

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 722**

51 Int. Cl.:

A61P 17/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 11/02 (2006.01)
A61K 31/35 (2006.01)
A61K 31/351 (2006.01)
A61K 31/4453 (2006.01)
A61K 36/76 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2013** **E 13190536 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018** **EP 2865421**

54 Título: **Agonistas de receptor de sabor amargo para uso tópico**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.10.2018

73 Titular/es:
**ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG
(100.0%)
Fahnenbergplatz
79085 Freiburg, DE**

72 Inventor/es:
**SCHEMPP, CHRISTOPH y
WOELFLE, UTE**

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 684 722 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Agonistas de receptor de sabor amargo para uso tópico

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un agonista de receptor de sabor amargo y su aplicación farmacéutica.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los receptores de sabor dulce y amargo son receptores acoplados a la proteína G (GPCR) que se encuentran en los insectos (*Drosophila*), así como en los vertebrados desde los peces hasta el hombre [1]. El GPCR T1R3 contiene una secuencia de genes evolutivamente conservada y se asocia con la sensación a sabor dulce y umami (glutamato) [2], mientras que la familia de genes T2R es muy diversa [3] [4] [5] y es responsable del sabor amargo. La hipótesis general es que el aroma amargo previene que traguemos posibles sustancias tóxicas, mientras que el sabor dulce y umami nos anima a comer comida que contiene hidratos de carbono y aminoácidos [6]. Los compuestos amargos tóxicos tienen formas y tamaños moleculares muy diferentes, de manera que no es sorprendente que los receptores que los reconocen sean diversos. Aunque el sabor amargo se considera un código de peligro, muchos compuestos amargos también proporcionan nutrientes importantes [7]. La cascada de señalización de los receptores de sabor amargo, así como de dulce, conducen mediante la α -gustducina de proteína G a la activación de la fosfolipasa C- β 2 (PLC β 2) y la formación de inositoltrifosfato (IP $_3$), así como diacilglicerol (DAG). Estos segundos mensajeros conducen a la liberación de calcio interno y la posterior activación del canal 5 de cationes de receptores de potencial transitorio (TRPM5). La activación de células de receptores de sabor por un estímulo se transporta entonces mediante las neuronas aferentes y se procesa en centros de sabor en el cerebro [8]. Entre estas proteínas que participan en la transducción de sabor (dulce, amargo, umami), la α -gustducina se ha asociado por primera vez a la transducción de sabor en modelos de ratón KO [8] y todavía se usa ampliamente como un marcador de células quimiosensoriales en todo el cuerpo [6], aunque los ratones KO para α -gustducina todavía tienen una ligera sensación de sabor amargo/dulce.

El receptor de sabor amargo T2R38 se estudia particularmente bien y es en gran medida responsable del polimorfismo humano en saborear la feniltiocarbamida (PTC). Muchos estudios previos han demostrado que para personas con la forma de degustador T2R38, las concentraciones de PTC son intensamente amargas, que son neutras para aquellos con la forma no degustadora [9] [10]. La diferencia entre la proteína T2R38 de degustador y la forma de no degustador radica en los restos de aminoácidos en la posición 49, 262 y 296. El alelo funcional del receptor contiene una prolina, alanina y valina (PAV), mientras que el alelo no funcional contiene una alanina, valina e isoleucina (AVI) en estas posiciones, respectivamente [11]. Basándose en la bioinformática y el modelado, se ha sugerido que la valina en la tercera posición en el polimorfismo participa en el enlace de hidrógeno interhelicoidal que estabiliza la estructura del receptor y permite la sorprendente activación de receptores solo en degustadores [12]. La selección de equilibrio mantiene probablemente tanto alelos T2R38 de degustador como de no degustador en poblaciones humanas.

Además, se mostró que los receptores de sabor amargo se expresan en tipos de células fuera del epitelio gustativo de la lengua y la bucofaringe. Influyen en la homeostasis de la glucosa en el tubo gastrointestinal humano [14] y en las células de músculo liso bronquiales donde estimulan la relajación de las vías respiratorias para mejorar la respiración [15], [16]. La mayoría de los experimentos en este campo se realizaron en ratones o ratas. Sin embargo, una comparación entre genes T2R humanos y de roedor indica que los roedores poseen más de 40 % más de receptores de sabor amargo (25 T2R frente a 36 T2R) y probablemente un espectro más amplio de detección del sentido amargo (Chandrashekar et al. 2000) en comparación con los seres humanos. Ensayos de expresión heteróloga demuestran que T2R16 humano se une al glucopiranosido amargo salicina, mientras que los ratones no saborean la salicina. Además, los T2R se pueden detectar en células humanas cultivadas de las vías respiratorias, pero no en las vías respiratorias inferiores de ratones. Esta discrepancia podría representar diferencia de especies o una diferencia de la situación *in vivo* (ratón) e *in vitro* (humana) [6]. Por tanto, es importante estudiar la expresión de T2R humanos en tejidos orales adicionales con el fin de elucidar sus funciones fisiológicas normales fuera del sistema gustativo. Se requieren tinciones de tejido *in situ* para determinar T2R específicos que expresan tipos de células, además de análisis de PCR para determinar la distribución de proteínas en el entorno celular natural.

En la presente invención, se investigó la expresión de receptores de sabor amargo en diversos tejidos humanos por tinción de micromatrices de tejido humano que contenían 45 tejidos de donantes humanos sanos. Se seleccionaron dos receptores de sabor amargo (T2R) conservados como dianas para este análisis, T2R1 y T2R38 [17]. Varios tejidos fuera del sistema gustativo mostraron una fuerte expresión de los receptores de sabor amargo sin expresión simultánea de receptores de sabor dulce.

Opciones de tratamiento disponibles para trastornos de la piel o afecciones patológicas que afectan la mucosa sinusal muestran o bien solo un débil efecto o bien poseen varios efectos secundarios. Los glucocorticoides, por ejemplo, pueden conducir a atrofia o hemorragia de la piel y mucosa. Efectos secundarios comunes de la xilometazolina o derivados de adrenalina son rinitis medicamentosa, atrofia de la mucosa o pérdida de efecto.

Por tanto, existe una gran necesidad de nuevas opciones de tratamiento, como la administración tópica de ligandos de receptor de sabor amargo. Los receptores de sabor amargo se expresan, entre otras cosas, en queratinocitos (células de la piel) y células inmunitarias (mastocitos). Los ligandos para estos receptores inducen una significativa entrada de calcio que conduce a una reducida liberación de histamina, proteasas y citocinas proinflamatorias en mastocitos. En células de la piel, se estimula la expresión de marcadores de diferenciación dando como resultado una barrera más fuerte a la piel y mucosa.

Los inventores de la presente solicitud encontraron sorprendentemente que la administración tópica de una crema que contiene ligando de sabor amargo alivió la picazón y el eritema en un caso de eccema atópico inmediatamente después de la primera aplicación.

El documento WO 2013/112865 A1 desvela un método de tratamiento de una infección respiratoria en un sujeto, comprendiendo el método administrar una composición a las vías respiratorias del sujeto, en el que la composición comprende un agente capaz de activar una vía de señalización de sabor amargo o inhibir una vía de señalización de sabor dulce en el sujeto, tratando así la infección respiratoria en el sujeto.

El documento JP2010/229124 A proporciona una disolución que contiene difenhidramina o una sal de la misma, un ácido orgánico y un plastificante y preferentemente además caramelo, es buena en el cumplimiento de la administración, difícilmente causa el reblandecimiento y la formación de fisuras de membranas de la piel de la cápsula, y se carga en cápsulas, y proporciona una cápsula rellena con la disolución. La disolución se desvela como útil para el tratamiento de, entre otros, rinitis alérgica o aguda, prurito, urticaria y trastornos dermatológicos.

El documento KR 2009 0126881 A desvela un parche adelgazante que contiene cafeína para eliminar eficazmente la celulitis y ayudar a hacer una línea corporal delgada que contiene 0,01-4 % en peso de cafeína como principio activo, 0,1-20 % en peso de monolaurato de glicerilo como potenciador de la permeación de la piel, teanina, genisteína, L-carnitina, extracto de café (extracto de grano de *Coffea arabica* (semilla de café)), extracto de *Ilex paraguariensis* (hoja) y extracto de flor de *Citrus aurantium amara* (naranja amarga), tiene un espesor de 10-200 μm y se usa en la forma de formulación en apósito sobre el sitio que tiene grasa subcutánea tal como las nalgas, parte posterior del muslo.

El documento JP2004/210656 A desvela una preparación para la piel, caracterizada por que comprende isoflavona y/o una acilisoflavona y/o un glucósido de isoflavona y una sustancia de sabor acre, sustancia de sabor amargo o sustancia de sabor agrio y que no contiene ácido cólico, escimnol y un éster de escimnol.

El documento EP2735302 A1 desvela una composición tópica que comprende un extracto de lúpulo, y al menos un miembro, seleccionado del grupo que consiste en vehículos, excipientes, y diluyentes dermatológica y cosméticamente aceptables; en la que el contenido de 8-prenil naringenina (8-PN) en la composición es entre 0,1 y 1,0 % en peso, y usa de dicha composición.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a las siguientes realizaciones (1) a (4).

(1) Un ligando para un receptor de sabor amargo (T2R) para su uso en el tratamiento de un trastorno de la piel, en el que el ligando se administra tópicamente a la piel, y en la que el ligando es amarogentina.

(2) El ligando para su uso según el punto (1), en el que el receptor de sabor amargo es el miembro 1 del receptor 2 de sabor (T2R1).

(3) El ligando para su uso según el punto (1), en el que dicho trastorno de la piel se selecciona del grupo que consiste en prurito, urticaria, dermatitis, eccema y sus combinaciones.

(4) Una composición farmacéutica para uso tópico en el tratamiento de un trastorno de la piel, que comprende un ligando para un receptor de sabor amargo como se define en el punto (1), en la que dicha composición es un spray nasal, una composición oftálmica, una pomada, una loción, una crema o un gel.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1: Tinción de tejido cerebral humano.

Se tiñeron secciones transversales de la micromatriz de tejido humano con tejido de la corteza cerebral (A-E) y cerebelo (F-J) con un control de isotipo (A, F) o anticuerpos contra T2R1 (B, G), T2R38 (C, H), α -gustducina (D, I) y T1R2 (E, J). La flecha indica neuronas piramidales (A-E) o neuronas de Purkinje (F-J). Las flechas en rojo indican hacia células positivamente y las flechas en negro hacia negativamente teñidas. Las barras indicadas corresponden a 50 μM (A-E) y 100 μM (F-J).

Figura 2: Tinción de tejido epidérmico.

Se tiñeron secciones transversales de micromatriz de tejido humano con piel humana se tiñó con un control de isotipo (A) o anticuerpos contra T2R1 (B), T2R38 (C), α -gustducina (D) y T1R2 (E). La barra indicada corresponde a 100 μ M.

5 Figura 3: Tinción de tejido placentario.

Se tiñeron secciones transversales de la micromatriz de tejido humano con placenta humana (placa coriónica) (A-E) con un control de isotipo (A) o anticuerpos contra T2R1 (B), T2R38 (C), α -gustducina (D) y T1R2 (E). Las flechas en rojo indican hacia células positivamente y las flechas en negro hacia negativamente teñidas. La barra indicada corresponde a 100 μ M.

10 Figura 4: Tinción de las glándulas parótidas y conductos intestinales del colon.

Se tiñeron secciones transversales de la micromatriz de tejido humano con glándula parótida humana (A-C) y los conductos del colon (D-F) con un control de isotipo (A, D) o con anticuerpos contra T2R1 (B, E) y T2R38 (C, F). Las flechas en rojo indican hacia células positivamente y las flechas en negro hacia negativamente teñidas. La barra indicada corresponde a 50 μ M.

15 Figura 5: Tinción del endocérvix.

Se tiñeron secciones transversales del tejido humano de endocérvix (A-F) con un control de isotipo (A) o anticuerpos contra T2R1 (B), T2R38 (C), α -gustducina (D), S100 (E) y T1R2 (F). Las flechas indican núcleos de posibles células dendríticas en los conductos. Las flechas en rojo indican hacia células positivamente y las flechas en negro hacia negativamente teñidas. La barra indicada corresponde a 50 μ M.

20 Figura 6: Expresión de genes y proteínas de T2R1, T2R38 y T1R3 en tejido de lengua y líneas celulares humanas.

Se realizó RT-PCR con ARN de las líneas celulares seleccionadas (la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, la línea celular placentaria humana JEG-3 y la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT) y ARN de lengua comercialmente disponible para T2R1, T2R38, T1R3 y el gen de mantenimiento β -actina. El control de H₂O contiene H₂O en lugar del molde. Las flechas indican hacia el producto de PCR (A). Se realizó transferencia Western con lisados de proteína de células HaCaT, JEG-3 y SH-SY5Y y de tejido de lengua visualizado por tinción con anticuerpo anti-T2R1, anti-T2R38, anti-T1R2 y anti-HSC-70 (gen de mantenimiento). Las bandas corresponden al peso molecular predicho de los monómeros de receptor, monómeros y oligómeros glucosilados. La pre-absorción del anticuerpo contra T2R38 con los péptidos antigénicos correspondientes (péptido T2R38) durante 1 h a 37 °C casi suprimió totalmente la señal con los anticuerpos anti-T2R38. Se indica el tamaño de las proteínas marcadoras en kDa (B).

Figura 7: Doble tinción de líneas celulares humanas con T2R1 o T2R38 y α -gustducina.

Las líneas celulares seleccionadas fueron la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (A), la línea celular placentaria humana JEG-3 (B) y la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT (C). Se visualizó el anticuerpo anti-T2R1 humano de conejo y anti-T2R38 humano de conejo por un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 555 y el anticuerpo anti- α -gustducina humana de cabra por un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488. Se muestran imágenes de superposición de los canales de FITC y PE fusionados (combinación). Las imágenes combinadas de α -gustducina y la expresión de T2R1 o T2R38 indicaron el doble marcado de todas las células en las tres líneas celulares probadas. El control de isotipo no mostró señal de fluorescencia en ninguna de las líneas celulares. Las imágenes se fotografiaron a aumento de 400x.

40 Figura 8: El difenidol (DPH) provocó una entrada de calcio en células de neuroblastoma SH-SY5Y (A, B), células placentarias JEG-3 (B, D) y queratinocitos HaCaT (E, F). Las células se estimularon con DPH (100 μ M) o etanol (EtOH, 0,05 %) en el momento de tiempo 60 s como se indica con la flecha y se analizaron las corrientes de calcio por obtención de imágenes de calcio. La entrada de calcio se expresa como la diferencia de las relación de fura-2 antes y después de la estimulación y se representa en barras (A, C, E) o en función del tiempo (B, D, F). Trazas representativas incluyen células tratadas con 9-20 DPH y 12-14 EtOH. Los datos se muestran con desviación estándar (EEM) y se analizaron con la prueba bilateral para datos independientes (* p < 0,05; ** p < 0,01, n=5).

Figura 9: Determinación del alelo del gen T2R38 en las líneas celulares HaCaT, JEG-3 y SH-SY5Y para distinguir entre degustadores de PTC y no degustadores de PTC.

50 (A) Esquema para demostrar los productos de escisión por un análisis basado en enzima de restricción de degustador y no degustador de PTC. Los degustadores de PTC tienen el haplotipo PAV y los no degustadores tienen el haplotipo AVI (A=Ala, V=Val, I=Ile) en las posiciones de proteína 49, 262 y 296 (B) Patrón de escisión de las líneas celulares HaCaT, JEG-3 y SH-SY5Y para determinar el estado de degustador. Primero, se amplifica por PCR un fragmento de 1067 pb de la porción del extremo N de T2R38 a una temperatura de hibridación de 58 °C. Entonces, el producto de PCR se digirió con Fnu4H, que corta ADN en la secuencia GCNGC (N es A, G, C o T).

Esta secuencia solapa ambos sitios de polimorfismos. En la posición de aminoácido 262 y 49, los degustadores de PAV contienen un sitio de corte, mientras que no lo tienen los no degustadores de AVI. El patrón de restricción del producto de PCR TAS2R38 de 1 Kb indica la secuencia en ambos sitios polimórficos y se determinó en un gel de agarosa a 2 %. Un fragmento de Fnu4H de 557 en los no degustadores se escinde en los fragmentos de 456 pb y 75 pb en los degustadores de PAV. Un fragmento de Fnu4H de 363 pb en los no degustadores se escinde en los fragmentos de 336 pb y 27 pb en los degustadores de PAV. La heterocigosidad muestra tanto los productos escindidos como no escindidos. Parece que HaCaT es heterocigótica para AVI/PAV, degustador de JEG PAV y no degustador de SH-SY5Y. (C) La secuencia de ADN de T2R38 en la posición de aminoácido 49 indicó claramente JEG como degustador de PAV con un sitio de escisión Fnu4H y SH-SY5Y como no degustador de PTC sin sitio de escisión.

