị ngọt.

Sáng chế còn đề cập đến thể khảm và dạng bị cắt ngắn của thụ thể T1R1, T1R2, và T1R3, cũng như thể khảm của các thụ thể T1R1/T1R3 và T1R2/T1R3, ở người, chuột hoặc các cấu trúc dưới phân tử ở người và chuột.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến việc xây dựng các dòng tế bào đồng biểu hiện ổn định hoặc tạm thời tổ hợp của T1R1 và T1R3; hoặc T1R2 và T1R3, kể cả các dạng bị cắt ngắn hoặc thể khảm của các cấu trúc dưới phân tử này cũng như các thụ thể thể khảm bao gồm các cấu trúc dưới phân tử kiểu hoang hoặc thể khảm; trong các điều kiện cơ bản hoặc cảm ứng.

Việc sử dụng các dòng tế bào này trong các thử nghiệm trên cơ sở tế bào để nhận biết các hợp chất điều chỉnh vị umami và vị ngọt cũng được đề xuất, cụ thể là trong các thử nghiệm sàng lọc năng suất cao để phát hiện hoạt tính thụ thể bằng cách sử dụng phương pháp chụp ảnh huỳnh quang.

Sáng chế còn đề cập đến các hợp chất gắn kết với các thụ thể T1R1/T1R3,

T1R2/T1R3, cũng như các cấu trúc dưới phân tử thể khảm và bị cắt ngắn T1R1, T1R2, và T1R3 và các thụ thể thể khảm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hệ vị giác cung cấp thông tin cảm giác về thành phần hoá học của thế giới bên ngoài. Động vật có vú được cho là có ít nhất năm phương thức vị giác cơ bản: ngọt, đắng, chua, mặn, và umami. Ví dụ, xem tài liệu 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). Mỗi phương thức vị giác được cho là được làm trung gian bởi một hoặc nhiều thụ thể protein khác biệt mà được biểu hiện trong các tế bào thụ thể vị giác được tìm thấy trên bề mặt của lưỡi (Lindemann, *Physiol. Rev.* 76: 718-716 (1996)). Các thụ thể vị giác nhận biết các chất kích thích có vị đắng, ngọt và umami thuộc về họ chung thụ thể gắn kết với protein G (GPCR – G-protein coupled receptor) (Hoon et al., *Cell* 96: 451 (1999); Adler et al., *Cell* 100: 693 (2000)). (Các phương thức vị giác khác được cho là trung gian bởi kênh ion.)

Các thụ thể gắn kết với protein G làm trung gian cho nhiều chức năng sinh-lý khác, như chức năng nội tiết, chức năng ngoại tiết, nhịp tim, phân giải mỡ, và chuyển hoá hydrat cacbon. Các phép phân tích sinh-hoá và tách dòng phân tử nhiều thụ thể trong số các thụ thể này đã cho thấy nhiều nguyên lý cơ bản về chức năng của các thụ thể này. Ví dụ, patent Mỹ số 5691188 mô tả việc một phối tử gắn kết với GPCR như thế nào, thụ thể này bị thay đổi cấu dạng dẫn đến hoạt hoá protein G heterotrimer bằng cách thúc đẩy sự thay thế GDP gắn kết bằng GTP gắn kết có mặt trên bề mặt của cấu trúc dưới phân tử $G\alpha$ và sau đó tách cấu trúc dưới phân tử $G\alpha$ ra khỏi các cấu trúc dưới phân tử $G\beta$ và $G\gamma$. Các cấu trúc dưới phân tử $G\alpha$ tự do và phức hợp $G\beta\gamma$ hoạt hoá xuôi dòng các yếu tố của con đường tải nạp tín hiệu khác nhau.

Trước đây, các thụ thể T1R được cho là có chức năng như các thụ thể vị ngọt (Hoon et al., *Cell* 96: 541-51 (1999); Kitagawa et al., *Biochem Biophys Res. Commun.* 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)), và gần đây, Nelson và các đồng tác giả (2001) và Li và các đồng tác giả (2002) đã chứng minh rằng T1R2 của chuột và T1R3 của người có tác dụng phối hợp để nhận biết các chất kích thích có vị ngọt.

Tuy nhiên, trong lĩnh vực này vẫn cần có các chất điều vị mới và cải thiện. Ví dụ, một trong số năm vị cơ bản đã biết là hương vị “savory” hoặc “umami” của mononatri glutamat (“MSG”). MSG đã được biết là tạo ra các phản ứng phụ ở một số người, nhưng có rất ít tiến triển đã được thực hiện trong việc xác định các chất thay thế nhân tạo cho MSG. Đã biết rằng một vài chất có trong tự nhiên có thể làm tăng hoặc gia tăng hiệu lực của MSG dưới dạng chất điều vị savory, nên cần ít MSG trong ứng dụng điều vị đã cho. Ví dụ, các hợp chất nucleotit inosin monophosphat (IMP) hoặc guanosin monophosphat (GMP) có trong tự nhiên đã được biết là có tác dụng khuếch đại vị savory của MSG, nhưng IMP và GMP rất khó kiếm và đắt tiền để phân lập và tinh chế từ các nguồn tự nhiên, hoặc tổng hợp, và do đó chỉ có ứng dụng thực tế giới hạn đối với hầu hết các nhu cầu thương mại trong các thành phần thức ăn hoặc thuốc chữa bệnh. Các hợp chất rẻ tiền hơn tạo ra hương vị của chính MSG hoặc làm gia tăng hiệu lực của MSG bất kỳ có mặt có thể có giá trị rất lớn. Tương tự, việc phát hiện hợp chất mà là chất tạo vị ngọt “mạnh” mới (nghĩa là, ngọt hơn rất nhiều lần sucroza) sẽ có giá trị.

Nhu cầu hiện nay trong lĩnh vực này là nhận biết và xác định tính chất của các thụ thể vị giác có tác dụng như các thụ thể vị ngọt và vị umami, thử nghiệm để nhận biết hợp chất có tác dụng điều chỉnh (làm gia tăng hoặc ức chế) vị ngọt và vị umami, và các hợp chất gắn kết đặc hiệu với các thụ thể này.

Tất cả các tài liệu viện dẫn, bao gồm cả các patent hoặc đơn yêu cầu cấp patent bất kỳ, nêu trong bản mô tả này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Tài liệu viện dẫn bất kỳ không được thừa nhận là giải pháp kỹ thuật đã biết. Phân bản luận về các tài liệu viện dẫn nêu nội dung mà tác giả của các tài liệu này đánh giá và chủ đơn có quyền không thừa nhận độ chính xác và thích hợp của các tài liệu được trích dẫn. Cần hiểu rõ rằng mặc dù nhiều tài liệu công bố của các giải pháp đã biết được nêu ở đây, việc viện dẫn này không phải là sự thừa nhận rằng tài liệu bất kỳ trong số các tài liệu này là một phần của kiến thức chung trong lĩnh vực này ở nước Úc hoặc quốc gia khác bất kỳ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp điều chỉnh vị savory của sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc bao gồm các bước:

tạo ra ít nhất một sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc hoặc tiền chất của nó, và

kết hợp sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc hoặc tiền chất của nó với ít nhất một lượng có tác dụng điều chỉnh vị savory của ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên gắn kết đặc hiệu với thụ thể T1R1/T1R3 gồm hT1R1/hT1R3 có khả năng làm chất tạo vị, chất làm tăng vị hoặc chất điều chỉnh vị umami như được xác định theo giá trị EC50 thấp hơn 1mM, trong đó ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên này là hợp chất amit hoặc hợp chất oxalamit hoặc muối ăn được của chúng để tạo thành sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc cải biến;

nhờ đó điều chỉnh vị savory của sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất phương pháp điều chỉnh vị ngọt của sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc bao gồm các bước:

tạo ra ít nhất một sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc hoặc tiền chất của nó,

và

kết hợp sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc hoặc tiền chất của nó với ít nhất một lượng có tác dụng điều chỉnh vị ngọt của ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên gắn kết đặc hiệu với thụ thể T1R2/T1R3 gồm hT1R2/hT1R3 có khả năng làm chất chủ vận vị ngọt như được xác định theo giá trị EC50 thấp hơn 10 μ M, hoặc muối ăn được của nó, để tạo thành sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc cải biến;

nhờ đó điều chỉnh vị ngọt của sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc.

Trong phần yêu cầu bảo hộ và phần mô tả của đơn sáng chế này, trừ khi ngữ cảnh yêu cầu khác do việc thể hiện ngôn ngữ hoặc hàm ý cần thiết, thuật ngữ “bao gồm” hoặc các phương án của nó như “có bao gồm” hoặc “việc bao gồm” được hiểu theo nghĩa rộng, nghĩa là chỉ rõ sự có mặt của các dấu hiệu đã nêu nhưng không loại trừ sự có mặt hoặc bổ sung thêm các dấu hiệu khác theo các phương án khác nhau của sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sự xếp thẳng hàng trình tự của T1R của người và chuột, thụ thể cảm giác canxi ở người và thụ thể glutamat hỗ biến trao đổi chất ở chuột.

Fig.2 thể hiện các kết quả thử nghiệm khuếch đại RT-PCR cho thấy rằng hT1R2 và hT1R3 được biểu hiện trong mô vị giác.

Các hình vẽ từ Fig.3a đến Fig.3c thể hiện số liệu chức năng (đáp ứng canxi nội bào) được tạo ra bởi các chất kích thích có vị ngọt khác nhau trong tế bào HEK biểu hiện ổn định G $_{\alpha 15}$ được chuyển nhiễm tạm thời bằng T1R2, T1R3 và T1R2/T1R3 của người ở các nồng độ khác nhau của các chất kích thích có vị ngọt (Fig.3a); đáp ứng liều lượng của T1R2/T1R3 của người đối với một số chất kích thích có vị ngọt (Fig.3b); đáp ứng của T1R2/T1R3 của người với sucroza với sự có mặt của gurmarin, và thụ thể $\beta 2$ -adrenalin nội sinh đáp ứng với isoproterenol với sự có mặt của gurmarin.

Fig.3c thể hiện đáp ứng được chuẩn hoá với các chất tạo vị ngọt khác.

Fig.4 thể hiện đáp ứng canxi nội bào trong tế bào HEK biểu hiện ổn định $G_{\alpha 15}$ được chuyển nhiễm tạm thời bằng hT1R2/hT1R3, rT1R2/rT1R3, hT1R2/rT1R3 và rT1R2/hT1R3 đáp ứng với sucroza 350mM, tryptophan 25mM, aspartam 15mM, và monelin 0,05%.

Fig.5 thể hiện kết quả của thử nghiệm trên cơ sở thiết bị đọc đĩa huỳnh quang trong đó tế bào HEK biểu hiện ổn định $G_{\alpha 15}$ được chuyển nhiễm tạm thời bằng hT1R2 và hT1R3 hoặc chỉ một mình hT1R3 và được cho tiếp xúc với thuốc nhuộm canxi Fluo-4 và chất kích thích có vị ngọt (xyclamat 12,5mM).

Fig.6 thể hiện đường cong đáp ứng liều được chuẩn hoá cho thấy rằng hT1R2 và hT1R3 thực hiện chức năng phối hợp dưới dạng thụ thể vị ngọt ở người dựa trên sự tương tác đặc hiệu liều lượng của chúng với các chất kích thích có vị ngọt khác nhau (trp, xyclamat, sucroza, neotam, aspartam, sacarin và Acek).

Fig.7 thể hiện thông tin cấu trúc liên quan đến mGluR1 và T1R1 cho thấy các gốc gắn kết phối tử chính quan sát được trong các phân tử này.

Các hình vẽ từ Fig.8a đến Fig.8c thể hiện số liệu chức năng cho thấy tế bào HEK biểu hiện ổn định $G_{\alpha 15}$ được chuyển nhiễm ổn định bằng T1R1/T1R3 đáp ứng với glutamat trong thử nghiệm trên cơ sở canxi nội bào. Fig.8a cho thấy rằng nồng độ canxi nội bào gia tăng mức độ đáp ứng với sự tăng nồng độ glutamat; Fig.8b cho thấy nồng độ canxi nội bào đáp ứng với IMP (2mM), glutamat (0,5mM) và IMP 0,2mM; và Fig.8c thể hiện mức độ đáp ứng của T1R1/T1R3 của người đối với glutamat với sự có mặt và không có mặt của IMP 0,2mM.

Fig.9a và Fig.9b thể hiện kết quả tương ứng của thử nghiệm nhuộm màu miễn dịch-huỳnh quang có sử dụng hT1R2 được đánh dấu bằng Myc và thử nghiệm FACS cho thấy rằng việc sử dụng peptit PDZIP (SEQ ID No: 1) làm gia tăng mức độ biểu hiện của T1R (hT1R2) trên màng huyết tương.

Fig.10a và Fig.10b thể hiện số liệu ảnh chụp canxi chứng minh rằng h1TR2/hT1R3 đáp ứng với các chất kích thích có vị ngọt khác nhau.

Fig.11 thể hiện mức độ đáp ứng của các dòng tế bào biểu hiện ổn định hT1R1/hT1R3 bằng cách chụp ảnh huỳnh quang tự động đối với chất kích thích có vị umami.

Fig.12 thể hiện mức độ đáp ứng của dòng tế bào biểu hiện ổn định hT1R2/hT1R3 bằng cách chụp ảnh huỳnh quang tự động đối với chất kích thích có vị ngọt.

Fig.13 thể hiện đường cong đáp ứng liều được xác định bằng cách chụp ảnh huỳnh quang tự động dòng tế bào biểu hiện cảm ứng thụ thể vị giác T1R1/T1R3 của người đối với L-glutamat với sự có mặt và không có mặt của IMP 0,2mM.

Fig.14 và Fig.15 thể hiện mức độ đáp ứng của dòng tế bào biểu hiện cảm ứng thụ thể vị giác T1R1/T1R3 của người (dòng vô tính I-17) đối với một nhóm các axit amin-L. Trên Fig.14, các axit amin-C khác nhau ở nồng độ 10mM được thử nghiệm với sự có mặt và không có mặt của IMP 1mM. Trên Fig.15, mức độ đáp ứng-liều lượng đối với các axit amin hoạt tính được xác định với sự có mặt của IMP 0,2mM.

Fig.16 cho thấy rằng lactisol ức chế hoạt tính thụ thể của T1R2/T1R3 của người và T1R1/T1R3 của người.

Fig.17 thể hiện sơ đồ các thể khảm T1R của người-chuột. Các thể khảm này được tạo cấu trúc bằng cách dung hợp vùng ngoại bào ở người hoặc chuột với vùng xuyên màng ở chuột hoặc người tương ứng, như h2-r2, r2-h2, h3-r3 và r3-h3.

Fig.18 cho thấy neohesperidin dihydrochalcon (NHDC) làm tăng hoạt tính của thụ thể vị umami T1R1/T1R3. [Neohesperidin dihydrochalcon] = 5 μ M. Đường cong đáp ứng liều của glutamat được dịch chuyển về bên trái 2,3 lần (hình bên trên), và đường cong đáp ứng liều của glutamat/IMP được dịch chuyển về bên trái 2,1 lần.

Fig.19 cho thấy rằng các chất tạo vị ngọt đối chứng không ảnh hưởng đến hoạt

tính của thụ thể vị umami T1R1/T1R3 [stevioxit] = 0,5mM. [sacarin] = 1mM. Đường cong đáp ứng liều của glutamat được thể hiện trên hình bên trên và đường cong đáp ứng liều của glutamat/IMP được thể hiện trên hình bên dưới.

Fig.20 thể hiện sự gắn kết của NHDC với vùng xuyên màng của T1R3 của người.

Fig.21 thể hiện sự gắn kết của hợp chất với vùng xuyên màng của T1R2 của người.

Các hình vẽ từ Fig.22a đến Fig.22d thể hiện sự gắn kết của các chất tạo vị ngọt với các vùng/cấu trúc dưới phân tử khác nhau của thụ thể vị ngọt ở người. Fig.22a thể hiện mức độ đáp ứng của thụ thể vị ngọt ở người và chuột đối với sucroza (200mM), aspartam (10mM), neotam (0,1mM), xyclamat (10mM), và sucroza (200mM) với sự có mặt của lactisol (1mM) (Suc/Lac). Các tế bào HEK-293T được chuyển nhiễm tạm thời bằng T1R2, T1R3 của người hoặc chuột, và thể khảm của $G_{\alpha 15}$ $G_{\alpha 15/il}$, và được thử nghiệm về nồng độ canxi nội bào gia tăng đáp ứng với các chất tạo vị ngọt. Fig.22b thể hiện mức gắn kết của aspartam và neotam với vùng ngoại bào đầu tận cùng N của T1R2 của người. Các tổ hợp của thể khảm T1R được chuyển nhiễm tạm thời vào tế bào HEK-293T cùng với $G_{\alpha 15/il}$, và được thử nghiệm đáp ứng với chất tạo vị ngọt ở các nồng độ được thể hiện trên Fig.23a. Sự có mặt hoặc không có mặt của đáp ứng là điều quan trọng. Fig.22c thể hiện mức gắn kết của xyclamat với vùng xuyên màng đầu tận cùng C của T1R3 của người. Fig.22d thể hiện mức gắn kết của lactisol với vùng xuyên màng của T1R3 của người. Các tổ hợp khác nhau của các thể khảm T1R được chuyển nhiễm tạm thời vào tế bào HEK-293T cùng với $G_{\alpha 15/il}$, và được thử nghiệm đáp ứng đối với sucroza (200mM) và AceK (10mM) khi không có mặt hoặc có mặt lactisol (1mM). Hoạt tính trong các sơ đồ B, C và D là giá trị trung bình $\pm$ SE của số lượng tế bào đáp ứng đối với bốn vùng được chụp ảnh, mỗi vùng có khoảng 1000 tế bào nhập dòng.

Các hình vẽ từ Fig.23a đến Fig.23d thể hiện sự đột biến trong T1R2 hoặc T1R3 tác động chọn lọc lên hoạt tính của các chất tạo vị ngọt khác nhau. Fig.23a thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng trình tự của vùng gắn kết phối tử đầu tận cùng N của mGluR5 ở chuột với T1R2 ở người và loài gặm nhấm. 8 axit amin then chốt liên quan đến sự gắn kết phối tử trong mGluR5 được đánh dấu bằng *, 3 trong số 8 axit amin này được bảo tồn trong T1R2 và gạch dưới. Fig.23b thể hiện hai sự đột biến điểm trong vùng ngoại bào đầu tận cùng N ở thụ thể T1R2 của người mà triệt tiêu đáp ứng với aspartam và neotam mà không ảnh hưởng tới xyclamat. Các dòng tế bào ổn định của hT1R2/hT1R3 (WT), hT1R2 S144A/hT1R3 (S144A) và hT1R2 E302A/hT1R3 (E302A) được tạo ra như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Liều lượng-đáp ứng của các dòng tế bào này đối với sucroza, aspartam, neotam và xyclamat được xác định trên thiết bị FLIPR. Hoạt tính là giá trị trung bình $\pm$ SE của số lần tăng cường độ phát huỳnh quang đối với bốn lỗ được ghi. Fig.23c thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng trình tự của vùng xuyên màng trong T1R3 của chuột và loài gặm nhấm. Ba quai ngoại bào được gạch chân và đánh dấu là EL1, 2, hoặc 3, theo thứ tự của chúng trong trình tự protein. Fig.23d thể hiện sự đột biến trong quai ngoại bào của hT1R3 mà triệt tiêu đáp ứng với xyclamat mà không ảnh hưởng đến aspartam. Mỗi quai trong số ba quai ngoại bào của hT1R3 được thay thế riêng rẽ bằng trình tự protein của chuột và thể đột biến hT1R3 tạo ra được chuyển nhiễm tạm thời vào tế bào HEK-293T cùng với $G_{\alpha 15/11}$, và được phân tích về mức độ đáp ứng với sucroza (200mM), aspartam (10mM) và xyclamat (10mM). Hoạt tính là giá trị trung bình $\pm$ SE của số lượng tế bào đáp ứng với bốn vùng được chụp ảnh, mỗi vùng có khoảng 1000 tế bào nhập dòng.

Fig.24a và Fig.24b thể hiện T1R2 của người cần thiết đối với sự gắn kết $G_{\alpha 15}$. Fig.24a thể hiện mức độ đáp ứng của thụ thể vị ngọt người, chuột và thể khảm đối với sucroza (200mM) và AceK (10mM). Các tế bào $G_{\alpha 15}$ ổn định được chuyển nhiễm tạm

thời bằng T1R của người, chuột hoặc thể khảm và được phân tích mức canxi nội bào gia tăng đáp ứng với chất tạo vị ngọt. Fig.24b thể hiện sự gắn kết $G_{\alpha 15}$ được trung gian bởi T1R2 của người. Hoạt tính là giá trị trung bình $\pm$ SE của số lượng tế bào đáp ứng đối với bốn vùng được chụp ảnh, mỗi vùng có khoảng 1000 tế bào nhập dòng.

Các hình vẽ từ Fig.25a đến Fig.25f thể hiện tác động của lactisol và xyclamat đối với thụ thể vị umami T1R1/T1R3 của người. Fig.25a thể hiện mức độ đáp ứng của dòng tế bào ổn định T1R1/T1R3 của người với L-glutamat (5mM) và L-glutamat/IMP (1/0,2mM) khi không có mặt hoặc có mặt lactisol (5mM). Fig.25b thể hiện đường cong ức chế phụ thuộc liều lượng lactisol được xác định đối với L-glutamat (Glu), và L-glutamat chứa IMP 0,2mM (Glu/IMP), mỗi đường được xác định ở hai nồng độ khác nhau. Giá trị IC_{50} tương ứng bằng $0,19 \pm 0,02$ mM và $0,21 \pm 0,01$ mM đối với L-glutamat ở nồng độ 8 và 80mM; $0,35 \pm 0,03$ mM và $0,82 \pm 0,06$ mM đối với L-glutamat có chứa IMP ở nồng độ 0,8 và 8mM. Fig.25c thể hiện đáp ứng liều lượng đối với L-glutamat, có hoặc không chứa IMP 0,2mM, được xác định với sự có mặt của các nồng độ khác nhau của lactisol. Với sự có mặt của lactisol 0,25 hoặc 50 μ M, giá trị EC_{50} bằng $9,9 \pm 1,5$ mM, $7,9 \pm 0,5$ mM, và $7,0 \pm 0,3$ mM đối với L-glutamat; với sự có mặt của lactisol 0,100 hoặc 200 μ M, giá trị EC_{50} bằng $0,53 \pm 0,04$ mM, $0,71 \pm 0,10$ mM, và $0,84 \pm 0,10$ mM đối với L-glutamat chứa IMP. Các giá trị là giá trị trung bình $\pm$ SE đối với bốn đáp ứng độc lập. Fig.25d thể hiện ngưỡng phát hiện đối với các chất kích thích có vị ngọt, vị umami và vị mặn được xác định với sự có mặt hoặc không có mặt của lactisol. Tác động ức chế của lactisol được thể hiện dưới dạng số lần tăng ngưỡng phát hiện. “Ngưỡng phát hiện” được xác định là giới hạn dưới của chất tạo vị có thể phát hiện được. Giá trị ngưỡng phát hiện được lấy trung bình của 4 lần thử nghiệm cho 3 đối tượng. Fig.25e thể hiện mức độ đáp ứng của dòng tế bào ổn định T1R1/T1R3 của người với mức ngưỡng của L-glutamat (4mM) và chất chủ vận thụ thể M2 nội sinh carbachol được phân tích trên thiết bị

FLIPR khi không có mặt hoặc có mặt các nồng độ khác nhau của xyclamat. Fig.25f thể hiện đáp ứng liều lượng của dòng tế bào ổn định T1R1/T1R3 của người được xác định trên thiết bị FLIPR đối với L-glutamat chứa hoặc không chứa IMP 0,2mM khi không có mặt hoặc có mặt của xyclamat (8mM). Hoạt tính trong các sơ đồ B, C, E và F là giá trị trung bình $\pm$ SE của số lần tăng cường độ phát huỳnh quang đối với 4 lỗ được ghi. Đường cong đáp ứng liều trong các sơ đồ B, C, E và F được tạo lại một cách độc lập ít nhất 6 lần.

Fig.26 thể hiện mô hình xử lý đối với mối liên hệ cấu trúc-chức năng của thụ thể vị ngọt và vị umami. Mũi tên đặc chỉ sự hoạt hoá, mũi tên rỗng chỉ sự gia tăng và mũi tên có vạch ngang chỉ sự ức chế.

Fig.27a thể hiện tất cả 16 tổ hợp của T1R và các thể khảm được thử nghiệm đáp ứng đối với các chất tạo vị ngọt và lactisol. rT1R2/T1R3H-R, rT1R2/hT1R3, và T1R2H-R/T1R3R-H thể hiện đáp ứng đáng kể đối với xyclamat và chúng có thể được ức chế bởi lactisol. Các thể khảm T1R được chuyển nhiễm tạm thời vào tế bào HEK-293T với $G_{\alpha 15/ii}$. Hoạt tính là giá trị trung bình $\pm$ SE của số lượng tế bào đáp ứng đối với bốn vùng được chụp ảnh, mỗi vùng có khoảng 1000 tế bào nhập dòng, mỗi đơn vị trên trục Y tương ứng với 50 tế bào. Chữ viết tắt: Suc (sucroza 100mM); Suc/Lac (sucroza 100mM, lactisol 1mM); AceK (axesulfam-K 10mM); AceK/Lac (axesulfam-K 10mM, lactisol 1mM); ATM (aspartam 10mM); NTM (neotam 10mM); Cyc (xyclamat 10mM). Fig.27b thể hiện đường cong ức chế phụ thuộc liều lượng lactisol của thụ thể vị ngọt ở người được xác định đối với sucroza (Suc), sacarin (Sac), và D-tryptophan (D-Trp), mỗi chất được thử nghiệm ở hai nồng độ khác nhau. Giá trị IC_{50} tương ứng bằng $19,6 \pm 0,1 \mu M$ và $64,6 \pm 0,3 \mu M$ đối với sucroza ở 50mM và 120mM; $22,6 \pm 0,1 \mu M$ và $103 \pm 7 \mu M$ đối với sacarin ở 0,1 và 2mM; $19,9 \pm 0,2 \mu M$ và $168 \pm 9 \mu M$ đối với D-tryptophan. Fig.27c thể hiện đường cong đáp ứng-liều lượng của thụ thể vị ngọt ở người đối với sucroza, D-Trp và sacarin được xác định với các

nồng độ khác nhau của lactisol. Với sự có mặt của lactisol 0, 10 hoặc 20 μ M, giá trị EC_{50} bằng $19,4 \pm 0,9$ mM, $24,7 \pm 1,0$ mM, và $31,3 \pm 0,3$ mM đối với sucroza; $0,37 \pm 0,02$ mM, $0,60 \pm 0,03$ mM, $0,94 \pm 0,08$ mM đối với D-Trp; 42 ± 3 μ M, 67 ± 6 μ M, 118 ± 2 μ M đối với sacarin. Các giá trị là giá trị trung bình $\pm$ SE đối với bốn đáp ứng độc lập. Đáp ứng liều lượng trong sơ đồ B và C được xác định một cách độc lập ít nhất 6 lần, và tạo ra các kết quả tương tự như được thể hiện ở đây.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất hợp chất gắn kết đặc hiệu với các thụ thể vị ngọt và vị umami kiểu hoang và thể khảm. Sáng chế còn đề xuất các hợp chất gắn kết đặc hiệu với cấu trúc dưới phân tử T1R2 hoặc T1R3 kiểu hoang, thể khảm hoặc bị cắt ngắn của thụ thể vị ngọt và vị umami.

Sự gắn kết với thụ thể vị ngọt T1R2/T1R3 xác định một nhóm rất lớn của các phân tử. Thụ thể này đáp ứng với mọi chất tạo vị ngọt được thử nghiệm bao gồm đường hydrat cacbon, axit amin và dẫn xuất, protein ngọt, và chất tạo vị ngọt tổng hợp. Trong khi đó, thụ thể này có tính chọn lọc lập thể đối với một số chất tạo vị ngọt, ví dụ, nó đáp ứng với D-tryptophan nhưng không đáp ứng với L-tryptophan, tương quan với các số liệu sinh-lý về vị giác.

Do đó, các hợp chất theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với các thụ thể thể khảm. Ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thụ thể T1R2/T1R3 thể khảm bao gồm cấu trúc dưới phân tử T1R2 của người và cấu trúc dưới phân tử T1R3 chuột; thụ thể T1R2/T1R3 thể khảm bao gồm cấu trúc dưới phân tử T1R2 của chuột và cấu trúc dưới phân tử T1R3 của người; cấu trúc dưới phân tử của thụ thể T1R2 thể khảm bao gồm vùng ngoại bào ở người, vùng xuyên màng ở chuột và vùng nội bào chuột; và cấu trúc dưới phân tử thụ thể T1R3 thể khảm bao gồm vùng ngoại bào ở chuột, vùng xuyên màng ở người và vùng nội bào ở người. Sáng chế đề xuất các thụ thể vị giác

chức năng, tốt hơn là thụ thể vị giác ở người, mà được tạo ra bởi sự đồng biểu hiện tổ hợp của các T1R khác nhau, tốt hơn nếu là T1R1/T1R3 hoặc T1R2/T1R3, và các trình tự hoặc đoạn axit nucleic, các thể khảm, hoặc các biến thể được phân lập tương ứng của chúng mà khi đồng biểu hiện thì tạo ra thụ thể vị giác chức năng, nghĩa là thụ thể vị ngọt (T1R2/T1R3) hoặc thụ thể vị umami (T1R1/T1R3).

T1R, một họ bao gồm các thụ thể gắn kết với protein G (GPCR) nhóm C, được biểu hiện chọn lọc ở các mô vị giác (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 và Nelson, G., et al., *Cell*, 2001.106 (3): p. 381-90.). Sự biểu hiện chức năng của T1R trong tế bào HEK293 cho thấy rằng các tổ hợp khác nhau của T1R đáp ứng với các chất kích thích có vị ngọt và vị umami (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 và T1R3, khi được đồng biểu hiện trong tế bào 293, nhận ra các chất tạo vị ngọt tự nhiên và tổng hợp khác nhau, trong khi đó T1R1 và T1R3 nhận ra chất kích thích có vị umami của L-glutamat, và đáp ứng này được làm tăng bởi 5'-ribonucleotit, dấu hiệu của vị umami. Các số liệu bất hoạt gen xác nhận rằng thực ra các thụ thể T1R làm trung gian cho các vị ngọt và vị umami ở chuột nhắt (Damak, S., et al., *Science*, 2003 301 (5634): p. 850-3, Zhao, G. Q., et al., *Cell* 2003 Oct 31; 115 (3): 255-66).

GPCR nhóm C có vùng ngoại bào đầu tận cùng N lớn, thường được gọi là vùng Venus flytrap (VFD - Venus Flytrap Domain) (Pin, J. P., *Pharmacol Ther*, 2003 98 (3): p. 325-54), và được biết là có chức năng như các homodime, trong trường hợp của thụ thể glutamat hỗ biến trao đổi chất (mGluR – metabotropic glutamate receptor) và thụ thể cảm giác canxi (CaR – calcium-sensing receptor), hoặc heterodime, trong trường hợp của thụ thể axit γ -aminobutyric typ B (GABA_BR). Các

số liệu biểu hiện chức năng cho thấy cơ chế heterodime đối với các T1R: cả T1R1 lẫn T1R2 đều cần được đồng biểu hiện cùng với T1R3 để có tác dụng, điều này được xác nhận bằng các mô hình biểu hiện chéo của T1R ở lưới loài gặm nhấm.

Ở đây, chúng minh được rằng các thành viên của họ T1R có tác dụng phối hợp với các thành viên khác của họ T1R để thực hiện chức năng như các thụ thể vị ngọt và vị umami. Như được bộc lộ chi tiết hơn trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây, đã chứng minh được rằng các tế bào khác loài đồng biểu hiện hT1R2 và hT1R3 được hoạt hoá chọn lọc bởi các chất kích thích có vị ngọt theo cách phản ánh vị ngọt ở người.

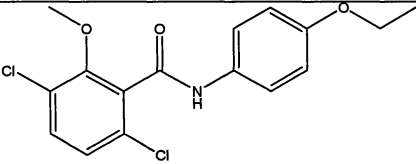
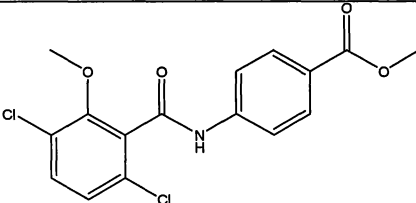
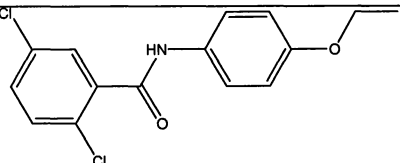
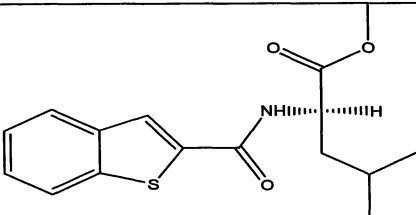
Ví dụ, tế bào HEK-293- $G_{\alpha 15}$ đồng biểu hiện hT1R2 và hT1R3 đáp ứng đặc hiệu với xyclamat, sucroza, aspartam, và sacarin, và đáp ứng liều lượng đối với các hợp chất này tương quan với ngưỡng nhận biết vị giác sinh-lý.

Ngoài ra, như được chứng minh bởi các số liệu trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, đã thấy được rằng các tế bào đồng biểu hiện hT1R1 và hT1R3 được hoạt hoá chọn lọc bởi glutamat (mononatri glutamat) và 5'-ribonucleotit theo cách phản ánh vị ngọt ở người. Ví dụ, tế bào HEK-293- $G_{\alpha 15}$ đồng biểu hiện hT1R1 và hT1R3 đáp ứng đặc hiệu với glutamat và đáp ứng liều lượng đối với hợp chất tạo vị umami này tương quan với ngưỡng nhận biết vị giác sinh-lý. Hơn nữa, 5'-ribonucleotit như IMP làm gia tăng mức độ đáp ứng đối với glutamat của thụ thể T1R1/T1R3, một đặc tính hiệp đồng tác dụng của vị umami.

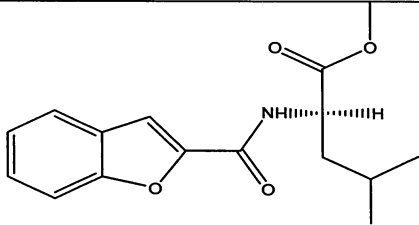
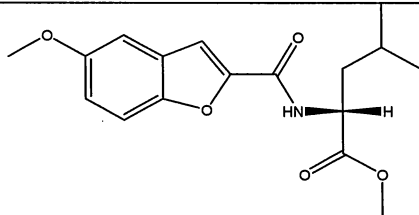
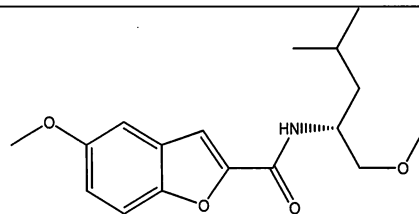
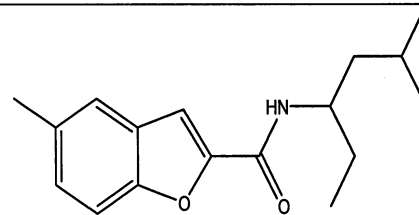
Hơn nữa, như được thể hiện bằng số liệu trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, biết được rằng các tế bào đồng biểu hiện ổn định và cảm ứng T1R1/T1R3 đáp ứng chọn lọc với các chất kích thích có vị umami L-glutamat và L-aspartat và chỉ có đáp ứng yếu với các axit L-amin khác, và ở nồng độ cao hơn nhiều, tạo ra bằng chứng tiếp theo là thụ thể T1R1/T1R3 có thể được sử dụng trong thử nghiệm để nhận biết hợp chất làm điều biến (làm tăng hoặc ức chế) các chất kích thích có vị umami.

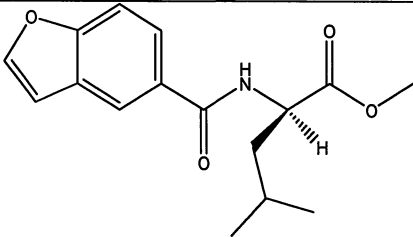
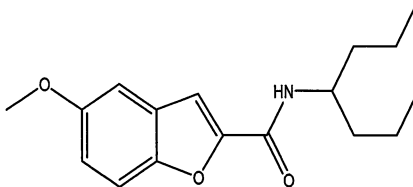
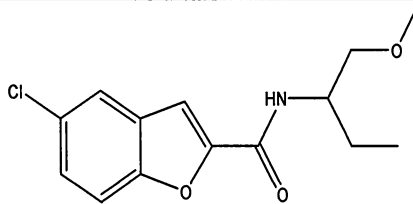
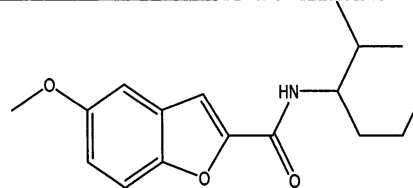
Ví dụ về các hợp chất gắn kết đặc hiệu với thụ thể vị ngọt và làm điều chỉnh vị ngọt có thể được tìm thấy trong Bảng 5.

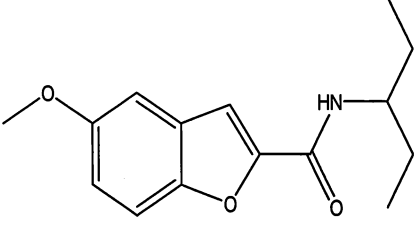
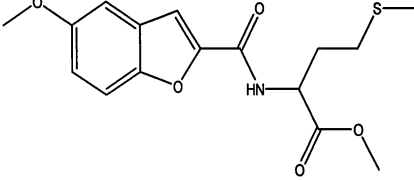
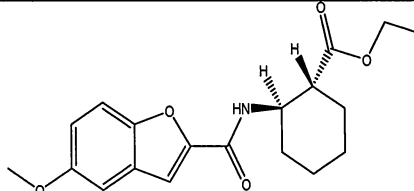
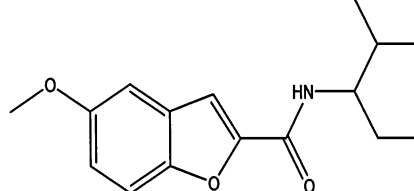
Các bảng từ 1 đến 4 đưa ra ví dụ về hợp chất gắn kết đặc hiệu với thụ thể vị umami và làm điều chỉnh vị umami.

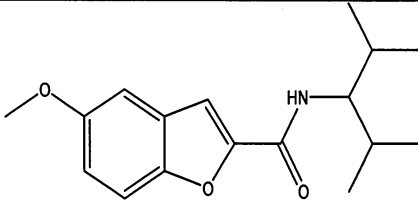
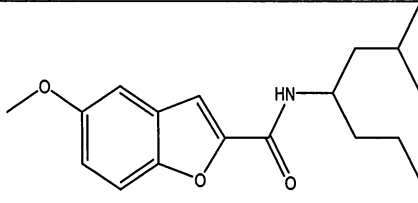
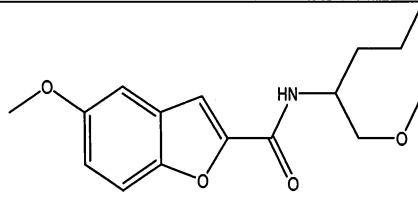
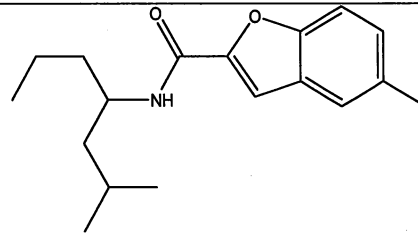
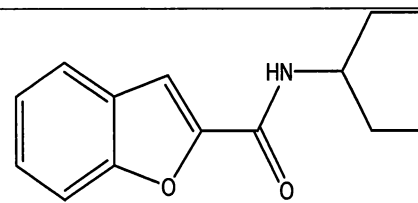
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A1	 3,6-Diclo-N-(4-etoxy-phenyl)-2-metoxy-benzamit	0,22	2,74	1
A2	 Este metyl của axit 4-(3,6-diclo-2-metoxy-benzoylamino)- benzoic	0,93	6,98	0,01
A3	 2,5-Diclo-N-(4-etoxyphenyl)benzamit	1,08	6,14	0,03
A4	 Este metyl của axit 2-[(benzo[b]thiophen-2-carbonyl)- amino]-4-metyl-pentanoic	0,4		

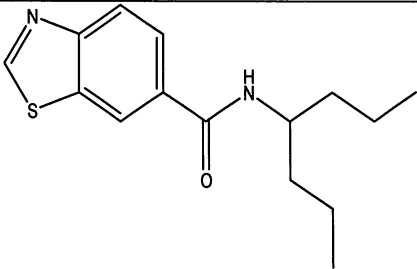
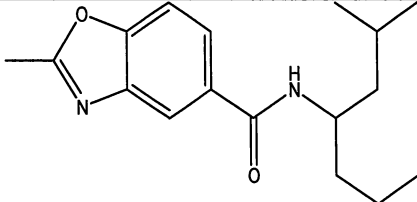
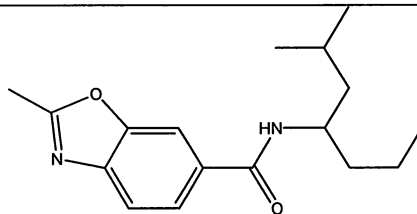
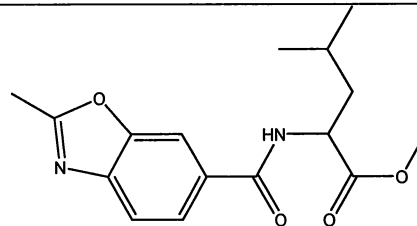
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami

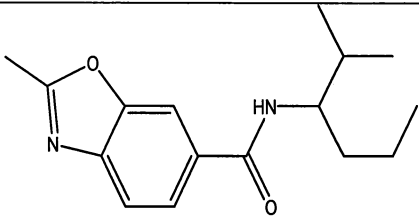
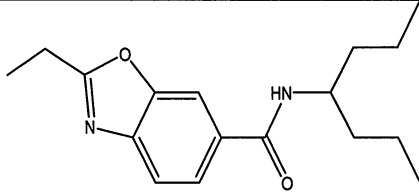
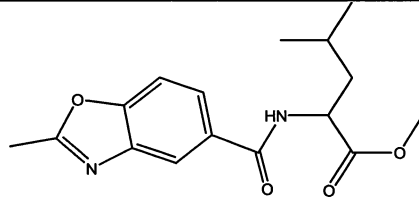
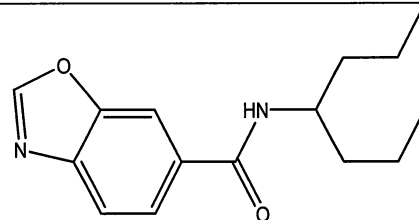
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ Ec ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A5	 Este metyl của axit 2-[(benzofuran-2-carbonyl)-amino]-4- metyl-pentanoic	0,31		
A6	 Este metyl của axit 2-[(5-metoxý-benzofuran-2-carbonyl)-amino]-4-metyl-pentanoic	0,32	2,86	1
A7	 (R)-5-Metoxý-N-(1-metoxý-4-metyl-pentan-2-yl)benzofuran-2-carboxamit	0,46		
A8	 5-Metyl-N-(5-metylhexan-3-yl)-benzofuran-2-carboxamit	0,5		

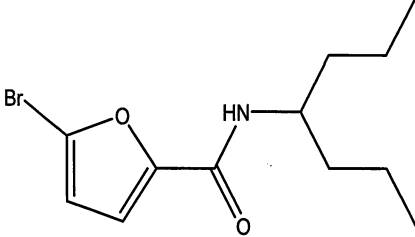
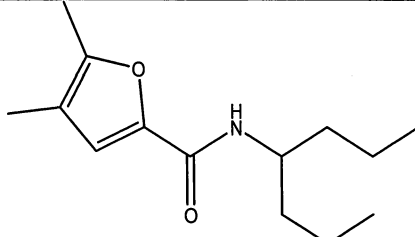
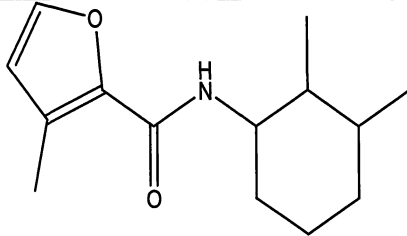
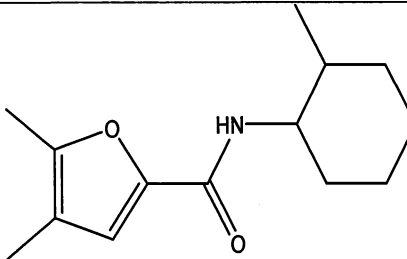
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ Ec ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A9	 Este metyl của axit 2-[(benzofuran-5-carbonyl)-amino]-4-metyl-pentanoic, (R)-metyl 2-(benzofuran-5-carboxamido)-4-metylpentanoat	0,71		
A10	 N-(Heptan-4-yl)-5-metoxymenzofuran-2-carboxamit	0,91	4,51	1
A11	 5-Clo-N-(1-metoxymutan-2-yl)benzofuran-2-carboxamit	1,05	6,5	0,3
A12	 5-metoxym-N-(2-metylhexan-3-yl) benzofuran-2-carboxamit	1,13		

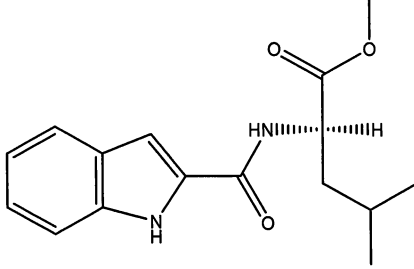
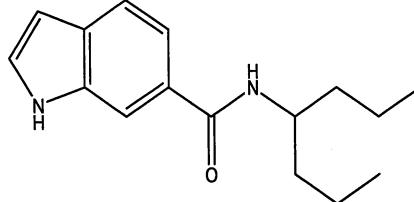
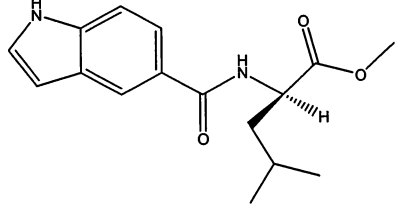
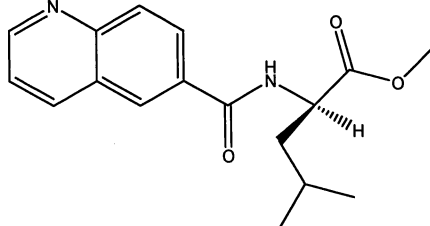
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A13	 5-Methoxy-N-(pentan-3-yl)benzofuran-2-carboxamid	1,14	4,46	1
A14	 Este metyl của axit 2-[(5-methoxy-benzofuran-2-carbonyl)-amino]-4-metylsulfanyl-butyrin, metyl 2-(5-methoxybenzofuran-2-carboxamido)-4-(methylthio)butanoat	1,14		
A15	 (1R,2R)-Etyl 2-(5-methoxybenzofuran-2-carboxamido) xyclohexancarboxylat	1,14		
A16	 5-Methoxy-N-(2-methylpentan-3-yl)benzofuran-2-carboxamid	1,18		

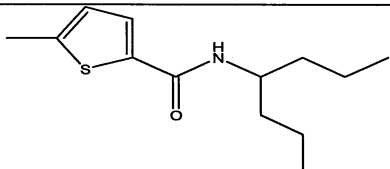
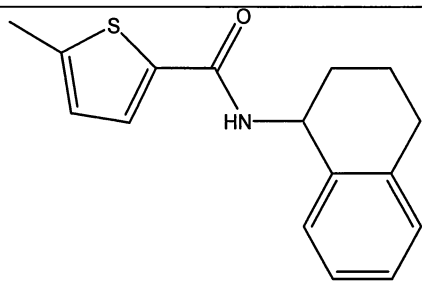
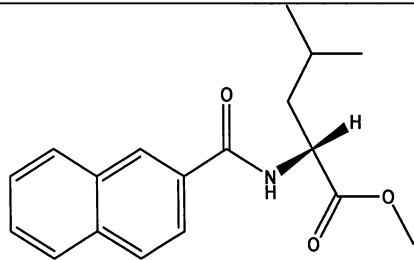
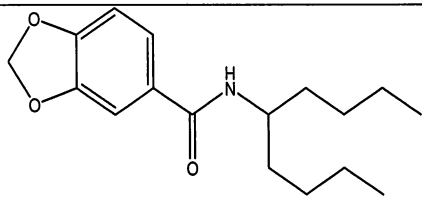
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A17	 N-(2,4-Dimethylpentan-3-yl)-5-methoxybenzofuran-2-carboxamid	1,2		
A18	 5-Methoxy-N-(2-methylheptan-4-yl)benzofuran-2-carboxamid	1,27		
A19	 5-Methoxy-N-(1-methoxypentan-2-yl)benzofuran-2-carboxamid	1,3		
A20	 5-Metyl-N-(2-methylheptan-4-yl)benzofuran-2-carboxamid	1,32		
A21	 N-(Pentan-3-yl)benzofuran-2-carboxamid	1,52	3,74	1

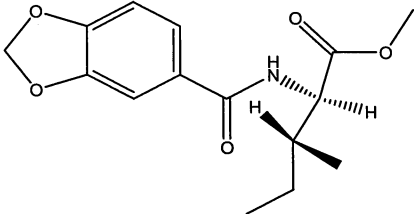
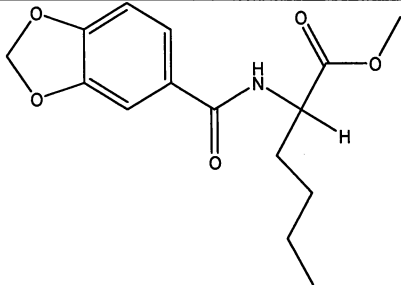
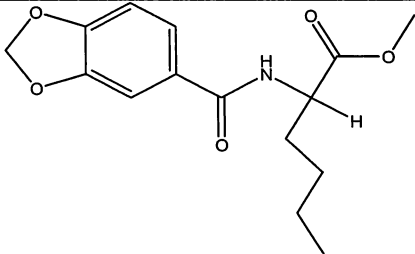
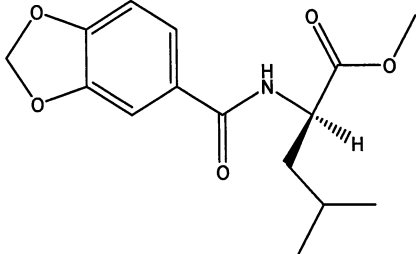
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A22	 (1-Propyl-butyl)-amit của axit benzothiazol-6-carboxylic	1,58		
A23	 2-Metyl-N-(2-metylheptan-4-yl)benzo[d] oxazol-5-carboxamit	0,38		
A24	 2-Metyl-N-(2-metylheptan-4-yl)benzo[d] oxazol-6-carboxamit	1,12		
A25	 Este metyl của axit (R)-4-metyl-2-[(2-metyl-benzooxazol-6-carbonyl)-amino]-pentanoic	1,48		

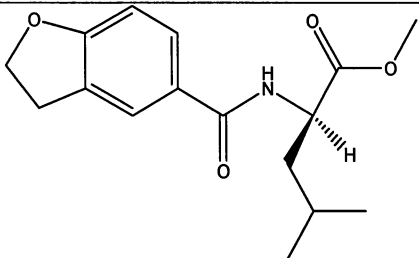
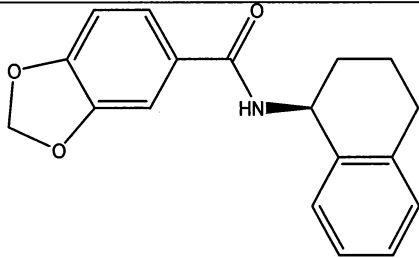
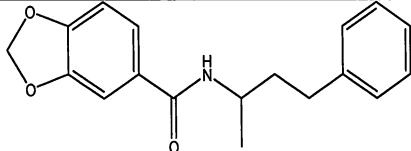
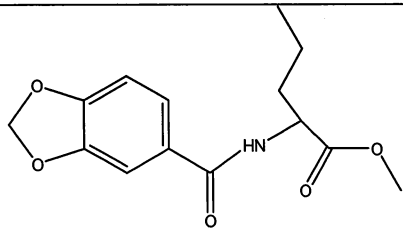
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ Ec ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A26	 2-Metyl-N-(2-metylhexan-3-yl)benzo[d] oxazol-6-carboxamit	1,6		
A27	 2-Etyl-N-(heptan-4-yl)benzo[d] oxazol-6-carboxamit	1,61		
A28	 Este metyl của axit (R)- 4-metyl-2-[(2-metyl-benzooxazol-5- carbonyl)-amino]-pentanoic	1,69		
A29	 N-(Heptan-4-yl)benzo[d] oxazol-6-carboxamit	1,91		

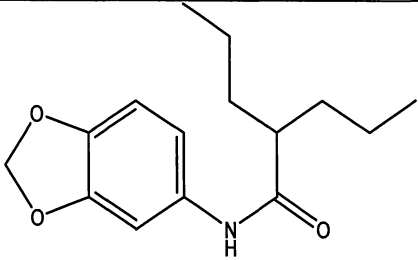
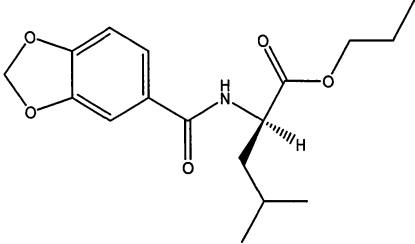
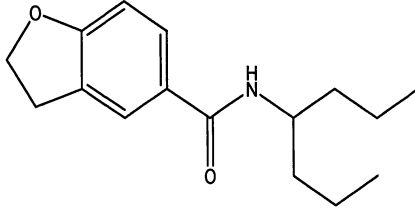
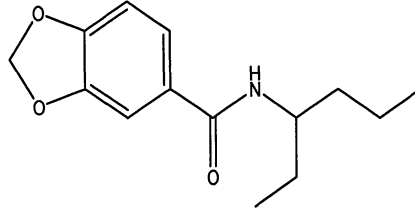
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A30	 5-Bromo-N-(heptan-4-yl)furan-2-carboxamid	0,49	12,6	1
A31	 N-(Heptan-4-yl)-4,5-dimethylfuran-2-carboxamid	0,62	10,04	1
A32	 N-(2,3-Dimethylcyclohexyl)-3-methylfuran-2-carboxamid	1,15		
A33	 4,5-Dimethyl-N-(2-methylcyclohexyl)furan-2-carboxamid	1,33		

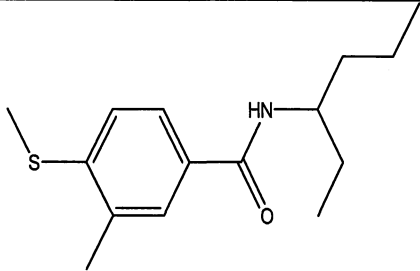
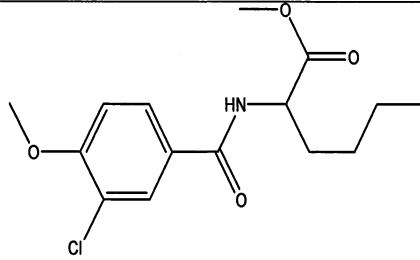
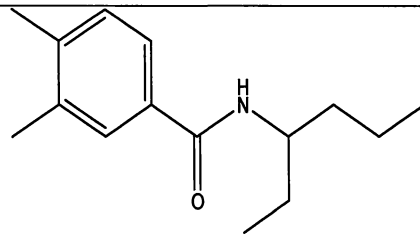
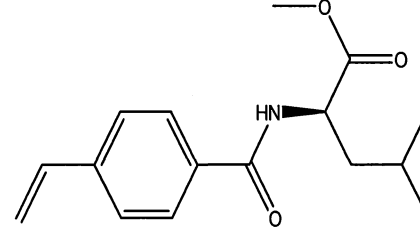
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A34	 (R)-Metyl 2-(1H-indol-2-carboxamido)-4-methylpentanoat	0,53		
A35	 N-(Heptan-4-yl)-1H-indol-6-carboxamit	0,82	8,81	1
A36	 (R)-Metyl 2-(1H-indol-5-carboxamido)-4-methylpentanoat	1,01		
A37	 (R)-Metyl 4-metyl-2-(quinolin-6-carboxamido) pentanoat	1,5		

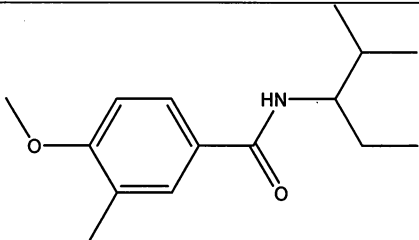
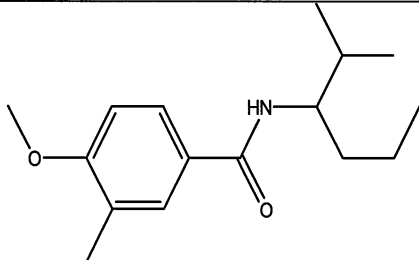
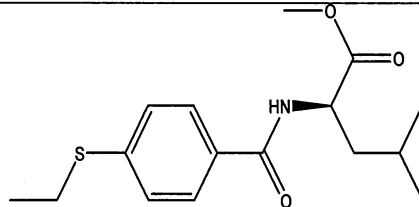
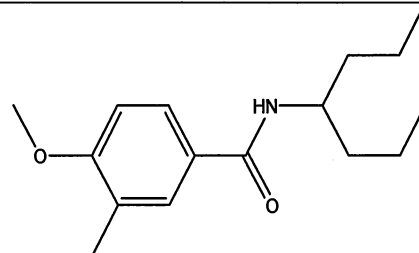
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ Ec ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A38	 (1-Propyl-butyl)-amit của axit 5-methyl-thiophen-2-carboxylic	1,22	6,54	1
A39	 (1,2,3,4-Tetrahydro-naphtalen-1-yl)-amit của axit 5-methyl-thiophen-2-carboxylic	1,31	2,3	1
A40	 (R)-Metyl 2-(2-naphtamido)-4-metylpentanoat	0,37		
A41	 N-(Nonan-5-yl)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamit	0,7	2,14	3

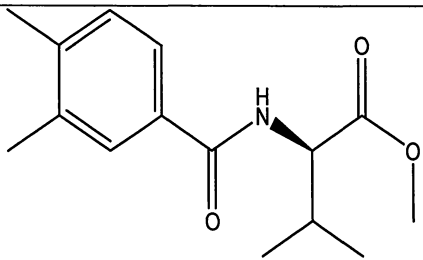
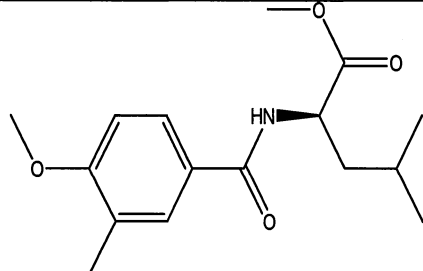
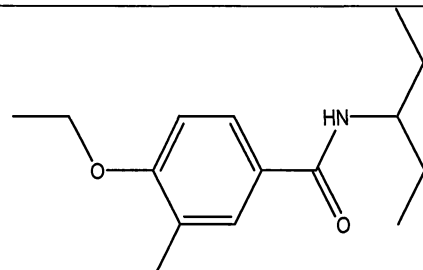
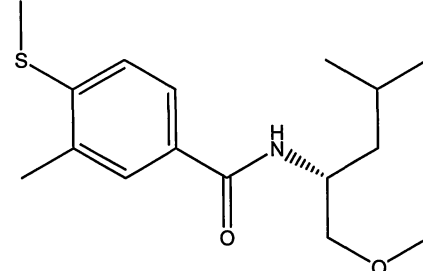
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ Ec ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A42	 (2R,3R)-Metyl 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamido)-3- methylpentanoat	0,35		
A43	 Este metyl của axit 2-[(benzo[1,3]dioxol-5- carbonyl)-amino]- hexanoic	0,49		
A44	 Este metyl của axit (R)-2-[(benzo [1,3]dioxol-5-carbonyl)- amino]-hexanoic	0,61		
A45	 (R)-Etyl 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5- carboxamido)-4-methylpentanoat	0,88		

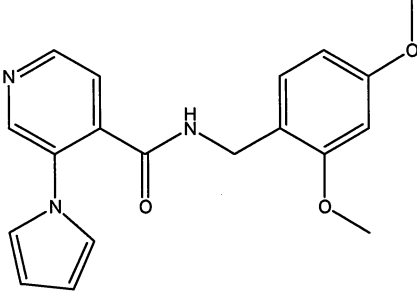
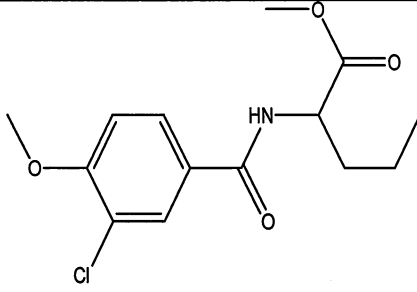
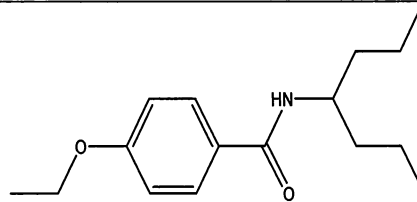
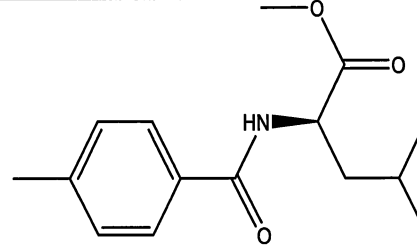
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ Ec ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A46	 (R)-Metyl 2-(2,3-dihydrobenzofuran-5-carboxamido)-4-metylpentanoat	1,32		
A47	 (S)-N-(1,2,3,4-Tetrahydronaphtalen-1-yl) benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamit	1,33	6,42	0,1
A48	 N-(4-Phenylbutan-2-yl)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamit	1,51	9,27	1
A49	 Este metyl của axit 2-[(benzo[1,3]dioxol-5-carbonyl)-amino]- pentanoic	1,54	9,53	1

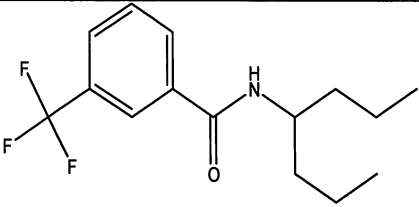
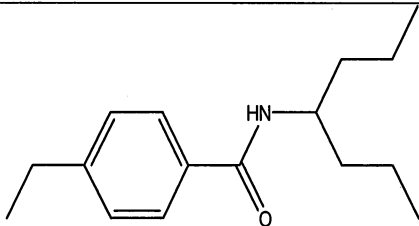
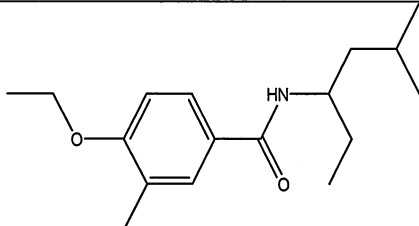
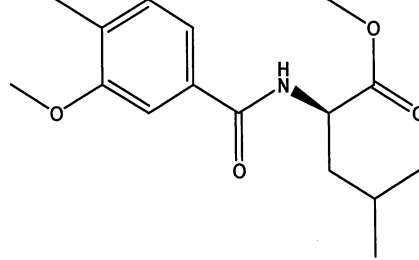
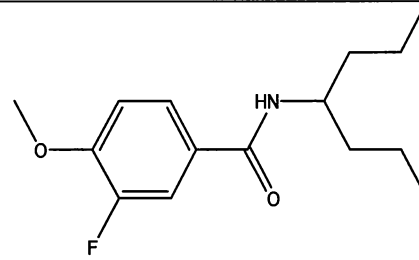
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ Ec ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A50	 N-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2-propylpentanamit	1,57		
A51	 (R)-Propyl 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamido)-4-metylpentanoat	1,58		
A52	 N-(Heptan-4-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-5-carboxamit	1,65		
A53	 N-(Hexan-3-yl)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamit	1,83		

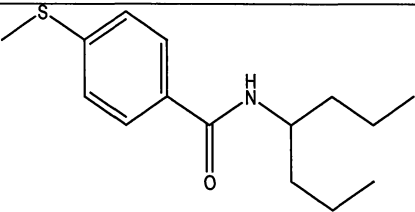
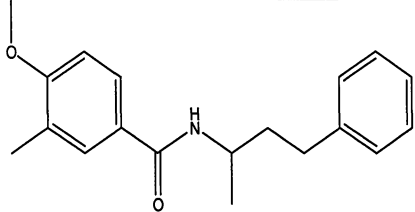
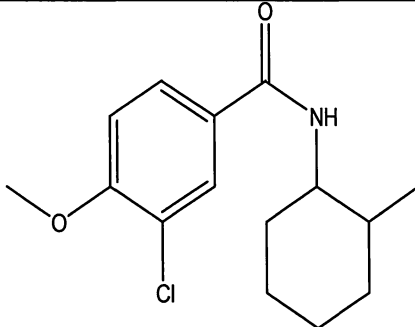
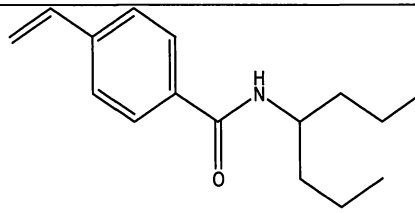
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ Ec ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A54	 N-(Hexan-3-yl)-3-metyl-4-(metylthio)benzamidit	0,12		
A55	 Metyl 2-(3-clo-4-metoxibenzamido)hexanoat	0,12		
A56	 N-(Hexan-3-yl)-3,4-dimetylbenzamidit	0,14		
A57	 (R)-Metyl 4-metyl-2-(4-vinylbenzamido)pentanoat	0,18		

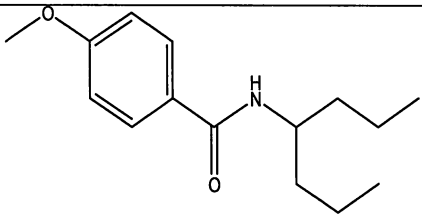
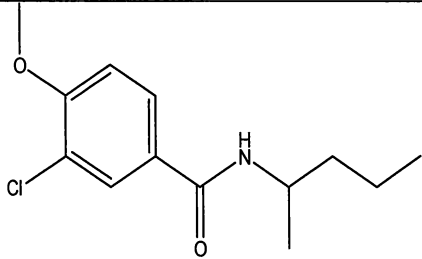
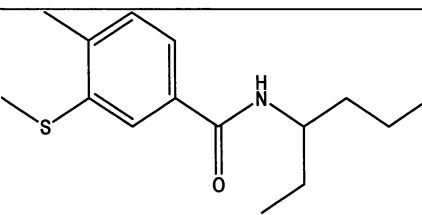
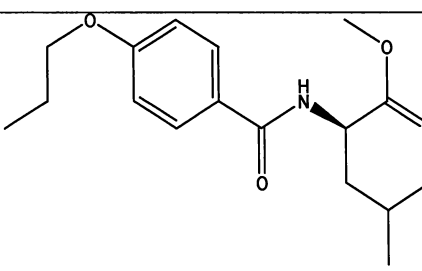
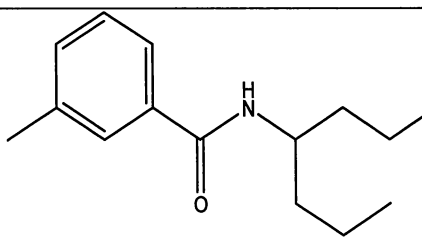
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ Ec ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A58	 4-Methoxy-3-metyl-N-(2-methylpentan-3-yl)benzamid	0,2		
A59	 4-Methoxy-3-metyl-N-(2-methylhexan-3-yl)benzamid	0,2		
A60	 (R)-Metyl 2-(4-(etylthio) benzamido)-4-methylpentanoat	0,2		
A61	 N-(Heptan-4-yl)-4-methoxy-3-methylbenzamid	0,22		

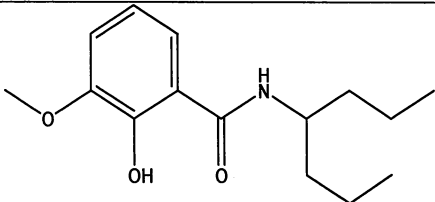
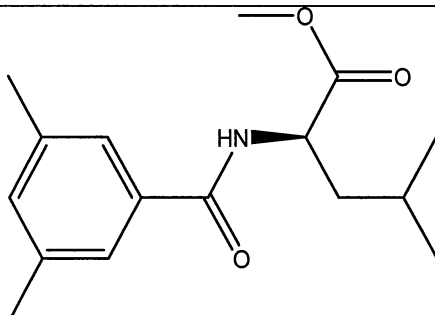
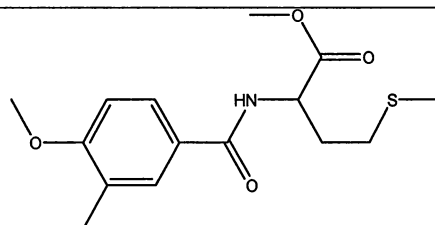
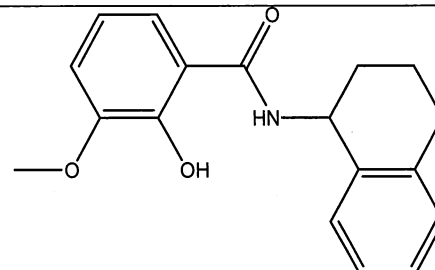
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ Ec ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A62	 (R)-Metyl 2-(3,4-dimethylbenzamido)-3-metylbutanoat	0,25		
A63	 (R)-Metyl 2-(4-metoxý-3-metylbenzamido)-4-metylpentanoat	0,25		
A64	 4-Etoxy-3-metyl-N-(pentan-3-yl)benzamidit	0,26		
A65	 (R)-N-(1-Metoxý-4-metylpentan-2-yl)-3-metyl-4-(metylthio)benzamidit	0,29		

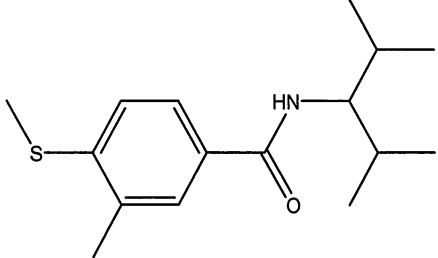
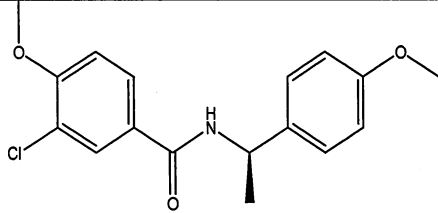
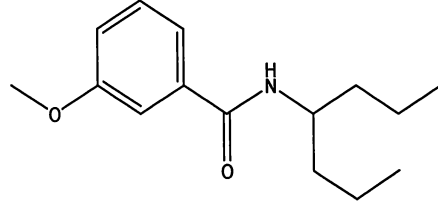
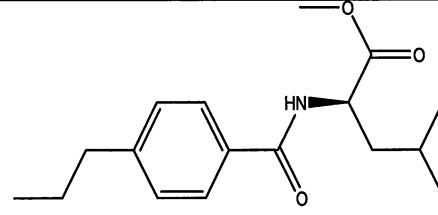
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ Ec ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A66	 N-(2,4-Dimethoxybenzyl)-3-(1H-pyrrol-1-yl)isonicotinamidit	0,29		
A67	 Metyl 2-(3-clo-4-metoxibenzamido)pentanoat	0,29	10,75	1
A68	 4-Etoxy-N-(heptan-4-yl)benzamidit	0,32	2,62	0,3
A69	 (R)-Metyl 4-metyl-2-(4-metylbenzamido)pentanoat	0,32		

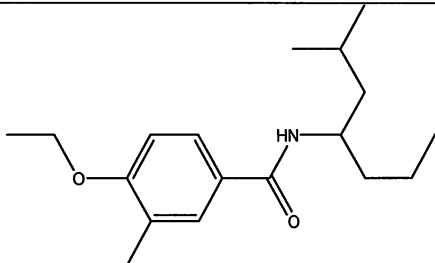
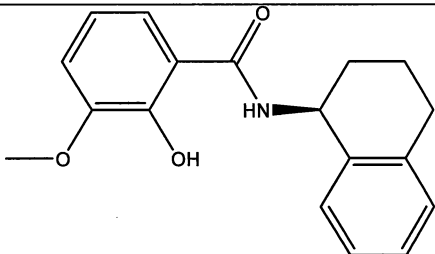
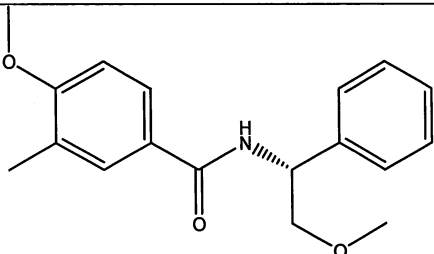
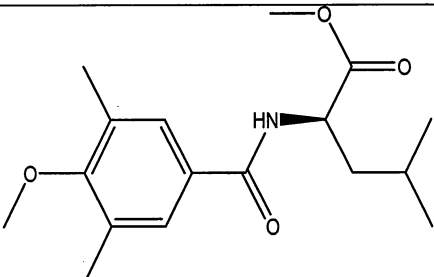
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ Ec ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A70	 N-(Heptan-4-yl)-3-(trifluoromethyl)benzamidit	0,33		
A71	 4-Etyl-N-(heptan-4-yl)benzamidit	0,34		
A72	 4-Etoxy-3-metyl-N-(5-metylhexan-3-yl)benzamidit	0,34		
A73	 (R)-Metyl 2-(3-metoxi-4-metylbenzamido)-4-metylpentanoat	0,34		
A74	 3-Flo-N-(heptan-4-yl)-4-metoxibenzamidit	0,35	4,98	0,3

