

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 159**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2014** **PCT/US2014/037507**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2014** **WO14183041**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2014** **E 14794217 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020** **EP 2994482**

54 Título: **Ensayo de internalización de los receptores del sabor**

30 Prioridad:

10.05.2013 US 201361821978 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.07.2020

73 Titular/es:

PEPSICO, INC. (100.0%)
700 Anderson Hill Road
Purchase, NY 10577, US

72 Inventor/es:

KURASH, YULIYA y
GRAVINA, STEPHEN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 776 159 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

Ensayo de internalización de los receptores del sabor

5 Campo técnico

Esta divulgación se refiere generalmente a ensayos útiles para identificar moduladores de receptores del sabor.

10 El documento US 6759206 da a conocer sistemas, métodos y cribados para medir la internalización de los receptores en una etapa individual con automatización y rendimiento apropiados.

Breve descripción de los dibujos

15 Figura 1. El tratamiento con RebA induce internalización de T2R14 (ensayo de "anillo") en células NCI-H716. Tinción de inmunofluorescencia de T2R14 (ThermoFisher) en células NCIH716.

Figura 2. Porcentaje de células positivas a "anillo" tras el tratamiento con RebA (media $\pm$ DE).

20 Figuras 3A-B. Ensayo de formación de anillo, internalización de T1R2. Figura 3A, tinción de inmunofluorescencia de T1R2 (ThermoFisher) en células NCI-H716. Figura 3B, porcentaje de células positivas a "anillo" (media $\pm$ DE). El reciclaje del receptor T1R2 está relacionado con un número disminuido de células positivas a "anillo".

25 Figuras 4A-B. GLUT4 es un receptor común para edulcorantes artificiales. Figura 4A, tinción de inmunofluorescencia de GLUT4 (Sigma) en células NCI-H716. Figura 4B, porcentaje de células positivas a "anillo" (media $\pm$ DE).

Descripción detallada

1. Ensayo de internalización de los receptores del sabor ("ensayo de anillo")

30 Esta divulgación proporciona un ensayo para medir la internalización de los receptores del sabor. Este ensayo, descrito en los ejemplos específicos, más adelante, y mostrado esquemáticamente en la figura 1, es muy robusto y cuantifica con exactitud tanto la localización de T2R14 (un receptor del sabor amargo) como de T1R2 (receptor del sabor dulce), el ensayo puede usarse para identificar moléculas dulces así como bloqueantes del sabor amargo, y es particularmente bien adecuado para su uso en ensayos de alto rendimiento.

35 El ensayo de internalización dado a conocer en el presente documento, también denominado "ensayo de anillo," detecta la localización de receptores usando anticuerpos específicos para los receptores. Un primer marcador detectable, específico para ácido nucleico (por ejemplo, DAPI, Hoechst 33342, DRAQ5, DRAQ7, DRAQ9), se usa para marcar los núcleos de las células; este marcaje proporciona información tal como el número de células en un campo y diferencia entre los compartimentos nuclear (por ejemplo, positivo a DAPI) y citoplásmico (por ejemplo, negativo a DAPI). Los anticuerpos que se unen específicamente a un receptor del sabor se usan junto con anticuerpos secundarios conjugados con un segundo marcador detectable que puede diferenciarse del primer marcador detectable (por ejemplo, FITC, TRITC, Cy3, Cy5, Alexa 350, 488, 546, 555, 568, 594, 633, 647). Se observa una tinción en círculo difusa en ausencia de un estímulo (por ejemplo, en presencia de tampón solo). En presencia de un estímulo, sin embargo, se visualiza un "anillo" de receptores internalizados. En algunas realizaciones, las células positivas a anillo se calculan mediante coeficiente de correlación para valores de píxeles de las señales nucleares y de receptor. El grado de internalización puede expresarse como el porcentaje (media $\pm$ DE) de células que muestran una tinción de anillo continua a partir de múltiples puntos de datos (por ejemplo, cuádruplicados).

50 i. *Receptor del sabor dulce*

En algunas realizaciones, el ensayo de anillo se usa para detectar la internalización de, por ejemplo, T1R2, T1R3 o GLUT4. La expresión conjunta del T1R2 y el T1R3 da como resultado un receptor del sabor que responde a estímulos de sabor dulce, incluyendo edulcorantes naturales y artificiales. Se unen ligandos dulces al receptor T1R2/T1R3 y activan la transducción de la ruta de proteínas G, que incluye internalización de los receptores y movilización de calcio intracelular, así como inducción de dianas aguas abajo tales como la fosforilación de ERK1/2. Se describen receptores del sabor dulce, por ejemplo, en la patente estadounidense 7.402.400. Anticuerpos que se unen específicamente a los receptores del sabor dulce están disponibles comercialmente o pueden generarse usando métodos bien conocidos en la técnica.

ii. *Receptores del sabor amargo*

65 En algunas realizaciones, el ensayo de anillo se usa para detectar la internalización de un receptor del sabor amargo, tal como, por ejemplo, T2R1, T2R3, T2R4, T2R5, T2R7, T2R8, T2R9, T2R10, T2R13, T2R14, T2R16, T2R38, T2R39, T2R40, T2R41, T2R42, T2R43, T2R44 (T2R31), T2R45, T2R46, T2R47 (T2R30), T2R48 (T2R19),

T2R49 (T2R20), T2R50 y T2R60. La expresión de T2R14 y otros receptores del sabor amargo da como resultado un receptor del sabor que responde a estímulos del sabor amargo, incluyendo los aspectos amargos de edulcorantes naturales y artificiales. Los ligandos amargos se unen a receptores del sabor amargo y activan la transducción de la ruta de proteínas G, que incluye internalización de los receptores y movilización de calcio intracelular, así como inducción de dianas aguas abajo. Se describen receptores del sabor amargo, por ejemplo, en la patente estadounidense 7.022.488. Anticuerpos que se unen específicamente a los receptores del sabor amargo están disponibles comercialmente o pueden generarse usando métodos bien conocidos en la técnica.

iii. Compuestos de prueba

Los compuestos de prueba pueden ser naturales o producidos sintéticamente. Las proteínas, polipéptidos, péptidos, polisacáridos y moléculas pequeñas son ejemplos de compuestos de prueba que pueden cribarse usando métodos dados a conocer en el presente documento.