Figura 10: PTC induce la entrada de calcio en células JEG-3. (A) Las células JEG-3 se estimulan después de 60 s con PTC (100 μ M) o DMSO (0,05 %) como se indica con la flecha y se analizan las corrientes de calcio por obtención de imágenes de calcio. La entrada de calcio se expresa como la diferencia de la relación de fura-2 antes y después de la estimulación. 1 h de pre-incubación con probenecid (1 mM) reduce las corrientes de calcio inducidas por PTC al nivel de disolvente. Datos + EEM. n = 5. Prueba de la t, datos independientes, bilateral. *** p < 0,001. (B) Se muestran trazos representativos que incluyen 28 (0,05 % de DMSO), 24 (PTC 100 μ M) y 24 (1 h pre-incubación con probenecid (1 mM), estimulación con PTC (100 μ M)) células JEG-3.

Figura 11: Difenidol (DPH) y amarogentina inducen la entrada de calcio en queratinocitos HaCaT. Se estimularon queratinocitos después de 60 s con diversas concentraciones de DPH (A) o amarogentina (B) en comparación con 0,1 % de EtOH. Las corrientes de calcio se analizan por obtención de imágenes de calcio usando la sonda sensible a calcio fura-2-am. La entrada de calcio se expresa como la diferencia de la relación de fura-2 antes y después de la estimulación. Datos + EEM. n = 6. Prueba de la t, datos independientes, bilateral. ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Figura 12: Efecto de compuestos amargos sobre la diferenciación de queratinocitos primarios.

Amarogentina y difenidol indujeron la diferenciación en queratinocitos primarios humanos (hPK). Se trataron hPK con calcio (2 mM) y amarogentina o difenidol durante 3 días. Se aisló ARNm total de hPK tratadas, se transcribió de forma inversa y se sometió a PCR. Se analizó la expresión de marcadores de diferenciación en muestras no tratadas y tratadas con amarogentina, difenidol o calcio (2 mM). Los histogramas muestran niveles de expresión relativos de marcadores de diferenciación en hPK en comparación con sus niveles de expresión normalizados en las células de control no tratadas.

Figura 13: La amarogentina no muestra citotoxicidad en células HaCaT en el intervalo de concentración de los experimentos. Se midió la viabilidad celular 24 h después del tratamiento de amarogentina.

Figura 14: La amarogentina inhibe la liberación de mediador desencadenada por la sustancia P (SP) de la línea de mastocitos humanos LAD-2. Se estimularon células LAD-2 con SP (2 μ M). En algunos experimentos, las células se pre-incubaron con el ligando de receptor de sabor amargo amarogentina (136 μ M) o difenidol (136 μ M) o el control positivo azelastina (24 μ M). (A) Se midió la liberación de histamina 20 min después de la estimulación de SP (B) Se midió la liberación de TNF- α 24 h después de la estimulación con SP.

Figura 15: La amarogentina inhibe la secreción de IL-6 o IL-8 y MMP1 en la línea celular de queratinocitos HaCaT después de la estimulación con histamina y TNF- α o IFN- γ . (A) Se estimularon células HaCaT con histamina y TNF- α como se indica. En algunos experimentos, las células se pre-incubaron con amarogentina (136 μ M) o el control azelastina (24 μ M) durante 30 minutos. (B) Se estimularon células HaCaT con histamina e IFN- γ como se indica. En algunos experimentos, las células se pre-incubaron con amarogentina (136 μ M) o azelastina (24 μ M).

Figura 16: La amarogentina y la azelastina no muestran citotoxicidad en células LAD-2 en el intervalo de concentración usado en los experimentos. Se midió la viabilidad celular 24 h después del tratamiento con amarogentina y azelastina.

Figura 17: Hipótesis de trabajo simplificadas para el mecanismo de reacción de los ligandos de receptor de sabor amargo en interacciones celulares entre mastocitos, linfocitos T y queratinocitos en la epidermis y la dermis superior de piel inflamada. La reacción se podría desencadenar por la liberación de sustancia P (SP) de las células nerviosas. En estos mecanismos, los ligandos de receptor de sabor amargo inhiben la secreción de histamina, TNF- α e IFN- γ de mastocitos, de manera que se inhibe la secreción de MMP-1, IL-6 e IL-8 y posiblemente también NGF de queratinocitos humanos. Una expresión reducida de MMP-1 da como resultado la reducida degradación de la membrana basal y una reducida transmigración de linfocitos T a la epidermis. De esta forma, se pueden reducir o evitar la secreción de citocinas inflamatorias por linfocitos T en la epidermis.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

A menos que se establezca de otro modo, los siguientes términos usados en la memoria descriptiva y reivindicaciones tienen el significado dado a continuación.

Un "ligando", como se usa en el presente documento, pretende significar una sustancia que o bien inhibe o bien estimula la actividad de un receptor y/o que compite por el receptor en un ensayo de unión.

Un "agonista" se define como un ligando que aumenta la actividad de un receptor. Un agonista del receptor de sabor amargo es un ligando que aumenta la actividad del receptor de sabor amargo.

- 5 Un "antagonista" se define como un ligando que reduce la actividad de un receptor, aquí el receptor de sabor amargo, cuando se inhibe la acción de un agonista. El antagonismo normalmente es una propiedad del ligando medida en presencia de un agonista.

10 Se usan "tejidos epiteliales" o "barreras" en organismos multicelulares para proteger las áreas de sus cuerpos que se ponen en contacto con el entorno externo. En el intestino, la barrera epitelial soporta el transporte de nutrientes y agua previniendo la contaminación microbiana de los tejidos intestinales. Junto con las membranas plasmáticas, la zona de oclusión intercelular es el determinante celular primario de la función de barrera epitelial. La alteración de la estructura de la zona de oclusión como resultado de mutaciones específicas de proteína o señales reguladoras aberrantes puede ser tanto una causa como un efecto de enfermedades.

Una "afección patológica" es una enfermedad o una afección que implica o causada por una enfermedad.

- 15 Una "medicación tópica" es una medicación que se aplica a la superficie del cuerpo tal como la piel o las membranas mucosas para tratar dolencias mediante un gran intervalo de clases que incluyen, pero no se limitan a, cremas, espumas, geles, lociones y pomadas. Muchas medicaciones tópicas son epicutáneas, que significa que se aplican directamente a la piel. Las medicaciones tópicas también pueden ser inhaladas o se aplican a la superficie de tejidos distintos de la piel tales como colirios aplicados a la conjuntiva, o gotas óticas dispuestas en el oído, o medicaciones aplicadas a la superficie de un diente. Un efecto tópico en el sentido farmacodinámico puede referirse a una diana local en vez de sistémica para la medicación. Sin embargo, muchos fármacos tópicamente administrados tienen efectos sistémicos.
- 20

Todas las concentraciones indicadas en el presente documento se deben entender como concentración (p/p). Es decir, una concentración en % significa % (p/p), a menos que se indique lo contrario.

- 25 Los "receptores de sabor" son responsables en la identificación de componentes alimenticios encontrados en la dieta de seres humanos y animales. Las cualidades de sabor básicas son agrio, salado, dulce, amargo y umami. Los receptores de sabor dulce y amargo son los receptores acoplados a la proteína G que se encuentran en insectos, así como en vertebrados. El receptor acoplado a la proteína G T1R3 se asocia con sensación de sabor dulce y umami. La familia génica T2R es muy diversa y es responsable del sabor amargo.

- 30 Ejemplos de los receptores de sabor amargo se pueden encontrar en BitterDB (Ayana Wiener; Marina Shudler; Anat Levit; Masha Y. Niv. BitterDB: a database of bitter compounds. Nucleic Acids Res 2012, 40:D413-419.). Según la presente invención, el ligando puede ser un ligando para el miembro 1 del receptor 2 de sabor (T2R1).

35 Los números de acceso de NCBI de ARNm y proteína de dT2R1 son NM_019599.2 y NP_062545.1, respectivamente. Los números de acceso de NCBI de ARNm y proteína de T2R38 son NM_176817.4 y NP_789787.4, respectivamente. El receptor T2R1 puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se muestra en el número de acceso NCBI NP_062545.1 (Número de acceso de UniProt Q9NYW7). Se prefiere que el ligando sea capaz de activar al menos un receptor de sabor amargo, por ejemplo, uno o más de los receptores de sabor amargo citados anteriormente en este documento.

- 40 Ejemplos de ligandos de receptor de sabor amargo (compuestos) se puede encontrar en la base de datos "BitterDB" (Ayana Wiener; Marina Shudler; Anat Levit; Masha Y. Niv. BitterDB: a database of bitter compounds. Nucleic Acids Res 2012, 40:D413-419.)

45 Se conocen por un experto en la técnica métodos de determinación de si un compuesto dado es o no un ligando para un receptor de sabor amargo, véase, por ejemplo, Jacob P. Ley, Chem. Percept. (2008) 1: 58-77. Según la presente invención, se puede usar el método descrito en Meyerhof, Chem. Senses (2010) 35: 157-170. Según la presente invención, el ligando para un receptor de sabor amargo es un agonista de receptor de sabor amargo.

Según la presente invención, el ligando para un receptor de sabor amargo es amarogentina.

En una realización, el ligando es el ligando para T2R1 y es amarogentina.

Composiciones farmacéuticas

- 50 El ligando de la presente invención o sus sales farmacológicamente aceptables según la invención se pueden formular en composiciones farmacéuticas o diversas formas farmacéuticas. Para preparar la composición farmacéutica de la invención, se mezclan uno o más compuestos que incluyen isómeros ópticos, enantiómeros, diaestereómeros, racematos o sus mezclas estereoquímicas, o sus sales farmacéuticamente aceptables, como su principio activo, con vehículos y aditivos apropiados según técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

Una sal farmacéuticamente aceptable se refiere a una forma de sal de los compuestos de la presente invención con el fin de permitir su uso o formulación como productos farmacéuticos y que retiene la eficacia biológica de los ácidos y bases libres del compuesto especificado que no es biológicamente o de otro modo no deseable. Ejemplos de dichas sales se describen en "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use", Wermuth, C.G. and Stahl, P.H. (eds.), Wiley Verlag, Helvetica Acta, Zurich, 2002, [ISBN 3906390-26-8].

5 La concentración de ligando en la composición farmacéutica de la presente invención puede variar desde 0,001 hasta 10 %, preferentemente desde 0,01 hasta 5 %, más preferentemente desde 0,1 % hasta 1 % (p/p).

Si la composición farmacéutica es una crema o pomada, la concentración puede variar desde 0,001 hasta 10 %, preferentemente desde 0,01 hasta 5 %, más preferentemente desde 0,1 % hasta 2 % (p/p).

10 Para amarogentina, la concentración en la composición farmacéutica puede variar desde 0,001 hasta 3 %, preferentemente desde 0,01 hasta 2 % más preferentemente desde 0,1 hasta 1 % (p/p).

Si la composición farmacéutica es una crema, la concentración de amarogentina puede variar desde 0,001 hasta 3 %, preferentemente desde 0,01 hasta 2 % más preferentemente desde 0,1 hasta 1 % (p/p).

15 Los vehículos y aditivos usados para dichas composiciones farmacéuticas pueden adoptar una variedad de formas dependiendo de su modo de administración esperado. Las composiciones para la preparación líquida incluyen disoluciones, emulsiones, dispersiones, suspensiones, jarabes, elixires y similares con vehículos y aditivos adecuados que son agua, alcoholes, aceites, glicoles, conservantes, aromatizantes, agentes colorantes, agentes de suspensión y similares. Las composiciones farmacéuticas según las realizaciones de la presente invención incluyen los adecuados para administración tópica (es decir, la piel) y transdérmica. En una realización preferida de la
20 presente invención, la composición farmacéutica es una pomada, una loción, una crema o un gel.

También pueden estar presentes en esta composición agentes antimicrobianos y/o conservantes.

Se describen a continuación cuatro formulaciones.

1 % de crema de salicina

1,0 g de salicina

25 6,0 g de alcohol cetílico

4,0 g de monoestearato de glicerol 60

7,5 g de triglicéridos de cadena media

25,5 g de vaselina blanca

7,0 g de macrogol-1000-monoestearato de glicerol

30 10,0 g de propilenglicol

39,0 g de agua purificada

5 % de crema de extracto de corteza de sauce

5,0 g de extracto de corteza de sauce (extracto de corteza de sauce TropicPure™ con 15-20 % de salicina; una marca registrada de Frutarom GmbH, Alemania)

35 6,0 g de alcohol cetílico

4,0 g de monoestearato de glicerol 60

7,5 g de triglicéridos de cadena media

25,5 g de vaselina blanca

7,0 g de macrogol-1000-monoestearato de glicerol

40 10,0 g de propilenglicol

35,0 g de agua purificada

0,1 % de spray nasal de amarogentina

Se disuelven 100 µg/ml de amarogentina en 2,5 % de etanol en 0,9 % de cloruro sódico.

Por 20 ml: 200 µl de amarogentina (10 mg/ml disueltos en 100 % de etanol)

300 µl de 100 % de etanol

19,5 ml de 0,9 % de cloruro sódico

0,1 % de spray nasal de difenidol

5 Se disuelven 100 µg/ml de difenidol en 2,5 % de etanol en 0,9 % de cloruro sódico

Por 20 ml: 200 µl de difenidol (10 mg/ml disueltos en 0,9 % de cloruro sódico)

500 µl de 100 % de etanol

19,5 ml de 0,9 % de cloruro sódico

En lugar de cloruro sódico se puede usar sal marina.

10 Además, se puede añadir ácido hialurónico a una concentración de desde 0,1 % hasta 10 %, preferentemente 0,5 % hasta 2 %, por ejemplo aproximadamente 1 %.

Usos terapéuticos

15 La invención se refiere además al uso terapéutico y/o profiláctico de un ligando para un receptor de sabor amargo descrito en el presente documento. Dicho ligando se puede usar para la prevención y/o el tratamiento de trastornos de la piel.

20 Los trastornos de la piel incluyen uno de los siguientes, pero no se limitan a, dermatitis atópica (neurodermatitis), cáncer de piel, lupus, rubeola, acné, hemangioma de piel, calentura, psoriasis, rosácea, eccema seborreico, urticaria, vitiligo, verrugas, fascitis necrotizante, candidiasis cutánea, forúnculo, celulitis, hiperhidrosis, impétigo, piel laxa, úlcera de decúbito, erisipelas, dermatitis del pañal, eccema dishidrótico, úlcera bucal, estomatitis herpética, infección fúngica de las uñas, ictiosis vulgar, dermatomiositis, uñas encarnadas, acrodermatitis, quiste seborreico, queratosis seborreica, seno pilonidal, queloide, liquen plano, queratosis actínica, dermatitis por estasis y úlceras en las piernas, ojos de gallo y callos, eccema, pitiriasis versicolor, penfigoide, úlceras de la boca y zóster. En una realización, el trastorno de la piel es un trastorno alérgico de la piel. En otra realización, el trastorno de la piel es un trastorno inflamatorio de la piel. En otra realización más, el trastorno de la piel es un trastorno inflamatorio y alérgico de la piel.

25 En una realización específica, dicho trastorno de la piel es prurito, urticaria, dermatitis o eccema. En una realización preferida, el trastorno de la piel es neurodermatitis.

30 El ligando descrito en el presente documento se administra por vía tópica al paciente. El ligando se administra por vía tópica a la piel de un paciente, por ejemplo en forma de una pomada, una crema, loción, o gel. El ligando se puede administrar a la piel del paciente a una dosis desde una vez al día hasta cuatro veces al día, preferentemente a una dosis dos a tres veces al día, más preferentemente tres veces al día.

35 Una ventaja de la presente invención es que existe un alivio muy rápido en los pacientes tratados. Preferentemente, el picor se reduce en un escala analógica visual por al menos 10 %, preferentemente por al menos 25 %, más preferentemente por al menos 50 %, en el plazo de 24 horas después de la administración de una dosis farmacéuticamente eficaz del ligando o de la composición farmacéutica de la presente invención.

En el caso de la inflamación de la piel, es decir, dermatitis atópica, el eritema de la piel se reduce en una escala analógica visual por al menos 10 %, preferentemente por al menos 25 %, más preferentemente por al menos 50 %, en el plazo de 24 horas después de la administración de una dosis farmacéuticamente eficaz del ligando o de la composición farmacéutica de la presente invención.