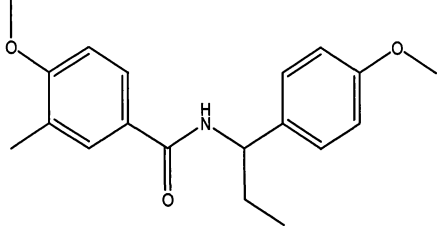
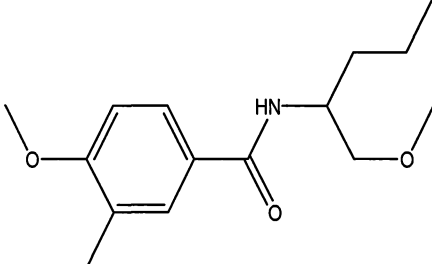
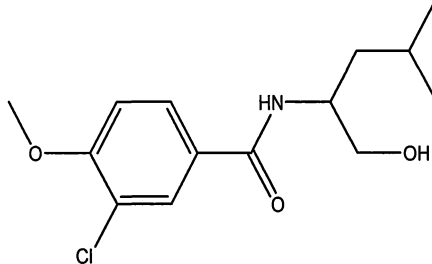
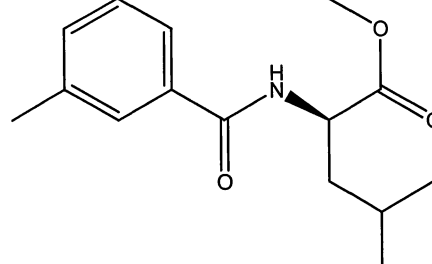
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ Ec ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A75	 N-(Heptan-4-yl)-4-(methylthio)benzamidit	0,39		
A76	 4-Metoxi-3-metyl-N-(4-phenylbutan-2-yl) benzamidit	0,4		
A77	 3-Clo-4-metoxi-N-(2-metylxclohexyl)benzamidit	0,44		
A78	 c N-(Heptan-4-yl)-4-vinylbenzamidit	0,46	10,22	0,3

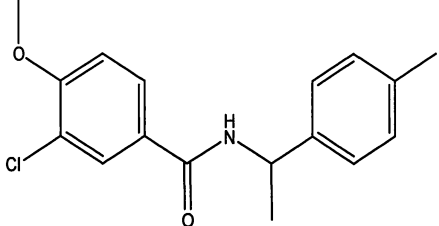
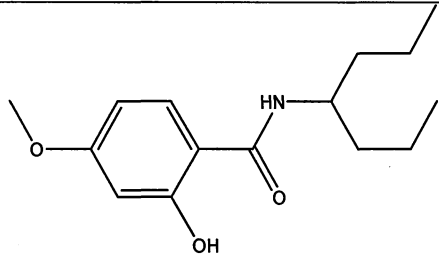
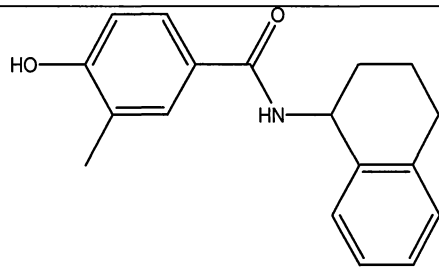
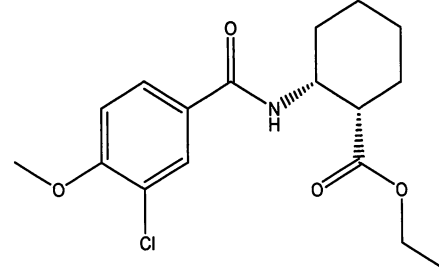
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ Ec ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A79	 N-(Heptan-4-yl)-4-methoxybenzamidit	0,46		
A80	 3-Clo-4-methoxy-N-(pentan-2-yl)benzamidit	0,47	5,12	0,1
A81	 N-(Hexan-3-yl)-4-metyl-3-(metylthio)benzamidit	0,5		
A82	 (R)-Metyl 4-metyl-2-(4-propoxybenzamido)pentanoat	0,51		
A83	 N-(Heptan-4-yl)-3-metylbenzamidit	0,52		

Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ Ec ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A84	 N-(Heptan-4-yl)-2-hydroxy-3-methoxybenzamidit	0,53		
A85	 (R)-Metyl 2-(3,5-dimethylbenzamido)-4-metylpentanoat	0,53		
A86	 Metyl 2-(4-methoxy-3-methylbenzamido)-4-(metylthio)butanoat	0,53		
A87	 2-Hydroxy-3-methoxy-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-yl)benzamidit	0,54	3,8	1

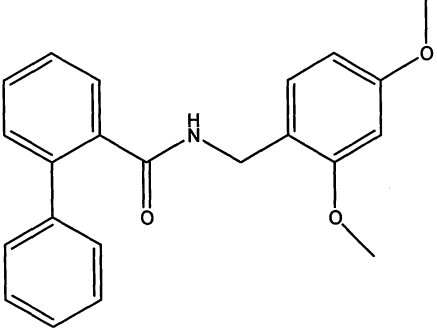
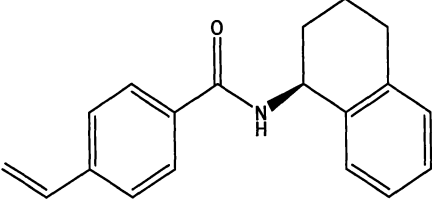
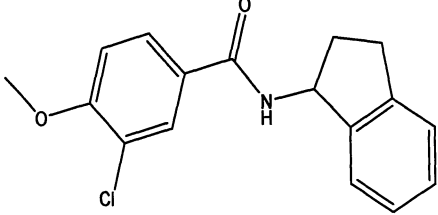
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ Ec ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A88	 N-(2,4-Dimethylpentan-3-yl)-3-methyl-4-(methylthio)benzamidit	0,55		
A89	 (R)-3-Clo-4-metoxi-N-(1-(4-metoxiphenyl)etyl)benzamidit	0,6	2,85	1
A90	 N-(Heptan-4-yl)-3-metoxibenzamidit	0,61		
A91	 (R)-Metyl 4-metyl-2-(4-propylbenzamido) pentanoat	0,62		

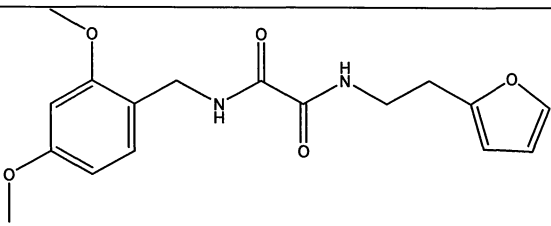
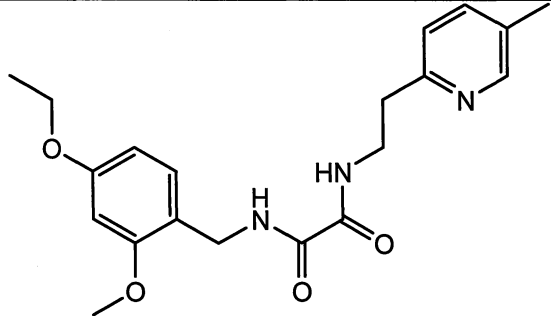
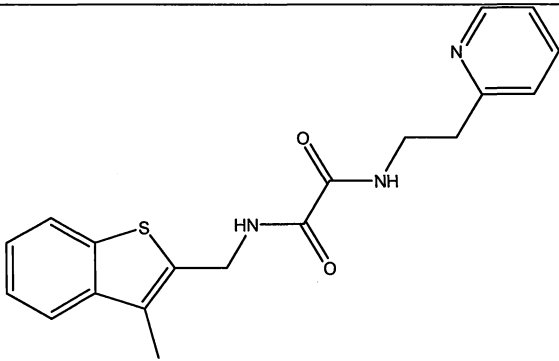
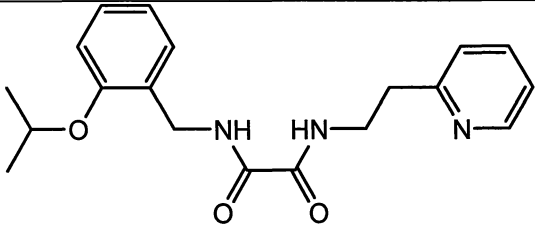
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A92	 4-Etoxy-3-metyl-N-(2-metylheptan-4-yl)benzamid	0,65		
A93	 (S)-2-Hydroxy-3-metoxi-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-yl)benzamid	0,7	5,7	1
A94	 (R)-4-Metoxi-N-(2-metoxi-1-phenyletyl)-3-metylbenzamid	0,72		
A95	 (R)-Metyl 2-(4-metoxi-3,5-dimetylbenzamido)-4-metylpentanoat	0,74		

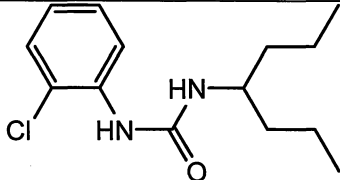
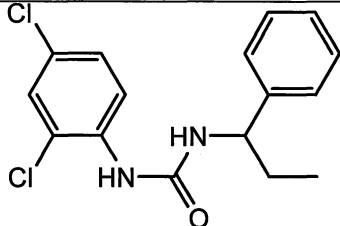
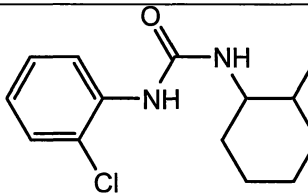
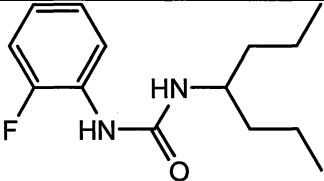
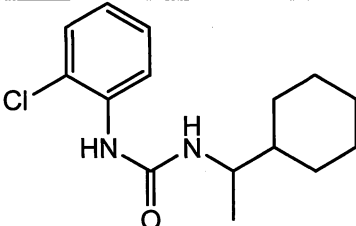
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ Ec ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A96	 4-Methoxy-N-(1-(4-methoxyphenyl)propyl)-3-methylbenzamidit	0,76		
A97	 4-Methoxy-N-(1-metoxypentan-2-yl)-3-methylbenzamidit	0,85		
A98	 3-Clo-N-(1-hydroxy-4-metypentan-2-yl)-4-metoxybenzamidit	0,88		
A99	 (R)-Metyl 4-metyl-2-(3-metylbenzamido)pentanoat	0,89		

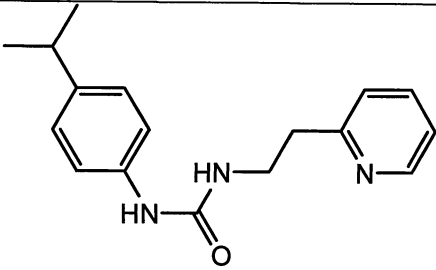
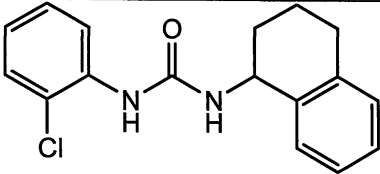
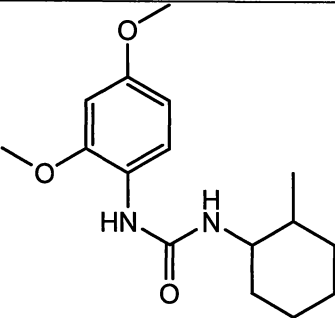
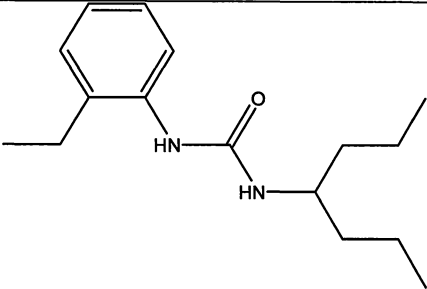
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A100	 3-Clo-4-metoxi-N-(1-p-tolyletyl)benzamidit	1,1		
A101	 N-(Heptan-4-yl)-2-hydroxy-4-metoxibenzamidit	1,16	7,62	1
A102	 4-Hydroxy-3-metyl-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-yl)benzamidit	1,32	9,49	1
A103	 (1S,2R)-Etyl 2-(3-clo-4-metoxibenzamido)xyclohexancarboxylat	1,36		

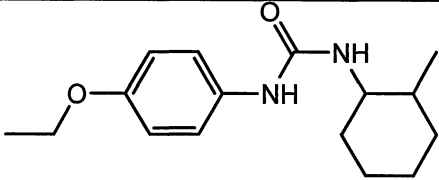
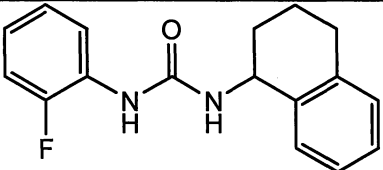
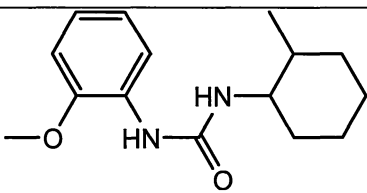
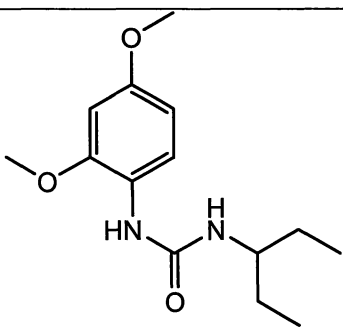
Bảng 1 - Hợp chất amit làm tăng vị umami

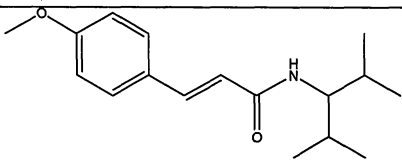
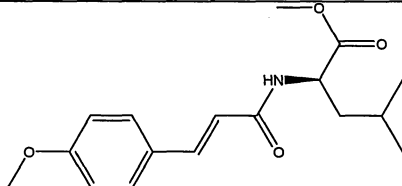
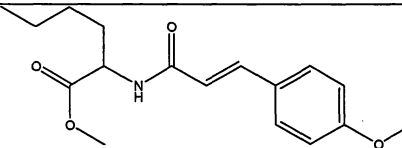
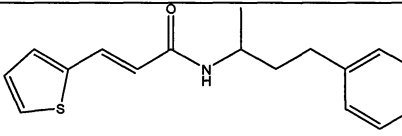
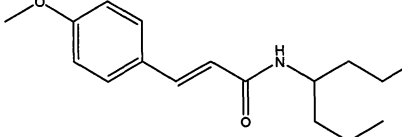
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ Ec ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
A104	 2,4-Dimethoxy-benzylamit của axit biphenyl-2-carboxylic	1,37		
A105	 (S)-N-(1,2,3,4-Tetrahydronaphtalen-1-yl)-4-vinylbenzamid	1,38	2,79	1
A106	 3-Clo-N-(2,3-dihydro-1H-inden-1-yl)-4-metoxibenamid	1,39	4,01	0,3

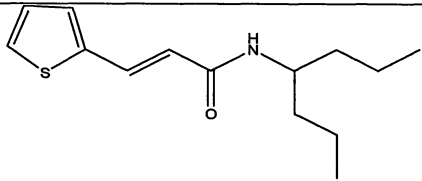
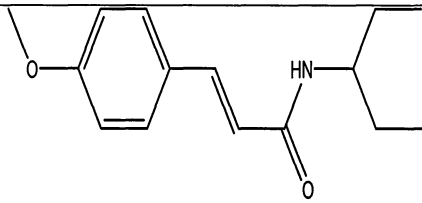
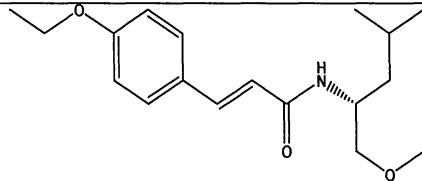
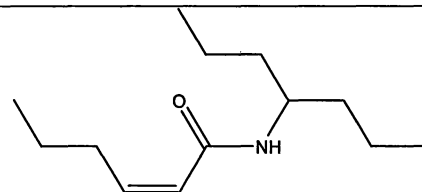
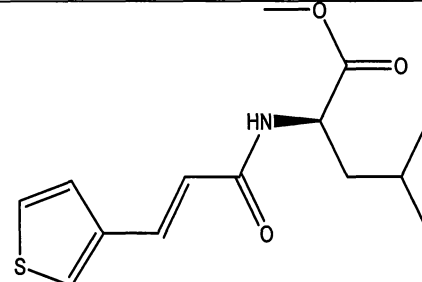
Bảng 2 – Hợp chất oxalamit làm tăng vị umami			
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ (so với MSG)
B1	 N1-(2,4-Dimethoxybenzyl)-N2-(2-(furan-2-yl)ethyl)oxalamit	0,18	
B2	 N1-(4-Etoxy-2-methoxybenzyl)-N2-(2-(5-methylpyridin-2-yl)ethyl)oxalamit	0,19	
B3	 N-(3-Methyl-benzo[b]thiophen-2-ylmethyl)-N'-(2-pyridin-2-yl-ethyl)-oxalamit	0,81	
B4	 N1-(2-Isopropoxybenzyl)-N2-(2-(pyridin-2-yl)ethyl)oxalamit	1,22	

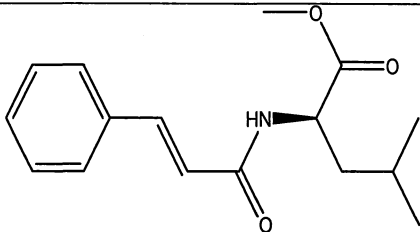
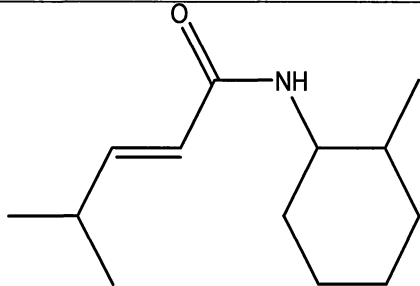
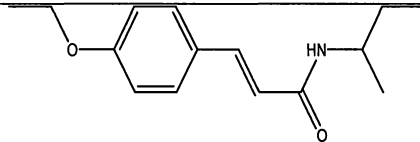
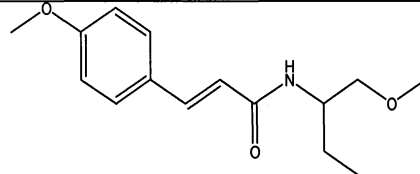
Bảng 3 – Hợp chất ure làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Tên gọi theo IUPAC	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ (so với MSG)	Nồng độ (uM)
C1	 1-(2-Clophenyl)-3-(heptan-4-yl)ure	0,37	4,95	1
C2	 1-(2,4-Diclophenyl)-3-(1-phenylpropyl)ure	0,49	4,52	1
C3	 1-(2-Clophenyl)-3-(2-metylxcyclohexyl)ure	0,52	3,24	3
C4	 1-(2-Flophenyl)-3-(heptan-4-yl)ure	0,79	12,15	3
C5	 1-(2-Clophenyl)-3-(1-xyclohexyletyl)ure	0,84	9,08	1

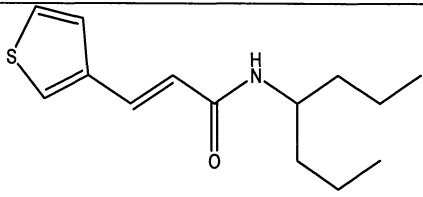
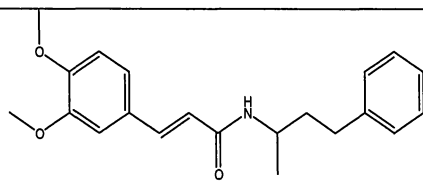
Bảng 3 – Hợp chất ure làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Tên gọi theo IUPAC	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ (so với MSG)	Nồng độ (uM)
C6	 1-(4-Isopropylphenyl)-3-(2-(pyridin-2-yl)ethyl)urea	0,98		
C7	 1-(2-Chlophenyl)-3-(1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-yl)urea	0,99	3,68	1
C8	 1-(2,4-Dimetoxyphenyl)-3-(2-metylxclohexyl)urea	1,41	2,62	0,3
C9	 1-(2-Etylphenyl)-3-(heptan-4-yl)urea	1,42		

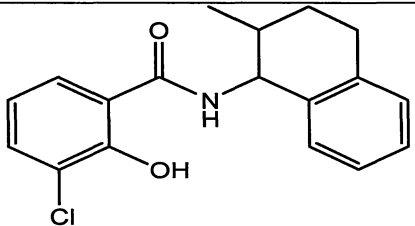
Bảng 3 – Hợp chất ure làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Tên gọi theo IUPAC	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ (so với MSG)	Nồng độ (uM)
C10	 1-(4-Etoxyphenyl)-3-(2-methylcyclohexyl)ure	1,51	2,1	0,3
C11	 1-(2-Fluorophenyl)-3-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)ure	1,65	4,49	1
C12	 1-(2-Methoxyphenyl)-3-(2-methylcyclohexyl)ure	1,67		
C13	 1-(2,4-Dimethoxyphenyl)-3-(pentan-3-yl)ure	1,72	11,87	1

Bảng 4 – Hợp chất acrylamit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
D1	 (E)-N-(2,4-Dimethylpentan-3-yl)-3-(4-methoxyphenyl)acrylamit	0,29	3,46	1
D2	 (R,E)-Metyl 2-(3-(4-methoxyphenyl)acrylamido)-4-methylpentanoat	0,32		
D3	 (E)-Metyl 2-(3-(4-methoxyphenyl)acrylamido)hexanoat	0,63		
D4	 N-(1-Metyl-3-phenyl-propyl)-3-thiophen-2-yl-acrylamit	0,69	9,73	1
D5	 (E)-N-(Heptan-4-yl)-3-(4-methoxyphenyl)acrylamit	0,72	3,48	0,3

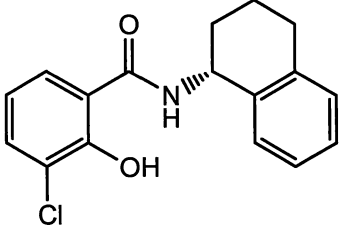
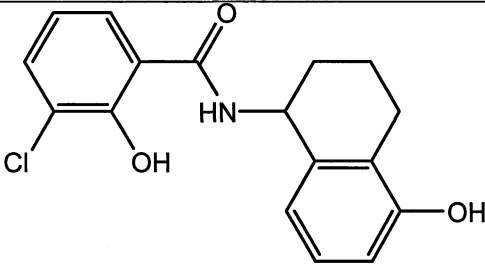
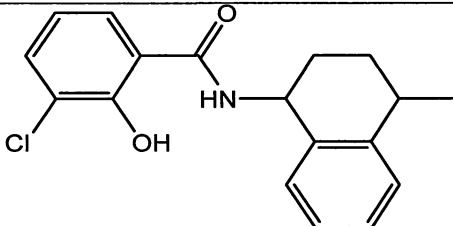
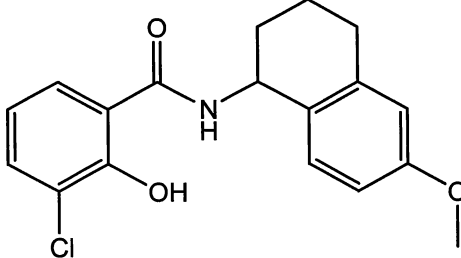
Bảng 4 – Hợp chất acrylamit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
D6	 N-(1-Propyl-butyl)-3-thiophen-2-yl-acrylamit	0,75	6,3	1
D7	 (E)-3-(4-Metoxyphenyl)-N-(pentan-3-yl)acrylamit	0,82	9,62	1
D8	 (R,E)-3-(4-Etoxyphenyl)-N-(1-metoxy-4-methylpentan-2-yl)acrylamit	0,94		
D9	 (Z)-N-(Heptan-4-yl)hex-2-enamit	0,98		
D10	 (R,E)-Metyl 4-metyl-2-(3-(thiophen-3-yl)acrylamido)pentanoat	1,09		

Bảng 4 – Hợp chất acrylamit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
D11	 (R)-Metyl 2-xinamamido-4-methylpentanoat	1,17		
D12	 (E)-4-Metyl-N-(2-metylxcyclohexyl) pent-2-enamit	1,28		
D13	 (E)-N-sec-Butyl-3-(4-etoxyphenyl)acrylamit	1,31	2,7	0,3
D14	 (E)-N-(1-Metoxibutan-2-yl)-3-(4-metoxiphenyl)acrylamit	1,43	8,48	1

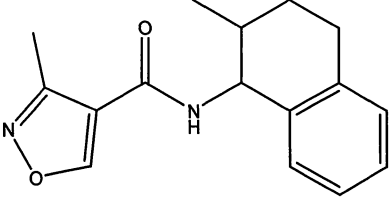
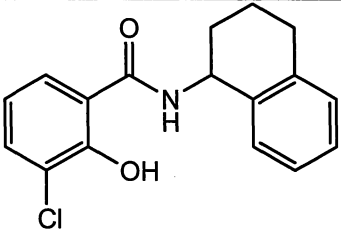
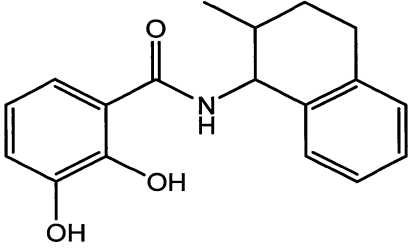
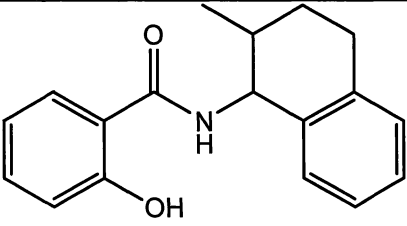
Bảng 4 – Hợp chất acrylamit làm tăng vị umami				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ (so với MSG)	@ (uM)
D15	 (E)-N-(Heptan-4-yl)-3-(thiophen-3-yl)acrylamit	1,54	2,22	0,3
D16	 (E)-3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-N-(4-phenylbutan-2-yl)acrylamit	1,56	3,13	1

Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E1	 3-Clo-2-hydroxy-N-(2-metyl-1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-yl)benzamit	0,19		

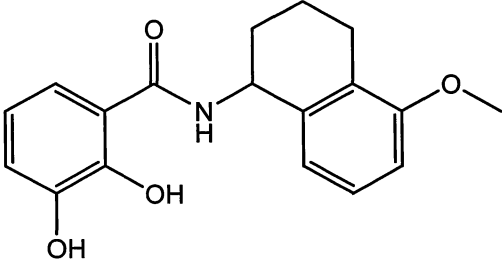
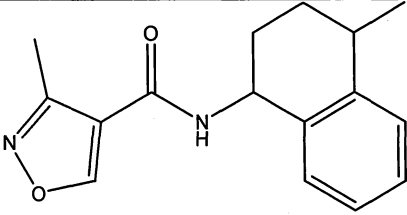
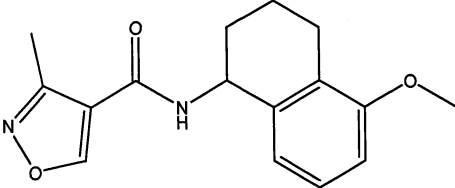
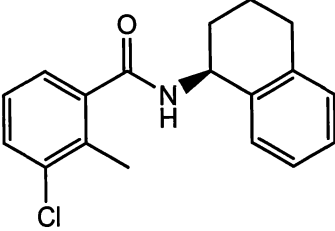
Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt

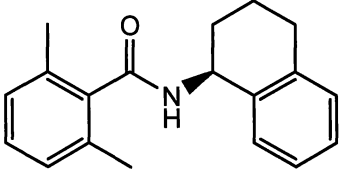
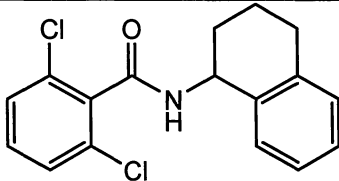
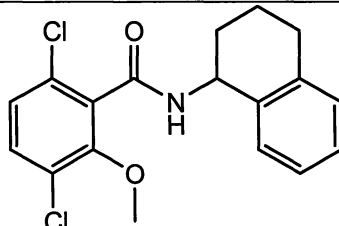
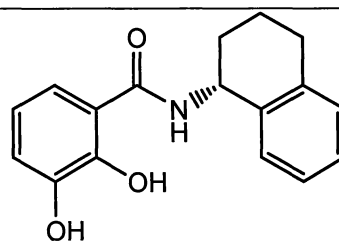
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E2	 (R)-3-Clo-2-hydroxy-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-yl)benzamidit	0,65		
E3	 3-Clo-2-hydroxy-N-(5-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-yl)benzamidit	1,03		
E4	 3-Clo-2-hydroxy-N-(4-metyl-1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-yl)benzamidit	1,61		
E5	 3-Clo-2-hydroxy-N-(6-metoxi-1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-yl)benzamidit	1,61		

Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt

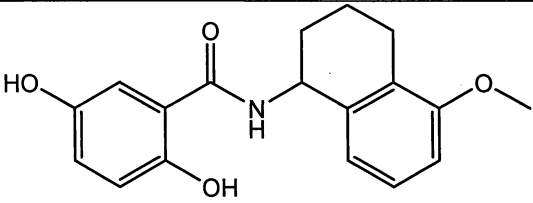
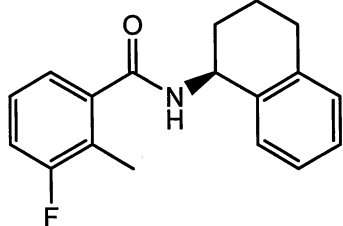
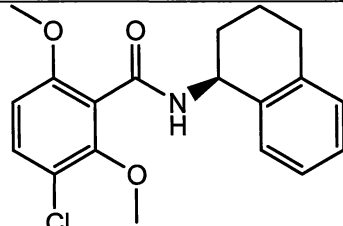
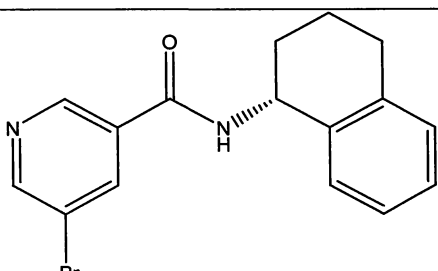
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E6	 3-Metyl-N-(2-metyl-1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-yl)isoxazol-4-carboxamit	1,48		
E7	 3-Clo-2-hydroxy-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-yl)benzamit	1,81		4,04
E8	 2,3-Dihydroxy-N-(2-metyl-1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-yl)benzamit	1,98		
E9	 2-Hydroxy-N-(2-metyl-1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-yl)benzamit	2,36		

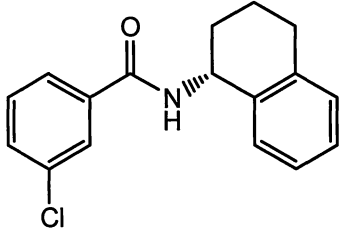
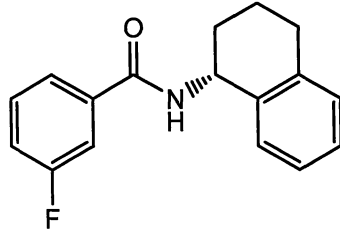
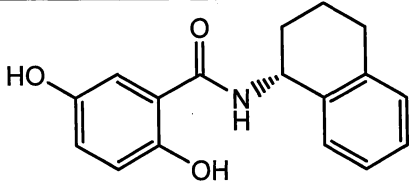
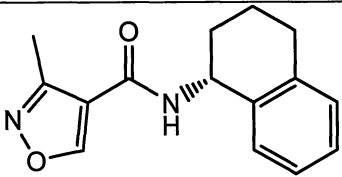
Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt

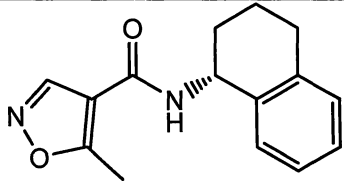
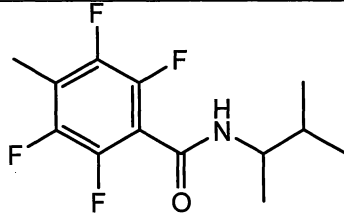
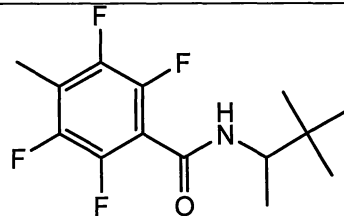
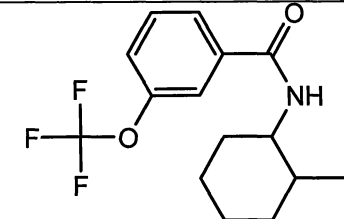
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E10	 2,3-Dihydroxy-N-(5-methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)benzamidit	2,44		
E11	 3-Metyl-N-(4-metyl-1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-yl)isoxazol-4-carboxamidit	2,46		
E12	 N-(5-Metoxi-1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-yl)-3-metylisoxazol-4-carboxamidit	2,85		
E13	 (S)-3-Clo-2-metyl-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-yl)benzamidit	2,91		

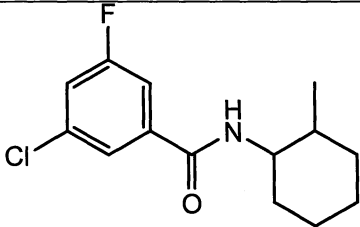
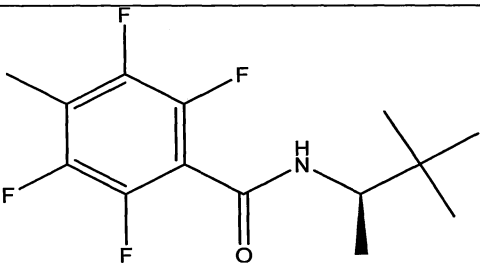
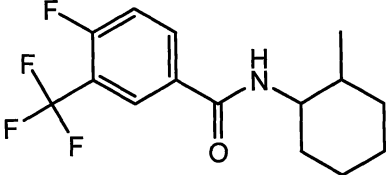
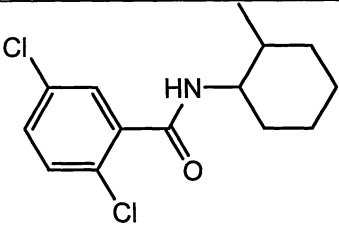
Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E14	 (S)-2,6-Dimetyl-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-yl)benzamidit	2,91		
E15	 2,6-Diclo-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-yl)benzamidit	3,02		
E16	 3,6-Diclo-2-metoxi-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-yl)benzamidit	3,04		
E17	 (R)-2,3-Dihidroksi-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-yl)benzamidit	3,13		

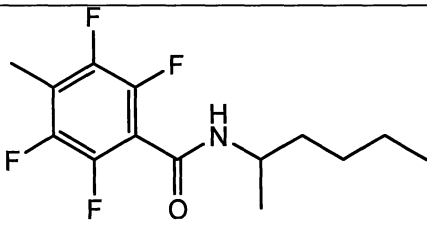
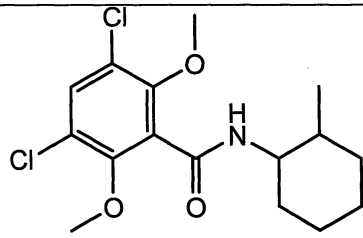
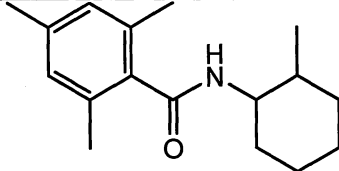
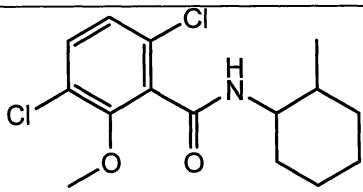
Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt

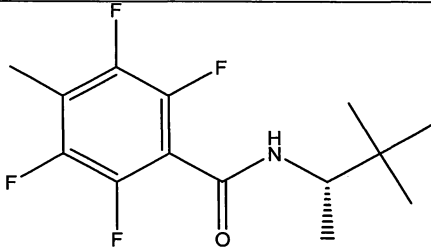
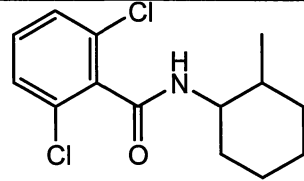
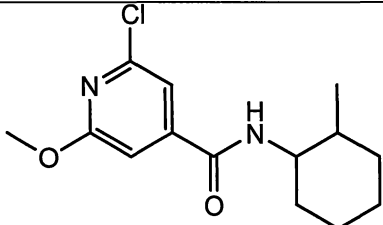
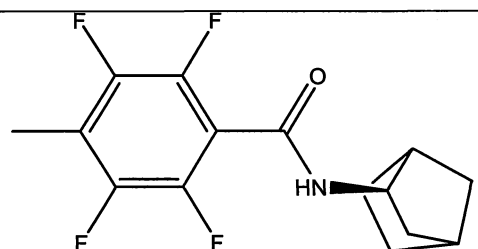
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E18	 2,5-Dihydroxy-N-(5-methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)benzamidit	3,38		
E19	 (S)-3-fluoro-2-methyl-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)benzamidit	3,57		
E20	 (S)-3-Cl-2,6-dimethoxy-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)benzamidit	4,13		
E21	 (R)-5-Bromo-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)nicotinamidit	4,19		

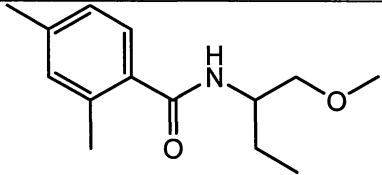
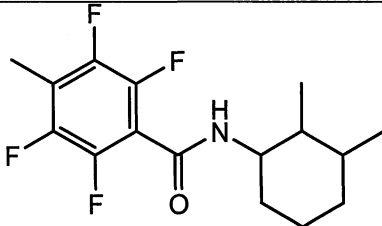
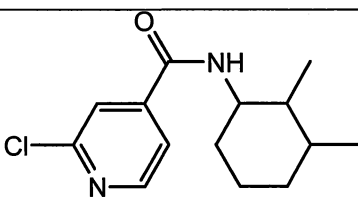
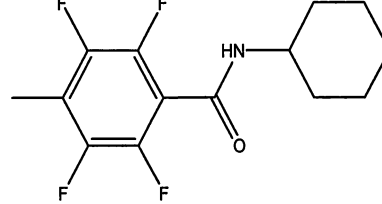
Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E22	 (R)-3-Clo-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)benzamidit	4,52		
E23	 (R)-3-Flo-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)benzamidit	4,86		
E24	 (R)-2,5-Dihydroxy-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)benzamidit	6,04		
E25	 (R)-3-Metyl-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)isoxazol-4-carboxamidit	7,79		

Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E26	 (R)-5-Metyl-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-yl)isoxazol-4-carboxamit	8,09		
E27	 2,3,5,6-Tetraflo-4-metyl-N-(3-metylbutan-2-yl)benzamit	0,14		
E28	 N-(3,3-Dimetylbutan-2-yl)-2,3,5,6-tetraflo-4-metylbenzamit	0,21		
E29	 N-(2-Metylxcyclohexyl)-3-(triflometoxy)benzamit	0,42		

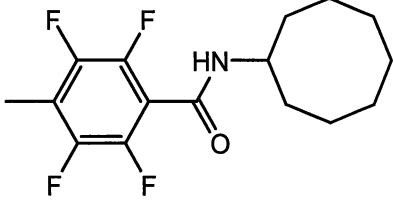
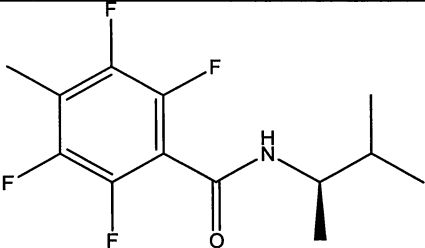
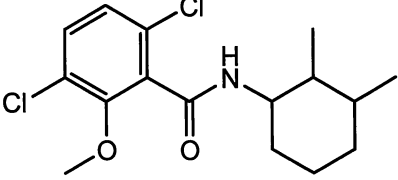
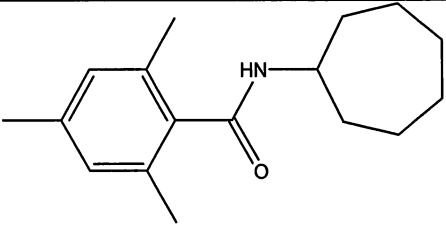
Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E30	 3-Clo-5-flo-N-(2-methylcyclohexyl)benzamidit	0,45		
E31	 (R)-N-(3,3-Dimetylbutan-2-yl)-2,3,5,6-tetraflo-4-metylbenzamidit	0,49		
E32	 4-Flo-N-(2-methylcyclohexyl)-3-(triflometyl)benzamidit	0,51		
E33	 2,5-Diclo-N-(2-methylcyclohexyl)benzamidit	0,63		

Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E34	 2,3,5,6-Tetrafluoro-N-(hexan-2-yl)-4-methylbenzamidit	0,71		
E35	 3,5-Diclo-2,6-dimetoxy-N-(2-metylxcyclohexyl)benzamidit	0,71		
E36	 2,4,6-Trimetyl-N-(2-metylxcyclohexyl)benzamidit	0,72		
E37	 3,6-Diclo-2-metoxy-N-(2-metylxcyclohexyl)benzamidit	0,77		

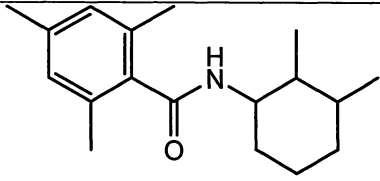
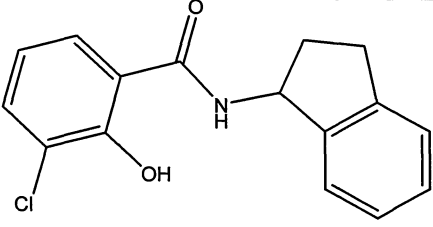
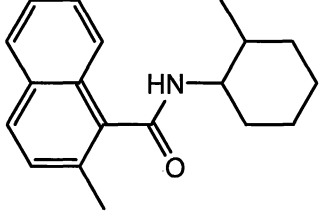
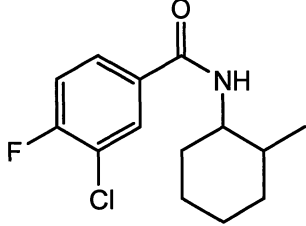
Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E38	 (S)-N-(3,3-Dimethylbutan-2-yl)-2,3,5,6-tetraflo-4-metylbenzamidit	0,9		
E39	 2,6-Diclo-N-(2-metylxclohexyl)benzamidit	0,91		
E40	 2-Clo-6-metoxi-N-(2-metylxclohexyl)isonicotinamidit	0,95		9,77
E41	 N-((2R)-Bixyclo[2.2.1]heptan-2-yl)-2,3,5,6-tetraflo-4-metylbenzamidit	1,02		

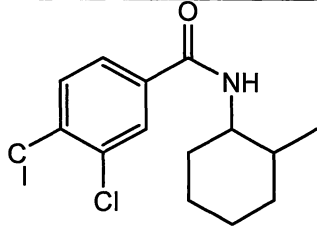
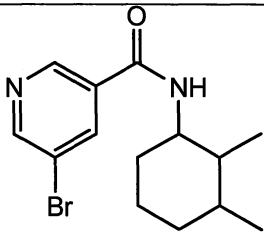
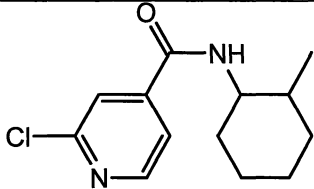
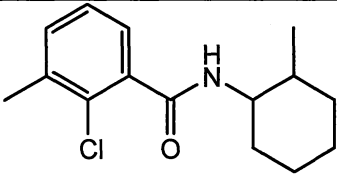
Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E42	 N-(1-Metoxibutan-2-yl)-2,4-dimetylbenzamidit	1,06		
E43	 N-(2,3-Dimetylxcyclohexyl)-2,3,5,6-tetraflo-4-metylbenzamidit	1,08		
E44	 2-Clo-N-(2,3-dimetylxcyclohexyl)isonicotinamidit	1,08		
E45	 N-Xyclohexyl-2,3,5,6-tetraflo-4-metylbenzamidit	1,13		

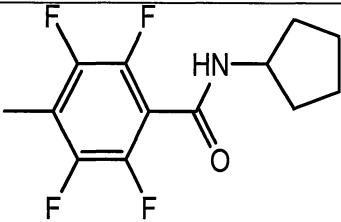
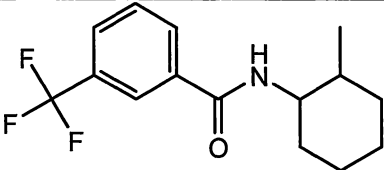
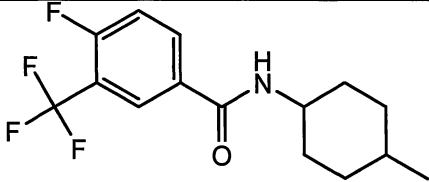
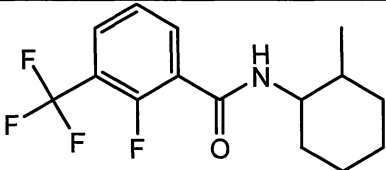
Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt

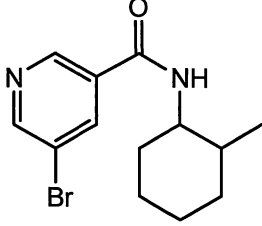
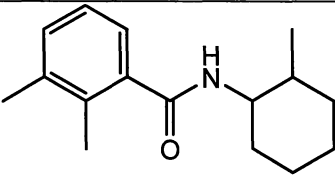
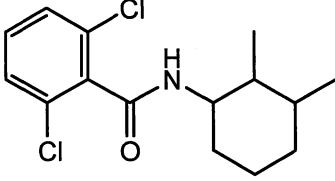
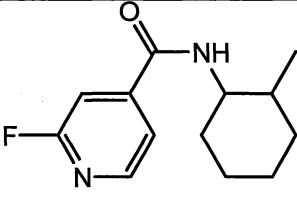
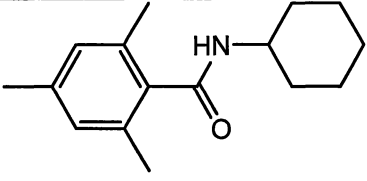
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E46	 N-Xyclooctyl-2,3,5,6-tetrafluoro-4-methylbenzamidit	1,25		
E47	 (R)-2,3,5,6-Tetrafluoro-4-metyl-N-(3-metylbutan-2-yl)benzamidit	1,25		
E48	 3,6-Diclo-N-(2,3-dimetylxcyclohexyl)-2-metoxibenamidit	1,29		
E49	 N-Xycloheptyl-2,4,6- trimetylbenzamidit	1,39		

Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt

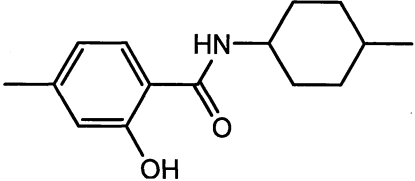
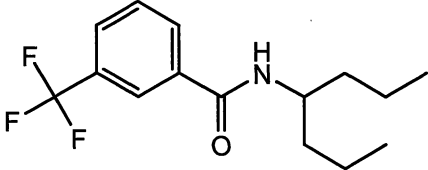
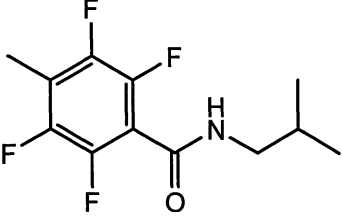
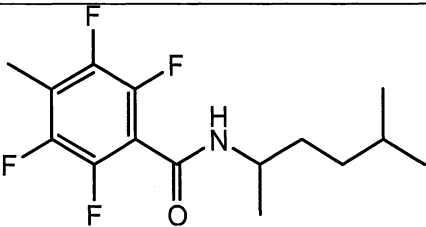
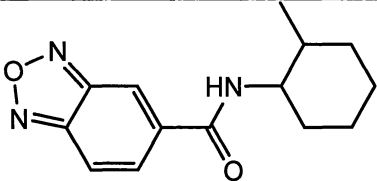
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E50	 N-(2,3-Dimethylcyclohexyl)-2,4,6-trimethylbenzamid	1,41		
E51	 3-Clo-N-(2,3-dihydro-1H-inden-1-yl)-2-hydroxybenzamid	1,49		
E52	 2-Metyl-N-(2-metylxcyclohexyl)-1-naphtamid	1,52		
E53	 3-Clo-4-flo-N-(2-metylxcyclohexyl)benzamid	1,7		

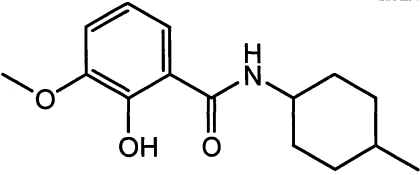
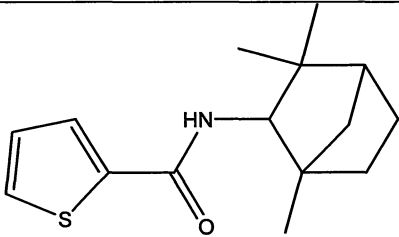
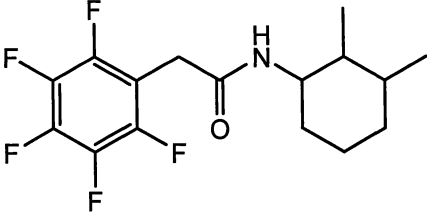
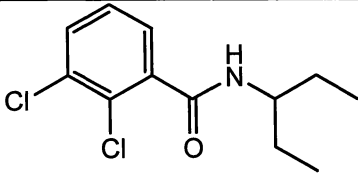
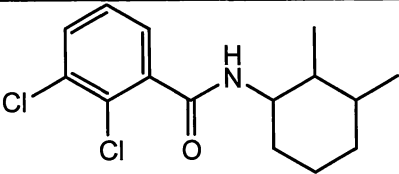
Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E54	 3,4-Diclo-N-(2-metylxclohexyl)benzamidit	1,83		10,66
E55	 5-Bromo-N-(2,3-dimetylxclohexyl)nicotinamidit	1,89		
E56	 2-Clo-N-(2-metylxclohexyl)isonicotinamidit	1,92		2,08
E57	 2-Clo-3-metyl-N-(2-metylxclohexyl)benzamidit	1,95		

Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E58	 N-Xyclopentyl-2,3,5,6-tetraflo-4-metylbenzamid	2,23		
E59	 N-(2-Metylxclohexyl)-3-(triflometyl)benzamid	2,34		2,07
E60	 4-Flo-N-(4-metylxclohexyl)-3-(triflometyl)benzamid	2,37		
E61	 2-Flo-N-(2-metylxclohexyl)-3-(triflometyl)benzamid	2,4		

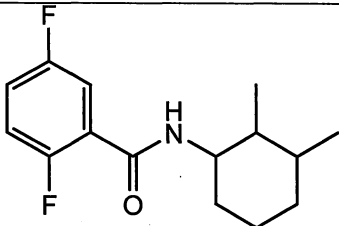
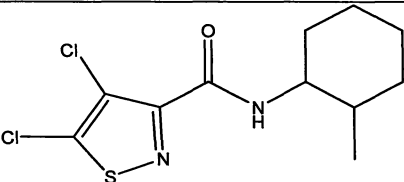
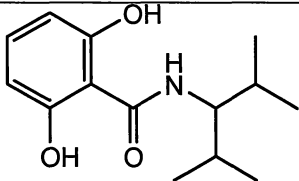
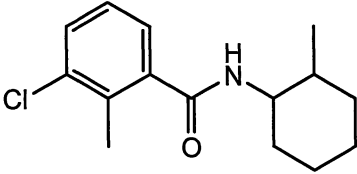
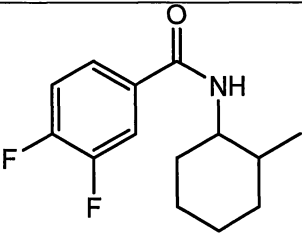
Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E62	 5-Bromo-N-(2-methylcyclohexyl)nicotinamid	2,42		
E63	 2,3-Dimetyl-N-(2-methylcyclohexyl)benzamit	2,6		
E64	 2,6-Diclo-N-(2,3-dimethylcyclohexyl)benzamit	2,77		
E65	 2-Flu-N-(2-methylcyclohexyl)isonicotinamid	2,83		
E66	 N-Xyclohexyl-2,4,6-trimetylbenzamit	2,86		

Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt

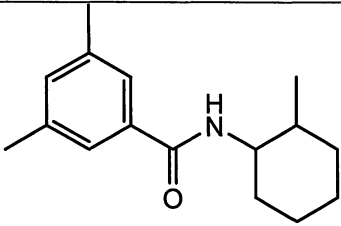
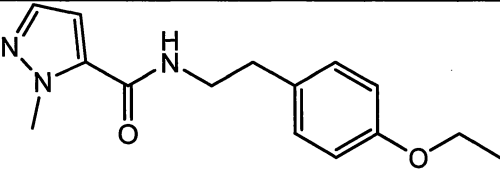
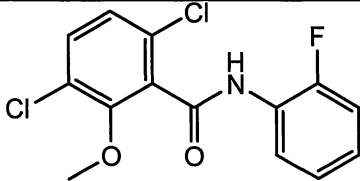
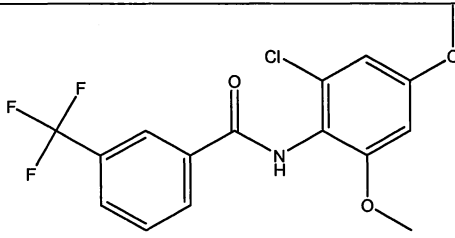
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E67	 2-Hydroxy-4-metyl-N-(4-metylxclohexyl)benzamidit	2,98		
E68	 N-(Heptan-4-yl)-3-(triflometyl)benzamidit	3,03	0,33	
E69	 2,3,5,6-Tetraflo-N-isobutyl-4-metylbenzamidit	3,19		
E70	 2,3,5,6-Tetraflo-4-metyl-N-(5-metylhexan-2-yl)benzamidit	3,2		
E71	 N-(2-Metylxclohexyl)-benzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-carboxamidit	3,33		

Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E72	 2-Hydroxy-3-methoxy-N-(4-methylcyclohexyl)benzamidit	3,35		
E73	 (1,3,3-Trimetyl-bixyclo[2.2.1]hept-2-yl)-amit của axit thiophen- 2-carboxylic	3,36		
E74	 N-(2,3-Dimetylxcyclohexyl)-2-(perflophenyl)axetamidit	3,62		
E75	 2,3-Diclo-N-(pentan-3-yl)benzamidit	3,78		
E76	 2,3-Diclo-N-(2,3-dimetylxcyclohexyl)benzamidit	3,99		

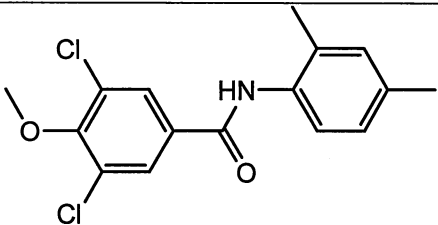
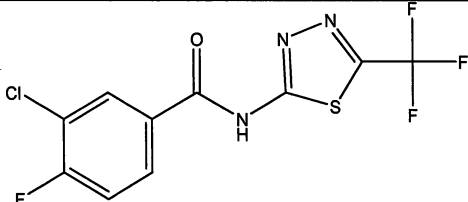
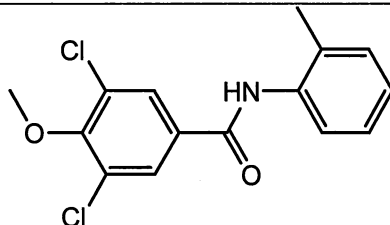
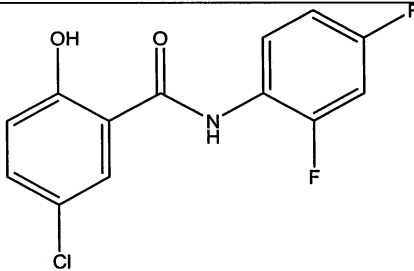
Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt

Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E77	 N-(2,3-Dimethylcyclohexyl)-2,5-diflobenzamit	4,11		
E78	 (2-Methyl-cyclohexyl)-amit của axit 4,5-diclo-isothiazol-3-carboxylic	4,24	8,51	
E79	 N-(2,4-Dimethylpentan-3-yl)-2,6-dihydroxybenzamit	4,28		
E80	 3-Clo-2-metyl-N-(2-methylcyclohexyl)benzamit	4,29		
E81	 3,4-Diflo-N-(2-methylcyclohexyl)benzamit	4,37		6,98

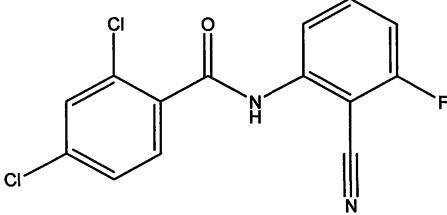
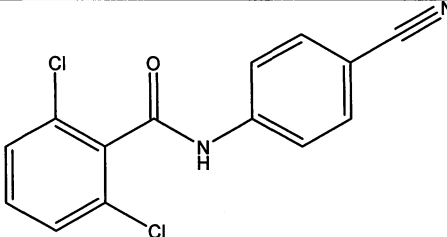
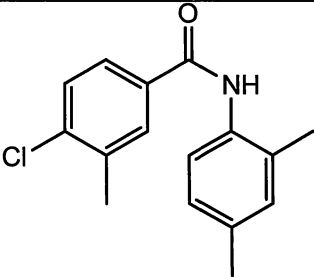
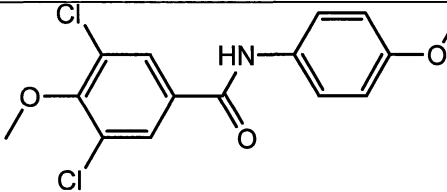
Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt

Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E82	 3,5-Dimetyl-N-(2-methylcyclohexyl)benzamidit	4,48		
E83	 N-(4-Etoxyphenetyl)-1-metyl-1H-pyrazol-5-carboxamidit	4,68		
E84	 3,6-Diclo-N-(2-florophenyl)-2-metoxibenamidit	0,83		16,51
E85	 N-(2-Clo-4,6-dimetoxi-phenyl)-3-triflometyl-benzamidit	1,42		

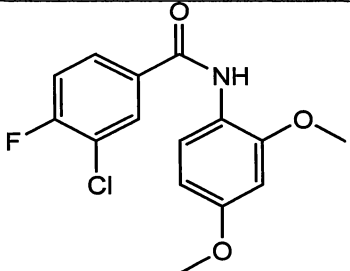
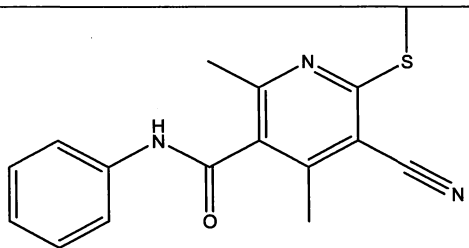
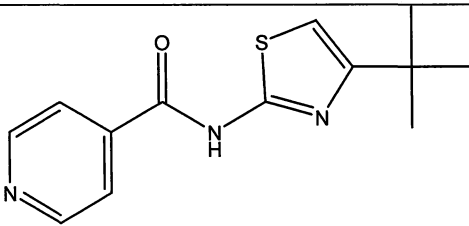
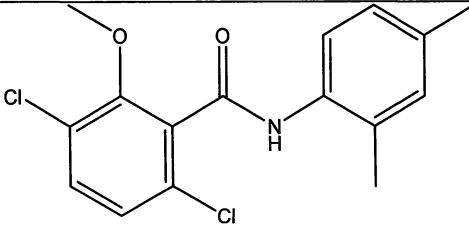
Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt

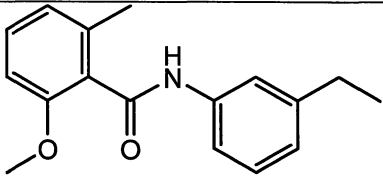
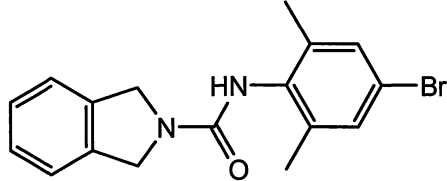
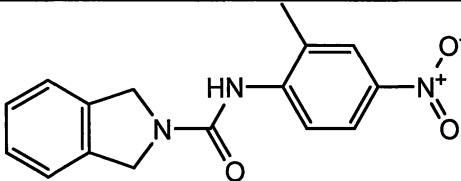
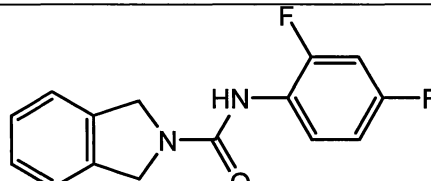
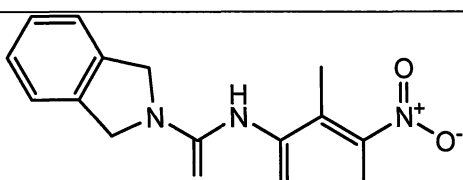
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E86	 3,5-Diclo-N-(2,4-dimetylphenyl)-4-metoxycarbonylbenzamidit	1,48		
E87	 3-Clo-4-flo-N-(5-triflometyl-[1,3,4]thiadiazol-2-yl)-benzamidit	1,55		
E88	 3,5-Diclo-4-metoxycarbonyl-N-o-tolylbenzamidit	1,84		
E89	 5-Clo-N-(2,4-diflo-phenyl)-2-hydroxy-benzamidit	2,56		

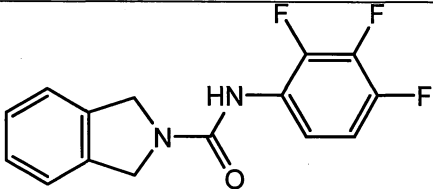
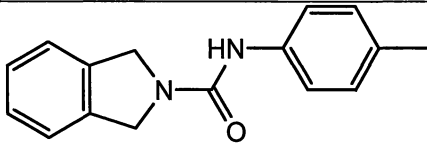
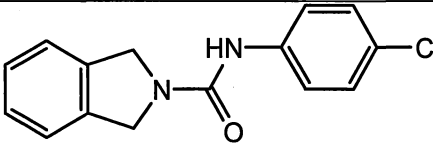
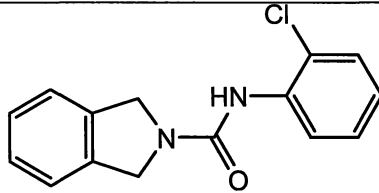
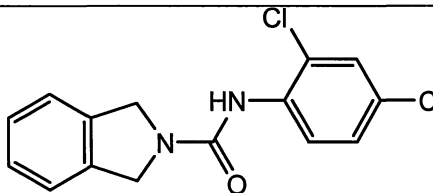
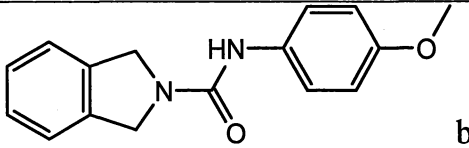
Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt

Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E90	 2,4-Diclo-N-(2-xyano-3-flo-phenyl)-benzamid	2,71		
E91	 2,6-Diclo-N-(4-xyano-phenyl)-benzamid	2,74		
E92	 4-Clo-N-(2,4-dimetylphenyl)-3-metylbenzamid	2,74		
E93	 3,5-Diclo-4-metoxi-N-(4-metoxi-phenyl)benzamid	3,24		

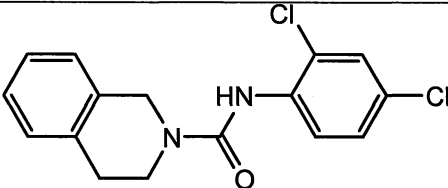
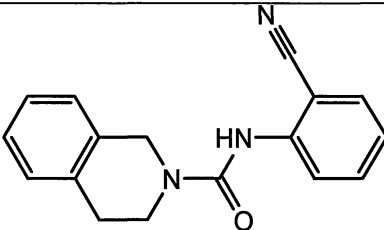
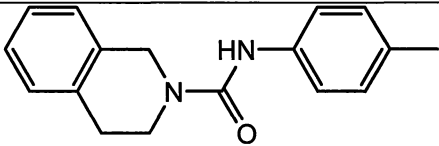
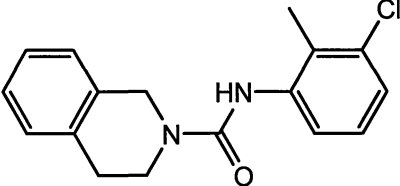
Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt

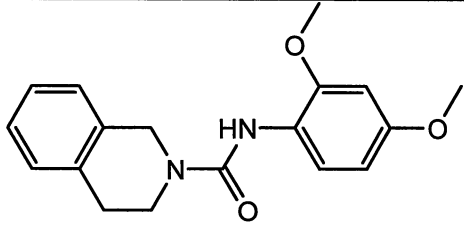
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E94	 3-Clo-N-(2,4-dimetoxyphenyl)-4-florenzamit	3,56		
E95	 5-Xyano-2,4-dimetyl-6-metylsulfanyl-N-phenyl-nicotinamid	3,58		
E96	 N-(4-tert-Butyl-thiazol-2-yl)-isonicotinamid	3,73		
E97	 3,6-Diclo-N-(2,4-dimetyl-phenyl)-2-metoxy-benzamid	4,25		

Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E98	 N-(3-Etylphenyl)-2-methoxy-6-methylbenzamid	4,63		
E99	 N-(4-Bromo-2,6-dimethylphenyl)isoindolin-2-carboxamid	0,93		
E100	 N-(2-Metyl-4-nitrophenyl)isoindolin-2-carboxamid	1,3		
E101	 N-(2,4-Diflophenyl)isoindolin-2-carboxamid	1,37		
E102	 N-(2-Metyl-3-nitrophenyl)isoindolin-2-carboxamid	2,01		

Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E103	 N-(2,3,4-Trifluorophenyl)isoindolin-2-carboxamid	2,58		
E104	 N-p-Tolylisoindolin-2-carboxamid	3,05		
E105	 N-(4-Chlorophenyl)isoindolin-2-carboxamid	3,4		
E106	 N-(2-Chlorophenyl)isoindolin-2-carboxamid	3,85		
E107	 N-(2,4-Dichlorophenyl)isoindolin-2-carboxamid	4,15		
E108	 N-(4-Methoxyphenyl)isoindolin-2-carboxamid	4,99		

Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt

Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E109	 N-(2,4-Diclophenyl)-3,4-dihydroisoquinol in-2(1H)-carboxamit	2,34		
E110	 N-(2-Xyanophenyl)-3,4- dihydroisoquinolin-2(1H)-carboxamit	2,5		
E111	 N-p-Tolyl-3,4-dihydroisoquinolin- 2(1H)-carboxamit	4,27		
E112	 N-(3-Clo-2-metylphenyl)-3,4- dihydroisoquinolin-2(1H)-carboxamit	4,33		

Bảng 5 – Hợp chất amit làm tăng vị ngọt				
Hợp chất số	Hợp chất	EC ₅₀ đối với vị ngọt (uM)	EC ₅₀ đối với vị umami (uM)	Tỷ lệ EC ₅₀ đối với vị umami
E113	 N-(2,4-Dimethoxyphenyl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-carboxamid	4,44		

Ngoài ra, như được chứng minh bởi các số liệu trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, biết được rằng các dòng tế bào đồng biểu hiện T1R1/T1R3 hoặc T1R2/T1R3 lần lượt đáp ứng với các chất kích thích có vị ngọt hoặc vị umami và liều lượng định lượng-kiểu đáp ứng hỗ trợ thêm cho kết luận rằng sự gắn kết đặc hiệu với thụ thể T1R1/T1R3 và T1R2/T1R3 có thể được sử dụng để xác định chất chủ vận và chất đối kháng thụ thể, ví dụ các chất thay thế MSG, chất ức chế vị umami, chất tạo vị ngọt nhân tạo mới và tự nhiên, và chất ức chế vị ngọt.

Hơn nữa, như được chứng minh bởi các số liệu trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, biết được rằng chất ức chế vị ngọt lactisol ức chế cả thụ thể vị ngọt T1R2/T1R3 và thụ thể vị umami T1R1/T1R3. Các hợp chất được đề xuất ở đây có tác dụng làm tăng, giống hệt, điều biến hoặc ức chế vị ngọt hoặc vị umami. Sự thật là, việc lactisol ức chế cả hai thụ thể T1R1/T1R3 và T1R2/T1R3 đưa ra giả thuyết là các thụ thể này có thể có chung các cấu trúc dưới phân tử mà được gắn kết với lactisol và các chất điều chỉnh vị giác tiềm tàng khác. Do đó, điều này cho thấy rằng một số hợp chất có tác dụng làm tăng, làm giống, điều biến hoặc ức chế vị ngọt có thể có tác dụng tương tự lên vị umami hoặc ngược lại.

Ngoài ra, như được chứng minh bởi các số liệu trong phần Ví dụ thực hiện

sáng chế, đã chứng minh được rằng các dòng tế bào đồng biểu hiện ổn định T1R, nghĩa là T1R1/T1R3 hoặc T1R2/T1R3, khi được thử nghiệm bằng cách chụp ảnh huỳnh quang tự động thì có đáp ứng rất hiệu quả đối với các chất kích thích có vị ngọt và vị umami khác nhau, nghĩa là với cường độ tương đối lớn hơn các tế bào được chuyển nhiễm tạm thời. Do đó, các dòng tế bào này là đặc biệt thích hợp để sử dụng trong các thử nghiệm sàng lọc năng suất cao để nhận biết hợp chất làm điều biến, ức chế, giống hệt hoặc làm tăng vị ngọt hoặc vị umami. Tuy nhiên, sáng chế còn bao gồm các thử nghiệm sử dụng tế bào biểu hiện tạm thời T1R hoặc tổ hợp của nó.

Hơn nữa, mặc dù đơn này bao gồm các số liệu chứng minh rằng một số T1R có tác dụng phối hợp, cụ thể là T1R1/T1R3 và T1R2/T1R3, và rằng các tổ hợp thụ thể này có thể được sử dụng trong thử nghiệm, tốt hơn là trong thử nghiệm năng suất cao, nên lưu ý rằng sáng chế còn bao gồm các thử nghiệm sử dụng T1R1, T1R2 và T1R3 một mình hoặc phối hợp với các protein khác, ví dụ các GPCR khác.

Tồn tại các khác biệt giữa vị ngọt mà người và loài gặm nhấm cảm nhận được về tính đặc hiệu phối tử, hiệu lực kết dính protein G, cũng như độ nhạy cảm với các chất ức chế. Các khác biệt về tính đặc hiệu phối tử của T1R có thể được sử dụng để chứng minh rằng thụ thể vị ngọt thực ra là có chức năng như một phức chất heterome, và rằng không có nhiều hơn 1 vị trí gắn kết phối tử trên thụ thể. Hơn nữa, liên kết chức năng giữa các thụ thể vị ngọt và vị umami được làm trung gian bởi T1R3 đã được thể hiện (Ví dụ 16).

Các thụ thể vị ngọt ở cả người lẫn chuột có thể kết dính hiệu quả với $G_{\alpha 15}$ khả năng có trình tự cuối đầu tận cùng C từ $G_{\alpha 11}$ ($G_{\alpha 15/11}$). Ví dụ, T1R2/T1R3 ở người chứ không phải ở chuột có đáp ứng chọn lọc với nhóm các chất tạo vị ngọt, bao gồm aspartam, neotam, và xyclamat. Điều này phù hợp với các số liệu vị giác sinh-lý. Các khác biệt về tính đặc hiệu chủ vận này có thể được sử dụng để xác định vị trí gắn kết của chúng trên thụ thể. T1R khả năng có thể được tạo ra giữa gen người và chuột, với mối nối ngay

trước vùng ngoại bào. Do đó, mỗi thể khảm T1R bao gồm hai mối nối, vùng ngoại bào đầu tận cùng N, và vùng xuyên màng và nội bào đầu tận cùng C, từ các loài khác nhau. Ví dụ, T1R2 thể khảm, gọi là T1R2-R, có trình tự được tạo ra từ đầu tận cùng N của T1R2 của người dung hợp với trình tự đầu tận cùng C của T1R2 của chuột. Sau đó, các đáp ứng với các thể khảm này có thể được thử nghiệm (Fig.22).

Các hợp chất mới và chất tạo mùi vị và chất tạo vị và chất làm tăng vị ngọt được phát hiện trong nhóm các dẫn xuất amit hoá học. Các hợp chất amit còn bao gồm một số nhóm phụ các dẫn xuất amit hoặc nhóm các dẫn xuất liên quan đến amit, ví dụ như ure, uretan, oxalamit, acrylamit, và các chất tương tự. Các hợp chất này, khi được sử dụng cùng với sucroza hoặc một mình, thì sẽ làm tăng đáp ứng in vitro và đồng thời làm mạnh thêm sự cảm nhận vị ngọt ở người. Các hợp chất này làm mạnh thêm các chất tạo vị ngọt tự nhiên và tổng hợp khác. Ví dụ về các hợp chất này được liệt kê trong Bảng 5.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất các hợp chất, chất tạo mùi vị, chất tạo vị, chất làm tăng mùi vị, chất làm tăng vị, hợp chất mới làm thay đổi mùi vị, và/hoặc chế phẩm chứa chúng.

Theo phương án cụ thể hơn, sáng chế đề xuất chất có mùi vị ngọt, chất tạo vị ngọt, chất làm tăng vị ngọt, và chất điều chỉnh vị ngọt mới và chế phẩm chứa chúng.

Cụ thể hơn, theo phương án khác, sáng chế đề cập đến hợp chất có tác dụng điều biến, cảm ứng, làm tăng hoặc ức chế chất có vị ngọt tự nhiên hoặc tổng hợp, ví dụ chất tạo vị ngọt có trong tự nhiên hoặc tổng hợp.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm, tốt hơn là chế phẩm thích hợp để sử dụng cho người hoặc động vật, chứa ít nhất một hợp chất theo sáng chế. Chế phẩm này bao gồm thức ăn, đồ uống và thuốc chữa bệnh, và chất phụ gia dùng cho thức ăn mà khi được thêm vào thức ăn, đồ uống hoặc thuốc chữa bệnh thì sẽ làm điều biến mùi vị hoặc vị của nó, cụ thể là bằng cách làm tăng vị ngọt của nó.

Phương án khác theo sáng chế đề cập đến việc sử dụng hợp chất theo sáng chế để điều chỉnh vị ngọt của thức ăn, đồ uống hoặc thuốc cần thiết, mà chế phẩm này có thể chứa một hoặc nhiều hợp chất khác có tác dụng tạo ra vị ngọt. Các hợp chất này, khi chúng được sử dụng cùng với các chất tạo vị ngọt có trong tự nhiên và tổng hợp, thì không chỉ làm tăng đáp ứng in vitro mà còn làm mạnh thêm sự cảm nhận vị ngọt và các mùi vị hoặc vị khác ở người. Các hợp chất cụ thể này, khi chúng được sử dụng cùng với chất tạo vị ngọt, như chất tạo vị ngọt có trong tự nhiên và tổng hợp, thì không chỉ làm tăng đáp ứng của T1R2/T1R3 in vitro mà còn làm mạnh thêm sự cảm nhận vị ngọt và các mùi vị hoặc vị khác ở người.