iv. Células

Puede usarse en un ensayo de anillo cualquier célula que comprende o puede manipularse mediante ingeniería genética para que comprenda un receptor del sabor funcional. En algunas realizaciones, se usan células NCI-H716 (n.º de catálogo de ATCC CCL-251). Estas células expresan los receptores del sabor amargo T2R1, T2R3, T2R4, T2R5, T2R7, T2R8, T2R9, T2R10, T2R13, T2R14, T2R16, T2R38, T2R39, T2R40, T2R41, T2R42, T2R43, T2R44 (T2R31), T2R45, T2R46, T2R47 (T2R30), T2R48 (T2R19), T2R49 (T2R20), T2R50 y T2R60, el receptor del sabor dulce T1R2/T1R3, α -gustducina y el transportador de glucosa GLUT4. Otras células pueden manipularse mediante ingeniería genética para expresar T2R14, T1R2/T1R3, α -gustducina y/o GLUT4 usando métodos bien conocidos en la técnica. GLUT4 se describe, entre otros, en la patente estadounidense 7.799.538 y las referencias citadas en ella. Véase la patente estadounidense 8.338.115 y las referencias citadas en ella y Adler *et al.*, Cell 100, 693-702, 2000 para descripciones de α -gustducina.

Otras células que pueden usarse en el ensayo dado a conocer incluyen, pero no se limitan a, 1A2, ARH-77, RWPE-1, WI-38, EJM, NCI-H1155, L-1236, NCI-H526, JM1, SHP-77, SNU-878, NCI-H2196, C3A, CA46, SNU-466, KS-1, SNU-738, MOLP-2, HDLM-2, Pfeiffer, HCC-15, células de Alexander, L-540, KMS-12-BM, JK-1, NCIH1092, SW 1990, NCI-H1184, SU-DHL-1, Hep 3B2.1-7, P3HR-1, NCI-H2029, SU-DHL-5, SNU-1, MOLP-8, SUPM2, MONO-MAC-1, SNU-1040, KYM-1, HEC-59, HCC1569, OCI-LY3, Hs 819.T, DU4475, CI-1, S-117, OVCAR-8, SNU-626, HL-60, SUIT-2, T3M-4, RKO, MOR/CPR, DK-MG, GA-10, OCUM-1, HCT-15, HT, MONO-MAC-6, G-402, Toledo, COV362, SU-DHL-8, Daoy, NCI-H1435, LS513, Hs 839.T, Hs 172.T, BT-483, KMS-21BM, AGS, NCI-H2172, LC-1/sq-SF, SNU-201, NUGC-4, SK-HEP-1, SUP-B15, SNU-5, HT-1197, SUP-T1, AMO-1, KU812, AN3 CA, AML-193, VMRC-RCW, HLE, HuH28, Hs 751.T, NCI-H2110, MEG-01, MV-4-11, Hep G2, KYSE-30, KALS-1, BICR 6, RMUG-S, JHH-6, Ki-JK, IST-MES1, HCC-95, HPB-ALL, HSC-3, 697, LOU-NH91, KARPAS-299, GI-1, COLO 792, SK-N-FI, D341 Med, HGC-27, SR-786, COLO-818, MHH-CALL-2, SF126, NCI-H322, A-253, NCI-H1623, MCF7, HCC-44, FU97, OCI-LY-19, Hs 766T, NCI-H522, RL, HCC1428, RPMI 6666, U-937, NCI-H460, SW 1088, NCI-H1792, NCIH1693, UACC-257, JHUEM-2, HuT 78, UACC-893, NCIH929, A-704, OV56, LN-229, OE19, SK-MEL-24, RDES, NCI-H211, KCI-MOH1, NCI-H1963, Hs 706.T, Cha-Go-K-1, EPLC-272H, OPM-2, KHM-1B, A549, HuG1-N, NCI-H508, MHH-CALL-3, SNU-1076, A3/KAW, MELHO, TO 175.T, Caki-1, Hs 936.T, SK-LU-1, WM-983B, K-562, EFE-184, SNU-520, NCI-H2291, HCC-1195, ABC-1, KE-39, NH-6, HCC2218, CMK, RS4;11, KYSE-450, OV7, KYSE-510, SK-UT-1, SNU-C1, OE33, P12-ICHIKAWA, DLD-1, COV434, HuNS1, SNU-899, SW480, COLO-678, LU99, KOPN-8, NCI-H2227, SW1463, Hs 675.T, JHH-4, NCI-H1703, HEC-1-A, BDCM, MIA PaCa-2, PC-3, TE-15, PK-45H, MKN-45, HCC-366, CAL-29, HEC-50B, CPC-N, KMRC-20, SW1116, EOL-1, COLO 205, EHEB, YD-38, MC116, SK-N-BE(2), BV-173, NCI-H2347, LU65, RT4, U-87 MG, LK-2, KP-NYN, HEC-251, NCI-H1651, GP2d, RERF-LC-MS, NB-4, NCI-H2286, SNU-61, T-47D, huH-1, KYSE-180, ST486, SW 1353, M-07e, KASUMI-1, YH-13, NCI-H28, GAMG, JeKo-1, GOS-3, SNU-324, PA-TU-8902, MFE-280, SNU-245, NALM-1, RERF-LC-Sq1, BICR 22, ZR-75-1, COR-L23, SW579, COR-L88, KM12, Hs 611.T, OUMS-23, RERF-LC-Ad1, NCI-H1385, SK-LMS-1, COLO-320, BL-70, GRANTA-519, MCAS, Panc 08.13, AM-38, KMS-11, SIG-M5, SNU-407, JHOS-2, OVCAR-4, Set-2, OV-90, MeWo, HEL, HT-29, MDA-MB-231, TOV-21G, NCIH1355, KMS-27, NALM-6, KMS-26, Caov-4, KASUMI-2, UACC-62, U266B1, Hs 695T, HT55, BICR 31, TCCPAN2, KMS-20, Hs 578T, RI-1, Hs 606.T, NCI-H1341, THP-1, BCP-1, Hs 737.T, SW1417, MOLT-4, Raji, ESS-1, MEL-JUSO, SH-10-TC, Hs 683, ME-1, EB2, PLC/PRF/5, NCI-H1339, A4/Fuk, SEM, HEC-265, ISTMES2, KE-97, NCI-H1437, COLO-704, NCI-H1915, TE-5, NCI-H2023, NCI-H82, T1-73, SNU-840, HuT 102, NCIH1944, KYSE-520, Kasumi-6, 1321N1, Hs 742.T, IM95, PL45, CL-40, WM1799, KMM-1, SNU-449, JHUEM-1, KARPAS-620, Loucy, SNU-1079, Daudi, HCC-56, HSC-2, COR-L47, PA-TU-8988S, OAW28, COR-L311, L-363, Malme-3M, NOMO-1, Hs 870.T, SU-DHL-10, Hs 229.T, NCI-H810, KYSE-410, RPMI-8402, SNU-175, EBC-1, RVH-421, K029AX, PA-TU-8988T, LXF-289, OVSAHO, CAL-12T, Hs 940.T, MM1-S, SUP-HD1, LNCaP clon FGC, HSC-4, NU-DHL-1, NCI-H2228, BEN, CAL-78, Sq-1, NCI-H1793, SNU-C2A, MDA-MB-134-VI, COV318, KE-37, TYK-nu, MOTN-1, T98G, SW837, EB1, Becker, PE/CA-PJ34 (clon C12), Hs 616.T, NCI-H446, WM-88, CHP-126, Calu-1, SNU-283, NCI-H1573, SW 1271, SNU-16, JHOS-4, ACHN, Calu-3, KMRC-1, SW 1783, TE-11, TE-9, HuH-6, P31/FUJ, HT-1376, NCI-H520, 786-O, KNS-60, Caki-2, OVK18, PL-21, NCI-H2452, JURL-MK1, DIEZ, JHH-7, MDA-MB-157, Calu-6, RKN, NUGC-2, ONS-76, J82, OUMS-27, SNU-1196, Hs 739.T, RPMI-7951, NCI-H854, JHH-5, JVM-2, Hey-A8, 5637, KYSE-140, Capan-2, KYSE-150, HEC-1-B, BICR 16, HEL 92.1.7, MHH-NB-11, SNU-387, SK-OV-3, SKMEL-28, IGROV1, ML-1, HLF-a, CHL-1, YKG1, A-204, OCI-M1, 8505C, JVM-3, NCI-H647, DB, COLO-800,