40 La presente invención se puede ilustrar adicionalmente por los siguientes ejemplos de sus realizaciones preferidas, aunque se entenderá que estos ejemplos se incluyen simplemente para fin de ilustración.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Materiales y métodos

45 **Anticuerpos y reactivos**

Se usaron los siguientes anticuerpos y diluciones para tinciones inmunohistoquímicas: el anticuerpo anti-T2R1 humano policlonal de conejo (Osensis, Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Alemania), 1:1000; el anticuerpo anti-S100 humano policlonal de conejo (Dako, Glostrup, Dinamarca), 1:200; el anticuerpo anti-T2R38 humano

5 policlonal de conejo (Osenses), 1:750; el anticuerpo anti-T2R38 humano policlonal de conejo (Abcam, Cambridge, R.U.), 1:1000, el anticuerpo anti- α -gustducina humano policlonal de cabra (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania), 1:200; el anticuerpo anti-T1R2 humano policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology), 1:200 y la fracción de inmunoglobulina de conejo (Dako) como control negativo. El anticuerpo secundario biotina multi-enlace, la marca estreptavidina-HRP y el sustrato AEC fueron de Dako y se usaron según las instrucciones del fabricante. 10 Los anticuerpos anti-cabra de burro Alexa 488 y anti-conejo de burro Alexa 555 fueron de Invitrogen (Darmstadt, Alemania) y se usaron a una dilución de 1:500. La matriz AccuMAX (Biocat, Heidelberg, Alemania) contiene 45 tejidos humanos de diversos órganos sanos con 2 manchas de cada caso. El diámetro de cada mancha sobre el portaobjetos fue 1,0 mm. Cada sección de tejido se extrajo de diversos bloques de donante y se transfirió a un bloque de receptor preparado. Los bloques de donante se fijaron en formalina y se incorporaron en parafina. Se obtuvo lisado de tejido completo de lengua humana (adulto normal) de Novus biological (Cambridge, R.U.) y el ARN humano de Agilent Technologies (Böblingen, Alemania).

Inmunohistoquímica

15 Se desparafinaron secciones de las matrices y posteriormente se sometieron a un pretratamiento de cocción de 20 min en disolución de recuperación diana (pH 6,0; Dako) o tratamiento con proteinasa K (Dako). La inmunotinción se realizó con el anticuerpo anti-T2R1 y -38, anti- α -gustducina, anti-S100 y anti-T1R2. La aplicación del anticuerpo primario (4 °C, durante la noche) fue seguida por incubación con inmunoglobulinas de anticuerpo de cerdo biotilado, anti-cabra, anti-ratón y anti-conejo (1 h, TA), estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (20 min, TA), disolución de AEC como cromógeno y contratinción con hematoxilina. Las tinciones con la fracción de 20 inmunoglobulina de conejo sirvieron de control de isotipo. Se escanearon las matrices de tejido con el escáner MIRAX (Zeiss, Jena, Alemania) y la tinción se evaluó según estructuras anatómicas.

Inmunofluorescencia

25 Para realizar el doble marcado de T2R1 o T2R38 y α -gustducina, las células se tiñeron con el anticuerpo anti-T2R1 o T2R38 humano policlonal de conejo y el anticuerpo anti- α -gustducina humano de cabra. Los anticuerpos secundarios requeridos (anticuerpos anti-cabra de burro Alexa 488 y anti-conejo de burro Alexa 555) se aplicaron durante 2 h a TA según las instrucciones del fabricante. Entonces, las células se tiñeron con DAPI y se montaron en medio de montaje de fluorescencia (Dako). Las imágenes se tomaron con un microscopio de fluorescencia (Zeiss) equipado con el software Axiovision.

Cultivo celular

30 La línea celular de queratinocitos humanos HaCaT, la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y y la línea celular placentaria JEG-3 fueron de CLS Cell Lines Service (Heidelberg, Alemania) y se cultivaron en medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM; Invitrogen) que contenía 10 % de suero bovino fetal (FCS; PAA, Pasching, Austria) a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Para tinciones dobles de fluorescencia, las células se sembraron en un portaobjetos de cámara de cuatro campos (Thermo Fisher Scientific GmbH; 1×10⁵ células/ml). 35 Para los experimentos de obtención de imágenes de calcio, las células se sembraron en cubreobjetos recubiertos de polilisina (Sigma-Aldrich, Múnich, Alemania) a una densidad de 1,5 - 2x 10⁵. Después del aislamiento de queratinocitos primarios humanos (hPK) de muestras de piel, las células se incubaron durante 3 días con calcio (2 mM), amarogentina (100 μ M) o difenidol (100 μ M) antes del aislamiento de ARN y la determinación de los marcadores de diferenciación.

Prueba de citotoxicidad

40 Se evaluó la citotoxicidad de amarogentina en células HaCaT con el ensayo Vialight Plus ATP (Cambrex, Verviers, Bélgica) según las instrucciones del manual. El método se basa en la medición de bioluminiscencia de ATP que está presente en células metabólicamente activas. La luciferasa cataliza la formación de luz de ATP y luciferina. La intensidad de luz emitida es directamente proporcional a la concentración de ATP y se mide usando un luminómetro (Sirius HT; MWG). 45

Transferencia Western

50 Se prepararon lisados celulares a partir de células HaCaT, JEG-3 y SH-SY5Y y se realizó análisis de transferencia Western según procedimientos convencionales. Para los experimentos de pre-absorción de anticuerpo, se pre-incubó el antisuero anti-T2R38 con un exceso de 5 veces (v/v) del péptido inmunogénico durante 1 h a 37 °C. Entonces, el anticuerpo se aplicó como anticuerpo primario a la membrana de transferencia y continuó el procedimiento normal de transferencia Western.

Extracción de ARN y PCR

55 Se extrajo ARN total con el kit RNeasy Mini (Qiagen, Hilden, Alemania) de células subconfluentes HaCaT, JEG-3 y SH-SY5Y. Se sintetizó ADNc de la primera hebra a partir de 2 μ g de ARN total en 20 μ l de volumen final usando el kit Omniscript (Qiagen, Hilden, Alemania) con cebadores hexámeros al azar (Invitrogen). Se usaron alícuotas de 2 μ l de la disolución de transcripción inversa como molde para las reacciones de PCR específicas con una temperatura

de hibridación de 58 °C y el producto de PCR se analizó por electroforesis en gel. Los cebadores de PCR (20 pmoles de cada uno) usados para amplificar T2R1, T2R38, T1R1 y el gen de mantenimiento β -actina fueron:

5 cebador directo de T2R1: 5'-gatctcctt ctttctgtc tg-3', cebador inverso: 5'-taaaattaagatgagagagtg-3'; cebador directo de T2R38: 5'-cgcacccgcaactgtgtccta-3'; cebador inverso: 5'-gggaatctgcctgtgtcgcg-3'; cebador directo de T1R3: 5'-gcaagttctt cagcttctct-3', cebador inverso: 5'-gtacatgttctccaggagctgc-3' y cebador directo de β -actina: 5'-ccccaggcaccaggcggtga-3'; cebador inverso: 5'-ggatctctcgcgggtggccttgggtg-3'.

Detección basada en enzima de restricción del alelo del gen T2R38 para distinguir entre degustador y no degustador de PTC:

10 Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) más comunes en T2R38 están en las posiciones de proteína 49, 262 y 296. Degustadores de PTC tienen el haplotipo PAV y los no degustadores tienen el haplotipo AVI (A=Ala, V=Val, I=Ile). Se pueden usar las diferencias de secuencia en las posiciones primera y central para distinguir degustadores de PAV y no degustadores de AVI usando una enzima de restricción que superpone estas dos regiones y así corta diferencialmente el ADN dependiendo del alelo. Primero, se amplifica por PCR un fragmento de 1067 pb de la porción de extremo N de T2R38 (cebador directo 5'catccctctaagtcttctgccaga, cebador inverso 5'ttgggataatggcagcttgcctc, temperatura de hibridación: 58 °C). Entonces, el producto de PCR se extrajo de un 0,8 % de gel de agarosa con el kit de extracción en gel de Qiagen y entonces se cortó con Fnu4H (New England Biolabs GmbH, Fráncfort) a 36 °C durante 15 minutos. Fnu4H corta el ADN en la secuencia GCNGC (N es A, G, C o T). Esta secuencia superpone ambos sitios de polimorfismo. En la posición de aminoácido 262, los degustadores de PAV contienen la secuencia de reconocimiento de Fnu4H (GCTGC), pero no los no degustadores de AVI (GTTGC).
15 En la posición de aminoácido 49, los degustadores de PAV contienen también el sitio de corte Fnu4H (GCAGC), pero no los no degustadores de AVI (GCAGG). El patrón de restricción del producto de PCR T2R38 indica la secuencia en ambos sitios polimórficos y se determinó en un 2 % del gel de agarosa. Un fragmento de Fnu4H de 557 pb en los no degustadores se escinde a un fragmento de 456 pb y uno de 75 pb en los degustadores de PAV. Un fragmento de Fnu4H de 363 pb en los no degustadores se escinde a un fragmento de 336 pb y uno de 27 pb en los degustadores de PAV (véase la Figura 9A para una descripción esquemática de los productos de escisión). La heterocigosidad muestra tanto los productos escindidos como los no escindidos.
20
25

Mediciones de fluorescencia

30 Se llevaron a cabo mediciones de concentración de Ca^{2+} intracelular en células individuales usando el indicador de fluorescencia fura-2-am (Invitrogen). Las células se lavaron con un tampón que contenía NaCl 130 mM, KCl 5 mM, HEPES 10 mM, glucosa 10 mM y CaCl_2 1 mM ajustado a pH 7,4 y se cargaron con fura-2-am 2 μM y 0,04 % de Pluronic F-127 (Invitrogen) durante 30 min. Después de aclarar dos veces, se dejó que las células desesterificaran fura-2-am durante 30 min. Las mediciones se realizaron con un sistema de obtención de imágenes basado en un monocromador unido a un microscopio invertido (Axiovert S100, Zeiss). La fluorescencia se excitó a 340 y 380 nm y la emisión se midió a 510 nm. Después de 60 s, las células se estimularon con diversas concentraciones de difenidol o amarogentina, PTC 100 μM o el control de disolvente respectivo. Se realizó la inhibición del receptor de T2R38 por pre-incubación de células JEG-3 durante 1 h con el antagonista de T2R38 probenecid (1 mM) antes de la estimulación por PTC. Después de la corrección de la fluorescencia de fondo, se calculó la relación de fluorescencia usando el software Axiovision.
35

PCR con transcripción inversa

40 Se realizó PCR con transcripción inversa como se ha descrito (Muller et al., 2008). En resumen, se aisló ARN total usando el reactivo Trizol (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Se sintetizó ADNc de la primera hebra a partir de 2 mg de ARN total en 20 ml de volumen final usando el kit Omniscript (Qiagen, Hilden, Alemania) con cebadores hexámeros al azar (Invitrogen). Se usaron alícuotas de 2 ml de la disolución de transcripción inversa como molde para PCR específica. Ya fueron publicados los cebadores de PCR (20 pmoles de cada uno) usados para amplificar queratina 10 (KRT10), INV, TGM y β -actina (Muller et al., 2008). Se usó β -actina como control de carga interna. Después de la electroforesis en gel, la cuantificación se logró con el software ImageJ.
45

Resultados

Fuerte expresión de T2R y α -gustducina en tejido humano

50 Se realizaron tinciones inmunohistoquímicas para determinar la expresión de los dos receptores de sabor amargo conservados T2R1 y T2R38 en 45 tejidos humanos que se proporcionaron en una micromatriz de tejido. T2R1 es el único receptor de sabor que se localiza en cromosoma 5 y T2R38 es el receptor de sabor amargo mejor caracterizado que se localiza en el cromosoma 7 y se relaciona estrechamente con los otros T2R. Además, la micromatriz de tejido se tiñó contra la proteína G específica de sabor α -gustducina para identificar tejidos que no mostraban expresión para T2R1 y T2R38, pero posiblemente para otros de los 25 receptores de sabor amargo humanos descritos. La especificidad del anticuerpo anti-T2R38 usado de Abcam se describió recientemente por experimentos inmunocitoquímicos en los que el antisuero anti-T2R38 fue capaz de detectar el receptor correspondiente en células de mamífero transfectadas transitoriamente [17]. En secciones de control, no se observó
55

tinción con un anticuerpo de control de isotipo. Los resultados de tinción con el anticuerpo anti-T2R38 de Abcam fueron idénticos con el anticuerpo anti-T2R38 de Osenses (datos no mostrados), de manera que este anticuerpo también reacciona específicamente con el antígeno T2R38 respectivo. Esto es especialmente importante ya que Behrens y colaboradores probaron muchos antisueros y varios dejaron de reconocer su epítipo específico. La especificidad del anticuerpo también se demostró por experimentos de transferencia Western con lisados de lengua normal humana (véase tejido de lengua como control positivo en la Figura 6B). Todos los resultados de tinción se resumieron en la Tabla 1.

Se encontró que cuatro tipos de tejido importante (cerebro, piel, placenta y epitelios mucosos del conducto glandular) expresaban los receptores de sabor amargo fuera de los epitelios gustativos. Para verificar que esto es una ventaja exclusiva de los receptores de sabor amargo, se compararon los resultados con tinciones contra el receptor de sabor dulce T1R2.

1. Expresión de T2R1, T2R38 y α -gustducina en tejido cerebral humano

El análisis inmunohistoquímico mostró la fuerte expresión de T2R1 y T2R38 en neuronas piramidales en la corteza cerebral, mientras que las células de la glía (por ejemplo, astrocitos, oligodendrocitos) no expresaron T2R1 y T2R38 (Figura 1B-C). Se puede observar el mismo patrón de tinción con un anticuerpo anti- α -gustducina (Figura 1D). En el cerebelo, solo las neuronas de Purkinje fueron positivas para el receptor de sabor amargo y α -gustducina, mientras que las células granulares siguieron sin teñir (Figura 1G-I). Las neuronas de Purkinje regulan y coordinan movimientos motores y se encuentran en una fila en el cerebelo entre la capa molecular, una región relativamente libre de somas neuronales con los axones proyectados de células granulares, y la capa de células granulares. De forma interesante, ni las neuronas piramidales ni las neuronas de Purkinje expresan el receptor de sabor dulce T1R2 (Figura 1E, J). No se observó tinción en la corteza cerebral ni el tejido de cerebelo con un anticuerpo de control de isotipo (Figura 1A, F). Además, los ganglios basales, un conjunto de núcleos situados en la base del prosencéfalo, así como la médula espinal, un haz tubular delgado de tejido nervioso que soporta células que se extienden desde el cerebro, no expresaron los receptores de sabor amargo analizados ni α -gustducina (datos no mostrados).

2. Expresión de T2R1, T2R38 y α -gustducina en la epidermis humana

La epidermis, la capa más externa de la piel, es un epitelio queratinizado estratificado y está principalmente compuesta de queratinocitos (queratinocitos basales proliferantes y suprabasales diferenciadores). Algunos de los queratinocitos basales, de los que algunos son células madre epidérmicas, solo mostraron una débil expresión de T2R1, T2R38 y α -gustducina (Figura 2B-D). Durante el proceso de diferenciación, los queratinocitos sacados del ciclo celular inician la expresión de marcadores de diferenciación epidérmica (por ejemplo, queratina 1, involucrina) y se mueven suprabasalmente donde llegan a ser parte del estrato espinoso, estrato granuloso y con el tiempo se convierten en corneocitos muertos en el estrato córneo. Los corneocitos han completado su programa de diferenciación, perdido su núcleo y orgánulos citoplásmicos. Durante este proceso de diferenciación, los queratinocitos desde el estrato espinoso hasta el estrato córneo expresaron fuertemente estos dos receptores de sabor amargo y α -gustducina (Figura 2B-D). Para probar si los receptores de sabor dulce también se expresaron en queratinocitos, se tiñó tejido de piel contra T1R2. Solo se detectó una ligera expresión de T1R2 en la epidermis y esta expresión aumentó solo un poco durante el proceso de diferenciación de los queratinocitos (Figura 2E). No se observó tinción en la epidermis humana con un anticuerpo de control de isotipo (Figura 2A).

3. Expresión de T2R1, T2R38 y α -gustducina en la placenta humana

La placenta es un órgano temporal requerido para el desarrollo del embrión y el feto. Permite el intercambio de productos metabólicos entre el feto y la madre. La placenta funciona como órgano fetomaterno con dos componentes: la placenta fetal (placa coriónica) y la placenta materna (la placa basal). La placa coriónica fetal está compuesta por amnios, corion y sincitiotrofoblasto. El último es una capa externa que forma cuerdas que invaden la pared del útero para establecer la circulación de nutrientes entre el embrión y la madre. El epitelio del amnios (una membrana que rodea y protege el embrión) y el sincitiotrofoblasto mostraron una fuerte tinción de T2R1, T2R38 y α -gustducina (Figura 3B-D). A diferencia, la expresión de T1R2 de la placa coriónica fue solo débil (Figura 3E). La placa basal (placenta materna), la parte del útero a la que se anclan las vellosidades, se tiñó solo débilmente para T2R1 y 38 (datos no mostrados). No se observó tinción en la placenta humana con un anticuerpo de control de isotipo (Figura 3A).

4. Expresión de T2R1, T2R38 y α -gustducina en algunas glándulas humanas

Otro tipo de célula que expresó fuertemente T2R1 y T2R38 fue el epitelio columnar simple de los conductores intralobulares secretorios (Figura 4B-C, flechas rojas). Casi no se tiñeron los ácinos serosos y mucosos, por ejemplo en la glándula parótida (Figura 4B-C, flechas negras). Estas células epiteliales columnares expresaron solo débilmente α -gustducina y fueron casi negativas para la expresión de T1R2 (datos no mostrados). Además, los espongocitos de la zona fasciculada de la corteza de la glándula suprarrenal, conductos intestinales tubulares rectos del colon (Figura 4E-F) y los túbulos colectores de la médula renal mostraron una fuerte tinción de T2R1 y T2R38. En la corteza renal, solo los túbulos renales fueron positivos para los receptores de sabor amargo (Tabla 1). No se

observó tinción en la glándula parótida y los conductos del colon con un anticuerpo de control de isotipo (Figura 4A, F).

