



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 337 322**

⑤1 Int. Cl.:
A23L 1/229 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **99967519 .2**

⑨6 Fecha de presentación : **22.12.1999**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1139793**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **10.10.2001**

⑤4 Título: **Inhibidores de la respuesta al sabor amargo.**

③0 Prioridad: **23.12.1998 US 113562 P**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.04.2010

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.04.2010

⑦3 Titular/es: **Mount Sinai School of Medicine of New
York University
One Gustave L. Levy Place
New York, New York 10029, US**

⑦2 Inventor/es: **Margolskee, Robert, F. y
Ming, Ding**

⑦4 Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Inhibidores de la respuesta al sabor amargo.

5 1. Introducción

La presente invención se refiere a un método de inhibir el sabor amargo en una sustancia que puede entrar en contacto con tejido gustativo, seleccionada de alimentos, bebidas, fármacos, productos dentales, cosméticos, pegamentos humectables, usados para sobres y sellos, jabones, champús y composiciones tóxicas usadas en el control de plagas.

10 2. Antecedentes de la invención

La sensación de gusto tiene una significancia biológica profunda. Tiene ramificaciones más amplias que solamente proporcionar a los hombres experiencias culinarias agradables. El gusto transmite numerosas indicaciones biológicas a los seres humanos y otros animales, que identifican alimentos pasados o estropeados y proporciona respuestas hedónicas que pueden ser proporcionales al valor calórico o nutritivo.

En general, se considera que sólo hay cuatro o cinco categorías de sabores básicos: dulce, agrio, amargo, ácido y “umami” (la palabra japonesa que describe el sabor del glutamato monosódico; Herness, M.S. & Gilbertson, T.A., 1999, *Annu. Rev. Physiol.* **61**:873-900). Éstos se pueden subclasificar como los sabores del apetito, tales como salado, dulce y umami, que se asocian con alimentos que contienen nutrientes, y los sabores amargo y agrio causados por compuestos tóxicos. Los dos últimos producen una reacción aversiva que puede proteger a un organismo al desalentar la ingestión de alimentos poco saludables o peligrosos. Entre los compuestos no deseables asociados a un sabor amargo están los alcaloides vegetales tales como cafeína, estricnina y quinina, cianuro y productos de desecho metabólico tal como urea (Lindemann, B., 1996, *Physiol. Rev* **76**:719-766). Recientemente se ha sugerido que la grasa, el nutriente más denso en energía, puede poseer indicaciones gustativas (*Id.*, que cita a Gilbertson T.A. *et al.*, 1997, *Am. J. Physiol.* **272**:C1203-1210 y Gilbertson, T.A., 1998, *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**:447-452).

La base anatómica para los sucesos iniciales del gusto es la célula receptora del gusto (“CRG”), localizadas en grupos denominados “papilas gustativas” (Lindemann, *supra*). Las papilas gustativas están distribuidas por toda la cavidad bucal, incluyendo la lengua así como localizaciones extra linguales (véase Herness y Gilbertson). En la lengua humana, las papilas gustativas se organizan en tres tipos especializados de estructuras, es decir, papilas fungiformes, foliadas y circunvaladas. Cada papila gustativa comprende entre alrededor de 50 y 100 células individuales agrupadas en un conjunto que tiene entre 20 y 40 micrómetros de diámetro. Las fibras nerviosas entran desde la base de la papila gustativa y forman sinapsis con algunas de las células receptoras gustativas. Típicamente, una única CRG está en contacto con varias fibras nerviosas sensoriales y cada fibra nerviosa sensorial inerva varias CRG en la misma papila gustativa (Lindemann, *supra*).

Cuando un sujeto ingiere un estimulante del gusto, y ese estimulante del gusto encuentra una célula receptora gustativa en la concentración adecuada, se produce un potencial de acción que, a través de sinapsis con neuronas sensoriales primarias, comunica la señal registrada por el receptor, a través de nervios aferentes, a la región apropiada de la corteza sensorial del cerebro, produciendo la percepción de un sabor particular por el sujeto. La apreciación de los alimentos puede dar lugar a una respuesta hedónica que implica la activación de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (Lindemann, *supra*, que cita a Mirenowicz, J. & Schultz, W., 1996, *Nature (Londres)* **379**:449-451) y la liberación de opiáceos endógenos (Lindemann, *supra*, que cita a Drenowski, A., *et al.*, 1992, *Physiol. Behav.* **51**:371-379; Dum, J. *et al.*, 1983, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **18**:443-447).