PK-59, FaDu, HLF, OVMANA, EFO-27, PF-382, NCI-H747, LS123, SU-DHL-6, SJRH30, PANC-1, NCI-H2342, KMH2, DND-41, HH, HuCCT1, F-36P, DMS 454, Hs 274.T, AU565, NCI-H1666, EN, RH-41, NCI-H1373, NCI-H838, SK-MEL-30, MOLM-6, DEL, NCI-H226, NCI-H1648, NCI-H661, 143B, Mino, C32, KMS-34, NCI-H1694, SKES-1, UACC-812, GDM-1, NCI-H23, Panc 02,03, CCFSTTG1, LOX IMVI, SJSA-1, MDST8, PK-1, NCI-H716, SU-DHL-4, MPP 89, MJ, COLO 829, PE/CA-PJ15, HDMY-Z, BxPC-3, WM-793, COLO 668, T84, JHOM-1, PEER, LS411N, GMS-10, KMBC-2, RMG-I, KELLY, SNU-761, NALM-19, HEC-151, G-361, OVTOKO, A-498, SW 900, LCLC-103H, FTC-133, QGP-1, Reh, CMK-11-5, NU-DUL-1, BT-20, Hs 600.T, Hs 604.T, KATO III, SNU-410, NCI-H2126, SK-MEL-5, MDA-MB-468, AsPC-1, HUP-T3, KP-N-SI9s, L-428, SNU-1105, HUP-T4, 769-P, LMSU, NCI-H1869, NCO2, MOLM-16, CAL 27, HCC70, NCI-H1930, COV644, Hs 863.T, HCC-2279, D283 Med, Hs 944.T, HCC1599, MDA-MB-415, HCC2157, NCI-H1618, SNU-308, HCC1954, DMS 153, HPAF-II, T24, CJM, VM-CUB1, UM-UC-3, LAMA-84, NCI-H1734, JHH-2, VMRC-RCZ, MFE-319, MDA-MB-453, SNU-503, TOV-112D, B-CPAP, GSU, HCC-78, NCI-H2171, CAMA-1, HEC-108, HCC4006, CAL-85-1, NCI-H2122, COLO-699, NCI-H196, LUDLU-1, SW 780, RPMI 8226, LP-1, PC-14, HuTu 80, T.T, SW948, 22Rv1, HARA, NCI-H596, IPC-298, SCaBER, NCI-H1838, NB-1, Hs 934.T, Hs 895.T, DMS 114, KYSE-70, KP-3, KP4, DAN-G, NCI-H2009, OC 316, SCC-25, U-138 MG, RCC10RGB, MFE-296, NCI-H1755, RERF-LC-KJ, 8305C, WSU-DLCL2, ES-2, MSTO-211H, SCC-15, ZR-75-30, PSN1, SNU-423, NCI-H2106, TE-1, UT-7, KMS-28BM, NCI-H2081, SK-MM-2, COLO 741, OC 314, HCC1395, MOLT-13, LN-18, Panc 10,05, PE/CA-PJ41 (clon D2), Hs 746T, CW-2, SKM-1, NUGC-3, TE-10, NCI-H358, NCI-H69, BFTC-909, HOS, BICR 18, NCIH1395, OVKATE, Hs 698.T, EFM-19, COLO-783, MHHCALL-4, ACC-MESO-1, NCI-H1436, KP-N-RT-BM-1, SK-MEL-31, NCI-H1105, CAL-51, YD-15, NCI-H2085, NCI-H2444, HCC1187, Hs 939.T, CAL-120, SCC-9, TUHR14TKB, KMRC-2, KG-1-C, ECC10, CGTH-W-1, NCI-H841, C2BBE1, SUP-T11, RCH-ACV, CADO-ES1, JURKAT, 647-V, SK-MEL-2, MDA-MB-175-VII, MKN74, SNU-C4, LCLC-97TM1, SCC-4, BHY, IGR-37, KYO-1, Hs 281.T, TT, TUHR4TKB, HT-1080, NCI-H660, TE 441.T, LS1034, KNS-42, Panc 04,03, HCC1419, AZ-521, SNG-M, NCI-N87, G-292, clon A141B1, KPL-1, MDA-MB-361, CL-14, NCI-H2170, HuH-7, RD, NCIH2066, IGR-1, TE-14, VCaP, BL-41, SNU-620, SK-MES-1, MEC-2, NCI-H1299, IGR-39, RT112/84, SF-295, DV-90, A2780, BICR 56, NCI-H510, NCI-H2141, YD-8, NCIH2405, TF-1, MEC-1, CCK-81, NCI-H1048, Hs 822.T, NCI-H2052, KO52, CAL-54, Hs 840.T, SW620, SK-CO-1, BT-474, CL-11, KNS-62, NCI-H1650, G-401, MOLT-16, SNU-398, COLO-680N, EM-2, Hs 294T, CAL-62, KMRC-3, A101D, KG-1, BT-549, HT115, A-375, SW-1710, WM-115, KLE, JHUEM-3, MKN7, CHP-212, HCC202, BC-3C, NCI-H1568, KMS-18, PE/CA-PJ49, COLO-849, SIMA, OCI-AML3, GSS, EC-GI-10, EFO-21, RCM-1, DMS 273, KU-19-19, RERF-GC-1B, SH-4, SKMEL-3, RERF-LC-Ad2, M059K, JHOM-2B, MDA PCa 2b, Hs 852.T, RL95-2, Panc 03,27, SNU-216, Panc 02,13, CFPAC-1, SK-N-SH, OCI-AML2, LoVo, SBC-5, NCI-H1876, NCI-H441, SK-N-AS, COR-L24, HCC38, NCI-H1781, DOHH-2, NCI-H1563, U-251 MG, HPAC, JIMT-1, U-2 OS, A-673, TC-71, NCI-H650, NIH:OVCA-3, CAS-1, JL-1, SK-MEL-1, MDA-MB-435S, Ishikawa (Heraklio) 02 ER-, TE 617.T, SU.86.86, RERF-LC-AI, TT2609-C02, LS 180, YAPC, HDQ-P1, KNS-81, FU-OV-1, KP-2, DMS 53, SNU-1272, Detroit 562, 42-MG-BA, L3,3, COLO-679, NCI-H2087, NCI-H2030, GCT, NCIH889, Caov-3, MDA-MB-436, NCI-H524, MKN1, KCL-22, Capan-1, CML-T1, H4, NCI-H727, Hs 343.T, MHHES-1, NMC-G1, HCC-1171, REC-1, Hs 618.T, A172, YD-10B, SW48, MUTZ-5, TE-6, JHH-1, HCT 116, TE-4, IALM, MG-63, NCI-H1975, TALL-1, HCC1806, HMCB, SCLC-21H, HCC1500, CL-34, Panc 05,04, SW403, TM-31, HCC1937, JMSU-1, DMS 79, SNB-19, NCI-H1836, Li-7, HCC827, 639-V, MOLM-13, SK-BR-3, IMR-32, TUHR10TKB, OAW42, SK-N-MC, TGBC11TKB, NCIH1581, EFM-192A, YMB-1, HCC2935, ECC12, HCC-33, DU 145, NCI-H146, SNU-1214, SNU-1077, 23132/87, HT-144, SNU-182, Hs 888.T, SNU-475, GCIY, Hs 729, JHOC-5, SW 1573, HEC-6, OCI-AML5, Hs 688(A).T, Hs 821.T, PCM6, RT-112, SK-N-DZ, SNU-478, SNU-119, HCC1143, NCI-H209, 8-MG-BA, COR-L105, COR-L95, SNU-46, COV504, CAL-148, SNU-C5, DBTRG-05MG, BHT-101, WM-266-4, BFTC-905, KYSE-270, TE-8, SNU-213, U2-OS y SH-SY5Y.