T2R1, T2R38 y α -gustducina que expresan células individuales en tejidos humanos

5 El páncreas es una glándula bifuncional, que tiene características de tanto una glándula endocrina en la agrupación de células de las células de Langerhans secretoras de insulina como una glándula exocrina que secreta enzimas digestivas. Los ácinos secretores exocrinos en el páncreas expresaron solo muy débilmente T2R1, T2R38 y α -gustducina; sin embargo, hubo algunas células con fuerte expresión de receptores de sabor amargo detectables en el parénquima del páncreas (datos no mostrados). Para una mejor caracterización de estas células, se realizó tinción con S100 para determinar si las células T2R1-positivas eran de origen mioepitelial o neuronal o células dendríticas. 10 La tinción con S-100 del páncreas mostró células S100-positivas individuales que son morfológicamente iguales a las células positivas para receptores de sabor amargo. Aunque S100 no es específico para células dendríticas y también se puede expresar por células neuronales y mioepiteliales [19], las células positivas para S100 con morfología dendrítica (núcleos ovalados, tamaño celular alargado con algún citoplasma) y su localización dentro del epitelio de conductos y ácinos, además del tejido conjuntivo intersticial, sugieren fuertemente que estas células son de hecho células dendríticas similares a las células recientemente descritas en las glándulas salivales [20]. También se pudieron observar algunas células positivas para S100, T2R1, T2R38 y α -gustducina en el epitelio secretor 15 columnar simple que reviste las glándulas endocervicales (Figura 5B-E). Las células positivas para S100 podrían ser células mioepiteliales que son contráctiles y ayudan en la secreción. Las células positivas para S100 en el páncreas y el endocérvix no fueron T1R2-positivas (Figura 5F), a diferencia de las células acinares del páncreas que expresaron T1R2. No se observó tinción en la glándula endocervical con un anticuerpo de control de isotipo (Figura 5A). El epitelio escamoso estratificado del ectocérvix fue fuertemente positivo para la expresión de receptores de 20 sabor amargo (Tabla 1).

Ausencia de expresión de T2R1, T2R38 y α -gustducina en tejidos humanos

25 Varios tejidos mesodérmicos humanos no muestran ni tinción contra T2R1, T2R38 y α -gustducina ni T1R2. Estos tejidos incluyen tejidos linfoides tales como ganglios linfáticos (datos suplementarios, no mostrados), timo, bazo así como corazón, músculo esquelético, tejido blando, miometrio y ovario (Tabla 1).

Tabla 1

Resumen de tejidos humanos positivos y negativos para T2R1, T2R38 y α -gustducina

capa blastodérmica	Sistema de órganos	células/tejidos	Expresión de gustducina y T2R1/ T2R38
ectodérmica	sistema nervioso central	células neuronales en: corteza cerebral, cerebelo, núcleo basal, hipocampo, médula espinal	positiva
ectodérmica	piel	queratinocitos fibroblastos membrana mucosa (lengua, paladar)	positiva
ectodérmica	placenta	amnios de placenta vellosidades coriónicas de la placenta, placenta basal cordón umbilical	positiva
ectodérmica	mucosa gastrointestinal y conductos	células epiteliales mucosas y conductos glandulares de: íleon, ciego, colon, recto, glándula parótida, riñón, mama, esófago, estómago páncreas	positiva negativa negativa, solo algunas células son positivas (véase en la sección de resultados)

capa blastodérmica	Sistema de órganos	células/tejidos	Expresión de gustducina y T2R1/ T2R38
endodérmica	sistema urogenital	próstata, testículo, exocérvix, endocérvix pro-endometrio sec-endometrio uréter miometrio, ovario, trompa de Falopio	positiva células positivas individuales positiva negativa
		hígado	
endodérmica	vías respiratorias	pulmón	negativa
mesodérmica	estructuras mesenquimatosas	músculo esqueléticos, tejido adiposo, tejido blando, corazón, células endoteliales	negativa
mesodérmica	tejido linfático	ganglio linfático, bazo, amígdalas, timo	negativa

ARN y expresión de proteínas de T2R1, T2R38 y T2R3 en líneas celulares humanas

Se determinó la expresión de T2R1, T2R38 y T1R3 en tres líneas celulares humanas correspondientes a tejidos que expresaron fuertemente T2R1 y T2R38, es decir, la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, la línea celular placentaria JEG-3 y la línea celular de queratinocitos HaCaT (Figura 6A) evaluando la expresión de su ARNm usando RT-PCR. Se usó ARN de lengua comercialmente disponible como control positivo. La expresión del gen de mantenimiento β -actina demostró contenido de ARN igual. Todas las líneas celulares y el tejido de lengua expresaron T2R1 y T2R38, sin embargo, solo el tejido de lengua expresó T1R3.

Se confirmaron los resultados de expresión génica de T2R1, T2R38 y T1R3 al nivel de proteína por transferencia Western con lisados de proteína de las tres líneas celulares y el tejido de lengua de control positivo (Figura 6B). Como no estuvo disponible anticuerpo anti-T1R3 humano, implicado en la percepción de tanto sabor dulce como umami, los presentes inventores usaron un anticuerpo contra el receptor de sabor dulce T1R2. La detección de HSC-70 se usó como control de carga (Figura 6B, última imagen). Las bandas corresponden al peso molecular predicho de monómeros de receptores, monómeros y oligómeros glucosilados. Se ha observado que T2R forman homo- y heterómeros *in vitro*. Aunque no fue obvia una significancia fisiológica de la hetero-oligomerización de receptor, la oligomerización de receptor podría ser en general necesaria para la función de receptor [21]. Además los hT2R contienen un sitio de N-glucosilación conservado en el 2° bucle extracelular, de manera que la banda que migra justo por encima de 50 kDa en la transferencia Western probablemente corresponde al monómero de receptor N-glucosilado de longitud completa (Figura 6B, primera imagen) [17]. Parece que la glucosilación unida a Asn (N) se asocia a plegamiento y transporte celular superficial junto con RTP (proteína de transporte de receptor) y REEP (proteína potenciadora de la expresión de receptor), pero no para su función en sí [22] [23]. Además, oligómeros del supuesto receptor que migran más lentos, así como un monómero de migra más rápido o variante de receptor posiblemente truncada, son visibles como ya se ha descrito [17]. Los monómeros no glucosilados son solo visibles en los lisados de las líneas celulares, pero no en el lisado de tejido de lengua, debido a que el patrón de T2R es posiblemente diferente en lisados de tejido en comparación con lisados de la línea celular. La especificidad del anticuerpo contra T2R38 se demuestra por experimentos paralelos en los que el antisuero anti-T2R38 primario ha sido pre-absorbido con los péptidos antigénicos correspondientes. Como era de esperar, esta preparación de antisuero con niveles reducidos de anticuerpos anti-T2R38 específicos reactivos no detectó T2R38 en los lisados celulares (Figura 6B, segunda imagen). Las bandas de la transferencia Western detectadas con un anticuerpo anti-T2R1 corresponden al peso molecular predicho de monómeros receptores, monómeros y oligómeros glucosilados como para el anticuerpo anti-T2R38 (Figura 6, tercera imagen). El receptor de sabor dulce T1R2 revela una banda inmunorreactiva importante que migra en aproximadamente 50 kDa, de acuerdo con el peso molecular teóricamente calculado y los datos de la bibliografía [24]. Solo en tejido de lengua, pero no en las otras líneas celulares, son detectables dos bandas en la transferencia Western (Figura 6B, cuarta imagen). Además, T1R2 forma heterodímeros con el receptor T1R3, de manera que la mayor banda también podría representar el heterodímero.

Coexpresión de T2R1 o T2R38 con α -gustducina en líneas celulares humanas

Para realizar el doble marcado de T2R1 o T2R38 y α -gustducina, se tiñeron la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Figura 7A), la línea celular placentaria JEG-3 (Figura 7B) y la línea celular de queratinocitos HaCaT (Figura 7C) con el anticuerpo anti-T2R1 o T2R38 humano policlonal de conejo y el anticuerpo anti- α -gustducina humano de cabra. Entonces, se aplicaron los anticuerpos secundarios requeridos (anticuerpos anti-cabra de burro Alexa 488 y anti-conejo de burro Alexa 555) y entonces las células se tiñeron con DAPI. Se podría demostrar que las células neuronales y placentarias positivas para T2R1 y T2R38, así como queratinocitos, expresaron α -gustducina. No fue detectable señal de fluorescencia con un anticuerpo de control de isotipo (Figura 7A-C, primera imagen).

El compuesto amargo difenidol induce la entrada de calcio en un línea celular de neuroblastoma humano, placentaria humana y epitelial humana

Habiendo demostrado que la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y, la línea celular placentaria humana JEG-3 y la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT expresan α -gustducina, así como los receptores de sabor amargo T2R1 y T2R38, la siguiente etapa fue determinar si los receptores de sabor amargo expresados eran funcionales midiendo la entrada de calcio intracelular después de la estimulación con difenidol (DPH). El difenidol es un agonista sintético de receptores de sabor amargo que activa 16 receptores de sabor amargo que incluyen T2R1 y T2R38 como se ha descrito [25]. La medicación de DPH se ha desarrollado clínicamente hace tiempo como un agente antiemético y un antivertiginoso [26]. Primero, los presentes inventores estimularon células HaCaT con cantidades crecientes de difenidol y ya observaron con 30 μ M una entrada de calcio significativa (Figura 11). Según los datos de la bibliografía, todas las líneas celulares en investigación se estimularon con difenidol 100 μ M y mostraron una entrada de calcio significativa (hasta 7 veces) en comparación con el control de disolvente (Figura 8). Sin embargo, el difenidol es un antagonista de receptores muscarínicos y, por tanto, no es específico para T2R. El difenidol también se describe como un inhibidor de los canales de K^+ y Ca^{2+} regulados por voltaje sin afectar los canales de Ca^{2+} operados por reserva. Pero la acción celular y molecular precisa del difenidol todavía no es completamente clara [26]. Por tanto, los presentes inventores realizaron experimentos de activación adicionales en células HaCaT con diferentes concentraciones de amarogentina, la sustancia más amarga en la naturaleza que está presente en cantidades más altas en *Gentiana lutea* y puede activar varios T2R (es decir, T2R1, 4, 39, 43, 46, 47 y 50) para demostrar la funcionalidad de los T2R. Una concentración de amarogentina 100 μ M condujo a una entrada significativa de calcio en células HaCaT (Figura 11).

PTC indujo la entrada de calcio en la línea celular de degustador JEG-3

A continuación, los presentes inventores quisieron estimular las tres líneas celulares con una sustancia que solo activa T2R1 o T2R38 para proporcionar una fuerte prueba de la función de T2R en estos tejidos no gustativos. PTC (feniltiocarbamida) es una buena sustancia para este fin, debido a que activa específicamente T2R38 en variantes de degustador (haplotipo PAV). Primero, los presentes inventores determinaron la variante de T2R38 en las tres líneas celulares analizadas por los presentes inventores por análisis de enzima de restricción (Figura 9B) y secuenciación génica (Figura 9C) de un fragmento de 1067 pb de la porción del extremo N de T2R38. El patrón de los productos de escisión después de la digestión con la enzima de restricción Fnu4H permite la distinción entre degustadores de PAV y no degustadores de AVI (véase la Figura 9A y la sección de Material y método). El ADN de la línea celular placentaria JEG-3 contiene la variante de degustador (PAV), la línea celular de queratinocitos HaCaT es heterocigótica (PAV/AVI) y el ADN de células SH-SY5Y contiene la variante homocigótica de no degustador (AVI). Por tanto, los presentes inventores usaron las células JEG-3 para el análisis de activación de PTC. PTC indujo la entrada de calcio en células JEG-3. Los datos de los presentes inventores son comparables a los resultados de la entrada de calcio descritos por Greene y colaboradores [18], que trabajaron con células HEK293 transfectadas con ADN de T2R38 antes de la estimulación de PTC y la medición de la entrada de calcio. Para demostrar adicionalmente la especificidad de la activación de PTC en células JEG-3, esta activación se reprimió con el inhibidor de T2R38 probenecid como se describe por Greene y colaboradores (Figura 10a y B). Esto da como resultado que las células JEG-3 demuestran una activación de T2R38 muy específica.

Inducción de diferenciación por amarogentina y difenidol

Como la entrada de calcio participa en la diferenciación, los presentes inventores investigaron si la amarogentina o el difenidol podrían inducir la diferenciación en queratinocitos primarios analizando la expresión del marcador de diferenciación queratina 10, involucrina y transglutaminasa 3 días después de la estimulación con difenidol, amarogentina o calcio. Se pudo aumentar la expresión de todos estos marcadores (Figura 12). La concentración usada de amarogentina y difenidol no mostró citotoxicidad en células HaCaT (Figura 13).

EJEMPLO 2**Material y métodos****Cultivo celular**

5 Se cultivaron mastocitos humanos LAD-2 (obtenidos del Dr. A. Kirshenbaum NIH) en medio sin suero (StemPro-34, Gibco, Alemania) complementado con L-glutamina 2 mM y 100 ng/ml de rhSCF (factor recombinante humano de células madre; Cell signaling technologies). Se cultivó la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT en medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM; Invitrogen) que contenía 10 % de suero bovino fetal (FCS; PAA, Pasching, Austria) a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂.

Estimulación de mastocitos humanos

10 Se lavaron células LAD-2 con PBS y se resuspendieron en medio completo. Se sembraron células LAD-2 (2x10⁵ células/400 µl/pocillo) en placas de cultivo celular Falcon de fondo plano de 48 pocillos de Becton Dickinson y entonces se estimularon con SP (2 µM, Sigma-Aldrich) durante 1 o 24 h. Algunas células se pre-incubaron durante 30 min con amarogentina (136 µM, Phytolab), difenidol (136 µM, Santa Cruz) o azelastina (24 µM, Sigma) como se indica. Los sobrenadantes se recogieron para ensayos adicionales.

15 Estimulación de queratinocitos humanos

Se sembró la línea celular de queratinocitos HaCaT (2x10⁵ células/400 µl/pocillo) en placas de cultivo celular Falcon de fondo plano de 48 pocillos de Becton Dickinson y entonces se estimularon con histamina (100 µl) y TNF-α (25 ng/ml) o IFN-γ (200U/ml) durante 24 h. Algunas células se pre-incubaron durante 30 min con amarogentina (136 µM, Phytolab), difenidol (136 µM, Santa Cruz) o azelastina (24 µM, Sigma) como se indica. Los sobrenadantes se recogieron para ensayos adicionales.

Ensayos de desgranulación

Se evaluó la desgranulación de mastocitos midiendo la histamina en el fluido de sobrenadante 1 h después de la estimulación de células con SP (2 µM). Se ensayaron los niveles de histamina usando un ELISA de histamina de IBL international.

25 Ensayos de liberación de citocinas y MMP-1

Se midieron la liberación de TNF-α, IL-6, IL-8 y MMP-1 en el fluido de sobrenadante 24 h después de la estimulación de células (ya sea con células LAD-2 o HaCaT) por enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) usando un kit comercial de R&D Systems según las instrucciones del manual.

Prueba de citotoxicidad:

30 Se evaluó la citotoxicidad de amarogentina y azelastina en células LAD-2 y HaCaT con el ensayo Vialight Plus ATP (Cambrex, Verviers, Bélgica) según las instrucciones del manual. El método se basa en la medida de bioluminiscencia de ATP que está presente en células metabólicamente activas. La luciferasa cataliza la formación de luz a partir de ATP y luciferina. La intensidad de luz emitida es directamente proporcional a la concentración de ATP y se mide usando un luminómetro (Sirius HT; MWG).

35 Resultados**La amarogentina reduce la liberación de histamina en mastocitos después de la estimulación de SP**

Los mastocitos LAD-2 liberan histamina 1 h después de la estimulación con SP (2 µM). La amarogentina (136 µM, 30 min) inhibe la liberación de histamina, así como la sustancia de control azelastina (24 µM, 30 min) (Figura 14A). Los mastocitos LAD-2 también secretan TNF-α recién sintetizado después de la estimulación con SP (2 µM). La pre-incubación con amarogentina (136 µM, 30 min) o difenidol (136 µM, 30 min), al igual que con el control positivo azelastina (24 µM, 30 min), bloqueó la secreción de TNF-α de mastocitos (Figura 14B).