Gran parte de la investigación se ha dirigido a elucidar la fisiología del gusto. Las CRG de la mayoría, si no de todas, las especies de vertebrados poseen canales iónicos de sodio, potasio y calcio operados por voltaje con propiedades similares a los de las neuronas (Kinnamon, S.C. & Margolskee, R.F., 1996, *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**:506-513). Diferentes tipos de sabores primarios parecen utilizar diferentes tipos de mecanismos de transducción, y ciertos tipos de sabores pueden emplear mecanismos múltiples que pueden reflejar requerimientos nutricionales variables entre especies (Kinnamon & Margolskee, *supra*). Por ejemplo, en el hámster, el sabor ácido se asocia con el influjo de protones mediante un canal de sodio sensible a amilorida (*Id.*, que cita a Gilbertson, T. A. *et al.*, 1993, *Neuron* **10**:931-942), mientras que en la salamandra acuática, está implicado un bloqueo protónico de los canales iónicos de potasio en la membrana celular apical (Kinnamon & Margolskee, *supra*, que cita a Kinnamon, S.C. *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**:7023-7027). El sabor salado típicamente se transduce a través de la penetración de iones de sodio a través de los canales de sodio sensibles a amilorida.

El sabor dulce se ha asociado con un sistema de segundo mensajero que puede ser diferente dependiendo de si el estimulante del gusto es un edulcorante natural o artificial, el primero se cree que utiliza AMPc, el último inositol trifosfato (IP₃; Herness M.S. & Gilbertson, T.A., 1999, *Annu. Rev. Physiol.* **61**:873-900). Hay evidencia de que un receptor unido a membrana, tal como el implicado en la activación de G_s y adenilato ciclase, puede estar implicado en la percepción de los sabores dulces (*Id.*).

También se piensa que las sensaciones del sabor amargo implican AMPc e IP₃ (Kinnamon & Margolskee, *supra*). El compuesto amargo denatonio produce liberación de ión calcio de las CRG de rata y el rápido aumento de los niveles de IP₃ en tejido gustativo de roedor (*Id.*, que cita a Bernhardt, S.J. *et al.*, 1996, *J Physiol. (Londres)* **490**:325-

336 y Akabas, M.H., *et al.*, 1988, *Science* **242**:1047-1050). Puesto que el denatonio no puede pasar la membrana celular, se ha sugerido que puede activar receptores acoplados a proteínas G, por lo que las subunidades α y/o $\beta\gamma$ de proteínas G activarían la fosfolipasa C, produciendo la generación de IP_3 y la liberación de iones de calcio (Kinnamon & Margolskee, *supra*).

5 En los últimos años, se ha clonado y caracterizado una proteína G específica del gusto denominada “gustducina” que es homóloga de la proteína G retinal (*Id.*, que cita a McLaughlin, S. *et al.*, 1992, *Nature (Londres)* **357**:563-569). Los ratones en los que se ha eliminado el gen de la α gustducina muestran respuestas disminuidas a ciertos estimulantes del gusto amargos (y ciertos dulces), lo que sugiere que la gustducina puede regular la respuesta de IP_3 en CRG (Kinnamon & Margolskee, que cita a Wong, G.T. *et al.*, 1996, *Nature (Londres)* **381**:796-800). Al introducir un ADNc
10 que codifica α -gustducina salvaje de rata en ratones sin α -gustducina se restableció su capacidad de respuesta a compuestos amargos y dulces (Ming, D. *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:8933-8938, que cita a Wong, G.T., *et al.*, 1996, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **61**:173-184). Recientemente se ha mostrado que la subunidad γ de la gustducina (γ_{13}) media la activación de la fosfolipasa C en respuesta al compuesto amargo denatonio (Huang, L.
15 *et al.*, 1999, *Nature Neurosci.* **2**:1055-1062).