2. Ensayos de anillo que usan células NCI-H716

En algunas realizaciones, se usan células NCI-H716 para detectar respuestas celulares a bloqueantes del sabor amargo potenciales. Las células NCI-H716 se ponen en contacto con un compuesto de prueba. La internalización de un receptor del sabor amargo en presencia del compuesto de prueba indica que el compuesto de prueba es un modulador potencial del sabor amargo. Los moduladores del sabor amargo pueden incluirse en diversos bienes consumibles, incluyendo alimentos, bebidas y productos farmacéuticos.

En algunas realizaciones, las células NCI-H716 se usan para detectar respuestas celulares a saborizantes dulces (por ejemplo, moléculas que provocan por sí mismas un sabor dulce o que potencian un sabor dulce). Las células NCI-H716 se ponen en contacto con un compuesto de prueba. La internalización de T1R2 indica que el compuesto de prueba es una molécula dulce. Las moléculas dulces pueden incluirse en diversos bienes consumibles, incluyendo alimentos, bebidas y productos farmacéuticos.

Ejemplo 1

Ensayo de obtención de imágenes de alto contenido para internalización de T2R14

Cultivo celular, materiales. Se cultivaron células NCI-H716 en medios RPMI1690 suplementados con suero bovino fetal al 10%. Se sembraron células a una densidad de 20.000 células/pocillo en placas de 384 pocillos recubiertas de PDL. Los anticuerpos de conejo anti-T2R14 y los anticuerpos de conejo anti-T1R2 eran de ThermoFisher. Los anticuerpos conjugados con Alexa 488 y Hoechst 33342, eran de Life Technology.

Tratamiento de compuestos. Se sembraron en placa 20.000 células en PBS + FBS al 10% en placas de 384 pocillos de paredes negras, recubiertas de PDL, de fondo transparente adecuadas para obtención de imágenes de HCA. Para estudios de T2R14, se añadieron compuestos a las células. Se diluyeron disoluciones madre de todos los compuestos en dimetilsulfóxido (DMSO) y se usaron a 10 mM. Los grupos control de células recibieron también DMSO (al 0,1%) en el medio.

Ensayos de anillo. Se estimularon células NCI-H716 con RebA (Purecircle) a 10 mM para indicar puntos temporales a 37°C. Se fijaron y procesaron entonces las células para inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos contra el receptor del sabor amargo T2R14. Se adquirieron todas las imágenes con un objetivo 20x usando microscopio automatizado ImageXpress Micro. La tinción de Hoechst 33342 es un pseudo-coloreado en azul y la tinción específica de anticuerpo es un pseudo-coloreado en verde. Las imágenes superpuestas indican una tinción en círculo difusa tras el tratamiento con tampón; el tratamiento de células NCI-H716 con RebA dio como resultado tinción de “anillo”. Se calcularon las células positivas a “anillo” mediante coeficiente de correlación para valores de píxeles de las señales de Hoechst 33342 (nuclear) y FITC (T2R14). El grado de internalización se expresa como el porcentaje (media $\pm$ DE) de células que muestran una tinción de “anillo” a partir de puntos de datos cuadruplicados. El reciclaje del receptor T2R14 está relacionado con un número disminuido de células positivas a “anillo”.