40 **La amarogentina reduce la liberación de IL-6, IL-8 y MMP-1 en queratinocitos tratados con histamina junto con TNF-α o IFN-γ.** La estimulación de TNF-α causó en la línea celular de queratinocitos HaCaT la liberación de la citocina IL-8 y la metaloproteínasa de matriz MMP-1. TNF-α aumentó la secreción de IL-8 y MMP-1, aunque la histamina sola únicamente potenció marginalmente la producción de IL-8 y MMP-1 (Figura 15A). IL-8 es una citocina inflamatoria que puede quimioatraer neutrófilos y linfocitos T y de esta forma inicia la inflamación cutánea. MMP-1 conduce a una elevada trans migración de linfocitos T a través de la membrana basal. Además, INF-γ junto con la histamina pueden inducir que células HaCaT produzcan la citocina proinflamatoria IL-6 y también produzcan MMP-1. La producción de IL-6 y MMP-1 se puede disminuir por amarogentina y el control azelastina (Figura 15B). La concentración usada de amarogentina no fue citotóxica para las células HaCaT (Figura 16). Se muestra en la Figura 17 una hipótesis de trabajo simplificada para la acción de los ligandos de receptores de sabor amargo.

Referencias

1. Yarmolinsky DA, Zuker CS, Ryba NJ (2009) Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell* 139: 234-244.
- 5 2. Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ, et al. (2001) Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106: 381-390.
3. Adler E, Hoon MA, Mueller KL, Chandrashekar J, Ryba NJ, et al. (2000) A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100: 693-702.
4. Chandrashekar J, Mueller KL, Hoon MA, Adler E, Feng L, et al. (2000) T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* 100: 703-711.
- 10 5. Matsunami H, Montmayeur JP, Buck LB (2000) A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* 404: 601-604.
6. Finger TE, Kinnamon SC (2011) Taste isn't just for taste buds anymore. *F1000 Biol Rep* 3: 20.
7. Callaway E (2012) Evolutionary biology: the lost appetites. *Nature* 486: S16-17.
8. Amrein H, Bray S (2003) Bitter-sweet solution in taste transduction. *Cell* 112: 283-284.
- 15 9. Lee RJ, Xiong G, Kofonow JM, Chen B, Lysenko A, et al. (2012) T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection. *J Clin Invest* 122: 4145-4159.
10. Kim UK, Drayna D (2005) Genetics of individual differences in bitter taste perception: lessons from the PTC gene. *Clin Genet* 67: 275-280.
- 20 11. Bufo B, Breslin PA, Kuhn C, Reed DR, Tharp CD, et al. (2005) The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. *Curr Biol* 15: 322-327.
12. Biarnes X, Marchiori A, Giorgetti A, Lanzara C, Gasparini P, et al. (2010) Insights into the binding of Phenylthiocarbamide (PTC) agonist to its target human TAS2R38 bitter receptor. *PLoS One* 5: e12394.
13. Shah AS, Ben-Shahar Y, Moninger TO, Kline JN, Welsh MJ (2009) Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science* 325: 1131-1134.
- 25 14. Rozengurt E, Sternini C (2007) Taste receptor signaling in the mammalian gut. *Curr Opin Pharmacol* 7: 557-562.
15. Deshpande DA, Wang WC, McIlmoyle EL, Robinett KS, Schillinger RM, et al. (2010) Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction. *Nat Med* 16: 1299-1304.
- 30 16. Lindemann B (2001) Receptors and transduction in taste. *Nature* 413: 219-225.
17. Behrens M, Born S, Redel U, Voigt N, Schuh V, et al. (2012) Immunohistochemical detection of TAS2R38 protein in human taste cells. *PLoS One* 7: e40304.
18. Greene TA, Alarcon S, Thomas A, Berdougou E, Doranz BJ, et al. (2011) Probenecid inhibits the human bitter taste receptor TAS2R16 and suppresses bitter perception of salicin. *PLoS One* 6: e20123.
- 35 19. Haimoto H, Hosoda S, Kato K (1987) Differential distribution of immunoreactive S100-alpha and S100-beta proteins in normal nonnervous human tissues. *Lab Invest* 57: 489-498.
20. Le A, Saverin M, Hand AR (2011) Distribution of dendritic cells in normal human salivary glands. *Acta Histochem Cytochem* 44: 165-173.
- 40 21. Kuhn C, Bufo B, Batram C, Meyerhof W (2010) Oligomerization of TAS2R bitter taste receptors. *Chem Senses* 35: 395-406.
22. Reichling C, Meyerhof W, Behrens M (2008) Functions of human bitter taste receptors depend on N-glycosylation. *J Neurochem* 106: 1138-1148.
23. Behrens M, Bartelt J, Reichling C, Winnig M, Kuhn C, et al. (2006) Members of RTP and REEP gene families influence functional bitter taste receptor expression. *J Biol Chem* 281: 20650-20659.
- 45 24. Raliou M, Grauso M, Hoffmann B, Schlegel-Le-Poupon C, Nespoulous C, et al. (2011) Human genetic polymorphisms in T1R1 and T1R3 taste receptor subunits affect their function. *Chem Senses* 36: 527-537.

25. Meyerhof W, Batram C, Kuhn C, Brockhoff A, Chudoba E, et al. (2010) The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem Senses* 35: 157-170.
26. Leung YM, Wong KL, Cheng KS, Kuo CS, Su TH, et al. (2012) Inhibition of voltage-gated K⁺ channels and Ca²⁺ channels by diphenidol. *Pharmacol Rep* 64: 739-744.
- 5 27. Li F, Zhou M (2012) Depletion of bitter taste transduction leads to massive spermatid loss in transgenic mice. *Mol Hum Reprod* 18: 289-297.
28. Clark AA, Liggett SB, Munger SD (2012) Extraoral bitter taste receptors as mediators of off-target drug effects. *FASEB J* 26: 4827-4831.
- 10 29. Go Y, Investigators ST-NY (2006) Proceedings of the SBE Tri-National Young Investigators' Workshop 2005. Lineage-specific expansions and contractions of the bitter taste receptor gene repertoire in vertebrates. *Mol Biol Evol* 23: 964-972.
30. Dong D, Jones G, Zhang S (2009) Dynamic evolution of bitter taste receptor genes in vertebrates. *BMC Evol Biol* 9: 12.
- 15 31. Leuner K, Kraus M, Woelfle U, Beschmann H, Harteneck C, et al. (2011) Reduced TRPC channel expression in psoriatic keratinocytes is associated with impaired differentiation and enhanced proliferation. *PLoS One* 6: e14716.
32. Dehkordi O, Rose JE, Fatemi M, Allard JS, Balan KV, et al. (2012) Neuronal expression of bitter taste receptors and downstream signaling molecules in the rat brainstem. *Brain Res* 1475: 1-10.
- 20 33. Upadhyaya J, Pydi SP, Singh N, Aluko RE, Chelikani P (2010) Bitter taste receptor T2R1 is activated by dipeptides and tripeptides. *Biochem Biophys Res Commun* 398: 331-335.
34. Witt M, Reutter K (1996) Embryonic and early fetal development of human taste buds: a transmission electron microscopical study. *Anat Rec* 246: 507-523.
- 25 35. Muller M, Essin K, Hill K, Beschmann H, Rubant S et al. (2008) Specific TRPC6 channel activation, a novel approach to stimulate keratinocyte differentiation *J Biol.Chem.*, 283(49): 33942-54.

REIVINDICACIONES

1. Un ligando para un receptor de sabor amargo (T2R) para su uso en el tratamiento de un trastorno de la piel, en el que el ligando se administra por vía tópica a la piel, y en el que el ligando es amarogentina.
- 5 2. El ligando para su uso según la reivindicación 1, en el que el receptor de sabor amargo es el miembro 1 del receptor 2 de sabor (T2R1).
3. El ligando para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho trastorno de la piel se selecciona del grupo que consiste en prurito, urticaria, dermatitis, eccema y sus combinaciones.
- 10 4. Una composición farmacéutica para uso tópico en el tratamiento de un trastorno de la piel, que comprende un ligando para un receptor de sabor amargo como se define en la reivindicación 1, en la que dicha composición es una pomada, una loción, una crema o un gel.