Aunque se ha creído que las transducinas de conos y bastones eran proteínas G específicas presentes sólo en las células fotorreceptoras de la retina de vertebrados (Lochrie, M.A. *et al.*, 1985, *Science* **228**:96-99; Medynski, D.C. *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**:4311-4315; Tanabe, T. *et al.*, 1985, *Nature (Londres)* **315**:242-
20 245; Yatsunami K. & Khorana, H.G., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**:4316-4320), se ha descubierto que la transducina de bastones también está presente en las células gustativas de vertebrados, donde específicamente activa una fosfodiesterasa aislada de tejido gustativo (Ruiz-Avila, L. *et al.*, 1995, *Nature (Londres)* **376**:80-85). Usando un ensayo de sensibilidad a tripsina, se demostró que el compuesto amargo denatonio, en presencia de membranas de células gustativas, activa transducina pero no la proteína G, G_i (*Id.*). Esta activación se pudo inhibir mediante un
25 péptido derivado de la región C-terminal de la transducina, que inhibe de forma competitiva la interacción rodopsina-transducina (*Id.* y Hamm, H.E., *et al.*, 1988, *Science* **241**:832-8359). Ruiz-Avila y col. (*supra*) propusieron que la transducina podría estar implicada en la transducción del sabor amargo a través de una cascada similar a la que se produce en la percepción visual, por lo que un receptor amargo estimulado puede activar la transducina de la célula gustativa, que a su vez activa la fosfodiesterasa. La fosfodiesterasa activada podría entonces disminuir los niveles de
30 nucleótidos 3',5'-cíclicos intracelulares y los niveles resultantes más bajos de nucleótidos cíclicos podrían producir la despolarización de la CRG mediante un mecanismo denominado “conductancia suprimible por nucleótidos cíclicos” (*Id.* que cita a Kolesnikov, S. & Margolskee, R.F., 1995, *Nature (Londres)* **376**:85-88).

Más recientemente, Ming, D. *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:8933-8938 describieron que tanto
35 gustducina como transducina, en presencia de membranas de células gustativas bovinas, se activaron específicamente por ciertos compuestos amargos, incluyendo denatonio, quinina y estricnina. Se encontró que esta activación dependía de la interacción con el C-terminal de gustducina y requería la presencia de subunidades $\beta\gamma$ de proteínas G; se pudo inhibir de forma competitiva mediante péptidos derivados de los sitios de interacción de rodopsina y transducina.

40 3. Compendio de la invención

La presente invención se refiere a un método de inhibir el sabor amargo en una sustancia que puede entrar en contacto con tejido gustativo, como se define en la reivindicación 1. Se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que adenosina monofosfato (AMP) y compuestos relacionados inhibieron la activación de transducina por recep-
45 tores gustativos estimulados por estimulantes de gusto amargos, disminuyeron la estimulación neuronal por dichos estimulantes del gusto y produjeron respuestas de comportamiento que indican que la sensación de amargor estaba muy disminuida.

Los compuestos según la invención se pueden usar para disminuir o abrogar la percepción de amargor de estimu-
50 lantes del gusto amargos, capacidad en la que se denominan “inhibidores del amargor”.

También se puede encontrar que los compuestos según la invención transmiten dulzor a la sustancia.

Los compuestos según la invención se pueden usar para aumentar el sabor de alimentos, bebidas y fármacos inhi-
55 biendo el sabor amargo. Además de aumentar la satisfacción del consumidor del alimento, los compuestos según la invención también pueden permitir la incorporación en alimentos y fármacos, de estimulantes del gusto amargos que mejoran la vida útil o el valor nutritivo. Los compuestos según la invención podrían aumentar la ingesta de alimentos en seres humanos o ganado. Además, los compuestos según la invención podrían hacer los procedimientos médi-
60 cos que implican sustancias amargas más apetitosas, y mejorar la conformidad en pautas de fármacos que implican estimulantes del gusto amargos, particularmente, cuando se administran a niños.