Các hợp chất mới và chất tạo mùi vị, chất tạo vị và chất làm tăng vị umami và chất tạo vị mới như amit, ure, amino-amit, amido-amit, và β -lactam cũng được bộc lộ ở đây. Các hợp chất này, khi được sử dụng cùng với MSG hoặc một mình, sẽ làm tăng đáp ứng in vitro và sự cảm nhận vị umami ở người. Các hợp chất này cũng làm mạnh thêm chất tạo vị umami tự nhiên và tổng hợp khác. Ví dụ về các hợp chất này được liệt kê trong các Bảng 1-4.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất các hợp chất mới, chất tạo mùi vị, chất tạo vị, chất làm tăng mùi vị, chất làm tăng vị, hợp chất làm thay đổi mùi vị mới, và/hoặc chế phẩm chứa chúng.

Theo phương án cụ thể hơn, sáng chế đề xuất chất có mùi vị umami, chất tạo vị umami, chất làm tăng vị umami, và chất điều chỉnh vị umami mới và chế phẩm chứa chúng.

Cụ thể hơn, theo phương án khác, sáng chế đề cập đến hợp chất làm điều biến (làm cảm ứng, làm tăng hoặc ức chế) chất tạo vị umami tự nhiên hoặc tổng hợp, ví dụ mononatri glutamat (MSG).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm, tốt hơn là chế phẩm thích hợp để sử dụng cho người hoặc động vật, chứa ít nhất một hợp chất theo sáng chế.

Chế phẩm này bao gồm thức ăn, đồ uống và thuốc chữa bệnh, và chất phụ gia dùng cho thức ăn mà khi được thêm vào thức ăn, đồ uống hoặc thuốc chữa bệnh thì sẽ làm điều biến mùi vị hoặc vị của nó, cụ thể là làm tăng vị umami của nó.

Phương án khác theo sáng chế đề cập đến việc sử dụng hợp chất theo sáng chế để điều chỉnh vị umami của thức ăn, đồ uống hoặc thuốc cần thiết, trong đó chế phẩm này có thể chứa một hoặc nhiều hợp chất khác có tác dụng tạo ra vị umami, ví dụ MSG. Các hợp chất này, khi chúng được sử dụng cùng với MSG, không những chỉ làm tăng đáp ứng in vitro mà còn làm mạnh thêm sự cảm nhận vị umami và các mùi vị hoặc vị khác ở người. Các hợp chất cụ thể này, khi chúng được sử dụng cùng với chất tạo vị umami, như MSG, không những chỉ làm tăng đáp ứng của T1R1/T1R3 in vitro mà còn làm mạnh thêm sự cảm nhận vị umami và các mùi vị hoặc vị khác ở người. Một số hợp chất, khi chúng được sử dụng một mình thì sẽ làm cho người sử dụng cảm nhận được vị umami.

Các hợp chất được xác định bằng sự gắn kết đặc hiệu với các thụ thể đặc hiệu bằng cách sử dụng thử nghiệm T1R có thể được sử dụng để điều chỉnh vị của thức ăn và đồ uống. Các thử nghiệm thích hợp được mô tả chi tiết hơn dưới đây, ví dụ, bao gồm thử nghiệm toàn bộ tế bào và thử nghiệm sinh-hoá, bao gồm thử nghiệm gắn kết trực tiếp có sử dụng một trong số các tổ hợp của các thụ thể T1R khác, các thể khảm hoặc đoạn của nó, đặc biệt là đoạn chứa vùng gắn kết phối tử đầu tận cùng N. Ví dụ về các thử nghiệm thích hợp được mô tả chi tiết hơn dưới đây và đã được biết trong lĩnh vực GPCR.

Các thử nghiệm có thể được thiết kế sao cho định lượng được mức gắn kết của các hợp chất khác nhau hoặc hỗn hợp của các hợp chất với các thụ thể vị giác T1R hoặc các tổ hợp thụ thể vị giác T1R hoặc thụ thể T1R được biểu hiện phối hợp với các protein khác loài (non-T1R) khác, ví dụ các GPCR khác, hoặc sao cho định lượng được hoạt tính của tế bào biểu hiện thụ thể vị giác T1R. Điều này có thể được thực

hiện bằng cách biểu hiện ổn định hoặc tạm thời thụ thể vị giác trong các tế bào khác loài như tế bào HEK-293, CHO và COS. Do đó, đặc tính lý-hoá này của các hợp chất được sử dụng để xác định nhóm hợp chất có chung đặc tính này.

Tốt hơn, nếu các thử nghiệm này sử dụng tế bào mà cũng biểu hiện (tốt hơn là ổn định) protein G như $G_{\alpha 15}$ hoặc $G_{\alpha 16}$ hoặc các protein G pha tạp hoặc thể biến dị protein G khác, hoặc protein G nội sinh. Ngoài ra, các protein G_{β} và G_{γ} cũng có thể được biểu hiện trong đó.

Tác động của hợp chất lên vị ngọt hoặc vị umami có sử dụng tế bào hoặc tổ hợp biểu hiện hoặc chứa các thụ thể nêu trên hoặc các tổ hợp thụ thể nêu trên có thể được xác định bằng các cách khác nhau bao gồm việc sử dụng thuốc nhuộm nhạy canxi, thuốc nhuộm nhạy điện thế, thử nghiệm cAMP, thử nghiệm gắn kết trực tiếp có sử dụng phối tử được đánh dấu huỳnh quang hoặc phối tử phóng xạ như ^3H -glutamat, hoặc thử nghiệm phiên mã (có sử dụng chất thông báo thích hợp như luxiferaza hoặc beta-lactamaza).

Thử nghiệm mà có thể được sử dụng cùng với một hoặc nhiều T1R theo sáng chế, ví dụ, bao gồm thử nghiệm sử dụng quá trình chọn lọc di truyền đối với tế bào sống; thử nghiệm sử dụng toàn bộ tế bào hoặc đoạn màng hoặc protein T1R được tinh chế; thử nghiệm sử dụng chất truyền tin thứ cấp như cAMP và IP3, thử nghiệm phát hiện sự chuyển đoạn của arestin tới bề mặt tế bào, thử nghiệm phát hiện sự mất biểu hiện thụ thể trên bề mặt tế bào (internalization) bằng phối tử đã được thử nghiệm, thử nghiệm gắn kết phối tử trực tiếp, thử nghiệm gắn kết cạnh tranh với chất ức chế, thử nghiệm sử dụng protein đã được dịch mã in vitro, thử nghiệm phát hiện các thay đổi cấu dạng khi gắn kết với phối tử (ví dụ, như được chứng minh bằng phương pháp thủy phân protein, phát huỳnh quang, hoặc NMR), thử nghiệm hành vi có sử dụng động vật không phải là người chuyển gen biểu hiện T1R hoặc tổ hợp các T1R, như ruồi, giun, hoặc chuột nhắt, thử nghiệm sử dụng tế bào nhiễm virus tái tổ hợp chứa gen mã

hoá T1R.

Cũng thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế là các phép phân tích trên cơ sở cấu trúc, trong đó cấu trúc tinh thể tia X của T1R hoặc đoạn T1R (hoặc tổ hợp của các T1R, hoặc tổ hợp của T1R với một protein khác) được xác định và sử dụng để dự đoán hợp chất sẽ gắn kết và hoặc làm tăng, bất chước, ức chế hoặc điều biến thụ thể T1R cụ thể hoặc tổ hợp thụ thể bằng các kỹ thuật nghiên cứu bằng mô hình phân tử. Cụ thể hơn, sáng chế bao gồm việc xác định cấu trúc tinh thể của T1R1/T1R3 (tốt hơn là, hT1R1/hT1R3) và/hoặc T1R2/T1R3 (tốt hơn là, hT1R2/hT1R3) và việc sử dụng cấu trúc tinh thể này trong các phương pháp thiết kế dựa trên cơ sở cấu trúc để nhận biết phân tử có tác dụng điều biến hoạt tính thụ thể T1R.

Đặc biệt, sáng chế bao gồm các thử nghiệm sinh-hoá được thực hiện bằng cách sử dụng tế bào, ví dụ tế bào động vật có vú, nấm men, côn trùng hoặc các tế bào khác loài khác mà biểu hiện một hoặc nhiều thụ thể T1R có chiều dài đầy đủ hoặc đoạn T1R, tốt hơn là vùng đầu tận cùng N của T1R1, T1R2 và/hoặc T1R3. Tác động của hợp chất trong các thử nghiệm này có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm gắn kết cạnh tranh, ví dụ bằng cách sử dụng thử nghiệm glutamat hoặc IMP phóng xạ, phát huỳnh quang (ví dụ, phát huỳnh quang phân cực, FRET), hoặc gắn kết $\text{GTP}_\gamma^{35}\text{S}$. Như đã lưu ý, theo phương án được ưu tiên, các thử nghiệm sẽ sử dụng dòng tế bào đồng biểu hiện ổn định T1R1/T1R3 hoặc T1R2/T1R3 và protein G thích hợp, như $\text{G}_{\alpha 15}$. Các protein G thích hợp khác bao gồm protein G khả năng và biến dị được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 09/984292 và 60/243770.

Hơn nữa, các thụ thể bị biến đổi có thể được xây dựng và biểu hiện có các tính chất cải thiện, ví dụ mức biểu hiện bề mặt gia tăng hoặc mức kết dính protein G gia tăng. Các biến thể T1R này có thể được đưa vào trong các thử nghiệm trên cơ sở tế bào và thử nghiệm sinh-hoá.

Hình dung rằng các phát hiện liên quan tới T1R người sẽ mở rộng tới các loài

khác, ví dụ loài gặm nhấm, lợn, khỉ, chó và mèo, và có lẽ thậm chí cả các động vật không có vú như cá. Về điều này, một số đoạn T1R của cá được nhận biết dưới đây trong Ví dụ 1. Do đó, sáng chế có ứng dụng trong việc sàng lọc hợp chất để sử dụng trong chế phẩm thức ăn cho động vật.

Sáng chế còn bao gồm việc sử dụng các biến thể alen khác nhau của các T1R khác nhau và các tổ hợp của chúng, bằng cách đó có thể nhận biết được các hợp chất tạo ra sự cảm nhận vị giác cụ thể ở các cá thể biểu hiện các biến thể alen này hoặc các hợp chất tạo ra sự cảm nhận vị giác cụ thể ở tất cả các cá thể. Các hợp chất này có thể được sử dụng để làm cho thức ăn nói chung là dễ chấp nhận hơn.

Các axit nucleic mã hoá T1R cũng tạo ra các đoạn dò có giá trị để nhận biết tế bào vị giác, như axit nucleic được biểu hiện đặc hiệu trong tế bào vị giác. Ví dụ, đoạn dò đối với các polypeptit và protein của T1R có thể được sử dụng để nhận biết tế bào vị giác có mặt trong nhú dạng lá, nhú dạng đài, nhú dạng nấm, cũng như tế bào vị giác có mặt trong nụ vị giác Geschmackstreifen, khoang miệng, biểu mô dạ dày-ruột và nắp thanh quản. Cụ thể, các phương pháp phát hiện T1R có thể được sử dụng để nhận biết tế bào vị giác nhạy cảm với các chất kích thích có vị ngọt và/hoặc vị umami hoặc các chất kích thích có vị khác thể hiện các phương thức vị giác khác. Ví dụ, tế bào biểu hiện ổn định hoặc tạm thời T1R2 và/hoặc T1R3 được dự đoán từ sáng chế này là có đáp ứng với các chất kích thích có vị ngọt. Tương tự, tế bào biểu hiện T1R1 và/hoặc T1R3 được dự đoán là có đáp ứng với các chất kích thích có vị umami. Các axit nucleic mã hoá protein và polypeptit của T1R theo sáng chế có thể được phân lập từ các nguồn khác nhau, được thao tác di truyền, được khuếch đại, được tổng hợp và/hoặc được biểu hiện tái tổ hợp theo các phương pháp được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO 00/035374. Danh sách các T1R mà có thể được biểu hiện theo sáng chế được đưa ra trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Tuy nhiên, cần nhấn mạnh rằng sáng chế bao gồm việc biểu hiện và sử dụng các T1R hoặc đoạn, biến thể, hoặc

thể khảm cụ thể khác được xây dựng dựa trên trình tự T1R này và cụ thể là T1R của các loài khác.

Như đã được bộc lộ, khía cạnh quan trọng của sáng chế là các phương pháp sàng lọc đối với các chất điều biến, ví dụ chất hoạt hoá, chất ức chế, chất kích thích, chất làm tăng, chất chủ vận và chất đối kháng, của các GPCR đặc hiệu đối với tế bào vị giác này. Các chất điều biến sự tải nạp tín hiệu vị giác này có thể được sử dụng để điều biến con đường truyền tín hiệu vị giác. Các phương pháp sàng lọc này có thể được sử dụng để nhận biết các chất chủ vận và đối kháng có ái lực cao đối với sự hoạt động của tế bào vị giác. Sau đó, các hợp chất làm điều biến này có thể được sử dụng trong công nghệ thực phẩm để sản xuất thức ăn phù hợp với vị giác, ví dụ để điều chỉnh vị ngọt và/hoặc vị umami của thức ăn.

Sáng chế này chỉnh sửa sự thiếu hiểu biết trước đây liên quan đến vị ngọt và vị umami vì nó nhận biết được các thụ thể T1R đặc hiệu và tổ hợp thụ thể T1R đặc hiệu làm trung gian cho sự cảm nhận vị ngọt và vị umami. Do đó, nói chung, đơn này đề cập đến các phát hiện của các tác giả sáng chế liên quan đến nhóm các thụ thể gắn kết với protein G đặc hiệu vị giác T1R và chức năng đặc hiệu của chúng trong sự cảm nhận vị giác và mối liên hệ của các phát hiện này với sự hiểu biết tốt hơn về cơ sở phân tử của vị giác.

Cơ sở phân tử của vị ngọt và vị umami – vị của mononatri glutamat – là khó hiểu. Gần đây, một nhóm các thụ thể gắn kết với protein G đặc hiệu vị giác có ba thành phần, gọi là T1R, đã được nhận biết. Các mô hình biểu hiện T1R chồng chéo và việc phát hiện ra rằng thụ thể GABA_B có liên quan về mặt cấu trúc là heterodime đưa ra giả thuyết là T1R có chức năng như là thụ thể vị giác heterodime. Trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây, các tác giả sáng chế mô tả việc đồng biểu hiện chức năng của T1R1, T1R2, và T1R3 của người trong các tế bào khác loài; các tế bào đồng biểu hiện T1R1 và T1R3 được hoạt hoá bằng các chất kích thích có vị umami; các tế

bào đồng biểu hiện T1R2 và T1R3 được hoạt hoá bằng các chất kích thích có vị ngọt. Hoạt tính T1R1/T1R3 và T1R2/T1R3 tương quan với ngưỡng phát hiện sinh-lý. Ngoài ra, 5'-ribonucleotit IMP được phát hiện là có tác dụng làm tăng đáp ứng của T1R1/T1R3 đối với glutamat, một đặc tính hiệp đồng tác dụng của vị umami. Các phát hiện này chứng minh rằng các T1R đặc hiệu và các tổ hợp khác nhau cụ thể của T1R có chức năng như các thụ thể vị ngọt và vị umami.

Sự cảm nhận của người về vị đắng, vị ngọt và vị umami được cho là được làm trung gian bởi các thụ thể gắn kết với protein G (Lindemann, B., *Physiol. Res.* 76: 718-66 (1996)). Gần đây, việc đánh giá hệ gen của người đã phát hiện ra nhóm thụ thể vị đắng T2R (Adler et al., *Cell* 100: 613-702 (2000); Chandrashekar et al., *Cell* 100: 703-11 (2000); Matsunami et al., *Nature* 404: 601-604 (2000)) nhưng các thụ thể đối với vị ngọt và vị umami vẫn chưa được nhận biết. Gần đây, một nhóm thụ thể vị giác khác, các thụ thể T1R, đã được phát hiện. Đầu tiên, T1R được nhận dạng bằng cách lập trình tự trên quy mô lớn thư viện DNA bổ trợ rút gọn thu được từ mô vị giác chuột, mà nhận biết được T1R1, và sau đó bằng kỹ thuật PCR suy biến trên cơ sở T1R1, dẫn đến nhận biết được T1R2 (Hoon et al., *Cell* 96: 541-551 (1999)). Gần đây, các tác giả sáng chế và các đồng nghiệp đã nhận dạng được một thành viên thứ ba và có thể là cuối cùng của họ T1R, đó là T1R3, trong ngân hàng số liệu hệ gen của người (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)). Đáng chú ý là, T1R3 ở chuột nhất được dùng để lập bản đồ cho khoảng cách hệ gel chứa *Sac*, một locus ảnh hưởng đến vị ngọt ở chuột (Fuller et al., *J. Hered.* 65: 33-6 (1974); Li et al., *Mamm. Genome* 12: 13-16 (2001)). Do đó, T1R3 được dự đoán là có chức năng như thụ thể vị ngọt. Các nghiên cứu lập bản đồ gen có độ phân giải cao gần đây đã củng cố mối liên hệ giữa T1R3 của chuột và *Sac* (Fuller T. C., *J. Hered.* 65 (1): 33-36

(1974); Li et al., *Mammal. Genome* 12 (1): 13-16 (2001)).

Điều đáng quan tâm là, rất cả các thụ thể họ C mà được biểu hiện chức năng thì far - thụ thể glutamat hỗ biến trao đổi chất, thụ thể GABA_B, thụ thể cảm nhận canxi (Conigrave, A. D., Quinn, S. J. & Brown, E. M., *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 4814-9. (2000)), và thụ thể khứu giác ở cá (Specia, D. J. et al., *Neuron* 23, 487-98. (1999)) – được cho là được hoạt hoá bởi axit amin. Điểm đặc trưng chung này đề xuất khả năng là T1R nhận ra các axit amin, và T1R có thể có liên quan đến sự phát hiện glutamat ngoài các axit amin có vị ngọt. Theo cách khác, biến thể phiên mã của thụ thể glutamat hỗ biến trao đổi chất mGluR4 đã được đề xuất là thụ thể vị umami do sự biểu hiện chọn lọc của nó trong mô vị giác ở chuột, và sự giống nhau của ngưỡng hoạt hoá thụ thể với ngưỡng phát hiện tâm-vật lý glutamat (Chaudhari et al., *Nat. Neurosci.* 3: 113-119 (2000)). Giả thuyết này lại khó tương thích với mức biểu hiện quá thấp của biến thể mGluR4 trong mô vị giác, và vị của glutamat ít hoặc nhiều không bị thay đổi ở chuột bị bất hoạt gen mã hoá mGluR4 (Chaudhari và Roper, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 855: 398-406 (1998)). Hơn nữa, các biến thể vị giác không có vẻ hợp lý về mặt cấu trúc, thiếu không chỉ phần lớn các gốc mà tạo thành ổ gắn kết với glutamat của thụ thể kiểu hoang, mà còn khoảng một nửa vùng gắn kết glutamat đầu tận cùng N dạng cầu (Kunishima et al., *Nature* 407: 971-7 (2000)).

Các phân tích cạnh tranh của các mẫu biểu hiện T1R ở loài gặm nhấm đã chứng minh rằng T1R2 và có thể cả T1R1, mỗi thụ thể, được đồng biểu hiện cùng với 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)). Hơn nữa, sự dime hoá đang nổi lên như là một chủ đề chung của các thụ thể họ C: thụ thể glutamat hỗ biến trao đổi chất và cảm nhận canxi là các homodime (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)), và thụ thể GABA_B có liên quan về mặt cấu trúc là heterodimer (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)). Bằng việc đồng biểu hiện chức năng của T1R trong các tế bào khác loài, các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng T1R2 của người thực hiện chức năng phối hợp với T1R3 của người dưới dạng thụ thể vị ngọt và T1R1 người thực hiện chức năng phối hợp với T1R3 của người dưới dạng thụ thể vị umami.

Các phát hiện được bàn luận ở đây đặc biệt có ý nghĩa, vì trước đây sự phát triển của các chất tạo vị ngọt nhân tạo cải thiện đã bị ngăn trở bởi sự thiếu hụt các thử nghiệm về vị ngọt. Thực ra, năm chất tạo vị ngọt nhân tạo thường được sử dụng trong thương mại, tất cả chúng đều hoạt hoá hT1R2/hT1R3, đã được phát hiện một cách tình cờ. Tương tự, khác với thử nghiệm cảm giác, một quy trình khó thực hiện, không có thử nghiệm nào để nhận biết hợp chất làm điều chỉnh vị umami. Hiện nay, các vấn đề này đã được làm giảm nhẹ vì, như được chứng minh bởi các kết quả thử nghiệm được bàn luận dưới đây, các thụ thể vị ngọt và vị umami ở người đã được nhận biết, và các thử nghiệm đối với các thụ thể này đã được phát triển, cụ thể là các thử nghiệm sử dụng tế bào biểu hiện ổn định thụ thể vị giác T1R chức năng, nghĩa là thụ thể vị ngọt hoặc umami.

Do đó, sáng chế đề xuất thử nghiệm để phát hiện và xác định đặc điểm của các hợp chất điều chỉnh vị, trong đó các thành viên họ T1R có tác dụng, như chúng thực hiện ở nụ vị giác, như là các phân tử thụ thể đối với tác động lên vị ngọt và vị umami của các hợp chất điều chỉnh vị ngọt và vị umami. Cụ thể, trong phạm vi bảo hộ, sáng chế đề xuất thử nghiệm để nhận biết hợp chất làm thay đổi, bất chước, làm tăng và/hoặc ức chế riêng rẽ vị ngọt và vị umami. Các phương pháp thử nghiệm hoạt tính của GPCR, và đặc biệt là hợp chất ảnh hưởng đến hoạt tính GPCR là đã biết và có thể

sử dụng cho các thành viên của họ T1R theo sáng chế và các tổ hợp chức năng của nó. Các thử nghiệm thích hợp được thể hiện dưới đây.

Sáng chế còn đề xuất hợp chất gắn kết với T1R1, T1R2, T1R3, T1R2/T1R3 hoặc T1R1/T1R3, hoặc đoạn, phần, hoặc cấu trúc dưới phân tử bất kỳ của chúng, như được bộc lộ trong suốt bản mô tả này .

Cụ thể, GPCR có thể được sử dụng trong thử nghiệm, ví dụ, để đo các thay đổi về mức gắn kết phối tử, nồng độ ion, điện thế màng, dòng điện, dòng ion, mức phiên mã, mức tương tác thụ thể-phối tử, nồng độ chất truyền tin thứ cấp, in vitro và in vivo. Theo phương án khác, các thành viên họ T1R có thể được biểu hiện tái tổ hợp trong tế bào, và việc điều biến sự tải nạp tín hiệu vị giác nhờ hoạt tính GPCR có thể được thử nghiệm bằng cách đo các thay đổi về mức Ca^{2+} và các chất truyền tin nội bào khác như cAMP, GMP mạch vòng (cGMP), hoặc IP_3 .

Trong một số thử nghiệm, vùng polypeptit T1R, ví dụ vùng ngoại bào, vùng xuyên màng hoặc vùng nội bào, được dung hợp với một polypeptit khác loài, bằng cách đó tạo thành polypeptit khảm, ví dụ protein thể khảm có hoạt tính GPCR. Dự định cụ thể là việc sử dụng các đoạn của T1R1, T1R2 hoặc T1R3 chứa vùng gắn kết phối tử đầu tận cùng N. Các protein này có thể được sử dụng, ví dụ trong thử nghiệm, để nhận biết phối tử, chất chủ vận, chất đối kháng, hoặc các chất điều biến khác của thụ thể T1R. Ví dụ, polypeptit T1R có thể được biểu hiện trong tế bào có nhân điển hình dưới dạng thụ thể thể khảm với một trình tự chaperon khác loài mà tạo điều kiện thuận lợi cho sự vận chuyển màng huyết tương, hoặc giảm phân và tạo đích qua con đường tiết. Trình tự khác loài tùy ý có thể là peptit tương tác với vùng PDZ, đoạn PDZIP đầu tận cùng C (SEQ ID NO 1). PDZIP là một tín hiệu xuất khẩu ER (Endoplasmic Reticulum – thể lưới nội chất), mà theo sáng chế, đã thể hiện là tạo điều kiện thuận lợi cho sự biểu hiện bề mặt của các protein khác loài như thụ thể T1R được mô tả ở đây. Cụ thể hơn, theo một khía cạnh của sáng chế, PDZIP có thể được

sử dụng để thúc đẩy quá trình tạo đích chính xác của protein màng chưa rõ, thụ thể khứu giác, thụ thể vị giác T2R, và thụ thể vị giác T1R được mô tả ở đây.

Ví dụ về các thụ thể thể khảm này bao gồm thụ thể chuyển loài. Tổ hợp bất kỳ của các cấu trúc dưới phân tử thụ thể từ các loài khác nhau có thể cùng được sử dụng để tạo thành thụ thể thể khảm, mà sau đó có thể được sử dụng để nhận biết, ví dụ chất tạo vị chẳng hạn. Do đó, được đề cập đến ở đây là thụ thể T1R2/T1R3 thể khảm bao gồm cấu trúc dưới phân tử T1R2 của người và cấu trúc dưới phân tử T1R3 chuột. Cũng được đề cập đến là thụ thể T1R2/T1R3 thể khảm bao gồm cấu trúc dưới phân tử T1R2 của chuột và cấu trúc dưới phân tử T1R3 của người. Cũng được đề cập đến là cấu trúc dưới phân tử thụ thể T1R2 thể khảm bao gồm vùng ngoại bào ở người, vùng xuyên màng ở chuột và vùng nội bào chuột (ví dụ, SEQ ID NOS: 16 và 17). Cũng được đề cập đến là cấu trúc dưới phân tử thụ thể T1R3 thể khảm bao gồm vùng ngoại bào ở chuột, vùng xuyên màng ở người và vùng nội bào ở người (ví dụ, SEQ ID NOS: 18 và 19).

Các thụ thể T1R khảm này có thể được biểu hiện trong tế bào có nhân điển hình bất kỳ, như tế bào HEK-293. Tốt hơn là, tế bào chứa protein G, tốt hơn là protein G pha tạp như $G_{\alpha 15}$ hoặc $G_{\alpha 16}$ hoặc dạng khác của protein G pha tạp có thể liên kết một nhóm lớn các GPCR với con đường tín hiệu nội bào hoặc với protein truyền tín hiệu như phospholipaza C. Việc hoạt hoá các thụ thể thể khảm này trong tế bào có thể được phát hiện bằng cách sử dụng phương pháp chuẩn bất kỳ, như bằng cách phát hiện các thay đổi về mức canxi nội bào bằng cách phát hiện sự phát huỳnh quang phụ thuộc FURA-2 trong tế bào. Nếu các tế bào vật chủ được ưu tiên không biểu hiện protein G thích hợp, chúng có thể được chuyển nhiễm bằng gen mã hoá protein G hỗn tạp như gen được mô tả trong đơn yêu cầu patent Mỹ số 60/243,770, đơn yêu cầu patent Mỹ số 09/984,297, nộp ngày 29/10/2001, và đơn yêu cầu patent Mỹ số 09/989,497, nộp ngày 21/11/2001.

Các phương pháp khác để thử nghiệm đối với các chất điều biến sự tải nạp tín hiệu vị giác bao gồm thử nghiệm gắn kết phối tử in vitro bằng cách sử dụng polypeptit T1R, các phần của nó, nghĩa là, vùng ngoại bào, vùng xuyên màng, hoặc tổ hợp của chúng, hoặc protein thể khảm bao gồm một hoặc nhiều vùng chứa thành viên của họ T1R; tế bào nuôi cấy noãn bào hoặc mô biểu hiện polypeptit T1R, đoạn, hoặc protein dung hợp; phosphoryl hoá và loại nhóm phosphoryl của các thành viên họ T1R; protein G gắn kết với GPCR; thử nghiệm gắn kết phối tử; điện áp, điện thế màng và các thay đổi về độ dẫn; thử nghiệm dòng ion; các thay đổi về lượng chất truyền tin thứ cấp nội bào như cGMP, cAMP và inositol triphosphat (IP3); và các thay đổi về mức canxi nội bào.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện axit nucleic của T1R và sự biểu hiện protein, cho phép nghiên cứu sự điều tiết quá trình tải nạp tín hiệu vị giác và nhận biết đặc hiệu các tế bào thụ thể vị giác. Các thành viên của họ T1R cũng tạo ra các đoạn dò axit nucleic đối với các nghiên cứu quan hệ cha con và pháp y. Gen mã hoá T1R cũng có thể được sử dụng làm đoạn dò axit nucleic để nhận biết tế bào thụ thể vị giác, như tế bào có mặt trong nhú dạng lá, nhú dạng nấm, nhú dạng đài, tế bào vị giác có mặt trong nụ vị giác geschmackstreifen, và nắp thanh quản. Các thụ thể T1R cũng có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể đơn dòng và đa dòng để nhận biết tế bào thụ thể vị giác.

Về mặt chức năng, các polypeptit T1R bao gồm một họ các thụ thể gắn kết với protein G xuyên màng 7 lần có liên quan, mà được cho là có liên quan đến sự tải nạp tín hiệu vị giác và có thể tương tác với protein G để làm trung gian cho sự tải nạp tín hiệu vị giác (ví dụ, xem tài liệu Fong, Cell Signal, 8: 217 (1996); Baldwin, Curer. Opin. Cell Biol., 6: 180 (1994)). Về mặt cấu trúc, các trình tự nucleotit của các thành viên họ T1R mã hoá các polypeptit có liên quan bao gồm vùng ngoại bào, bảy vùng xuyên màng, và vùng tế bào chất. Các gen mã hoá họ T1R có liên quan từ các loài

khác nhau có chung ít nhất khoảng 50%, và tùy ý 60%, 70%, 80%, hoặc 90%, trình tự nucleotit trên vùng có độ dài ít nhất khoảng 50 nucleotit, tùy ý có độ dài khoảng 100, 200, 500, nucleotit hoặc nhiều hơn, đồng nhất với trình tự axit nucleic của T1R được bộc lộ ở đây trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, hoặc các biến thể được biến đổi bảo tồn của nó, hoặc các polypeptit mã hoá có chung ít nhất khoảng từ 35 đến 50%, và tùy ý 60%, 70%, 80%, hoặc 90%, trình tự axit amin trên vùng axit amin có độ dài ít nhất khoảng 25 axit amin, tùy ý có độ dài từ 50 đến 100 axit amin, đồng nhất với trình tự polypeptit của T1R được bộc lộ dưới đây trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, hoặc các biến thể được biến đổi bảo tồn của nó.

Một số trình tự hoặc vùng axit amin liên ứng cũng được nhận biết là có đặc tính của các thành viên họ T1R. Ví dụ, các thành viên họ T1R thường chứa trình tự mà có độ đồng nhất ít nhất khoảng 50%, tùy ý 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95-99%, hoặc cao hơn, so với trình tự liên ứng 1 và 2 của họ T1R (tương ứng là SEQ ID NO. 2 và 3). Do đó, các vùng liên ứng này có thể được sử dụng để nhận biết các thành viên của họ T1R, bằng cách lai hoá hoặc khuếch đại đồng nhất, đặc hiệu, hoặc gắn kết đặc hiệu bởi các kháng thể được tạo ra để chống lại một vùng. Ví dụ, các trình tự liên ứng của họ T1R bao gồm các trình tự dưới đây:

Trình tự liên ứng 1 của họ T1R: (SEQ ID NO: 2)

(TR)C(FL)(RQP)R(RT)(SPV)(VERKT)FL(AE)(WL)(RHG)E

Trình tự liên ứng 2 của họ T1R: (SEQ ID NO: 3)

(LQ)P(EGT)(NRC)YN(RE)A(RK)(CGF)(VLI)T(FL)(AS)(ML)

Các trình tự liên ứng này bao gồm các trình tự được tìm thấy trong polypeptit T1R được mô tả ở đây, nhưng các thành viên họ T1R từ các sinh vật khác có thể được cho là bao gồm các trình tự liên ứng có độ đồng nhất khoảng 75% hoặc cao hơn so với tất cả các trình tự liên ứng được mô tả cụ thể ở đây.

Các vùng đặc hiệu của nucleotit T1R và trình tự axit amin có thể được sử dụng

để nhận biết các biến thể đa hình, thể tương đồng khác loài, và alen của các thành viên họ T1R. Việc nhận biết này có thể được thực hiện in vitro, ví dụ trong điều kiện lai hoá nghiêm ngặt hoặc PCR (ví dụ, bằng cách sử dụng đoạn môi mã hoá các trình tự liên ứng T1R xác định trên đây), hoặc bằng cách sử dụng thông tin trình tự trong hệ máy tính để so sánh với các trình tự nucleotit khác. Các alen khác biệt về gen mã hoá T1R trong một quần thể loài duy nhất cũng có thể được sử dụng để xác định liệu các khác biệt về trình tự alen có kiểm soát các khác biệt về sự cảm nhận vị giác giữa các thành viên trong quần thể. Các kỹ thuật khuếch đại dạng PCR và tách dòng cổ điển có thể được sử dụng để phân lập các T1R mới, ví dụ, trong đó các đoạn môi suy biến là đủ để phát hiện các gen có liên quan từ loài này đến loài kia.

Thông thường, việc nhận dạng biến thể đa hình và alen của các thành viên họ T1R có thể được thực hiện bằng cách so sánh trình tự axit amin của khoảng 25 axit amin hoặc nhiều hơn, ví dụ 50-100 axit amin. Độ đồng nhất của axit amin ít nhất nằm trong khoảng từ 35 đến 50%, và tùy ý 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95-99%, hoặc cao hơn thường chứng minh rằng protein là một biến thể đa hình, thể tương đồng khác loài, hoặc alen của thành viên họ T1R. Việc so sánh trình tự có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thuật toán so sánh trình tự bất kỳ được bàn luận dưới đây. Các kháng thể gắn kết đặc hiệu với polypeptit T1R hoặc vùng được bảo tồn của nó cũng có thể được sử dụng để nhận biết alen, thể tương đồng khác loài, và biến thể đa hình.

Biến thể đa hình, thể tương đồng khác loài, và alen của gen mã hoá T1R có thể được xác nhận bằng cách kiểm tra sự biểu hiện đặc hiệu tế bào vị giác của gen hoặc protein T1R giả định. Thông thường polypeptit T1R có trình tự axit amin được bộc lộ ở đây có thể được sử dụng làm đối chứng dương so sánh với polypeptit T1R giả định để chứng minh việc nhận dạng biến thể đa hình hoặc alen của thành viên họ T1R. Biến thể đa hình, alen, và thể tương đồng khác loài được cho là giữ lại được cấu trúc

xuyên màng bảy lần của thụ thể gắn kết với protein G. Chi tiết hơn, công bố Đơn quốc tế số WO 00/06592 bộc lộ các thành viên họ T1R liên quan, GPCR-B3. Ở đây, thụ thể GPCR-B3 dùng để chỉ rT1R1 và mT1R1. Mặt khác, công bố Đơn quốc tế số 00/06593 bộc lộ các thành viên họ T1R liên quan, GPCR-B4. Ở đây, thụ thể GPCR-B4 dùng để chỉ rT1R2 và mT1R2. Như đã được bàn luận trên đây, sáng chế còn bao gồm thử nghiệm dựa trên cơ sở cấu trúc trong đó sử dụng cấu trúc tinh thể tia X của T1R hoặc tổ hợp T1R, ví dụ hT1R2/hT1R3 hoặc hT1R1/hT1R3, để nhận biết phân tử điều biến hoạt tính thụ thể T1R, và bằng cách đó điều chỉnh vị ngọt và/hoặc vị umami.

Sáng chế còn đề xuất thử nghiệm, tốt hơn là thử nghiệm năng suất cao, để nhận biết phân tử làm tăng, bất chước, ức chế và/hoặc điều biến các thụ thể T1R. Trong một số thử nghiệm, một vùng cụ thể của một thành viên họ T1R được sử dụng phối hợp với một vùng cụ thể của một thành viên khác của họ T1R, ví dụ vùng ngoại bào, xuyên màng hoặc nội bào. Theo phương án khác, vùng ngoại bào, vùng xuyên màng hoặc tổ hợp của chúng có thể gắn kết với cơ chất rắn, và được sử dụng, ví dụ, để phân lập phối tử, chất chủ vận, chất đối kháng, hoặc phân tử khác bất kỳ mà có thể gắn kết và/hoặc điều biến hoạt tính của polypeptit T1R.

Các sự đột biến và thay thế bảo tồn khác nhau được cho là thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế. Ví dụ, thuộc lĩnh vực kỹ thuật này là việc thực hiện sự thay thế axit amin bằng cách sử dụng các kỹ thuật gen tái tổ hợp đã biết bao gồm PCR, tách dòng gen, phát sinh đột biến hướng vị trí của ADN bổ trợ, chuyển nhiễm của tế bào vật chủ, và phiên mã in-vitro. Sau đó, các biến thể có thể được kiểm tra hoạt tính.

Định nghĩa

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ dưới đây có ý nghĩa được gán cho chúng, nếu không có quy định khác.

Trong phần yêu cầu bảo hộ và phần mô tả của đơn sáng chế này, trừ khi ngữ

cảnh yêu cầu khác do việc thể hiện ngôn ngữ hoặc hàm ý cần thiết, thuật ngữ “bao gồm” hoặc các phương án của nó như “có bao gồm” hoặc “việc bao gồm” được hiểu theo nghĩa rộng, nghĩa là chỉ rõ sự có mặt của các dấu hiệu đã nêu nhưng không loại trừ sự có mặt hoặc bổ sung thêm các dấu hiệu khác theo các phương án khác nhau của sáng chế.

Thuật ngữ “tế bào vị giác” bao gồm tế bào nội mô thần kinh mà được thiết lập thành các nhóm để tạo thành nụ vị giác của lưỡi, ví dụ các tế bào trong nhú dạng lá, nhú dạng nấm, và nhú dạng đài (ví dụ, xem tài liệu Roper et al., *Ann. Rev. Neurosci.* 12: 329-353 (1989)). Tế bào vị giác còn được tìm thấy trong mô vòm miệng và các mô khác, như thực quản và dạ dày.

Thuật ngữ “T1R” dùng để chỉ một hoặc nhiều thành viên của họ thụ thể gắn kết với protein G được biểu hiện trong tế bào vị giác như tế bào trong nhú dạng lá, nhú dạng nấm và nhú dạng đài, cũng như tế bào của vòm miệng, và thực quản (ví dụ, xem tài liệu Hoon et al., *Cell*, 96: 541-551 (1999)). Các thành viên của họ này cũng được dùng để chỉ GPCR-B3 và TR1 trong công bố đơn quốc tế số WO 00/06592 cũng như GPCR-B4 và TR2 trong công bố đơn quốc tế số WO 00/06593. Ở đây, GPCR-B3 còn được dùng để chỉ rT1R1, và GPCR-B4 còn được dùng để chỉ rT1R2. Các tế bào thụ thể vị giác còn có thể được nhận biết dựa trên cơ sở hình thái học (ví dụ, xem tài liệu của Roper nêu trên), hoặc bằng sự biểu hiện protein được biểu hiện đặc hiệu trong tế bào vị giác. Các thành viên họ T1R có thể có khả năng thực hiện vai trò là các thụ thể đối với sự tải nạp tín hiệu vị ngọt hoặc để phân biệt giữa các phương thức vị giác khác nhau khác. Các trình tự T1R đại diện, bao gồm hT1R1, hT1R2 và hT1R3, được nhận dạng dưới đây trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Axit nucleic “T1R” mã hoá họ GPCR với 7 vùng xuyên màng mà có “hoạt tính thụ thể gắn kết với protein G”, ví dụ, chúng có thể gắn kết với protein G đáp ứng với các kích thích ngoại bào và đẩy mạnh sự sản sinh chất truyền tin thứ cấp như IP3,

cAMP, cGMP, và Ca^{2+} thông qua việc kích thích các enzym như phospholipaza C và adenylat cyclaza (đối với việc mô tả cấu trúc và chức năng của GPCR, ví dụ xem tài liệu của Fong trên đây, và tài liệu của Baldwin trên đây). Một tế bào vị giác riêng rẽ có thể chứa nhiều polypeptit T1R khác biệt.

Do đó, thuật ngữ họ “T1R” dùng để chỉ biến thể đa hình, alen, thể đột biến, và thể tương đồng khác loài mà: (1) có ít nhất khoảng từ 35 đến 50% trình tự axit amit đồng nhất, tùy ý khoảng 60, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 hoặc 99% trình tự axit amin đồng nhất với polypeptit T1R, tốt hơn là polypeptit T1R được xác định trong Ví dụ 1, trên đoạn bao gồm khoảng 25 axit amin, tùy ý 50-100 axit amin; (2) gắn kết đặc hiệu với các kháng thể tạo ra sự chống lại chất sinh miễn dịch bao gồm trình tự axit amin, tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm trình tự polypeptit T1R được bộc lộ trong Ví dụ 1 và các biến thể được biến đổi bảo tồn của nó; (3) được mã hoá bằng phân tử axit nucleic mà lai hoá đặc hiệu (với kích thước ít nhất khoảng 100, tùy ý ít nhất khoảng 500-1000 nucleotit) trong các điều kiện lai hoá nghiêm ngặt với trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit nucleic T1R có trong Ví dụ 1, và các biến thể được biến đổi bảo tồn của nó; hoặc (4) chứa trình tự giống ít nhất khoảng 35 đến 50% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm trình tự axit amin T1R được xác định trong Ví dụ 1.

Về mặt hình học topo, T1R được bộc lộ ở đây có “vùng đầu tận cùng N” còn được gọi là “vùng ngoại bào” bao gồm “vùng venus flytrap” và “vùng giàu xystein”; “vùng xuyên màng” bao gồm 7 vùng xuyên màng, các quai tế bào chất và ngoại bào tương ứng; và “vùng đầu tận cùng C” (ví dụ, xem tài liệu Hoon et al., Cell, 96: 541-551 (1999); Buck & Axel, Cell, 65: 175-187 (1991)). Các vùng này được xác định cấu trúc bằng cách sử dụng các phương pháp mà chuyên gia trong lĩnh vực này đã biết, như chương trình phân tích trình tự dùng để nhận biết các vùng kỵ nước và ưa nước (Stryer, Biochemistry, (3rd ed. 1988)). Các vùng này có thể được sử dụng để tạo

ra protein thể khảm và dùng cho các thử nghiệm in vitro theo sáng chế, ví dụ thử nghiệm gắn kết phối tử. Gắn kết đặc hiệu của hợp chất với các vùng được xác định cấu trúc này đề xuất sự định nghĩa về mặt cấu trúc đối với hợp chất.

Do đó, thuật ngữ “vùng ngoại bào” dùng để chỉ vùng polypeptit T1R mà nhô ra từ màng tế bào và được tiếp xúc với mặt bên ngoài của tế bào. Các vùng này thường bao gồm “vùng đầu tận cùng N” mà được tiếp xúc với mặt bên ngoài của tế bào, và tùy ý có thể bao gồm các phân quai ngoại bào của vùng xuyên màng mà được tiếp xúc với mặt bên ngoài của tế bào, nghĩa là, các quai giữa vùng xuyên màng 2 và 3, giữa vùng xuyên màng 4 và 5, và giữa vùng xuyên màng 6 và 7.

Thuật ngữ “vùng đầu tận cùng N” bắt đầu ở đầu tận cùng N và mở rộng tới vùng gần điểm bắt đầu của vùng xuyên màng thứ nhất. Cụ thể hơn, theo một phương án của sáng chế, vùng này bắt đầu từ đầu tận cùng N và kết thúc ở khoảng axit glutamic được bảo tồn ở vị trí axit amin 563 cộng hoặc trừ khoảng 20 axit amin. Các vùng ngoại bào này có thể được sử dụng cho thử nghiệm liên kết phối tử in vitro, cả pha hoà tan lẫn pha rắn. Ngoài ra, vùng xuyên màng, được mô tả dưới đây, cũng có thể gắn kết với phối tử hoặc phối hợp với vùng ngoại bào, và do đó cũng được sử dụng cho thử nghiệm gắn kết phối tử in vitro.

Thuật ngữ “vùng giàu xystein” dùng để chỉ vùng polypeptit. Trình tự được bảo tồn này chứa vài gốc Cys được bảo tồn cao mà tạo thành các cầu nối disulfua, và nằm bên ngoài màng tế bào. Vùng này tương ứng với vùng của các thành viên họ T1R và được tìm thấy trong tất cả ba cấu trúc dưới phân tử, T1R1-T1R3. Trình tự giàu xystein được tìm thấy trong các axit amin 510-566 của T1R1, 508-565 của T1R2, và 512-568 của T1R3.

Thuật ngữ “vùng xuyên màng”, bao gồm bảy “vùng xuyên màng”, dùng để chỉ vùng polypeptit T1R nằm bên trong màng huyết tương, và có thể còn bao gồm các quai tế bào chất (nội bào) và ngoại bào tương ứng. Theo một phương án, vùng này

tương ứng với vùng của các thành viên họ T1R mà bắt đầu ở khoảng gốc axit glutamic được bảo tồn ở vị trí axit amin 563 cộng hoặc trừ 20 axit amin và kết thúc ở khoảng gốc axit amin của tyrosin được bảo toàn ở vị trí 812 cộng hoặc trừ khoảng 10 axit amin. Bảy vùng xuyên màng và các quai ngoại bào và tế bào chất này có thể được nhận biết bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn, như được mô tả trong tài liệu Kyte & Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157: 105-32 (1982)), hoặc trong tài liệu của Stryer trên đây.

Thuật ngữ “vùng tế bào chất” dùng để chỉ các vùng của polypeptit T1R mà hướng vào phần bên trong của tế bào, ví dụ “vùng đầu tận cùng C” và các quai nội bào của vùng xuyên màng, ví dụ quai nội bào giữa vùng xuyên màng 1 và 2, quai nội bào giữa vùng xuyên màng 3 và 4, và quai nội bào giữa vùng xuyên màng 5 và 6.

Thuật ngữ “vùng đầu tận cùng C” dùng để chỉ vùng nối điểm cuối của vùng xuyên màng cuối cùng và đầu tận cùng C của protein, và thường định vị bên trong chất tế bào. Theo một phương án, vùng này bắt đầu từ gốc axit amin của tyrosin ở vị trí 812 cộng hoặc trừ khoảng 10 axit amin và tiếp tục tới đầu tận cùng C của polypeptit.

Thuật ngữ “vùng gắn kết phối tử” dùng để chỉ trình tự thu được từ thụ thể vị giác, cụ thể là thụ thể vị giác mà về cơ bản chứa ít nhất vùng ngoại bào của thụ thể. Theo một phương án, vùng ngoại bào của vùng gắn kết phối tử có thể bao gồm vùng đầu tận cùng N và, tùy ý, các phần của vùng xuyên màng, như quai ngoại bào của vùng xuyên màng. Vùng gắn kết phối tử có thể gắn kết phối tử và cụ thể hơn là hợp chất làm tăng, bất chước và/hoặc điều chỉnh vị giác, ví dụ vị ngọt hoặc vị umami.

Trong ngữ cảnh của thụ thể T1R hoặc polypeptit theo sáng chế, cụm từ “heteromultimer” hoặc “phức chất heteromultimer” dùng để chỉ sự liên hợp về mặt chức năng của ít nhất một thụ thể T1R với một thụ thể khác, thường là polypeptit của một thụ thể T1R khác (hoặc, theo cách khác là polypeptit của một thụ thể không phải

T1R khác). Để dễ hiểu, sự đồng phụ thuộc về mặt chức năng của các T1R được xác định theo đơn này dưới dạng phản ánh chức năng có thể của chúng dưới dạng phức chất của thụ thể vị giác heterodime. Tuy nhiên, như đã được bàn luận trên đây, sự đồng phụ thuộc về mặt chức năng có thể phản ánh theo cách khác sự tương tác gián tiếp. Ví dụ, T1R3 có thể thực hiện chức năng một mình để tạo điều kiện thuận lợi cho sự biểu hiện bề mặt của T1R1 và T1R2, mà có thể hoạt động độc lập dưới dạng thụ thể vị giác. Mặt khác, thụ thể vị giác chức năng có thể chỉ bao gồm T1R3, mà được xử lý biệt hoá dưới sự kiểm soát của T1R1 hoặc T1R2, tương tự với quá trình xử lý phụ thuộc RAMP của thụ thể liên quan đến canxi.

Cụm từ “tác động chức năng” trong ngữ cảnh của thử nghiệm để kiểm tra hợp chất làm điều biến sự tải nạp tín hiệu vị giác qua trung gian thành viên họ T1R bao gồm việc xác định thông số bất kỳ theo cách gián tiếp hoặc trực tiếp dưới sự ảnh hưởng của thụ thể, ví dụ các tác động chức năng, vật lý và hoá học. Nó bao gồm các thử nghiệm gắn kết phối tử, các thay đổi về dòng ion, điện thế màng, dòng điện, mức phiên mã, mức gắn kết G protein, mức phosphoryl hoá GPCR hoặc loại nhóm phosphoryl, thử nghiệm trên cơ sở thay đổi cấu dạng, mức tải nạp tín hiệu, mức tương tác thụ thể-phối tử, nồng độ chất truyền tin thứ cấp (ví dụ, cAMP, cGMP, IP3, hoặc Ca^{2+} nội bào), in vitro, in vivo, và ex vivo và vòng bao gồm các tác động sinh-lý khác như tăng hoặc giảm sự giải phóng chất dẫn truyền thần kinh hoặc hormon.

Trong ngữ cảnh thử nghiệm, bằng cách “xác định tác động chức năng” có nghĩa là thử nghiệm đối với hợp chất làm tăng hoặc giảm thông số theo cách gián tiếp hoặc trực tiếp dưới tác động của thành viên họ T1R, ví dụ các tác động chức năng, vật lý và hoá học. Các tác động chức năng này có thể được đo bằng phương pháp bất kỳ mà chuyên gia trong lĩnh vực này đã biết, ví dụ các thay đổi về đặc tính quang phổ (ví dụ, phát huỳnh quang, chỉ số hấp phụ, chỉ số khúc xạ), thuỷ động lực học (ví dụ, hình dạng), sắc ký, hoặc các tính chất hoà tan, đo dòng ion qua màng sinh học (patch

clamping), thuốc nhuộm nhạy điện thế, dòng điện toàn tế bào, mức chảy thoát đồng vị phóng xạ, dấu chuẩn cảm ứng, sự biểu hiện gen mã hoá T1R ở noãn bào; sự biểu hiện T1R trong tế bào nuôi cấy mô; sự hoạt hoá phiên mã gen mã hoá T1R; thử nghiệm gắn kết phối tử; điện áp, điện thế màng và sự thay đổi độ dẫn; thử nghiệm dòng ion; các thay đổi về lượng chất truyền tin thứ cấp nội bào như cAMP, cGMP, và inositol triphosphat (IP3); các thay đổi về mức canxi nội bào; sự giải phóng chất dẫn truyền thần kinh, thử nghiệm cấu dạng và các thông số tương tự.

Ở đây, thuật ngữ “chất tạo mùi vị hoặc tạo vị” dùng để chỉ hợp chất hoặc muối chấp nhận được về mặt sinh học của nó mà làm cho đối tượng sử dụng cảm nhận được mùi hoặc vị, mà bao gồm vị ngọt, vị chua, vị mặn, vị đắng và vị umami, và các vị khác. Đối tượng này có thể là người, động vật và/hoặc thử nghiệm sinh học, như đối tượng được mô tả và trích dẫn trong đơn này.

Ở đây, thuật ngữ “chất làm thay đổi mùi vị hoặc vị” dùng để chỉ hợp chất hoặc muối chấp nhận được về mặt sinh học của nó làm điều biến, bao gồm làm tăng, ức chế, và tạo ra, mùi và/hoặc vị của chất tạo vị tự nhiên hoặc tổng hợp ở đối tượng sử dụng.

Ở đây, thuật ngữ “chất làm tăng mùi vị hoặc vị” dùng để chỉ hợp chất hoặc muối chấp nhận được về mặt sinh học của nó có tác dụng làm tăng vị hoặc mùi của chất tạo vị tự nhiên hoặc tổng hợp, ví dụ mononatri glutamat (MSG) đối với vị umami và fructoza đối với vị ngọt.

Ở đây, thuật ngữ “chất tạo vị umami” hoặc “hợp chất có vị umami” dùng để chỉ hợp chất hoặc muối chấp nhận được về mặt sinh học của nó mà tạo ra vị umami có thể nhận thấy được ở đối tượng sử dụng, ví dụ MSG.

Ở đây, thuật ngữ “chất tạo vị ngọt” hoặc “hợp chất có vị ngọt” dùng để chỉ hợp chất hoặc muối chấp nhận được về mặt sinh học của nó mà tạo ra vị ngọt có thể nhận thấy được ở đối tượng sử dụng, ví dụ fructoza.

Ở đây, thuật ngữ “chất điều chỉnh vị umami” dùng để chỉ hợp chất hoặc muối chấp nhận được về mặt sinh học của nó mà làm điều biến, bao gồm làm tăng, ức chế, và tạo ra, vị umami của chất tạo vị umami tự nhiên hoặc tổng hợp, ví dụ mononatri glutamat (MSG), ở đối tượng sử dụng.

Ở đây, thuật ngữ “chất điều chỉnh vị ngọt” dùng để chỉ hợp chất hoặc muối chấp nhận được về mặt sinh học của nó mà làm điều biến, bao gồm làm tăng, ức chế, và tạo ra, vị ngọt của chất tạo vị ngọt tự nhiên hoặc tổng hợp, ví dụ fructoza, ở đối tượng sử dụng,.

Ở đây, “lượng làm tăng vị” dùng để chỉ lượng hợp chất đủ để làm tăng vị của chất tạo vị tự nhiên hoặc tổng hợp, ví dụ mononatri glutamat (MSG) đối với vị umami hoặc fructoza đối với vị ngọt.

Thuật ngữ “xúp lơng” có nghĩa là loại xúp lơng/lởng không chú ý tới nồng độ hoặc dụng cụ chứa, bao gồm cả xúp được làm đông lạnh. Với mục đích định nghĩa, xúp có nghĩa là một loại thức ăn được làm từ thịt, gia cầm, cá, rau, ngũ cốc, trái cây và các thành phần khác, được nấu trong một chất lỏng mà có thể bao gồm các miếng nhìn thấy được của một số hoặc tất cả các thành phần này. Xúp có thể ở dạng trong (như nước luộc) hoặc sền sệt (như xúp sôđơ), nhuyễn, đặc sệt, ăn liền, bán đặc hoặc đặc và có thể dùng nóng hoặc lạnh, là món đầu tiên hoặc là món chính trong bữa ăn hoặc là bữa ăn nhẹ (sử dụng như một đồ uống). Xúp có thể được sử dụng làm thành phần để tạo ra một món ăn khác và có thể có dạng từ nước luộc (nước dùng) đến nước xốt (xúp kem hoặc xúp phomat).

Thuật ngữ “thực phẩm khô và nấu được” có nghĩa là: (i) các sản phẩm dùng để hỗ trợ việc chế biến thức ăn như: bột, hạt, bột nhão, sản phẩm lỏng được cô đặc, bao gồm nước canh thịt cô đặc, nước canh thịt và nước canh thịt kiểu sản phẩm ở dạng hình khối nén, viên nén hoặc bột hoặc hạt, mà được bán riêng rẽ dưới dạng thành phẩm hoặc dưới dạng một thành phần trong một sản phẩm, nước xốt và hỗn hợp dùng

để chế biến thức ăn (không chú ý đến công nghệ); (ii) sản phẩm để chế biến thức ăn dạng dung dịch như như: xúp đã được loại nước và xúp được sấy khô ở nhiệt độ thấp, bao gồm hỗn hợp xúp đã được loại nước, xúp ăn liền đã được loại nước, xúp chế biến sẵn dùng để xào nấu đã được loại nước, sản phẩm đã được loại nước dưới dạng thức ăn đựng trong đĩa, món ăn chế biến sẵn, và món ăn dùng cho một người bao gồm đĩa mì ống, khoai tây và cơm; và (iii) sản phẩm để làm đẹp thức ăn như: đồ gia vị, nước xốt, gia vị để làm xa-lat, đồ trang trí xa-lat, nước chấm, bánh mì, hỗn hợp bột nhào, chất phết lên bánh bảo quản ở điều kiện bình thường, nước xốt dùng cho đồ nướng, hỗn hợp để chế biến thức ăn lỏng, thể cô đặc, nước xốt hoặc hỗn hợp nước xốt, bao gồm hỗn hợp dùng để trộn xa-lat, được bán dưới dạng thành phẩm hoặc dưới dạng một thành phần trong sản phẩm, được loại nước, ngâm nước hoặc làm đông lạnh hay không.

Thuật ngữ “đồ uống” có nghĩa là đồ uống, hỗn hợp đồ uống và thể cô đặc, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đồ uống sẵn chứa cồn và không chứa cồn và bột khô. Các ví dụ khác về thức ăn và đồ uống, trong đó hợp chất theo sáng chế có thể được đưa vào bao gồm đồ uống được làm bão hoà khí cacbonic hoặc không được làm bão hoà khí cacbonic, ví dụ xô-đa, nước ép hoa quả, đồ uống chứa cồn và không chứa cồn, bánh kẹo, ví dụ bánh ngọt, bánh quy, bánh có nhân, kẹo, kẹo gôm, gelatin, kem, nước trái cây, bánh phứt-đinh, mứt, kẹo dẻo, gia vị để làm xa-lát, và các loại gia vị, ngũ cốc khác, và đồ ăn nhanh, nước trái cây đóng hộp và nước quả nghiền khác và đồ uống tương tự.

Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng trong chế phẩm có mùi vị để thêm vào thức ăn và đồ uống. Trong trường hợp được ưu tiên, chế phẩm sẽ bao gồm các chất làm thay đổi mùi vị hoặc vị khác như chất tạo vị ngọt.

Trong một số trường hợp, muối chấp nhận được về mặt sinh học của hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng. Ví dụ về các muối này bao gồm muối của kim

loại kiềm và kiềm thổ, muối hữu cơ và các muối tương tự. Các ví dụ cụ thể bao gồm muối kali, natri, canxi và magie, muối của axit clohydric hoặc sulfuric, muối etanolamin, và các muối tương tự. Muối này sẽ có được chọn sao cho an toàn sinh học đối với sự tiêu hoá và không ảnh hưởng bất lợi đến các tính chất điều chỉnh vị ngọt của hợp chất.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “sản phẩm chữa bệnh” bao gồm cả chất rắn và chất lỏng, không độc có thể ăn được, có giá trị chữa bệnh như xi-rô trị ho, thuốc nhỏ giọt trị ho, aspirin và viên nén dùng để nhai. Sản phẩm vệ sinh bao gồm chất rắn và chất lỏng như thuốc đánh răng hoặc nước súc miệng.

Thuật ngữ “chất mang hoặc tá dược chấp nhận được về mặt mỹ phẩm hoặc y tế” là môi trường được sử dụng để điều chế các dạng liều cần thiết của hợp chất theo sáng chế. Chất mang chấp nhận được về mặt mỹ phẩm hoặc y tế bao gồm dung môi, chất làm loãng, hoặc chất dẫn dạng lỏng khác; chất hỗ trợ sự phân tán hoặc chất hỗ trợ sự tạo huyền phù; chất hoạt động bề mặt; chất tạo sự đẳng trương; chất làm đặc hoặc chất nhũ hoá, chất bảo quản; chất độn rắn; chất làm trơn và các chất tương tự.

Thuật ngữ “chất ức chế”, “chất hoạt hoá”, “chất làm tăng” và “chất điều biến” gen hoặc protein T1R được sử dụng để chỉ phân tử có tác dụng ức chế, hoạt hoá, làm tăng hoặc điều biến được nhận biết bằng cách sử dụng các thử nghiệm in vitro và in vivo đối với sự tải nạp tín hiệu vị giác, ví dụ phối tử, chất chủ vận, chất đối kháng, và các chất tương tự và chất giống hệt của chúng.

Các chất ức chế là hợp chất, ví dụ, gắn kết, ức chế một phần hoặc toàn toàn sự kích thích, làm giảm, ngăn ngừa, làm chậm sự hoạt hoá, làm mất tác dụng, làm giảm nhạy cảm, hoặc điều tiết giảm sự tải nạp tín hiệu vị giác, ví dụ chất đối kháng. Chất hoạt hoá và chất làm tăng là hợp chất, ví dụ gắn kết, làm tăng, kích thích, làm tăng, làm mở, hoạt hoá, tạo điều kiện thuận lợi, làm tăng sự hoạt hoá, làm nhạy cảm, hoặc điều tiết tăng sự tải nạp tín hiệu vị giác, ví dụ chất chủ vận. Chất điều biến bao gồm

hợp chất, ví dụ làm thay đổi sự tương tác của thụ thể với: protein ngoại bào gắn kết với các chất hoạt hoá hoặc chất ức chế (ví dụ, ebnerin và các thành viên khác của họ chất mang kỵ nước); protein G; kinaza (ví dụ, thể tương đồng của rhodopsin kinaza và kinaza của thụ thể beta adrenalin liên quan đến sự khử hoạt tính và làm giảm độ nhạy cảm thụ thể); và arestin, mà khử hoạt tính và làm giảm độ nhạy cảm của thụ thể. Các chất điều biến có thể tạo ra các thể bị biến đổi về mặt di truyền của các thành viên họ T1R, ví dụ có hoạt tính bị thay đổi, cũng như các phối tử, chất đối kháng, chất chủ vận, phân tử hoá học nhỏ có trong tự nhiên và tổng hợp và các chất tương tự. Các thử nghiệm đối với các chất ức chế và chất hoạt hoá này, ví dụ, bao gồm biểu hiện các thành viên họ T1R trong tế bào hoặc màng tế bào, ứng dụng các chất điều biến giả định, có hoặc không có mặt chất tạo vị, ví dụ chất tạo vị ngọt, và sau đó xác định các tác động chức năng đến sự tải nạp tín hiệu vị giác, như được mô tả trên đây. Các mẫu hoặc thử nghiệm chứa các thành viên họ T1R mà có thể được xử lý bằng chất làm tăng, chất hoạt hoá, chất ức chế hoặc chất điều biến tiềm tàng được so sánh với mẫu đối chứng không chứa chất ức chế, chất hoạt hoá, hoặc chất điều biến để kiểm tra mức độ điều biến. Mẫu đối chứng dương (ví dụ, chất tạo vị ngọt được bổ sung chất điều biến) được ấn định là có giá trị hoạt tính T1R tương đối bằng 100%.

“EC₅₀” được xác định là lượng hợp chất tạo ra mức đáp ứng bằng 50% mức đáp ứng tối đa mà hợp chất có thể tạo ra, dưới dạng chất hoạt hoá, chất làm tăng, hoặc chất điều biến. Trong một ví dụ, đường cong đáp ứng phụ thuộc liều lượng được xác định đối với hợp chất, và xác định được nồng độ hợp chất tương ứng với đáp ứng tối đa 50% từ đường cong.

“IC₅₀” được xác định là lượng hợp chất tạo ra tác dụng bằng 50% tác dụng tối đa mà hợp chất có thể tạo ra dưới dạng chất ức chế.

Về chất tạo vị ngọt và chất làm tăng vị ngọt, sau khi nhận biết được hợp chất nhận biết, điểm số hoạt tính của chúng được thể hiện dưới dạng phần trăm của cường

độ fructoza tối đa (%). Về đáp ứng liều lượng của hợp chất, EC_{50} cũng có thể được tính toán để phản ánh hiệu lực của hợp chất dưới dạng chất chủ vận vị ngọt. Theo sáng chế, giá trị EC_{50} nhỏ hơn khoảng 100mM biểu thị hợp chất tạo ra hoạt tính T1R2/T1R3 dưới dạng chất chủ vận vị ngọt. Đối với chất chủ vận vị ngọt, tốt hơn nếu kết quả tích cực có giá trị EC_{50} nhỏ hơn khoảng 1mM; tốt hơn nữa là nhỏ hơn khoảng 10 μ M.

Trong thử nghiệm làm tăng vị ngọt, đáp ứng liều lượng fructoza được chạy và đáp ứng liều lượng fructoza thứ hai được chạy cùng với một lượng nhất định của hợp chất thử nghiệm ở mọi nồng độ fructoza ở cùng một thời điểm. Sau đó, tỷ lệ EC_{50} có thể được tính toán dựa trên công thức sau đây:

$$\text{Tỷ lệ } EC_{50} = EC_{50}(\text{fructoza}) / EC_{50}(\text{fructoza} + [\text{hợp chất}])$$

trong đó “[hợp chất]” dùng để chỉ nồng độ của chất được sử dụng để tạo ra (hoặc làm tăng) đáp ứng liều lượng fructoza. Các nồng độ này có thể thay đổi từ pM đến mM, được ưu tiên hơn là từ nM thấp đến μ M. Chất làm tăng vị ngọt hiệu nghiệm có tỷ lệ EC_{50} cao ở nồng độ thấp của hợp chất được sử dụng.

Theo sáng chế, tỷ lệ EC_{50} lớn hơn 1 biểu thị hợp chất có tác dụng điều biến (làm tăng) hoạt tính T1R2/T1R3 và là chất làm tăng vị ngọt. Tốt hơn là, kết quả tích cực sẽ có giá trị tỷ lệ EC_{50} ít nhất bằng 1,20, tốt hơn là nằm trong khoảng ít nhất từ 1,50 đến 100 hoặc thậm chí còn cao hơn.

Ngược lại, chất chủ vận cạnh tranh (loại trừ các chất tạo vị ngọt gắn kết qua lại) hoặc chất ức chế thường có giá trị tỷ lệ EC_{50} nhỏ hơn 1, như nằm trong khoảng từ 0 đến 1.

Về chất tạo vị umami và chất làm tăng vị umami, điểm số hoạt tính của chúng được thể hiện dưới dạng phần trăm của cường độ MSG tối đa (%). Về đáp ứng liều lượng của hợp chất, EC_{50} cũng có thể được tính toán để phản ánh hiệu lực của hợp chất dưới dạng chất chủ vận vị umami. Theo sáng chế, giá trị EC_{50} nhỏ hơn 10mM

biểu thị một hợp chất tạo ra hoạt tính T1R2/T1R3 dưới dạng chất chủ vận vị umami. Đối với chất chủ vận vị umami, tốt hơn nếu kết quả tích cực sẽ có giá trị EC_{50} nhỏ hơn khoảng 1mM; tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ pM đến μ M thấp.

Trong thử nghiệm làm tăng vị umami, đáp ứng liều lượng MSG được chạy và đáp ứng liều lượng MSG thứ hai được chạy cùng với một lượng nhất định của hợp chất thử nghiệm ở mọi nồng độ MSG ở cùng một thời điểm. Sau đó, tỷ lệ EC_{50} có thể được tính toán dựa trên công thức sau đây:

$$\text{Tỷ lệ } EC_{50} = EC_{50}(\text{MSG})/EC_{50}(\text{MSG} + [\text{hợp chất}])$$

trong đó “[hợp chất]” dùng để chỉ nồng độ của chất được sử dụng để tạo ra (hoặc làm tăng) đáp ứng liều lượng MSG. Các nồng độ này có thể thay đổi trong khoảng từ pM đến mM, được ưu tiên hơn là từ nM thấp đến μ M. Chất làm tăng vị umami hiệu nghiệm có tỷ lệ EC_{50} cao ở nồng độ thấp của hợp chất được sử dụng.

Theo sáng chế, tỷ lệ EC_{50} lớn hơn 1 biểu thị hợp chất có tác dụng điều biến (làm tăng) hoạt tính T1R1/T1R3 và là chất làm tăng vị umami. Tốt hơn là, kết quả tích cực có giá trị tỷ lệ EC_{50} ít nhất bằng 1,20, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1,50 đến 100 hoặc thậm chí còn cao hơn.

Các mẫu đối chứng âm (ví dụ, chất đệm không được bổ sung các chất kích thích có vị) được ấn định giá trị hoạt tính T1R tương đối là 0%. Sự ức chế T1R đạt được khi hỗn hợp bao gồm mẫu đối chứng dương và chất điều biến tạo ra giá trị hoạt tính T1R tương ứng với mẫu đối chứng dương là khoảng 80%, tùy ý 50% hoặc 25-0%. Việc hoạt hoá T1R bằng chỉ một mình chất điều biến đạt được khi giá trị hoạt tính T1R tương ứng với mẫu đối chứng dương là 10%, 25%, 50%, 75%, tùy ý 100%, tùy ý 150%, tùy ý 200-500%, hoặc cao hơn 1000-3000%.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tinh khiết”, “hầu như tinh khiết” và “phân lập” dùng để chỉ trạng thái không chứa hợp chất khác, không giống thường kết hợp với hợp chất theo sáng chế ở trạng thái tự nhiên của nó, sao cho chất “tinh khiết”,

“hầu như tinh khiết” và “phân lập” chiếm ít nhất 0,5%, 1%, 5%, 10%, hoặc 20%, và tốt nhất là ít nhất 50% hoặc 75% khối lượng mẫu đã cho, theo trọng lượng. Theo một phương án được ưu tiên, thuật ngữ này dùng để chỉ hợp chất theo sáng chế chiếm ít nhất 95% khối lượng mẫu đã cho, theo trọng lượng. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tinh khiết”, “hầu như tinh khiết” và “phân lập”, khi nói tới axit nucleic hoặc protein, cũng dùng để chỉ trạng thái tinh chế hoặc nồng độ khác với trạng thái tinh chế hoặc nồng độ có trong tự nhiên trong động vật có vú, đặc biệt là trong cơ thể con người. Mức độ tinh chế hoặc nồng độ bất kỳ lớn hơn mức tinh chế và nồng độ có trong tự nhiên ở động vật có vú, đặc biệt là cơ thể con người, bao gồm (1) tinh chế từ các cấu trúc hoặc hợp chất có liên quan khác hoặc (2) liên quan đến cấu trúc hoặc chất mà thường không liên quan ở động vật có vú, đặc biệt là cơ thể con người, nằm trong nghĩa “phân lập”. Axit nucleic hoặc protein hoặc nhóm các axit nucleic hoặc protein, được mô tả ở đây, có thể được phân lập, hoặc theo cách khác liên kết với cấu trúc hoặc hợp chất mà chúng thường không liên kết trong tự nhiên, theo nhiều phương pháp và quy trình khác nhau mà chuyên gia trong lĩnh vực này đã biết.

Thuật ngữ “axit nucleic” hoặc “trình tự axit nucleic” dùng để chỉ deoxy-ribonucleotit hoặc ribonucleotit oligonucleotit ở cả dạng sợi đơn hoặc sợi kép. Thuật ngữ này bao gồm các axit nucleic, nghĩa là, các oligonucleotit, chứa các chất tương tự đã biết của nucleotit tự nhiên. Thuật ngữ này còn bao gồm các cấu trúc kiểu axit nucleic với bộ khung chính tổng hợp (ví dụ, xem tài liệu Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach, ed. F. Eckstein, Oxford Univ. Press (1991); Antisense Strategies, 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 and 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)).

Nếu không có chỉ dẫn khác, một trình tự axit nucleic cụ thể còn hoàn toàn bao gồm các biến thể được biến đổi bảo tồn của nó (ví dụ, thể thay thế codon suy biến) và các trình tự bổ trợ, cũng như trình tự được chỉ ra một cách rõ ràng. Cụ thể, thể thay thế codon suy biến có thể nhận được bằng cách tạo ra, ví dụ, các trình tự trong đó vị trí thứ ba của một hoặc nhiều codon đã chọn được thay thế bằng gốc bazơ hỗn tạp và/hoặc deoxyinosin (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)). Thuật ngữ axit nucleic được sử dụng có thể thay thế bằng gen, ADN bổ trợ, ARN thông tin, oligonucleotit, và polynucleotit.

Ở đây, thuật ngữ “polypeptit”, “peptit” và “protein” được sử dụng có thể thay thế cho nhau dùng để chỉ polyme của gốc axit amin. Các thuật ngữ này áp dụng cho polyme của axit amin trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin là gốc hoá học nhân tạo giống hệt của axit amin có trong tự nhiên tương ứng, cũng như áp dụng cho polyme axit amin có trong tự nhiên và polyme axit amin không có trong tự nhiên.

Thuật ngữ “vùng chuyển đoạn màng huyết tương” hoặc đơn giản là “vùng chuyển đoạn” có nghĩa là vùng polypeptit mà khi được đưa vào trình tự mã hoá polypeptit, có thể “chaperon” hoặc “chuyển đoạn” protein lai (“dung hợp”) vào màng huyết tương của tế bào với hiệu lực lớn hơn khi không có vùng này. Ví dụ, “vùng chuyển đoạn” có thể được tạo ra từ đầu amino của polypeptit của thụ thể rhodopsin bò, một thụ thể xuyên màng 7 lần. Tuy nhiên, rhodopsin thu được từ động vật có vú khác có thể được sử dụng, dưới dạng trình tự khác tạo điều kiện cho sự chuyển đoạn. Do đó, vùng chuyển đoạn là đặc biệt hữu hiệu trong việc chuyển đoạn các protein xuyên màng 7 lần dung hợp vào màng huyết tương, và protein (ví dụ, polypeptit của thụ thể vị giác) chứa vùng chuyển đoạn đầu amin sẽ được vận chuyển tới màng huyết tương một cách hữu hiệu hơn khi không có vùng này. Tuy nhiên, nếu vùng đầu tận

cùng N của polypeptit có hoạt tính khi gắn kết, như với thụ thể T1R theo sáng chế, thì việc sử dụng các vùng chuyển đoạn khác có thể được ưu tiên. Ví dụ, peptit tương tác với vùng PDZ, như được mô tả ở đây, có thể được sử dụng.