Se hicieron análisis estadísticos y gráficos con Tibco Spotfire o GraphPad Prism.

En el ensayo de anillo, cuando los receptores T2R14 se tiñen con anticuerpos específicos, se observa la mayoría de los receptores T2R14 en la superficie de las células, lo que da como resultado una tinción en círculo difusa. Cuando se trataron las células con RebA o RebC, tuvo lugar la internalización de los receptores y el tráfico de T2R14, dando como resultado tinción de “anillo”. Se demuestra, usando un algoritmo de análisis de puntuación de translocación de ondas múltiples (Molecular Devices), que la internalización del T2R14 aumenta después de la estimulación de células NCIH716 con RebA o RebC. En cambio, no se observó la internalización tras el tratamiento con RebD. Este ejemplo demuestra un vínculo entre los ensayos basados en células de obtención de imágenes de alto contenido y los datos sensoriales, proporcionando de ese modo un enfoque basado en mecanismo *in vitro* que puede usarse para descubrir bloqueantes del sabor amargo novedosos. Los resultados se muestran en la figura 2.

Ejemplo 2

Ensayo de obtención de imágenes de alto contenido para internalización de T1R2

Se investigan los efectos de compuestos dulces sobre la línea celular enteroendocrina humana NCIH716 que expresa de manera endógena el receptor de dulce T1R2/T1R3 y α -gustducina. Las células NCI-H716 no tratadas expresaron receptores T1R2 en la superficie celular. El tratamiento con D-glucosa indujo la internalización del receptor T1R2, dando como resultado tinción de “anillo” típica (figura 3A). Se cuantificó, usando un módulo de translocación de ondas múltiples, la internalización de T1R2 endógena en células NCI-H716 tratadas con compuestos de sabor dulce. La internalización de T1R2 aumentó después de la estimulación con D-glucosa, D-fructosa, sacarosa, sucralosa, aspartamo y Ace-K, mientras que el proceso de internalización del T1R2 no se observó tras el tratamiento con sacarina (figura 3B).

Se observó una correlación entre las estructuras moleculares de azúcares y vías de reciclaje de T1R2. Por tanto, el T1R2 reciclado volvió a la membrana celular muy rápidamente tras el tratamiento con monosacáridos, D-glucosa y D-fructosa, mientras que se observó reciclaje lento de T1R2 con el disacárido sacarosa y su análogo sucralosa (figura 3B).

Ejemplo 3

Ensayo de obtención de imágenes de alto contenido para internalización de GLUT4

Recientemente, estudios sensoriales y en animales proporcionaron evidencia de que pueden existir receptores adicionales para el sabor dulce, que responden especialmente a compuestos artificiales, tales como sacarina. Se planteó la hipótesis de que el transportador de glucosa GLUT4 (n.º de Entrez Gene 6517) pueda ser una molécula aguas arriba en la señalización de sacarina en las células NCI-H716. El GLUT4 se expresa preferentemente en células de sabor positivas a T1R3 y la internalización de GLUT4 es un mecanismo clave para la regulación de captación de glucosa en ausencia de insulina. Las células NCI-H716 expresan GLUT4 endógeno (base de datos de Oncomine), que puede mediar la respuesta de Ca^{2+} observada en estas líneas celulares.

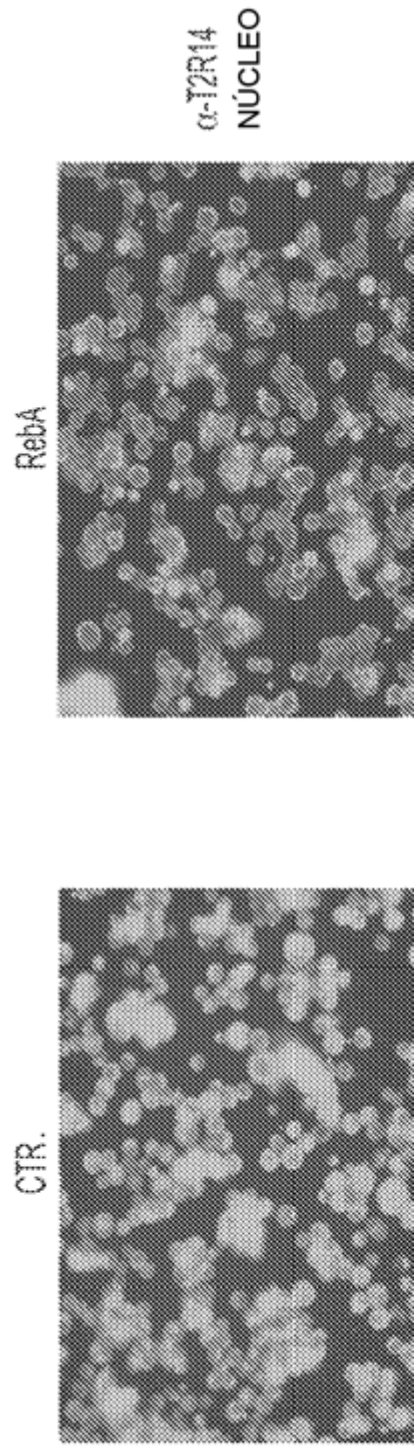
Para explorar adicionalmente el papel de GLUT4 en la señalización mediante edulcorantes artificiales, se sometió a prueba la internalización de GLUT4 en células NCI-H716. El tratamiento con sacarina condujo a una rápida redistribución de GLUT4 dentro de la célula, dando como resultado tinción de “anillo” (figura 4A). La cuantificación de internalización de GLUT4, medida como un número aumentado de células positivas a “anillo”, ha demostrado que la internalización de GLUT4 aumentó después de la estimulación con Ace-K, aspartamo y sacarina, mientras que los azúcares naturales no fueron capaces de activar el proceso de internalización de GLUT4 (figura 4B).

Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren que el GLUT4 es el receptor común para los edulcorantes artificiales. La sacarina activa la respuesta de $\text{Ca}^{(2+)}$ por medio del GLUT4 solamente, mientras que Ace-K y aspartamo seleccionan como diana las rutas tanto del T1R2/T1R3 como del GLUT4.

5

REIVINDICACIONES

1. Método para identificar un modulador del sabor que comprende:
 - 5 a) poner en contacto una célula que comprende un receptor del sabor funcional con un compuesto de prueba;
 - b) poner en contacto la célula con un primer reactivo que comprende un marcador detectable específico para un núcleo de célula y con un segundo reactivo que comprende un segundo marcador detectable
10 específico para el receptor del sabor; y
 - c) detectar la internalización del receptor del sabor, en el que la internalización del receptor del sabor en presencia del compuesto de prueba indica que el compuesto de prueba es un modulador potencial de
15 sabor; yen el que el receptor del sabor funcional es un receptor del sabor endógeno funcional.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el receptor del sabor es un receptor del sabor dulce.
- 20 3. Método según la reivindicación 2, en el que receptor del sabor dulce comprende T1R2.
4. Método según la reivindicación 2, en el que receptor del sabor dulce comprende T1R3.
5. Método según la reivindicación 2, en el que receptor del sabor dulce es GLUT4.
25
6. Método según la reivindicación 1, en el que el receptor del sabor es un receptor del sabor amargo.
7. Método según la reivindicación 6, en el que el receptor del sabor amargo se selecciona del grupo que
30 consiste en T2R1, T2R3, T2R4, T2R5, T2R7, T2R8, T2R9, T2R10, T2R13, T2R14, T2R16, T2R38, T2R39, T2R40, T2R41, T2R42, T2R43, T2R44 (T2R31), T2R45, T2R46, T2R47 (T2R30), T2R48 (T2R19), T2R49 (T2R20), T2R50, T2R60 y combinaciones de los mismos.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la célula es una célula NCI-H716.