4. Descripción de las figuras

Figura 1A-E. El AMP inhibe la activación de transducina por estímulos amargos en presencia de membranas de
65 células receptoras del gusto bovinas. (A) La transducina inactiva (unida a GDP) (carril de más a la derecha) genera un fragmento de 23 kDa en la digestión con tripsina. La transducina activa (unida a GTP- γ S) (segundo carril por la derecha) activada por DEN más membranas gustativas genera un fragmento de 32 kDa en el tratamiento con tripsina. Las concentraciones crecientes de AMP (0,25, 0,5, 1,25, 2,5 y 5,0 mM) inhiben la activación de transducina por

DEN más membranas receptoras gustativas bovinas determinada mediante el desplazamiento de los fragmentos de 32 kDa a 23 kDa. (B) Las concentraciones crecientes de AMP (0,01, 0,05, 0,10, 0,50, 1,0, 1,5, 2,0 y 2,5 mM) inhiben la activación de transducina por QUI 1,0 mM más membranas gustativas bovinas. (C) El AMP (2,5 mM) inhibe la activación dependiente de membrana gustativa de transducina por DEN (5,0 mM), QUI (1,0 mM), clorhidrato de estricnina (STR, 5,0 mM), hemisulfato de nicotina (NIC, 5,0 mM) y clorhidrato de atropina (ATR, 5,0 mM). (D) El AMP (0,25, 0,5, 1,25, 2,5 y 5,0 mM) no inhibe la activación de la transducina por rodopsina 0,001 mM. (E) El GMP (0,25, 0,5, 1,25, 2,5 y 5,0 mM) no inhibe la activación de la transducina por DEN (5,0 mM) más membranas gustativas bovinas.

Figura 2. Sólo ciertos análogos de AMP bloquean la activación de transducina por DEN más membranas gustativas. La activación dependiente de membrana gustativa de transducina por DEN (5,0 mM) no se inhibe por adenosina 5'-carboxilato (ACA, 5,0 mM), adenosina 5'-monosulfato (AMS, 5,0 mM), teofilina (THE, 5,0 mM), clorhidrato de adenina (ADE, 5,0 mM), clorhidrato de adenosina (ADO, 5,0 mM), AMPc (5,0 mM) o cafeína (CAF, 5,0 mM). La activación por DEN/membranas gustativas de la transducina se inhibe por timidina 5'-monofosfato (TMP, 5,0 mM), ácido 5'-citidílico (CMP, 5,0 mM), ácido inosínico (IMP, 5,0 mM), ADP (5,0 mM), 3'-AMP (5,0 mM), adenosina 5'-succinato (ASU, 5,0 mM) y ATP (5,0 mM). Los carriles de H₂O y rodopsina (RHO) controlan para efectos independientes de receptor no específico.

Figura 3A-E. El AMP bloquea las respuestas aversivas de ratones a varios compuestos amargos. (A) Respuestas de preferencia de cuarenta y ocho horas a dos botellas de ratones C57BL/6J (n = 10) a DEN solo, DEN más AMP (0,1 y 1,0 mM) y DEN más GMP (0,1 y 1,0 mM). El AMP (0,1 y 1,0 mM) inhibió las repuestas de aversión a DEN a 0,05, 0,10, 0,50 y 1,0 mM (P<0,001). El GMP (0,1 y 1,0 mM) no inhibió las repuestas de aversión a DEN. **P<0,001. (B) Las concentraciones crecientes de AMP (0,1, 1,0, 5,0 mM) desplazaron la curva dosis-aversión a la derecha. El AMP solo no indujo respuestas de comportamiento hasta que su concentración alcanzó 0,5 mM. (C) Respuestas de preferencia de ratones C57BL/6J (n = 10) a QUI sola, QUI más AMP (0,1 y 0,5 mM) y QUI más GMP (0,1 y 0,5 mM). El AMP (0,1 y 0,5 mM) inhibió las repuestas de aversión a QUI a 0,05, 0,10 y 0,50 mM (P<0,001). El GMP (0,1 y 0,5 mM) no inhibió las repuestas de aversión a QUI. **P<0,001. (D) Las concentraciones crecientes de AMP (0,1, 1,0, 5,0 mM) desplazaron la curva dosis-aversión a la derecha. (E) Respuestas de preferencia de ratones C57BL/6J (n = 10) expuestos a dos concentraciones diferentes de estimulantes del gusto ± AMP 0,1 mM. El AMP inhibió las respuestas de aversión a los estimulantes del gusto amargos esparteína (SPA) a 0,05 y 0,10 mM (P<0,001) y (-)-epicatequina (E.I.) a 0,05 mM y 0,10 mM (P<0,01); el AMP no alteró las respuestas de comportamiento a NaCl (0,1 y 0,3 M), HCl (0,01 y 0,10 mM), sacarosa (SUC) (5,0 y 150 mM) o el edulcorante artificial de gran potencia SC45647 (SC) (0,01 y 0,10 mM). **P<0,001, *P<0,01.