Figura 1

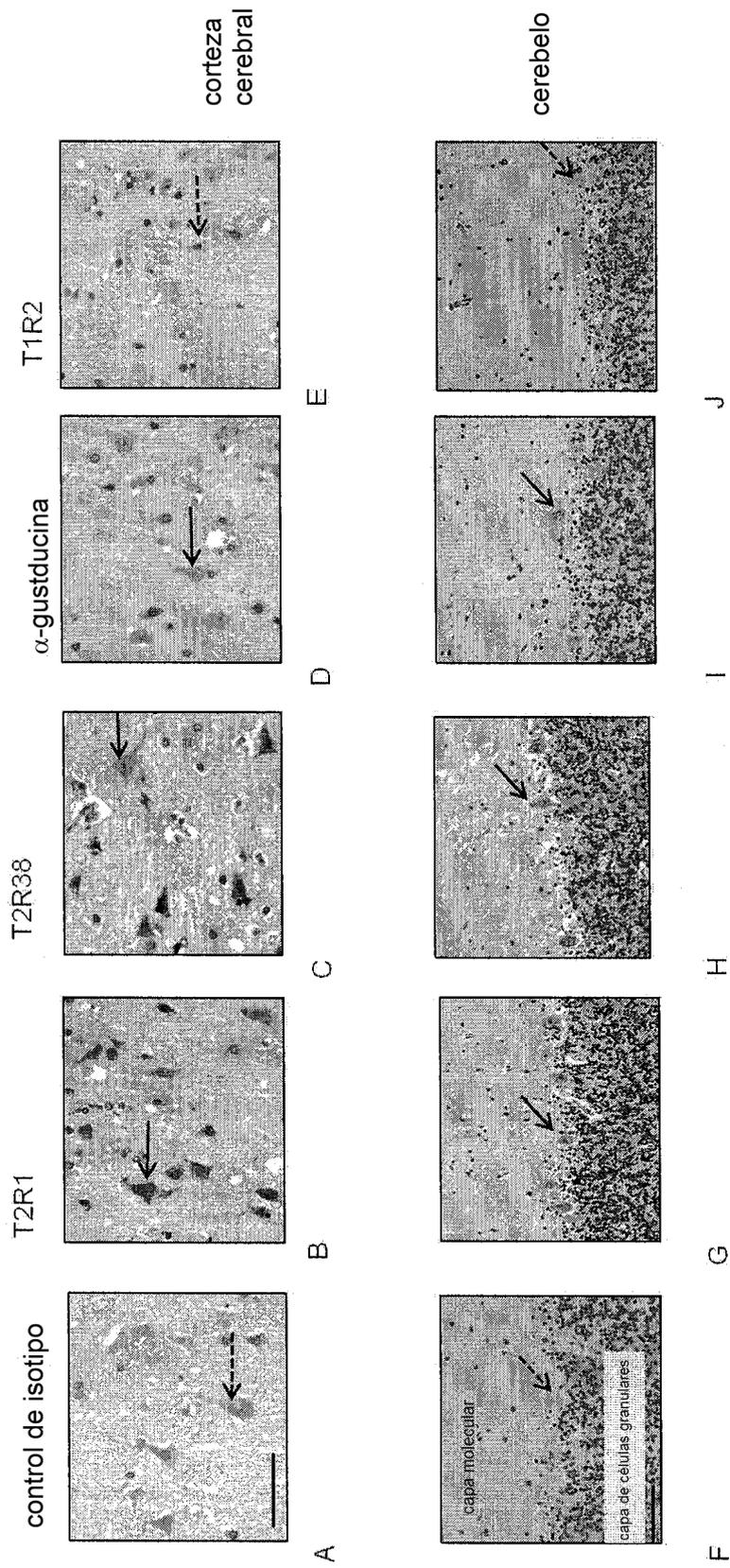


Figura 2

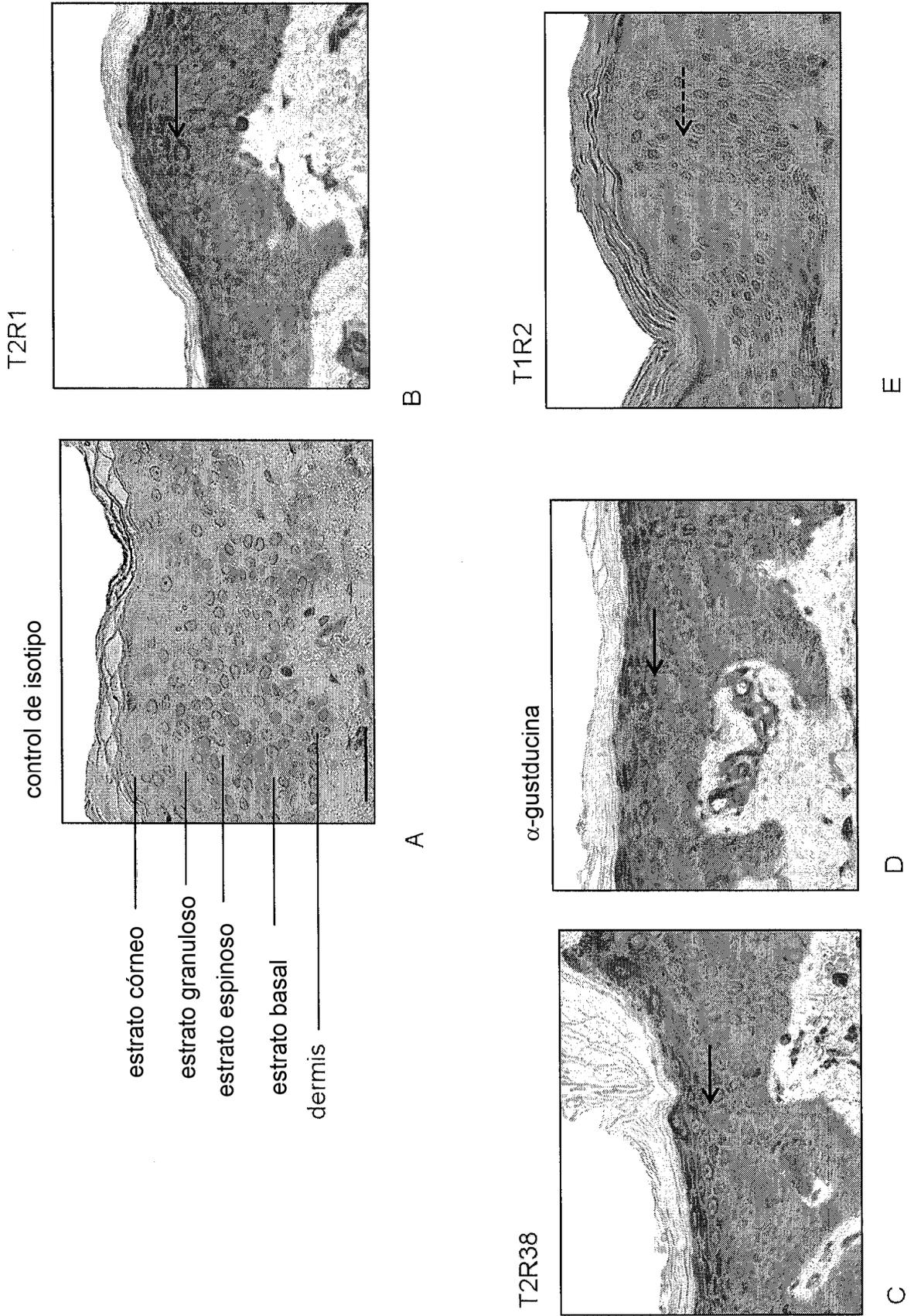


Figura 3

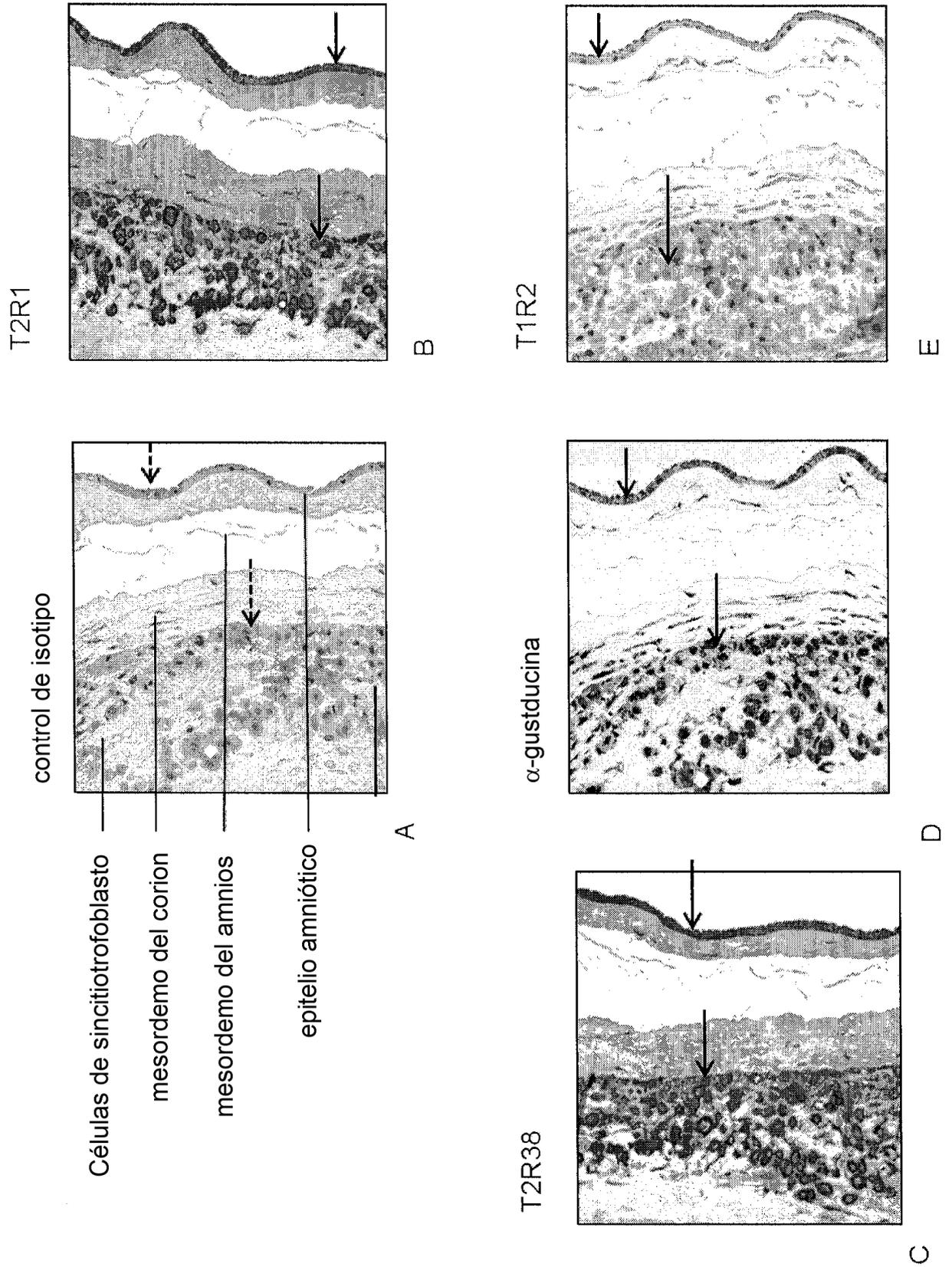


Figura 4

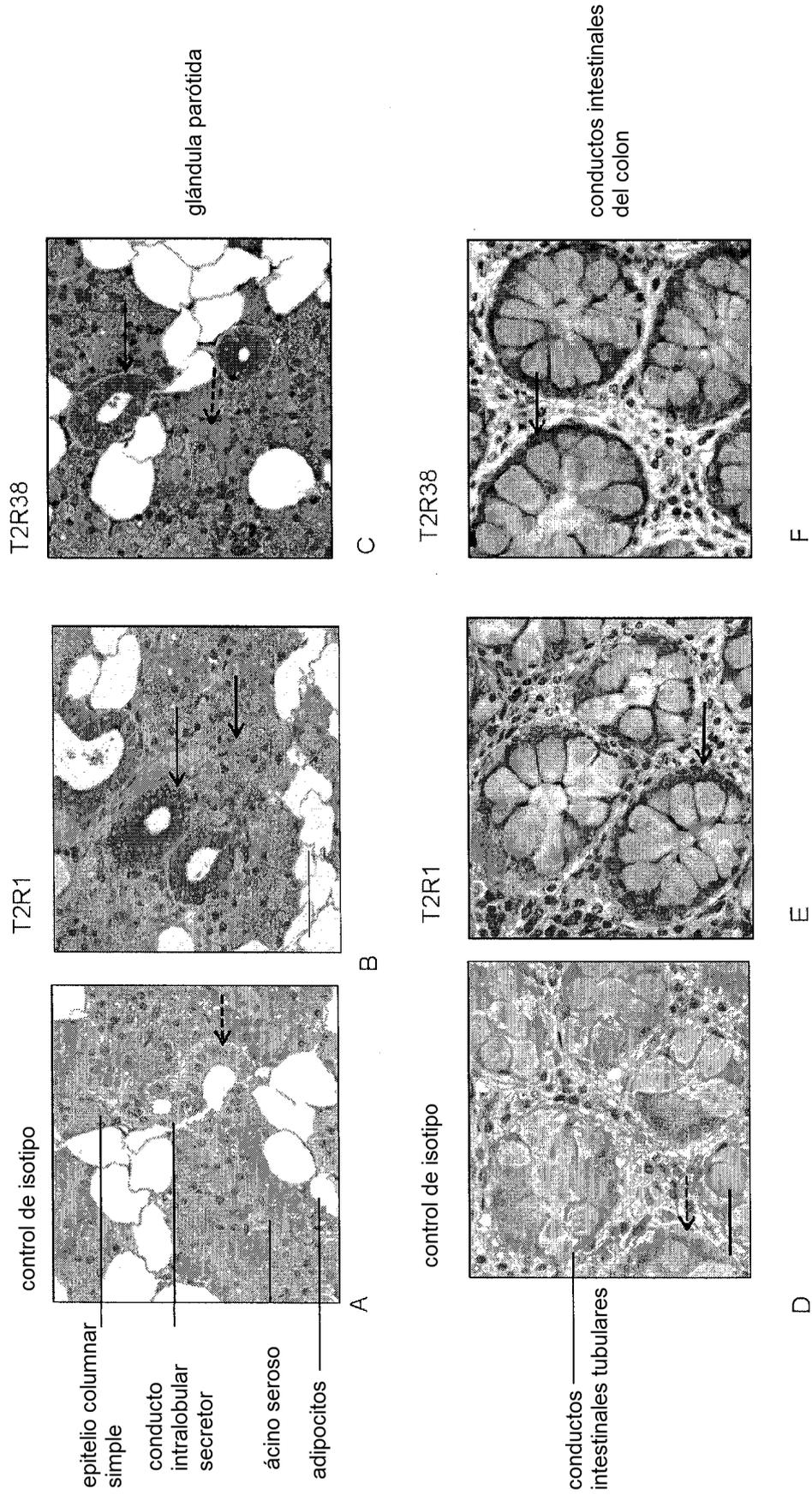


Figura 5

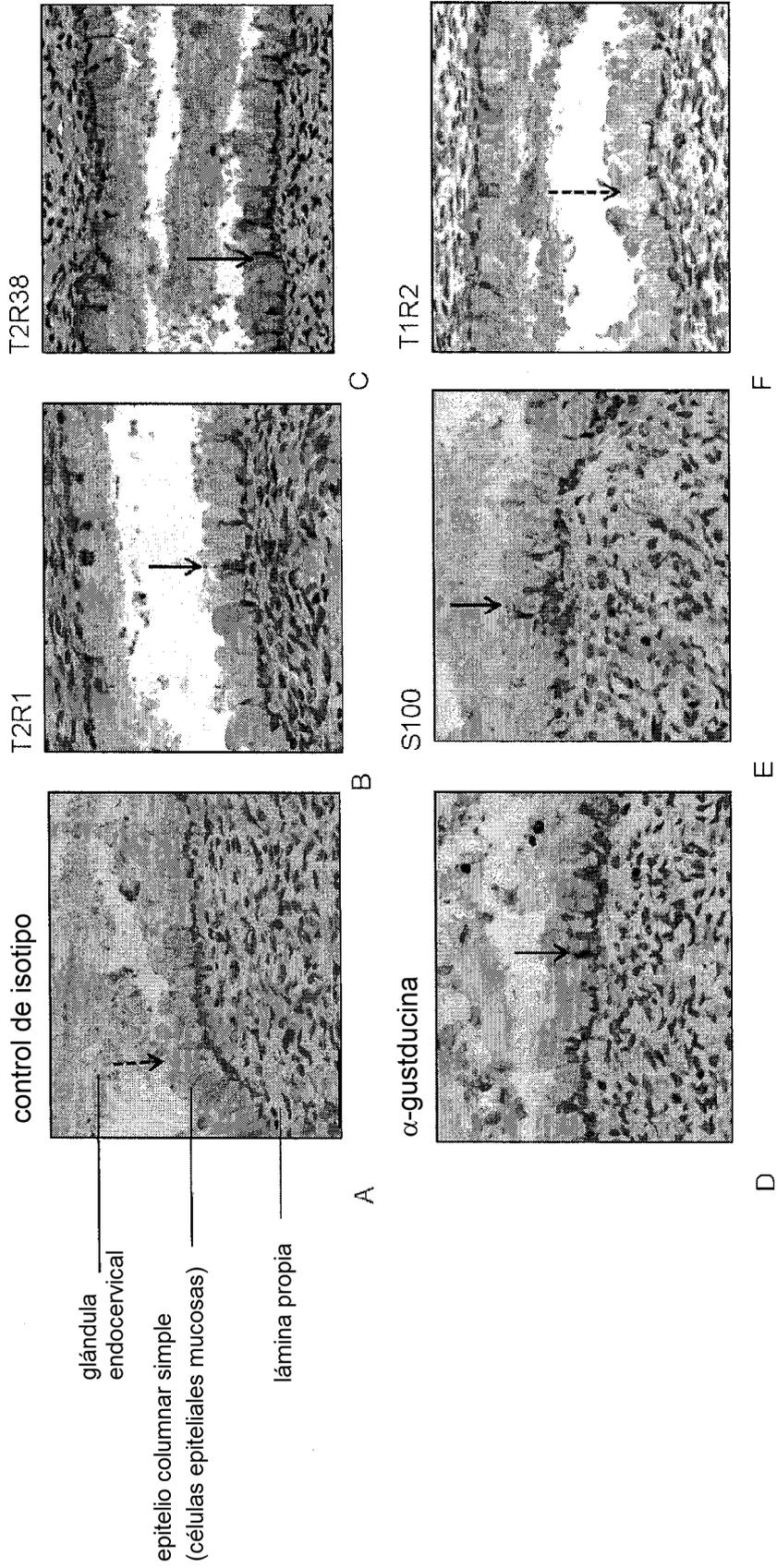


Figura 6

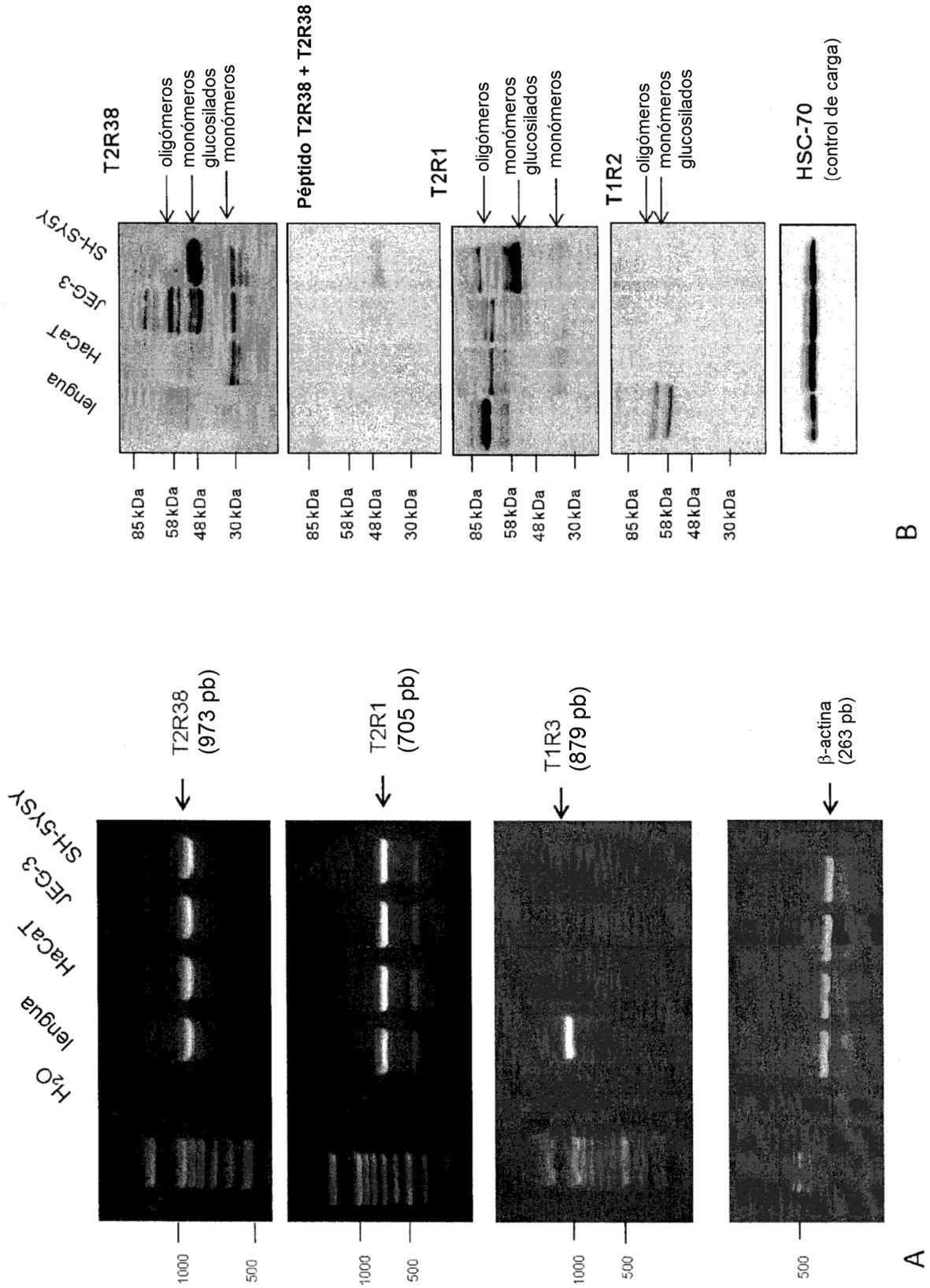


Figura 7

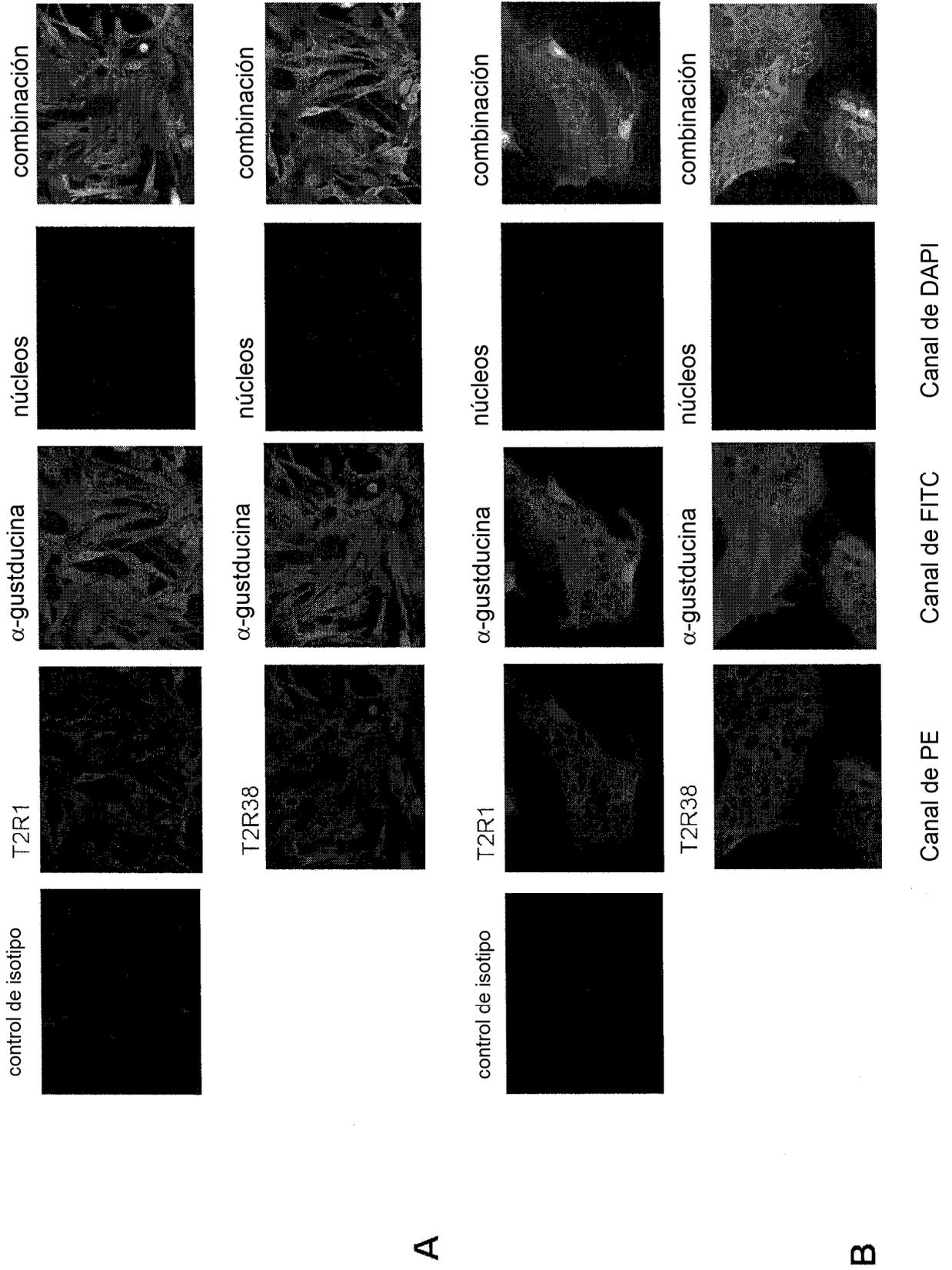
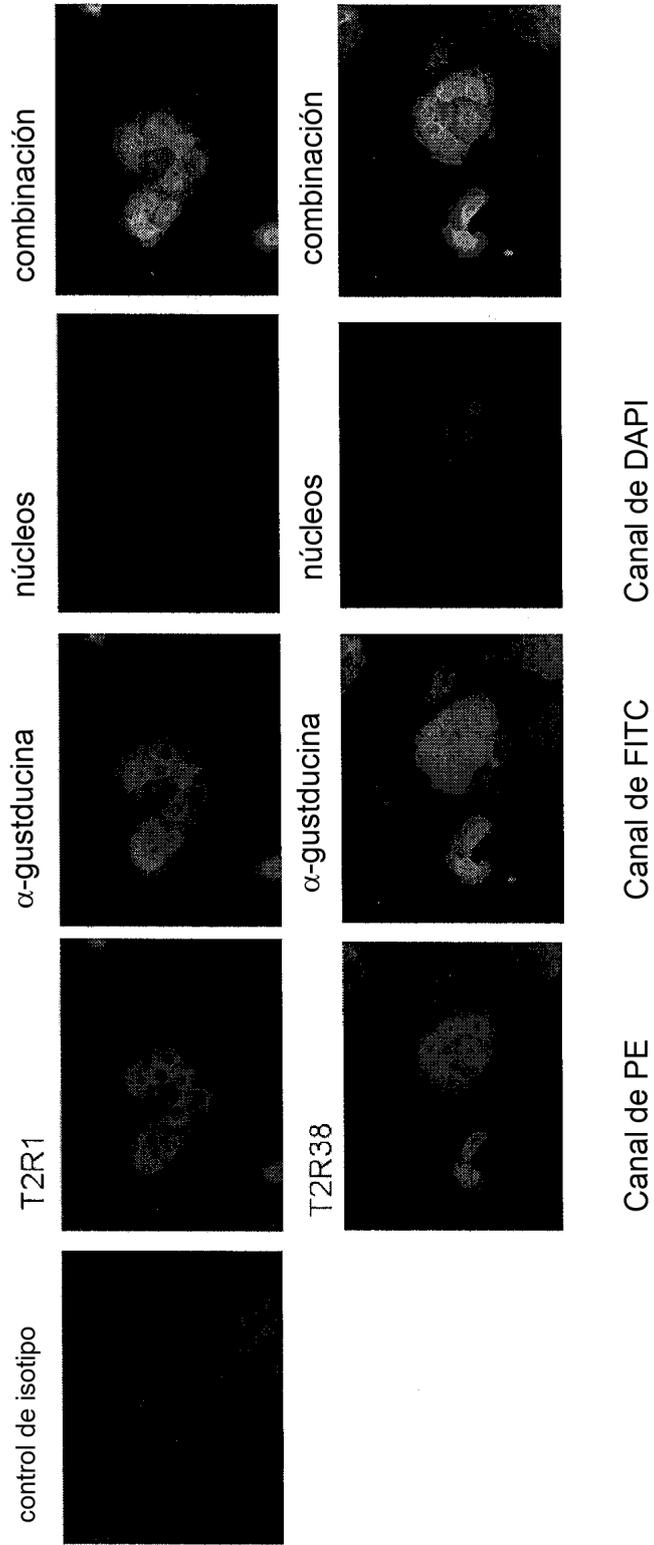