ALGORITMO DE ANÁLISIS DE IMÁGENES PARA CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS POSITIVAS A ANILLO

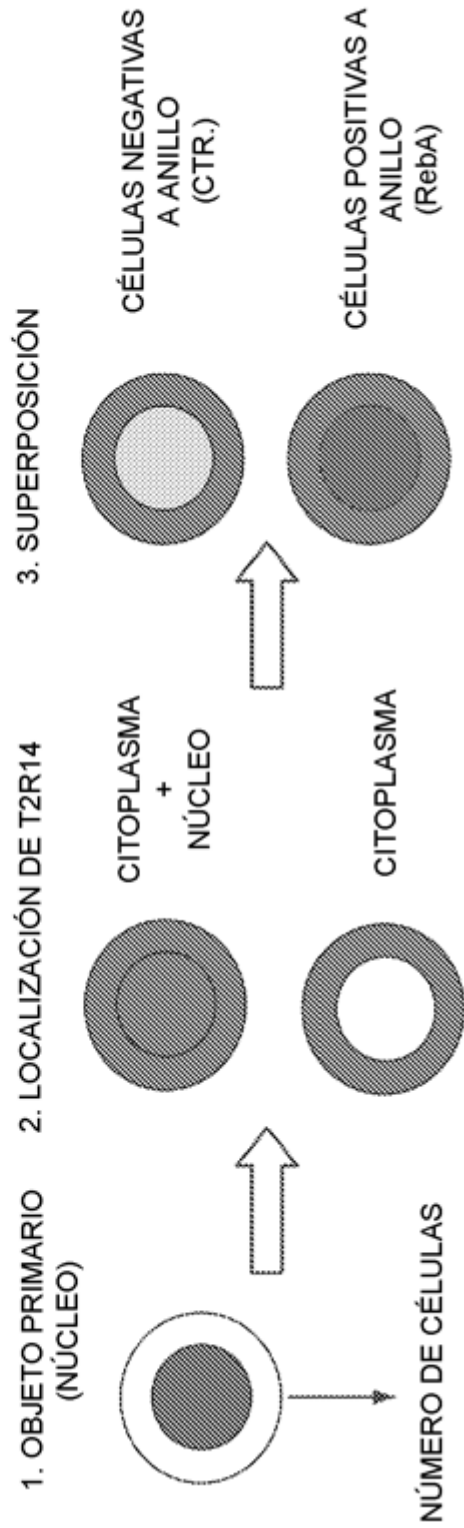


FIG.1