Figura 4A-I. El AMP disminuye las respuestas del nervio glossofaríngeo de ratones a la estimulación lingual con estimulantes del gusto amargos. (A) Respuestas glossofaríngeas a NH₄Cl 0,1 M, DEN 5,0 mM, esparteína (SPA) 1,0 mM, estricnina (STR) 1,0 mM y atropina (ATR) 1,0 mM. (B) Respuestas glossofaríngeas a los compuestos anteriores mezclados con AMP 0,1 mM. (C) Respuestas glossofaríngeas a los compuestos anteriores mezclados con GMP 0,1 mM. (D) Respuestas glossofaríngeas a una serie de concentraciones de AMP (0,01, 0,1, 1,0, 5,0 mM) solo y en combinación con QUI (0,1 mM y 1,0 mM) (E y F, respectivamente). (G) Respuestas tónicas registradas de los nervios glossofaríngeos de ratones (n = 5 a 7) estimulados mediante la aplicación lingual de DEN (0,1, 0,5, 1,0, 5,0 y 10,0 mM) ± AMP (0,1 y 1,0 mM). **P<0,001; *P<0,01. (H) Respuestas tónicas registradas de los nervios glossofaríngeos de ratones (n = 6 a 8) estimulados mediante la aplicación lingual de QUI (0,1, 0,3 y 1,0 mM) y sus mezclas con AMP (0,1 y 1,0 mM). **P<0,001. (I) Respuestas tónicas registradas de los nervios glossofaríngeos de ratones (n = 4 a 7) estimulados mediante la aplicación lingual de HCl 5,0 mM, NaCl 0,1 M, SC45647 3,0 mM, sacarosa 0,5 M (SUC), SPA 1,0 mM o agua con o sin AMP 0,1 mM. El AMP inhibe las respuestas tónicas relativas de SPA 1,0 mM (P<0,001) y SC45647 3,0 mM (P<0,01) pero no de los otros compuestos. **P<0,001; *P<0,01.

5. Descripción detallada de la invención

Un “estimulante del gusto amargo”, como se define aquí, es un compuesto o complejo molecular que induce, en un sujeto, la percepción de un sabor amargo. En particular, un estimulante de del gusto amargo es uno que produce la activación de gustducina y/o transducina, por ejemplo, pero no a modo de limitación, en un ensayo tal como el que se describe en Ming, D. *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* **95**:8933-8938 (por ejemplo, véase la figura 3 de esa referencia). Los ejemplos de estimulantes del gusto amargos incluyen, pero no están limitados a benzoato de denatonio (“denatonio”; también “DEN”), clorhidrato de quinina (“quinina”; también “QUI”), clorhidrato de estricnina (“estricnina”; también “STR”), hemisulfato de nicotina (“nicotina”; también “NIC”), clorhidrato de atropina (“atropina”; también “ATR”), esparteína, naringina, ácido cafeico (“cafeína”; también “CAF”), quinacrina y epicatequina. Véase Ming *et al.*, 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**:9903-9908, incorporado aquí mediante referencia.

La presente invención proporciona un método de inhibir en una sustancia el sabor amargo resultante de poner en contacto tejido gustativo de un sujeto con la sustancia, que comprende incorporar en la sustancia de 1 a 50 mM de un compuesto seleccionado de adenosina 5'-monofosfato (“AMP”); timidina 5'-monofosfato, adenosina 5'-difosfato, adenosina 3'-monofosfato (3'-AMP), adenosina 5'-succinato, adenosina 5'-trifosfato (“ATP”) y adenosina 2'-monofosfato.

En formas de realización específicas, no limitantes, la sustancia comprende una concentración del compuesto de entre aproximadamente 1 y 20 mM, preferiblemente entre aproximadamente 1 y 5 mM.