Thuật ngữ “vùng chuyển đoạn”, “vùng gắn kết phối tử” của tổ hợp các thụ thể thể khảm được mô tả ở đây còn bao gồm “chất tương tự”, hoặc “biến thể bảo tồn” và “chất giống hệt” (“chất giống hệt peptit”) với cấu trúc và hoạt tính về cơ bản là tương ứng với trình tự được lấy làm ví dụ. Do đó, thuật ngữ “biến thể bảo tồn” hoặc “chất tương tự” hoặc “chất giống hệt” dùng để chỉ polypeptit mà có trình tự axit amin được biến đổi, sao cho sự thay đổi này gần như không làm thay đổi cấu trúc và/hoặc hoạt tính của polypeptit (của biến thể bảo tồn), như được xác định ở đây. Chúng bao gồm các biến thể được biến đổi bảo tồn của trình tự axit amin, nghĩa là, thay thế, bổ sung axit amin, hoặc loại bỏ các gốc mà không quan trọng đối với hoạt tính protein, hoặc thay thế axit amin bằng gốc có các tính chất tương tự (ví dụ, axit, bazơ, mang điện dương hoặc âm, phân cực hoặc không phân cực, v.v.) sao cho sự thay thế các gốc axit amin không quan trọng này gần như không làm thay đổi cấu trúc và/hoặc hoạt tính.

Cụ thể hơn, thuật ngữ “biến thể được biến đổi bảo tồn” áp dụng cho cả trình tự axit amin và axit nucleic. Đối với các trình tự axit nucleic cụ thể, các biến thể được biến đổi bảo tồn dùng để chỉ các axit nucleic mà mã hoá các trình tự axit amin giống nhau hoặc gần giống nhau, hoặc khi axit nucleic không mã hoá trình tự axit amin, thì dùng để chỉ các trình tự gần giống nhau. Do sự suy biến mã di truyền, một số lượng lớn các axit nucleic giống nhau về mặt chức năng mã hoá protein đã cho bất kỳ.

Ví dụ, các codon GCA, GCC, GCG và GCU đều mã hoá axit amin alanin. Do đó, ở mỗi vị trí tại đó alanin được định rõ bằng một codon, codon này có thể được thay đổi với một codon tương ứng bất kỳ trong số các codon đã được mô tả mà không làm thay đổi polypeptit được mã hoá.

Sự biến đổi axit nucleic là “sự biến đổi âm thầm”, đó là một loại biến đổi được

bảo tồn. Ở đây, mỗi trình tự axit nucleic, mã hoá một polypeptit, còn mô tả mỗi sự biến đổi âm thầm có thể của axit nucleic. Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng mỗi codon trong axit nucleic (ngoại trừ AUG, thường chỉ là codon đối với methionin, và TGG, thường chỉ là codon đối với tryptophan) có thể được biến đổi để tạo ra phân tử giống hệt về mặt chức năng. Do đó, mỗi sự biến đổi âm thầm của axit nucleic mã hoá một polypeptit, liên quan đến mỗi trình tự được mô tả ở đây.

Bảng thay thế bảo tồn đề xuất các axit amin tương tự về mặt chức năng là đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, một hướng dẫn ví dụ để lựa chọn gốc thay thế bảo tồn bao gồm (gốc nguyên thủy, tiếp đó là gốc thay thế ví dụ): ala/gly hoặc ser; arg/lys; asn/gln hoặc his; asp/glu; cys/ser; gln/asn; gly/asp; gly/ala hoặc pro; his/asn hoặc gln; ile/leu hoặc val; leu/ile hoặc val; lys/arg hoặc gln hoặc glu; met/leu hoặc tyr hoặc ile; phe/met hoặc leu hoặc tyr; ser/thr; thr/ser; trp/tyr; tyr/trp hoặc phe; val/ile hoặc leu. Một hướng dẫn ví dụ khác sử dụng sáu nhóm sau, mỗi nhóm chứa các axit amin mà là gốc thay thế bảo tồn cho một axit khác: 1) Alanin (A), Serin (S), Threonin (T); 2) Axit aspartic (D), Axit glutamic (E); 3) Asparagin (N), Glutamin (Q); 4) Arginin (R), Lysin (I); 5) Isoleuxin (I), Leuxin (L), Methionin (M), Valin (V); và 6) Phenylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptophan (W); (Ví dụ, xem tài liệu Creighton, *Proteins*, W. H. Freeman and Company (1984); Schultz and Schimer, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag (1979)). Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ hiểu được là các gốc thay thế nêu trên không chỉ là gốc thay thế bảo tồn có thể xảy ra. Ví dụ, đối với một số mục đích, người ta có thể coi tất cả các axit amin mang điện là gốc thay thế bảo tồn đối với mọi axit amin dù chúng mang điện dương hoặc âm. Ngoài ra, sự thay thế, loại bỏ hoặc bổ sung riêng rẽ mà làm thay đổi, bổ sung hoặc loại bỏ một axit amin duy nhất hoặc một tỷ lệ nhỏ các axit amin trong trình tự được mã hoá cũng có thể được coi là “thể biến đổi được biến đổi bảo tồn”.

Thuật ngữ “chất giống hệt” và “chất giống hệt peptit” dùng để chỉ hợp chất hoá

học tổng hợp mà chủ yếu có cùng đặc tính cấu trúc và/hoặc chức năng của polypeptit, ví dụ vùng chuyển đoạn, vùng gắn kết phối tử, hoặc thụ thể thể khảm theo sáng chế. Chất giống hệt có thể được cấu thành hoàn toàn từ các chất tương tự tổng hợp hoặc không có trong tự nhiên của axit amin, hoặc có thể là phân tử khảm của axit amin peptit một phần tự nhiên và chất tương tự một phần không có trong tự nhiên của axit amin. Chất giống hệt còn có thể là lượng bất kỳ của thể thay thế bảo tồn axit amino tự nhiên miễn là các gốc thay thế này cũng gần như không làm thay đổi cấu trúc và/hoặc hoạt tính của chất giống hệt.

Vì cùng với polypeptit theo sáng chế mà là các biến thể bảo tồn, thử nghiệm thông thường sẽ xác định liệu chất giống hệt thuộc lĩnh vực bảo hộ của sáng chế, nghĩa là, cấu trúc và/hoặc chức năng của nó gần như không thay đổi. Tổ hợp chất giống hệt polypeptit có thể chứa tổ hợp bất kỳ của các thành phần có cấu trúc không tự nhiên, mà thường được chọn từ ba nhóm cấu trúc sau: a) nhóm liên kết gốc mà không phải là liên kết amit tự nhiên ("liên kết peptit"); b) gốc không tự nhiên thay cho các gốc axit amin có trong tự nhiên; hoặc c) gốc tạo ra sự giống hệt về cấu trúc thứ cấp, nghĩa là, tạo ra hoặc làm ổn định cấu trúc thứ cấp, ví dụ vòng beta, vòng gama, dải beta, cấu dạng xoắn ốc alpha, và các cấu trúc tương tự. Một polypeptit có thể được xác định đặc điểm như là chất giống hệt khi tất cả hoặc một số gốc của nó được kết hợp bằng các phương pháp hoá học mà không phải là liên kết peptit tự nhiên. Các gốc giống hệt peptit riêng rẽ có thể được kết hợp bằng các liên kết peptit, các liên kết hoá học khác hoặc các phương pháp kết hợp khác, ví dụ như glutaraldehyt, N-hydroxysuccinimide este, maleimide hai chức năng, N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) hoặc N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC). Các nhóm liên kết mà có thể thay thế cho liên kết amin truyền thống ("liên kết peptit"), ví dụ, bao gồm ketometylen (ví dụ $-C(=O)-CH_2-$ thay cho $-C(=O)-NH-$), aminometylen (CH_2-NH), etylen, olefin ($CH=CH$), ete (CH_2-O), thioete (CH_2-S), tetrazol (CN_4), thiazol, retroamit, hoặc este

(ví dụ, xem tài liệu Spatola, *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Vol. 7, pp 267-357, “Peptide Backbone Modifications”, Marcell Dekker, NY (1983)). Một polypeptit còn có thể được xác định đặc điểm như là một chất giống hệt bằng cách chứa tất cả hoặc một số gốc không có trong tự nhiên thay cho các gốc axit amin có trong tự nhiên, gốc không có trong tự nhiên là đã được mô tả kỹ trong các tài liệu chuyên ngành và tài liệu patent.

“Gốc đánh dấu” hoặc “gốc dễ phát hiện” là thành phần dễ phát hiện bằng các phương pháp quang phổ, quang hoá, sinh hoá, miễn dịch hoá học hoặc hoá học. Ví dụ, các chất đồng vị đánh dấu hữu hiệu bao gồm ^{32}P , thuốc nhuộm huỳnh quang, chất có mật độ điện tử cao, enzym (ví dụ, như thường được sử dụng trong phương pháp ELISA), biotin, digoxigenin, hoặc hapten và protein mà có thể được làm cho dễ phát hiện, ví dụ bằng cách đưa các chất đánh dấu phóng xạ vào peptit hoặc được sử dụng để phát hiện các kháng thể phản ứng đặc hiệu với peptit.

“Đoạn dò axit nucleic hoặc oligonucleotit được đánh dấu” là axit nucleic hoặc oligonucleotit được gắn kết đồng hoá trị qua một chất liên kết hoặc liên kết hoá học, hoặc không đồng hoá trị, qua các liên kết ion, Van der Waals, tĩnh điện, hoặc hydro với đồng vị phóng xạ sao cho sự có mặt của đoạn dò có thể được phát hiện bằng cách phát hiện sự có mặt của đồng vị phóng xạ gắn kết với đoạn dò.

Như được sử dụng ở đây, “đoạn dò axit nucleic hoặc oligonucleotit” được xác định là một axit nucleic có khả năng gắn kết với axit nucleic đích của trình tự bổ trợ qua một hoặc nhiều loại liên kết hoá học, thông thường qua cặp bazơ bổ trợ, thông thường qua sự hình thành liên kết hydro. Như được sử dụng ở đây, một đoạn dò có thể bao gồm các bazơ tự nhiên (nghĩa là, A, G, C, hoặc T) hoặc các bazơ được biến đổi (7-deazaguanosin, inosin, v.v.). Ngoài ra, các bazơ trong đoạn dò có thể được liên kết bằng một liên kết mà không phải là liên kết phosphodiester, miễn là nó không ảnh hưởng đến quá trình lai. Do đó, ví dụ, đoạn dò có thể là axit nucleic của peptit trong

đó các bazơ thành phần được liên kết bằng liên kết peptit chứ không phải là gắn kết phosphodiester. Chuyên gia trong lĩnh vực này hiểu được là đoạn dò có thể liên kết với trình tự đích thiếu độ hỗ trợ hoàn toàn với trình tự đoạn dò phụ thuộc và độ nghiêm ngặt của điều kiện lai. Tùy ý, đoạn dò được đánh dấu trực tiếp bằng chất đồng vị, nhóm mang màu, chất phát quang, nhóm sinh màu, hoặc đánh dấu gián tiếp như bằng biotin mà phức chất streptavidin có thể được gắn kết sau đó. Bằng cách thử nghiệm sự có mặt hoặc không có mặt của đoạn dò, chuyên gia trong lĩnh vực này có thể phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của trình tự hoặc tiểu trình tự được lựa chọn.

Thuật ngữ “khác loài” khi được sử dụng có liên quan tới các phần của axit nucleic chỉ ra rằng axit nucleic bao gồm hai hoặc nhiều tiểu trình tự mà trong tự nhiên chúng không có cùng mối quan hệ với nhau. Ví dụ, axit nucleic thường được tạo ra theo cách tái tổ hợp, có hai hoặc nhiều trình tự thu được từ các gen không liên quan được sắp xếp để tạo ra một axit nucleic chức năng mới, ví dụ gen khởi đầu thu được từ một nguồn và vùng mã hoá thu được từ một nguồn khác. Tương tự, protein khác loài chỉ ra rằng protein này bao gồm hai hoặc nhiều tiểu trình tự mà trong tự nhiên chúng không có cùng mối quan hệ với nhau (ví dụ, protein dung hợp).

“Yếu tố khởi đầu” được xác định là dãy trình tự axit nucleic mà trực tiếp phiên mã axit nucleic. Như được sử dụng ở đây, yếu tố khởi đầu bao gồm các trình tự axit nucleic cần thiết gần vị trí bắt đầu phiên mã, như trong trường hợp của yếu tố khởi đầu polymeraza typ II, đơn vị TATA. Yếu tố khởi đầu còn tùy ý bao gồm yếu tố làm xa tâm hoặc ức chế, mà có thể định vị nhiều tới mức có thể như vài nghìn cặp bazơ từ vị trí phiên mã ban đầu. Một yếu tố khởi đầu “cơ bản” là yếu tố khởi đầu có hoạt tính trong hầu hết các điều kiện môi trường và phát triển.

Yếu tố khởi đầu “cảm ứng” là yếu tố khởi đầu mà có hoạt tính trong điều kiện điều tiết môi trường hoặc phát triển. Thuật ngữ “được liên kết tùy ý” dùng để chỉ sự liên kết chức năng giữa trình tự kiểm soát sự biểu hiện axit nucleic (như yếu tố khởi

đầu, hoặc dãy vị trí gắn kết yếu tố phiên mã) và trình tự axit nucleic thứ hai, trong đó trình tự kiểm soát sự biểu hiện trực tiếp phiên mã axit nucleic tương ứng thành trình tự thứ hai.

Như được sử dụng ở đây, “tái tổ hợp” dùng để chỉ polynucleotit được tổng hợp hoặc nói theo cách khác, được thao tác in vitro (ví dụ, “polynucleotit tái tổ hợp”), dùng để chỉ phương pháp có sử dụng polynucleotit tái tổ hợp để tạo ra các sản phẩm gen trong tế bào hoặc các hệ sinh học khác, hoặc dùng để chỉ polypeptit (“protein tái tổ hợp”) được mã hoá bằng polynucleotit tái tổ hợp. “Phương pháp tái tổ hợp” còn bao gồm việc buộc axit nucleic có các vùng mã hoá khác nhau hoặc trình tự yếu tố khởi đầu từ các nguồn khác nhau vào trong một cat xet hoặc vector để biểu hiện, ví dụ biểu hiện cảm ứng hoặc cơ bản một protein dung hợp bao gồm vùng chuyển đoạn như được bộc lộ ở đây và trình tự axit nucleic được khuếch đại bằng cách sử dụng đoạn môi được bộc lộ ở đây.

Như được sử dụng ở đây, “dòng tế bào ổn định” dùng để chỉ dòng tế bào ổn định, nghĩa là trong một khoảng thời gian kéo dài biểu hiện trình tự nucleic khác loài, nghĩa là T1R hoặc protein G. Theo phương án được ưu tiên, các dòng tế bào ổn định này sẽ được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm tế bào thích hợp, thường là tế bào của động vật có vú, ví dụ, tế bào HEK-293, bằng vector mạch thẳng chứa cấu trúc biểu hiện T1R, nghĩa là T1R1, T1R2 và/hoặc T1R3. Tốt nhất là, các dòng tế bào ổn định này sẽ được tạo ra bằng cách đồng chuyển nhiễm hai plasmit mạch thẳng biểu hiện hT1R1 và hT1R3 hoặc hT1R2 và hT1R3 và tiến hành lựa chọn thích hợp để tạo ra các dòng tế bào có các gen được hợp chất ổn định trong đó. Tốt nhất là, dòng tế bào này cũng biểu hiện ổn định protein G như $G_{\alpha 15}$.

Cụm từ “lai chọn lọc (đặc hiệu)” dùng để chỉ việc gắn kết, nhân đôi hoặc lai chỉ một phân tử thành một trình tự nucleotit cụ thể trong các điều kiện lai nghiêm ngặt khi trình tự này có mặt trong một hỗn hợp phức tạp (ví dụ, tế bào toàn phần hoặc

thư viện ADN hoặc ARN).

Cụm từ “các điều kiện lai nghiêm ngặt” dùng để chỉ các điều kiện trong đó đoạn dò sẽ lai với các tiểu trình tự đích của nó, thông thường trong hỗn hợp phức tạp bao gồm các axit nucleic, nhưng không lai với các trình tự khác. Các điều kiện nghiêm ngặt phụ thuộc trình tự và sẽ khác nhau trong các trường hợp khác nhau. Các trình tự dài hơn lai đặc hiệu ở nhiệt độ cao hơn. Hướng dẫn rất cụ thể về quá trình lai các axit nucleic được tìm thấy trong tài liệu Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology- Hybridization with Nucleic Probes*, “Overview of principles of hybridization and the strategy của nucleic acid assays” (1993). Nói chung, các điều kiện nghiêm ngặt được chọn là nhiệt độ thấp hơn từ 5 đến 10°C so với điểm nóng chảy nhiệt (T_m) đối với trình tự đặc hiệu ở nồng độ ion, độ pH xác định. T_m là nhiệt độ (trong các điều kiện nồng độ ion, độ pH và nồng độ nucleic xác định) tại đó 50% đoạn dò bổ trợ với đích lai thành trình tự đích ở trạng thái cân bằng (do trình tự đích có mặt với lượng dư, ở T_m , 50% đoạn dò bị giữ ở trạng thái cân bằng). Các điều kiện nghiêm ngặt sẽ là điều kiện trong đó nồng độ muối thấp hơn nồng độ ion natri khoảng 1,0M, nồng độ ion natri thường nằm trong khoảng từ 0,01 đến 1,0M (hoặc muối khác) ở độ pH = 7,0 đến 8,3 và nhiệt độ ít nhất là 30°C đối với đoạn dò ngắn (ví dụ, 10 đến 50 nucleotit) và ít nhất khoảng 60°C đối với đoạn dò dài (ví dụ, lớn hơn 50 nucleotit). Các điều kiện nghiêm ngặt còn có thể nhận được bằng cách bổ sung chất làm mất ổn định như formamit. Để lai chọn lọc hoặc đặc hiệu, tín hiệu dương bằng ít nhất hai lần tín hiệu nền, tùy ý 10 lần tín hiệu lai của nền. Các điều kiện lai nghiêm ngặt ví dụ có thể là như sau: formamit 50%, 5x SSC, và SDS 1%, ủ ở 42°C, hoặc 5x SSC, SDS 1%, ủ ở 65°C, cùng với việc rửa bằng 0,2x SSC, và SDS 0,1% ở 65°C. Việc lai và các bước rửa này có thể được thực hiện, ví dụ, trong 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 phút hoặc nhiều hơn.

Các axit nucleic mà không lai với nhau trong các điều kiện nghiêm ngặt về cơ

bản là vẫn có liên quan nếu polypeptit mà chúng mã hoá hầu như có liên quan. Điều này, ví dụ, xảy ra khi một bản sao của axit nucleic được tạo ra bằng cách sử dụng sự suy biến codon tối đa được chấp nhận bởi sự mã hoá di truyền. Trong các trường hợp này, các axit nucleic thường lai trong các điều kiện lai nghiêm ngặt vừa phải. “Các điều kiện lai nghiêm ngặt vừa phải” được lấy làm ví dụ bao gồm lai trong dung dịch đệm bao gồm formamit 40%, NaCl 1M, SDS 1% ở 37°C, và rửa 1x SSC ở 45°C. Việc lai và bước rửa này có thể được thực hiện, ví dụ, trong 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 phút hoặc nhiều hơn. Lai dương tính là lai mà tín hiệu dương ít nhất bằng 2 lần tín hiệu nền. Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ hiểu được là các điều kiện lai và rửa khác có thể được sử dụng để tạo ra các điều kiện nghiêm ngặt tương tự.

Thuật ngữ “kháng thể” dùng để chỉ polypeptit bao gồm vùng khung thu được từ gen globulin miễn dịch hoặc đoạn của nó mà gắn kết đặc hiệu và nhận biết được kháng nguyên. Gen globulin miễn dịch được nhận dạng bao gồm các gen có vùng cố định kapa, lamda, alpha, gama, delta, epsilon, và mu, cũng như các gen globulin miễn dịch có vùng thay đổi là myriad. Các chuỗi nhẹ được phân loại thành kapa hoặc lamda. Chuỗi nặng được phân loại thành gama, mu, alpha, delta, hoặc epsilon, mà sau đó tương ứng xác định các nhóm globulin miễn dịch, IgG, IgM, IgA, IgD và IgE.

Một đơn vị cấu trúc globulin miễn dịch (kháng thể) được lấy làm ví dụ là tetrame. Mỗi tetrame bao gồm hai cặp chuỗi polypeptit giống nhau, mỗi cặp có một chuỗi “nhẹ” (khoảng 25kDa) và một chuỗi “nặng” (khoảng 50-70kDa). Các đầu tận cùng N của mỗi chuỗi xác định vùng thay đổi chứa khoảng từ 100 đến 110 axit amin hoặc nhiều hơn chủ yếu chịu trách nhiệm nhận biết kháng nguyên. Thuật ngữ “chuỗi nhẹ biến đổi” (VL- variable light chain) và “chuỗi nặng biến đổi” (VH - variable heavy chain) tương ứng dùng để các chuỗi nhẹ và nặng này.

Thuật ngữ “kháng thể thể khảm” là phân tử kháng thể trong đó (a) vùng không đổi, hoặc một phần của nó, được thay đổi, thay thế hoặc trao đổi sao cho vị trí gắn kết

kháng nguyên (vùng thay đổi) được liên kết với vùng không đổi của lớp khác hoặc lớp bị biến đổi, chức năng và/hoặc loại cơ quan thực hiện, hoặc toàn bộ một phân tử khác mà tạo ra các tính chất mới cho kháng thể thể khảm, ví dụ enzym, độc tố, hormon, yếu tố phát triển, dược chất, v.v.; hoặc (b) vùng thay đổi hoặc một phần của nó, được thay đổi, thay thế hoặc trao đổi với vùng thay đổi có tính đặc hiệu kháng nguyên khác hoặc bị biến đổi.

Kháng thể “kháng T1R” là kháng thể hoặc đoạn kháng thể gắn kết đặc hiệu với polypeptit được mã hoá bằng gen mã hoá T1R, ADN bổ trợ, hoặc tiểu trình tự của nó.

Thuật ngữ “thử nghiệm miễn dịch” là thử nghiệm sử dụng kháng thể để gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên. Thử nghiệm miễn dịch được đặc trưng bằng việc sử dụng các đặc tính gắn kết đặc hiệu của một kháng thể cụ thể để phân lập, tạo đích và/hoặc định lượng kháng nguyên.

Cụm từ “gắn kết đặc hiệu (hoặc chọn lọc)” hoặc “phản ứng đặc hiệu (hoặc chọn lọc)” với một phân tử hoặc tổ hợp, dùng để chỉ phản ứng gắn kết xác định sự có mặt của phân tử trong quần thể không đồng nhất của các sinh vật khác. Do đó, trong các điều kiện đã cho, các phân tử cụ thể gắn kết với một thụ thể cụ thể với tín hiệu bằng ít nhất hai lần tín hiệu nền và gần như không gắn kết với lượng đáng kể với các phân tử khác có mặt trong mẫu. Việc gắn kết đặc hiệu với một thụ thể trong các điều kiện như vậy có thể đòi hỏi thụ thể được chọn lọc về tính đặc hiệu của nó đối với một phân tử cụ thể.

Về kháng thể, các dạng thử nghiệm miễn dịch khác nhau có thể được sử dụng để chọn lọc các kháng thể có hoạt tính miễn dịch đặc hiệu với một protein cụ thể. Ví dụ, thử nghiệm miễn dịch ELISA pha rắn thường được sử dụng để chọn lọc các kháng thể có hoạt tính miễn dịch đặc hiệu với một protein (ví dụ, xem tài liệu Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, (1988), tài liệu này mô tả các dạng và các

điều kiện thử nghiệm miễn dịch mà có thể được sử dụng để xác định hoạt tính miễn dịch đặc hiệu). Thông thường, một phản ứng đặc hiệu hoặc chọn lọc sẽ có tín hiệu hoặc nhiều ít nhất bằng 2 lần tín hiệu hoặc nhiều của nền và thường là có tín hiệu hoặc nhiều gấp từ 10 đến 100 lần tín hiệu hoặc nhiều của nền.

Cụm từ “liên kết chọn lọc với” dùng để chỉ khả năng của một axit nucleic “lai chọn lọc” với một axit nucleic khác như được xác định trên đây, hoặc khả năng của một kháng thể “gắn kết chọn lọc (hoặc đặc hiệu)” với một protein, như được xác định trên đây.

Thuật ngữ “vector biểu hiện” dùng để chỉ hệ biểu hiện tái tổ hợp bất kỳ cho mục đích biểu hiện một trình tự axit nucleic *in vitro* hoặc *in vivo*, theo cách cơ bản hoặc cảm ứng, trong tế bào bất kỳ, bao gồm tế bào nhân nguyên thủy, nấm men, nấm, thực vật, côn trùng hoặc động vật có vú. Thuật ngữ này bao gồm các hệ biểu hiện dạng tuyến tính hoặc vòng. Thuật ngữ này bao gồm các hệ biểu hiện mà giữ nguyên được episom hoặc hợp nhất vào trong hệ gen của tế bào vật chủ. Các hệ biểu hiện còn có thể có khả năng tự sao chép hoặc không, nghĩa là chỉ biểu hiện tạm thời trong tế bào. Thuật ngữ này bao gồm sự biểu hiện tái tổ hợp “các cat xet chỉ chứa các yếu tố tối thiểu cần thiết để phiên mã axit nucleic tái tổ hợp.

“Tế bào vật chủ” có nghĩa là tế bào chứa vector biểu hiện và hỗ trợ việc sao chép hoặc biểu hiện của vector biểu hiện. Tế bào vật chủ này có thể là tế bào nhân nguyên thủy như *E. coli*, hoặc tế bào có nhân điển hình như tế bào nấm men, côn trùng, động vật lưỡng cư, giun hoặc động vật có vú như tế bào CHO, Hela, HEK-293, và các tế bào tương tự, ví dụ tế bào được nuôi cấy, mảnh cấy, và tế bào *in vivo*.

Hợp chất

Như được bàn luận trên đây, có nhiều vùng khác nhau trên thụ thể T1R. Mỗi thụ thể T1R1, T1R2, và T1R3 chứa vùng ngoại bào đầu tận cùng N (còn gọi là vùng Venus flytrap); vùng xuyên màng bao gồm bảy vùng xuyên màng, và tế bào chất

tương ứng, và vùng quai ngoại bào; vùng giàu xystein, và vùng đầu tận cùng C. Mỗi vùng xác định một tập hợp các hợp chất cụ thể gắn kết đặc hiệu với vùng đó.

Ở người, vùng ngoại bào đầu tận cùng N bao gồm các axit amin từ 1 đến 560 của hT1R2 và các axit amin từ 1 đến 563 của hT1R3. Ở chuột, vùng ngoại bào đầu tận cùng N chứa các axit amin từ 1 đến 564 của rT1R2, và các axit amin từ 1 đến 568 của rT1R3.

Ở người, vùng xuyên màng và vùng nội bào đầu tận cùng C chứa các axit amin từ 561 đến 839 của hT1R2, và các axit amin từ 564 đến 852 của hT1R3. Ở chuột, vùng xuyên màng và vùng nội bào đầu tận cùng C chứa các axit amin từ 565 đến 842 của rT1R2, và các axit amin từ 569 đến 858 của rTIR3.

Thụ thể glutamat hỗ biến trao đổi chất (mGluR) là một lớp khác của các thụ thể gắn kết với protein G lớp C có đáp ứng với glutamat. Các thụ thể này chủ yếu được phát hiện trong mô não và thần kinh, nơi chúng có vai trò trong quá trình truyền tín hiệu thần kinh. Vùng ngoại bào đầu tận cùng N của mGluR có thể gắn kết đồng hoá trị với T1R để tạo ra các thụ thể thể khảm. Thụ thể mGluR có thể là thụ thể bất kỳ trong số các thụ thể, ví dụ, từ mGluR1 đến mGluR8. Các phối tử khác nhau gắn kết với các vùng khác nhau trên các cấu trúc dưới phân tử khác nhau của các thụ thể vị umami lẫn thụ thể vị ngọt. Ví dụ, aspartam và neotam gắn kết với vùng ngoại bào đầu tận cùng N của T1R2, trong lúc đó xyclamat, neohesperidin dihydrochalcon (NHDC), và lactisol gắn kết với vùng xuyên màng của T1R3. Do T1R3 là một trong số hai cấu trúc dưới phân tử của thụ thể vị umami T1R1/T1R3, nên xyclamat, NHDC và lactisol cũng có thể tương tác với T1R3 trong thụ thể vị umami T1R1/T1R3. Xyclamat và NHDC làm tăng hoạt tính của thụ thể vị umami, trong lúc đó lactisol ức chế thụ thể vị umami.

Các hợp chất gắn kết đặc hiệu theo sáng chế do chúng liên quan đến chất tạo vị umami bao gồm các hợp chất amit. Các hợp chất amit cũng bao gồm một số phân

nhóm của dẫn xuất amit hoặc các lớp dẫn xuất liên quan đến amit, ví dụ như ure, uretan, oxalamit, acrylamit, và các chất tương tự.

Các phân tử tương tác với vùng xuyên màng của T1R2, ví dụ, có thể là chất điều chỉnh vị ngọt, và các phân tử tương tác với vùng xuyên màng của T1R3 có thể là chất điều chỉnh vị ngọt và/hoặc vị umami.

T1R2/T1R3 của người nhận biết nhóm các chất tạo vị ngọt mà không được nhận biết bởi T1R2/T1R3 chuột, và T1R2/T1R3 của người chứ không phải T1R2/T1R3 của chuột bị ức chế bởi lactisol. Khi vùng ngoại bào của T1R2 của người được thay thế bởi vùng ngoại bào của T1R2 của chuột, thì thụ thể của người bị mất khả năng nhận biết aspartam, cho thấy rằng phần này của T1R2 của người cần phải gắn kết với aspartam. Ngược lại, khi vùng ngoại bào của T1R2 của chuột được thay thế bằng vùng ngoại bào của T1R2 của người, thì thụ thể này ở chuột lại có khả năng nhận biết aspartam, cho thấy rằng phần này của T1R2 của người là đủ để gắn kết aspartam. Với cùng một nguyên lý, vùng xuyên màng của T1R3 của người là cần và đủ để

Bảng 6 thể hiện các chữ viết tắt được sử dụng để thể hiện các thụ thể thể khảm khác nhau ở người và chuột và các cấu trúc dưới phân tử thụ thể.

Bảng 6

hT1R2 - T1R2 của người
hT1R3 - T1R3 của người
rT1R2 - T1R2 của chuột
rT1R3 - T1R3 của chuột
hT1R2/rT1R3 - thụ thể bao gồm T1R2 của người và T1R3 của chuột
rT1R2/hT1R3 - thụ thể bao gồm T1R2 của chuột và T1R3 của người
hT1R2/h3-r3 - thụ thể bao gồm T1R2 của người và T1R3 thể khảm với vùng ngoại bào đầu tận cùng N ở người và vùng xuyên màng và đầu tận cùng C ở chuột

rT1R2/r3-h3 - thụ thể bao gồm T1R2 của chuột và T1R3 thể khảm với vùng ngoại bào đầu tận cùng N ở chuột và vùng xuyên màng và đầu tận cùng C ở người
h2-r2/rT1R3 - thụ thể bao gồm T1R2 thể khảm với vùng xuyên màng đầu tận cùng N ở người và vùng xuyên màng và đầu tận cùng C ở chuột và T1R3 của chuột
r2-h2/rT1R3 - thụ thể bao gồm T1R2 thể khảm với vùng ngoại bào đầu tận cùng N ở chuột và vùng xuyên màng và đầu tận cùng C ở người và T1R3 của chuột
h2-h1/hT1R3 - thụ thể bao gồm T1R khảm với vùng ngoại bào đầu tận cùng N của T1R2 của người và vùng xuyên màng và đầu tận cùng C của T1R1 người và T1R3 của người
h1-h2/hT1R3 - thụ thể bao gồm T1R khảm với vùng ngoại bào đầu tận cùng N của T1R1 người và vùng xuyên màng và đầu tận cùng C của T1R2 của người và T1R3 của người
h2-mGluR1/h3-mGluR1 - thụ thể bao gồm vùng ngoại bào đầu tận cùng N thu được từ hT1R2 gắn kết đồng hoá trị với vùng xuyên màng và đầu tận cùng C của mGluR1 và, vùng ngoại bào đầu tận cùng N thu được từ hT1R3 gắn kết đồng hoá trị với vùng xuyên màng và đầu tận cùng C của mGluR1
h1-mGluR1/h3-mGluR1 - thụ thể bao gồm vùng ngoại bào đầu tận cùng N thu được từ hT1R1 gắn kết đồng hoá trị với vùng xuyên màng và đầu tận cùng C của mGluR1 và vùng ngoại bào đầu tận cùng N thu được từ hT1R3 gắn kết đồng hoá trị với vùng xuyên màng và đầu tận cùng C của mGluR1
mGluR1-h2/mGluR1-h3 - thụ thể bao gồm vùng ngoại bào đầu tận cùng N thu được từ mGluR1 gắn kết đồng hoá trị với vùng xuyên màng và đầu tận cùng C của hT1R2 và vùng ngoại bào đầu tận cùng N thu được từ mGluR1 gắn kết đồng hoá trị với vùng xuyên màng và đầu tận cùng C của hT1R3
mGluR1-h1/mGluR1-h3 - thụ thể bao gồm vùng ngoại bào đầu tận cùng N thu được từ mGluR1 gắn kết đồng hoá trị với vùng xuyên màng và đầu tận cùng C của hT1R1 và vùng ngoại bào đầu tận cùng N thu được từ mGluR1 gắn kết đồng hoá trị với vùng xuyên màng và đầu tận cùng C của hT1R3

Được bộc lộ ở đây là các hợp chất không có trong tự nhiên, gắn kết đặc hiệu với thụ thể T1R2/T1R3 bao gồm hT1R2/hT1R3 nhưng không bao gồm rT1R2/rT1R3. Ví dụ về các hợp chất này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, neotam, aspartam, xyclamat, lactisol, Hợp chất 883360, Hợp chất 6542888, Hợp chất 403249, Hợp chất 6364395, axit dihydroxybenzoic (DHB), Hợp chất 6542888, và neohesperidin dihydrochalcon (NHDC) Các ví dụ bổ sung được tìm thấy trong các Bảng từ 1 đến 4. Các hợp chất hữu cơ không peptit có thể là một khối hình hộp có kích thước 15x8x8Å, tốt hơn là có kích thước 12x5x5Å.

Cũng được bộc lộ là hợp chất gắn kết đặc hiệu với thụ thể T1R2/T1R3 bao gồm hT1R2/rT1R3 nhưng không bao gồm rT1R2/hT1R3. Ví dụ về các hợp chất này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, aspartam, và neotam. Các ví dụ bổ sung có thể được tìm thấy trong Bảng 5.

Cũng được mô tả là các hợp chất gắn kết đặc hiệu với vùng ngoại bào đầu tận cùng N của T1R2 trong thụ thể hT1R2/hT1R3. Ví dụ về các hợp chất này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, neotam, đường aspartam hydrat cacbon (ví dụ, sucroza, fructoza, glucoza, tagatoza, erythritol, sorbitol, maltoza, xylitol, lactoza và galactoza, cũng như tất cả các đường hydrat cacbon khác). Các ví dụ bổ sung được tìm thấy trong Bảng 5.

Cũng được mô tả là các hợp chất gắn kết đặc hiệu với vùng Venus Flytrap (VFD - Venus Flytrap Domain) của T1R2 trong thụ thể hT1R2/hT1R3 và hT1R2/rT1R3.

Cũng được mô tả là hợp chất gắn kết đặc hiệu với vùng Venus flytrap đầu tận cùng N của cấu trúc dưới phân tử T1R2 trong thụ thể T1R2/T1R3. Cụ thể hơn, cũng được mô tả là hợp chất gắn kết đặc hiệu với gốc axit amin 144 và 302 của vùng Venus flytrap đầu tận cùng N ở người của cấu trúc dưới phân tử T1R2 trong thụ thể T1R2/T1R3. Ví dụ về các hợp chất này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở,

aspartam, neotam, hydrat cacbon, và axit amin ngọt, như D-Trp, Ala, và Gly.

Cũng được mô tả là các hợp chất gắn kết đặc hiệu với vùng giàu xystein của T1R2 trong thụ thể hT1R2/hT1R3. Cũng được mô tả là các hợp chất gắn kết đặc hiệu với vùng xuyên màng (TM – Transmembrane Domain) của T1R2 trong thụ thể hT1R2/hT1R3.

Cũng được mô tả là các hợp chất gắn kết đặc hiệu với thụ thể T1R2/T1R3 chứa rT1R2/hT1R3 nhưng không chứa hT1R2/rT1R3. Ví dụ về các hợp chất này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, xyclamat, NHDC, lactisol, Hợp chất 883360, Hợp chất 403249, và Hợp chất 6364395. Các ví dụ bổ sung được tìm thấy trong Bảng 5.

Cũng được mô tả là các hợp chất gắn kết đặc hiệu với hT1R2/hT1R3 và rT1R2/r3-h3 nhưng không gắn kết với rT1R2/rT1R3 hoặc với hT1R2/h3-r3. Ví dụ về các hợp chất này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, xyclamat, NHDC, lactisol, Hợp chất 883360, Hợp chất 403249 và Hợp chất 6364395.

Cũng được mô tả là các hợp chất gắn kết đặc hiệu với quai ngoại bào 2 và quai ngoại bào 3 của vùng đầu tận cùng C ở người trong cấu trúc dưới phân tử T1R3 của thụ thể T1R2/T1R3. Cũng được mô tả là hợp chất gắn kết đặc hiệu với hT1R2/hT1R3 và r2-h2/rT1R3 nhưng không gắn kết với rT1R2/rT1R3 hoặc với h2-r2/hT1R3.

Cũng được mô tả là các hợp chất gắn kết đặc hiệu với vùng ngoại bào đầu tận cùng N ở người của cấu trúc dưới phân tử T1R3 trong thụ thể T1R2/T1R3. Cũng được mô tả là các hợp chất gắn kết đặc hiệu với vùng Venus Flytrap của T1R3 trong thụ thể hT1R2/hT1R3. Ví dụ về các hợp chất này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, aspartam, neotam, hydrat cacbon, và axit amin ngọt, như D-Trp, Ala, và Gly.

Cũng được mô tả là các hợp chất gắn kết đặc hiệu với vùng xuyên màng của T1R3 trong thụ thể hT1R2/hT1R3. Cũng được mô tả là các hợp chất gắn kết đặc hiệu với quai ngoại bào 2 và quai ngoại bào 3 của vùng xuyên màng ở người của cấu trúc dưới phân tử T1R3 của T1R2/T1R3. Ví dụ về các hợp chất này bao gồm, nhưng

không chỉ giới hạn ở, xyclamat.

Hợp chất theo sáng chế không bao gồm sucroza, fructoza, glucoza, erythritol, isomalt, lactitol, manitol, sorbitol, xylitol, một số terpenoit tự nhiên đã biết, flavonoit, hoặc chất protein có vị ngọt, di-peptit, tri-peptit, aspartam, sacarin, sucraloza, sacarit được halogen hoá, axesulfam-K, xyclamat, sucraloza, và alitam, neotam, perilartin, SC-45647, SC-40014, monelin, NC-002740-01, thaumatin, CC-00100, NC-00420, alitam, SC-44102, dulxin, NC-00576, axit slyxyrhizic, steviosit, Na-sacarin, D-tryptophan, xyclamat, DHB, axit glycolic, glyxin, D (-) fructoza, homofuronol, D (-) tagatoza, maltoza, D (+) glucoza, D-sorbitol, D (+) galactoza, α -lactoza, L () fructoza, L (+) Hợp chất 403249, và glucoza.

Tuỳ ý, hợp chất theo sáng chế cũng không phải là Hợp chất 6364395.

Cũng được bộc lộ ở đây là các hợp chất gắn kết với vùng bị cắt ngắn của vùng T1R. Ví dụ, được mô tả là các hợp chất gắn kết đặc hiệu với vùng TM của T1R2 trong thụ thể vị ngọt bị cắt ngắn chứa h2TM/h3TM, hợp chất gắn kết đặc hiệu với vùng TM của T1R3 trong thụ thể vị ngọt bị cắt ngắn chứa h2TM/h3TM, hợp chất gắn kết đặc hiệu với vùng TM của T1R2 trong thụ thể thể khảm chứa mGluR-h2/mGluR-h3, hợp chất gắn kết đặc hiệu với vùng TM của T1R3 trong thụ thể thể khảm chứa mGluR-h2/mGluR-h3, hợp chất gắn kết với vùng TM của T1R1 trong thụ thể vị savory bị cắt ngắn chứa h1TM/h3TM, hợp chất gắn kết với vùng TM của T1R3 trong thụ thể vị ngọt bị cắt ngắn chứa h1TM/h3TM, các hợp chất gắn kết với vùng TM của T1R1 trong thụ thể thể khảm chứa mGluR-h1/mGluR-h3, và các hợp chất gắn kết với vùng TM của T1R3 trong thụ thể thể khảm chứa mGluR-h1/mGluR-h3. SEQ ID NOS: 29-33 hiển các thụ thể bị cắt ngắn.

Các hợp chất theo sáng chế không bao gồm mononatri glutamat ("MSG"), inosin monophosphat (IMP) hoặc guanosin monophosphat (GMP), sucroza, fructoza, glucoza, erythritol, isomalt, lactitol, manitol, sorbitol, xylitol, một số terpenoit tự

nhiên đã biết, flavonoit, hoặc chất protein có vị ngọt, di-peptit, tri-peptit, aspartam, sacarin, sucraloza, sacarit được halogen hoá, axesulfam-K, xyclamat, sucraloza, alitam, mononatri glutamat ("MSG"), inosin monophosphat (IMP) hoặc guanosin monophosphat (GMP), hoặc adenosin monophosphat (AMP).

Hợp chất 403249 là (5-(4H-benzo[d][1,3]oxathiin-2-yl)-2-methoxyphenol, trong lúc đó Hợp chất 6364395 là 3-(3-hydroxy-4-metoxyphenetyl) benzo[d]isoxazol- 4,6-diol.

Các hợp chất được mô tả trên đây có thể thể hiện sự gia tăng phụ thuộc hợp chất cường độ phát huỳnh quang với hoạt tính bằng ít nhất là 25% so với hoạt tính tối đa của fructoza trong thử nghiệm trên cơ sở phát huỳnh quang có sử dụng thiết bị FLIPR (Fluorometric Intensity Plate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Ví dụ về phương pháp này, xem các Ví dụ 12 và 18. Các hợp chất này cũng có thể thể hiện sự giảm phụ thuộc hợp chất giá trị EC_{50} đối với một chất tạo vị ngọt ít nhất 2 lần trong thử nghiệm trên cơ sở phát huỳnh quang có sử dụng thiết bị FLIPR (Molecular Devices). Hơn nữa, trong thử nghiệm trên cơ sở tế bào, hợp chất có thể tạo ra 10 trong số 100 tế bào được chuyển nhiễm bằng thụ thể kiểu hoang hoặc thụ thể thể khảm thể hiện sự gia tăng phụ thuộc hợp chất cường độ phát huỳnh quang. Một ví dụ về thử nghiệm trên cơ sở tế bào có thể được tìm thấy trong Ví dụ 24. Hợp chất này cũng có thể thể hiện sự gia tăng phụ thuộc chất ít nhất là 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2 lần hoặc lớn hơn hoặc con số bất kỳ giữa số tế bào phát huỳnh quang đáp ứng với mức dưới tối đa của chất tạo vị ngọt. Đáp ứng này có thể được đo bằng cường độ phát huỳnh quang, mức canxi, nồng độ IP3, nồng độ cAMP, mức gắn kết GTP γ S, hoặc hoạt tính của gen thông báo (ví dụ, luxiferaza, beta-galactosidaza).

Hơn nữa, các hợp chất được bộc lộ ở đây có thể có một hoặc nhiều các đặc tính sau đây trong tế bào: làm EC_{50} giảm ít nhất khoảng 50% so với hợp chất đối chứng, làm mức Ca^{2+} nội bào tăng ít nhất khoảng 25%, làm mức cAMP nội bào tăng lên ít

nhất khoảng 25%, làm mức GMP vòng nội bào tăng ít nhất khoảng 25%, làm IP3 nội bào tăng ít nhất khoảng 25%, hoặc làm mức gắn kết protein G của GTP γ S tăng ít nhất khoảng 25%.

Phương pháp sử dụng hợp chất

Cũng được mô tả là các phương pháp điều chỉnh vị savory của sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm chữa bệnh bao gồm việc tạo ra ít nhất một sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm chữa bệnh, hoặc tiền chất của chúng, và kết hợp sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc hoặc tiền chất của chúng với ít nhất một lượng có tác dụng điều chỉnh vị savory của ít nhất một chất không có trong tự nhiên như được mô tả ở đây, hoặc muối ăn được của nó, sao cho tạo ra một sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc cải biến, nhờ đó điều chỉnh vị savory của sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc.

Cũng được mô tả là các phương pháp ức chế vị savory của sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc bao gồm việc tạo ra ít nhất một sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc, hoặc tiền chất của nó, và kết hợp sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc hoặc tiền chất của nó với ít nhất một lượng có tác dụng ức chế mùi vị savory của ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên như được bộc lộ ở đây, hoặc muối ăn được của nó, để tạo thành sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc cải biến; nhờ ức chế vị savory của sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc.

Cũng được mô tả là các phương pháp làm tăng vị savory của sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc bao gồm các bước: tạo ra ít nhất một sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc, hoặc tiền chất của nó, và kết hợp sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc hoặc tiền chất của nó với ít nhất một lượng có tác dụng làm tăng mùi vị savory của ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên như được bộc lộ ở đây, hoặc muối ăn được của nó, để tạo thành sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc cải biến; nhờ đó làm tăng vị savory của sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc.

Cũng được mô tả là các phương pháp điều chỉnh vị ngọt của sản phẩm ăn được

hoặc sản phẩm thuốc bao gồm các bước: tạo ra ít nhất một sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc, hoặc tiền chất của nó, và kết hợp sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc hoặc tiền chất của nó với ít nhất một lượng có tác dụng điều biến mùi vị ngọt của ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên như được bộc lộ ở đây, hoặc muối ăn được của nó, để tạo thành sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc cải biến; nhờ đó điều chỉnh vị ngọt của sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc.

Cũng được mô tả là các phương pháp ức chế vị ngọt của sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc bao gồm các bước: tạo ra ít nhất một sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc, hoặc tiền chất của nó, và kết hợp sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc hoặc tiền chất của nó với ít nhất một lượng có tác dụng ức chế mùi vị ngọt của ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên như được bộc lộ ở đây, hoặc muối ăn được của nó, để tạo thành sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc cải biến; nhờ đó ức chế vị ngọt của sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc.

Cũng được mô tả là các phương pháp làm tăng vị ngọt của sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc bao gồm việc tạo ra ít nhất một sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc hoặc tiền chất của nó, và kết hợp sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc hoặc tiền chất của nó với ít nhất một lượng có tác dụng làm tăng mùi vị ngọt của ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên như được bộc lộ ở đây, hoặc muối ăn được của nó, để tạo thành sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc cải biến; nhờ đó làm tăng vị ngọt của sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc.

Cũng được mô tả là phương pháp làm tăng sự cảm nhận vị umami bao gồm việc cho thụ thể vị umami tiếp xúc với xyclamat và NHDC, và các dẫn xuất của nó, cũng như phương pháp làm tăng sự cảm nhận vị umami bao gồm việc cho thụ thể vị umami tiếp xúc với dẫn xuất lactisol. Cũng được mô tả là phương pháp làm tăng sự cảm nhận vị ngọt bao gồm việc cho thụ thể vị ngọt tiếp xúc với xyclamat và NHDC, và dẫn xuất của chúng. Cũng được mô tả là phương pháp làm tăng sự cảm nhận vị

ngọt bao gồm việc cho thụ thể vị ngọt tiếp xúc với dẫn xuất lactisol.

Phân lập và biểu hiện polypeptit T1R

Việc phân lập và biểu hiện T1R, hoặc các đoạn hoặc biến thể của nó, được bộc lộ ở đây có thể được thực hiện như được mô tả dưới đây. Đoạn môi PCR có thể được sử dụng để khuếch đại axit nucleic mã hóa vùng gắn kết phối tử thụ thể vị giác, và thư viện các axit nucleic này có thể được tùy ý tạo ra. Sau đó, vectơ biểu hiện riêng lẻ hoặc thư viện các vectơ biểu hiện có thể được sử dụng để làm nhiễm hoặc chuyển nhiễm tế bào vật chủ đối với biểu hiện chức năng của axit nucleic hoặc thư viện này. Các gen và vectơ này có thể được tạo ra và được biểu hiện *in vitro* hoặc *in vivo*. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rằng, kiểu hình mong muốn để thay đổi và kiểm soát sự biểu hiện của axit nucleic có thể đạt được bằng cách điều biến sự biểu hiện hoặc hoạt tính của gen và axit nucleic (ví dụ, yếu tố khởi đầu, yếu tố tăng cường và yếu tố tương tự khác) trong các vectơ được bộc lộ ở đây. Phương pháp đã biết bất kỳ được mô tả để làm tăng hoặc làm giảm sự biểu hiện hoặc hoạt tính có thể được sử dụng. Sáng chế có thể được thực hiện kết hợp với phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, chúng được mô tả kỹ trong tài liệu chuyên ngành khoa học và patent.

Trình tự axit nucleic được bộc lộ ở đây và axit nucleic khác được sử dụng để thực hiện sáng chế, trong đó, ARN, ADN bổ trợ, ADN hệ gen, vectơ, virus hoặc thể lai của nó, có thể được phân lập từ các nguồn, được thao tác di truyền, được khuếch đại, và/hoặc được biểu hiện tái tổ hợp. Hệ biểu hiện tái tổ hợp bất kỳ có thể được sử dụng, bao gồm, ví dụ vi khuẩn, nấm men, côn trùng hoặc hệ thực vật, ngoài tế bào của động vật có vú.

Theo cách khác, axit nucleic này có thể được tổng hợp *in vitro* bằng các kỹ thuật tổng hợp hóa học đã biết, như được mô tả trong tài liệu, ví dụ, Carruthers, *Cold Spring Harbor Symp. 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); Patent Mỹ Số 4,458,066. Tiếp đó, các đoạn ADN sợi kép có thể thu được bằng cách tổng hợp thanh nhiễm sắc bổ trợ và gắn các thanh nhiễm sắc với nhau trong các điều kiện thích hợp, hoặc bằng cách thêm thanh nhiễm sắc bổ trợ bằng cách sử dụng ADN polymeraza có trình tự đoạn môi thích hợp.

Kỹ thuật để thao tác axit nucleic, ví dụ, để tạo ra sự đột biến về trình tự, tách dòng phụ, đoạn dò đánh dấu, xác định trình tự, lai và các quá trình tương tự khác là đã biết trong tài liệu chuyên ngành khoa học và patent. Ví dụ, xem tài liệu Sambrook, ed., *Molecular Cloning: a Laboratory manual* (2nd ed.), 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*, Part I, *Theory and Nucleic acid preparation*, Tijssen, ed. Elsevier, N. Y. (1993).

Axit nucleic, vectơ, capsit, polypeptit và các loại tương tự khác có thể được phân tích và định lượng bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp chung mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết. Các phương pháp này bao gồm, ví dụ phương pháp sinh hóa phân tích như NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*: phổ cộng hưởng từ hạt nhân), phép phổ quang kế, phép chụp ảnh bằng tia X, phép điện di, phép điện di mao dẫn, phép sắc ký lỏng tính năng cao (*High Performance Liquid Chromatography*: HPLC), phép sắc ký lớp mỏng (*Thin Layer Chromatography*: TLC), và sắc ký siêu khuếch tán, các phương pháp miễn dịch khác nhau, ví dụ phản ứng lắng cặn lỏng hoặc gel, khuếch tán miễn dịch, phép điện di miễn dịch, thử nghiệm phóng xạ miễn dịch (*Radioimmunoassay*: RIA), thử nghiệm hấp thụ miễn

dịch chuỗi enzym (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA*), thử nghiệm miễn dịch-phát huỳnh quang, phân tích Southern, phân tích Northern, phân tích thấm điểm (dot-blot), phép điện di gel (ví dụ SDS-PAGE), RT-PCR, PCR định lượng, phương pháp khuếch đại axit nucleic hoặc đích hoặc tín hiệu khác, đánh dấu phóng xạ, đếm nhấp nháy, và sắc ký ái lực.

Đoạn môi oligonucleotit có thể được sử dụng để khuếch đại đoạn axit nucleic mã hóa vùng gắn kết phối tử thụ thể vị giác. Axit nucleic được mô tả ở đây còn có thể được tách dòng hoặc được xác định một cách định lượng bằng cách sử dụng kỹ thuật khuếch đại. Phương pháp khuếch đại là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và bao gồm, ví dụ phản ứng chuỗi polymeraza, PCR (*PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*, ed. Innis. Academic Press, N. Y. (1990) và *PCR Strategies*, ed. Innis, Academic Press, Inc., N. Y. (1995), phản ứng chuỗi ligaza (LCR) (ví dụ xem tài liệu Wu, *Genomics* 4:560 (1989); Landegren, *Science* 241:1077, (1988); Banger, *Gene* 89:117 (1990)); khuếch đại phiên mã (ví dụ, xem tài liệu Kwoh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1173 (1989)); và, sao chép trình tự tự duy trì (ví dụ, xem tài liệu Guatelli, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874 (1990)); khuếch đại Q Beta replicaza (ví dụ, xem tài liệu Smith, *J. Clin. Microbiol.* 35: 1477-1491 (1997)); thử nghiệm khuếch đại Q-beta replicaza tự động (ví dụ, xem tài liệu Burg, *Mol. Cell. Probes* 10: 257-271 (1996)) và kỹ thuật qua trung gian ARN polymeraza khác (ví dụ, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario); cũng xem tài liệu Berger, *Methods Enzymol.* 152:307-316 (1987); Sambrook; Ausubel; Patent Mỹ số 4,683,195 và 4,683,202; Sooknanan, *Biotechnology* 13: 563-564 (1995). Đoạn môi có thể được chỉ định để giữ lại trình tự gốc của thụ thể màng 7 “cho”. Theo cách khác, đoạn môi có thể mã hóa gốc axit amin, gốc này là sự thay thế bảo toàn (ví dụ, kỵ nước đối với gốc kỵ nước, xem phần thảo luận ở trên) hoặc sự thay thế lành tính về chức năng (ví dụ, không ngăn chặn sự xuyên màng huyết tương, do sự phân cắt bởi peptidaza, do sự gấp nếp di

thường của thụ thể, và loại tương tự khác). Ngay khi khuếch đại, axit nucleic, riêng biệt hoặc dưới dạng thư viện, có thể được tách dòng theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, nếu cần, thành vectơ bất kỳ sử dụng phương pháp sinh học phân tử thông thường; phương pháp tách dòng axit nucleic đã khuếch đại *in vitro* được mô tả, ví dụ, trong Patent Mỹ số 5,426,039.

Cặp đoạn môi có thể được chỉ định để khuếch đại chọn lọc vùng gắn kết phối tử của các thành phần họ T1R. Vùng này có thể thay đổi theo phối tử hoặc vị khác nhau. Do đó, cái gì có thể là vùng gắn kết tối thiểu cho một vị, nó cũng có thể giới hạn cho vị thứ hai. Do đó, vùng gắn kết phối tử của các cơ khác nhau bao gồm các cấu trúc vùng ngoại bào khác nhau có thể được khuếch đại.

Mô hình được thiết kế để làm thoái biến cặp đoạn môi là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, chương trình máy tính chiến lược Liên ứng-Thoái biến đoạn môi oligonucleotit lai (*COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotit Primer: CODEHOP*) là có ở trang web: <http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>, và được liên kết trực tiếp từ vị trí liên kết đa trình tự BlockMaker đối với dự đoán đoạn môi lai bắt đầu bằng bộ trình tự protein có liên quan, là vùng gắn kết phối tử thụ thể vị giác đã biết (ví dụ, xem tài liệu Rose, *NucleicAcids Res.* 26: 1628-1635 (1998); Singh, *Biotechniques* 24:318-319 (1998)).

Phương pháp để tổng hợp cặp đoạn môi oligonucleotit là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Cặp bazơ “trung tính” hoặc cặp bazơ tổng hợp có thể được sử dụng. Ví dụ, việc sử dụng nucleobazơ nhân tạo đưa ra cách tiếp cận linh hoạt để thực hiện trình tự đoạn môi và tạo ra hỗn hợp phức tạp hơn của các sản phẩm khuếch đại. Nhiều họ nucleobazơ nhân tạo khác nhau là có khả năng mang nhiều định hướng liên kết hydro nhờ việc quay liên kết bên trong để tạo ra phương pháp làm thoái biến sự nhận dạng phân tử. Việc đưa các chất tương tự này vào vị trí duy nhất của đoạn môi PCR cho phép tạo ra thư viện phức tạp của các sản phẩm khuếch đại. Ví dụ, xem tài liệu Hoops,

Nucleic Acids Res. 25:4866-4871 (1997). Phân tử không phân cực còn có thể được sử dụng để bắt chước hình dạng của bazơ ADN tự nhiên. Sự bắt chước hình dạng liên kết không phải hydro đối với adenin có thể sao chép một cách hữu hiệu và chọn lọc với sự bắt chước hình dạng không phân cực đối với thymine (ví dụ, xem tài liệu Morales, *Nat. Struct. Biol.* 5: 950-954 (1998)). Ví dụ, hai bazơ thoái biến có thể là bazơ pyrimidin 6H,8H-3,4-dihydropyrimido[4,5-c][1,2]oxazin-7-on hoặc bazơ purin N6-metoxi-2,6-diaminopurin (ví dụ, xem tài liệu Hill, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4258-4263 (1998)). Đoạn môi thoái biến tiêu biểu kết hợp chất tương tự nucleobazơ 5'-dimetoxitrityl-N-benzoyl-2'-deoxy-xytidin,3'-[(2-xyanoetyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidit (thuật ngữ "P" trong trình tự, xem ở trên). Chất tương tự pyrimidin này liên kết hydro với purin, bao gồm cả gốc A và gốc G.

Biến thể đa hình, alen, và thể tương đồng khác loài mà gần giống với thụ thể vị giác được bộc lộ ở đây có thể được phân lập bằng cách sử dụng đoạn dò axit nucleic được mô tả ở trên. Theo cách khác, thư viện biểu hiện có thể được sử dụng để tách dòng polypeptit T1R và biến thể đa hình, alen, và thể tương đồng khác loài của nó, bằng cách phát hiện thể tương đồng được biểu hiện về mặt miễn dịch với các kháng thể kháng huyết thanh hoặc các kháng thể được tinh chế được tạo ra để kháng lại polypeptit T1R, chúng còn xác định và liên kết chọn lọc với thể tương đồng T1R.

Axit nucleic mã hóa vùng gắn kết phối tử của thụ thể vị giác có thể được tạo ra bằng cách khuếch đại (ví dụ, PCR) trình tự axit nucleic thích hợp sử dụng cặp đoạn môi thoái hóa. Axit nucleic khuếch đại có thể là ADN hệ gen từ tế bào hoặc mô bất kỳ hoặc ARN thông tin hoặc ADN bổ trợ có nguồn gốc từ các tế bào biểu hiện thụ thể vị giác.

Theo một phương án, trình tự mã hóa protein lai bao gồm các axit nucleic mã hóa T1R dung hợp với trình tự chuyển đoạn có thể được tạo ra. Sáng chế còn đề xuất T1R lai bao gồm motif chuyển đoạn và vùng gắn kết với chất tạo vị của họ thụ thể

nhạy cảm hóa học khác, đặc biệt là thụ thể vị giác. Trình tự axit nucleic này có thể được liên kết mở với yếu tố kiểm soát phiên mã hoặc kiểm soát dịch mã, ví dụ trình tự, yếu tố khởi đầu và yếu tố tăng cường bắt đầu phiên mã và dịch mã, gen kết thúc phiên mã và dịch mã, trình tự polyadenyl hóa và các trình tự khác được sử dụng để phiên mã ADN thành ARN. Trong tổ hợp gồm cat xet, vectơ và vật truyền gen biểu hiện tái tổ hợp, đoạn yếu tố khởi đầu tận cùng Có thể được sử dụng để hướng biểu hiện của axit nucleic mong muốn trong tất cả các tế bào hoặc mô mong muốn.

Theo phương án khác, protein dung hợp có thể bao gồm trình tự chuyển đoạn đầu tận cùng C hoặc đầu tận cùng N. Ngoài ra, protein dung hợp có thể bao gồm các yếu tố bổ sung, ví dụ để phát hiện, tinh chế protein hoặc ứng dụng khác. Vùng tạo thuận lợi cho việc phát hiện và tinh chế bao gồm, ví dụ, peptit cation hóa kim loại như dải polyhistidin, modul histidin-tryptophan hoặc các vùng khác mà cho phép tinh chế trên kim loại cố định; protein gắn kết maltoza, vùng protein A mà cho phép tinh chế trên globulin miễn dịch cố định; hoặc vùng được sử dụng trong hệ tinh chế mở rộng/ái lực FLAGS (Immune Corp., Seattle, WA).

Thể vùi của trình tự liên kết phân cắt được như yếu tố Xa (ví dụ, xem tài liệu Ottavi, *Biochimie* 80: 289-293 (1998)), motif nhận biết subtilisin proteaza (ví dụ, xem tài liệu Polyak, *Protein Eng.* 10:615-619 (1997)); enterokinaza (Invitrogen, San Diego, CA), và các loại tương tự khác, giữa vùng chuyển đoạn (đối với sự biểu hiện màng huyết tương hiệu lực) và phần còn lại của polypeptit mới được dịch mã có thể được sử dụng để tạo thuận lợi cho quá trình tinh chế. Ví dụ, một cấu trúc có thể bao gồm polypeptit mã hóa trình tự axit nucleic liên kết với sáu gốc histidin, sau đó là thioredoxin và vị trí phân cắt enterokinaza (ví dụ, xem tài liệu Williams, *Biochemistry* 34: 1787-1797 (1995)), và vùng chuyển đoạn đầu tận cùng C. Gốc histidin tạo thuận lợi cho quá trình phát hiện và tinh chế trong khi đó vị trí phân cắt enterokinaza tạo ra phương pháp tinh chế protein mong muốn từ phần còn lại của

protein liên hợp. Công nghệ gắn liền với vectơ mã hóa protein dung hợp và sử dụng protein dung hợp đã được mô tả kỹ trong tài liệu chuyên ngành khoa học và patent, ví dụ, xem tài liệu Kroll, *DNA Cell. Biol.* 12:441-53 (1993).

Vectơ biểu hiện, dưới dạng vectơ biểu hiện riêng biệt hoặc thư viện các vectơ biểu hiện chứa trình tự mã hóa vùng gắn kết phối tử có thể được đưa vào hệ gen hoặc vào bào chất hoặc nhân của tế bào và được biểu hiện bằng một loạt kỹ thuật thông thường, đã được mô tả trong tài liệu chuyên ngành khoa học và patent. Ví dụ, xem tài liệu Roberts, *Nature* 328:731 (1987); Berger, tên tài liệu như nêu trên; Schneider, *Protein Expr. Purif.* 6:435:10 (1995); Sambrook; Tijssen; Ausubel. Thông tin về sản phẩm của nhà sản xuất chất phản ứng sinh học và thiết bị thử nghiệm cũng đưa ra thông tin về phương pháp sinh học đã biết. Các vectơ có thể được phân lập từ nguồn tự nhiên, có nguồn gốc từ nguồn như ATCC hoặc thư viện GenBank, hoặc được điều chế bằng các phương pháp tổng hợp hoặc tái tổ hợp.

Axit nucleic có thể được biểu hiện bằng cách sử dụng cat xet, vectơ hoặc virus biểu hiện, các loại này được biểu hiện ổn định hoặc tạm thời trong các tế bào (ví dụ, hệ biểu hiện ngoại thể). Gen đánh dấu chọn lọc có thể được đưa vào cat xet và vectơ biểu hiện để đưa ra kiểu hình thích hợp trên tế bào hoặc trình tự biến nạp. Ví dụ, gen đánh dấu chọn lọc có thể mã hóa để duy trì ngoại thể và sao chép sao cho việc hợp nhất vào hệ gen vật chủ là không cần thiết. Ví dụ, gen đánh dấu có thể mã hóa tính đề kháng của kháng sinh (ví dụ, cloramphenicol, kanamycin, G418, blastixidin, hygromycin) hoặc tính đề kháng của thuốc diệt cỏ (ví dụ, closulfuron hoặc Basta) để cho phép lựa chọn các tế bào biến nạp bằng trình tự ADN mong muốn này (ví dụ, xem tài liệu Blondelet-Rouault, *Gene* 190: 315-317 (1997); Aubrecht, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281:992-997 (1997)). Do gen đánh dấu có thể chọn lọc có được tính đề kháng với cơ chất giống neomycin hoặc hygromycin chỉ có thể được sử dụng trong nuôi cấy mô, nên gen chịu hóa chất cũng được sử dụng làm gen đánh dấu chọn lọc *in*

vitro và *in vivo*.

Trình tự axit nucleic khảm có thể mã hóa vùng gắn kết thụ thể T1R bằng polypeptit xuyên màng 7 lần bất kỳ. Vì polypeptit thụ thể xuyên màng 7 lần có trình tự bậc nhất và cấu trúc bậc hai và bậc ba tương tự, nên vùng cấu trúc (ví dụ, vùng ngoại bào, vùng TM, vùng tế bào chất, v.v..) có thể được xác định dễ dàng bằng cách phân tích trình tự. Ví dụ, với mô hình hóa tính tương đồng, phép phân tích Fourier và việc phát hiện chu kỳ xoắn ốc có thể xác định và mô tả đặc điểm bảy vùng bằng trình tự của thụ thể xuyên màng 7 lần. Thuật toán FFT (*Fast Fourier Transform*) có thể được sử dụng để đánh giá các giai đoạn chiếm ưu thế, giai đoạn này mô tả profin của tính kỵ nước và tính biến thiên của trình tự được phân tích. Sự gia tăng phát hiện tính chu kỳ và mục lục tính chu kỳ xoắn ốc theo alpha có thể được thực hiện như được mô tả trong tài liệu Donnelly, *Protein Sci.* 2:55-70 (1993). Các thuật toán sắp xếp thẳng hàng và mô hình hóa khác là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, xem tài liệu Peitsch, *Receptors Channels* 4:161-164 (1996); Kyte & Doolittle, *J. Med. Bio.*, 157:105-132 (1982); Cronet, *Protein Eng.* 6:59-64 (1993).

Sáng chế còn bao gồm không chỉ ADN và protein có trình tự axit nucleic và axit amin đặc hiệu, mà còn bao gồm cả các đoạn ADN, đặc biệt là các đoạn có, ví dụ, 40, 60, 80, 100, 150, 200, hoặc 250 nucleotit, hoặc nhiều hơn, cũng như mảnh protein có, ví dụ 10, 20, 30, 50, 70, 100, hoặc 150 axit amin, hoặc nhiều hơn. Một cách tùy ý, các đoạn axit nucleic có thể mã hóa polypeptit kháng nguyên, polypeptit này có khả năng gắn kết với kháng thể kháng lại thành viên họ T1R. Ngoài ra, mảnh protein như được bộc lộ ở đây có thể tùy ý là mảnh kháng nguyên, mảnh này có khả năng gắn kết với kháng thể kháng thành viên họ T1R.

Còn được kể đến là protein thể khảm, protein này chứa ít nhất 10, 20, 30, 50, 70, 100, hoặc 150 axit amin, hoặc nhiều hơn, trong số ít nhất một polypeptit T1R được mô tả ở đây, kết hợp với axit amin bổ sung đại diện cho tất cả hoặc một phần

của GPCR khác, tốt hơn là thành phần của họ chung các thụ thể xuyên màng 7 lần. Các thể khảm này có thể được tạo ra từ thụ thể có sẵn và GPCR khác, hoặc chúng có thể được tạo ra bằng cách kết hợp hai hoặc nhiều thụ thể T1R được bộc lộ ở đây. Theo phương án khác, một phần của thể khảm tương ứng với hoặc có nguồn gốc từ vùng ngoại bào của polypeptit T1R theo sáng chế. Theo phương án khác, một phần của thể khảm tương ứng với, hoặc có nguồn gốc từ vùng ngoại bào và một hoặc nhiều vùng xuyên màng của polypeptit T1R được mô tả ở đây, và phần hoặc các phần còn lại có thể tạo thành từ GPCR khác. Thụ thể thể khảm là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và kỹ thuật để tạo ra chúng và lựa chọn và đường biên của vùng hoặc đoạn của thụ thể gắn kết với protein G để đưa vào cũng đã biết. Do đó, kiến thức này của chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng dễ dàng để tạo ra các thụ thể thể khảm này. Việc sử dụng thụ thể thể khảm này có thể tạo ra, ví dụ, điểm đặc trưng về tính chọn lọc vị giác của một trong số các thụ thể được mô tả cụ thể ở đây, kết hợp với đặc tính tải nạp tín hiệu của thụ thể khác, như thụ thể đã biết được sử dụng trong hệ thử nghiệm của các giải pháp kỹ thuật đã biết.

Như nêu trên, các thể khảm này, tương tự với thụ thể T1R tự nhiên, hoặc hỗn hợp hoặc tổ hợp thụ thể T1R tự nhiên sẽ gắn kết với và/hoặc được hoạt hóa bằng các phân tử mà ảnh hưởng bình thường lên vị ngọt hoặc vị umami. Thụ thể T1R khảm chức năng hoặc tổ hợp thụ thể là các phân tử mà khi được biểu hiện một mình hoặc phối hợp với T1R khác hoặc GPCR khác (có thể tự bản thân chúng là khảm) gắn kết với hoặc được hoạt hóa bằng chất kích thích có vị giác, đặc biệt là chất kích thích có vị ngọt (T1R2/3) hoặc chất kích thích có vị umami (T1R1/3). Các phân tử mà tạo ra vị ngọt bao gồm các chất tạo ngọt tự nhiên và nhân tạo như sucroza, aspartam, xylitol, xyclamat, và các loại khác. Các phân tử mà tạo ra vị umami bao gồm glutamat và chất tương tự glutamat và các hợp chất khác gắn kết với T1R1 và/hoặc T1R3 tự nhiên, như 5'-nucleotit.

Ví dụ, vùng như vùng gắn kết phối tử, vùng ngoại bào, vùng xuyên màng, vùng tế bào chất, vùng đầu tận cùng N, vùng đầu tận cùng C, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng, có thể được liên kết đồng hóa trị với protein khác loài. Ví dụ, vùng ngoại bào của T1R có thể được liên kết với vùng xuyên màng của GPCR khác loài, hoặc vùng ngoại bào của GPCR khác loài có thể được liên kết với vùng xuyên màng của T1R. Các protein khác loài khác có thể được sử dụng, ví dụ, protein phát huỳnh quang màu xanh.

Trong phạm vi của sáng chế còn bao gồm tế bào vật chủ để biểu hiện T1R, đoạn, thể khảm hoặc biến thể theo sáng chế. Để đạt được mức biểu hiện cao của gen hoặc axit nucleic tách dòng vô tính, như ADN bổ trợ mã hóa T1R, đoạn hoặc biến thể theo sáng chế, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này thường tách dòng phụ trình tự axit nucleic đang được quan tâm thành vectơ biểu hiện, vectơ này chứa yếu tố khởi đầu mạnh để phiên mã trực tiếp yếu tố kết thúc phiên mã/dịch mã, và nếu đối với axit nucleic mã hóa protein, vị trí gắn kết ribosom để bắt đầu dịch mã. Yếu tố khởi đầu tận cùng C của vi khuẩn thích hợp là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả, ví dụ trong tài liệu của Sambrook và các đồng tác giả. Tuy nhiên, hệ biểu hiện vi khuẩn hoặc hệ có nhân điển hình có thể được sử dụng.

Quy trình đã biết bất kỳ để đưa trình tự nucleotit lạ vào tế bào vật chủ có thể được sử dụng. Quy trình này bao gồm việc sử dụng chuyển nhiễm canxi phosphat, polybren, dung hợp thể nguyên sinh, sự đánh thủng bằng điện, liposom, tiêm tế bào, vectơ huyết tương, vectơ virus và phương pháp đã biết bất kỳ khác để đưa ADN hệ gen, ADN bổ trợ, ADN hệ thống đã được tách dòng hoặc chất di truyền lạ khác vào tế bào vật chủ (ví dụ, xem tài liệu của Sambrook và các đồng tác giả). Chỉ cần thiết là, quy trình thao tác hệ gen cụ thể được sử dụng có khả năng đưa một cách thành công ít nhất một phân tử axit nucleic vào tế bào vật chủ có khả năng biểu hiện T1R, đoạn hoặc biến thể đang được quan tâm.

Sau khi vectơ biểu hiện được đưa vào tế bào, tế bào chuyển nhiễm được nuôi cấy trong các điều kiện có lợi cho sự biểu hiện của thụ thể, đoạn hoặc biến thể đang được quan tâm, tiếp theo nó được thu hồi từ môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng kỹ thuật tiêu chuẩn. Ví dụ về các kỹ thuật này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, xem công bố đơn quốc tế WO 00/06593.

Phát hiện polypeptit T1R

Ngoài việc phát hiện gen T1R và biểu hiện gen bằng cách sử dụng công nghệ lai axit nucleic, còn có thể sử dụng thử nghiệm miễn dịch để phát hiện T1R, ví dụ, để xác định tế bào thụ thể vị giác, và biến thể của thành viên họ T1R. Thử nghiệm miễn dịch có thể được sử dụng để phân tích định lượng hoặc định tính T1R. Khái quát chung về công nghệ có thể được sử dụng này có thể được tìm thấy trong tài liệu Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988).

1. Kháng thể đối với các thành phần họ T1R

Phương pháp tạo ra các kháng thể đa dòng và đơn dòng mà phản ứng đặc hiệu với thành phần họ T1R là đã biết với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, xem tài liệu Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow & Lane, tên tài liệu như nêu trên; Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2d ed. 1986); và Kohler & Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975)). Kỹ thuật này bao gồm việc điều chế kháng thể bằng cách chọn kháng thể từ thư viện kháng thể tái tổ hợp trong vectơ thể thực khuẩn hoặc vectơ tương tự, cũng như điều chế kháng thể đa dòng hoặc đơn dòng từ thỏ hoặc chuột được gây miễn dịch (ví dụ, xem tài liệu Huse et al., *Science*, 246:1275-1281 (1989); Ward et al., *Nature*, 341:544-546 (1989)).