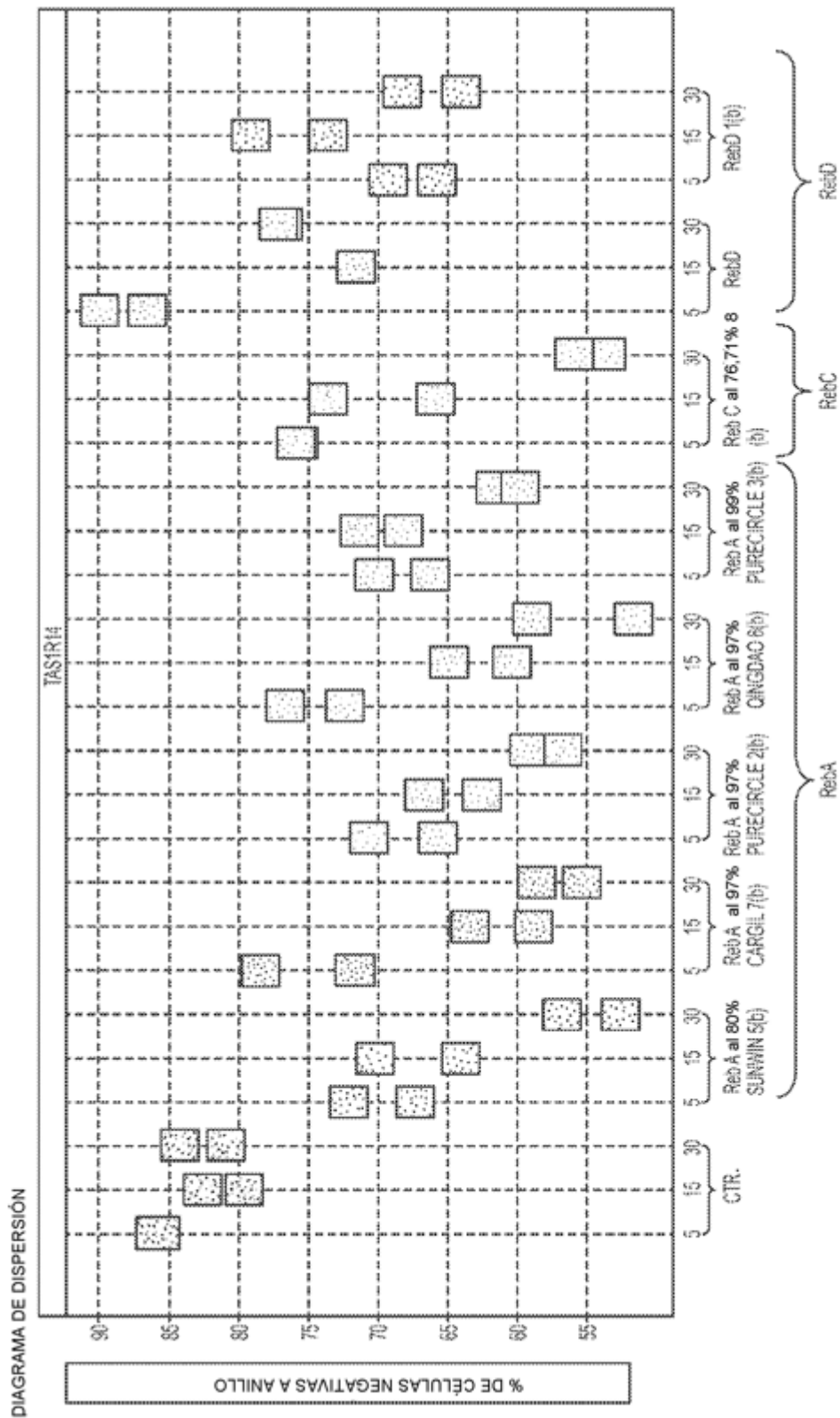


FIG. 2

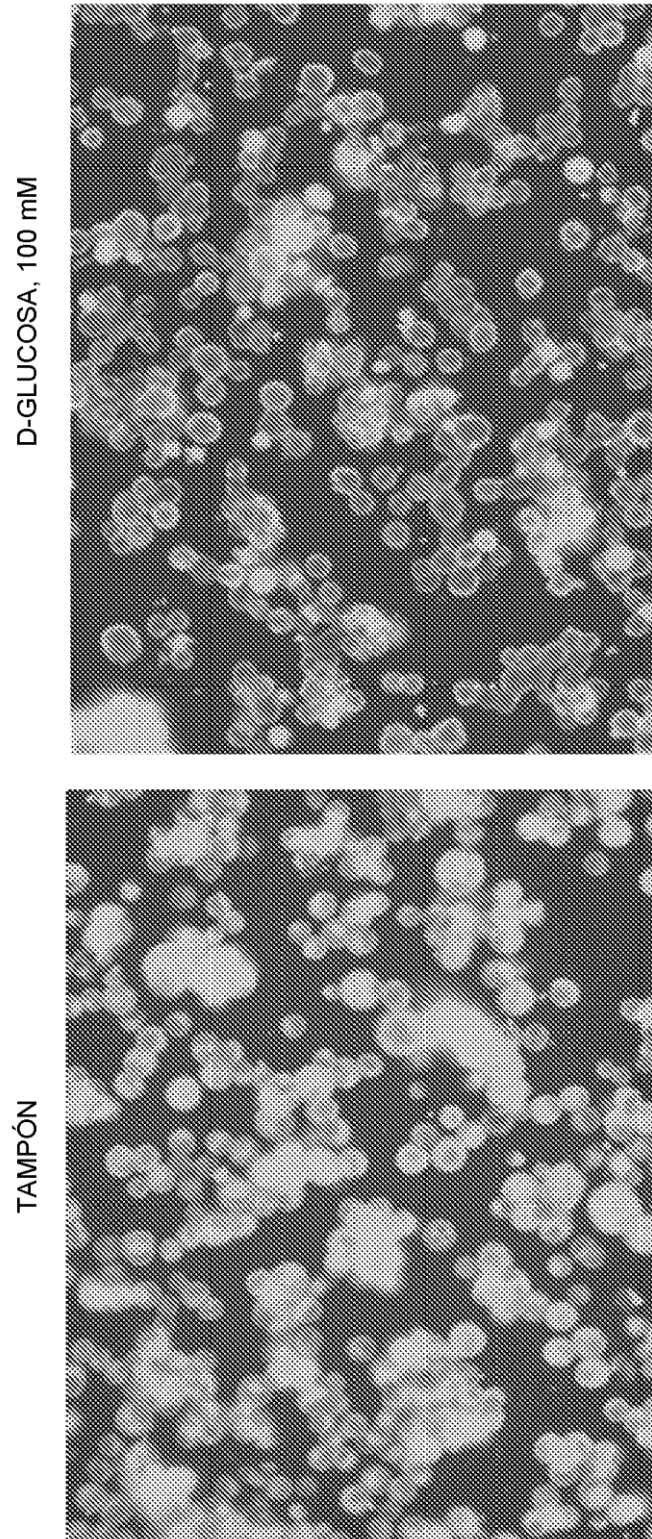


FIG. 3A

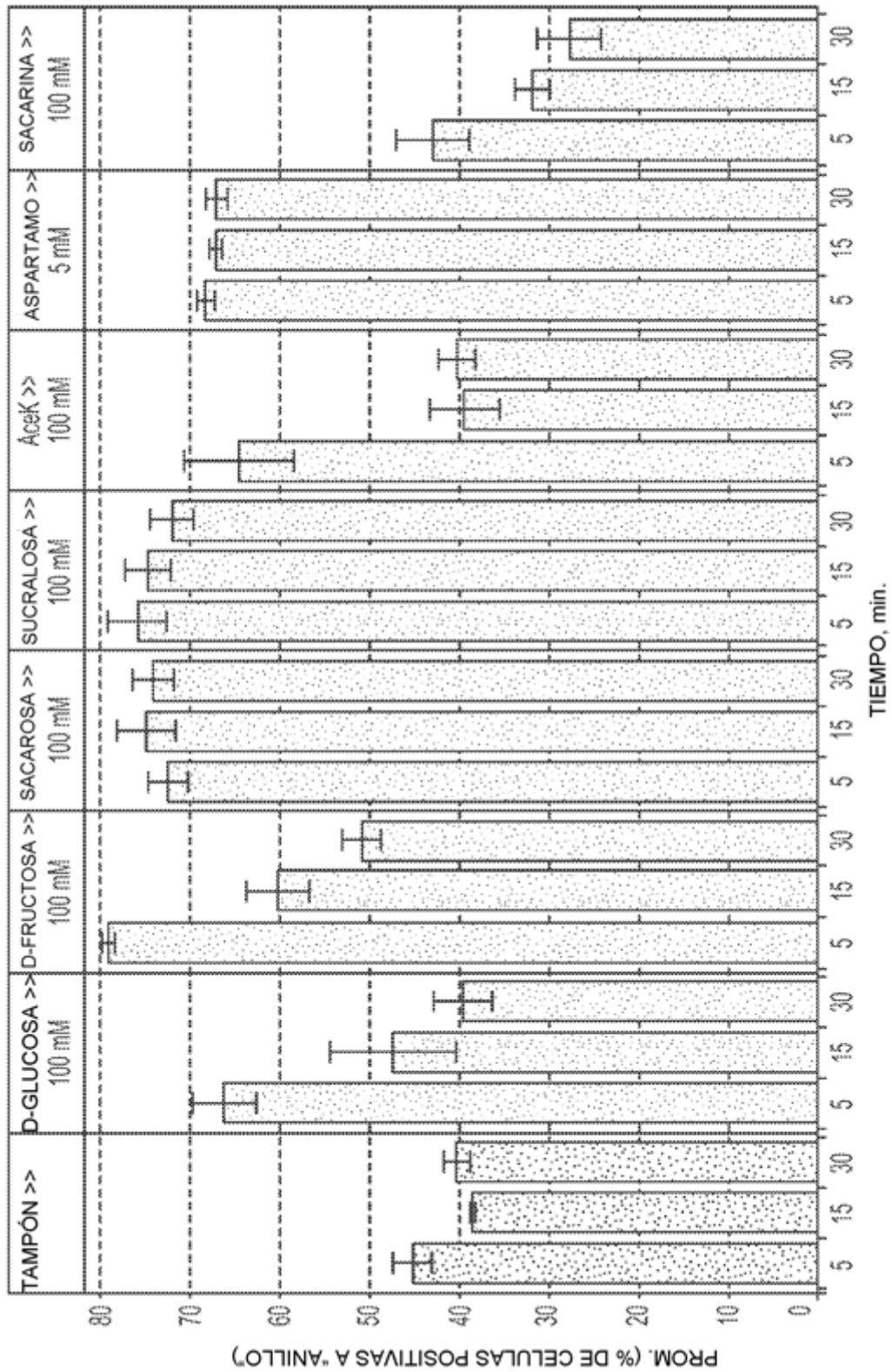


FIG. 3B

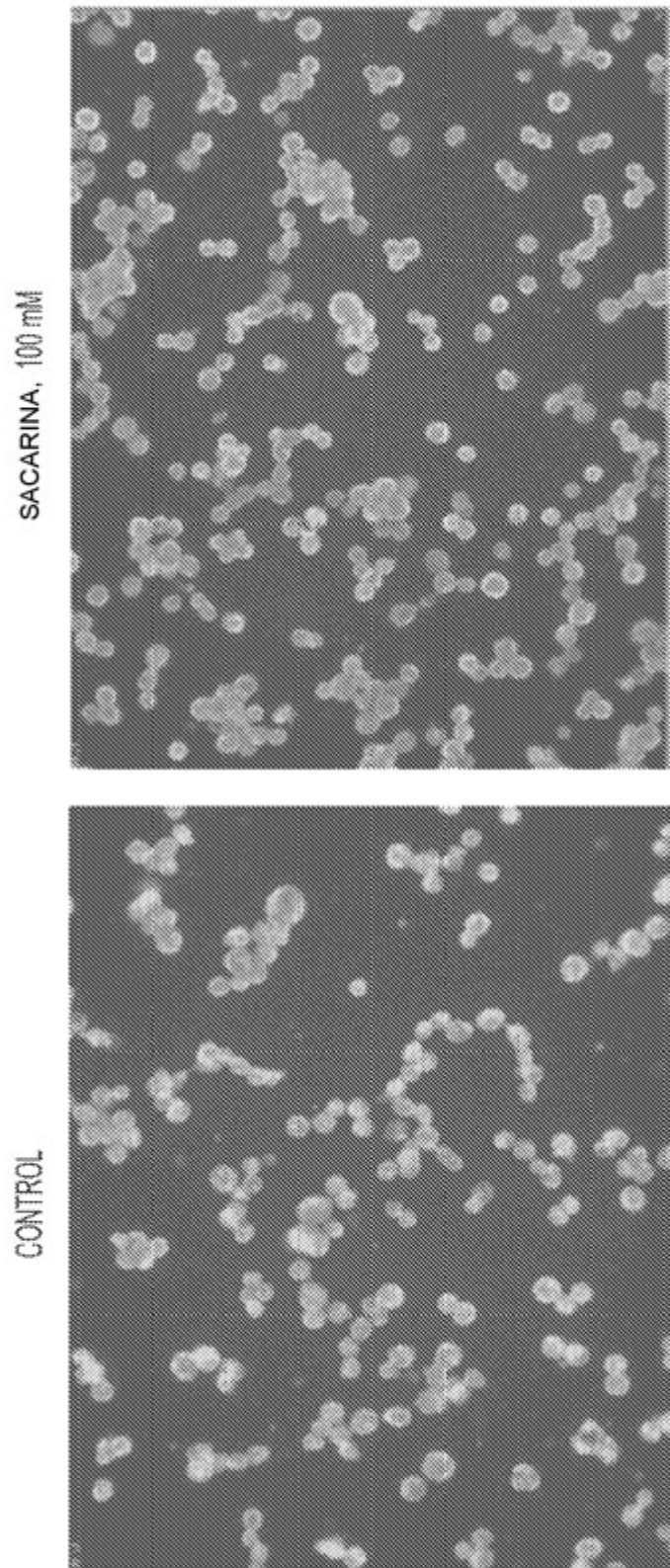


FIG. 4A