En formas de realización específicas, no limitantes, donde se usa timidina 5'-monofosfato como el inhibidor de amargor, una composición que comprende un estimulante del gusto amargo puede comprender además una concentración de timidina 5'-monofosfato de entre aproximadamente 0,01 y 20 mM, preferiblemente entre aproximadamente 1 y 5 mM.

En formas de realización específicas, no limitantes, donde se usa adenosina 5'-difosfato como el inhibidor de amargor, una composición que comprende un estimulante del gusto amargo puede comprender además una concentración de adenosina 5'-difosfato de entre aproximadamente 0,01 y 20 mM, preferiblemente entre aproximadamente 1 y 5 mM.

En formas de realización específicas, no limitantes, donde se usa adenosina 3'-monofosfato como el inhibidor de amargor, una composición que comprende un estimulante del gusto amargo puede comprender además una concentración de adenosina 3'-monofosfato de entre aproximadamente 0,01 y 20 mM, preferiblemente entre aproximadamente 1 y 5 mM.

En formas de realización específicas, no limitantes, donde se usa adenosina 5'-succinato como el inhibidor de amargor, una composición que comprende un estimulante del gusto amargo puede comprender además una concentración de adenosina 5'-succinato de entre aproximadamente 0,01 y 20 mM, preferiblemente entre aproximadamente 1 y 5 mM.

En formas de realización específicas, no limitantes, donde se usa adenosina 5'-trifosfato como el inhibidor de amargor, una composición que comprende un estimulante del gusto amargo puede comprender además una concentración de adenosina 5'-trifosfato de entre aproximadamente 0,01 y 20 mM, preferiblemente entre aproximadamente 1 y 5 mM.

En formas de realización específicas, no limitantes, donde se usa adenosina 2'-monofosfato como el inhibidor de amargor, una composición que comprende un estimulante del gusto amargo puede comprender además una concentración de adenosina 2'-monofosfato de entre aproximadamente 0,01 y 20 mM, preferiblemente entre aproximadamente 1 y 5 mM.

La presente invención se puede usar para mejorar el sabor de alimentos disminuyendo o eliminando los efectos aversivos de los estimulantes del gusto amargos. Donde los inhibidores son edulcorantes inhibidores, se pueden usar para mejorar el sabor de los alimentos produciendo un sabor dulce. Si el estimulante del gusto amargo es un conservante alimentario, los inhibidores de la invención pueden permitir o facilitar su incorporación en alimentos, mejorando de esta manera la seguridad alimentaria. Para alimentos administrados como suplementos nutricionales, la incorporación de los inhibidores de la invención puede alentar la ingestión, aumentando de esta manera la eficacia de estas composiciones en proporcionar nutrición o calorías a un sujeto.

De esta manera, según una forma de realización preferida, el compuesto endulza la sustancia.

Los compuestos según la invención se pueden incorporar a composiciones médicas y/o dentales. Ciertas composiciones usadas en procedimientos de diagnóstico tienen un sabor desagradable, tales como los materiales de contraste y los anestésicos locales orales. Los compuestos según la invención se pueden usar para mejorar la comodidad de sujetos que se someten a tales procedimientos mejorando el gusto de las composiciones. Además, los compuestos según la invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas, incluyendo comprimidos y líquidos, para mejorar su sabor y mejorar la conformidad del paciente (particularmente cuando el paciente es un niño o un animal no humano).

Los compuestos según la invención pueden estar comprendidos en cosméticos para mejorar sus características de sabor. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los compuestos según la invención se pueden incorporar en cremas para la cara y barras de labios.

Además, los compuestos según la invención se pueden incorporar en composiciones que no son alimentos, fármacos o cosméticos tradicionales, pero que pueden entrar en contacto con membranas gustativas. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, jabones, champús, dentífrico, adhesivos de dentaduras, pegamento en las superficies de sellos y sobres, y composiciones tóxicas usadas en el control de plagas (por ejemplo, veneno para ratas o cucarachas).