Một số chất sinh miễn dịch chứa T1R có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể phản ứng đặc hiệu với thành phần họ T1R. Ví dụ polypeptit T1R tái tổ hợp, hoặc mảnh kháng nguyên của nó, có thể được phân lập ra như được mô tả ở đây. Vùng kháng nguyên thích hợp bao gồm, ví dụ trình tự liên ứng mà có thể được sử dụng để

xác định thành phần của họ T1R. Protein tái tổ hợp có thể được biểu hiện trong tế bào có nhân chuẩn hoặc tế bào chưa có nhân điển hình như được mô tả ở trên, và được tinh chế như được mô tả chung ở trên. Protein tái tổ hợp là chất sinh miễn dịch được ưu tiên để tạo ra kháng thể đơn dòng hoặc đa dòng. Theo cách khác, peptit tổng hợp có nguồn gốc từ các trình tự được mô tả ở đây và được dung hợp với protein tái có thể được sử dụng làm chất sinh miễn dịch. Protein thường thấy trong tự nhiên còn có thể được sử dụng ở dạng tinh khiết hoặc không tinh khiết. Sau đó, sản phẩm được tiêm vào động vật có khả năng tạo ra kháng thể. Kháng thể đơn dòng hoặc đa dòng có thể được tạo ra, để sử dụng tiếp trong các thử nghiệm miễn dịch để xác định protein.

Phương pháp tạo ra kháng thể đa dòng là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, dòng lai cận thân của chuột (ví dụ, chuột BALB/C) hoặc thỏ được gây miễn dịch bằng protein sử dụng tá được tiêu chuẩn, ví dụ tá được Freund và phương pháp gây miễn dịch tiêu chuẩn. Đáp ứng miễn dịch của động vật với chế phẩm chất sinh miễn dịch được theo dõi bằng cách thực hiện thử nghiệm chảy máu và xác định độ chuẩn của tính phản ứng với T1R. Nếu thu được độ chuẩn của kháng thể với chất sinh miễn dịch là cao một cách thích hợp, máu được thu gom từ động vật và kháng huyết thanh được điều chế. Phân đoạn thêm kháng huyết thanh để làm giàu cho kháng thể phản ứng với protein có thể được thực hiện nếu muốn (xem tài liệu Harlow & Lane, tên tài liệu như nêu trên).

Kháng thể đơn dòng có thể thu được bằng các kỹ thuật khác nhau mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết. Nói ngắn gọn, các tế bào lách từ động vật đã được gây miễn dịch bằng kháng nguyên mong muốn có thể được cố định, thường bằng cách dung hợp với tế bào u tủy (xem tài liệu Kohler & Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6: 511-519 (1976)). Phương pháp khác để làm cố định bao gồm biến đổi bằng virus Epstein Barr, gen gây ung thư, hoặc virus retro, hoặc phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tập đoàn tạo ra từ các tế bào cố định đơn được sàng

lọc để tạo ra kháng thể có độ đặc hiệu và ái lực mong muốn đối với kháng nguyên, và hiệu suất của kháng thể đơn dòng được tạo ra bởi các tế bào này có thể được làm tăng bằng các kỹ thuật khác nhau, bao gồm tiêm vào ổ bụng của vật chủ có xương sống. Theo cách khác, nó có thể phân lập trình tự ADN mà mã hóa kháng thể đơn dòng hoặc đoạn gắn kết của nó bằng cách sàng lọc thư viện ADN từ các tế bào B của người theo phương pháp chung được nêu trong tài liệu Huse et al., *Science*, 246: 1275-1281 (1989).

Kháng thể đơn dòng và kháng huyết thanh đa dòng được thu gom và chuẩn độ kháng lại protein sinh miễn dịch trong thử nghiệm miễn dịch, ví dụ, thử nghiệm miễn dịch pha rắn bằng chất sinh miễn dịch cố định trên chất mang rắn. Thông thường, kháng huyết thanh đa dòng có độ chuẩn là 104 hoặc lớn hơn được chọn và được thử nghiệm về mức độ phản ứng chéo của nó với polypeptit không phải T1R, hoặc thậm chí thành phần họ T1R khác hoặc protein có liên quan khác từ sinh vật khác, sử dụng thử nghiệm miễn dịch gắn kết cạnh tranh. Kháng huyết thanh đa dòng và kháng thể đơn dòng đặc hiệu thường gắn kết với giá trị Kd ít nhất là khoảng 0,1mM, thường ít nhất khoảng 1pM, tùy ý ít nhất khoảng 0,1pM hoặc tốt hơn, và tùy ý 0,01pM hoặc tốt hơn.

Ngay khi kháng thể đặc hiệu đối với thành phần họ T1R là sẵn có, mỗi protein T1R và mảnh protein có thể được phát hiện bằng các phương pháp thử nghiệm miễn dịch khác nhau. Để tham khảo quy trình miễn dịch và thử nghiệm miễn dịch, xem tài liệu *Basic và Clinical Immunology* (Stites & Terr eds., 7th ed. 1991). Ngoài ra, thử nghiệm miễn dịch được bộc lộ ở đây có thể được thực hiện theo dạng bất kỳ trong số nhiều dạng, chúng được xem xét khái quát trong tài liệu *Enzyme Immunoassay* (Maggio, ed., 1980); và Harlow & Lane, tên tài liệu như nêu trên.

2. Thử nghiệm gắn kết miễn dịch

Protein T1R, mảnh protein và biến thể của nó có thể được phát hiện và/hoặc

xác định bằng cách sử dụng một số thử nghiệm bất kỳ trong số các thử nghiệm gắn kết miễn dịch đã biết (ví dụ, xem tài liệu Patent Mỹ số 4,366,241; 4,376,110; 4,517,288; và 4,837,168). Để tham khảo thử nghiệm miễn dịch chung, cũng xem tài liệu *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology*, volume 37 (Asai, ed. 1993); *Basic and Clinical Immunology* (Stites & Terr, eds., 7th ed. 1991). Thử nghiệm gắn kết miễn dịch (hoặc thử nghiệm miễn dịch) thường sử dụng kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với protein và kháng nguyên được chọn (trong trường hợp này là thành viên họ T1R hoặc trình tự kháng nguyên của nó). Kháng thể (ví dụ, kháng T1R) có thể được tạo ra bằng một số phương pháp bất kỳ mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết và như được mô tả ở trên.

Thử nghiệm miễn dịch còn sử dụng chất đánh dấu để gắn kết đặc hiệu và đánh dấu phức được tạo thành bằng kháng thể và kháng nguyên. Chất đánh dấu có thể tự nó là một trong số các nhóm chứa phức kháng thể/kháng nguyên. Do đó, chất đánh dấu có thể là polypeptit T1R được đánh dấu hoặc kháng thể kháng T1R được đánh dấu. Theo cách khác, chất đánh dấu có thể là nhóm thứ ba, như kháng thể thứ hai mà gắn kết đặc hiệu với phức kháng thể/T1R (kháng thể thứ hai thường là đặc hiệu với kháng thể của loài mà từ đó kháng thể thứ nhất được tạo ra). Protein khác có khả năng gắn kết đặc hiệu với vùng không đổi của globulin miễn dịch, như protein A hoặc protein G cũng có thể được sử dụng làm chất đánh dấu. Các protein này có tính phản ứng không sinh miễn dịch mạnh với vùng không đổi của globulin miễn dịch từ nhiều loài khác nhau (ví dụ, xem tài liệu Kronval et al., *J. Immunol.*, 111:1401-1406 (1973); Akerstrom et al., *J. Immunol.*, 135:2589-2542 (1985)). Chất đánh dấu có thể được xác định bằng nhóm dễ phát hiện, như biotin, nhóm mà phân tử khác có thể gắn kết đặc hiệu vào nó, như streptavidin. Các nhóm dễ phát hiện khác nhau là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Trong suốt thử nghiệm, bước ủ và/hoặc rửa có thể là cần thiết sau mỗi bước kết

hợp chất phản ứng. Bước ủ có thể thay đổi từ 5 giây đến nhiều giờ, tùy ý nằm trong khoảng từ 5 phút đến 24 giờ. Tuy nhiên, thời gian ủ sẽ phụ thuộc vào dạng thử nghiệm, kháng nguyên, thể tích dung dịch, nồng độ và các yếu tố khác. Thông thường, thử nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ môi trường, mặc dù nó có thể được thực hiện ngoài khoảng nhiệt độ này, như ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10 đến 40°C.

A. Dạng thử nghiệm không cạnh tranh

Thử nghiệm miễn dịch để phát hiện ra polypeptit T1R trong mẫu có thể là thử nghiệm cạnh tranh hoặc không cạnh tranh. Thử nghiệm miễn dịch không cạnh tranh là thử nghiệm, trong đó lượng kháng nguyên được xác định trực tiếp. Trong thử nghiệm “sandwich” được ưu tiên, ví dụ, kháng thể kháng T1R có thể được gắn kết trực tiếp với cơ chất rắn, mà trên đó chúng được cố định. Tiếp đó, các kháng thể cố định này chiếm được polypeptit T1R có mặt trong mẫu thử nghiệm. Sau đó, polypeptit T1R vừa được cố định được gắn kết bởi chất đánh dấu, ví dụ kháng thể T1R thứ hai mang chất đánh dấu. Theo cách khác, kháng thể thứ hai có thể thiếu chất đánh dấu, nhưng ngược lại, nó có thể được gắn kết bằng kháng thể thứ ba được đánh dấu đặc hiệu với kháng thể của loài mà từ đó, thu được kháng thể thứ hai. Kháng thể thứ hai hoặc thứ ba thường được biến đổi bằng nhóm dễ phát hiện, ví dụ biotin, nhóm mà phân tử khác gắn kết đặc hiệu vào nó, như streptavidin, để tạo ra nhóm dễ phát hiện.

B. Dạng thử nghiệm cạnh tranh

Trong thử nghiệm cạnh tranh, lượng polypeptit T1R có mặt trong mẫu được xác định gián tiếp bằng cách xác định lượng polypeptit T1R đã biết được thêm vào (ngoại sinh) được thay thế (đã cạnh tranh hết) từ kháng thể kháng T1R bằng polypeptit T1R chưa biết có mặt trong mẫu. Trong thử nghiệm cạnh tranh, lượng polypeptit T1R đã biết được thêm vào mẫu và sau đó mẫu được cho tiếp xúc với

kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với T1R. Lượng polypeptit T1R ngoại sinh gắn kết với kháng thể là tỷ lệ nghịch đảo với nồng độ polypeptit T1R có mặt trong mẫu. Trong phương án được đặc biệt ưu tiên, kháng thể được làm cố định trên cơ chất rắn. Lượng polypeptit T1R gắn kết với kháng thể có thể được xác định bằng cách đo lượng polypeptit T1R có mặt trong phức T1R/kháng thể, hoặc theo cách khác bằng cách đo lượng protein chưa tạo phức còn lại. Lượng polypeptit T1R có thể được phát hiện bằng cách tạo ra phân tử T1R được đánh dấu.

Thử nghiệm ức chế hapten (kháng nguyên không hoàn toàn) là thử nghiệm cạnh tranh được ưu tiên khác. Trong thử nghiệm này, polypeptit T1R đã biết được làm cố định trên cơ chất rắn. Lượng kháng thể kháng T1R đã biết được thêm vào mẫu, và sau đó mẫu được cho tiếp xúc với T1R cố định. Lượng kháng thể kháng T1R gắn kết với polypeptit T1R cố định đã biết là tỷ lệ nghịch đảo với lượng polypeptit T1R có mặt trong mẫu. Một lần nữa, lượng kháng thể cố định có thể được phát hiện bằng cách phát hiện phân đoạn cố định chứa kháng thể hoặc phân đoạn chứa kháng thể mà còn lại trong dung dịch. Việc phát hiện có thể là trực tiếp nếu kháng thể được đánh dấu hoặc là gián tiếp bằng cách thêm liên tục nhóm được đánh dấu mà gắn kết đặc hiệu với kháng thể như được mô tả trên đây.

C. Xác định mức độ phản ứng chéo

Thử nghiệm miễn dịch ở dạng gắn kết cạnh tranh còn có thể được sử dụng để xác định mức độ phản ứng chéo. Ví dụ, protein ít nhất được mã hóa một phần bằng trình tự axit nucleic được mô tả ở đây có thể được cố định vào chất mang rắn. Protein (ví dụ, polypeptit T1R và thể tương đồng) được thêm vào thử nghiệm cạnh tranh để gắn kết kháng huyết thanh với kháng nguyên cố định. Khả năng của protein thêm vào cạnh tranh với gắn kết của kháng huyết thanh với protein cố định được so sánh với khả năng của polypeptit T1R được mã hóa bằng trình tự axit nucleic được mô tả ở đây để cạnh tranh với bản thân nó. Độ phản ứng ngang theo phần trăm đối với protein ở

trên được tính bằng cách sử dụng các phép tính tiêu chuẩn. Các kháng huyết thanh có mức độ phản ứng chéo ít hơn 10% với mỗi protein được thêm vào được nêu trên được chọn và thu thập. Kháng thể phản ứng ngang được loại bỏ tùy ý ra khỏi kháng huyết thanh được thu thập bằng cách hấp thụ miễn dịch bằng protein được cân nhắc thêm vào, ví dụ thể tương đồng có liên quan xa. Ngoài ra, peptit chứa trình tự axit amin đại diện cho motif được bảo tồn mà được sử dụng để xác định thành phần của họ T1R có thể được sử dụng trong việc xác định mức độ phản ứng chéo.

Tiếp đó, kháng huyết thanh đã hấp phụ miễn dịch và đã được thu thập được sử dụng trong thử nghiệm miễn dịch gắn kết cạnh tranh như được mô tả ở trên để so sánh protein thứ hai, được cho là có thể là alen hoặc biến thể đa hình của thành phần họ T1R, với protein sinh miễn dịch (tức là polypeptit T1R được mã hóa bằng trình tự axit nucleic được mô tả trên đây). Để thực hiện so sánh này, hai protein được thử nghiệm ở khoảng nồng độ rộng và lượng mỗi protein cần thiết để ức chế 50% mức gắn kết của kháng huyết thanh với protein cố định được xác định. Nếu lượng protein thứ hai cần thiết để ức chế 50% mức gắn kết là nhỏ hơn 10 lần so với lượng protein được mã hóa bằng trình tự axit nucleic được mô tả trên đây cần để ức chế 50% mức gắn kết, thì protein thứ hai được coi là gắn kết đặc hiệu với kháng thể đa dòng được tạo ra đối với chất sinh miễn dịch T1R.

Kháng thể kháng motif được bảo tồn bởi T1R còn có thể được sử dụng để điều chế kháng thể mà chỉ gắn kết đặc hiệu với GPCR của họ T1R, nhưng không gắn kết với GPCR từ họ khác.

Kháng thể đa dòng mà gắn kết đặc hiệu với thành phần cụ thể của họ T1R có thể được tạo ra bằng cách loại trừ kháng thể phản ứng ngang sử dụng thành phần họ T1R khác. Kháng thể đa dòng đặc hiệu loài có thể được tạo ra theo cách tương tự. Ví dụ, kháng thể đặc hiệu với T1R1 của người có thể được tạo ra bằng cách loại trừ kháng thể mà phản ứng ngang với trình tự gen tiến hóa thẳng, ví dụ T1R1 của chuột

cổng hoặc T1R1 của chuột nhắt.

D. Các dạng thử nghiệm khác

Phân tích thấm Western (thấm miễn dịch) được sử dụng để phát hiện và định lượng sự có mặt của polypeptit T1R trong mẫu. Kỹ thuật này thường bao gồm bước phân lập protein trong mẫu bằng phép điện di gel dựa trên cơ sở trọng lượng phân tử, chuyển protein đã được tách sang chất mang rắn thích hợp (ví dụ, bộ lọc nitroxenluloza, bộ lọc nylon hoặc bộ lọc nylon dẫn xuất hóa), và ủ mẫu bằng kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với polypeptit T1R. Kháng thể kháng polypeptit T1R gắn kết đặc hiệu với polypeptit T1R trên chất mang rắn. Các kháng thể này có thể được đánh dấu trực tiếp hoặc theo cách khác có thể được phát hiện sau đó bằng cách sử dụng kháng thể đã đánh dấu (ví dụ, kháng thể kháng chuột của cừu đã được đánh dấu) mà gắn kết đặc hiệu với kháng thể kháng T1R.

Các dạng thử nghiệm khác bao gồm thử nghiệm miễn dịch liposom (*Liposome ImmunoAssays: LIA*), thử nghiệm này sử dụng liposom được chỉ định để gắn kết các phân tử đặc hiệu (ví dụ kháng thể) và giải phóng chất phản ứng hoặc gen đánh dấu đã được bao nang. Tiếp theo, các chất hóa học được giải phóng được phát hiện theo kỹ thuật chuẩn (ví dụ xem tài liệu Monroe et al., *Amer. Clin. Prod. Rev.*, 5:34-41 (1986)).

E. Khử gắn kết không đặc hiệu

Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ rằng, thường mong muốn làm giảm đến mức tối thiểu gắn kết không đặc hiệu trong thử nghiệm miễn dịch. Cụ thể là, nếu thử nghiệm liên quan đến kháng nguyên hoặc kháng thể được làm cố định trên cơ chất rắn, mong muốn làm giảm đến mức tối thiểu lượng gắn kết không đặc hiệu với chất nền. Phương pháp làm giảm gắn kết không đặc hiệu này là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thông thường, kỹ thuật này liên quan đến việc bao cơ chất bằng chế phẩm có protein. Cụ thể là, chế phẩm chứa protein như

albumin huyết thanh bò (*Bovine Serum Albumin*: BSA), sữa bột không béo và gelatin được sử dụng rộng rãi, trong đó sữa bột là được ưu tiên nhất.

F. Chất đánh dấu

Chất đánh dấu và nhóm dễ phát hiện cụ thể được sử dụng trong thử nghiệm không phải là khía cạnh chính, miễn là nó không can thiệp đáng kể vào gắn kết đặc hiệu của kháng thể được sử dụng trong thử nghiệm. Nhóm dễ phát hiện có thể là chất bất kỳ có đặc tính lý học và hóa học dễ phát hiện. Chất đánh dấu dễ phát hiện này được phát triển trong lĩnh vực thử nghiệm miễn dịch và, nói chung, hầu hết chất đánh dấu được sử dụng trong phương pháp này có thể được áp dụng. Do đó, chất đánh dấu này là chế phẩm bất kỳ có thể phát hiện được bằng các phương pháp quang phổ, quang hóa, sinh hóa, hóa miễn dịch, điện, quang hoặc hóa học. Chất đánh dấu hữu hiệu bao gồm các hạt từ tính (ví dụ, DYNABEADSTM), thuốc nhuộm phát huỳnh quang (ví dụ, florescein isothiocyanat, đỏ Texas, rhodamin, và chất tương tự khác), chất đánh dấu phóng xạ (ví dụ, ^3H , ^{125}I , ^{14}C , ^{35}S), các enzym (ví dụ, peroxidaza của cây cải ối ven biển, phosphat kiềm và các loại thông thường khác được sử dụng trong thử nghiệm ELISA), và chất đánh dấu dùng cho máy so màu như hạt thủy tinh hoặc hạt nhựa màu vàng hoặc có màu dạng keo (ví dụ polystyren, polypropylen, latec, v.v.).

Chất đánh dấu có thể được kết hợp trực tiếp hoặc gián tiếp với thành phần mong muốn của thử nghiệm theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Như nêu trên, một loạt các chất đánh dấu có thể được sử dụng, với sự lựa chọn chất đánh dấu phụ thuộc vào độ nhạy cần thiết, sự dễ dàng dung hợp với hợp chất, yêu cầu về độ bền, thiết bị sẵn có và dự phòng để sử dụng.

Chất đánh dấu không có tính phóng xạ thường được gắn vào bằng phương pháp gián tiếp. Nói chung, phân tử phối tử (ví dụ biotin) liên kết đồng hóa trị với phân tử. Tiếp đó, phối tử gắn kết với phân tử khác (ví dụ streptavidin), phân tử này vốn đã dễ

dàng phát hiện hoặc liên kết đồng hóa trị với hệ tín hiệu, ví dụ enzym để phát hiện, hợp chất phát huỳnh quang hoặc hợp chất phát quang hóa học. Phối tử này và gen đích của nó có thể được sử dụng trong hỗn hợp thích hợp bất kỳ với kháng thể mà nhận biết polypeptit T1R, hoặc kháng thể thứ hai mà nhận biết chất kháng T1R.

Các phân tử còn có thể được dung hợp trực tiếp với hợp chất tạo tín hiệu, ví dụ, bằng cách dung hợp với enzym hoặc floropho. Enzym được quan tâm làm chất đánh dấu sẽ chủ yếu là hydrolaza, đặc biệt là phosphataza, esteraza và glycosidaza, hoặc oxidotaza, đặc biệt là peroxidaza. Hợp chất phát huỳnh quang bao gồm floresxein và dẫn xuất của nó, rhodamin và dẫn xuất của nó, dansyl, umbelliferon, v.v.. Hợp chất phát quang hóa học bao gồm luxiferin, và 2,3-dihydrophthalazindion, ví dụ luminol. Để tham khảo hệ đánh dấu và hệ tạo tín hiệu khác nhau mà có thể được sử dụng, xem Patent Mỹ Số 4,391,904.

Phương pháp phát hiện chất đánh dấu là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Do đó, ví dụ, nếu chất đánh dấu là chất đánh dấu phóng xạ, phương pháp để phát hiện bao gồm đếm nhấp nháy hoặc tạo màng ảnh như trong kỹ thuật tự chụp X quang. Nếu chất đánh dấu là chất đánh dấu phát huỳnh quang, nó có thể được phát hiện bằng cách kích thích chất gây huỳnh quang bằng bước sóng ánh sáng thích hợp và phát hiện sự phát huỳnh quang tạo thành. Sự phát huỳnh quang có thể được phát hiện theo thị giác, bằng phương pháp tạo màng ảnh, sử dụng chất phát hiện điện như bộ ghép nối điện tích (*Charge-Coupled Devices: CCD*) hoặc bộ nhân quang và thiết bị khác. Tương tự, chất đánh dấu enzym có thể được phát hiện bằng cách tạo ra cơ chất thích hợp đối với enzym và phát hiện ra sản phẩm phản ứng tạo thành. Cuối cùng, chất đánh dấu dùng cho thiết bị đo màu đơn giản có thể được phát hiện đơn giản bằng cách quan sát màu liên quan đến chất đánh dấu. Do đó, trong các thử nghiệm về que đo mực nước khác nhau, vàng liên hợp thường xuất hiện màu hồng, trong khi các hạt dung hợp khác nhau xuất hiện màu của hạt.

Một số dạng thử nghiệm không cần sử dụng thành phần đánh dấu. Ví dụ, thử nghiệm ngưng kết có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của kháng thể đích. Trong trường hợp này, các hạt được bao kháng nguyên được ngưng kết bằng mẫu chứa kháng thể đích. Trong dạng thử nghiệm này, không có thành phần nào cần phải đánh dấu và sự có mặt của kháng thể đích được phát hiện bằng cách kiểm tra hiển thị đơn giản.

Phát hiện chất điều biến

Chế phẩm và phương pháp để xác định liệu hợp chất thử nghiệm có gắn kết đặc hiệu với thụ thể T1R, cả *in vitro* và *in vivo*, được mô tả dưới đây. Nhiều khía cạnh của sinh lý học tế bào có thể được theo dõi để đánh giá tác động của phối tử gắn kết với polypeptit T1R. Thử nghiệm này có thể được thực hiện trên tế bào nguyên vẹn biểu hiện thụ thể nhạy cảm hóa học, trên các tế bào thấm, hoặc trên các đoạn màng được tạo ra theo các phương pháp tiêu chuẩn hoặc protein tổng hợp *in vitro* hoặc *de novo*.

In vivo, thụ thể vị giác gắn kết với chất tạo vị và bắt đầu tải nạp chất kích thích hóa học thành tín hiệu điện. Protein G đã hoạt hóa hoặc ức chế đến lượt nó sẽ làm thay đổi đặc tính của enzym đích, kênh và protein tác động khác. Một số ví dụ là sự hoạt hóa phosphodiesteraza GMP vòng bằng cách tải nạp trong hệ nhìn thấy, adenyl hóa xyclaza bằng protein G kích thích, phospholipaza C bằng Gq và protein G cùng nguồn gốc khác và điều biến kênh ngược bằng protein Gi và protein G khác. Hệ quả xuôi dòng còn có thể được thử nghiệm như việc tạo ra diacyl glycerol và IP3 bằng phospholipaza C, và đến lượt nó, để làm di động canxi bằng IP3.

Protein hoặc polypeptit T1R của thử nghiệm tốt hơn là được chọn từ polypeptit có trình tự polypeptit T1R được chọn từ nhóm được mô tả trong Ví dụ 1, hoặc đoạn hoặc biến thể được biến đổi bảo toàn của nó. Một cách tùy ý, đoạn hoặc biến thể có thể là đoạn hoặc biến thể kháng nguyên, chúng gắn kết với kháng thể kháng T1R. Tùy ý, đoạn và biến thể có thể gắn kết với hoặc được hoạt hóa bằng chất tạo vị ngọt

hoặc chất tạo vị umami.

Theo cách khác, protein hoặc polypeptit T1R của thử nghiệm có thể có nguồn gốc từ tế bào vật chủ có nhân điển hình và có thể bao gồm trình tự axit amin có trình tự axit amin giống với polypeptit T1R được mô tả trong Ví dụ 1, hoặc đoạn hoặc biến thể được biến đổi bảo toàn của nó. Nói chung, độ đồng nhất của trình tự axit amin sẽ ít nhất nằm trong khoảng từ 35 đến 50%, hoặc tùy ý là 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%. Tùy ý, protein hoặc polypeptit T1R của thử nghiệm có thể chứa vùng của protein T1R, như vùng ngoại bào, vùng xuyên màng, vùng tế bào chất, vùng gắn kết phối tử, và vùng tương tự khác. Ngoài ra, như được mô tả trên đây, T1R protein hoặc vùng của nó có thể liên kết đồng hóa trị với protein khác loài để tạo ra protein thể khảm được sử dụng trong thử nghiệm được mô tả ở đây.

Chất điều biến hoạt tính thụ thể T1R được thử nghiệm bằng cách sử dụng protein hoặc polypeptit T1R như được mô tả trên đây, tái tổ hợp hoặc thường thấy trong tự nhiên. Protein hoặc polypeptit T1R có thể được phân lập, đồng biểu hiện trong tế bào, đồng biểu hiện trong màng có nguồn gốc từ tế bào, đồng biểu hiện trong mô hoặc trong động vật, tái tổ hợp hoặc thường thấy trong tự nhiên. Ví dụ, lát mỏng ở lưỡi, các tế bào được phân ly từ lưỡi, tế bào chuyển dạng hoặc màng có thể được sử dụng. Việc điều biến có thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng một trong số các thử nghiệm *in vitro* hoặc *in vivo* được mô tả ở đây.

Ví dụ, như được mô tả trong phần thử nghiệm trong các Ví dụ dưới đây, phát hiện ra rằng, một số 5' nucleotit, ví dụ 5' IMP hoặc 5' GMP, làm tăng hoạt tính của L-glutamat để hoạt hóa thụ thể vị umami, hoặc làm cản trở quá trình hoạt hóa thụ thể vị umami bằng chất kích thích có vị umami như L-glutamat và L-aspartat.

1. Thử nghiệm gắn kết *in vitro*

Quá trình tải nạp tín hiệu vị giác còn có thể được thử nghiệm *in vitro* bằng các phản ứng trạng thái tan được hoặc trạng thái rắn, sử dụng polypeptit T1R được bọc

ở đây. Theo phương án cụ thể, vùng gắn kết phối tử T1R có thể được sử dụng *in vitro* trong phản ứng trạng thái tan được hoặc trạng thái rắn để thử nghiệm về sự gắn kết phối tử.

Ví dụ, vùng đầu tận cùng N của T1R được dự đoán là liên quan đến sự gắn kết phối tử. Cụ thể hơn, T1R phụ thuộc vào phân họ GPCR, được đặc trưng bởi đoạn đầu tận cùng N ngoại bào lớn, chứa khoảng 600 axit amin. Các đoạn đầu tận cùng N này được cho là tạo thành vùng gắn kết phối tử, và do đó được sử dụng trong thử nghiệm hóa sinh để xác định chất chủ vận và chất đối kháng T1R. Có thể là, vùng gắn kết phối tử có thể được tạo thành bởi phần bổ sung của vùng ngoại bào, như quai ngoại bào của vùng xuyên màng.

Thử nghiệm gắn kết *in vitro* được sử dụng với GPCR khác mà có liên quan đến T1R, như thụ thể glutamat hồ biến trao đổi chất (ví dụ, xem tài liệu Han và Hampson, *J. Biol. Chem.* 274:10008-10013 (1999)). Các thử nghiệm này có thể liên quan đến việc thay thế phối tử được đánh dấu có hoạt tính phóng xạ hoặc phát huỳnh quang, đo sự thay đổi về mức phát huỳnh quang bên trong hoặc sự thay đổi về tính miễn cảm phân giải protein, v.v.

Gắn kết phối tử với phức hợp hetero-multimer chứa polypeptit T1R có thể được thử nghiệm trong dung dịch, trong màng hai lớp, tùy ý gắn vào pha rắn, trong lớp mỡ đơn lớp hoặc trong nang. Sự gắn kết của chất điều biến có thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng, ví dụ sự thay đổi về các đặc tính quang phổ (ví dụ, sự phát huỳnh quang, sự hấp thụ, hệ số khúc xạ), các đặc tính động lực học (ví dụ hình dạng), đặc tính sắc ký hoặc đặc tính hòa tan.

Theo phương án khác, thử nghiệm GTP γ ³⁵S có thể được sử dụng. Như được mô tả trên đây, sau khi hoạt hóa GPCR, cấu trúc dưới phân tử G α của phức protein G được kích thích để thay đổi GDP gắn kết thành GTP. Sự kích thích hoạt tính thay đổi protein G gây ra qua trung gian phối tử có thể được xác định trong thử nghiệm hóa

sinh bằng cách xác định gắn kết của $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ được đánh dấu hoạt tính phóng xạ với protein G với sự có mặt của phối tử giả định. Thông thường, màng chứa thụ thể nhạy cảm hóa học đang được quan tâm được trộn với phức chứa protein G. Chất ức chế và/hoặc chất hoạt hóa tiềm năng và $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ được thêm vào thử nghiệm, và mức gắn kết của $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ với protein G được xác định. Mức gắn kết có thể được xác định bằng phép đếm nhấp nháy lỏng hoặc bằng phương pháp bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm thử nghiệm gần nhấp nháy (*Scintillation Proximity Assays: SPA*). Trong các dạng thử nghiệm khác, $\text{GTP}\gamma\text{S}$ được đánh dấu phát huỳnh quang có thể được sử dụng.

2. Thử nghiệm phân cực phát huỳnh quang

Theo phương án khác, thử nghiệm dựa trên sự phân cực phát huỳnh quang (*Florescence Polarization: FP*) có thể được sử dụng để phát hiện và theo dõi sự gắn kết phối tử. Phân cực phát huỳnh quang là kỹ thuật linh hoạt trong phòng thí nghiệm để xác định mức gắn kết cân bằng, mức lai axit nucleic và hoạt tính enzym. Thử nghiệm phân cực phát huỳnh quang là đồng nhất ở chỗ, nó không cần bước tách như ly tâm, lọc, sắc ký, kết tủa hoặc điện di. Các thử nghiệm này được thực hiện trong thời gian thực, trực tiếp trong dung dịch và không cần pha cố định. Giá trị phân cực có thể được xác định lặp lại nhiều lần và sau khi thêm chất phản ứng vì việc xác định phân cực là nhanh chóng và không làm phá hủy mẫu. Nói chung, kỹ thuật này có thể được sử dụng để xác định giá trị phân cực của fluorophore từ mức picomol thấp đến mức micromol. Đoạn này mô tả thử nghiệm phân cực phát huỳnh quang có thể được sử dụng như thế nào theo cách đơn giản và định lượng để xác định gắn kết của phối tử với polypeptit T1R được bộc lộ ở đây.

Nếu phân tử được đánh dấu phát huỳnh quang được kích thích bằng ánh sáng phân cực phẳng, nó sẽ phát ra ánh sáng có độ phân cực là tỷ lệ nghịch đảo với sự quay phân tử của nó. Các phân tử được đánh dấu phát huỳnh quang lớn vẫn tương đối tĩnh

trong trạng thái kích thích (4 nano giây trong trường hợp phát huỳnh quang) và sự phân cực ánh sáng vẫn tương đối không đổi giữa trạng thái kích thích và trạng thái phát xạ. Phân tử được đánh dấu phát huỳnh quang nhỏ quay nhanh trong trạng thái kích thích và sự phân cực thay đổi đáng kể giữa trạng thái kích thích và trạng thái phát xạ. Do đó, các phân tử nhỏ có giá trị phân cực thấp và các phân tử lớn có giá trị phân cực cao. Ví dụ, oligonucleotit sợi đơn được đánh dấu phát huỳnh quang có giá trị phân cực tương đối thấp nhưng nếu nó được lai với nhiễm sắc thể, nó sẽ có giá trị phân cực cao hơn. Nếu sử dụng FP để phát hiện và theo dõi gắn kết của chất tạo vị, gắn kết này có thể hoạt hóa hoặc ức chế thụ thể nhạy cảm hóa, chất tạo vị được đánh dấu phát huỳnh quang hoặc chất tạo vị tự phát huỳnh quang có thể được sử dụng.

Độ phân cực phát huỳnh quang (P) được xác định là:

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

Trong đó, Π là cường độ của ánh sáng phát xạ song song với mặt phẳng của ánh sáng kích thích và $Int_{\perp}$ là cường độ của ánh sáng phát xạ vuông góc với mặt phẳng của ánh sáng kích thích. P, là tỷ lệ của cường độ ánh sáng, là số không có thứ nguyên. Ví dụ, Beacon® và hệ Beacon 2000™ có thể được sử dụng kết hợp với thử nghiệm này. Hệ này thường biểu thị độ phân cực ở đơn vị milipolarization (1 đơn vị Polarization = 1000 đơn vị mP).

Mối quan hệ giữa sự quay và kích thước phân tử được mô tả trong phương trình Perrin và thiết bị đọc được đề cập đến trong tài liệu Jolley, M. E. (1991), *Journal of Analytical Toxicology*, pp. 236-240, tài liệu này giải thích kỹ lưỡng phương trình này. Tương tự, phương trình Perrin cho rằng, độ phân cực là tỷ lệ trực tiếp với thời gian giãn quay, thời gian này làm cho phân tử quay xung quanh góc khoảng 68,5°. Thời gian giãn quay liên quan đến độ nhớt (η), nhiệt độ tuyệt đối (T), thể tích phân tử (V) và hằng số khí (R) theo phương trình sau đây:

$$\text{Thời gian giãn quay} = \frac{3\eta V}{RT}$$

Thời gian giãn quay là nhỏ (khoảng 1 nano giây) đối với các phân tử nhỏ (ví dụ florescein) và là lớn (khoảng 100 nano giây) (ví dụ globulin miễn dịch). Nếu độ nhớt và nhiệt độ được giữ không đổi, thời gian giãn quay và do đó độ phân cực sẽ liên quan trực tiếp đến thể tích phân tử. Sự thay đổi về thể tích phân tử có thể là do sự tương tác với các phân tử khác, sự phân ly, polyme hóa, suy biến, lai hoặc sự thay đổi về cấu dạng của phân tử được đánh dấu phát huỳnh quang. Ví dụ, sự phân cực phát huỳnh quang được sử dụng để xác định mức phân cắt enzym của polyme lớn được đánh dấu huỳnh quang bằng proteaza, ADNaza, và ARNaza. Nó còn được sử dụng để xác định mức gắn kết cân bằng đối với các tương tác protein/protein, gắn kết kháng thể/kháng nguyên và gắn kết protein/ADN.

A. Thử nghiệm năng suất cao trạng thái rắn và hòa tan

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất thử nghiệm hòa tan sử dụng phức polypeptit T1R hetero-oligome; hoặc tế bào hoặc mô đồng biểu hiện polypeptit T1R. Tốt hơn là, tế bào này bao gồm dòng tế bào đồng biểu hiện ổn định thụ thể vị T1R1/T1R3 (umami) chức năng hoặc thụ thể vị T1R2/T1R3 (ngọt) chức năng. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất thử nghiệm *in vitro* dựa trên pha rắn ở dạng năng suất cao, trong đó polypeptit T1R, hoặc tế bào hoặc mô biểu hiện polypeptit T1R được gắn vào cơ chất pha rắn hoặc hợp chất kích thích có vị giác và tiếp xúc với thụ thể T1R, và gắn kết được phát hiện bằng cách sử dụng thẻ đánh dấu thích hợp hoặc kháng thể kháng lại thụ thể T1R.

Trong thử nghiệm năng suất cao được bộc lộ ở đây, có thể thử nghiệm tối đa hàng ngàn chất điều biến hoặc phối tử khác nhau trong 1 ngày duy nhất. Cụ thể, mỗi lỗ của đĩa tế vi có thể được sử dụng để thực hiện thử nghiệm riêng biệt với chất điều biến tiềm năng được chọn, hoặc nếu tác động của nồng độ hoặc thời gian ủ được quan

sát, cứ 5-10 lỗ có thể thử nghiệm một chất điều biến đơn. Do đó, một đĩa tế vi tiêu chuẩn đơn có thể thử nghiệm được khoảng 100 (ví dụ 96) chất điều biến. Nếu đĩa 1536 lỗ được sử dụng, thì một đĩa đơn có thể dễ dàng thử nghiệm từ 1000 đến 1500 hợp chất khác nhau. Còn có thể thử nghiệm nhiều hợp chất trong mỗi lỗ của đĩa. Có thể thử nghiệm nhiều đĩa khác nhau mỗi ngày; thử nghiệm được thực hiện tối đa cho khoảng từ 6000 đến 20000 hợp chất khác nhau là có thể thực hiện được bằng cách sử dụng hệ tích hợp được bộc lộ ở đây. Mới gần đây, cách tiếp cận vi lỏng với việc thao tác chất phản ứng đã được phát triển.

Phân tử đang được quan tâm có thể được gắn kết với thành phần ở trạng thái rắn, trực tiếp hoặc gián tiếp, bằng liên kết đồng hóa trị hoặc liên kết không đồng hóa trị, bằng thẻ đánh dấu. Thẻ đánh dấu này có thể là thành phần bất kỳ. Nói chung, phân tử mà gắn kết với thẻ đánh dấu (chất gắn kết thẻ) được cố định vào chất mang rắn, và phân tử đã được đánh dấu đang được quan tâm (ví dụ phân tử tải nạp tín hiệu vị giác đang được quan tâm) được gắn vào chất mang rắn nhờ tương tác của thẻ đánh dấu và chất gắn kết thẻ đánh dấu.

Một số thẻ đánh dấu và chất gắn kết thẻ đánh dấu có thể được sử dụng, dựa trên sự tương tác phân tử đã biết đã được mô tả trong tài liệu chuyên ngành. Ví dụ, nếu thẻ đánh dấu có chất gắn kết tự nhiên, ví dụ, biotin, protein A, protein G, nó có thể được sử dụng kết hợp với chất gắn kết thẻ đánh dấu thích hợp (avidin, streptavidin, neutravidin, vùng Fc của globulin miễn dịch, v.v.). Kháng thể với phân tử có chất gắn kết tự nhiên như biotin là có sẵn và là chất gắn kết thẻ đánh dấu thích hợp (xem tài liệu, SIGMA Immunochemicals 1998 catalogue SIGMA, St. Louis MO).

Tương tự, hợp chất hapten hoặc kháng nguyên bất kỳ có thể được sử dụng kết hợp với kháng thể thích hợp để tạo ra cặp thẻ/chất gắn kết thẻ đánh dấu. Hàng ngàn kháng thể đặc hiệu là có bán sẵn ở quy mô công nghiệp và nhiều kháng thể bổ sung được mô tả trong tài liệu chuyên ngành. Ví dụ, trong cấu hình thông thường, thẻ đánh

dấu là kháng thể thứ nhất và chất gắn kết thể đánh dấu là kháng thể thứ hai, kháng thể này xác nhận kháng thể thứ nhất. Ngoài tương tác kháng thể-kháng nguyên, tương tác thụ thể-phối tử còn là thích hợp dưới dạng thể đánh dấu và cặp thể đánh dấu-chất gắn kết. Ví dụ, chất chủ vận và chất đối kháng của thụ thể màng tế bào (ví dụ, tương tác thụ thể tế bào-phối tử như transferin, c-kit, phối tử thụ thể virus, thụ thể xytokin, thụ thể chemokin, thụ thể intolơkin, thụ thể globulin miễn dịch và kháng thể, họ cadherein, họ integrin, họ selectin và các loại tương tự khác; ví dụ, xem tài liệu Pigott & Power, *The Adhesion Molecule Facts Book I* (1993)). Tương tự, tất cả độc tố và nọc độc, epitop (biểu vị) của virus, hormon (ví dụ opiat, steroid, v.v..), thụ thể trong tế bào (ví dụ thụ thể gây ra tác dụng của các phối tử nhỏ khác nhau, bao gồm steroid, hormon tuyến giáp, retinoit và vitamin D; peptit), dược chất, lectin, đường, axit nucleic (cả cấu hình tuyến tính lẫn cấu hình polyme vòng), oligosaccarit, protein, phospholipit và kháng thể có thể tương tác với các thụ thể tế bào khác nhau.

Polyme tổng hợp, ví dụ polyuretan, polyeste, polycacbonat, polyure, polyamit, polyetylenimin, polyarylen sulfua, polysiloxan, polyimit, và polyaxetat còn có thể tạo thành thể đánh dấu hoặc chất gắn kết thể đánh dấu thích hợp. Nhiều cặp thể/chất gắn kết thể đánh dấu khác cũng được sử dụng trong hệ thử nghiệm được mô tả ở đây, sẽ trở nên rõ ràng với chuyên gia trong lĩnh vực này sau khi xem bản mô tả này.

Chất liên kết thông thường như peptit, polyete và các chất tương tự khác còn có thể đóng vai trò thể, và bao gồm trình tự polypeptit, như trình tự poly gly có khoảng từ 5 đến 200 axit amin. Chất liên kết linh hoạt này là đã biết với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, chất liên kết poly(etelyn glycol) là có sẵn từ Shearwater Polymers, Inc. Huntsville, Alabama. Các chất liên kết này tùy ý có mối liên kết amit, mối liên kết sulfhydryl, hoặc mối liên kết dị chức năng.

Chất gắn kết thể đánh dấu được cố định vào cơ chất rắn bằng cách sử dụng phương pháp hiện có bất kỳ. Cơ chất rắn thường được tạo dẫn xuất hoặc chức năng

hóa bằng cách cho tất cả hoặc một phần của cơ chất tiếp xúc với chất phản ứng hóa học, chất này sẽ cố định nhóm hóa học vào bề mặt mà phản ứng với một phần của chất gắn kết thể. Ví dụ, nhóm thích hợp để gắn kết vào phần mạch dài hơn có thể bao gồm các nhóm amin, hydroxyl, thiol, và carboxyl. Aminoalkylsilan và hydroxyalkylsilan có thể được sử dụng để chức năng hóa nhiều bề mặt, như bề mặt thủy tinh. Cấu thành của mạng biopolyme pha rắn này đã được mô tả kỹ trong tài liệu chuyên ngành. Ví dụ, xem tài liệu Merrifield, J; *Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963) (mô tả quy trình tổng hợp pha rắn, ví dụ peptit); Geysen et al., *J. Immun. Meth.*, 102:259-274 (1987) (mô tả quy trình tổng hợp thành phần pha rắn trên kim); Frank & Doring, *Tetrahedron*, 44:60316040 (1988) (mô tả quy trình tổng hợp các trình tự peptit khác nhau trên đĩa xenluloza); Fodor et al., *Science*, 251:767-777 (1991); Sheldon et al., *Clinical Chemistry*, 39 (4):718-719 (1993); và Kozal et al., *Nature Medicine*, 2 (7): 753759 (1996) (tất cả đều mô tả mạng biopolyme được cố định vào cơ chất rắn). Các cách tiếp cận không phải hóa học để cố định chất gắn kết thể đánh dấu vào cơ chất bao gồm các phương pháp thông thường khác, như phương pháp nhiệt, liên kết ngang bằng phóng xạ UV và các phương pháp khác.

3. Thử nghiệm dựa trên tế bào

Theo phương án ưu tiên về điều trị, hỗn hợp gồm protein T1R hoặc polypeptit T1R được đồng biểu hiện tạm thời hoặc ổn định trong tế bào có nhân điển hình ở dạng không xác định, hoặc dưới dạng thụ thể thể khảm, biến đổi hoặc bị cắt ngắn có hoặc tốt hơn là không có trình tự khác loài đi kèm mà tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình giảm phân và tạo đích bằng con đường tiết. Polypeptit T1R này có thể được biểu hiện trong tế bào có nhân điển hình bất kỳ, như tế bào HEK-293. Tốt hơn là, các tế bào này bao gồm protein G chức năng, ví dụ Gα15 hoặc protein G khảm được xác định trước, hoặc protein G khác có khả năng kết hợp thụ thể thể khảm với con đường tín hiệu nội bào hoặc với protein tín hiệu như phospholipaza C. Ngoài ra, tốt hơn là tế

bào sẽ được tạo ra đồng biểu hiện ổn định T1R1/T1R3 hoặc T1R2/T1R3 sao cho các tế bào này được thấy (như được thể hiện trong ví dụ thử nghiệm) là có đáp ứng gia tăng với chất kích thích có vị giác (liên quan đến tế bào mà biểu hiện tạm thời tổ hợp T1R tương tự). Việc hoạt hóa thụ thể T1R trong các tế bào này có thể được phát hiện bằng cách sử dụng phương pháp tiêu chuẩn bất kỳ, như bằng cách phát hiện sự thay đổi về mức canxi nội bào bằng cách phát hiện sự phát huỳnh quang phụ thuộc Flo-4 trong tế bào. Thử nghiệm này là cơ sở cho thử nghiệm được trình bày trong đơn này.

Thụ thể GPCR hoạt hóa thường là cơ chất cho kinaza mà phosphoryl hóa đuôi tận cùng C của thụ thể (và cũng như vị trí có thể khác). Do đó, chất hoạt hóa sẽ thúc đẩy sự truyền ^{32}P từ ATP đánh dấu phóng xạ sang thụ thể, nó có thể được thử nghiệm bằng phép đếm nhấp nháy. Quá trình phosphoryl hóa đuôi tận cùng C sẽ thúc đẩy gắn kết của protein kiểu arestin và sẽ can thiệp vào gắn kết của protein G. Để tham khảo tổng quát tải nạp tín hiệu GPCR và phương pháp thử nghiệm tải nạp tín hiệu, ví dụ, xem tài liệu *Methods in Enzymology*, vols. 237 và 238 (1994) và volume 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).

Việc điều biến T1R có thể được thử nghiệm bằng cách so sánh đáp ứng của polypeptit T1R được xử lý bằng chất điều biến T1R giả định với đáp ứng của mẫu đối chứng không được xử lý hoặc mẫu chứa đối chứng “dương” đã biết. Chất điều biến T1R giả định này có thể bao gồm các phân tử mà ức chế hoặc hoạt hóa hoạt tính polypeptit T1R. Theo một phương án, mẫu đối chứng (không được xử lý bằng chất hoạt hóa hoặc chất ức chế) được chỉ định có giá trị hoạt tính T1R tương đối là 100. Việc ức chế polypeptit T1R đạt được khi giá trị hoạt tính T1R so với đối chứng là khoảng 90%, tùy ý 50%, tùy ý từ 25 đến 0%. Việc hoạt hóa polypeptit T1R đạt được khi giá trị hoạt tính T1R so với đối chứng là 110%, tùy ý là 150%, 200-500% hoặc 1000-2000%.

Sự thay đổi về dòng ion có thể được đánh giá bằng cách xác định sự thay đổi về sự phân cực ion (ví dụ điện thế) của tế bào hoặc màng biểu hiện polypeptit T1R. Một phương pháp để xác định sự thay đổi về phân cực tế bào là xác định sự thay đổi về dòng điện (nhờ đó, xác định được sự thay đổi về phân cực) bằng kỹ thuật kẹp điện áp và kẹp miếng đắp (ví dụ, xem kiểu “gắn tế bào”, kiểu “trong-ngoài” và kiểu “tế bào nguyên vẹn”, ví dụ tài liệu Ackerman et al., *New Engl. J. Med.*, 336:1575-1595 (1997)). Dòng tế bào nguyên vẹn được xác định dễ dàng bằng cách sử dụng phương pháp tiêu chuẩn. Thử nghiệm đã biết khác bao gồm: thử nghiệm dòng ion đánh dấu phóng xạ và thử nghiệm phát huỳnh quang bằng cách sử dụng thuốc nhuộm nhạy điện áp (ví dụ, xem tài liệu Vestergarrd-Bogind et al., *J. Membrane Biol.*, 88:67-75 (1988); Gonzales & Tsien, *Chem. Biol.*, 4:269-277 (1997); Daniel et al., *J. Pharmacol. Meal.*, 25:185-193 (1991); Holevinsky et al., *J. Membrane Biology*, 137:59-70 (1994)).

Tác động của hợp chất thử nghiệm lên chức năng của polypeptit có thể được xác định bằng cách xem xét các thông số bất kỳ được nêu trên đây. Sự thay đổi sinh lý thích hợp bất kỳ mà ảnh hưởng lên hoạt tính GPCR có thể được sử dụng để đánh giá sự ảnh hưởng của hợp chất thử nghiệm lên polypeptit được bộc lộ ở đây. Nếu hệ quả chức năng được xác định bằng cách sử dụng tế bào hoặc động vật nguyên vẹn, nó còn có thể xác định một loạt tác động như giải phóng vật truyền, giải phóng hormon, sự thay đổi phiên mã lên cả gen đánh dấu di truyền đã biết và chưa xác định (ví dụ thảm Northern), sự thay đổi về cơ chế chuyển hóa tế bào như sự tăng trưởng của tế bào và sự thay đổi độ pH, và sự thay đổi về vật truyền tin thứ cấp trong tế bào như Ca^{2+} , IP3, cGMP, hoặc cAMP.

Thử nghiệm đối với GPCR được ưu tiên bao gồm các tế bào mà được bổ sung ion hoặc thuốc nhuộm nhạy với điện áp để báo cáo hoạt tính thụ thể. Thử nghiệm xác định hoạt tính của các thụ thể này còn có thể sử dụng chất chủ vận và chất đối kháng

đã biết đối với thụ thể gắn kết với protein G khác làm đối chứng để đánh giá hoạt tính của hợp chất thử nghiệm. Trong thử nghiệm để xác định hợp chất điều biến (ví dụ chất chủ vận, chất đối kháng), sự thay đổi về mức ion trong điện thế của tế bào chất hoặc màng sẽ được theo dõi bằng cách sử dụng lần lượt chất chỉ thị phát huỳnh quang nhạy ion hoặc có điện áp của màng. Các chất chỉ thị nhạy ion và đoạn môi điện áp mà có thể được sử dụng là các chất được mô tả trong tài liệu *Molecular Probes* 1997 Catalog. Đối với thụ thể gắn kết với protein G, protein G pha tạp như G α 15 và G α 16 có thể được sử dụng trong thử nghiệm về sự lựa chọn (xem tài liệu Wilkie et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, 88:10049-10053 (1991)).

Sự hoạt hóa thụ thể khơi mào các sự kiện nội bào tiếp theo, ví dụ làm tăng vật truyền tin thứ cấp. Việc hoạt hóa một số thụ thể gắn kết với protein G sẽ kích thích sự tạo thành inositol triphosphat (IP3) thông qua việc thủy phân phosphatidylinositol gây ra qua trung gian phospholipaza C (tài liệu Berridge & Irvine, *Nature*, 312:315-21 (1984)). Đến lượt mình, IP3 sẽ kích thích sự giải phóng khối lượng dự trữ ion canxi nội bào. Do đó, sự thay đổi về mức ion canxi của tế bào chất, hoặc sự thay đổi về mức vật truyền tin thứ hai như IP3 có thể được sử dụng để đánh giá chức năng thụ thể gắn kết với protein G. Các tế bào biểu hiện thụ thể gắn kết với protein G này có thể có mức canxi tế bào chất gia tăng là kết quả của việc đóng góp từ sự giải phóng canxi từ kho dự trữ nội bào lẫn lượng vào của canxi ngoại bào qua kênh ion màng huyết tương.

Theo phương án được ưu tiên, hoạt tính của polypeptit T1R được xác định bằng gen đồng biểu hiện T1R ổn định hoặc tạm thời, tốt hơn là ổn định, trong tế bào khác loài cùng với protein G pha tạp mà liên kết thụ thể với con đường tải nạp tín hiệu phospholipaza C (xem tài liệu Offermanns & Simon, *J. Biol. Chem.*, 270:15175-15180 (1995)). Theo phương án được ưu tiên, dòng tế bào là HEK-293 (không biểu hiện bình thường gen T1R) và protein G pha tạp là G α 15 (Offermanns &

Simon, tên tài liệu như nêu trên). Việc điều biến tải nạp tín hiệu vị giác được thử nghiệm bằng cách xác định những thay đổi về mức Ca^{2+} trong tế bào, mức này sẽ làm thay đổi đáp ứng với quá trình điều biến con đường tải nạp tín hiệu T1R thông qua việc dùng phân tử mà liên kết với polypeptit T1R. Sự thay đổi về mức Ca^{2+} được xác định tùy ý bằng cách sử dụng thuốc nhuộm chỉ thị Ca^{2+} phát huỳnh quang và phép chụp ảnh huỳnh quang.

Theo phương án khác, sự thủy phân phosphatidyl inositol (PI) có thể được phân tích theo Patent Mỹ 5,436,128. Nói ngắn gọn, thử nghiệm này liên quan đến việc đánh dấu tế bào bằng 3H-myoinositol trong 48 giờ hoặc lâu hơn. Các tế bào đã được đánh dấu được xử lý bằng hợp chất thử nghiệm trong 1 giờ. Các tế bào đã qua xử lý được làm tan và chiết trong clorofom-metanol-nước, sau đó inositol phosphat được tách ra bằng cách sắc ký trao đổi ion và được định lượng bằng cách đếm nhấp nháy. Mức tăng kích thích (lần) được xác định bằng cách tính tỷ lệ cpm (chu kỳ trên giây) khi có mặt của chất chủ vận, với cpm khi có mặt của đối chứng đệm. Tương tự, mức tăng ức chế (lần) được xác định bằng cách tính tỷ lệ cpm khi có mặt chất đối kháng với cpm khi có mặt đối chứng đệm (đối chứng này có thể hoặc không chứa chất chủ vận)

Thử nghiệm thụ thể khác có thể liên quan đến việc xác định mức nucleoti vòng nội bào, ví dụ, cAMP hoặc cGMP. Trong các trường hợp mà việc hoạt hóa thụ thể dẫn đến làm giảm mức nucleotit vòng, tốt hơn nên các tế bào được cho tiếp xúc với tác nhân làm tăng mức nucleotit vòng nội bào, ví dụ forskolin, trước khi thêm hợp chất hoạt hóa thụ thể vào tế bào trong thử nghiệm. Theo một phương án, sự thay đổi về cAMP hoặc cGMP nội bào có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch. Phương pháp được mô tả trong tài liệu Offermanns & Simon, *J. Bio. Chem.*, 270:15175-15180 (1995), có thể được sử dụng để xác định mức cAMP. Hơn nữa, phương pháp được mô tả trong tài liệu Felley-Bosco et al., *Am. J. Resp. Cell and Mol.*

Biol., 11:159-164 (1994), có thể được sử dụng để xác định GMP vòng. Ngoài ra, kit thử nghiệm để xác định cAMP và/hoặc cGMP được mô tả trong Patent Mỹ 4,115,538.

Theo phương án khác, mức độ phiên mã có thể được xác định để đánh giá tác động của hợp chất thử nghiệm lên tải nạp tín hiệu. Tế bào vật chủ chứa polypeptit T1R đang được quan tâm được tiếp xúc với hợp chất thử nghiệm trong thời gian thích hợp để ảnh hưởng đến tương tác bất kỳ, và tiếp đó mức biểu hiện gen được đánh giá. Lượng thời gian tác dụng lên tương tác này có thể được xác định theo kinh nghiệm, ví dụ bằng cách chạy trong 1 khoảng thời gian và xác định mức phiên mã dưới dạng hàm của thời gian. Lượng phiên mã có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết. Ví dụ, sự biểu hiện ARN thông tin của protein đang được quan tâm có thể được phát hiện bằng cách sử dụng phương pháp thấm Northern hoặc sản phẩm polypeptit của nó có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch. Theo cách khác, thử nghiệm dựa trên sự phiên mã sử dụng gen thông báo có thể được sử dụng như được mô tả trong Patent Mỹ 5,436,128. Gen thông báo có thể là, ví dụ chloramphenicol axetyltransferaza, luxiferaza, beta-galactosidaza beta-lactamaza và phosphataza kiềm. Hơn nữa, protein đang được quan tâm có thể được sử dụng làm gen thông báo gián tiếp nhờ sự gắn vào gen thông báo thứ hai như protein phát huỳnh quang màu xanh (ví dụ, xem tài liệu Mistili & Spector, *Nature Biotechnology*, 15:961-964 (1997)).

Tiếp đó, lượng phiên mã này được so sánh với lượng phiên mã trong tế bào tương tự mà không có hợp chất thử nghiệm, hoặc nó có thể được so sánh với lượng phiên mã trong tế bào gần giống nhưng thiếu polypeptit T1R đang được quan tâm. Tế bào gần giống này có thể thu được từ các tế bào tương tự mà từ đó, tế bào tái tổ hợp được điều chế nhưng không được biến đổi bằng cách đưa ADN khác loài vào. Sự khác nhau bất kỳ về lượng phiên mã cho thấy rằng, hợp chất thử nghiệm có một số cách

làm thay đổi hoạt tính của polypeptit T1R đang được quan tâm.

4. Động vật chuyển gen không phải người biểu hiện thụ thể nhạy cảm hóa học

Động vật không phải là người biểu hiện tổ hợp các trình tự thụ thể vị giác T1R được bộc lộ ở đây còn có thể được sử dụng cho thử nghiệm thụ thể. Biểu hiện này có thể được sử dụng để xác định liệu hợp chất thử nghiệm có gắn kết đặc hiệu với phức thụ thể xuyên màng vị giác của động vật có vú *in vivo* bằng cách cho động vật không phải là người được chuyển nhiễm ổn định hoặc tạm thời tiếp xúc với axit nucleic mã hóa thụ thể nhạy cảm hóa học hoặc vùng gắn kết phối tử của nó bằng hợp chất thử nghiệm và xác định xem liệu tế bào động vật có phản ứng với hợp chất thử nghiệm bằng gắn kết đặc hiệu với phức thụ thể polypeptit.

Động vật được chuyển nhiễm hoặc gây nhiễm bằng vectơ được bộc lộ ở đây đặc biệt hữu hiệu cho thử nghiệm để xác định và mô tả đặc điểm chất kích thích có vị giác mà có thể gắn kết vào thụ thể đặc hiệu hoặc nhóm các thụ thể. Động vật được làm nhiễm bằng vectơ biểu hiện trình tự thụ thể vị giác của người này có thể được sử dụng để thử nghiệm *in vivo* chất kích thích có vị giác và tác động của nó lên, ví dụ, sinh lý tế bào (ví dụ lên neuron vị giác), lên hệ thần kinh trung ương (CNS) hoặc lên hành vi. Theo cách khác, dòng tế bào ổn định mà biểu hiện T1R hoặc tổ hợp của nó, có thể được sử dụng làm chất cho chuyển nucleic để tạo ra động vật chuyển gen được tách dòng, động vật này biểu hiện ổn định T1R cụ thể hoặc tổ hợp của nó. Phương pháp sử dụng chất chuyển nucleic để tạo ra động vật tách dòng mà biểu hiện ADN khác loài mong muốn là đối tượng của nhiều patent Mỹ đã ban hành được cấp cho University of Massachusetts (cấp giấy phép cho Advanced Cell Technology, Inc.) và Roslin Institute (cấp giấy phép cho Geron Corp.).

Phương pháp để làm nhiễm/biểu hiện axit nucleic và vectơ, riêng biệt hoặc dưới dạng thư viện, là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một loạt các thông số về tế bào, cơ quan riêng biệt hoặc động vật nguyên vẹn có thể được xác định bằng các

phương pháp khác nhau. Trình tự T1R được bộc lộ ở đây có thể được đồng biểu hiện trong mô vị giác của động vật chẳng hạn bằng cách giải phóng tác nhân gây nhiễm, ví dụ vectơ biểu hiện virut adeno.

Gen thụ thể vị giác nội sinh vẫn giữ được hoạt tính chức năng và hoạt tính kiểu hoang (bẩm sinh) cũng có thể có mặt. Trong trường hợp khác, nếu mong muốn toàn bộ hoạt tính của thụ thể vị giác là nhờ thụ thể lai ngoại sinh được đưa vào, việc sử dụng dòng bị bất hoạt là được ưu tiên. Phương pháp tạo ra động vật chuyển gen không phải là người, đặc biệt là chuột chuyển gen, và việc lựa chọn và điều chế cấu trúc tái tổ hợp để tạo ra các tế bào biến nạp là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Việc tạo nên tế bào hoặc động vật bị “bị bất hoạt” được dựa trên cơ sở là mức biểu hiện của gen cụ thể trong tế bào động vật có vú có thể được làm giảm hoặc được loại bỏ hoàn toàn bằng cách đưa hệ gen vào trình tự ADN mới mà đóng vai trò phá vỡ một số phần của trình tự ADN của gen bị ức chế. Ngoài ra, “sự lỏng lẻo gen” có thể được sử dụng để phá vỡ gen vật chủ, và tế bào nguồn phôi (*Embryonic Stem: ES*) của chuột có thể được sử dụng để tạo ra động vật chuyển gen bị bất hoạt (ví dụ, xem tài liệu Holzschu, *Transgenic Res* 6:97-106 (1997)). Việc lỏng gen ngoại sinh thường là bằng cách tái tổ hợp tương đồng giữa các trình tự axit nucleic bổ trợ. Trình tự ngoại sinh là một phần của gen đích được biến đổi, ví dụ trình tự điều hòa exon, intron hoặc phiên mã, hoặc trình tự hệ gen bất kỳ mà có thể ảnh hưởng đến mức biểu hiện của gen đích; hoặc tổ hợp của chúng. Sự tạo đích gen bằng cách tái tổ hợp tương đồng trong tế bào nguồn phôi đa tiềm năng cho phép làm thay đổi một cách chính xác trình tự hệ gen đang được quan tâm. Kỹ thuật bất kỳ có thể được sử dụng để tạo ra, để thử nghiệm, để nhân giống động vật bị bất hoạt, ví dụ xem tài liệu Bijvoet, *Hum. Mol. Genet.* 7:53-62 (1998); Moreadith, *J. Mol. Med.* 75:208-216 (1997); Tojo, *Cytotechnology* 19:161-165 (1995); Mudgett, *Methods Mol. Biol.* 48:167-184 (1995); Longo, *Transgenic Res.* 6:321-328 (1997); các Patent Mỹ số 5,616,491;

5,464,764; 5,631,153; 5,487,992; 5,627,059; 5,272,071; các Công bố đơn quốc tế số WO 91/09955; W093/09222; WO 96/29411; WO 95/31560; WO 91/12650.

Axit nucleic được bộc lộ ở đây cũng có thể được sử dụng làm chất phản ứng để tạo ra tế bào của người bị “bị bất hoạt” và thế hệ con của nó. Tương tự, axit nucleic cũng có thể được sử dụng làm chất phản ứng để tạo ra sự “knock-in” (sự thay thế gen bằng thể đột biến của gen tương tự bằng cách sử dụng sự tái tổ hợp khác loài) ở chuột nhắt. Trình tự gen T1R của người hoặc chuột cống có thể thay thế cho T1R tiến hóa thẳng ở hệ gen của chuột nhắt. Theo cách này, chuột nhắt biểu hiện T1R của người hoặc chuột cống sẽ được tạo ra. Sau đó, chuột nhắt này có thể được sử dụng để phân tích chức năng của T1R của người hoặc của T1R của chuột cống, và để xác định phối tử đối với T1R này.

a. Chất điều biến

Hợp chất được thử nghiệm làm chất điều biến thành phần họ T1R có thể là hợp chất hóa học nhỏ bất kỳ, hoặc thực thể sinh học của nó, như protein, axit nucleic hoặc lipid. Ví dụ về nó bao gồm 5¹ IMP và 5¹ GMP. Hợp chất hóa học cần thiết bất kỳ có thể được sử dụng làm chất điều biến hoặc phối tử tiềm năng trong thử nghiệm được bộc lộ ở đây, mặc dù hầu hết các hợp chất mà không tan trong dung dịch nước được thử nghiệm. Thử nghiệm này có thể được thiết kế để sàng lọc thư viện các chất hóa học lớn bằng cách tự động hóa các bước thử nghiệm và tạo ra hợp chất từ nguồn thông thường bất kỳ; các thử nghiệm này thường được thực hiện song song (ví dụ, ở dạng tế vi trên các đĩa tế vi trong các thử nghiệm có sử dụng người máy). Rõ ràng rằng, thư viện các chất hóa học có thể được tổng hợp bằng một trong nhiều phản ứng hóa học (ví dụ hóa học thuộc sở hữu Senomyx). Ngoài ra, còn nhiều nhà cung cấp hợp chất hóa học nữa, bao gồm Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Switzerland) và các hãng khác.

Theo phương án được ưu tiên, phương pháp thử nghiệm năng suất cao liên quan đến việc tạo ra thư viện chất hóa học hoặc peptit tổ hợp chứa một số lớn hợp chất tác dụng lên vị giác tiềm năng (hợp chất điều biến hoặc phối tử tiềm năng). Sau đó, “thư viện chất hóa học tổ hợp” hoặc “thư viện phối tử” này được sàng lọc trong một hoặc nhiều thử nghiệm được mô tả ở đây để xác định các thành phần của thư viện này (loại hoặc phân nhóm hóa học cụ thể) mà thể hiện hoạt tính đặc trưng mong muốn. Hợp chất vừa được xác định có thể thực hiện chức năng làm “hợp chất dẫn dắt” thông thường hoặc bản thân chúng có thể được sử dụng làm chất điều chỉnh vị giác tiềm năng hoặc thực sự.

Tốt hơn là, thư viện này sẽ được thử nghiệm dựa trên tế bào hoặc dòng tế bào biểu hiện ổn định T1R hoặc tổ hợp của T1R, tức là T1R1/T1R3 hoặc T1R2/T1R3 và được ưu tiên là protein G thích hợp, ví dụ $G_{\alpha 15}$. Như được thể hiện trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây, các dòng tế bào ổn định này có đáp ứng rất rõ rệt với chất kích thích có vị giác, ví dụ, chất kích thích có vị umami hoặc vị ngọt. Tuy nhiên, tế bào và dòng tế bào mà biểu hiện tạm thời một hoặc nhiều T1R cũng có thể được sử dụng trong thử nghiệm này.

Thư viện chất hóa học tổ hợp là sự chọn lọc các hợp chất hóa học khác nhau được tạo ra bằng cách tổng hợp hóa học hoặc sinh học, bằng cách kết hợp một số “khối xây dựng” hóa học như chất phản ứng. Ví dụ, thư viện chất hóa học tổ hợp thẳng như thư viện polypeptit được tạo thành bằng cách kết hợp một tập hợp các khối xây dựng (axit amin) theo nhiều cách có thể đối với một độ dài hợp chất đã cho (tức là số axit amin trong hợp chất polypeptit). Hàng nghìn đến hàng triệu hợp chất hóa học có thể được tổng hợp bằng cách kết hợp tổ hợp các khối xây dựng hóa học này.

Việc điều chế và sàng lọc thư viện chất hóa học tổ hợp là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật. Thư viện chất hóa học tổ hợp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thư viện peptit (ví dụ, Patent Mỹ 5,010,175, Furka, *Int. J. Pept.*

Prot. Res., 37:487-493 (1991) và Houghton et al., *Nature*, 354: 84-88 (1991)). Các hóa chất khác để tạo ra thư viện chất hóa học khác nhau cũng có thể sử dụng. Các hóa chất này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: peptoit (ví dụ, Công bố đơn PCT Số WO 91/19735), peptit mã hóa (ví dụ, Công bố đơn PCT WO 93/20242), bio-oligome ngẫu nhiên (ví dụ, Công bố đơn PCT Số WO 92/00091), benzodiazepin (ví dụ, Patent Mỹ Số 5,288,514), các Diversomer như hydantoin, benzodiazepin và dipeptit (tài liệu Hobbs et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 90: 6909-6913 (1993)), polypeptit vinylog (tài liệu Hagihara et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 114:6568 (1992)), chất bắt chước peptit không phải là peptit có giàn glucoza (tài liệu Hirschmann et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 114:9217-9218 (1992)), tổng hợp hữu cơ tương tự thư viện hợp chất nhỏ (tài liệu Chen et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 116:2661 (1994)), oligocarbamat (tài liệu Cho et al., *Science*, 261:1303 (1993)), peptidyl phosphonat (tài liệu Campbell et al., *J. Org. Chem.*, 59:658 (1994)), thư viện axit nucleic (tài liệu Ausubel, Berger và Sambrook, tên tài liệu như nêu trên), thư viện peptit axit nucleic (Patent Mỹ số 5,539,083), thư viện kháng thể (tài liệu Vaughn et al., *Nature Biotechnology*, 14 (3):309-314 (1996) và PCT/US96/10287), thư viện hydrat cacbon (tài liệu Liang et al., *Science*, 274:1520-1522 (1996) và Patent Mỹ 5,593,853), thư viện phân tử hữu cơ nhỏ (benzodiazepin, Baum, C&EN, Jan 18, page 33 (1993); thiazolidinon và metathiazanon, Patent Mỹ số 5,549,974; pynrolidin, Patent Mỹ số 5,525,735 và 5,519,134; hợp chất morpholino, Patent Mỹ số 5,506,337; benzodiazepin, Patent Mỹ số 5,288,514, và các chất khác).

Thiết bị để tạo ra thư viện tổ hợp là có sẵn ở quy mô công nghiệp (ví dụ, xem tài liệu 357 MPS, 390 MPS (Advanced Chem Tech, Louisville KY), Symphony (Rainin, Woburn, MA), 433A (Applied Biosystems, Foster City, CA), 9050 Plus (Millipore, Bedford, MA)). Ngoài ra, một số thư viện tổ hợp bản thân chúng tự có sẵn (ví dụ, xem tài liệu ComGenex, Princeton, NJ; Tripos, Inc., St. Louis, MO; 3D

Pharmaceuticals, Exton, PA; Martek Biosciences; Columbia, MD; v.v.).

Các chất điều biến T1R có thể được sử dụng trong sản phẩm thực phẩm bất kỳ, bánh kẹo, dược phẩm hoặc thành phần của nó để nhờ đó điều chỉnh vị của sản phẩm, chế phẩm hoặc thành phần theo cách mong muốn. Ví dụ, chất điều biến T1R mà làm tăng sự nhận cảm vị ngọt có thể được thêm vào để làm ngọt sản phẩm hoặc chế phẩm; chất điều biến T1R mà làm tăng sự nhận cảm vị umami có thể được thêm vào thực phẩm để làm tăng vị ngon miệng. Theo cách khác, chất đối kháng T1R có thể được sử dụng để ức chế vị ngọt và/hoặc vị umami.

b. Kit

Gen T1R và thể tương đồng của nó là công cụ hữu hiệu để xác định các tế bào thụ thể nhạy cảm hóa học, đối với các phương pháp xác định quan hệ cha con và pháp y, và để thử nghiệm tải nạp tín hiệu vị giác. Chất phản ứng đặc hiệu với thành phần học T1R mà lai đặc hiệu với axit nucleic T1R, như đoạn dò và đoạn môi T1R, và chất phản ứng đặc hiệu T1R mà gắn kết đặc hiệu với polypeptit T1R, ví dụ kháng thể T1R được sử dụng để thử nghiệm sự biểu hiện tế bào vị giác và điều hòa quá trình tải nạp tín hiệu vị giác.

Thử nghiệm axit nucleic đối với sự có mặt của ADN và ARN của thành viên họ T1R trong mẫu bao gồm kỹ thuật khác nhau mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết, như phân tích Southern, phân tích Northern, chấm điểm, bảo vệ ARNaza, phân tích S1, kỹ thuật khuếch đại như PCR, và lai tại chỗ. Trong phương pháp lai tại chỗ, ví dụ, axit nucleic đích được giải phóng từ bề mặt xung quanh tế bào của nó sao cho có sẵn để lai trong tế bào trong khi vẫn giữ được hình thái học tế bào để giải thích và phân tích tiếp. Các bài báo sau đây cung cấp cái nhìn chung trong lĩnh vực kỹ thuật về sự lai tại chỗ: Singer et al., *Biotechniques*, 4:230250 (1986); Haase et al., *Methods in Virology*, vol. VII, pp. 189-226 (1984); và *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (Names et al., eds. 1987). Ngoài ra, polypeptit T1R có thể được phát hiện

bằng nhiều kỹ thuật thử nghiệm miễn dịch khác nhau được mô tả trên đây. Mẫu thử nghiệm thường được so sánh với cả mẫu đối chứng dương (ví dụ, mẫu biểu hiện polypeptit T1R tái tổ hợp) lẫn mẫu đối chứng âm.

Sáng chế cũng bộc lộ kit để thử nghiệm chất điều biến thành phần họ T1R. Kit này có thể được tạo ra từ chất và chất phản ứng sẵn có. Ví dụ, kit này có thể bao gồm một hoặc nhiều chất bất kỳ sau đây: axit nucleic hoặc protein T1R, ống phản ứng, và hướng dẫn để thử nghiệm hoạt tính T1R. Tùy ý, bột kit này chứa thụ thể T1R có hoạt tính sinh học hoặc dòng tế bào mà biểu hiện ổn định hoặc tạm thời thụ thể vị giác chứa T1R có hoạt tính sinh học. Một loạt kit và thành phần khác nhau có thể được tạo ra theo sáng chế, tùy thuộc vào người sử dụng kit và yêu cầu cụ thể của người sử dụng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Trong khi sáng chế được mô tả chi tiết trên đây, các ví dụ sau đây được đưa ra nhằm minh họa cho các phương án ưu tiên. Các ví dụ này chỉ nhằm minh họa cho sáng chế mà không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Trong các trình tự protein được trình bày ở đây, mã một chữ cái X hoặc Xaa dùng để chỉ gốc bất kỳ trong số 20 gốc axit amin thông thường. Trong các trình tự ADN được trình bày ở đây, mã một chữ cái N hoặc n dùng để chỉ bazơ nucleotit bất kỳ trong số bốn bazơ nucleotit thông thường, A, T, C hoặc G.