Figura 7



C

Figura 8

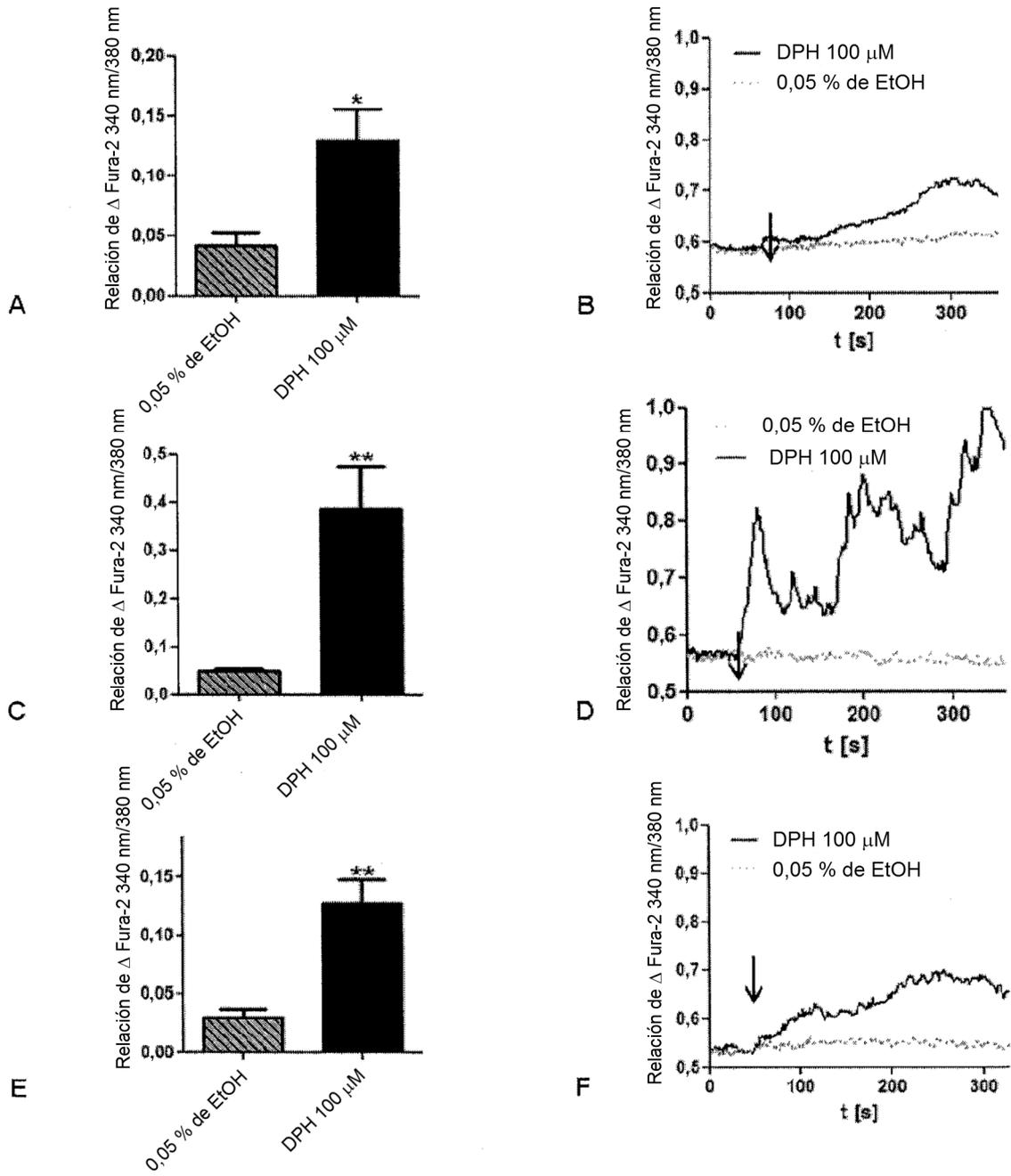


Figura 9

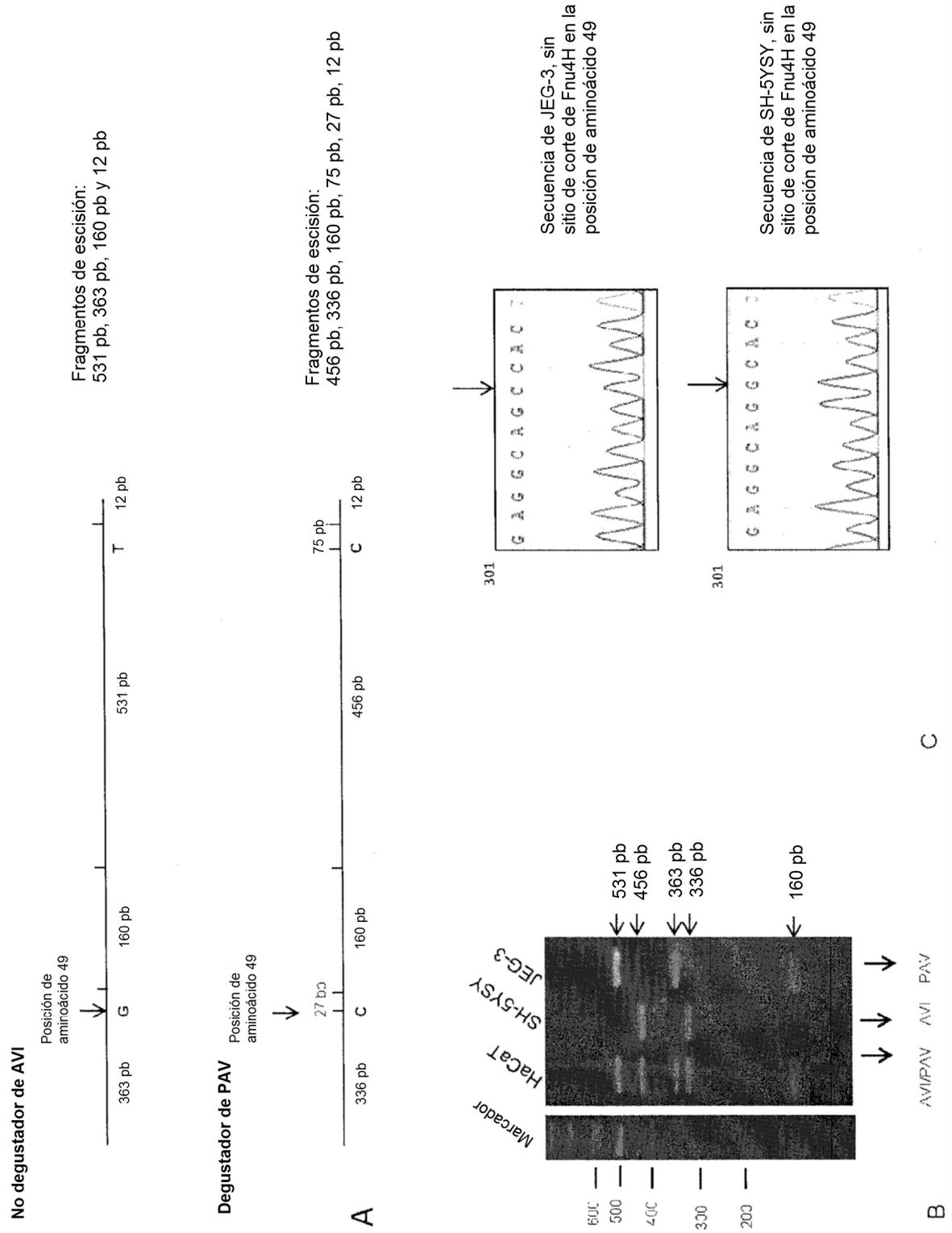


Figura 10

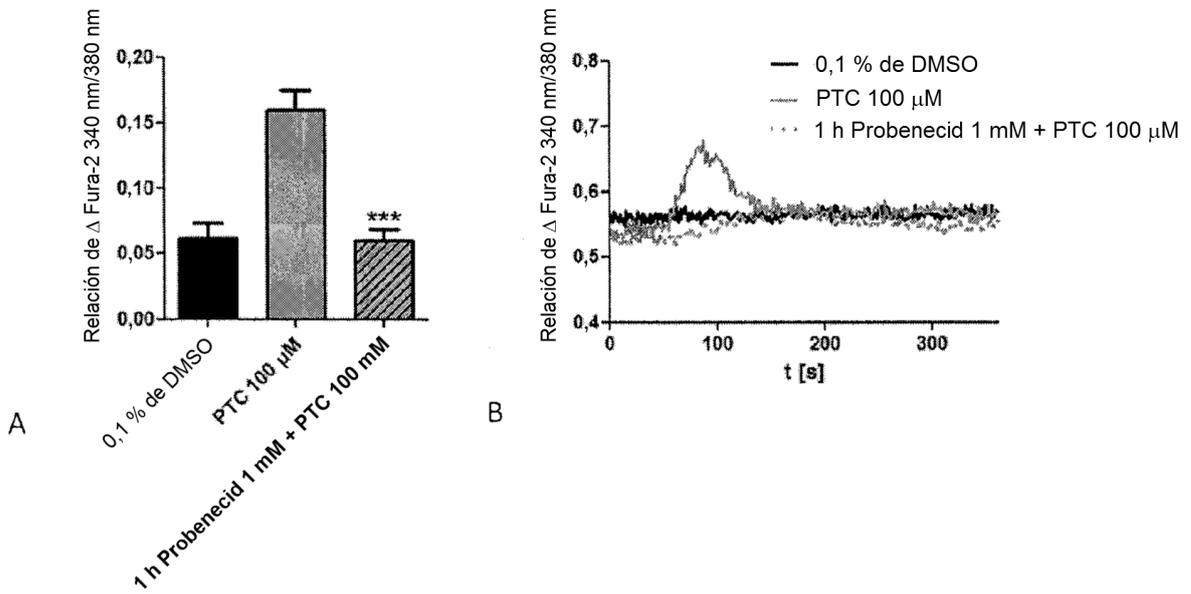


Figura 11

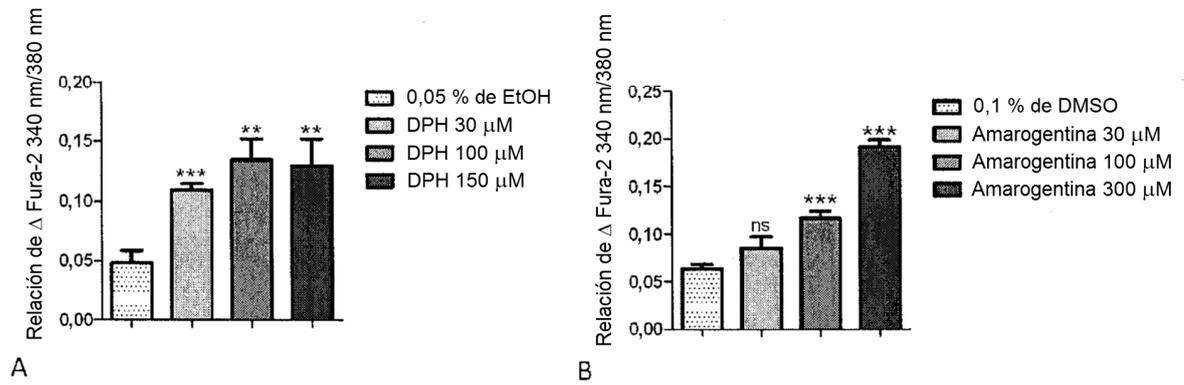


Figura 12

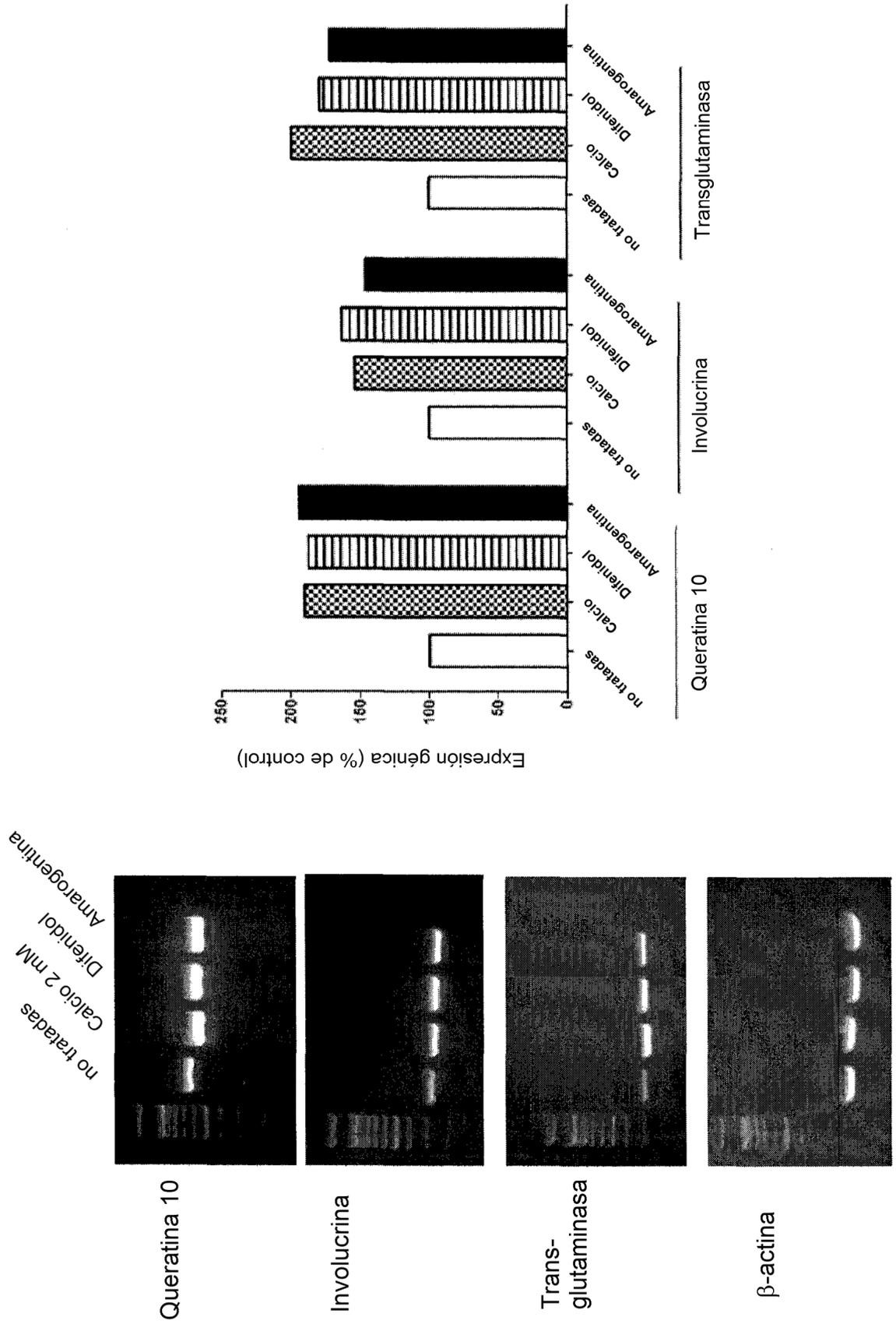


Figura 13

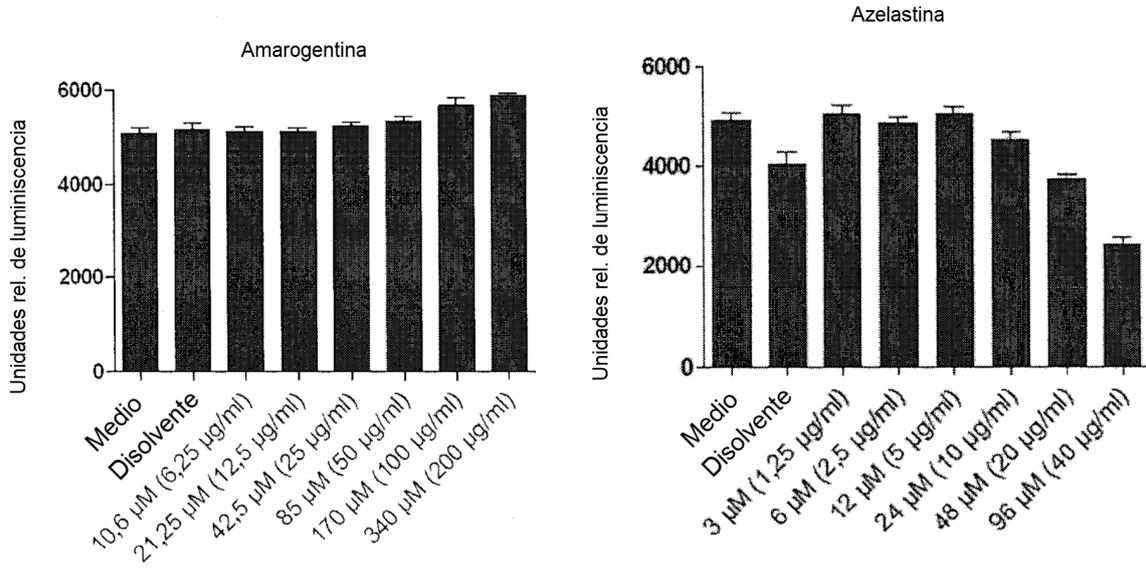