6. Ejemplo

El bloqueo de la activación de gustducina por los receptores gustativos inhibe las respuestas gustativas a compuestos amargos

6.1 Materiales y métodos

Ensayos de activación de proteínas G. Se recogieron lenguas bovinas (*Bos primigenius*) recientes del matadero local y se transportaron en hielo al laboratorio. Las papilas circunvaladas se disecaron a mano, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Los tejidos gustativos recogidos se homogenizaron, se eliminaron los particulados mediante centrifugación y se recogieron las membranas enriquecidas de las células gustativas como se describe (Ming, D., et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:8933-8938). Las membranas precipitadas se lavaron

dos veces, se resuspendieron en tampón de homogenización que carecía de inhibidores de proteasas y se homogenizaron adicionalmente mediante 20 pases a través de una aguja de calibre 25. Las alícuotas se congelaron rápidamente o se almacenaron en hielo hasta su uso. La concentración de proteína en las preparaciones de membrana se determinó mediante la modificación de Peterson del método micro-Lowry (Peterson, G. L., 1977, *Anal. Biochem.* **83**:346-356).

5 La activación de la transducina se basó en el procedimiento de sensibilidad a tripsina publicado (Ming, D., *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:8933-8938, Neer, E. J., *et al.*, 1994, *Methods Enzymol.* **237**:226-239). Después de la digestión con tripsina, las muestras se diluyeron con tampón de Laemmli (Laemmli, U. K., 1970, *Nature (Londres)* **227**:680-685) y se separaron mediante SDS/PAGE usando un gel del 4-20% y tampón Tris-glicina. Los polipéptidos separados se transfirieron mediante electro-transferencia a una membrana de poli(difluoruro de vinilideno), que se

10 bloqueó mediante la adición de BLOTTO al 5% [Tris-HCl 50 mM, pH 7,4/NaCl 100 mM/leche desnatada en polvo al 5%], (30 minutos), después se visualizaron los péptidos de transducina mediante unión de un antisuero de transducina y anticuerpo secundario anti-conejo de cabra marcado con peroxidasa de rábano, seguido mediante revelado con reactivos de tinción de ácido bicinconínico de Bio-Rad y exposición a película de rayos X.

15 *Productos químicos.* Todos los productos químicos estimulantes del gusto amargo y tampones fueron de la mayor pureza disponible y se adquirieron de Sigma o Boehringer Mannheim, a menos que se especifique de otra manera. La rodopsina se purificó en la luz como los segmentos externos de bastones bovinos lavados con urea 6 M usando procedimientos publicados (Mazzoni, M.R., *et al.*, 1991, *J. Biol. Chem.* **266**:14072-14081). El heterotrímero de transducina bovina se purificó mediante procedimientos estándar (Fung, B. K.-K., *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**:152-156). El anticuerpo anti-transducina policlonal de conejo fue un generoso regalo de Mel Simon y John Watson (Instituto de Tecnología de California, Pasadena, CA).

Ensayos de comportamiento. Se ensayaron múltiples conjuntos de ratones macho C57BL/6J de Jackson Laboratory. Cada conjunto (n = 10) se ensayó con un estimulante del gusto $\pm$ AMP o GMP. Entre pruebas, a los ratones

25 se les suministró agua acidificada (pH 4,5) durante alrededor de 2 semanas. Los ratones ensayados variaban en edad desde 8 a 20 semanas. Los ratones se enjaularon por separado, y se les suministró comida *ad libitum* (Pico Lab Mouse Diet 20 no. 5058; PMI Feeds, St. Louis, MO) y se les presentó agua destilada en dos botellas con boquilla durante 48 horas antes de la prueba. Durante cada periodo de prueba de 48 horas, se suministró una cantidad determinada de estimulante del gusto en una botella con boquilla, mientras que la otra tenía agua destilada. Después de 24 horas,

30 se registraron los volúmenes consumidos, se rellenaron las botellas y se cambiaron las posiciones (para controlar las indicaciones posicionales). Los estimulantes del gusto se presentaron en concentraciones crecientes. Se calcularon las relaciones de preferencia como la fracción del estimulante del gusto consumido como un porcentaje del volumen total de líquido consumido. Se calcularon las relaciones medias de preferencia y las pruebas t de Student a partir de los datos recogidos.