Ví dụ 1

Tạo ra cấu trúc biểu hiện hT1R không chứa intron

Cấu trúc biểu hiện hT1R không chứa intron được tách dòng bằng tổ hợp các phương pháp dựa trên ADN bổ trợ và dựa trên ADN hệ gen. Để tạo ra cấu trúc biểu hiện hT1R1 có chiều dài đầy đủ, hai exon mã hóa 5' được nhận dạng trong khoảng cách hT1R1 được tách dòng (số lưu giữ AL159177) được kết hợp bằng quang lặp

PCR, và tiếp đó liên kết với dòng vô tính ADN bổ trợ của tinh hoàn bị cắt ngắn. Cấu trúc biểu hiện hT1R2 được tạo ra từ khoảng cách hệ gen hT1R2 được xác định trình tự một phần. Hai exon 5' thiếu hT1R2 được xác định bằng cách thử nghiệm thư viện bắt buộc của khoảng cách hệ gen được tách dòng vô tính bằng cách sử dụng đoạn dò thu được từ trình tự mã hóa chuột tương ứng. Tiếp đó, exon mã hóa được kết hợp bằng quăng lạp PCR để tạo ra cấu trúc biểu hiện có chiều dài đầy đủ. Cấu trúc biểu hiện hT1R3 được tạo ra bằng quăng lạp PCR từ khoảng cách hệ gen hT1R3 đã được xác định trình tự (số lưu giữ AL139287). T1R3 của chuột được tách ra khỏi thư viện ADN bổ trợ có nguồn gốc từ mô vị giác của chuột bằng cách sử dụng đoạn exon rT1R3 được tạo ra bằng PCR thoái biến dựa trên hT1R3. Các trình tự ADN bổ trợ của hT1R1, ADN bổ trợ của rT1R2 một phần và trình tự hệ gen hT1R2 một phần có được từ Dr. Charles Zulcer (University of California, San Diego).

Trình tự axit nucleic và axit amin đối với trình tự được tách dòng T1R được xác định ở trên cũng như trình tự T1R có chiều dài đầy đủ và một phần khác được nêu trong danh sách trình tự.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến việc dịch mã khái niệm sau đây, tương ứng với vùng đầu tận cùng C của hai cặp tiến hóa thẳng của T1R của cá, thu được từ các đoạn trình tự hệ gen chưa được công bố. Fugu T1RA có nguồn gốc từ số lưu giữ 'scaffold 164'; Fugu T1RB có nguồn gốc từ số lưu giữ LPC61711; Tetradon T1RA có nguồn gốc từ số lưu giữ AL226735; Tetradon T1RB có nguồn gốc từ số lưu giữ AL222381. Sự tối nghĩa trong dịch mã khái niệm ('X') là kết quả của sự tối nghĩa trong trình tự dữ liệu. Các trình tự này có thể được tìm thấy trong danh sách trình tự.

Hơn nữa, số lưu giữ và trích dẫn tham khảo liên quan đến T1R của chuột nhắt và chuột đồng và biến thể alen của nó trong vùng chung được nêu dưới đây: rT1R1 (Số lưu giữ AAD18069) (Hoon et al., *Cell* 96 (4):541-51 (1999)); rT1R2 (Số lưu giữ AAD18070) (Hoon et al., *Cell* 96 (4):541-59 (1999)); mT1R1 (Số lưu giữ

AAK39437); mT1R2 (Số lưu giữ AAK 39438); mT1R3 (Accession AAK 55537) (Max et al., *Nat. Genet.* 28 (1):58-63 (2001)); rT1R1 (Số lưu giữ AAK7092) (Li et al., *Mamm. Genome* (12 (1):13-16 (2001)); mT1R1 (Số lưu giữ NP 114073); mT1R1 (Số lưu giữ AAK07091) (Li et al., *Mamm. Genome* (121):13-16 (2001)); rT1R2 (Số lưu giữ AAD18070) (Hoon et al., *Cell* 9664): 541-551 (1999)); mT1R2 (Số lưu giữ NP114079); mT1R3 (Số lưu giữ AAK39436); mT1R3 (Số lưu giữ BAB47181); (Kitagawa et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 283 (1):236-42 (2001)); mT1R3 (Số lưu giữ NP114078); mT1R3 (Số lưu giữ AAK55536) (Max et al., *Nat. Genet.* 28 (1):58-63 (2001)); và mT1R3 (Số lưu giữ AAK01937).

Ví dụ 2

Sự sắp xếp thẳng hàng trình tự T1R của người và của chuột

Trình tự T1R tách dòng được chọn từ các trình tự được xác định ở trên được sắp xếp thẳng hàng với T1R tương ứng của chuột. Như được thể hiện trên Fig.1, T1R1 của người, T1R2 của người và T1R3 của người và T1R3 của chuột được sắp xếp thẳng hàng với T1R được mô tả ở trên (rT1R1 có Số lưu giữ AAD18069 và rT1R2 có Số lưu giữ AAD18070), thụ thể glutamat hỗ biến trao đổi chất mGluR1 của chuột (Số lưu giữ P23385); và thụ thể nhạy canxi của người (Số lưu giữ P41180). Để làm rõ việc so sánh, vùng đầu tận cùng C của mGluR1 và thụ thể nhạy canxi được cắt ngắn. Bảy đoạn xuyên màng tiềm năng được bỏ vào hộp màu xanh dương. Các gốc mà tiếp xúc với carbutylat mạch nhánh glutamat trong cấu trúc tinh thể mGluR1 được cho vào hộp màu đỏ, và gốc mà tiếp xúc với nhóm α -axit amin glutamat được cho vào hộp màu xanh lục. Gốc xystein của mGluR1 và thụ thể nhạy canxi liên quan đến việc hình thành dựa trên disulfua giữa các cấu trúc dưới phân tử được khoanh tròn bằng màu đỏ tía. Các xystein này không được bảo tồn trong T1R1 và T1R2, nhưng được định vị trong vùng thoái biến của sự sắp xếp thẳng hàng mà chứa gốc xystein T1R3 tương tự tiềm năng cũng được khoanh tròn.

Ví dụ 3

Chứng minh bằng RT-PCR rằng hT1R2 và hT1R3 được biểu hiện trong mô vị giác

Như được thể hiện trên Fig.2, hT1R2 và hT1R3 được biểu hiện trong mô vị giác: sự biểu hiện của cả hai gen có thể được phát hiện bằng RT-PCR từ nhú dạng dài được tách người.

Ví dụ 4

Phương pháp sự biểu hiện khác loài của T1R trong các tế bào khác loài

Dẫn xuất HEK-293 (Chandrashekar et al., *Cell* 100 (6): 703-11 (2000)), biểu hiện ổn định Glx5, được phát triển và duy trì ở nhiệt độ 37°C trong môi trường Đại bàng biến tính Dulbeco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (DMEM, Gibco BRL) được bổ sung thêm FBS 10%, axit amin không thiết yếu MEM (Gibco BRL), và blastixidin 3µg/ml. Đối với thử nghiệm chụp ảnh canxi, các tế bào trước hết được gieo trong đĩa nuôi cấy mô 24 lỗ (khoảng 0,1 triệu tế bào mỗi lỗ), và được chuyển nhiễm liposom bằng Mirus TransIt-293 (PanVera). Để làm giảm đến mức tối thiểu sự mất nhạy cảm do glutamat và glucoza gây ra, DMEM bổ sung được thay thế bằng DMEM/GlutaMAX chứa glucoza nồng độ thấp (Gibco BRL) khoảng 24 giờ sau khi chuyển nhiễm. Sau 24 giờ, các tế bào được bổ sung thuốc nhuộm canxi Flo-4 (Molecular Probes), 3µM trong dung dịch đệm PBS Dulbecco (DPBS, GibcoBRL) trong 1,5 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi thay thế bằng 250µl DPBS, việc kích thích được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng bằng cách thêm 200µl DPBS được bổ sung thêm chất kích thích có vị giác. Sự di động của canxi được theo dõi trên kính hiển vi Axiovert S100 TV (Zeiss) bằng cách sử dụng phần mềm Imaging Workbench 4.0 (Axon). Đáp ứng của T1R1/T1R3 và T1R2/T1R3 là đặc biệt ngắn ngủi – sự gia tăng canxi hiếm khi tồn tại lâu hơn 15 giây – và thiếu đồng bộ. Do đó, số tế bào đáp ứng là hằng số tương đối theo thời gian; nên đáp ứng của tế bào được định lượng bằng cách các đếm bằng tay số tế bào đáp ứng tại thời điểm cố định, thường là 30 giây sau

khi thêm chất kích thích.

Ví dụ 5

T1R2/T1R3 của người thực hiện chức năng làm thụ thể vị ngọt

Tế bào HEK biểu hiện ổn định $G_{\alpha 15}$ được chuyển nhiễm tạm thời bằng T1R2, T1R3 và T1R2/T1R3 của người, và được thử nghiệm về sự gia tăng canxi nội bào đáp ứng với nồng độ sucroza gia tăng (Fig.3 (a)). Hơn nữa, đáp ứng liều T1R2/T1R3 được xác định cho nhiều chất kích thích có vị ngọt (Fig.3 (b)). Phần trăm tối đa của tế bào đáp ứng là khác nhau đối với các chất tạo vị ngọt khác nhau, nằm trong khoảng từ 10 đến 30%. Để làm rõ ràng, đáp ứng liều được chuẩn hóa thành phần trăm tối đa của tế bào đáp ứng. Các giá trị trên Fig.3 là giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn (s.e.) của bốn đáp ứng độc lập. Vòng tròn trực X đánh dấu ngưỡng phát hiện tâm-vật lý được xác định bằng thử nghiệm vị giác. Gurmarin (pha loãng 50 lần dịch chiết trong nước *Gymnema sylvestre* 10g/l đã được lọc) ức chế đáp ứng của T1R2/T1R3 với sucroza 250mM, nhưng không ức chế đáp ứng của thụ thể gây tiết $\beta 2$ - adrenalin nội sinh với isoproterenol 20 μ M (Fig.3 (b)). Fig.3 (c) bao gồm đáp ứng chuẩn hóa của các dòng tế bào đồng biểu hiện T1R2/T1R3 với các chất tạo vị ngọt khác nhau (sucroza, aspartam, D-tryptophan và sacarin).

Ví dụ 6

T1R2/T1R3 của chuột còn thực hiện chức năng làm thụ thể vị ngọt

Tế bào HEK biểu hiện ổn định $G_{\alpha 15}$ được chuyển nhiễm tạm thời bằng hT1R2/hT1R3, rT1R2/rT1R3, hT1R2/rT1R3, và rT1R2/hT1R3. Tiếp đó, các tế bào đã chuyển nhiễm này được thử nghiệm về mức canxi nội bào gia tăng đáp ứng với sucroza 350mM, tryptophan 25mM, aspartam 15mM và monelin 0,05%. Kết quả với sucroza và aspartam được nêu trên Fig.4 và chỉ ra rằng rT1R2/rT1R3 còn thực hiện chức năng làm thụ thể vị ngọt. Hơn nữa, các kết quả này gợi ý rằng T1R2 có thể kiểm soát tính đặc hiệu phối tử của T1R2/T1R3.

Ví dụ 7

Đáp ứng của T1R2/T1R3 bằng cách sử dụng thử nghiệm dựa trên sự phát huỳnh quang tự động

Tế bào HEK biểu hiện ổn định Gα15 được chuyển nhiễm tạm thời bằng hT1R2 và hT1R3. Các tế bào này được bổ sung thuốc nhuộm canxi Flo-4 và đáp ứng của chúng với chất tạo vị ngọt được xác định bằng cách sử dụng máy đọc đĩa phát huỳnh quang. Fig.5 bao gồm đáp ứng của tế bào biểu hiện hT1R2/hT1R³ và của các tế bào chỉ biểu hiện hT1R3 (J19-22) đối với xyclamat (12,5mM). Kết quả về sự phát huỳnh quang thu được thể hiện rằng, các đáp ứng với chất kích thích có vị giác này chỉ xảy ra trong các tế bào biểu hiện hT1R2/hT1R3. Fig.6 chứa đường cong đáp ứng liều đã được chuẩn hóa, kết quả của đường cong này cho thấy rằng hT1R2 và hT1R3 cùng thực hiện chức năng làm thụ thể vị giác của người dựa trên tương tác đặc hiệu liều lượng của chúng với các chất kích thích có vị ngọt khác nhau. Cụ thể, Fig.6 chứa đường cong đáp ứng liều đối với sucroza, tryptophan và các chất tạo vị ngọt có sẵn khác. Các kết quả này chỉ ra rằng, T1R2/T1R3 là thụ thể vị ngọt của người làm trình tự xếp loại và giá trị ngưỡng thu được trong thử nghiệm phản ánh rất kỹ các giá trị đối với vị ngọt của người.

Ví dụ 8

Gốc gắn kết phối tử của mGluR1 được bảo tồn trong T1R1

Như được thể hiện trên Fig.6, gốc gắn kết phối tử chủ chốt của mGluR1 được bảo tồn trong T1R1. Sự tương tác của glutamat với mGluR1 được thể hiện trong nhiều gốc chủ chốt nổi bật theo Sơ đồ có màu giống như Fig.1.

Ví dụ 9

T1R1/T1R3 ở người thực hiện chức năng làm thụ thể vị umami

Tế bào HEK biểu hiện ổn định Ga15 được chuyển nhiễm tạm thời bằng T1R1, T1R3 và T1R1/T1R3 ở người và được thử nghiệm về mức tăng canxi nội bào đáp ứng

với nồng độ gia tăng của glutamat (Fig.8 (a)), và glutamat 0,5mM, IMP 0,2mM, và glutamat 0,5mM cộng với IMP 0,2mM (Fig.8 (b)). Đáp ứng liều của T1R1/T1R3 của người được xác định đối với glutamat với sự có mặt và không có mặt của IMP 0,2mM (Fig.8 (c)). Phần trăm tối đa của các tế bào đáp ứng là khoảng 5% đối với glutamat và khoảng 10% đối với glutamat cộng thêm IMP. Để rõ ràng hơn, đáp ứng liều được chuẩn hóa thành phần trăm tối đa của tế bào đáp ứng. Giá trị này là trung bình $\pm$ sai số chuẩn (s. e.) của bốn đáp ứng độc lập. Vòng tròn trục X đánh dấu ngưỡng phát hiện vị giác được xác định bằng thử nghiệm vị giác.

Ví dụ 10

PDZIP có chức năng làm trình tự xuất khẩu

Trình tự 6 gốc PDZIP (SVSTW (SEQ ID NO: 1)) được dung hợp với vùng đầu tận cùng C của T1R2 của người và thụ thể thể khảm (nghĩa là hT1R2-PDZIP) được chuyển nhiễm vào tế bào vật chủ HEK-293. Tiếp đó, biểu hiện bề mặt của hT1R2 được theo dõi bằng cách sử dụng số liệu miễn dịch phát huỳnh quang và số liệu quét FACS. Như được thể hiện trên Fig.9A và 9B, việc lồng trình tự PDZIP làm tăng mức biểu hiện bề mặt của hT1R2-PDZIP so với hT1R2. Cụ thể hơn, Fig.9A cho thấy rằng, sự nhuộm màu miễn dịch huỳnh quang hT1R2 đánh dấu bằng Myc chứng minh rằng PDZIP làm gia tăng đáng kể lượng protein hT1R2 trên màng huyết tương. Fig.9B thể hiện số liệu phân tích FACS chứng minh các kết quả tương tự. Các tế bào giống nhau biểu hiện hT1R2 được đánh dấu myc được thể hiện bằng đường chấm chấm và các tế bào biểu hiện hT1R2-PDZIP đánh dấu bằng Myc được thể hiện bằng đường thẳng. Cụ thể là, Fig.10 thể hiện các tế bào vật chủ ổn định G α 15 chưa chuyển nhiễm trong dung dịch đệm HBS, Fig.10B thể hiện các tế bào vật chủ ổn định G α 15 được chuyển nhiễm hT1R2-PDZIP trong nhóm chất tạo vị ngọt số 5 (sacarin, natri xyclamat, Acesulfam K, và Aspartam-20mM trong dung dịch đệm HBS), Fig.10C thể hiện các tế bào vật chủ ổn định G α 15 được chuyển nhiễm T1R3-PDZIP trong tập hợp chất tạo

vị ngọt số 5, và Fig.10D thể hiện các tế bào vật chủ ổn định $G\alpha 15$ đồng chuyển nhiễm hT1R2-PDZIP/hT1R3-PDZIP trong tập hợp chất tạo vị ngọt số 5. Ngoài ra, Fig.10E-10H thể hiện đáp ứng phụ thuộc liều lượng của các tế bào vật chủ ổn định $G\alpha 15$ đồng chuyển nhiễm hT1R2/hT1R3 với sucroza-E: 0mM trong dung dịch đệm HBS; F: 30mM; G: 60mM; và H: 250mM. Fig.10I-10L thể hiện mức độ đáp ứng của các tế bào vật chủ ổn định $G\alpha 15$ đồng chuyển nhiễm hT1R2/hT1R3 với mỗi chất tạo vị ngọt - I: Aspartam (1,5mM); J: Acesulfam K (1mM); K: Neotam (20mM); L: Natri xyclamat (20mM). Như được thể hiện bằng phép chụp ảnh canxi của Fig.10, cả hT1R2 và hT1R3 đều cần thiết đối với hoạt tính mà được khơi mào bằng chất kích thích vị ngọt.

Ví dụ 11

Tạo ra các dòng tế bào đồng biểu hiện ổn định T1R1/T1R3 hoặc T1R2/T1R3

Các dòng tế bào của người mà đồng biểu hiện ổn định T1R2/T1R3 của người hoặc T1R1/T1R3 ở người được tạo ra bằng cách đồng chuyển nhiễm vector có nguồn gốc từ PEAK10 đã làm tuyến tính (Edge Biosystems) và vector có nguồn gốc từ pCDNA 3.1/ZEO (Invitrogen) lần lượt chứa cấu trúc biểu hiện hT1R1 hoặc hT1R2 (plasmid SAV2485 đối với T1R1, SAV2486 đối với T1R2) và hT1R3 (plasmid SXV550 đối với T1R3) vào dòng tế bào biểu hiện $G\alpha 15$. Đặc biệt, các dòng tế bào ổn định T1R2/T1R3 được tạo ra bằng cách đồng chuyển nhiễm SAV2486 và SXV550 đã làm tuyến tính vào dòng tế bào HEK-293 của Aurora Bioscience's mà biểu hiện ổn định $G\alpha 15$. Dòng tế bào ổn định T1R1/T1R3 được tạo ra bằng cách đồng chuyển nhiễm SAV2485 và SXV550 đã làm tuyến tính vào dòng tế bào HEK-293 mà biểu hiện ổn định $G\alpha 15$. Sau khi chuyển nhiễm SAV2485/SXV550 và SAV2486/SXV550, tập đoàn kháng puromycin và tập đoàn kháng zeoxin được lựa chọn, mở rộng và thử nghiệm bằng phép chụp ảnh canxi về đáp ứng với chất kích thích có vị ngọt hoặc vị umami. Các tế bào được lựa chọn trong puromycin 0,0005mg/ml (CALBIOCHEM)

và zeoxin 0,1mg/ml (Invitrogen) ở 37°C trong môi trường DMEM glucoza nồng độ thấp được bổ sung thêm GlutaMAX, FBS được làm tan 10%, và blastixidin 0,003mg/ml. Tập đoàn kháng được mở rộng và đáp ứng của chúng với chất kích thích có vị ngọt được đánh giá bằng kính hiển vi phát huỳnh quang. Đối với phép chụp ảnh huỳnh quang tự động trên thiết bị VIPR-II (Aurora Biosciences), các tế bào ổn định T1R2/T1R3 trước hết được gieo trên đĩa 96 lỗ (khoảng 100.000 tế bào/lỗ). Sau 24 giờ, các tế bào được bổ sung thuốc nhuộm canxi flo-3-AM (Molecular Probes), 0,005mM trong PBS, trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi thay thế bằng 70µl PBS, việc kích thích được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng bằng cách thêm 70µl PBS có bổ sung thêm chất kích thích có vị giác. Cường độ phát huỳnh quang (bước sóng kích thích 480nm và bước sóng phát xạ 535nm) đáp ứng từ 20 đến 30 giây sau khi thêm hợp chất được tính trung bình, hiệu chỉnh đối với cường độ phát huỳnh quang của nền xác định được trước khi thêm hợp chất, và chuẩn hóa với đáp ứng với ionomycin 0,001mM (CALBIOCHEM), canxi ionophor.

Sau đó, quan sát thấy rằng nếu các dòng tế bào này được tiếp xúc với chất kích thích có vị ngọt hoặc vị umami, thì đối với dòng vô tính hoạt tính, thường 80-100% tế bào đáp ứng với chất kích thích có vị giác. Bất ngờ là, độ lớn của các đáp ứng của mỗi tế bào là lớn hơn đáng kể so với các tế bào chuyển nhiễm tạm thời.

Dựa trên quan sát này, tác giả sáng chế đã thử nghiệm hoạt tính của dòng tế bào ổn định T1R bằng hình ảnh phát huỳnh quang tự động bằng cách sử dụng thiết bị VIPR của Aurora Bioscience như mô tả trên đây. Đáp ứng của hai dòng tế bào T1R1/T1R3 và một dòng tế bào T1R2/T1R3 được thể hiện lần lượt trên Fig.11 và Fig.12.

Đáng chú ý là tổ hợp của một số lượng gia tăng các tế bào đáp ứng và độ lớn của đáp ứng gia tăng dẫn đến gia tăng hoạt tính tăng lớn hơn 10 lần so với các tế bào chuyển nhiễm tạm thời (bằng cách so sánh, phần trăm đáp ứng ionomycin của tế bào

chuyển nhiệm tạm thời bằng T1R2/T1R3 là khoảng 5% trong các điều kiện tối ưu). Hơn nữa, đáp ứng liều thu được đối với T1R2/T1R3 và T1R1/T1R3 ở người biểu hiện ổn định tương ứng với ngưỡng phát hiện vị giác của người. Hoạt tính T1R mạnh của các dòng tế bào ổn định này gợi ý rằng, chúng rất thích hợp để sử dụng trong thử nghiệm năng suất cao thư viện các chất hóa học để xác định hợp chất, ví dụ phân tử nhỏ, phân tử này điều biến thụ thể vị ngọt hoặc vị umami và do đó, điều biến, làm tăng, ức chế hoặc bất chức vị ngọt hoặc vị umami.

Ví dụ 12

Tạo ra các dòng tế bào đồng biểu hiện cảm ứng T1R1/T1R3 đáp ứng chọn lọc với chất kích thích có vị umami

Các dòng tế bào T1R1/T1R3 HEK 293 biểu hiện ổn định thụ thể vị umami thể hiện hoạt tính được cải thiện nhiều so với các vị trí chuyển nhiệm tạm thời. Tuy nhiên, bất lợi là ở chỗ, chúng có thể nhanh chóng bị mất hoạt tính trong suốt quá trình sinh sản của tế bào.

Ngoài ra, những phát hiện này cho thấy rằng (i) T1R1/T1R3 là thụ thể vị umami, nghĩa là, và (ii) các dòng tế bào mà biểu hiện mạnh T1R1/T1R3, tốt hơn là các dòng tế bào T1R1/T1R3 ổn định và/hoặc cảm ứng có thể được sử dụng trong các thử nghiệm, tốt hơn là để thử nghiệm năng suất cao thư viện các hợp chất hóa học để xác định chất điều biến mới vị umami. Chất điều biến mà làm tăng vị umami có thể được sử dụng.

Để khắc phục tính không ổn định của dòng tế bào ổn định T1R1/T1R3, các tế bào HEK-Gα15 được thao tác di truyền để biểu hiện cảm ứng T1R1/T1R3 bằng cách sử dụng hệ GeneSwitch (Invitrogen). Vectơ biểu hiện kháng zeoxin có nguồn gốc từ pGene đối với T1R1 và T1R3 của người (plasmid SXV603 đối với T1R1 và SXV611 đối với T1R3) và vectơ kháng puromycin có nguồn gốc từ pSwitch mang protein GeneSwitch (plasmid SXV628) được làm tuyến tính và đồng chuyển nhiễm vào dòng

tế bào HEK-G α 15. Tập đoàn kháng zeoxin và tập đoàn kháng puromyxin được chọn lọc, mở rộng, gây cảm ứng bằng lượng mifepriston biến đổi, và được thử nghiệm bằng phép chụp ảnh canxi về đáp ứng với chất kích thích có vị umami.

Biểu hiện cảm ứng của T1R1/T1R3 gây ra hoạt tính mạnh. Ví dụ, khoảng 80% tế bào cảm ứng nhưng chỉ khoảng 10% tế bào chuyển nhiễm tạm thời đáp ứng với L-glutamat; Đặc biệt hơn, vectơ biểu hiện kháng zeoxin có nguồn gốc từ pGene mà biểu hiện T1R1 của người và T1R3 của người và vectơ kháng puromyxin có nguồn gốc từ pSwitch mang protein GeneSwitch được làm tuyến tính và đồng chuyển nhiễm vào các tế bào G α 15. Các tế bào này được chọn lọc trong puromyxin 0,5 μ g/ml (CAL BIOCHEM) và Zeoxin 100 μ g/ml (Invitrogen) ở 37°C trong môi trường DMEM được bổ sung thêm GlutaMAX, FBS được làm tan 10%, và blastixidin 3 μ g/ml. Tập đoàn kháng được mở rộng, và đáp ứng của chúng với chất kích thích có vị umamit sau khi gây cảm ứng bằng mifepriston 10⁻¹⁰M được xác định bằng kính hiển vi phát huỳnh quang theo phương pháp của Li và các đồng tác giả, *PNAS* 99 (7):4692-4696 (2002).

Đối với phép chụp ảnh huỳnh quang tự động trên thiết bị FLIPR (Molecular Device), các tế bào từ một dòng vô tính (được ký hiệu là dòng vô tính I-17) được gieo trong đĩa 96 lỗ (khoảng 80.000 tế bào/lỗ) với sự có mặt của mifepriston 10⁻¹⁰M và được ủ trong 48 giờ. Tiếp đó, các tế bào được bổ sung thuốc nhuộm canxi flo-4-AM (Molecular Probes), 3 μ M trong PBS, trong 1,5 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

Sau khi thay thế bằng 50 μ l PBS, việc kích thích được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng bằng cách thêm 50 μ l PBS có bổ sung chất kích thích khác. Ngược lại với hệ biểu hiện thụ thể vị umami T1R1/T1R3 tạm thời mà buộc phải định lượng hoạt tính thụ thể T1R1/T1R3 bằng cách đếm riêng lẻ các tế bào tương ứng (Li et al., *PNAS* 99 (7): 4692-4696 (2002)) (do hoạt tính thấp của thụ thể trong đó), hệ biểu hiện cảm ứng chủ thể dẫn đến dòng vô tính I-17 có hoạt tính hầu như gia tăng, cho phép hoạt tính của thụ thể được định lượng bằng cách xác định mức tăng phát huỳnh quang tối

đa (bước sóng kích thích 480nm và bước sóng phát xạ 535nm) rút gọn trên trường tế bào được chụp ảnh. Cường độ phát huỳnh quang tối đa từ bốn phép xác định độc lập được lấy trung bình, hiệu chỉnh đối với cường độ phát huỳnh quang của nền được xác định trước khi thêm hợp chất, và chuẩn hóa với đáp ứng với ionomycin 0,002mM (CALBIOCHEM).

Các kết quả này được thể hiện trên Fig.13. Cụ thể là, Fig.13 chứa đường cong đáp ứng liều được xác định đối với L-glutamat với sự có mặt hoặc không có mặt IMP 0,2mM. Trong mỗi hình vẽ, mỗi giá trị là cường độ phát huỳnh quang tối đa rút gọn trung bình (được hiệu chỉnh đối với cường độ phát huỳnh quang của nền) của bốn phép xác định độc lập. Đường cong đáp ứng liều này tương ứng với đường cong xác định được đối với tế bào chuyển nhiễm tạm thời bằng T1R1/T1R3.

Tính chọn lọc của thụ thể vị umami T1R1/T1R3 còn được đánh giá bằng cách thử nghiệm bằng các axit L-amin khác nhau. Kết quả thu được thể hiện rằng, T1R1/T1R3 được hoạt hóa chọn lọc bằng axit L-amin vị umami (L-glutamat và L-aspartat).

Kết quả của thử nghiệm, trong đó đáp ứng của dòng vô tính I-17 thu được trong thử nghiệm với sự có mặt của các axit L-amino khác nhau được nêu trên Fig.14 và Fig.15. Fig.15 cho thấy rằng, kết quả của thử nghiệm trong đó dòng tế bào I-17 được tiếp xúc với các axit L-amin khác nhau ở nồng độ 10mM với sự có mặt và không có mặt IMP 1mM.

Fig.15 thể hiện đường cong đáp ứng liều đối với các axit amin hoạt tính được xác định với sự có mặt của IMP 0,2mM. Mỗi giá trị là giá trị trung bình của bốn phép xác định độc lập.

Kết quả thu được trong các thử nghiệm này chứng minh tính đặc hiệu và tính chọn lọc của thụ thể vị umami với chất kích thích có vị umami. Trong khi chất kích thích có vị umami L-glutamat và L-aspartat hoạt hóa đáng kể thụ thể T1R1/T1R3 ở

nồng độ khác nhau (xem Fig.14 và 15), thì axit L-amin khác mà hoạt hoạt thụ thể T1R1/T1R3 của người chỉ hoạt hóa thụ thể yếu và ở nồng độ cao.

Do đó, các kết quả này chứng minh rằng, tính chọn lọc của thụ thể T1R1/T1R3 đối với chất kích thích có vị umami và tính tương hợp của hệ biểu hiện ổn định cảm ứng này để sử dụng trong thử nghiệm năng suất cao bằng cách sử dụng thiết bị chụp ảnh huỳnh quang tự động để xác định hợp chất mà hoạt hóa thụ thể vị umami, ví dụ L-glutamat hoặc L-aspartat, hoặc làm tăng hoạt tính của L-glutamat để hoạt hóa thụ thể vị umami, ví dụ 5'-IMP hoặc 5'-GMP, hoặc ức chế sự hoạt hóa thụ thể vị umami bằng chất kích thích có vị umami như L-glutamat và L-aspartat.

Hợp chất được xác định bằng cách sử dụng các thử nghiệm này có tính ứng dụng cao làm chất điều vị trong thực phẩm và đồ uống để bắt chước hoặc ức chế chất kích thích có vị umami.

Ví dụ 13

Lactisol ức chế hoạt tính thụ thể T1R2/T1R3 và T1R1/T1R3 ở người, và vị ngọt và vị umami

Lactisol, axit aralkyl carboxylic được cho là chất ức chế vị ngọt chọn lọc (ví dụ xem tài liệu Lindley (1986), Patent Mỹ số 4,567,053; và Schiffman et al. *Chem Senses* 24:439-447 (1999)). Đáp ứng của các tế bào HEK- $G_{\alpha 15}$ được chuyển nhiễm tạm thời bằng T1R2/T1R3 với sucroza 150mM với sự có mặt của các nồng độ khác nhau của Lactisol được xác định. Lactisol ức chế hoạt tính của T1R2/T1R3 của người với giá trị IC_{50} là 24 μ M.

Thụ thể vị umami T1R1/T1R3 và thụ thể vị ngọt T1R2/T1R3 có thể có chung cấu trúc dưới phân tử thông thường. Do đó, có giả thuyết rằng, lactisol mà ức chế thụ thể vị ngọt T1R2/T1R3 có thể có tác động tương tự lên thụ thể vị umami T1R1/T1R3. Tác giả sáng chế đã thử nghiệm tác động của lactisol lên đáp ứng của T1R1/T1R3 ở người bằng L-Glutamat 10mM. Như với thụ thể vị ngọt T1R2/T1R3, lactisol ức chế

T1R1/T1R3 với giá trị IC_{50} là $165\mu M$. Sự ức chế lactisol có khả năng phản ánh cơ chế đối kháng ở thụ thể T1R, ví dụ, thay cho sự ức chế không đặc hiệu tín hiệu qua trung gian $G\alpha 15$ do đáp ứng của thụ thể axetylcholin muscarinic không được ức chế bằng lactisol.

Do đó, sáng chế đánh giá tác động của lactisol lên thụ thể vị umami của người. Ngưỡng vị giác với sự có mặt của lactisol 1mM và 2mM được xác định đối với chất kích thích có vị umami L-Glutamat có hoặc không có mặt IMP 0,2mM, chất kích thích có vị ngọt sucroza và D-tryptophan, và chất kích thích có vị mặn natri clorua theo phương pháp của Schiffman và các đồng tác giả (Tài liệu *Chem. Senses* 24:439-447 (1989)). Nồng độ milimol của lactisol làm tăng đột ngột ngưỡng phát hiện đối với chất kích thích có vị ngọt và vị umami nhưng không làm tăng ngưỡng phát hiện đối với vị mặn. Các kết quả này được thể hiện trên Fig.16.

Kết luận là, (i) những phát hiện này còn chứng minh giả thuyết của tác giả rằng T1R1/T1R3 chỉ là thụ thể vị umami, và (ii) thụ thể T1R1/T1R3 và T1R2/T1R3 có thể có chung vùng gắn kết lactisol có liên quan về mặt cấu trúc.

Trong khi phần mô tả chi tiết trên đây mô tả nhiều phương án của sáng chế, cần hiểu rằng, phần mô tả trên chỉ nhằm minh họa và không làm giới hạn sáng chế. Sáng chế chỉ bị giới hạn bởi phần yêu cầu bảo hộ sau đây.

Ví dụ 14

Xác định các vị trí tương tác phối tử trên thụ thể vị ngọt

Thông qua việc đồng biểu hiện T1R2R-H bằng T1R3 của người, một phần thụ thể vị ngọt của người (vùng đầu tận cùng N của T1R2) được thay thế bằng trình tự protein của chuột. Đáp ứng với aspartam và neotam được hủy bỏ, cho thấy rằng, vùng đầu tận cùng N của T1R2 của người là cần thiết để nhận biết aspartam và neotam. Tương tự, vùng đầu tận cùng N của T1R2 của chuột cũng được thay thế bằng trình tự protein của người bằng cách đồng biểu hiện T1R2H-R bằng T1R3 của chuột. Thụ thể

thể khảm có được khả năng đáp ứng với aspartam và neotam, gợi ý rằng vùng tương tự của T1R2 của người cũng là đủ (trong phạm vi thụ thể vị ngọt) để xác nhận hai chất tạo vị ngọt này (Fig.22B). Số liệu biểu hiện chức năng *in vitro* chỉ ra rằng, yếu tố quyết định tương tác quan trọng được định vị ở vùng ngoại bào đầu tận cùng N.

Ngược lại, việc thay thế một nửa T1R2 của người bằng trình tự protein của chuột không làm ảnh hưởng lên đáp ứng của nó với xyclamat. Thay vào đó, vùng đầu tận cùng C của T1R3 của người là cần thiết và đủ, nếu được đồng biểu hiện bằng T1R2, để nhận ra xyclamat (Fig.22C). Vùng xuyên màng của họ GPCR C đã được biết là chứa các vị trí gắn kết đối với chất điều biến biến cấu (Gasparini, F., R. Kuhn, và J. P. Pin, *Curr Opin Pharmacol* 2002 Feb; 2 (1):43-9). Đây là trường hợp thứ nhất trong họ GPCR C, nếu chất chủ vận gắn kết trực tiếp với vùng xuyên màng và hoạt hóa thụ thể mà không có mặt phối tử khác.

Lactisol, axit aralkyl carboxylic, là chất ức chế vị ngọt đặc hiệu ở người, nó có tác động sinh lý lên vị giác của chuột. Phù hợp với tác động vị giác, lactisol ức chế đáp ứng T1R2/T1R3 của người nhưng không ức chế đáp ứng T1R2/T1R3 của chuột với sucroza trong hệ thử nghiệm (Fig.22A). Loại tương tự của thử nghiệm xác định trên vị trí tương tác lactisol bằng cách sử dụng thể khảm T1R được thực hiện. Giống xyclamat, lactisol đòi hỏi vùng đầu tận cùng C của T1R3 của người để ức chế đáp ứng của thụ thể với sucroza và axesulfam K (Fig.22D). Kết quả này còn chứng minh tầm quan trọng của vùng đầu tận cùng C của T1R3 trong chức năng của thụ thể vị ngọt. Thể khảm trong tất cả 16 tổ hợp có thể có được thử nghiệm, và tất cả tổ hợp chức năng tạo ra có kết quả phù hợp với mô hình của chúng.

Các nghiên cứu gây đột biến được thực hiện trên cả T1R2 lẫn T1R3 để thu hẹp các axit amin thiết yếu trong việc nhận biết aspartam, neotam và xyclamat. Nếu T1R2 và T1R3 chịu trách nhiệm nhận biết các chất tạo vị ngọt khác nhau, sự đột biến trong vùng đầu tận cùng N của T1R2 có thể ảnh hưởng lên đáp ứng với aspartam và

neotam, nhưng không ảnh hưởng lên đáp ứng với xyclamat. Ngoài ra, sự đột biến trong vùng đầu tận cùng C của T1R3 có thể có tác động ngược. Để lựa chọn các gốc axit amin quyết định trong vùng đầu tận cùng N của T1R2, trình tự T1R2 được sắp xếp thẳng hàng với mGluR1 (Fig.23A). Trong số 8 gốc mà quyết định trong gắn kết phối tử trong mGluR1 (Kunishima, N., et al., *Nature*, 2000. 407 (6807): p. 971-7), ba gốc được bảo tồn trong T1R2 của người (S144, Y218, và E302). Mỗi gốc trong số ba gốc này được đột biến và các thụ thể tạo thành được thử nghiệm về đáp ứng của nó với các chất tạo vị ngọt khác nhau. Việc thay thế Y218 cho A loại bỏ các đáp ứng với tất cả các chất tạo vị ngọt được thử nghiệm, cho thấy Y218 là quan trọng đối với toàn bộ cấu dạng của thụ thể. Hai biến thể hT1R2 khác, chứa S144A và E302A, ảnh hưởng chọn lọc lên đáp ứng với aspartam và neotam nhưng không ảnh hưởng đối với xyclamat. Các dòng tế bào ổn định biểu hiện biến thể S144A và E302A của hT1R2 (đồng biểu hiện bằng hT1R3 và $G_{\alpha 15}$ kiểu hoang) không đáp ứng với aspartam hoặc neotam ở nồng độ sinh lý, nhưng đáp ứng với xyclamat (Fig.23B).

Để xác định thêm vị trí gắn kết xyclamat, ba quai ngoại bào trong vùng đầu tận cùng C của T1R3 được sử dụng vào. Việc sắp xếp thẳng hàng T1R3 của người và chuột bộc lộ sự khác nhau của axit amin trong ba quai ngoại bào (Fig.23C). Việc thay thế quai ngoại bào 2 hoặc quai ngoại bào 3 bằng trình tự của chuột sẽ loại bỏ đáp ứng của xyclamat mà không ảnh hưởng lên đáp ứng của sucroza hoặc aspartam. Ngược lại, việc thay thế quai ngoại bào 1 không có ảnh hưởng đáng kể lên đáp ứng với xyclamat, cho thấy tầm quan trọng của quai ngoại bào 2 và 3 trong việc nhận biết xyclamat (Fig.23D). Không có cái nào trong việc thay thế quai này ảnh hưởng đến tác động ức chế của lactisol, cho thấy cơ chế gắn kết khác nhau. Tóm lại, việc thay thế axit amin trong T1R2 hoặc T1R3 dẫn đến sự nhiễu chọn lọc của hoạt tính gây ra bởi các chất tạo vị ngọt khác nhau, phù hợp với kết quả thụ thể thể khảm.

Các kết quả trên chứng minh rằng, chức năng thụ thể vị ngọt của người làm

phức heterome của T1R2 và T1R3. Cả hai cấu trúc dưới phân tử là thiết yếu để nhận biết các chất tạo vị ngọt khác nhau, và số liệu chỉ ra sự tồn tại của ổ gắn kết trên thụ thể đối với các nhóm chất chủ vận khác nhau. Sự có mặt của nhiều vị trí gắn kết phối tử tạo ra hướng dẫn và định nghĩa về mặt cấu trúc về hợp chất gắn kết đặc hiệu theo sáng chế.

Ví dụ 15

Xác định các tương tác thụ thể-protein G

Thụ thể vị ngọt của người và chuột cũng khác nhau về độ hiệu quả kết dính protein G của chúng. Mặc dù cả thụ thể của người lẫn chuột đều có thể liên kết một cách hữu hiệu với $G_{\alpha15/11}$, nhưng chỉ có thụ thể của người có thể liên kết hữu hiệu với $G_{\alpha15}$ (Fig.24A). Sự khác nhau về loại này cho phép xác định tương tác thụ thể-protein G bằng cách sử dụng các thụ thể thể khảm giống nhau như được mô tả trên đây. T1R2, nhưng không phải T1R3 dường như là then chốt đối với gắn kết $G_{\alpha15}$, do sự thay thế đầu tận cùng C của T1R2 của người bằng trình tự tương ứng của chuột làm hủy bỏ gắn kết, và việc thay thế nửa đầu tận cùng C của T1R2 bằng trình tự của người cho phép thụ thể gắn kết với $G_{\alpha15}$ và đáp ứng với sucroza và axesulfam K (Fig.24); Việc trao đổi trình tự đầu tận cùng C của T1R3 không ảnh hưởng đến gắn kết $G_{\alpha15}$ (Fig.24). Quan sát này chứng minh vai trò quan trọng của T1R2 trong kết dính protein G trong hệ biểu hiện chức năng. Gustdixin (tài liệu Wong, G. T., K. S. Gannon, và R. F. Margolskee, *Nature*, 1996.381 (6585): p. 796-800) đề xuất protein G nội sinh cho thụ thể vị ngọt, và T1R2 có thể là cấu trúc dưới phân tử chịu trách nhiệm gắn kết *in vivo* trong tế bào vị giác. $GABA_B$ R là ví dụ khác về họ C GPCR heterome, trong khi một cấu trúc dưới phân tử ($GABA_B$ R1) chịu trách nhiệm gắn kết phối tử, và cấu trúc dưới phân tử còn lại ($GABA_B$ R2) chịu trách nhiệm kết dính protein G (tài liệu Margeta-Mitrovic, M., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001. 98 (25): p. 14643-8; Margeta-Mitrovic, M., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001. 98 (25): p. 14649-54). Thụ thể

vị ngọt là khác với GABA_BR ở chỗ T1R2 là thiết yếu cho cả nhận biết phối tử lẫn kết dính protein G.

Ví dụ 16

Lactisol gây đối kháng T1R1/T1R3 ở người và ức chế vị umami ở người

Giả thiết rằng, do chức năng của T1R1/T1R3 là thụ thể heterome cũng như thụ thể vị ngọt, lactisol sẽ có tác động tương tự lên hoạt tính T1R1/T1R3, do T1R3 là cấu trúc dưới phân tử thông thường giữa thụ thể vị ngọt và vị umami. Thực vậy, lactisol gây đối kháng T1R1/T1R3 ở người (Fig.25A). Lactisol hoạt động như chất ức chế không cạnh tranh của T1R1/T1R3, do giá trị IC_{50} dường như không phụ thuộc vào nồng độ glutamat (Fig.25B), và lactisol làm giảm hoạt tính tối đa của thụ thể mà không làm thay đổi đáng kể giá trị EC_{50} của chất chủ vận (Fig.25C). Các kết quả này chứng minh rằng, lactisol gắn kết vào vị trí khác với L-glutamat, và phù hợp với giả thiết là ổ gắn kết glutamat được định vị ở T1R1. Lactisol dường như là chất ức chế cạnh tranh thụ thể vị ngọt, vì IC_{50} của nó phụ thuộc vào nồng độ của chất tạo vị ngọt, và nó làm tăng giá trị EC_{50} của chất tạo vị ngọt mà không ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính tối đa.

Tác động ức chế của lactisol được gây ra bởi các thụ thể T1R do nó không ảnh hưởng lên thụ thể axetylcholin muscarinic nội sinh trong các tế bào HEK hoặc lên thụ thể vị đắng của chuột, mT2R5, biểu hiện tạm thời trong các tế bào HEK. Như trường hợp đối với thụ thể T1R2/T1R3, sự ức chế đáp ứng của T1R1/T1R3 của lactisol với chất kích thích có vị umami có thể đảo ngược sau khi rửa và tái kích thích.

Để đánh giá tương quan hoạt tính thụ thể với hành vi, tác động của lactisol lên vị umami của người được thử nghiệm. Như nêu trên, nồng độ milimol của lactisol làm tăng đột ngột ngưỡng phát hiện đối với chất kích thích có vị ngọt và vị umami nhưng không xảy ra đối với chất kích thích có vị mặn (Fig.25D). Lactisol đã được biết trước đây là chất ức chế vị umami. Tương quan giữa hoạt tính thụ thể và kết quả

vị giác chứng minh vai trò quyết định của T1R trong vị umami của người.

Ví dụ 17

Xyclamat làm tăng hoạt tính thụ thể T1R1/T1R3 ở người

Dựa trên cùng một mô hình heterome của T1R (Fig.26), người ta tiên đoán rằng, xyclamat còn có thể điều biến hoạt tính của thụ thể vị umami T1R1/T1R3 ở người bằng cách tác dụng lên T1R3. Mặc dù một mình xyclamat không tác dụng lên T1R1/T1R3, nhưng nó làm tăng hoạt tính của thụ thể với sự có mặt của L-glutamat (Fig.27E). Tác động này là đặc hiệu đối với T1R1/T1R3 ở người, vì xyclamat không tác dụng lên hoạt tính của thụ thể axetylcholin muscarinic nội sinh với sự có mặt của carbachol (Fig.27E). Đáng chú ý là, xyclamat có giá trị EC_{50} so sánh được với thụ thể vị ngọt (Fig.23B) và thụ thể vị umami. Xyclamat dịch chuyển về phía trái theo cách tạo lại được đường cong đáp ứng liều đối với L-glutamat 2 lần khi có mặt hoặc không có mặt IMP (Fig.25F). IMP có tác động làm tăng thụ thể đột ngọt hơn, và tác động của xyclamat quan sát được khi có mặt IMP (Fig.25F), cho thấy cơ chế khác với IMP trong việc làm tăng thụ thể. IMP dường như gắn kết với T1R1, do nó không có tác dụng lên thụ thể vị ngọt. Các chất tạo vị ngọt khác, bao gồm sucroza, aspartam, sacarin và D-tryptophan, không có tác dụng lên hoạt tính T1R1/T1R3 ở người.

Tóm lại, người ta chứng minh được rằng, cả T1R2 lẫn T1R3 là thiết yếu trong thụ thể vị ngọt chức năng, rằng aspartam và neotam cần có vùng ngoại bào đầu tận cùng N của T1R2, gắn kết G protein cần có nửa đầu tận cùng C của T1R2, và xyclamat và lactisol cần có vùng xuyên bào của T1R3. Những phát hiện này chứng minh vai trò chức năng khác nhau của các cấu trúc dưới phân tử T1R trong phức heterome và sự có mặt của nhiều vị trí tương tác chất tạo vị ngọt trên thụ thể vị ngọt. Do T1R3 là cấu trúc dưới phân tử thông thường trong thụ thể vị ngọt và vị umami, người ta tiên đoán và khẳng định tác động của xyclamat và lactisol lên thụ thể vị umami. Hơn nữa, tương quan này có thể được xác định giữa tác động của lactisol lên

hoạt tính thụ thể với vị giác. Dựa trên những quan sát này, mô hình được tạo ra (Fig.26) về mối quan hệ cấu trúc-chức năng của thụ thể vị giác họ T1R. Chất tạo vị ngọt hydrat cacbon tự nhiên gắn kết với vùng đầu tận cùng N của T1R2, tương tự với aspartam và neotam, và cũng có các vị trí gắn kết phối tử khác trên thụ thể vị ngọt, ví dụ, vùng xuyên màng của T1R2. Chức năng thụ thể vị umami tương tự với phức heterome, và mỗi MSG và IMP dường như gắn kết với cấu trúc dưới phân tử T1R1, do không có loại nào có tác động bất kỳ lên thụ thể vị ngọt, và vùng xuyên màng của T1R1 chịu trách nhiệm gắn kết với protein G.

Ví dụ 18

Phương pháp HTS đối với vị ngọt

Dẫn xuất dòng tế bào HEK293 (Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., Zuker, C. S., Ryba, N. J., *Cell* 2000, 100, 703-711) mà biểu hiện ổn định G_{α15} và hT1R2/hT1R3 (Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M., Adler, E. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99, 4692-4696, Công bố đơn patent quốc tế số WO 03/001876 A2) được sử dụng để xác định hợp chất có các đặc tính làm tăng vị ngọt.

Hợp chất được lựa chọn ban đầu dựa trên hoạt tính của nó lên dòng tế bào hT1R2/hT1R3-HEK293-Gα15 (Li, và các đồng tác giả, tên tài liệu như nêu trên). Hoạt tính được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm chụp ảnh huỳnh quang tự động trên thiết bị FLIPR (Fluorometric Intensity Plate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) (được ký hiệu là thử nghiệm FLIPR). Các tế bào từ một dòng vô tính (được ký hiệu là các tế bào S-9) được gieo trong đĩa 384 lỗ (khoảng 50.000 tế bào/lỗ) trong môi trường chứa DMEM Glucoza nồng độ thấp (Invitrogen, Carlsbad, CA), huyết thanh bào thai bò được làm tan 10% (Invitrogen, Carlsbad, CA), Penicillin G 100đơn vị/ml, và streptomycin 100µg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Li, và các đồng tác giả, tên tài liệu như nêu trên), còn xem trong WO 03/001876 A2). Tế bào S-9

được sinh trưởng trong 24 giờ ở 37°C. Tiếp đó, các tế bào S-9 được bổ sung thuốc nhuộm canxi Flo-3AM (Molecular Probes, Eugene, OR), 4 μ M trong dung dịch muối đệm phosphat (D-PBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA), trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi thay thế bằng 25 μ l D-PBS, việc kích thích được thực hiện trong thiết bị FLIPR và ở nhiệt độ trong phòng bằng cách thêm 25 μ l D-PBS được bổ sung thêm các chất kích thích khác nhau ở nồng độ tương ứng bằng hai lần nồng độ cuối cùng mong muốn. Hoạt tính của thụ thể được định lượng bằng cách xác định mức tăng cường độ phát huỳnh quang tối đa (sử dụng bước sóng kích thích 480nm và bước sóng phát xạ 535nm) sau khi chuẩn hóa cường độ phát huỳnh quang của nền đo được trước khi kích thích.

Đối với phân tích liều lượng-đáp ứng, chất kích thích được sử dụng ở 10 nồng độ khác nhau nằm trong khoảng từ 60nM đến 30 μ M, thực hiện hai lần. Hoạt tính được chuẩn hóa thành đáp ứng thu được bằng D-fructoza 400mM, nồng độ tạo ra đáp ứng thụ thể tối đa. Giá trị EC₅₀ được xác định bằng cách sử dụng thuật toán hồi quy phi tuyến (sử dụng phần mềm Senomyx, Inc.), trong đó đường bằng Hill, tiệm cận đáy và tiệm cận đỉnh được phép biến đổi. Các kết quả giống nhau thu được khi phân tích số liệu liều lượng-đáp ứng bằng cách sử dụng phần mềm sẵn có để phân tích hồi quy phi tuyến như GraphPad PRISM (San Diego, CA).

Để xác định mức độ phụ thuộc của hT1R2/hT1R3 đối với đáp ứng của tế bào với các chất kích thích khác nhau, hợp chất đã chọn được đưa vào phân tích tương tự trên tế bào HEK293-Gα15 (không biểu hiện thụ thể vị ngọt của người). Tế bào HEK293-Gα15 không thể hiện đáp ứng chức năng bất kỳ trong thử nghiệm FLIPR đối với D-Fructoza hoặc chất tạo vị ngọt đã biết bất kỳ khác. Tương tự, hợp chất được mô tả ở đây không gây ra đáp ứng bất kỳ khi sử dụng tế bào HEK293-Gα15 trong thử nghiệm FLIPR.

Ví dụ 19

Xác định sự gia tăng hương vị đối với vị ngọt bằng cách sử dụng người tham gia thử nghiệm

Thử nghiệm cơ bản về người thử vị nhạy: Nhóm người tham gia thử nghiệm tiềm năng được thử về khả năng của họ phân loại và xếp loại cường độ của dung dịch biểu thị năm vị cơ bản. Người tham gia thử nghiệm phân loại và xếp loại cường độ của năm nồng độ khác nhau của mỗi loại trong số năm hợp chất sau đây: sucroza (vị ngọt), natri clorua (vị mặn), axit xitric (vị chua), cafein (vị đắng) và mononatri glutamat (vị umami). Người tham gia thử nghiệm được thử tổng cộng 25 mẫu mỗi phân (5 mẫu của 5 loại dung dịch). Trong phần đầu tiên, người tham gia thử nghiệm phân loại 5 nồng độ về cường độ của thuộc tính được quan tâm. Điều này được lặp lại nhiều hơn 4 lần với các mẫu khác. Trong phần thứ hai, người tham gia thử nghiệm xếp loại cường độ của 5 nồng độ của mỗi mẫu bằng cách sử dụng thang chia vạch được gọi là “thang độ lớn đánh dấu” (*Labeled Magnitude Scale: LMS*). LMS được đánh dấu bằng cường độ (ví dụ, trống rỗng, phát hiện được, yếu, vừa phải, mạnh, rất mạnh, và mạnh nhất có thể được) để giúp người tham gia thử nghiệm trong việc xếp loại các mẫu. Mẫu được nếm ở thể tích 10ml ở nhiệt độ trong phòng và được đánh dấu bằng mã gắn kết 3 chữ số. Mẫu được trình bày dưới dạng trình tự ngẫu nhiên, đối trọng trong mỗi dung dịch mẫu (ví dụ sucroza, axit xitric, v.v.).

Để được lựa chọn tham gia thử nghiệm, người tham gia thử nghiệm cần phải phân loại và xếp loại chính xác các mẫu về cường độ, với số sai số chấp nhận được. Khoảng 25 người hoàn thành xuất sắc quy trình này.

Người tham gia thử nghiệm được chọn trong quy trình trên được cho là có đủ điều kiện để thực hiện quy trình thử nghiệm vị giác sơ bộ. Thử nghiệm vị giác sơ bộ được sử dụng để đánh giá hợp chất mới về cường độ của các vị cơ bản và vị không cơ bản. Một nhóm nhỏ người tham gia thử nghiệm ($n=5$) nếm khoảng 5 nồng độ hợp

chất (thường nằm trong khoảng từ 1 đến 100uM, trong chu kỳ bán logarit, ví dụ, 1, 3, 10, 30 và 100uM) trong nước hoặc dung dịch đậm và trong dung dịch 4% (trọng lượng/thể tích, 117mM) sucroza để đánh giá sự nổi bật. Thông thường, các mẫu còn chứa etanol 0,1% để hỗ trợ sự phân tán hợp chất trong dung dịch nước. Nhóm người tham gia thử nghiệm xếp loại 5 vị cơ bản (vị ngọt, mặn, chua, đắng và umami) cũng như các vị không cơ bản (như vị hóa học, kim loại, lưu huỳnh) trên LMS. Các mẫu được giữ thành các phần 10ml ở nhiệt độ trong phòng. Mục đích của thử nghiệm là để xác định nồng độ cao nhất mà tại đó, không có vị không cơ bản khó chịu, và xác định liệu sự nổi bật rõ rệt của vị ngọt có tồn tại ở nồng độ được thử nghiệm bất kỳ.

Nếu hợp chất là hữu hiệu và không có vị không cơ bản khó chịu, nó được thử bằng người có trình độ (hội đồng chuyên gia) trong nghiên cứu lớn hơn.

Ví dụ: Năm người tham gia thử nghiệm đánh giá 1, 3, 10, 30 và 100uM XVI-3 trong nước và trong dung dịch sucroza 4%. Tất cả các mẫu có hợp chất được làm cân bằng bằng etanol ở nồng độ 0,1% (hỗ trợ sự phân tán hợp chất). Người tham gia thử nghiệm được yêu cầu xếp loại các vị cơ bản và vị không cơ bản bằng cách sử dụng LMS cho mỗi mẫu được thử. Nếu người tham gia thử nghiệm ghi nhận vị ngọt trong mẫu bất kỳ, họ sẽ được yêu cầu nếm mẫu sucroza tham khảo (sucroza 2, 4, 6, 8%) để đánh giá độ ngọt tương đương.

Hội đồng có trình độ (chuyên gia) được sử dụng để đánh giá thêm hợp chất mà được thử bằng thử nghiệm vị giác sơ bộ.

Những người tham gia làm hội đồng thẩm định được lựa chọn từ nhóm lớn những người tham gia thử nghiệm đánh giá vị. Những người tham gia thử nghiệm còn được huấn luyện về vị ngọt bằng thử nghiệm phân loại và xếp loại sử dụng dung dịch sucroza. Người tham gia thử nghiệm hoàn thành một loạt phân loại, xếp loại và khác với thử nghiệm tham khảo bằng dung dịch ngọt. Trong thử nghiệm phân loại và xếp loại, người tham gia thử nghiệm đánh giá nồng độ sucroza (sucroza 2, 4, 6, 8% (trọng

lượng/thể tích)).

Hợp chất được thử bằng hội đồng thẩm định được đánh giá khác với thử nghiệm tham khảo. Người tham gia thử nghiệm được đưa các mẫu tham khảo có nồng độ khác nhau (sucroza 2, 4, 6, 8% (trọng lượng/thể tích)) và được yêu cầu xếp loại mẫu dựa trên thang từ -5 đến +5 liên quan đến sự khác biệt về vị ngọt so với mẫu tham khảo (điểm: -5 = vị ngọt ít hơn so với mẫu tham khảo; = vị ngọt giống với mẫu tham khảo; +5 vị ngọt nhiều hơn so với mẫu tham khảo). Mẫu thử nghiệm là dung dịch có sự biến đổi về lượng sucroza và hợp chất. Thông thường, mỗi phân so sánh mẫu tham khảo (đánh dấu là REF) với một số mẫu thử nghiệm (được đánh dấu bằng mã 3 chữ số). Thử nghiệm thường bao gồm các mẫu khác nhau có sự thay đổi nồng độ sucroza, cũng như mẫu tham khảo mù, để đánh giá mức độ chính xác của hội đồng. Hợp chất được thử nghiệm lại tham khảo mẫu có hoặc không có sucroza 4% hoặc 6%. Tất cả các mẫu được trình bày ở thể tích 10ml ở nhiệt độ trong phòng. Hơn nữa, để xác định độ ngọt của riêng hợp chất, dung dịch tham khảo được điều chế ở nồng độ chỉ định và được so sánh với độ ngọt ngưỡng của sucroza (2%).

Ví dụ 20

Phương pháp HTS đối với vị umami

Tế bào HEK-G α 15 được tạo ra để biểu hiện cảm ứng T1R1/T1R3 bằng cách sử dụng hệ GeneSwitch (Invitrogen). Vectơ biểu hiện kháng zeoxin có nguồn gốc từ pGene đối với T1R1 và T1R3 của người (plasmid SXV603 đối với T1R1 và SXV611 đối với T1R3) và vectơ kháng puromyxin có nguồn gốc pSwitch mà mang protein GeneSwitch (plasmid SXV628) được làm tuyến tính và được đồng chuyển nhiễm vào dòng tế bào HEK-G α 15. Tập đoàn kháng zeoxin và tập đoàn kháng puromyxin được lựa chọn, mở rộng, gây cảm ứng bằng lượng mifepriston thay đổi và thử nghiệm bằng phép chụp ảnh canxi về đáp ứng với chất kích thích có vị umami. Các tế bào được lựa chọn trong puromyxin 0,5 μ g/ml (CALBIOCHEM) và zeoxin 100 μ g/ml (Invitrogen)

ở 37°C trong môi trường DMEM được bổ sung thêm GlutaMAX, FBS được làm tan 10%, và blastixidin 3µg/ml. Tập đoàn kháng được mở rộng và đáp ứng của chúng với chất kích thích có vị umami sau khi gây cảm ứng bằng mifepriston 10⁻¹⁰M được đánh giá bằng kính hiển vi phát huỳnh quang theo phương pháp của Li và các đồng tác giả, PNAS (2002) 99(7): 4692-4696. Đối với phép chụp ảnh huỳnh quang tự động trên thiết bị FLIPR (Molecular Device), các tế bào từ một dòng vô tính (được ký hiệu là dòng vô tính I-17) được gieo trên đĩa 96 lỗ hoặc đĩa 384 lỗ (khoảng 80.000 tế bào/lỗ) với sự có mặt của mifepriston 10⁻¹⁰M và được ủ trong 48 giờ. Sau đó, các tế bào được bổ sung thuốc nhuộm canxi flo-4-AM (Molecular Probes), 3µM trong PBS, trong 1,5 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi thay thế bằng 50µl PBS, việc kích thích được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng bằng cách thêm 50µl PBS có bổ sung thêm chất kích thích khác. Cường độ phát huỳnh quang tối đa từ bốn phép xác định độc lập được tính trung bình, hiệu chỉnh đối với cường độ phát huỳnh quang của nền xác định được trước khi thêm hợp chất, và được chuẩn hóa với đáp ứng với ionomycin 0,002mM (CALBIOCHEM).

Ví dụ 21

Phương pháp thử nghiệm vị giác đối với vị umami

Huấn luyện cơ bản Người cảm quan: Người nếm được huấn luyện để đánh giá vị của dung dịch nước (5ml, “ngậm và nhổ” (*swash and spit*) của các hợp chất vị tiêu chuẩn sau đây bằng cách sử dụng thử nghiệm tam giác như được mô tả trong tài liệu chuyên ngành: sucroza (50mM) đối với vị ngọt; axit xitric (5mM) hoặc axit lactic (20mM) đối với vị chua; NaCl (12mM) đối với vị mặn, quinin (10µM) hoặc cafein (1mM) đối với vị đắng; và mononatri glutamat (8mM) đối với vị umami hoặc vị “dễ chịu”.

Huấn luyện đối với vị Umami: Người nếm được cho từ 1-3 nhóm mẫu 6 MSG và/hoặc MSG-IMP với hàm lượng MSG nằm trong khoảng từ 3 đến 60mM và hàm

lượng IMP nằm trong khoảng từ 0 đến 200 μ M, mỗi loại được sắp xếp trong khay với nồng độ gia tăng. Bài tập này đưa ra cho đối tượng sự luyện tập về đánh giá đáp ứng liều. Sau đó, nhóm khác được tạo ra cho 6 mẫu tương tự, nhưng được cho với trình tự ngẫu nhiên. Tiếp đó, đối tượng được yêu cầu sắp xếp mẫu theo cường độ gia tăng và sau đó xếp loại cường độ vị umami của chúng.

Đánh giá tiêu chuẩn người tham gia nếm: Người nếm được đưa vào thử nghiệm hai lựa chọn thay đổi cưỡng bức (*two alternative forced choice: 2AFC*) tiêu chuẩn bằng 5 cặp mẫu nếm. Họ được yêu cầu tạo ra sự lựa chọn mẫu có vị umami đặc trưng nhất từ hai mẫu (một cặp). Thử nghiệm bao gồm hai cặp dễ, hai cặp có độ khó trung bình và một cặp khó. Người nếm mà phân biệt được cặp có độ khó trung bình được chọn làm người tham gia thử nghiệm.

Thử nghiệm vị giác thí điểm/định tính về ứng cử viên làm tăng vị umami (*Umami Enhancer Candidate: UEC*) bằng một nhóm nhỏ người tham gia thử nghiệm: Mẫu nếm có nồng độ thích hợp (thường nằm trong khoảng từ 1-50 μ M) được tạo ra trong nước (sử dụng lượng etanol tối thiểu nếu không hòa tan); Chỉ riêng UEC vị giác ở nồng độ 30 và/hoặc 50 μ M đối với umami và các thuộc tính khác. Xếp loại các thuộc tính vị giác này trên thang LMS dựa trên phiếu bầu thử nghiệm; nếu UEC không có vị umami và vị khác hoặc có vị umami và vị khác thấp, thì chuyển sang thử nghiệm phân biệt đối xử, so sánh một số nồng độ của MSG, ví dụ 12mM và 12mM MSG + 30 μ M UEC để xác định liệu có sự tăng bất kỳ nào không; xếp loại cường độ vị umami nhận được trên thang LMS thích hợp dựa trên phiếu bầu thử nghiệm; thay đổi nồng độ của UEC và/hoặc MSG để tìm ra tổ hợp tốt nhất; quyết định dung dịch nào để sử dụng trong thử nghiệm hội đồng; ghi lại tất cả các quy trình và số liệu bao gồm mô tả nghiên cứu, điều chế mẫu, sắp xếp mẫu, phiếu bầu và ký vào tờ giấy đối với người tham gia thử nghiệm, số liệu đầu vào và sự đánh giá.

Thử nghiệm hội đồng 2AFC UEC: Thực hiện thử nghiệm hội đồng bằng những

người tham gia thử nghiệm có trình độ bằng cách sử dụng phương pháp được tạo ra từ thử nghiệm thí điểm; ghi lại tất cả quy trình và số liệu; so sánh báo cáo tóm tắt với kết luận có ý nghĩa thống kê, nếu có.

Ví dụ 22

Thử nghiệm vị giác định lượng đối với hợp chất 2725761 và 3756807

Thử nghiệm vị giác định lượng đối với hợp chất 2725761 và 3756807 được thực hiện theo quy trình được trình bày trên đây. Người ta phát hiện ra rằng, ngoài tác dụng làm tăng cường độ vị umami của chúng, cả hai hợp chất này còn làm gia tăng MSG.

Ví dụ 23

Tổng hợp hợp chất 2725761 và 3756807

Hợp chất 2725761 và 3756807 được điều chế như được thể hiện trong Ví dụ 22, từ axit và amin tương ứng của chúng. Sản phẩm được tinh chế theo các phương pháp thông thường, ví dụ rửa bằng nước bazơ và axit, hoặc HPLC điều chế. Cấu trúc của các hợp chất này được khẳng định dựa trên phương pháp phân tích thông thường, ví dụ NMR và LCMS. Phương pháp này còn có thể được sử dụng để tổng hợp hợp chất bất kỳ nêu trong các Bảng từ 1 đến 5.

Ví dụ 24

Thử nghiệm dựa trên tế bào

Tế bào được sinh trưởng và giữ ở 37°C trong môi trường DMEM được bổ sung thêm FBS 10% và axit amin không thiết yếu MEM (Gibco BRL); môi trường cho các tế bào G_{α15} còn chứa blastixidin 3μg ml⁻¹ (Gibco BRL). Đối với thử nghiệm chụp ảnh canxi, các tế bào trước hết được gieo trong đĩa nuôi cấy mô 48 lỗ (khoảng 30.000 tế bào/lỗ), và được chuyển nhiễm bằng cách sử dụng Mirus TransIt-293 (PanVera). Hiệu quả chuyển nhiễm, được đánh giá bằng cách đồng chuyển nhiễm bằng vector

biểu hiện RFP, thường xấp xỉ 60%. Để làm giảm đến mức tối thiểu sự mất nhạy cảm do glutamat và glucoza gây ra, DMEM được bổ sung được thay thế bằng DMEM chứa glucoza nồng độ thấp được bổ sung thêm GlutaMAX và FBS được làm tan 10% (Gibco BRL) khoảng 24 giờ sau khi chuyển nhiễm. Sau 24 giờ nữa, các tế bào được bổ sung thuốc nhuộm canxi flo-4-AM (Molecular Probes), 3 μ M trong dung dịch đệm PBS của Dulbecco (DPBS, GibcoBRL), trong 1,5 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi thay thế bằng 100 μ l DPBS, việc kích thích được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng bằng cách thêm 100 μ l DPBS được bổ sung thêm chất kích thích có vị giác. Sự di chuyển của canxi được theo dõi trên kính hiển vi Axiovert S100 được trang bị thấu kính 1 OX/0,5 LWD plano flor (Zeiss) và camera CCD lạnh (Princeton Instruments). Hình ảnh phát huỳnh quang thu được ở bước sóng kích thích 480nm và bước sóng phát xạ 535nm, và được phân tích bằng phần mềm Imaging Workbench 4.0 (Axon Instruments). Hoạt tính thụ thể T1R được định lượng bằng cách đếm số tế bào đáp ứng sau 30 giây sau khi thêm chất kích thích.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp điều chỉnh vị savory của sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc bao gồm các bước:

tạo ra ít nhất một sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc hoặc tiền chất của nó, và

kết hợp sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc hoặc tiền chất của nó với ít nhất một lượng có tác dụng điều chỉnh vị savory của ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên gắn kết đặc hiệu với thụ thể T1R1/T1R3 gồm hT1R1/hT1R3 có khả năng làm chất tạo vị, chất làm tăng vị hoặc chất điều chỉnh vị umami như được xác định theo giá trị EC_{50} thấp hơn 1mM, trong đó ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên này là hợp chất amit hoặc hợp chất oxalamit hoặc muối ăn được của chúng để tạo thành sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc cải biến;

nhờ đó điều chỉnh vị savory của sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên có tỷ lệ EC_{50} được xác định là tỷ lệ của nồng độ MSG với nồng độ hợp chất này cộng với MSG cần thiết để tạo ra đáp ứng liều MSG lớn hơn 1.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó mức giảm EC_{50} như được xác định trong thử nghiệm độ huỳnh quang bằng cách sử dụng dụng cụ FLIPR ít nhất là hai lần.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên có hoạt tính so với hoạt tính tối đa của glutamat khi được xác định bằng mức gia tăng độ huỳnh quang theo hợp chất bằng ít nhất 25% trong thử nghiệm độ huỳnh quang bằng cách sử dụng dụng cụ FLIPR.
5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên có khả năng sao cho ít nhất 10 trong số 100 tế bào đã được chuyển nhiễm thụ thể có sự gia tăng độ huỳnh quang theo hợp chất.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên có khả năng sao cho số lượng tế bào huỳnh quang đáp ứng với nồng độ cận tối đa của glutamat tăng lên ít nhất hai lần.
7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên có mức độ đáp ứng của tế bào với nồng độ cận tối đa của glutamat tăng lên ít nhất 1,25 lần so với mức độ đáp ứng với riêng chất tạo ngọt, trong đó mức độ đáp ứng này được xác định theo độ huỳnh quang, nồng độ canxi, nồng độ inositol triphosphat (IP₃), nồng độ adenosin 3',5'-monophosphat mạch vòng (cAMP), mức độ liên kết GTPγS hoặc hoạt tính của gen thông báo.
8. Phương pháp điều chỉnh vị ngọt của sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc bao gồm các bước:

tạo ra ít nhất một sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc hoặc tiền chất của nó,

và

kết hợp sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc hoặc tiền chất của nó với ít nhất một lượng có tác dụng điều chỉnh vị ngọt của ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên gắn kết đặc hiệu với thụ thể T1R2/T1R3 gồm hT1R2/hT1R3 có khả năng làm chất chủ vận vị ngọt như được xác định theo giá trị EC₅₀ thấp hơn 10μM, hoặc muối ăn được của nó, để tạo thành sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc cải biến;

nhờ đó điều chỉnh vị ngọt của sản phẩm ăn được hoặc sản phẩm thuốc.
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên có kích cỡ khoảng 12x5x5 angstrom.
10. Phương pháp theo điểm 8 hoặc điểm 9, trong đó ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên có một hoặc nhiều đặc tính trong số các đặc tính sau đây ở tế bào đồng biểu hiện hT1R2 và hT1R3

EC₅₀ giảm so với đối chứng ít nhất 50%,

nồng độ Ca^{2+} nội bào tăng ít nhất khoảng 25%,
 nồng độ cAMP nội bào tăng ít nhất khoảng 25%,
 nồng độ guanosin monophosphat mạch vòng (cGMP) nội bào tăng ít nhất khoảng 25%, hoặc
 nồng độ IP_3 nội bào tăng ít nhất khoảng 25%.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên có mức độ đáp ứng của tế bào với nồng độ cận tối đa của chất tạo ngọt tăng lên ít nhất 1,25 lần so với mức độ đáp ứng với riêng chất tạo ngọt, trong đó mức độ đáp ứng này được xác định bằng mức độ huỳnh quang, nồng độ canxi, nồng độ IP_3 , nồng độ cAMP, mức độ liên kết GTP γ S hoặc hoạt tính của gen thông báo.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên có hoạt tính so với hoạt tính tối đa của fructoza khi được xác định theo mức gia tăng độ huỳnh quang theo hợp chất bằng ít nhất 25% trong thử nghiệm độ huỳnh quang bằng cách sử dụng dụng cụ FLIPR.
13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên có hoạt tính so với hoạt tính tối đa của fructoza như được xác định theo mức gia tăng độ huỳnh quang theo hợp chất mà nó thể hiện mức giảm của EC_{50} theo hợp chất đối với fructoza ít nhất gấp hai lần trong thử nghiệm độ huỳnh quang bằng cách sử dụng dụng cụ FLIPR.
14. Phương pháp theo điểm 12, trong đó ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên có khả năng sao cho ít nhất 10 trong số 100 tế bào đã được chuyển nhiễm có sự gia tăng độ huỳnh quang theo hợp chất xác định được bằng kính hiển vi huỳnh quang.
15. Phương pháp theo điểm 12, trong đó ít nhất một hợp chất không có trong tự nhiên có khả năng sao cho số lượng tế bào huỳnh quang đáp ứng với nồng độ cận tối đa của

fructoza tăng lên ít nhất hai lần.

16. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó sản phẩm ăn được chọn từ nhóm bao gồm: xúp loãng/lỏng, thực phẩm khô hoặc nấu được, và đồ uống.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Senomyx, Inc.