Figura 14

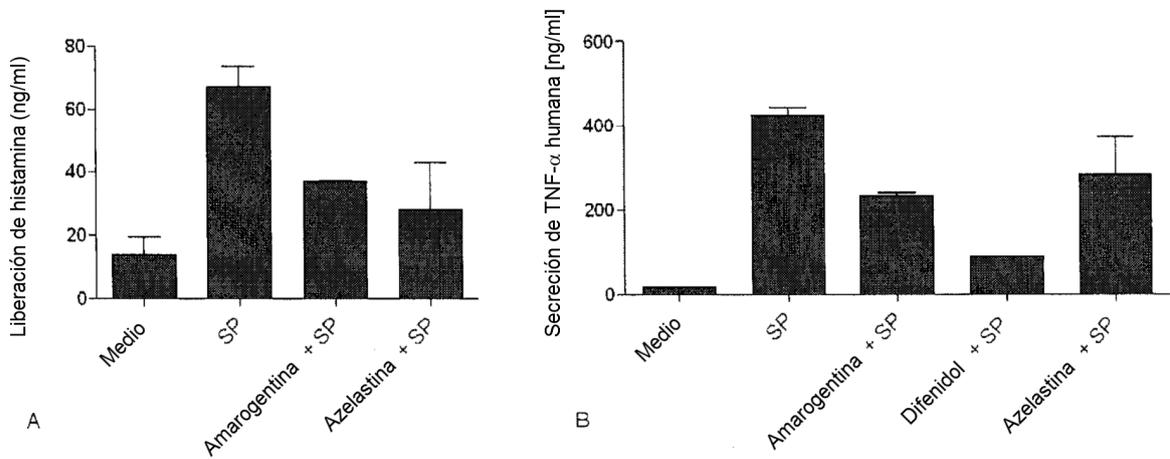


Figura 15A

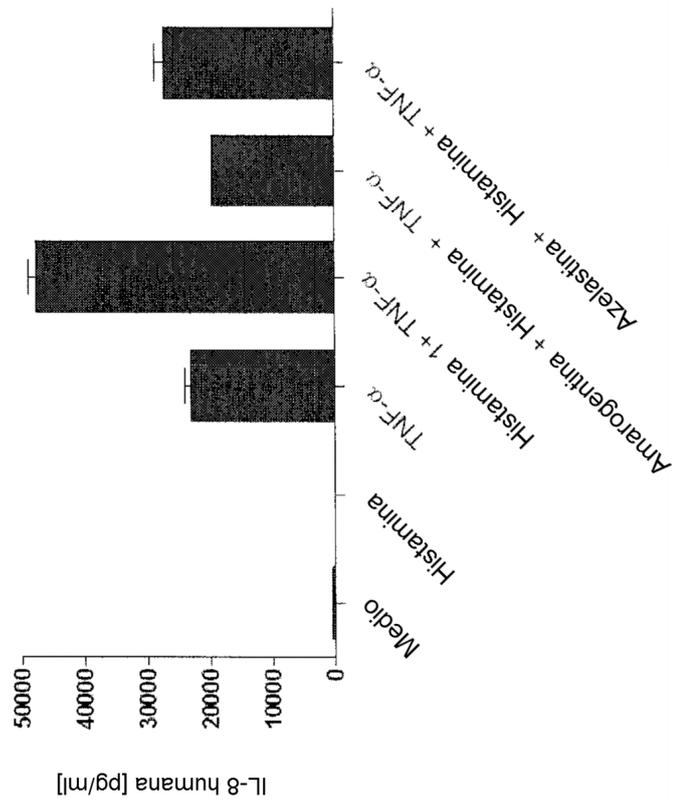
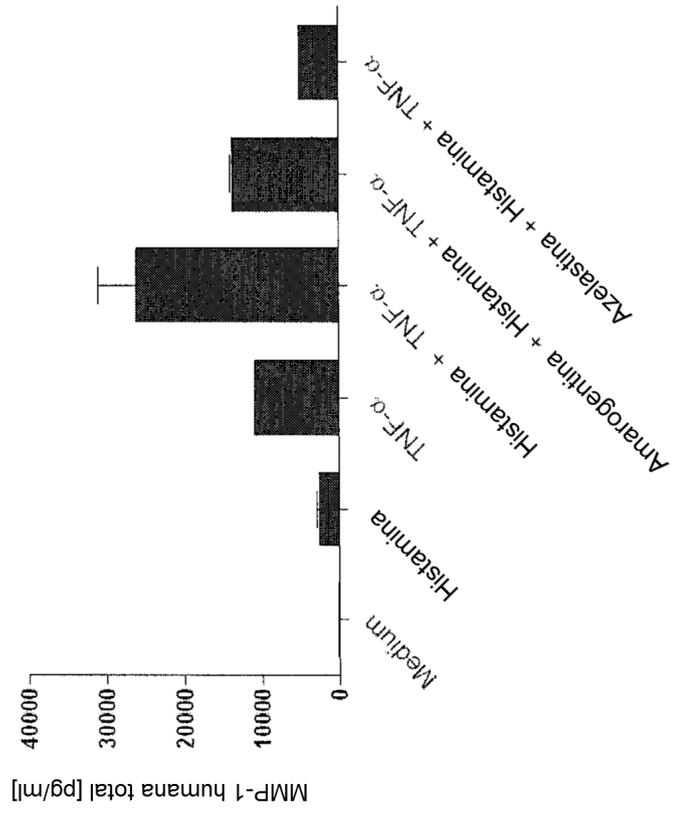


Figura 15B

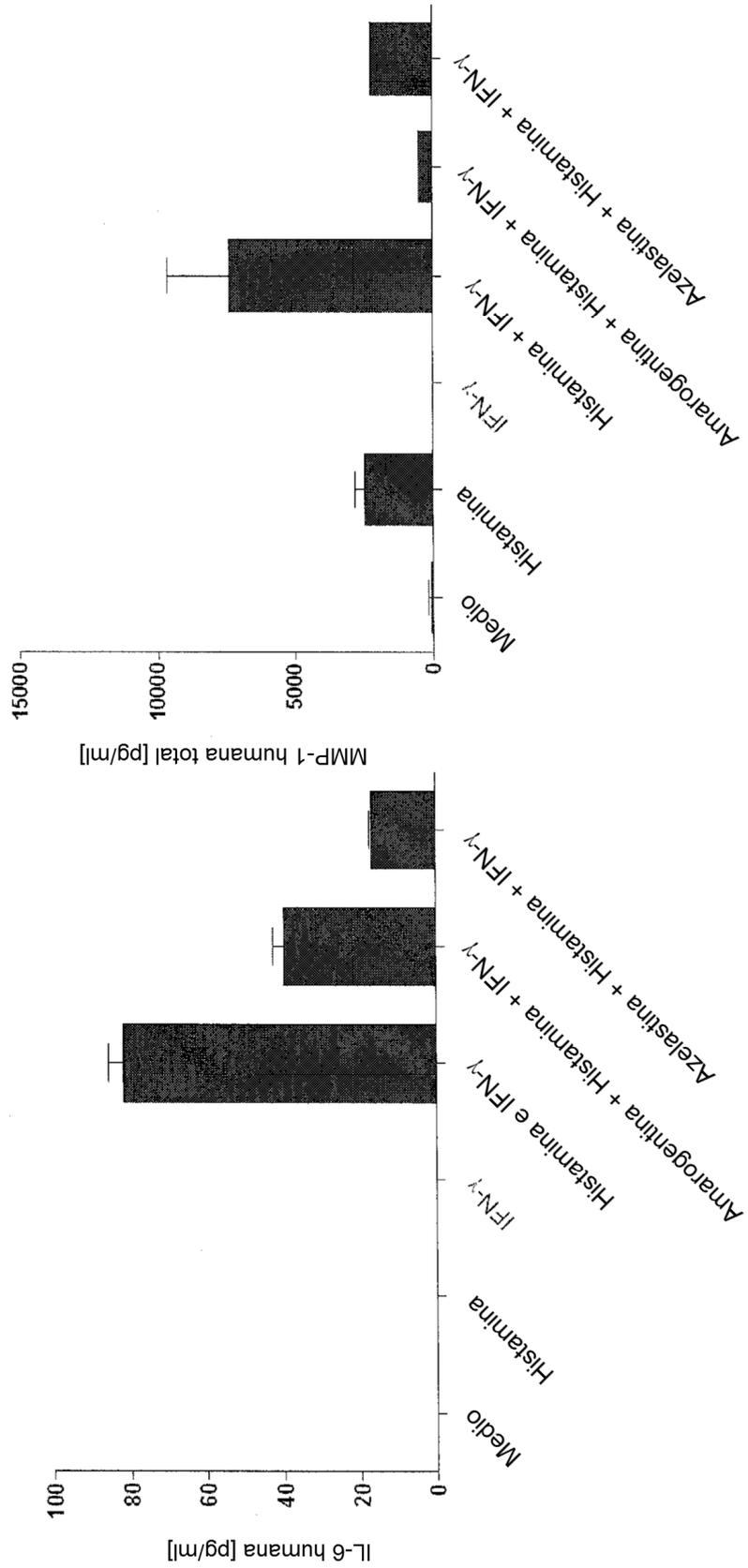


Figura 16

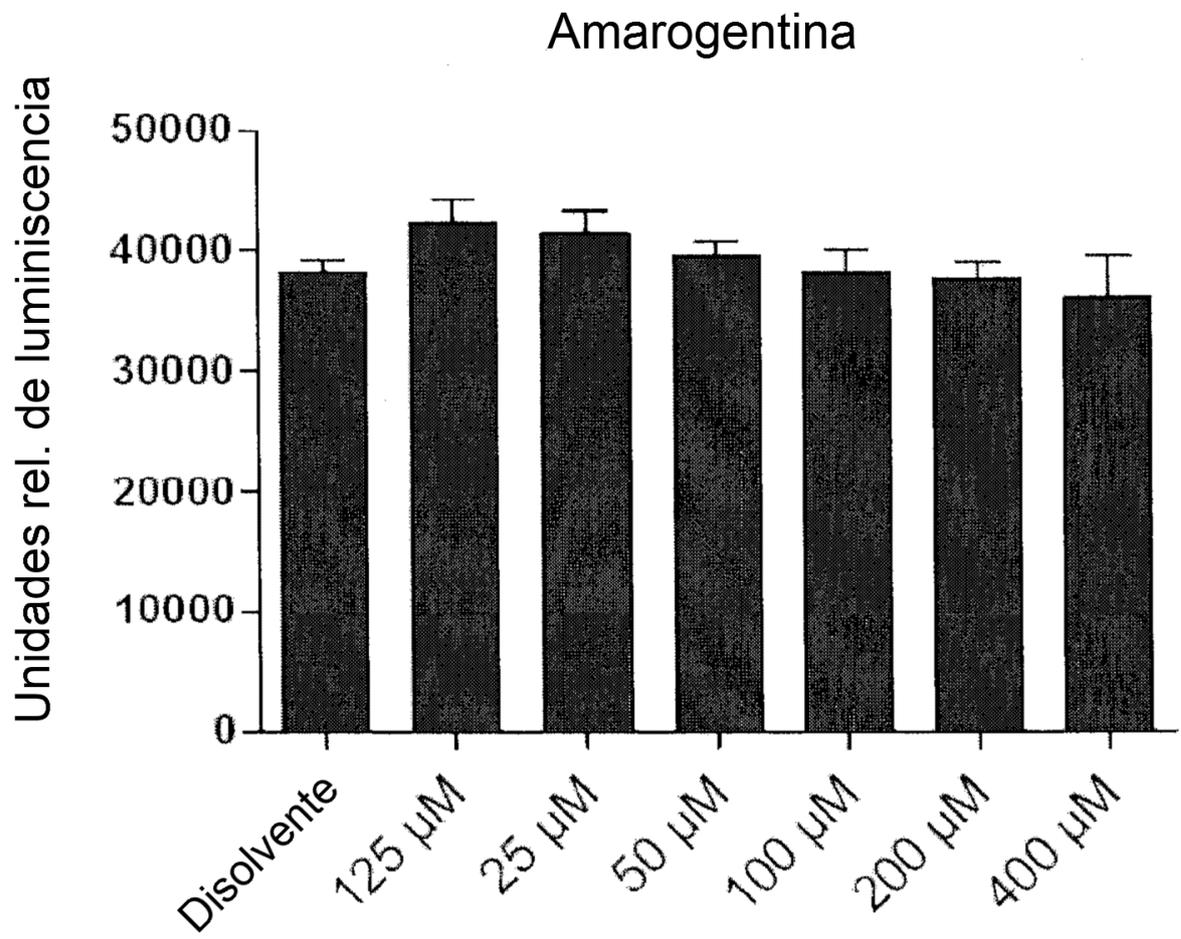


Figura 17

Hipótesis de trabajo simplificada