<120> PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHỈNH VỊ SAVORY VÀ VỊ NGỌT CỦA
SẢN PHẨM ĂN ĐƯỢC HOẶC SẢN PHẨM THUỐC

<130> 19328.0001u1

<140> Chưa gán

<141> 2004-08-06

<150> 60/494,071

<151> 2003-08-06

<150> 60/552,064

<151> 2004-03-09

<160> 33

<170> Chương trình FastSEQ dùng cho phiên bản Windows 4.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<400> 1

Ser	Val	Ser	Thr	Trp
1				5

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<221> BIẾN THỂ

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

<223> Ở vị trí 1, Xaa có thể là Thr hoặc Arg

Ở vị trí 3, Xaa có thể là Phe hoặc Leu

Ở vị trí 4, Xaa có thể là Arg, Gln hoặc Pro

Ở vị trí 6, Xaa có thể là Arg hoặc Thr

Ở vị trí 7, Xaa có thể là Ser, Pro hoặc Val

Ở vị trí 8, Xaa có thể là Val, Glu, Arg, Lys hoặc Thr

Ở vị trí 11, Xaa có thể là Ala hoặc Glu

Ở vị trí 12, Xaa có thể là Trp hoặc Leu

Ở vị trí 13, Xaa có thể là Arg, His hoặc 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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<221> BIẾN THỂ

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

<223> Ở vị trí 1, Xaa có thể là Leu hoặc Gln

Ở vị trí 3, Xaa có thể là Glu, Gly hoặc Thr

Ở vị trí 4, Xaa có thể là Asn, Arg hoặc Cys

Ở vị trí 7, Xaa có thể là Arg hoặc Glu

Ở vị trí 9, Xaa có thể là Arg hoặc Lys

Ở vị trí 10, Xaa có thể là Cys, Gly hoặc Phe

Ở vị trí 11, Xaa có thể là Val, Leu hoặc Ile

Ở vị trí 13, Xaa có thể là Phe hoặc Leu

Ở vị trí 14, Xaa có thể là Ala hoặc Ser

Ở vị trí 15, Xaa có thể là Met hoặc 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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<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														

```

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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<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					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	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	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 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> Trình tự nhân tạo

<220>

 <223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
 cấu trúc tổng hợp

<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
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
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 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
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
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
Ala Gln Ala	Leu His Asn Thr Leu	Gln Cys Asn Ala	Ser Gly Cys Pro
	405	410	415
Ala Gln Asp	Pro Val Lys Pro Trp	Gln Leu Leu Glu	Asn Met Tyr Asn
	420	425	430
Leu Thr Phe	His Val Gly Gly Leu	Pro Leu Arg Phe	Asp Ser Ser Gly
	435	440	445
Asn Val Asp	Met Glu Tyr Asp Leu	Lys Leu Trp Val	Trp Gln Gly Ser
	450	455	460

Val	Pro	Arg	Leu	His	Asp	Val	Gly	Arg	Phe	Asn	Gly	Ser	Leu	Arg	Thr
465					470					475					480
Glu	Arg	Leu	Lys	Ile	Arg	Trp	His	Thr	Ser	Asp	Asn	Gln	Lys	Pro	Val
			485						490					495	
Ser	Arg	Cys	Ser	Arg	Gln	Cys	Gln	Glu	Gly	Gln	Val	Arg	Arg	Val	Lys
		500						505					510		
Gly	Phe	His	Ser	Cys	Cys	Tyr	Asp	Cys	Val	Asp	Cys	Glu	Ala	Gly	Ser
	515						520					525			
Tyr	Arg	Gln	Asn	Pro	Asp	Asp	Ile	Ala	Cys	Thr	Phe	Cys	Gly	Gln	Asp
	530					535					540				
Glu	Trp	Ser	Pro	Glu	Arg	Ser	Thr	Arg	Cys	Phe	Arg	Arg	Arg	Ser	Arg
545					550					555					560
Phe	Leu	Ala	Trp	Gly	Glu	Pro	Ala	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
				565					570						575
Ser	Leu	Ala	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Phe	Val	His
	580							585					590		
His	Arg	Asp	Ser	Pro	Leu	Val	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Ala	Cys
	595						600					605			
Phe	Gly	Leu	Val	Cys	Leu	Gly	Leu	Val	Cys	Leu	Ser	Val	Leu	Leu	Phe
	610					615					620				
Pro	Gly	Gln	Pro	Ser	Pro	Ala	Arg	Cys	Leu	Ala	Gln	Gln	Pro	Leu	Ser
625					630					635					640
His	Leu	Pro	Leu	Thr	Gly	Cys	Leu	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	Gln	Ala	Ala
				645					650						655
Glu	Ile	Phe	Val	Glu	Ser	Glu	Leu	Pro	Leu	Ser	Trp	Ala	Asp	Arg	Leu
			660					665					670		
Ser	Gly	Cys	Leu	Arg	Gly	Pro	Trp	Ala	Trp	Leu	Val	Val	Leu	Leu	Ala
	675						680					685			
Met	Leu	Val	Glu	Val	Ala	Leu	Cys	Thr	Trp	Tyr	Leu	Val	Ala	Phe	Pro
	690					695					700				
Pro	Glu	Val	Val	Thr	Asp	Trp	His	Met	Leu	Pro	Thr	Glu	Ala	Leu	Val
705					710					715					720
His	Cys	Arg	Thr	Arg	Ser	Trp	Val	Ser	Phe	Gly	Leu	Ala	His	Ala	Thr
				725					730					735	
Asn	Ala	Thr	Leu	Ala	Phe	Leu	Cys	Phe	Leu	Gly	Thr	Phe	Leu	Val	Arg
			740					745					750		
Ser	Gln	Pro	Gly	Arg	Tyr	Asn	Arg	Ala	Arg	Gly	Leu	Thr	Phe	Ala	Met
	755						760					765			
Leu	Ala	Tyr	Phe	Ile	Thr	Trp	Val	Ser	Phe	Val	Pro	Leu	Leu	Ala	Asn
	770					775					780				
Val	Gln	Val	Val	Leu	Arg	Pro	Ala	Val	Gln	Met	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu
785					790					795					800
Cys	Val	Leu	Gly	Ile	Leu	Ala	Ala	Phe	His	Leu	Pro	Arg	Cys	Tyr	Leu
				805					810					815	
Leu	Met	Arg	Gln	Pro	Gly	Leu	Asn	Thr	Pro	Glu	Phe	Phe	Leu	Gly	Gly
			820					825					830		
Gly	Pro	Gly	Asp	Ala	Gln	Gly	Gln	Asn	Asp	Gly	Asn	Thr	Gly	Asn	Gln
		835					840						845		
Gly	Lys	His	Glu												
			850												

<210> 8

<211> 2526

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<400> 8

atgctgctct	gcacggctcg	cctggctcggc	ctgcagcttc	tcatttcctg	ctgctggggcc	60
tttgccctgcc	atagcacgga	gtctttctcct	gacttcaccc	tccccggaga	ttacctcctg	120
gcaggcctgt	tccctctcca	ttctggctgt	ctgcagggtga	ggcacagacc	cgaggtgacc	180
ctgtgtgaca	ggctctttag	cttcaatgag	catggctacc	acctcttcca	ggctatgcgg	240
cttgggggttg	aggagataaa	caactccacg	gccctgctgc	ccaacatcac	cctgggggtac	300
cagctgtatg	atgtgtgttc	tgactctgcc	aatgtgtatg	ccacgctgag	agtgtctctc	360
ctgccaggggc	aacaccacat	agagctccaa	ggagaccttc	tccactattc	ccctacgggtg	420
ctggcagtgga	ttgggcctga	cagcaccaac	cgtgctgcca	ccacagccgc	cctgctgagc	480
cctttcctgg	tgcccatgat	tagctatgcg	gccagcagcg	agacgctcag	cgtgaagcgg	540
cagtatccct	ctttcctgcg	caccatcccc	aatgacaagt	accagggtgga	gaccatgggtg	600
ctgctgctgc	agaagtctcg	gtggacctgg	atctctctgg	ttggcagcag	tgacgactat	660
gggcagctag	gggtgcaggc	actggagaac	caggccactg	gtcaggggat	ctgcattgct	720
ttcaaggaca	tcatgccctt	ctctgccccag	gtgggcatg	agaggatgca	gtgcctcatg	780
cgccacctgg	cccaggccgg	ggccaccgtc	gtgggtgttt	tttccagccg	gcagttggcc	840
aggggtgtttt	tcgagtccgt	ggtgctgacc	aacctgactg	gcaagggtgtg	ggtcgccctca	900
gaagcctggg	ccctctccag	gcacatcact	gggggtgccc	ggatccagcg	cattggggatg	960
gtgctggggcg	tggccatcca	gaagagggct	gtccctggcc	tgaaggcggt	tgaagaagcc	1020
tatgcccggg	cagacaagaa	ggcccctagg	ccttgccaca	agggctcctg	gtgcagcagc	1080
aatcagctct	gcagagaatg	ccaagctttc	atggcacaca	cgatgcccaa	gctcaaagcc	1140
ttctccatga	gttctgccta	caacgcatac	cgggctgtgt	atgcgggtggc	ccatggccctc	1200
caccagctcc	tgggctgtgc	ctctggagct	tgttccaggg	gcccaggtcta	cccctggcag	1260
cttttggagc	agatccacaa	ggtgcatttc	cttctacaca	aggacactgt	ggcgtttaac	1320
gacaacagag	atcccctcag	tagctataac	ataattgcct	gggactggaa	tggaccceaag	1380
tggaccttca	cggtcctcgg	ttcctccaca	tggctctccag	ttcagctaaa	cataaatgag	1440
acaaaaatcc	agtggcacgg	aaaggacaac	cagggtgccta	agtctgtgtg	ttccagcgac	1500
tgtcttgaag	ggcaccagcg	agtggttacg	ggtttccatc	actgctgctt	tgagtgtgtg	1560
ccctgtgggg	ctgggacctt	cctcaacaag	agtgaacctc	acagatgcca	gccttgtggg	1620
aaagaagagt	gggcacctga	gggaagccag	acctgcttcc	cgcgcaactgt	ggtgtttttg	1680
gctttgcgtg	agcacacctc	ttgggtgctg	ctggcagcta	acacgctgct	gctgctgctg	1740
ctgcttggga	ctgctggcct	gtttgcctgg	cacctagaca	cccctgtggt	gaggtcagca	1800
gggggcccgc	tgtgctttct	tatgctgggc	tccctggcag	caggtagtgg	cagcctctat	1860
ggctttctttg	gggaaccac	aaggcctgcg	tgcttgcctac	gccaggccct	ctttgccctt	1920
ggtttcacca	tcttctctgc	ctgcctgaca	gttcgctcat	tccaaactaat	catcatcttc	1980
aagttttcca	ccaaggatacc	tacattctac	cacgcctggg	tccaaaacca	cgggtgctggc	2040
ctgtttgtga	tgatcagctc	agcggcccag	ctgcttatct	gtctaacttg	gctgggtggtg	2100
tggacccac	tgctgctag	ggaataccag	cgcttcccc	atctggtgat	gcttgagtgc	2160
acagagacca	actccctggg	cttcatactg	gccttccctc	acaatggcct	cctctccatc	2220
agtgcctttg	cctgcagcta	cctgggtaag	gacttgccag	agaactacaa	cgaggccaaa	2280
tgtgtcacct	tcagcctgct	cttcaacttc	gtgtcctgga	tcgccttctt	caccacggcc	2340
agcgtctacg	acggcaagta	cctgcctgcg	gccaacatga	tggctgggct	gagcagcctg	2400
agcagcggct	tcgggtgggta	ttttctgcct	aagtgtctacg	tgatcctctg	ccgccagac	2460
ctcaacagca	cagagcactt	ccaggcctcc	attcaggact	acacgaggcg	ctgcggctcc	2520
acctga						2526

<210> 9

<211> 2559

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<400> 9

atgctggggc	ctgctgtcct	gggcctcagc	ctctgggctc	tcctgcaccc	tgggacgggg	60
gccccattgt	gcctgtcaca	gcaacttagg	atgaaggggg	actacgtgct	gggggggctg	120
ttccccctgg	gcgaggccga	ggaggctggc	ctccgcagcc	ggacacggcc	cagcagccct	180
gtgtgcacca	ggttctcctc	aaacggcctg	ctctgggcac	tggccatgaa	aatggccgtg	240
gaggagatca	acaacaagtc	ggatctgctg	cccgggctgc	gcctgggcta	cgacctcttt	300
gatacgtgct	cggagcctgt	ggtggccatg	aagcccagcc	tcattgttct	ggccaaggca	360
ggcagccggc	acatgcgcgc	ctactgcaac	tacacgcagt	accagccccg	tgtgctggct	420
gtcatcgggc	cccactcgtc	agagctcgcc	atgggtcacg	gcaagttctt	cagcttcttc	480
ctcatgcccc	aggtcagcta	cgggtgctagc	atggagctgc	tgagcgcccc	ggagaccttc	540
ccctccttct	tccgcaccgt	gcccagcgac	cgtgtgcagc	tgacggccgc	cgcgagctg	600
ctgcaggagt	tgggtggaa	ctgggtggcc	gcccggggca	gcgacgacga	gtacggcccg	660
cagggcctga	gcattctctc	ggccctggcc	gcggcacgcg	gcattctgcat	cgcgcacgag	720
ggcctgggtg	cgctgccccg	tggcgatgac	tgcgggctgg	ggaagggtgca	ggacgtcctg	780
caccagggtga	accagagcag	cgtgcagggtg	gtgctgctgt	tgcctccgt	gcacgcccgc	840
cacgccctct	tcaactacag	catcagcagc	aggctctcgc	ccaagggtgtg	ggtggccagc	900
gaggcctggc	tgacctctga	cctgggtcatg	gggctgcccc	gcattggccca	gatgggcacg	960
gtgcttgggt	tcctccagag	gggtgcccag	ctgcacgagt	tcctccagta	cgtgaagacg	1020
cacctggccc	tggccaccga	cccggccttc	tgctctgccc	tgggcgagag	ggagcagggt	1080
ctggaggagg	acgtgggtggg	ccagcgctgc	ccgcagtgtg	actgcatcac	gctgcagaac	1140
gtgagcgag	ggctaaatca	ccaccagacg	ttctctgtct	acgcagctgt	gtatagcgtg	1200
gcccaggccc	tgcacaacac	tcttcagtgc	aacgcctcag	gctgccccgc	gcaggacccc	1260
gtgaagccct	ggcagctcct	ggagaacatg	tacaacctga	ccttccacgt	gggcgggctg	1320
ccgctgcggt	tgcacagcag	cggaaacgtg	gacatggagt	acgacctgaa	gctgtgggtg	1380
tggcagggct	cagtggccag	gctccacgac	gtgggcaggt	tcaacggcag	cctcaggaca	1440
gagcgctga	agatccgctg	gcacacgtct	gacaaccaga	agcccgtgtc	ccggtgctcg	1500
cggcagtgcc	aggaggggcca	ggtgcgcccg	gtcaaggggt	tcactcctg	ctgctacgac	1560
tgtgtggact	gcgaggcggg	cagctaccgg	caaaacccag	acgacatcgc	ctgcaccttt	1620
tgtggccagg	atgagtggtc	cccggagcga	agcacacgct	gcttccgccc	caggtctcgg	1680
ttcctggcat	ggggcgagcc	ggctgtgctg	ctgctgctcc	tgctgctgag	cctggcgctg	1740
ggccttgtgc	tggctgcttt	ggggctgttc	gttcaccatc	gggacagccc	actggttcag	1800
gcctcggggg	ggcccttggc	ctgctttggc	ctggtgtgcc	tgggcctggg	ctgcctcagc	1860
gtcctcctgt	tccttggcca	gcccagccct	gcccgatgcc	tggcccagca	gcccttgtcc	1920
cacctcccgc	tcacgggctg	cctgagcaca	ctcttcctgc	aggcggccga	gatcttcgtg	1980
gagtcagaac	tgccctctgag	ctgggcagac	cggctgagtg	gctgcctgcg	ggggccctgg	2040
gcctggctgg	tgggtgctgct	ggccatgctg	gtggaggctg	cactgtgcac	ctggtacctg	2100
gtggccttcc	cgcgggaggt	ggtgacggac	tggcacatgc	tgcccacgga	ggcgctgggtg	2160
cactgccgca	cacgctcctg	ggtcagcttc	ggcctagcgc	acgccaccaa	tgccacgctg	2220
gcctttctct	gcttcctggg	cactttcctg	gtgcggagcc	agccgggctg	ctacaaccgt	2280
gcccgtggcc	tcacctttgc	catgctggcc	tacttcatca	cctgggtctc	ctttgtgccc	2340
ctcctggcca	atgtgcagg	ggtcctcagg	cccgcgctgc	agatgggcgc	cctcctgctc	2400
tgtgtcctgg	gcattcctgg	tgcttccac	ctgcccagg	gttacctgct	catgcggcag	2460
ccagggctca	acacccccga	gttcttcctg	ggagggggcc	ctggggatgc	ccaaggccag	2520
aatgacggga	acacaggaaa	tcaggggaaa	catgagtga			2559

<210> 10

<211> 2518

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<400> 10

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

ctccatgcca	acatgaaggg	cattgtttcac	cttaacttcc	tgcaggtgcc	catgtgcaag	180
gagtatgaag	tgaaggtgat	aggctacaac	ctcatgcagg	ccatgcgctt	cgcggtggag	240
gagatcaaca	atgacagcag	cctgctgcct	ggtgtgctgc	tgggctatga	gatcgtggat	300
gtgtgctaca	tctccaacaa	tgtccagccg	gtgctctact	tccctggcaca	cgaggacaac	360
ctccttccca	tccaagagga	ctacagtaac	tacatttccc	gtgtggtggc	tgtcattggc	420
cctgacaact	ccgagtctgt	catgactgtg	gccaatccct	ctccctattt	ctccttccac	480
agatcaccta	cagcgccatc	agcgatgagc	tgcgagacaa	ggtgcgcttc	ccggctttgc	540
tgcgtaccac	accagcgcc	gaccaccagc	tcgaggccat	ggtgcagctg	atgctgcact	600
tccgctggaa	ctggatcatt	gtgctgggtg	gcagcgacac	ctatggccgc	gacaatggca	660
gctgcttggc	gagcgctggg	cccggcgcg	catctgcatc	gccttccagg	agacgctgcc	720
cacactgcag	cccaaccaga	acatgacgtc	agaggagcgc	cagcgccctg	tgaccattgt	780
ggacaagctg	cagcagagca	cagcgcgctg	cgtggctcgt	ttctcgcccg	acctgaccct	840
gtaccacttc	ttcaatgagg	tgctgcgcca	gaacttcacg	ggcgccgtgt	ggatcgccct	900
cgagtccctg	gccatcgacc	cggctcctga	caacctcacg	gagctgggcc	acttgggcac	960
cttcctgggg	atcaccatcc	agagcgtgcc	catcccgggc	ttcagtga	tcgcgagtg	1020
gggcccacag	gctggggccg	caccctcag	caggaccagc	cagagctata	cctgcaacca	1080
ggagtgcgac	aactgcctga	acgccacctt	gtccttcaac	accattctca	ggctctctgg	1140
ggagcgtgtc	gtctacagcg	tgtactctgc	ggtctatgct	gtggcccatg	ccctgcacag	1200
cctcctcggc	tgtgacaaaa	gcacctgcac	caagaggggt	gtctacccct	ggcagctgct	1260
tgaggagatc	tggaaggtca	acttcactct	cctggaccac	caaactctct	tcgaccgcga	1320
aggggacgtg	gctctgcact	tggagattgt	ccagtggcaa	tgggaccgga	gccagaatcc	1380
cttccagagc	gtcgccctct	actacccctt	gcagcgacag	ctgaagaaca	tccaagacat	1440
ctcctggcac	accgtcaaca	acacgatccc	tatgtccatg	tgttccaaga	ggtgccagtc	1500
agggcaaaa	aagaagcctg	tgggcatcca	cgtctgctgc	ttcgagtga	tcgactgcct	1560
tcccggcacc	ttcctcaacc	acactgaaga	tgaatatgaa	tgccaggcct	gcccgaataa	1620
cgagtggctc	taccagagtg	agacctcctg	cttcaagcgg	cagctggctt	tccctggaatg	1680
gcatgaggca	cccaccatcg	ctgtggccct	gctggccgcc	ctgggcttcc	tcagcaccct	1740
ggccatcctg	gtgatattct	ggaggcactt	ccagacaccc	atagtctcgt	cggtctgggg	1800
ccccatgtgc	ttcctgatgc	tgacactgct	gctgggtggc	tacatgggtg	tcccgggtga	1860
cgtggggccg	cccaaggtct	ccacctgcct	ctgccgccag	gccctctttc	ccctctgctt	1920
cacaatttgc	atctcctgta	tcgccgtgcg	ttctttccag	atcgtctgcg	ccttcaagat	1980
ggccagccgc	ttcccacgcg	cctacagcta	ctgggtccgc	taccaggggc	cctacgtctc	2040
tatggcattt	atcacggtac	tcaaaatggg	cattgtggta	attggcatgc	tggccacggg	2100
cctcagtccc	accaccctga	ctgaccccga	tgaccccagg	atcacaattg	tctcctgtaa	2160
ccccaaactac	cgcaacagcc	tgctgtttcaa	caccagcctg	gacctgctgc	tctcagtggg	2220
gggttttcagc	ttcgccctaca	tgggcaaaga	gctgcccacc	aactacaacg	aggccaagtt	2280
catcacccctc	agcatgacct	tctattttcac	ctcatccgtc	tccctctgca	ccttcatgtc	2340
tgcttacagc	ggggtgctgg	tcaccatcgt	ggacctcttg	gtcactgtgc	tcaacctcct	2400
ggccatcagc	ctgggctact	tcggcccca	gtgctacatg	atcctcttct	acccggagcg	2460
caacacgccc	gcctacttca	acagcatgat	ccagggctac	accatgagga	gggactag	2518

<210> 11

<211> 2577

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<400> 11

atgccggggt	tggctatctt	gggcctcagt	ctggctgctt	tcctggagct	tgggatgggg	60
tcctctttgt	gtctgtcaca	gcaattcaag	gcacaagggg	actatatatt	gggtggacta	120
tttcccctgg	gcacaactga	ggaggccact	ctcaaccaga	gaacacagcc	caacggcatc	180
ctatgtacca	ggttctcgcc	ccttggtttg	ttcctggcca	tggctatgaa	gatggctgta	240
gaggagatca	acaatggatc	tgccttgctc	cctgggctgc	gactgggcta	tgacctgttt	300
gacacatgct	cagagccagt	ggtcaccatg	aagcccagcc	tcatgttcat	ggccaaggtg	360

```

ggaagtcaaa gcattgctgc ctactgcaac tacacacagt accaaccggt tgtgctggct 420
gtcattgggtc cccactcatc agagcttgcc ctcattacag gcaagttctt cagcttcttc 480
ctcatggccac aggtcagcta tagtgccagc atggatcggc taagtgaccg ggaacattt 540
ccatccttct tccgcacagt gccagtgac cgggtgcagc tgcaggccgt tgtgacactg 600
ttgcagaatt tcagctggaa ctgggtgggt gccttaggta gtgatgatga ctatggccgg 660
gaaggtctga gcatcttttc tggctgggcc aactcacgag gtatctgcat tgcacacgag 720
ggcctgggtgc cacaacatga cactagtggc caacaattgg gcaaggtggg ggatgtgcta 780
cgccaagtga accaaagcaa agtacagggt gtgggtgctgt ttgcatctgc ccgtgctgtc 840
tactcccttt ttagctacag catccttcat gacctctcac ccaaggtatg ggtggccagt 900
gagtcctggc tgacctctga cctgggtcat acacttccca atattgcccg tbtgggact 960
gttcttgggt ttctgcagcg cggtgcccta ctgcctgaat tttccatta tbtggagact 1020
cgccttgccc tagctgctga cccaacattc tgtgcctccc tgaaaagctga gttggatctg 1080
gaggagcgcg tgatggggcc acgctgttca caatgtgact acatcatgct acagaacctg 1140
tcatctgggc tgatgcagaa cctatcagct gggcagttgc accaccaaat atttgcaacc 1200
tatgcagctg tgtacagtgt ggctcaggcc cttcacaaca cctgacgtg caatgtctca 1260
cattgccaca catcagagcc tgttcaacct tggcagctcc tggagaacat gtacaatatg 1320
agtttccgtg ctcgagactt gacactgcag tttgatgcca aaggaggtg agacatggaa 1380
tatgacctga agatgtgggt gtggcagagc cctacacctg tactacatac tbtaggcacc 1440
ttcaacggca cccttcagct gcagactcg aaaatgtatt ggcaggcaa ccaggtgcca 1500
gtctcccagt gctcccggca gtgcaaagat gccaggtgc gcagagtaaa gggctttcat 1560
tcctgtgct atgactgtgt ggactgcaag gcagggagct accggaagca tccagatgac 1620
ttcacctgta ctccatgtgg caaggatcag tggctcccag aaaaaagcac aacctgctta 1680
cctcgaggcc ccaagtttct ggcttggggg gagccagctg tgctgtcact tctcctgctg 1740
ctttgcctgg tgctgggcct gacactgggt gccctggggc tctttgtcca ctactgggac 1800
agccctcttg ttcaggcctc aggtgggtca ctgttctgct ttggcctgat ctgcctaggc 1860
ctcttctgcc tcagtgtcct tctgttccca ggacgaccac gctctgccag ctgccttgcc 1920
caacaaccaa tggctcacct ccctctcaca ggctgcctga gcacactctt cctgcaagca 1980
gccgagatct ttgtggagtc tgagctgcca ctgagttggg caaactgggt ctgcagctac 2040
cttcggggcc cctgggcttg gctgggtgta ctgctggcca ctcttgtgga ggctgacta 2100
tgtgcctggt acttgatggc tttccctcca gaggtggtga cagattggca ggtgctgccc 2160
acggagggtac tggaacactg ccgcatgctg tcctgggtca gcctgggctt ggtgcacatc 2220
accaatgcag tgtagcttt cctctgcttt ctgggcactt tcctgggtaca gagccagcct 2280
ggtcgctata accgtgcccg tggcctcacc ttgccatgc tagcttattt catcatctgg 2340
gtctcttttg tgccctcct ggctaattgt caggtggcct accagccagc tbtgcagatg 2400
ggtgctatct tattctgtgc cctgggcatc ctggccacct tccacctgcc caaatgctat 2460
gtacttctgt ggctgccaga gctcaacacc caggagtctt tcctgggaag gagcccaag 2520
gaagcatcag atgggaatag tggtagtagt gaggcaactc ggggacacag tgaatga 2577

```

<210> 12

<211> 137

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<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

```


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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<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	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	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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<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
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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<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									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		
						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			

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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<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 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
				245					250					255
Glu	Gln	Arg	Gln	Leu	Asp	Asn	Ile	Leu	Asp	Lys	Leu	Arg	Arg	Thr
			260					265						270
Ala	Arg	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
	290					295					300			
Ser	Glu	Ser	Trp	Ala	Ile	Asp	Pro	Val	Leu	His	Asn	Leu	Thr	Glu
305					310					315				320
Arg	His	Thr	Gly	Thr	Phe	Leu	Gly	Val	Thr	Ile	Gln	Arg	Val	Ser
				325					330					335
Pro	Gly	Phe	Ser	Gln	Phe	Arg	Val	Arg	Arg	Asp	Lys	Pro	Gly	Tyr
			340					345					350	
Val	Pro	Asn	Thr	Thr	Asn	Leu	Arg	Thr	Thr	Cys	Asn	Gln	Asp	Cys
		355					360					365		
Ala	Cys	Leu	Asn	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Asn	Ile	Leu	Ile	Leu
	370					375					380			
Gly	Glu	Arg	Val	Val	Tyr	Ser	Val	Tyr	Ser	Ala	Val	Tyr	Ala	Val
385					390					395				400
His	Ala	Leu	His	Arg	Leu	Leu	Gly	Cys	Asn	Arg	Val	Arg	Cys	Thr
				405					410					415
Gln	Lys	Val	Tyr	Pro	Trp	Gln	Leu	Leu	Arg	Glu	Ile	Trp	His	Val
		420						425				430		
Phe	Thr	Leu	Leu	Gly	Asn	Arg	Leu	Phe	Phe	Asp	Gln	Gln	Gly	Asp
	435						440					445		
Pro	Met	Leu	Leu	Asp	Ile	Ile	Gln	Trp	Gln	Trp	Asp	Leu	Ser	Gln
	450					455					460			
Pro	Phe	Gln	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Ser	Pro	Thr	Ser	Lys	Arg	Leu
465					470					475				480
Tyr	Ile	Asn	Asn	Val	Ser	Trp	Tyr	Thr	Pro	Asn	Asn	Thr	Val	Pro
				485					490					495
Ser	Met	Cys	Ser	Lys	Ser	Cys	Gln	Pro	Gly	Gln	Met	Lys	Lys	Ser
		500						505					510	
Gly	Leu	His	Pro	Cys	Cys	Phe	Glu	Cys	Leu	Asp	Cys	Met	Pro	Gly
	515						520					525		
Tyr	Leu	Asn	Arg	Ser	Ala	Asp	Glu	Phe	Asn	Cys	Leu	Ser	Cys	Pro
	530					535					540			
Ser	Met	Trp	Ser	Tyr	Lys	Asn	Asp	Ile	Thr	Cys	Phe	Gln	Arg	Arg
545					550					555				560
Thr	Phe	Leu	Glu	Trp	His	Glu	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Val	Ala	Leu
				565				570					575	
Leu	Ala	Ala	Leu	Gly	Phe	Leu	Ser	Thr	Leu	Ala	Ile	Leu	Val	Ile
		580						585				590		
Trp	Arg	His	Phe	Gln	Thr	Pro	Ile	Val	Arg	Ser	Ala	Gly	Gly	Pro
		595					600					605		
Cys	Phe	Leu	Met	Leu	Thr	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Tyr	Met	Val	Val
	610					615					620			
Val	Tyr	Val	Gly	Pro	Pro	Lys	Val	Ser	Thr	Cys	Leu	Cys	Arg	Gln
625					630					635				640
Leu	Phe	Pro	Leu	Cys	Phe	Thr	Ile	Cys	Ile	Ser	Cys	Ile	Ala	Val
				645					650					655
Ser	Phe	Gln	Ile	Val	Cys	Ala	Phe	Lys	Met	Ala	Ser	Arg	Phe	Pro
		660						665					670	
Ala	Tyr	Ser	Tyr	Trp	Val	Arg	Tyr	Gln	Gly	Pro	Tyr	Val	Ser	Met
		675					680					685		

```

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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<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 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 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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<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> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<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

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

```

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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<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													

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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<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

			20					25				30			
Ala Gly Asp Tyr Leu Leu Gly Gly Leu Phe Thr Leu His Ala Asn Val															
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	65			70				75						80	
Leu Gly Tyr Glu Met Val Asp Val Cys Tyr Leu Ser Asn Asn Ile His	85					90						95			
Pro Gly Leu Tyr Phe Leu Ala Gln Asp Asp Asp Leu Leu Pro Ile Leu	100					105					110				
Lys Asp Tyr Ser Gln Tyr Met Pro His Val Val Ala Val Ile Gly Pro	115					120					125				
Asp Asn Ser Glu Ser Ala Ile Thr Val Ser Asn Ile Leu Ser His Phe	130				135					140					
Leu Ile Pro Gln Ile Thr Tyr Ser Ala Ile Ser Asp Lys Leu Arg Asp	145			150						155				160	
Lys Arg His Phe Pro Ser Met Leu Arg Thr Val Pro Ser Ala Thr His	165					170								175	
His Ile Glu Ala Met Val Gln Leu Met Val His Phe Gln Trp Asn Trp	180					185						190			
Ile Val Val Leu Val Ser Asp Asp Asp Tyr Gly Arg Glu Asn Ser His	195					200					205				
Leu Leu Ser Gln Arg Leu Thr Lys Thr Ser Asp Ile Cys Ile Ala Phe	210				215					220					
Gln Glu Val Leu Pro Ile Pro Glu Ser Ser Glu Val Met Arg Ser Glu	225			230						235				240	
Glu Gln Arg Gln Leu Asp Asn Ile Leu Asp Lys Leu Arg Arg Thr Ser	245					250							255		
Ala Arg Val Val Val Val Phe Ser Pro Glu Leu Ser Leu Tyr Ser Phe	260					265						270			
Phe His Glu Val Leu Arg Trp Asn Phe Thr Gly Phe Val Trp Ile Ala	275					280					285				
Ser Glu Ser Trp Ala Ile Asp Pro Val Leu His Asn Leu Thr Glu Leu	290				295					300				320	
Arg His Thr Gly Thr Phe Leu Gly Val Thr Ile Gln Arg Val Ser Ile	305			310						315					
Pro Gly Phe Ser Gln Phe Arg Val Arg Arg Asp Lys Pro Gly Tyr Pro	325					330						335			
Val Pro Asn Thr Thr Asn Leu Arg Thr Thr Cys Asn Gln Asp Cys Asp	340					345						350			
Ala Cys Leu Asn Thr Thr Lys Ser Phe Asn Asn Ile Leu Ile Leu Ser	355					360					365				
Gly Glu Arg Val Val Tyr Ser Val Tyr Ser Ala Val Tyr Ala Val Ala	370				375					380				400	
His Ala Leu His Arg Leu Leu Gly Cys Asn Arg Val Arg Cys Thr Lys	385			390						395				415	
Gln Lys Val Tyr Pro Trp Gln Leu Leu Arg Glu Ile Trp His Val Asn	405					410						415			
Phe Thr Leu Leu Gly Asn Arg Leu Phe Phe Asp Gln Gln Gly Asp Met	420					425						430			
Pro Met Leu Leu Asp Ile Ile Gln Trp Gln Trp Asp Leu Ser Gln Asn	435					440					445				
Pro Phe Gln Ser Ile Ala Ser Tyr Ser Pro Thr Ser Lys Arg Leu Thr	450				455					460				480	
	465			470						475					

```

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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

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

<210> 25

<211> 857

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<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 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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<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
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
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
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
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> Trình tự nhân tạo

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<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                      800
Leu Leu Ala Ile Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Pro Lys Cys Tyr Met Ile
      805                      810                      815
Leu Phe Tyr Pro Glu Arg Asn Thr Pro Ala Tyr Phe Asn Ser Met Ile
      820                      825                      830
Gln Gly Tyr Thr Met Arg Arg Asp
      835                      840

```

<210> 28

<211> 1123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<400> 28

```

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

```

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

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<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					
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					
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	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					
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					
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					
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					
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 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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<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 1	Glu 2	Ile 3	Asn 4	Asn 85	Lys 5	Ser 6	Asp 7	Leu 8	Leu 90	Pro 10	Gly 11	Leu 12	Arg 13	Leu 95	Gly 14
Tyr 15	Asp 16	Leu 17	Phe 100	Asp 18	Thr 19	Cys 20	Ser 21	Glu 105	Pro 22	Val 23	Val 24	Ala 25	Met 110	Lys 26	Pro 27
Ser 28	Leu 29	Met 115	Phe 30	Leu 31	Ala 32	Lys 33	Ala 34	Gly 120	Ser 35	Arg 36	Asp 37	Ile 125	Ala 38	Ala 39	Tyr 40
Cys 41	Asn 130	Tyr 42	Thr 43	Gln 44	Tyr 45	Gln 46	Pro 47	Arg 48	Val 49	Leu 50	Ala 51	Val 52	Ile 53	Gly 54	Pro 55
His 145	Ser 56	Ser 57	Glu 58	Leu 59	Ala 60	Met 61	Val 62	Thr 63	Gly 64	Lys 155	Phe 65	Phe 66	Ser 67	Phe 68	Phe 160
Leu 69	Met 70	Pro 71	Gln 72	Val 73	Ser 74	Tyr 75	Gly 76	Ala 77	Ser 170	Met 78	Glu 79	Leu 80	Leu 81	Ser 82	Ala 83
Arg 84	Glu 85	Thr 86	Phe 180	Pro 87	Ser 88	Phe 89	Phe 90	Arg 91	Thr 92	Val 93	Pro 94	Ser 95	Asp 96	Arg 97	Val 98
Gln 99	Leu 100	Thr 101	Ala 102	Ala 103	Ala 104	Glu 105	Leu 106	Gln 107	Glu 108	Phe 109	Gly 205	Trp 110	Asn 111	Trp 112	
Val 113	Ala 210	Ala 114	Leu 115	Gly 116	Ser 117	Asp 215	Glu 118	Tyr 119	Gly 120	Arg 121	Gln 122	Gly 123	Leu 124	Ser 125	
Ile 225	Phe 126	Ser 127	Ala 128	Leu 129	Ala 130	Ala 131	Ala 132	Arg 133	Gly 134	Ile 135	Cys 136	Ile 137	Ala 138	His 139	Glu 240
Gly 140	Leu 141	Val 142	Pro 143	Leu 144	Pro 145	Arg 146	Ala 147	Asp 148	Asp 250	Ser 149	Arg 150	Leu 151	Gly 152	Lys 153	Val 154
Gln 155	Asp 156	Val 157	Leu 260	His 158	Gln 159	Val 160	Asn 161	Gln 162	Ser 163	Ser 164	Val 165	Gln 166	Val 167	Val 168	Leu 169
Leu 170	Phe 171	Ala 172	Ser 173	Val 174	His 175	Ala 176	Ala 177	His 178	Ala 179	Leu 180	Phe 181	Asn 182	Tyr 183	Ser 184	Ile 185
Ser 186	Ser 187	Arg 188	Leu 189	Ser 190	Pro 191	Lys 192	Val 193	Trp 194	Val 195	Ala 196	Ser 197	Glu 198	Ala 199	Trp 200	Leu 201
Thr 305	Ser 202	Asp 203	Leu 204	Val 205	Met 206	Gly 207	Leu 208	Pro 209	Gly 210	Met 211	Ala 212	Gln 213	Met 214	Gly 215	Thr 320
Val 216	Leu 217	Gly 218	Phe 219	Leu 220	Gln 221	Arg 222	Gly 223	Ala 224	Gln 225	Leu 226	His 227	Glu 228	Phe 229	Pro 230	Gln 231
Tyr 232	Val 233	Lys 234	Thr 340	His 235	Leu 236	Ala 237	Leu 238	Ala 239	Thr 240	Asp 241	Pro 242	Ala 243	Phe 244	Cys 245	Ser 246
Ala 247	Leu 248	Gly 249	Glu 250	Arg 251	Glu 252	Gln 253	Gly 254	Leu 255	Glu 256	Glu 257	Asp 258	Val 259	Val 260	Gly 261	Gln 262
Arg 263	Cys 264	Pro 265	Gln 266	Cys 267	Asp 268	Cys 269	Ile 270	Thr 271	Leu 272	Gln 273	Asn 274	Val 275	Ser 276	Ala 277	Gly 278
Leu 385	Asn 279	His 280	His 281	Gln 282	Thr 283	Phe 284	Ser 285	Val 286	Tyr 287	Ala 288	Ala 289	Val 290	Tyr 291	Ser 292	Val 400
Ala 293	Gln 294	Ala 295	Leu 296	His 297	Asn 298	Thr 299	Leu 300	Gln 301	Cys 302	Asn 303	Ala 304	Ser 305	Gly 306	Cys 307	Pro 308
Ala 309	Gln 310	Asp 311	Pro 312	Val 313	Lys 314	Pro 315	Trp 316	Gln 317	Leu 318	Leu 319	Glu 320	Asn 321	Met 322	Tyr 323	Asn 324
Leu 325	Thr 326	Phe 327	His 328	Val 329	Gly 330	Gly 331	Leu 332	Pro 333	Leu 334	Arg 335	Phe 336	Asp 337	Ser 338	Ser 339	Gly 340
Asn 341	Val 342	Asp 343	Met 344	Glu 345	Tyr 346	Asp 347	Leu 348	Lys 349	Leu 350	Trp 351	Val 352	Trp 353	Gln 354	Gly 355	Ser 356
Val 465	Pro 357	Arg 358	Leu 359	His 360	Asp 361	Val 362	Gly 363	Arg 364	Phe 365	Asn 366	Gly 367	Ser 368	Leu 369	Arg 370	

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 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> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
 cấu trúc tổng hợp

```

<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	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
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
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
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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<400> 32

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

	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		

```

        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 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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo; lưu ý =
cấu trúc tổng hợp

<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

```


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

1/40

117IR1 1 -MLCTARLVGLQLISCCWAFACHSTES—SPDFILPGDYLAGLFPFL-HSGCLQVRHR—PEVTLDRSCSFNEHGYHLFQANRLGVEEINNSTALLPNITLGYLVDCSD-SANVYATLRVL 119
 117IR1 1 -MLFTWAHLLLSQL—YYCWAFSCQRTES—SPGFSLPQDFLAGLFSL-HGJCLQVRHR—PLVTSQDRPDSFGHGYHLFQANRFTVEEINSSALLPNITLGYELVDCSE-SANVYATLRVL 118
 117IR2 1 -AGPRAKTTICSLFF—LLWLALCP-AE—NSDFYLPQDYLLGGFLSL-HANWKGIVHLNFIQVKNCK-EYKVKYGVNLMQANRFVAVEEINJUSSLLPGVLLGYEIVDCYI-SNNVQPVLYFL 115
 117IR2 1 -HGPQARTILCLSL—LLHVLKPKGLVE—NSDFHLACDYLLGGFLTL-HANWKSLSLSYLQVKNCA-EFTMKVLYGNLMQANRFVAVEEINJUSSLLPGVLLGYEMDVCYL-SNNHPLGLYFL 118
 117IR3 1 -MLGPVAVGLSLWALLPFCAPLCL—QQLRMKGDVYLLGGFLPGLCEAEAGLRSRTRPSPVCT—RFSSNGLLWALANKMAVEEINNKSDLLPGLRGLCYDLFDTCSEPVWAMKPSLMFL 117
 117IR3 1 -MPCALILGLSLAFLLELGMSLCL—QOFKAGDYILGGFLPGLGTTEATLNORTQVGLCT—RFSPLGLFLAWANKMAVEEINNKSSALLPGLRGLCYDLFDTCSEPVWTKPSLMFL 117
 117IR1 1 -MWRLLITFFPMIFLEMSILPRAMPDKVYLLAGASSQSVARMDGDVYIGALFVSHHQPAEKVPE—RKCG—ETREQVIGIQRVENFHTLQKINADPVLLPNITLGEIRDSCHWSSVALEQSIET 123
 117IR1 120 SLPG—QHIEIQCGLLHNSP—TVLAVIGPDSINRAATTAALLSPELVNMSIYAASSETLSWKQVPSFLRTIPDKYQVETIMLLQKFCWTWISLVGSSDDYQQLGVQALENQTGQ-G 236
 117IR1 119 ALQC—PRHIEIQDLRNHSS—KVAFIGPDNTDHAVTTAALLCPFLMPLVSYEASSWLSAKKFPSELRTPSDRHOVEVMQQLQSTGHWIISLIGSYGDIQQLGVQALELAVPR-G 235
 117IR2 116 AHE—DNLLPIQEDYSNTS—RVAVIGPDNSESVMIVANFLSFLPQITYSATSDELROKVRFPALLRTPPSADHHEANVQLMLHFRNNITVLVSSDYYGRNGQLGERVARR-D 231
 117IR2 119 ACD—DOLLPIKDYSQMP—HWAVIGPDNSESALTIVSNILSFLPQITYSATSUKLROKRFPSMLRTPPSATHIEANVQLMWHFQNNITVVLVSDDDYGRENSHLSQRLTKTSD 235
 117IR3 118 AKAG—SHDIAAYCNYTQYQ—RVLAVIGPHSSELAMVTKGKFFSFLMPQVSYGASMLLSARETFPSFRTPVSRVQLTAAELLQEGNMMVAALGSDEYGRQLSIFSALAAAR-G 234
 117IR3 118 AKVG—SQSTIAAYCNYTQYQ—RVLAVIGPHSSELALITCKGFFSFLMPQVSYGASMLLSARETFPSFRTPVSRVQLQAVTILLQNFNNMVAALGSDDYGRGLSIFSGLANSR-G 234
 117IR1 124 RDSLISIRDEKQGLNRCLPQDQTLPPGRTKKPIAGVIGPSSVAIQVQLQLFDIPQIAYSATSIDLSDKTLKYFLRWPSDTLOARAILDTWRVNNITVSAVHTEGNYGESMDAFKELAAQE-G 252
 117IR1 237 ICIAFKDIMPFSQAQV—DER—MCLLRHLAQ—ACATVWWFSSRQLARVFFESVLTNLTKQWVA—SEAWALSRIHTGVPQIRIGMVGVALQKAVPGLKAFFEEAYAR—ADKKAPRPHK 354
 117IR1 236 ICVAFKDIVPFSARVG—DPR—MCSMAGHLAQ—ARTTWVWF SNRHLARVFRSRLANLTKQWVA—SEDWALSTYITSVTGIGGTVLGVAVQQRQVPLKEFEESYVR—AVTAAPSACPE 353
 117IR2 232 ICIAFQETLPTLPNQMTSEERQLVTYDKLQ—STARVWFSPDLTYHFFNEVLRQNF TGAWVIA—SESWAIDPVHLNLTGLHGLTELGITIQSVIPPGFSEFRENGPQ—AGPPPLSRTSQ 355
 117IR2 236 ICIAFQEVLPPESSQWMPSEERQLDNILDKLR—TSARVWFSPDLTYHFFNEVLRQNF TGAWVIA—SESWAIDPVHLNLTGLHGLTELGITIQSVIPPGFSEFRENGPQ—AGPPPLSRTSQ 355
 117IR3 235 ICIAHEGLVPLPRADD—SRLGKQDVLHQVQ—SSQVWLLFASVHAHALFNYSISSRLSPKWWVA—SEAMLTSOLVMGLPGMAQMGTVLGLQRCQLHEFFPQVYKTHLA—LATDPAFCSALG 355
 117IR3 235 ICIAHEGLVPQDHTSG—QQLGKQDVLHQVQ—SKQVWLLFASARAVYSLSFSTLHDLSPKWWVA—SESWLTSOLVMTLPNIRVGTGLGLQRCALLPEFSHMVETRLA—LAADPTFCASLK 355
 117IR1 253 LCIAHSOKIYSWAGEK—SFDRLRLKRLERLPKARVWVCFCEGTVRGLLSMARRLGVWGEFSLIGSDGWADRDVEIEGYEANGGIT—IKLQSPFVRSFDDYFLKRLDITNTRNPPFFEFWQ 373

FIG.1A

2/40

```

11R1 355 G-----SWCSNQLQRECAFAHATMPKLAFS-----MSSAYNAYRAYAVAHQLHQLGCA-----SSACSR-GRVYFPHQLLEQIKVHFL-LHKOTVAFNDRDPLSSNIIANDNNGPKW-TFTVL 466
11R1 354 G-----SWCSNQLQRECHITTRNPTLGAFS-----MSAYRYEAYAVAHQLHQLGCT-----SEICSR-GRVYFPHQLLQQIKVHFL-LHENTVAFDNDGDTLGYDIIANDNNGPEN-IFEII 465
11R2 356 S-----YTC-NQEDNCLNATLSFNITLRLSG-----ERWYSYSAYAVAHALHSLGCD-----KSTCTK-RVYVPHQLLEEIKVHFT-LDQJIFFDPCGVNHLHLEIVQNDORSON-PFQSV 465
11R2 360 R-----TTC-NQDDACLNTIKSFNITLRLSG-----ERWYSYSAYAVAHALHRLGCN-----RVRCCK-QKVPVPHQLREIHWHFT-LIGNRLEFDQGGTNPMLDITQKMDLSON-PFQSI 469
11R3 356 EREGLEEDWGQRPQDCITLQNSAGLN-----HQTF-SYAAVYSVAQALHNTLQCN-----ASGCPAQPVKVPVPHQLLEWYNLTFH-VGGPLPRFDSGNQMEYDLKLVWQGSVP-RLHDV 471
11R3 355 -AELDLEERVAGPRCSQDYIMQLSSLQMLSAGQLHQIFATYAAVYSVAQALHNTLQCN-----VSHCHTSEPVQVPHQLLENNVMSFR-ARDLTLQFDKAGSVQMEYDLKLVWQGSPTP-VLHTV 478
11R1 374 HR-----FOCALPGHLLNPNFRKVNCTGNESLEENVQ-----DSKMGFVINALYAMAHFELQNAHHALCPGHVGLCDAMKPIDGRKLLDFLTKSSFVGVSGEEVWFDEKGDAPGRYDINMLQYTEANRYDYMYV 497
11R1 467 GSSTNSPVLNINETIKQWGHKONQVPSVCSDDCLEGHQR-WTGFHHCCECPVCGAGTFLN-KSDLYRCOPCKEWAPEGSCQCFPRTWFLALREHITSWLLAANTILLILLGLTAGLFAWHLDT 594
11R1 466 GSASLSPHLDINKTIQWGHKONQVPSVCTDCLAGHR-WVGSFHCCFECVPCAGTFLN-MSLHICOPGTEEWAPKESTTCFPRTVFELANHEPISLVLAANTILLILLGLTAGLFAWHFHT 593
11R2 466 ASYPLQRQLKN-IQDISHTVNTTPMSKSRQSGQKK-KPVGJHCCFECIDCLPGFLENHTEDEYECQACPNNESYQSEISCFKRQLVLEWHEAPTTIAYALLAALGFLSTLAILVIFHRRFQT 593
11R3 470 ASYPTSRLTY-INNVSHYTPNNTVPSKCSQCPQCAK-KSICLHPCCFECIDCLPGFTLNRSADEFNCLSCPCSMMSYKNDITCFQRRPTFLEWHEVPTTWATLAALGFFSTLAILVIFHRRFQT 597
11R3 472 GFN-GSLRTER-LKIRHITSQNGKPSRCSRQCEQGR-RWKGFSHCCYDCDCEAGSYRQ-NPDDIACITCGQDENSPERSIRCFRRRSRFLANGEPAVILLILLSLALGLVLAALGLFVHRRDS 596
11R3 479 GFEN-GTLQLOH-SKMHFG-NQPVSSCSRQCKQGR-RWKGFSHCCYDCDCKAGSYRK-HPDDFTCTPCCKQNSPEKSTICLPRPKFLANGEPAVLSLILLCLVGLTLAALGLFVHRRDS 601
11R1 498 GTWH-EGVLNIDDYKIQWK-SMMRVSQSEPCIKQIKVIRKGEVSCONICTACKENEFVQ-----DEFTCRACULGNHFWHFLGCEPIPVRYLEWSDIESIIAFAFSCLGILVTLFVTLIFVL 620
11R1 595 PWRAGGRLOFIMLGLSAGSGSLYGFEGEPTPACILROALEALGFTIFLSQTVRSFQLIIIFKSTKVPTEFYHAWQNHGAGLFWM-ISSAQLLICTLWLVWTPLEPA-REYQRPPLVMLECTE 722
11R1 594 PWRAGGRLOFIMLGLSAGSGSLYGFEGEPTPACILRQPLFSLGFAIFLSQLTIRFQLVIFKSTKVPTEFYRTWAGNHGAGLFVI-VSSTVHLLICTLWLVWTPRPT-REYQRPPLVILECTE 721
11R2 594 PIYRSAGGPVCFIMLTLVAYWVPVYVGPVKVSTLCROALEPLCFITCISCAVRSQIVCAFMAASREPRAYSVMYRQGPVWSMA-FITVKMVTWIGMLATGLSPTTRTDPPDKITTVSNP 722
11R2 598 PWRAGGPVCFIMLVLAFGMPVYVGPPTVFCROAFFVCFSLSCITVRSFQIVCFKMARLPSAYSFMYRHGPPYFVA-FITAIKVALWGNMLATTINPIGRTDPPDPNIMLSCHP 726
11R3 597 PLVQASGGLPACFGLVCLGLVCLSVLFFGQPSARCLACQPLSHLPLTGCLSTLFLQAEIFVESELPLSHADRSLSCGLRCPHAWLVL-LAMLEVALCTWYLYAFPEVW-TDWHMLPTEALVHCR 724
11R3 602 PLVQASGGLPACFGLVCLGLVCLSVLFFGQPSARCLACQPMHPLTGCLSTLFLQAEIFVESELPLSHAWLCSYL RCPHAWLVL-LATLEVALCANYLYAFPEVW-TDWHMLPTEALVHCR 729
11R1 621 PWRSSRELCTYILAGLELGVCPETLAKPTTTSYLOQLVLGLSSANCYSALVTKTRJARILAGSKKICTRKPFRFSAWAQVILASLISVQLTLWTLIINEPPMPL-SYPSIK-EVYLICNT 748

```

FIG.1B

3/40

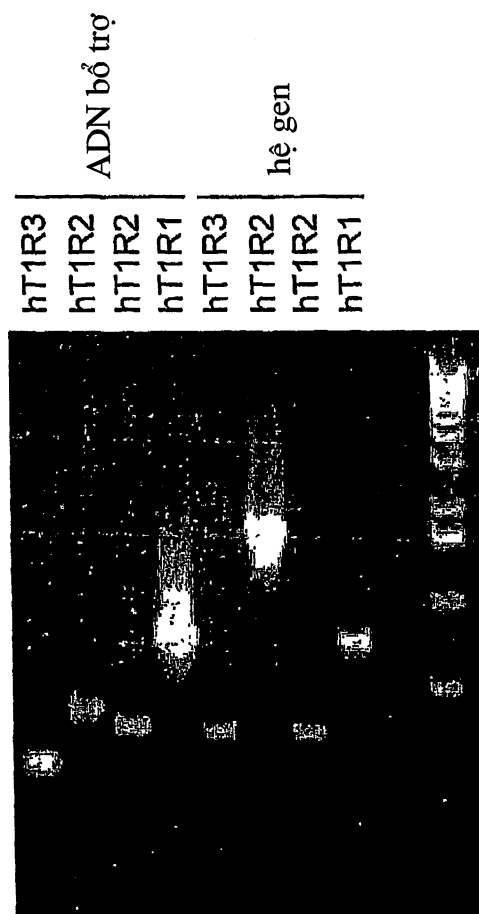
```

841 723 TNSLGTILAFYNGLLSISAFACSYLGNOLPENYNEAKGVTFSLLENFVSWIAFFTITASVDGKYLPAANNMAGLSSLSGFGGYFLPKCYVILGRPDLNSTEHFQASIQDYTRRGST
840 722 VNSVGFLLAFTHNILLSISTFVGSYLGKELPENYNEAKGVTFSLLENFVSWIAFFTITASVQGSYLPANNVLACGLITLSGFGSGYFLPKCYVILCRPELNWTEHFQASIQDYTRRGTT
839 723 NYRNSLLFNISDLILLSWGFSAFNGKELPTNYNEAKFTILSMTFYFTSSVSLCTFNISAYSGVLVTVDLLVTVLNLLAISLGYFCPKCYMILFYPERNTPAYFNSMIQGYTMRRD
843 727 NYRNGLLFNISMDILLSVGLGFSFAYNGKELPTNYNEAKFTILSMTFSTSSISLCTFNISVDGVLVTMDLLVTVLNFLTALGIGYFCPKCYMILFYPERNTSAYFNSMIQGYTMRRKS
852 725 RSNWSTGLAHATNATLAFCLGTFELVRSQPCRYNRARGITFAMLAYFTIWSFVPLLANVQWLRPANDNGALLCVLGTAAFLPRCYLLMRQPCNLNTEFFELGSGPGDAGQNDGN--TCNQGKHE
858 730 RSNWSLGLVHITNAVLAFLCLGTFELVQSQPCRYNRARGITFAMLAYFTIWSFVPLLANVQVAYQPDNDGALLFCALGILATFHLPKCYVLLWLPENLTQEFFELGRSPKEASDGNSSGSEATRGHSE
845 749 SN-LGWAPAGYNGLLINSCITYAFKTRNPPANFNEAKYATMTYTTCITNLAFVPIYFCSN--YKLTTCFAVSLSVTVLGGMFTPKMTILLAKPERN

```

FIG. 1C

4/40



hT1R2 và hT1R3 được biểu hiện trong biểu mô lưỡi ở người.
 Các sản phẩm khuếch đại đặc hiệu ADN bổ trợ có thể được khuếch
 đại từ ADN bổ trợ được điều chế từ nhú dạng đài ở người

FIG.2

5/40

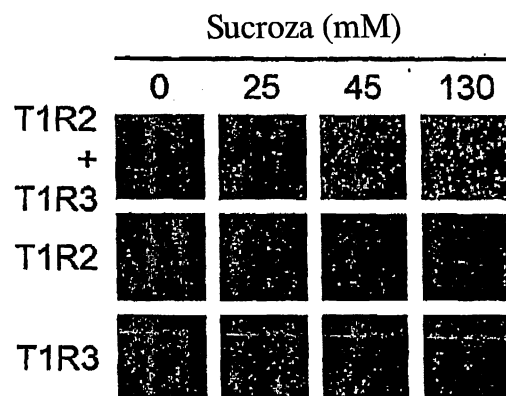


FIG.3A



FIG.3B

6/40

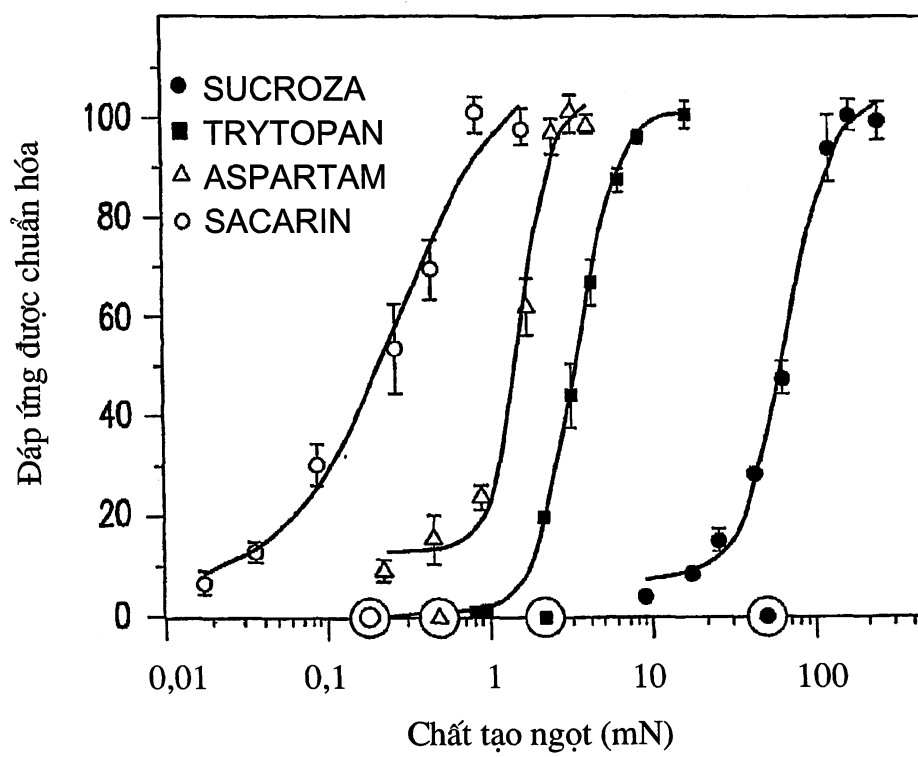


FIG.3C

7/40

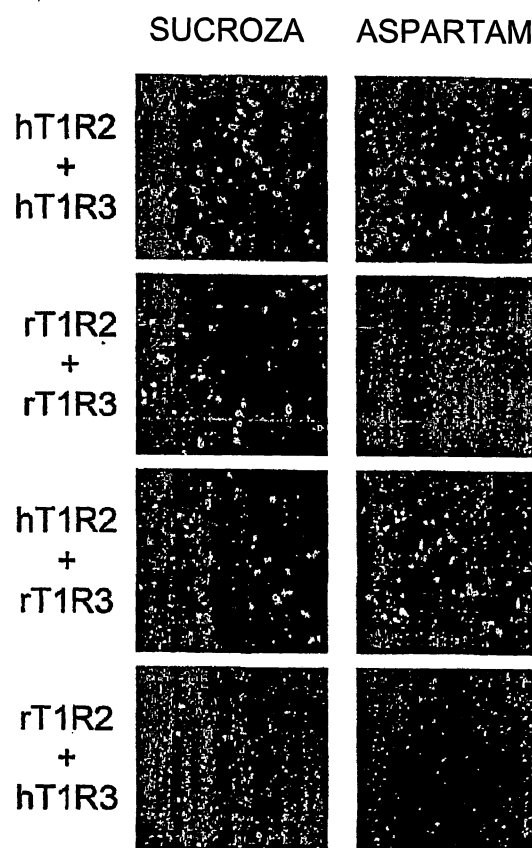


FIG.4

8/40

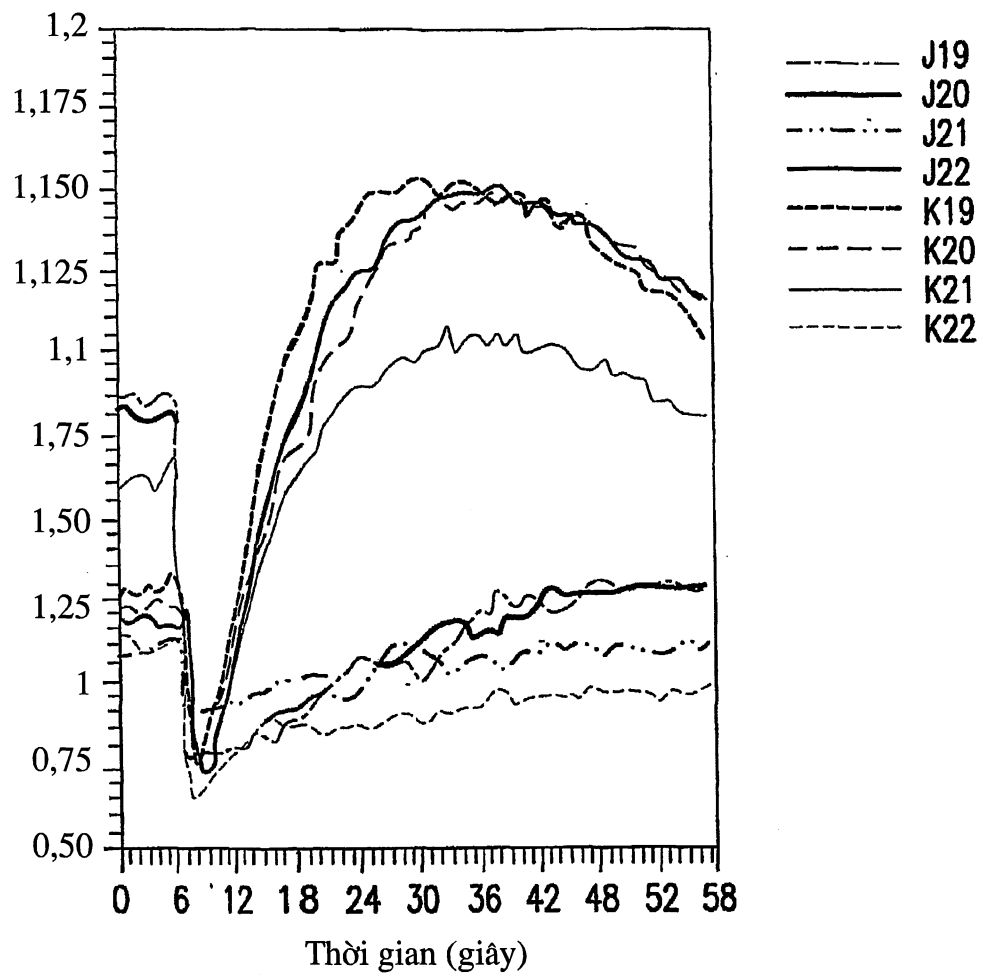


FIG.5

9/40

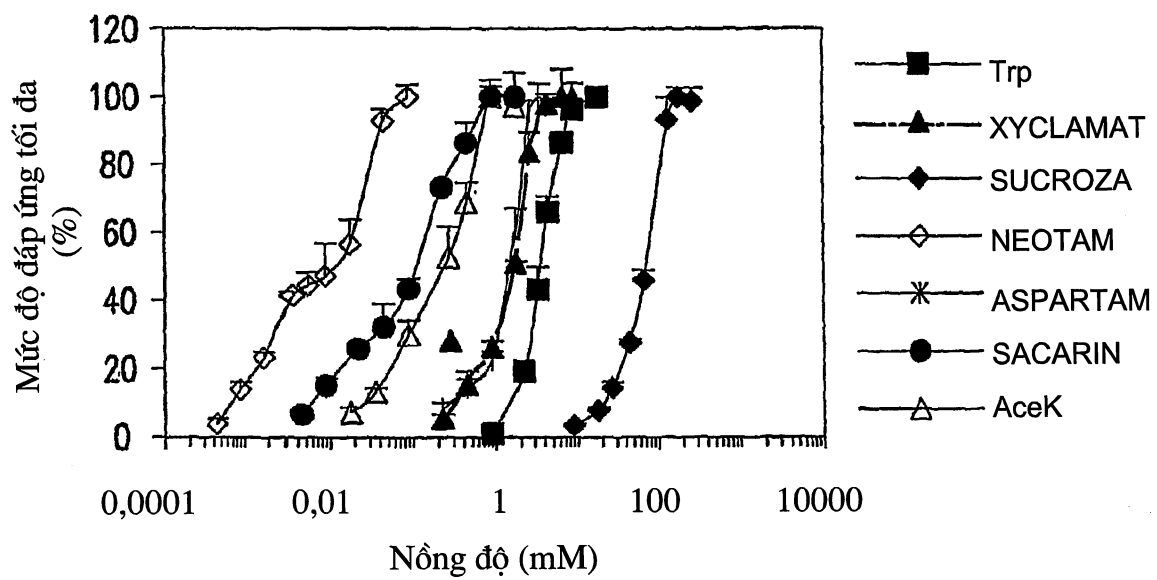


FIG.6

19645

10/40

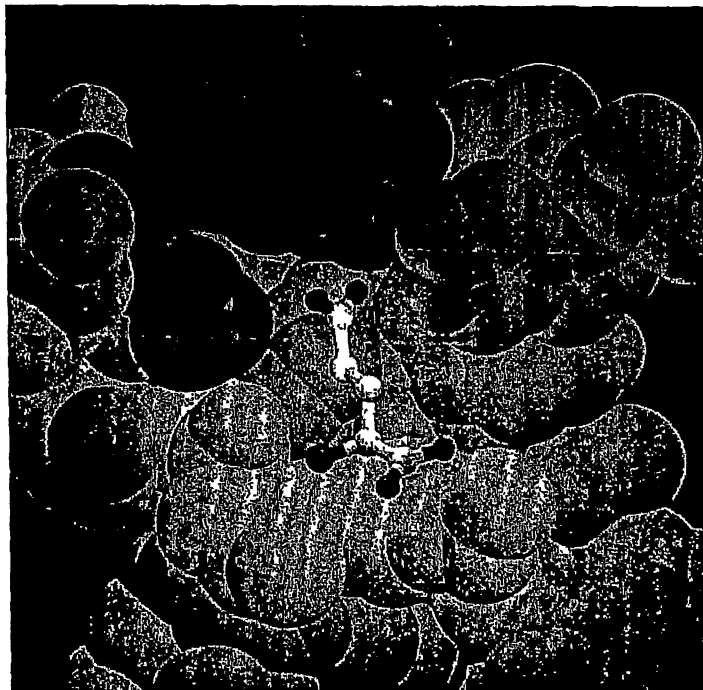


FIG.7

11/40

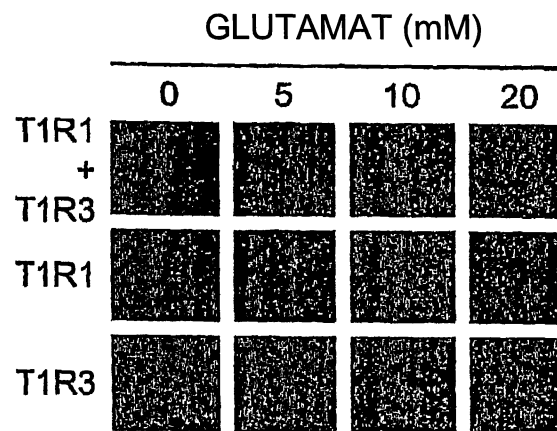


FIG.8A

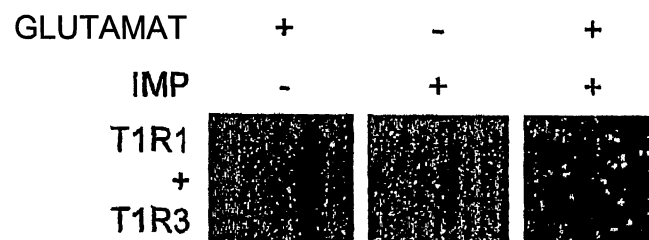


FIG.8B

12/40

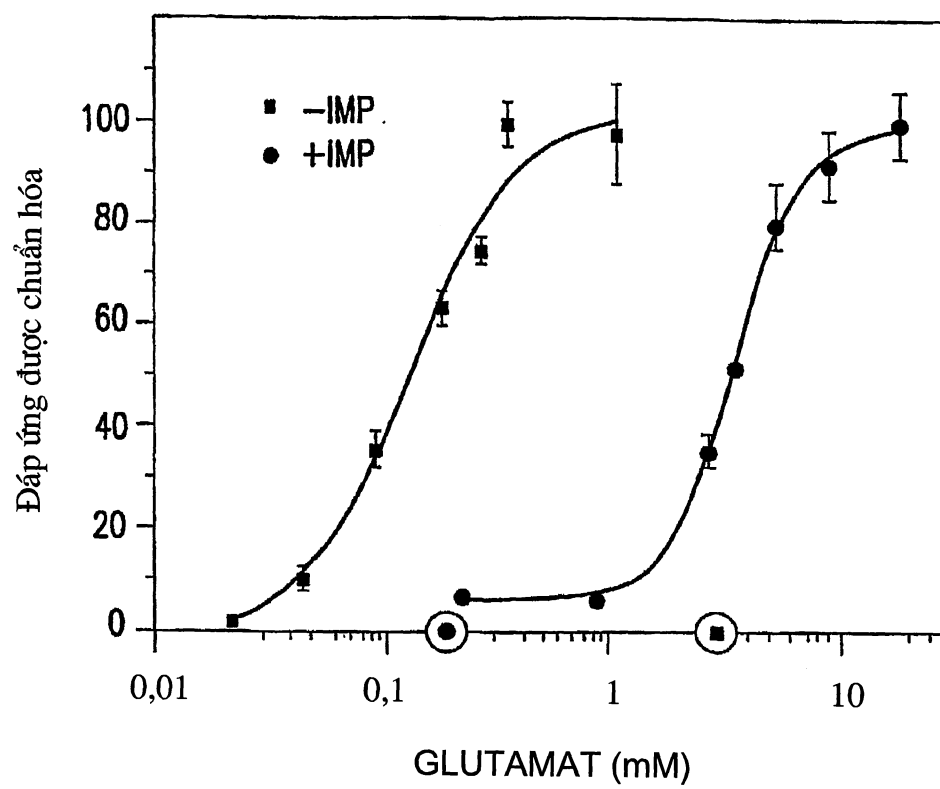
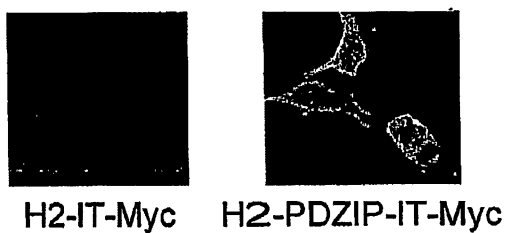


FIG.8C

13/40

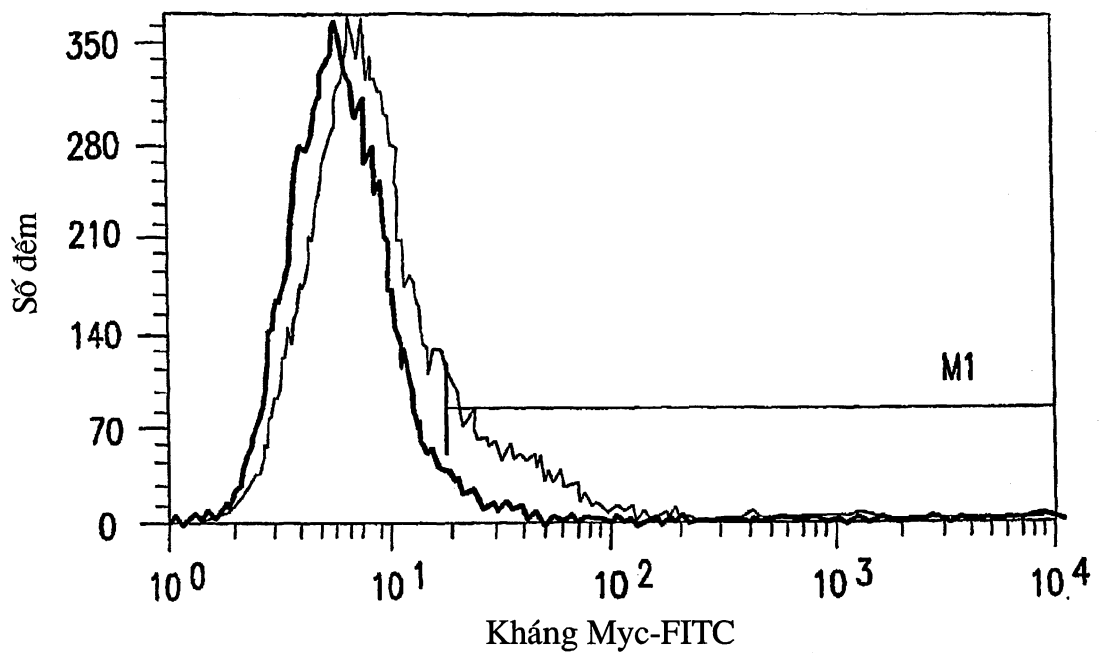


PDZIP tạo điều kiện thuận lợi cho sự biểu hiện bề mặt của T1R2 ở người

Việc nhuộm miễn dịch huỳnh quang hT1R2 được đánh dấu bằng Myc cho thấy rằng PDZIP làm tăng đáng kể lượng protein T1R2 người trên màng huyết tương

FIG.9A

14/40



Số liệu phân tích FACS cho cùng một kết quả

- T1R2 người được đánh dấu bằng Myc: đường đậm màu
- T1R2 người được đánh dấu bằng Myc cùng với PDZIP: đường nhạt màu

FIG.9B

15/40

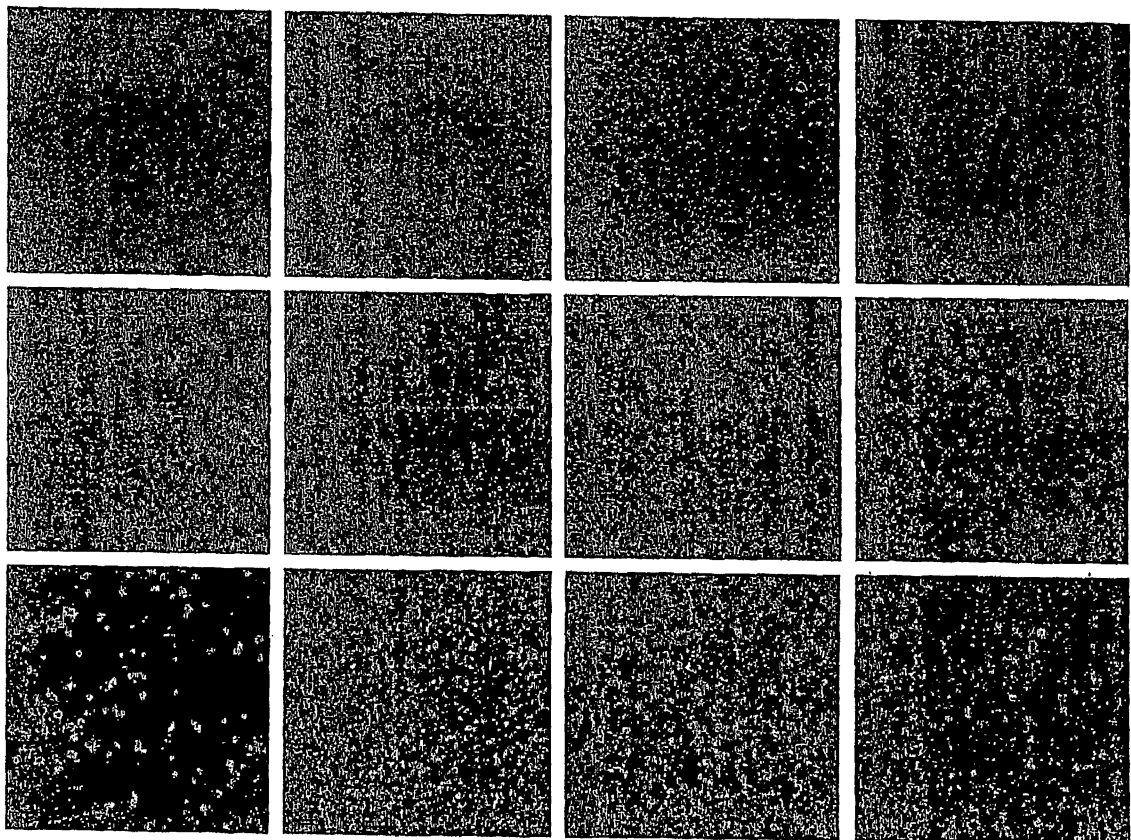


FIG.10

16/40

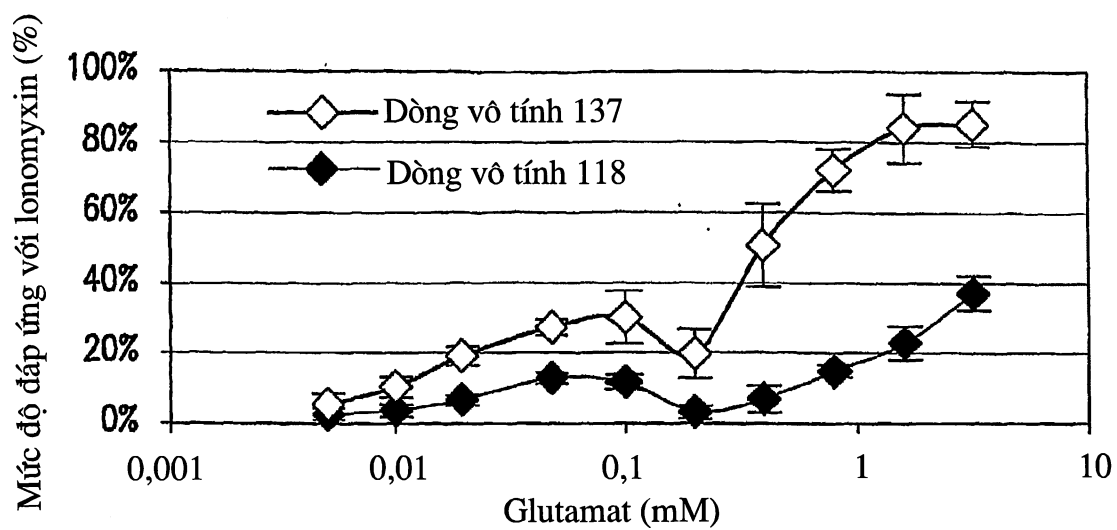


FIG. 11

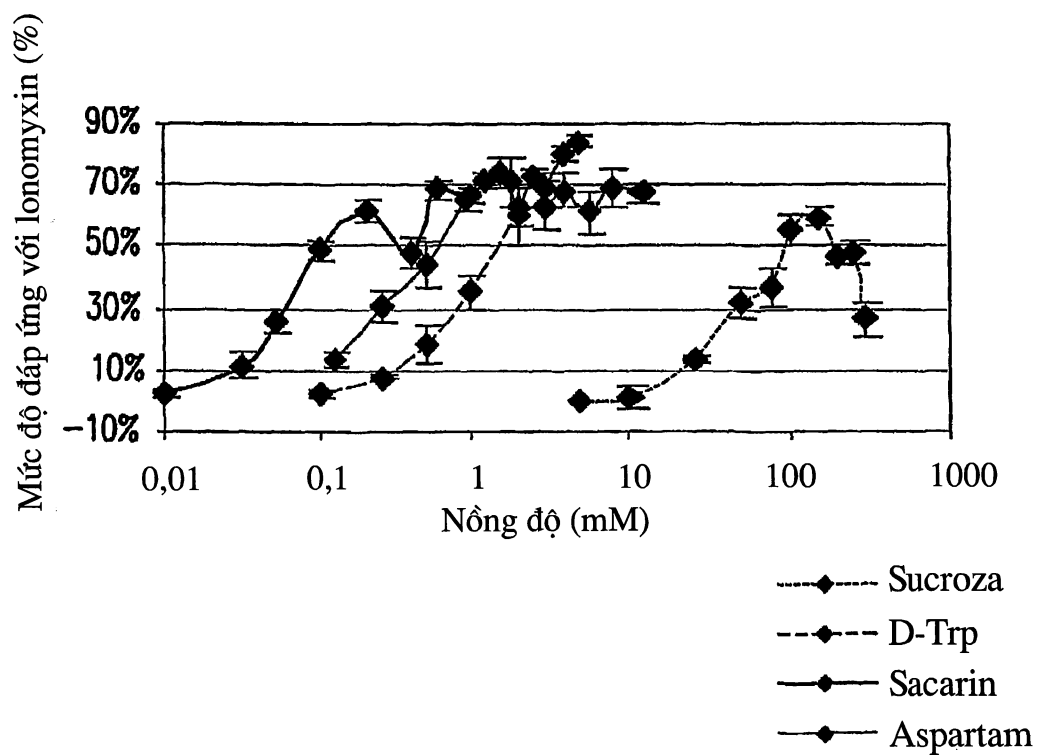


FIG 12

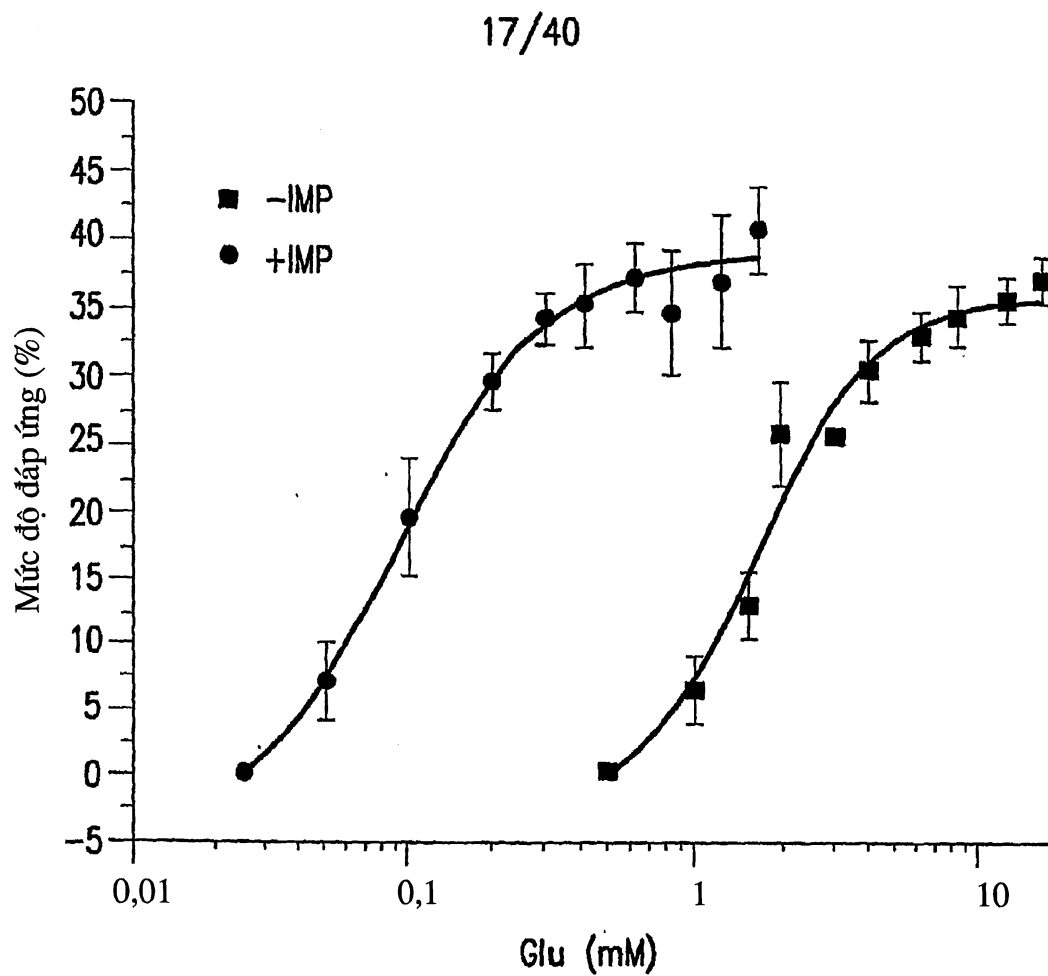


FIG. 13

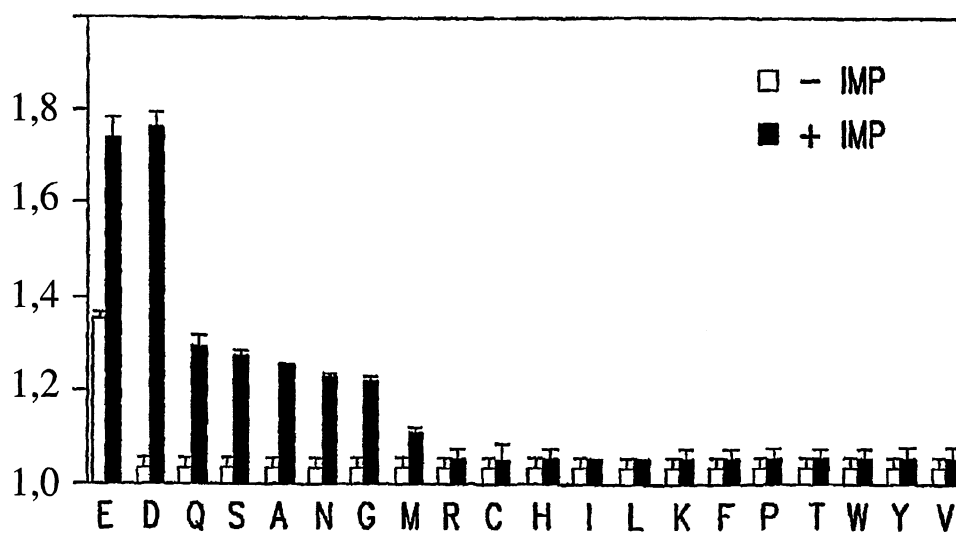


FIG. 14

18/40

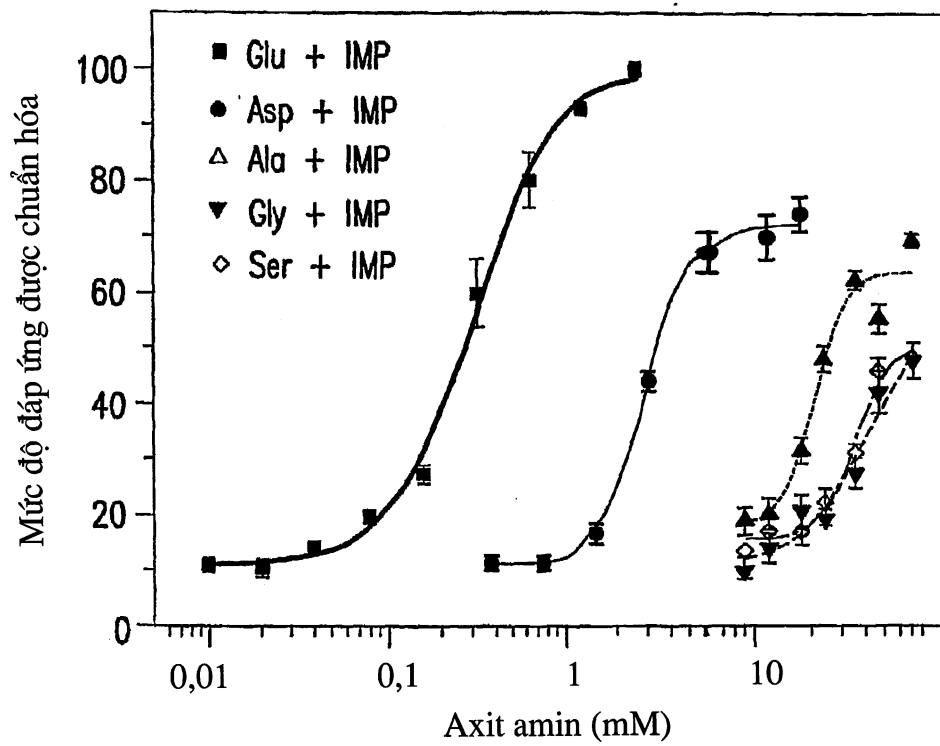


FIG.15

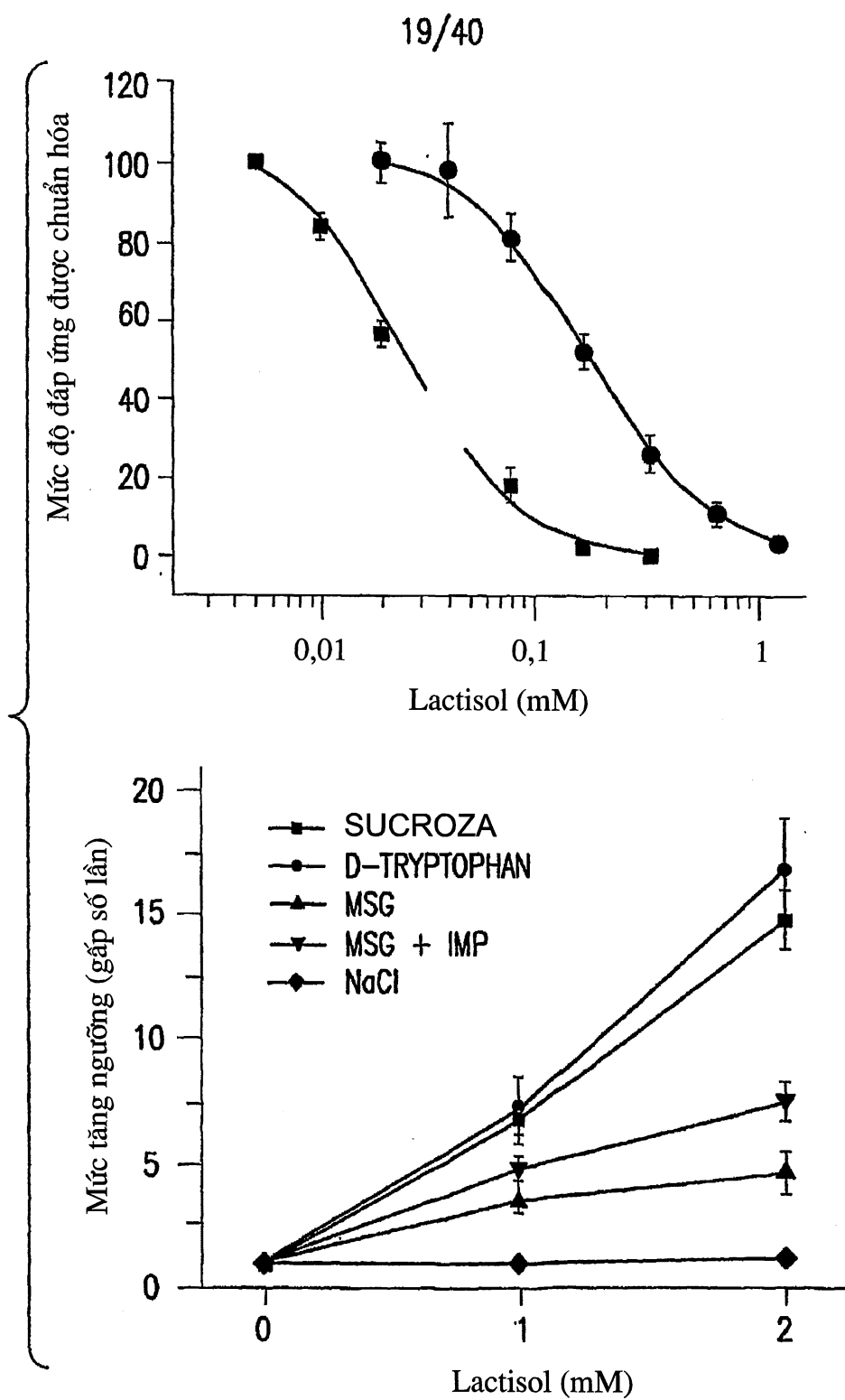


FIG. 16

20/40

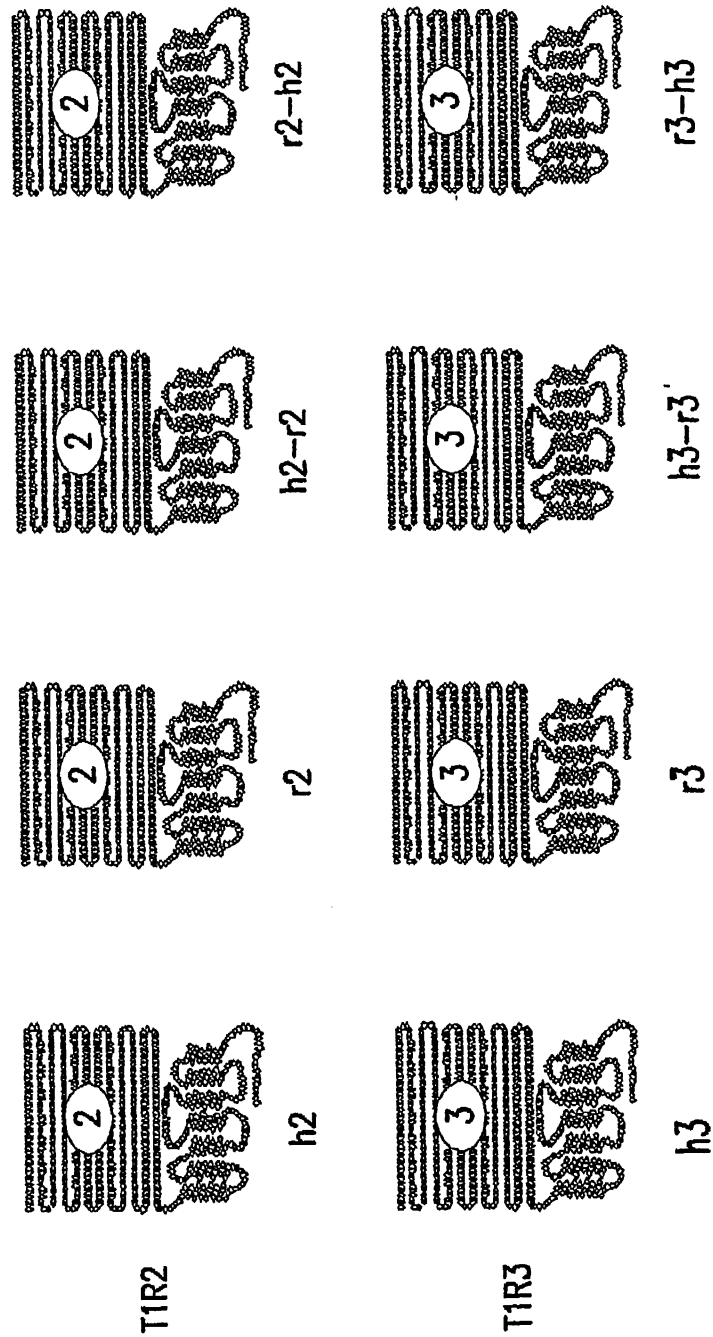


FIG.17

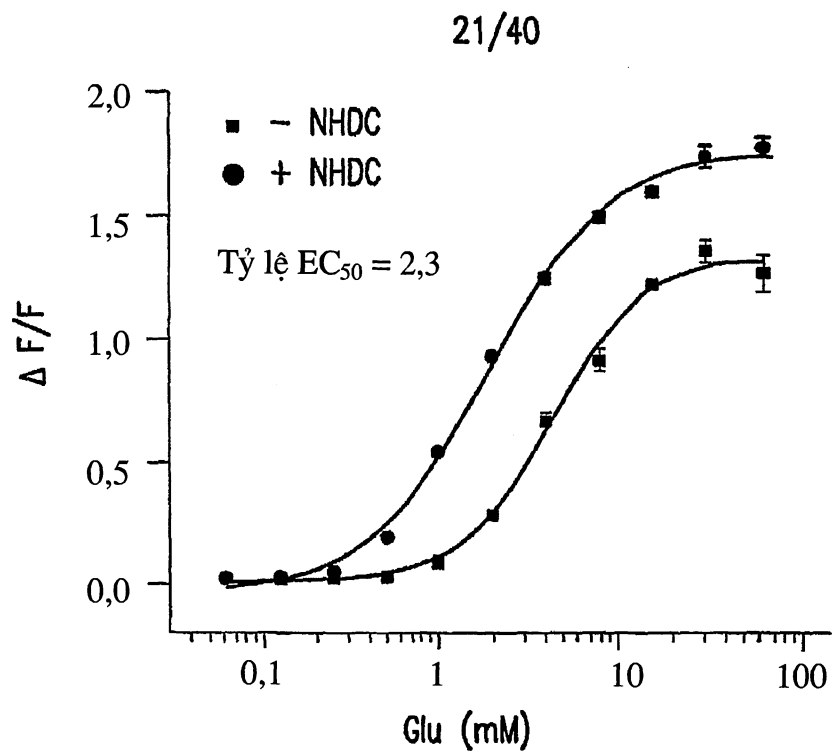


FIG.18A

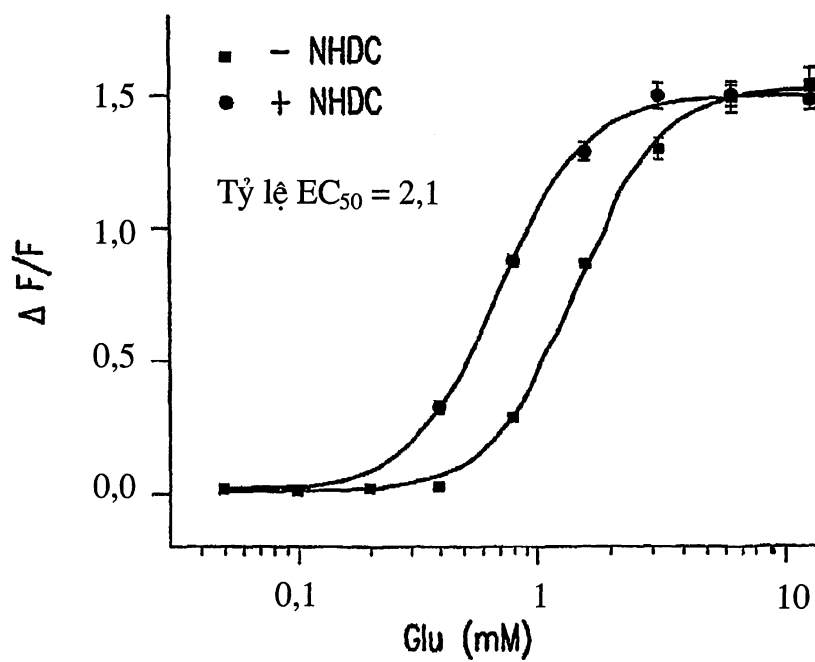


FIG.18B

22/40

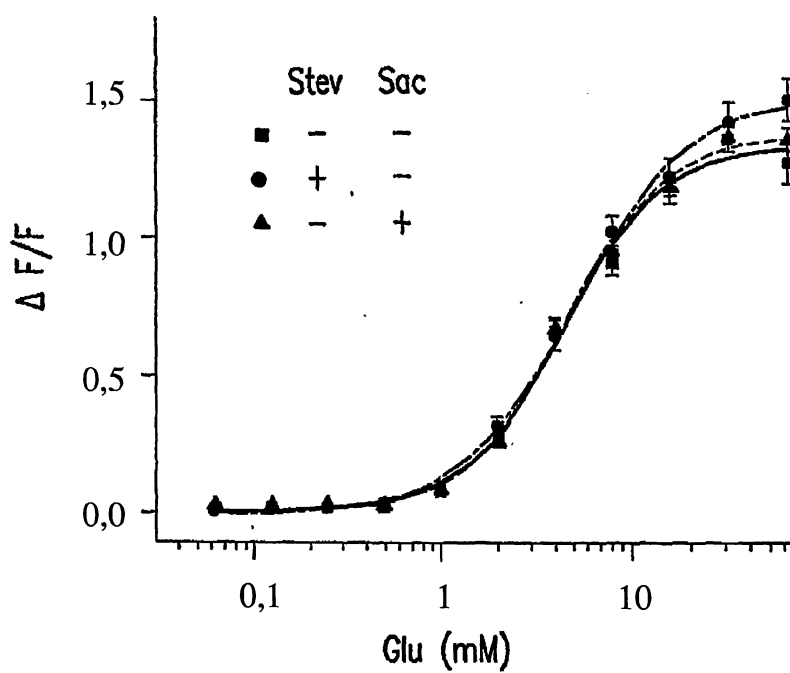


FIG. 19A

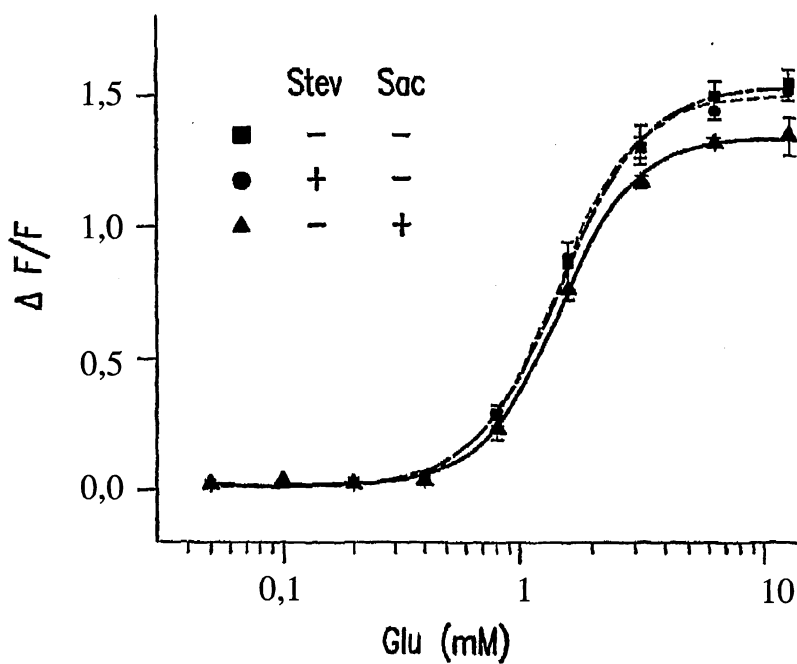


FIG. 19B

23/40

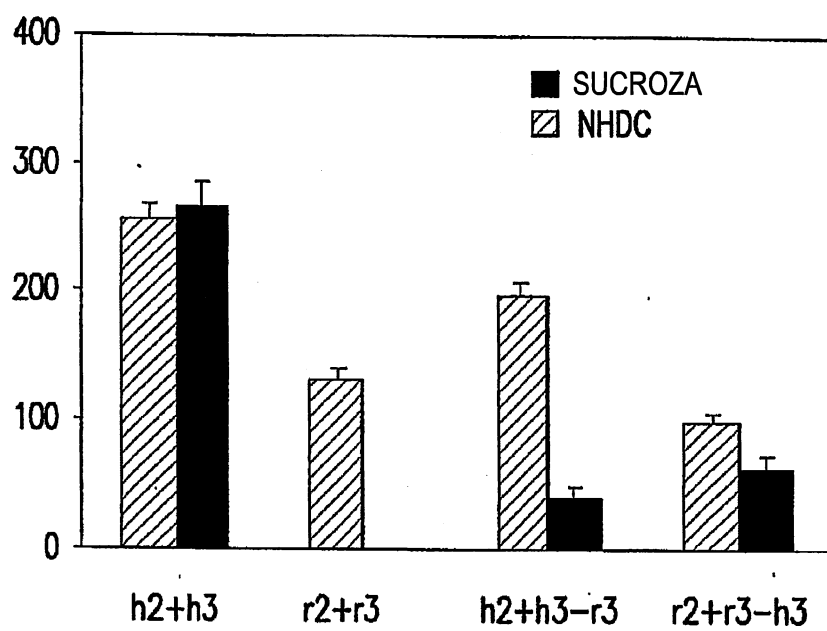


FIG.20

24/40

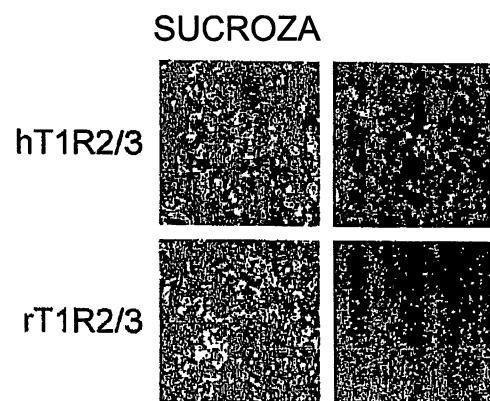


FIG.21A

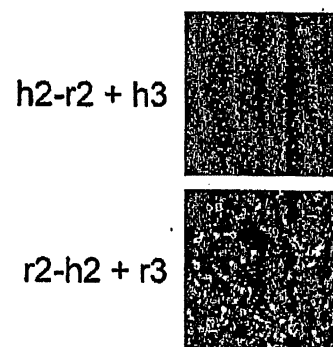


FIG.21B

25/40

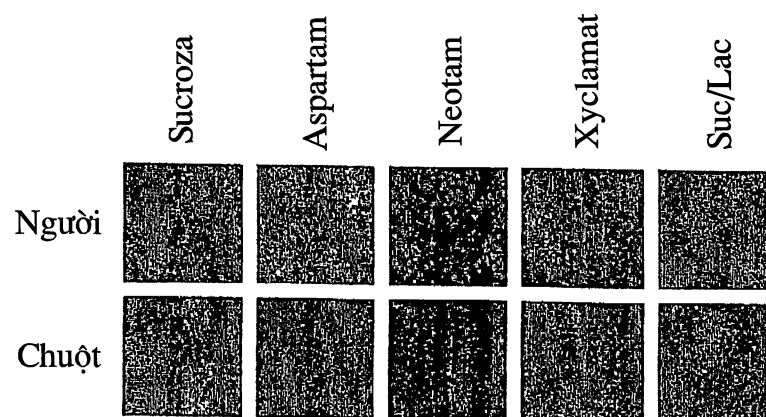


FIG.22A

26/40

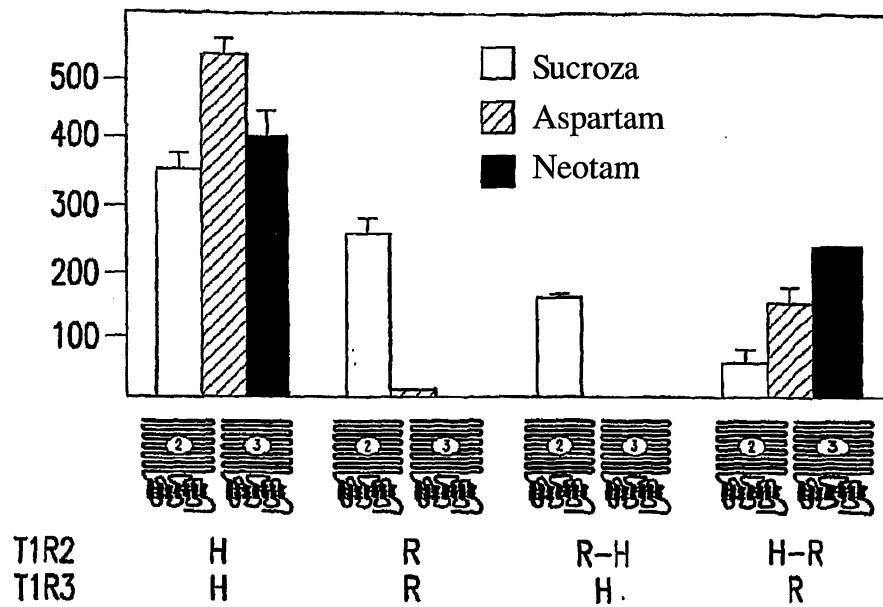


FIG. 22B

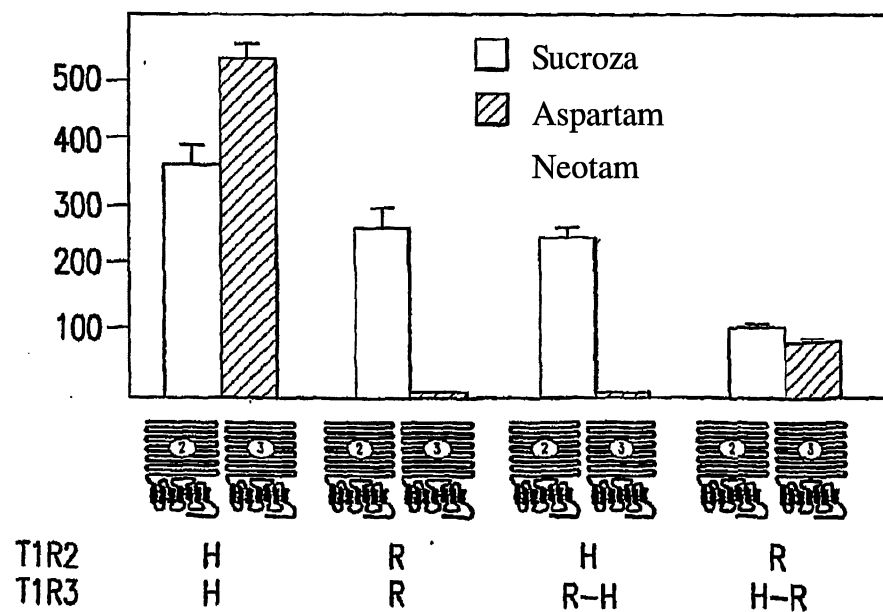


FIG. 22C

27/40

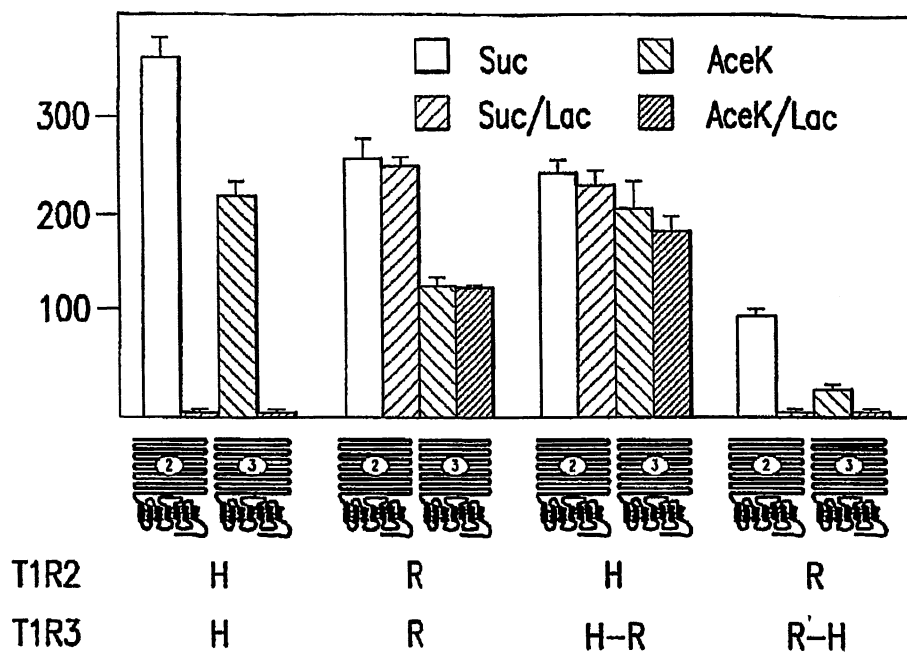


FIG.22D

28/40

```

rT1R2    1 -MGPOARTLCLLSLLLHVLKPG-----KLVENSDFHLAGDYLLGGLFTLHANVKSI
mT1R2    1 -MGPOARTLHLLFLLHALPKPV-----MLVGNSDFHLAGDYLLGGLFTLHANVKS
hT1R2    1 -MGPRAKTICSLFFLLWVIAEP-----AENSDFYLPGDYLLGGLFSLHANMKGI
rmGluR1  1 MVRLLLIFFPMIFLEMSILPRMPDRKVLLAGASSQRSVARMGDGVIIGALFSVHHQPP--

rT1R2    52 SHLSYLQVQPCNEFTMKVLGYNLMQAMRFAVEEINNCSLLPGVLLGYEMVDVCYLSNNI
mT1R2    52 SHLSYLQVQPCNEYNMKVLGYNLMQAMRFAVEEINNCSLLPGVLLGYEMVDVCYLSNNI
ht1r2    49 VHLNFLQVPMCKEYEVKVGYNLMQAMRFAVEEINNDSLLPGVLLGYEIVDVCYISNNV
rmGluR1  59 --AEKVPERKCGEIREQYG-IQRVEAMFHTLDKINADPVLLPNITLGEIRDSCWHSSVA

rT1R2    112 HPGLYFLAQD-----DDLPIKDYSQYMP-----HVAVIGPDNSESATVSNIL
mT1R2    112 QPGLYFLSQI-----DDFLPIKDYSQYRP-----QVAVIGPDNSESATVSNIL
hT1R2    109 QPVLYFLAHE-----DNLLPIQEDYSNYIS-----RVAVIGPDNSESMTVANFL
rmGluR1  116 LEQSIEFIRDSLISIRDEKDGLNRCLPDGQTLPPGRTKKPIAGVIGPGSSSSVAIQVQNL

rT1R2    158 SHFLIPQITYSAISDKLRDKRHFPMLRTVPSATHHIEAMVQLMVHFQNNWIVLVSDDD
mT1R2    158 SYFLVPQVTYSAITDKLRDKRRFPAMLRTPVPSATHHIEAMVQLMVHFQNNWIVLVSDDD
hT1R2    155 SLFLLPQITYSAISDELDRKVRFPALLRTPPSADHHVEAMVOLMLHFRWNWIVLVSSDT
rmGluR1  176 QLFDIPQIAYSATSIDLSDKTLYKYFLRVVPSDTLQARAMLDIVKRYNWTYVSAVHTEGN

rT1R2    218 YGRENSHLLSQRLTKTSDICIAFQEVLPPESSQVMRSEEQRLDNILDKLRRTSARVVV
mT1R2    218 YGRENSHLLSQRLTNTGDICIAFQEVLPPEPNQAVRPEEQDLNILDKLRRTSARVVV
hT1R2    215 YGRDNGQLLGERVARR-DICIAFQETLPTLQPNQNMTEERQRLTVTDKLQQSTARVVV
rmGluR1  236 YG-ESGMDAFKELAAQEGLCIAHSDKIYS---NAGEKSFDRLR--KLR-ERLPKARVVV

rT1R2    278 VFSPELSLSYFFHEVLRWNFTG-FVWIASESWAIDPVLHNLTELRTG---TFLGVTIQR
mT1R2    278 IFSPELSLSHFFREVLRWNFTG-FVWIASESWAIDPVLHNLTELRTG---TFLGVTIQR
hT1R2    274 VFSPDLTYHFFNEVLRQNFTG-AVWIASESWAIDPVLHNLTELHGLG---TFLGITIQS
rmGluR1  289 CFCEGMTVRGLLSAMRRLGVVGEFSLIGSDGWADRDEVI EGYEVEANGGITIKLSPEVR

rT1R2    334 VSIPGFSQFRVRDCKPGYPVPNTTNLRTTCNQDCDACLNTTKSFNNILISGER-----
mT1R2    334 VSIPGFSQFRVRHDKPEYMPNETSLRRTTCNQDCDACMNTESFNNVLMISGER-----
hT1R2    330 VPIPGFSEFREWGPQAGPPPLSRTSQTCTCNQECNCLNATLSFNTILRLSGER-----
rmGluR1  349 SFDDYFLKLRLDTNTRNPWFPEFWQHRFQCRLPGHLLNPNFKKVCTGNESLEENYVQDS

rt1r2    388 ----VVYSVYSAVYAVAHALHRLGNCNRVCTKQKVYPWQLLREIWHVN--FTLLGNRLF
mT1R2    388 ----VVYSVYSAVYAVAHTLHRLHCNQVRCTKQIVYPWQLLREIWHVN--FTLLGNQLF
hT1R2    384 ----VVYSVYSAVYAVAHALHSLGCDKSTCTKRVVYPWQLLEEIKVN--FTLLDHQIF
rmGluR1  409 KMGFVINAIYAMAHGLQNMHHALCPGHVGLCDAMKPIDGRKLLDFLIKSSFVGVSGEVW

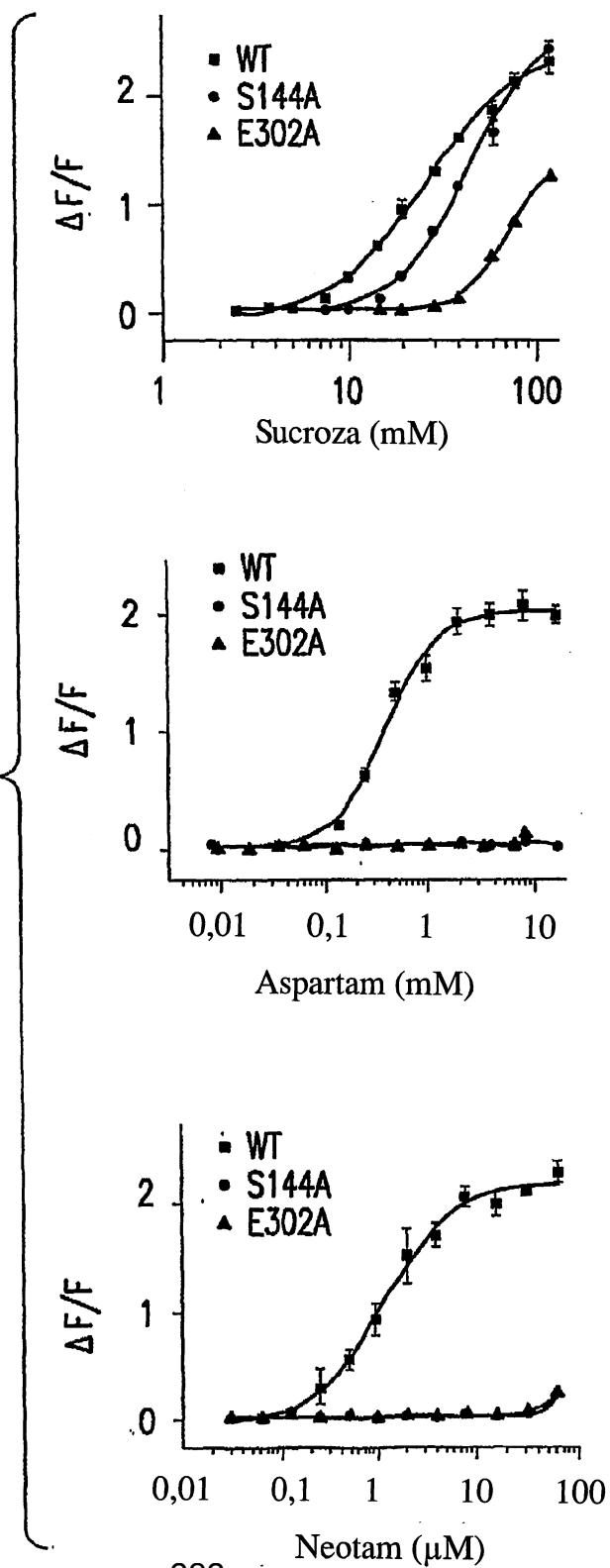
rT1R2    442 FDQQGDMPLLDDIIQWQWDLSONPFQSIASYSPTSRLTYINNVSWYTPNNTVPVSMCSK
mT1R2    442 FDEQGDMPMLDDIIQWQWGLSONPFQSIASYSPTETRLTYISNVSWYTPNNTVPISMCSK
hT1R2    438 FDPQGDVALHLEIVQWQWDRSQNPFSVASYPLQRLKNIQDISWHTVNNTIPMSMCSK
rmGluR1  469 FDEKGDAPGRYDIMNLQYTEAN--RYDYVHVGTWHEGVLNIDDYKIQMNKSGMVRVSCSE

```

FIG.23A

29/40

FIG.23B



30/40

```

rT1R3 598 YWDSPLVQASGGSIFCFGLICLGLFCLSVLLFPGRPRSASCLAQQPMAHLPLTGCLSTLF
mT1R3 598 HWDSPVQASGGSQFCFGLICLGLFCLSVLLFPGRPSSASCLAQQPMAHLPLTGCLSTLF
hT1R3 593 HRDSPLVQASGGPLACFGLVCLGLVCLSVLLFPGQSPARCLAQQPLSHLPLTGCLSTLF

rT1R3 658 LQAAEIFVESELPLSWANWLCSYL RGPWAWLVLLATLVEAALCAWYLMAFPPEVVTDMQ
mT1R3 658 LQAAETFESELPLSWANWLCSYL RGLWAWLVLLATFVEAALCAWYLIAFPPEVVTDMQ
hT1R3 653 LQAAEIFVESELPLSWADRLSGCLRGPWAWLVLLAMLVEALCTWYLVAFPPEVVTDMH

rT1R3 718 VLPTEVLEHCRMRSWVSLGLVHITNAVLAFCLFGLGTFLVQSQPGRYNRARGLTFAMLAYF
mT1R3 718 VLPTEVLEHCHVRSWVSLGLVHITNAVLAFCLFGLGTFLVQSQPGRYNRARGLTFAMLAYF
hT1R3 713 MLPTEALVHCRTRSWVSGLAHATNATLAFCLFGLGTFLVRSQPGRYNRARGLTFAMLAYF

rT1R3 778 ITWVSFVPLL ANVQVAYQPAVQMGAILFCALGILATFHLPKCYVLLWLPELNTQEFFLGR
mT1R3 778 ITWVSFVPLL ANVQVAYQPAVQMGAILVCALGILVTFHLPKCYVLLWLPKLNTQEFFLGR
hT1R3 773 ITWVSFVPLL ANVQVVL RPAVQMGALLCVLGILAAFHLPKCYLLMRQPGLNTPEFFLGG

rT1R3 838 SPKEASDGNSSSEATRGHSE
mT1R3 838 NAKKAADENSGGGEAAQGHNE
hT1R3 833 GPQDAQGQNDGNTGNQKHE-

```

FIG.23C

31/40

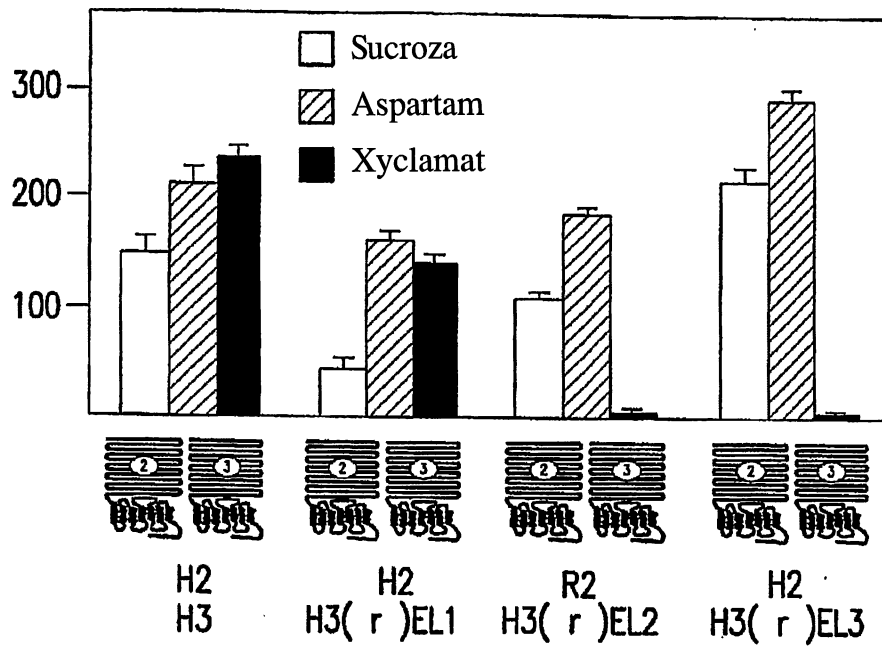


FIG.23D

32/40

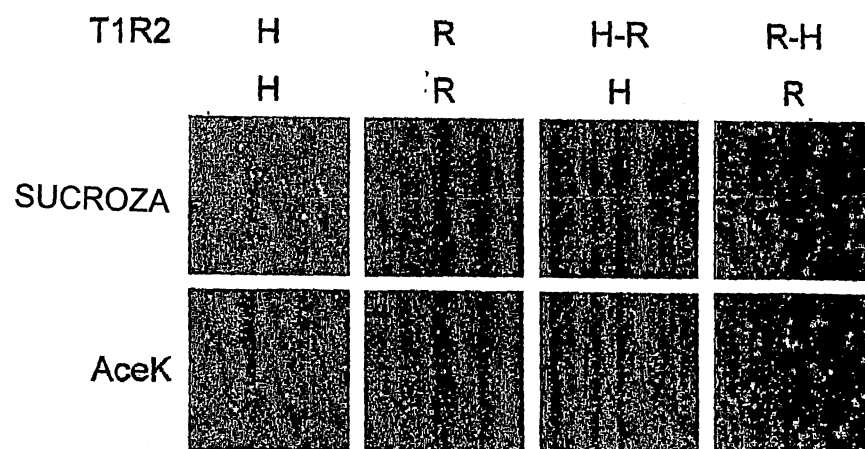


FIG.24A

33/40

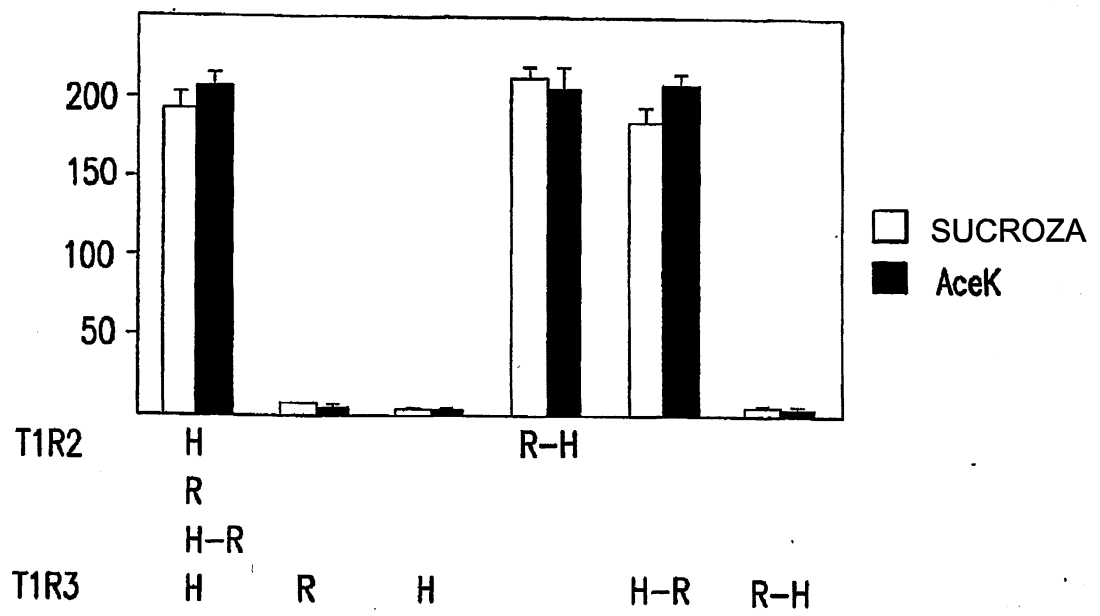


FIG.24B

34/40

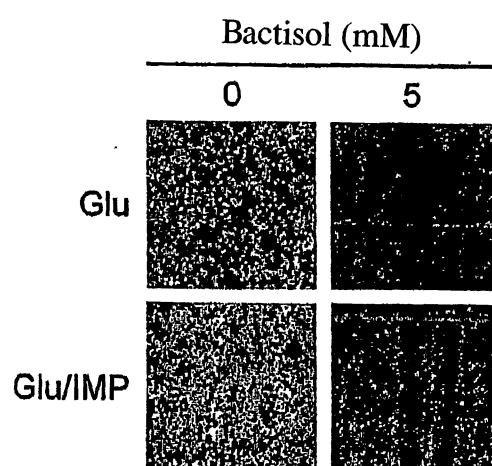


FIG.25A

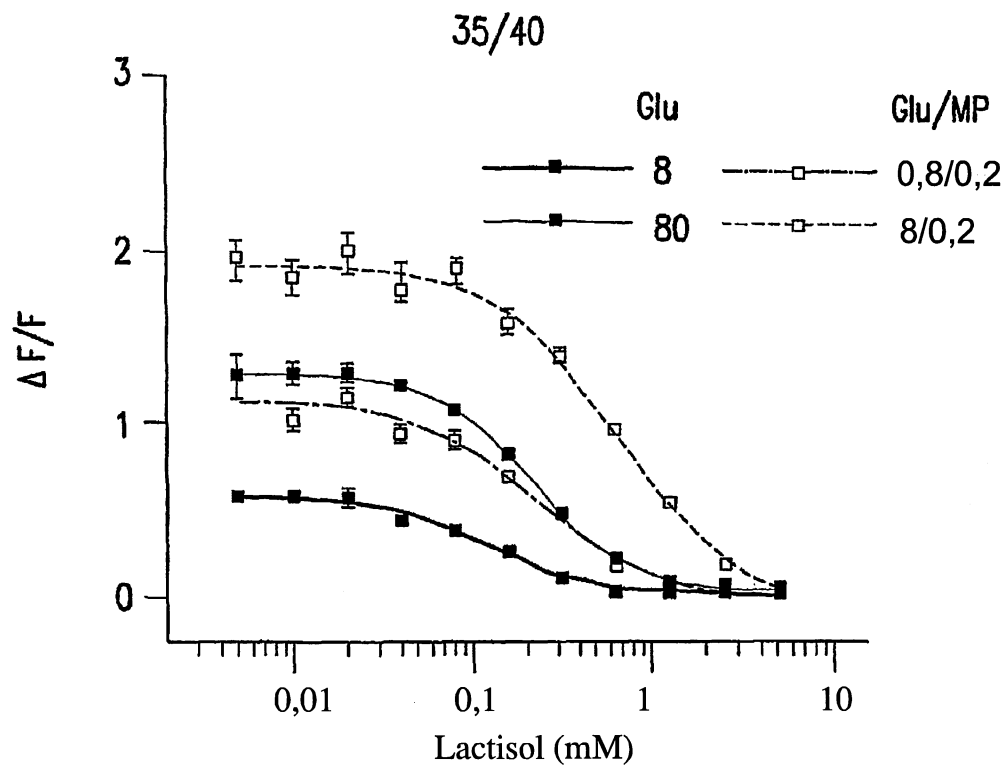
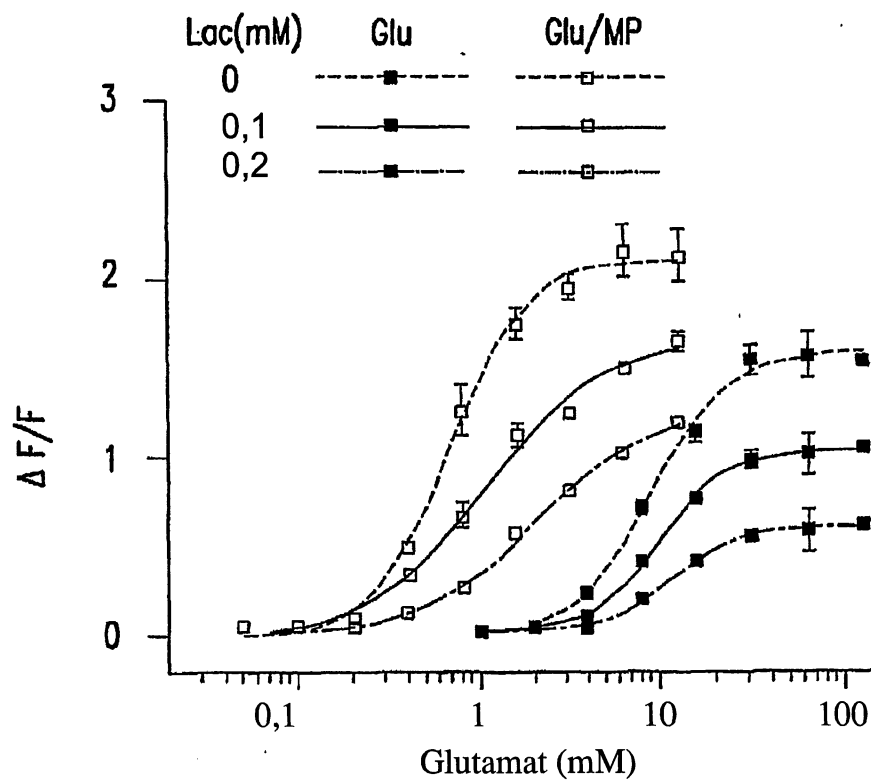


FIG.25B



36/40

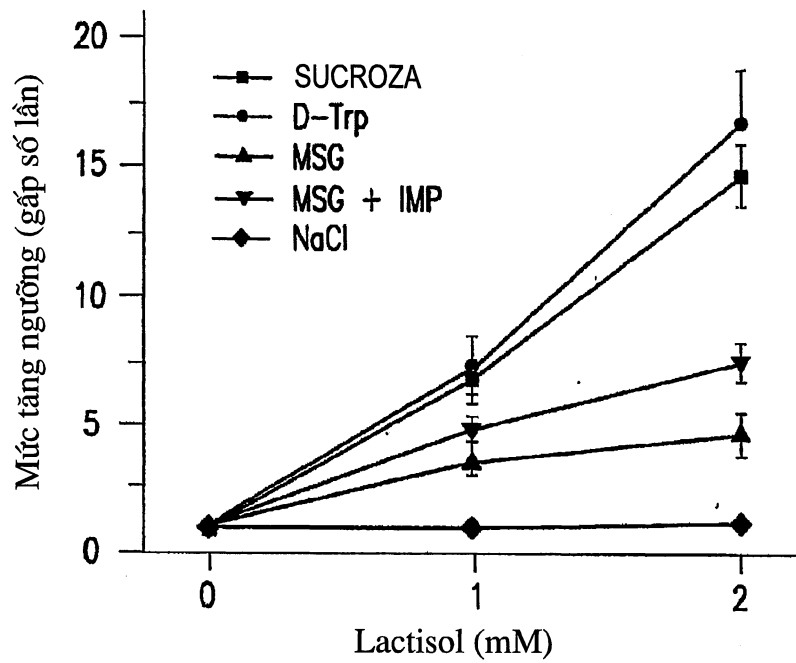


FIG.25D

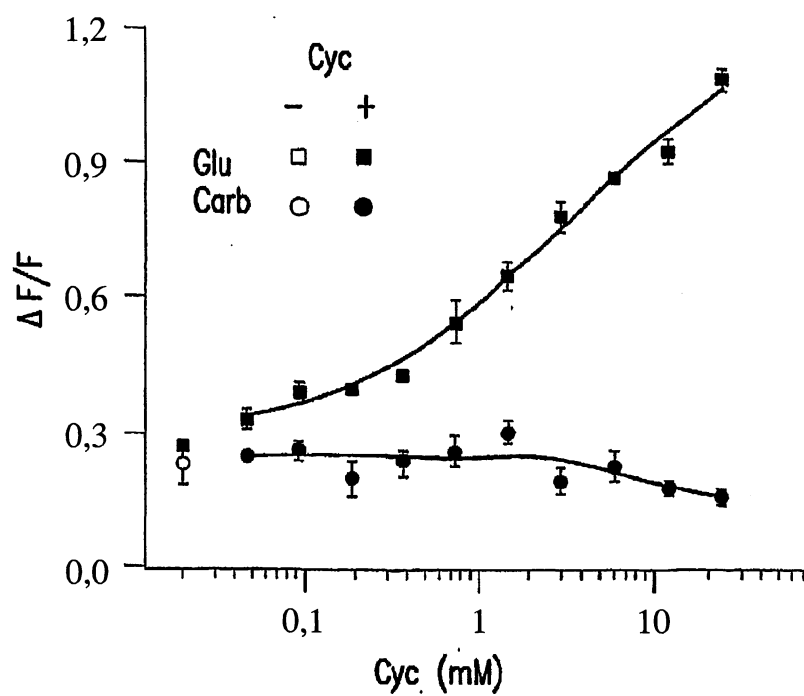


FIG.25E

37/40

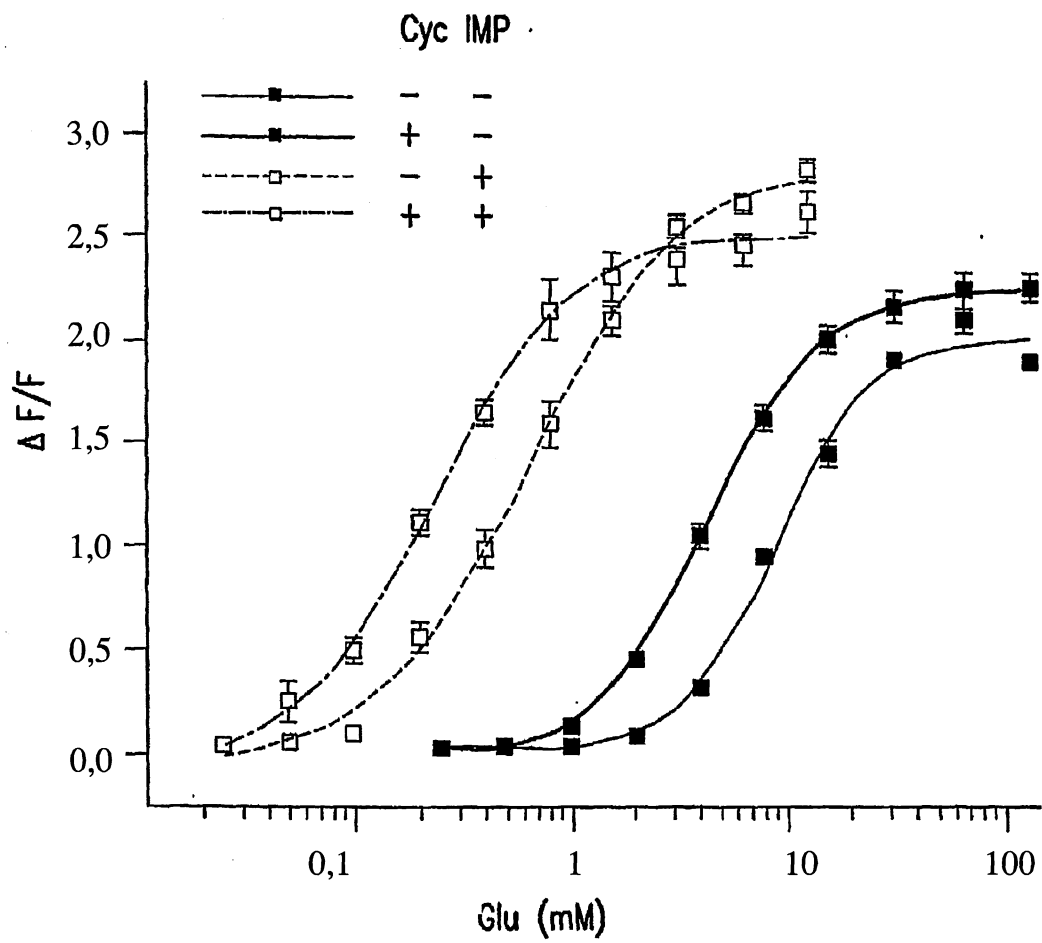


FIG.25F

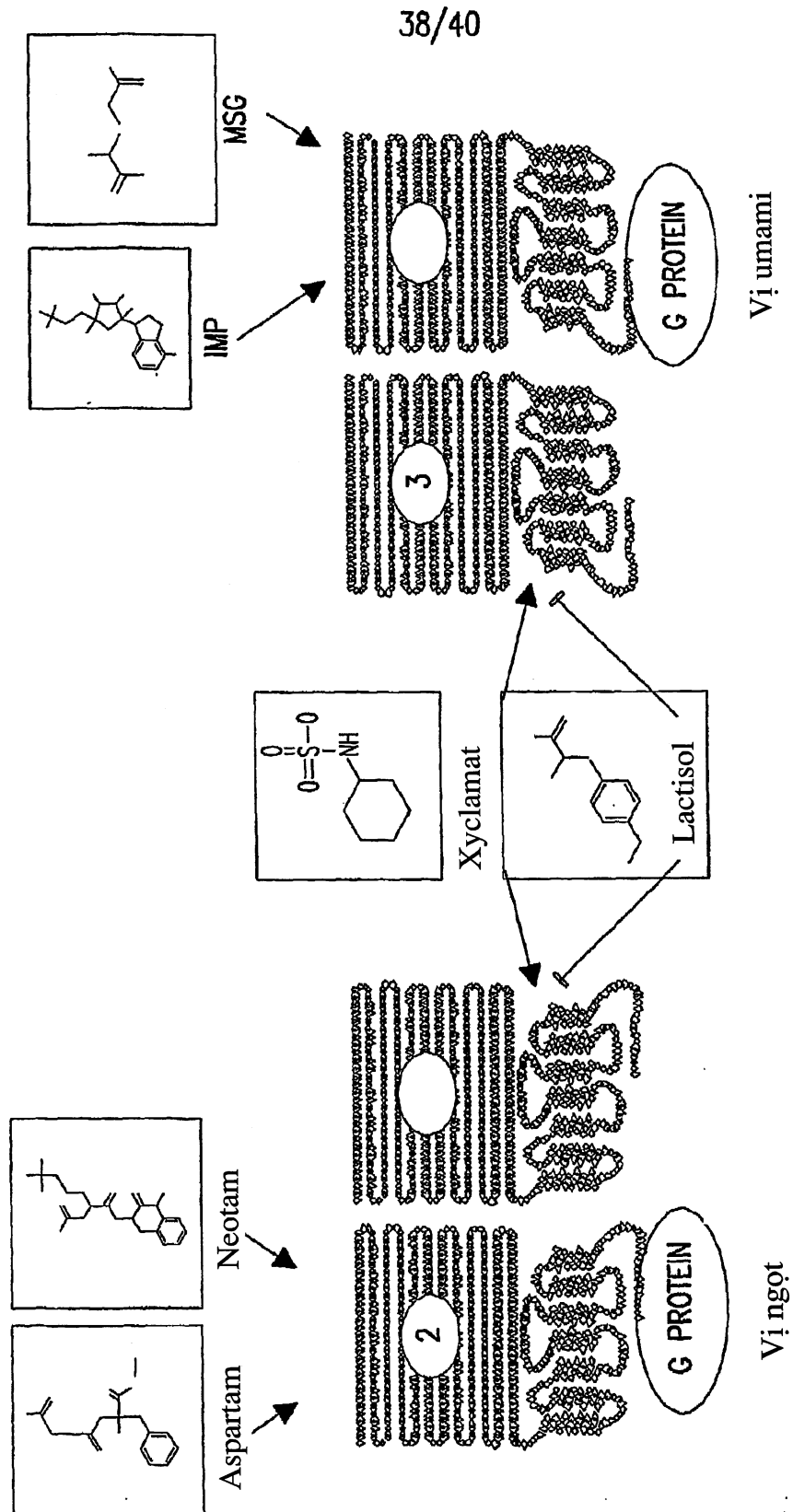


FIG.26

39/40

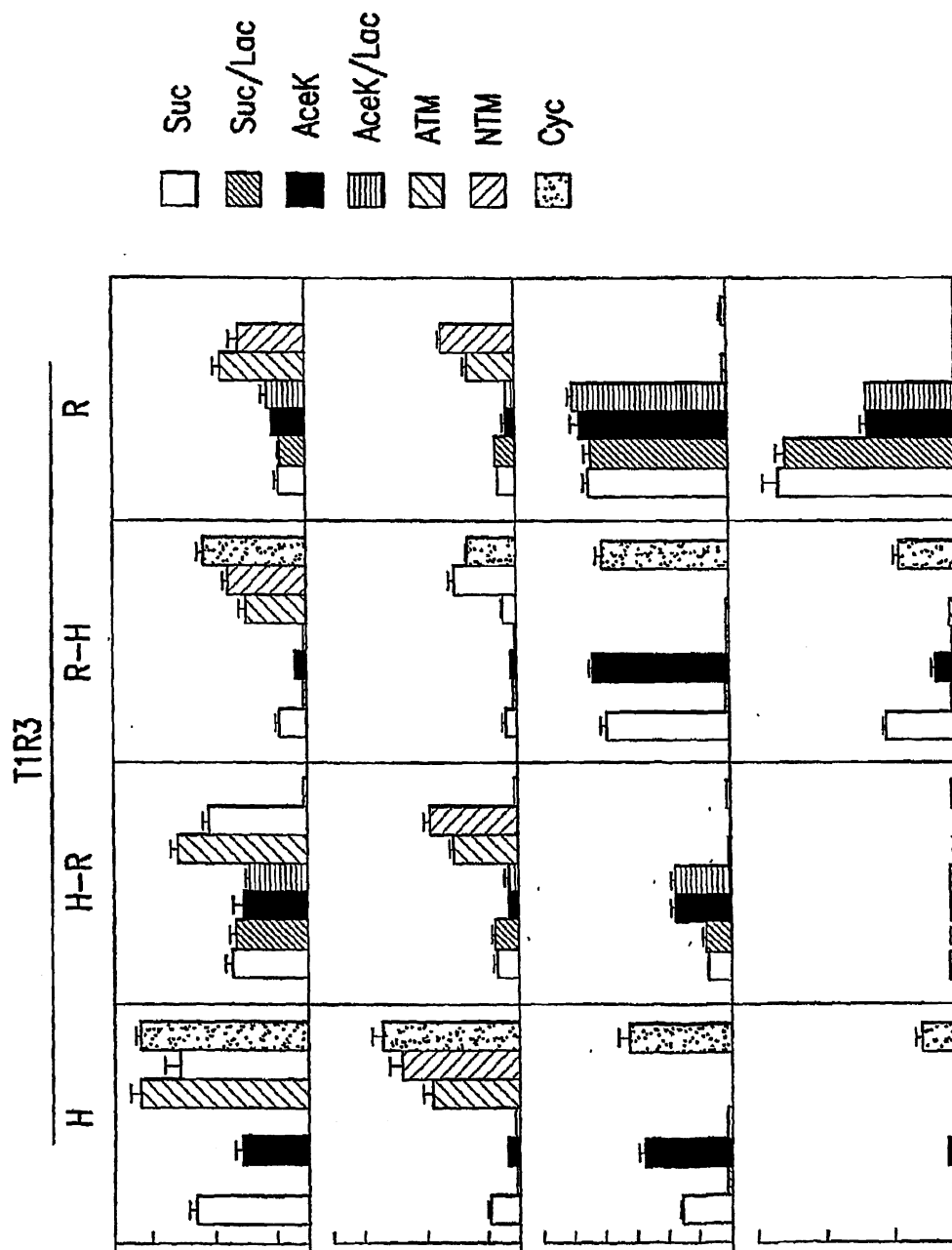


FIG.27A

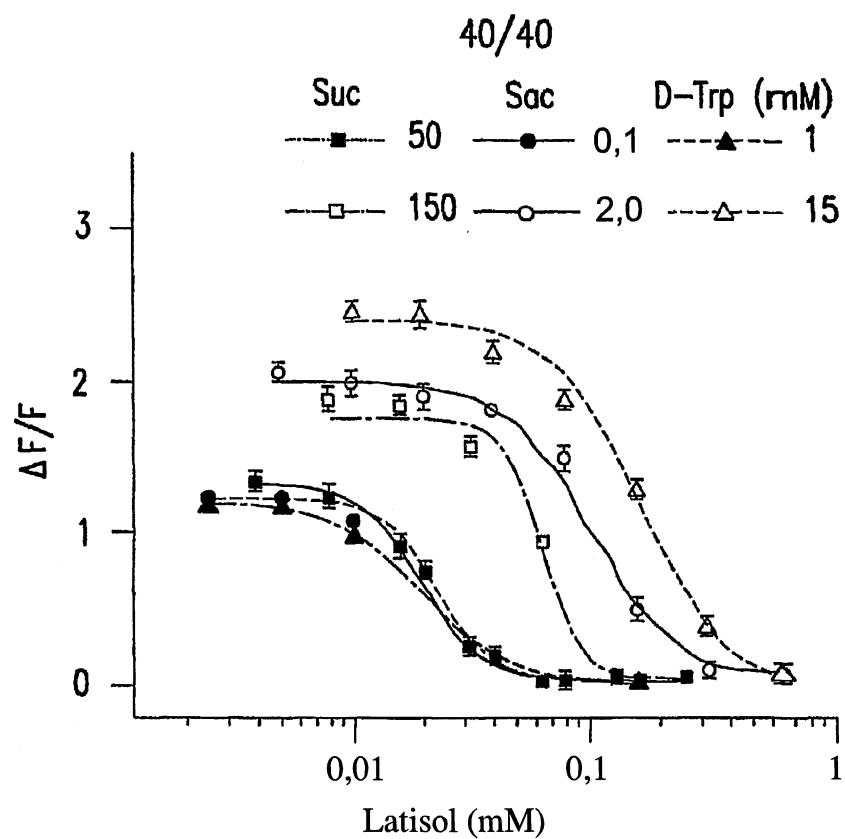


FIG.27B