35 *Registro nervioso.* Se registraron las respuestas de los nervios glosofaríngeos de ratones macho C57BL/6J como se ha descrito previamente (Ninomiya, Y., *et al.*, 1997, *Am. J. Physiol. (Londres)* **272**:R1002-R1006). Cada ratón se anestesió con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (40-50 mg/kg) y se mantuvo a un nivel quirúrgico de anestesia con inyecciones suplementarias del fármaco. La tráquea se canuló, y el ratón se fijó luego en posición

40 supina con una sujeción en la cabeza para permitir la disección del nervio glosofaríngeo. El nervio hipogloso se transeccionó bilateralmente para prevenir movimientos accidentales de la lengua. El nervio glosofaríngeo derecho se expuso mediante retirada del músculo digástrico y el cuerno posterior del hueso hioides. El nervio glosofaríngeo se disecó después libre de los tejidos subyacentes y se cortó cerca de su entrada al agujero rasgado posterior. El nervio entero se colocó en un electrodo de alambre de plata para el registro del nervio entero. Se colocó un electrodo

45 indiferente cerca en la herida. Las respuestas neurales resultantes de la aplicación tópica de estimulantes del gusto a la lengua se alimentaron a un amplificador y se mostraron en una pantalla de osciloscopio. Se integraron las respuestas del nervio entero usando un convertidor RMS-DC (Hendrick, Tallahassee, FL) con una constante de tiempo de 0,5 segundos. Para la estimulación química de las papilas circunvaladas y foliadas, se hizo una incisión a cada lado de la cara del animal desde la esquina de la boca hasta justo por encima del ángulo de la mandíbula, las papilas se expusieron

50 y sus zanjas se abrieron mediante una ligera tensión aplicada a través de una pequeña sutura cosida en la punta de la lengua. Las soluciones de estimulantes del gusto se administraron a la lengua mediante flujo por gravedad, y fluyeron sobre la lengua durante un periodo controlado. La estabilidad de cada preparación se siguió mediante la aplicación periódica de NH_4Cl 0,1 M. Se consideró que un registro era estable cuando las magnitudes de respuesta a NH_4Cl 0,1 M al principio y al final de cada serie de estimulación se desviaron en no más del 15%. En el análisis de datos

55 sólo se usaron las respuestas de registros estables. En el análisis de las respuestas de nervios enteros, se midieron las magnitudes de la respuesta integrada a 20, 25, 30, 35 y 40 segundos después del inicio del estímulo y se hicieron las medias para generar respuestas tónicas: la respuesta tónica representa la respuesta sostenida del nervio a estimulación continua de las células receptoras gustativas por estimulantes del gusto. Se obtuvo la respuesta tónica relativa para cada estímulo mediante normalización a la respuesta de NH_4Cl 0,1 M (la respuesta tónica de NH_4Cl se definió como 1,0). Se usó la prueba t de Student para el análisis estadístico.

6.2 Resultados

65 Se puede distinguir la forma activa (unida a GTP) de las proteínas G tales como gustducina y transducina de la forma inactiva (unida a GDP) mediante digestión limitada con tripsina (Fung, B. K.-K. & Nash, C. R., 1983, *J. Biol. Chem.* **258**:10503-10510; Halliday, K. R., *et al.*, 1984, *J. Biol. Chem.* **259**:516-525). Usando transducina como un indicador en este ensayo *in vitro*, se identificaron compuestos que inhibían las respuestas gustativas a compuestos amargos. La activación de transducina por membranas gustativas mediante los compuestos amargos benzoato de de-

natonio (DEN) y clorhidrato de quinina (QUI) se inhibió en una manera dependiente de la dosis por AMP (figura 1A y 1B). El efecto inhibitor de AMP se generalizó a todos los compuestos amargos que activaron transducina en presencia de membranas gustativas: DEN, QUI, estricnina, nicotina, atropina (figura 1C), esparteína, naringina, ácido cafeico y quinacrina. El efecto inhibitor del AMP era específico y requería receptores del gusto, porque el AMP no inhibió la activación de transducina mediada por rodopsina (figura 1D). El GMP no inhibió la activación de transducina por membranas gustativas en respuesta a DEN (figura 1E) u otros estimulantes del gusto amargos, lo que sugiere especificidad de unión. Varios compuestos relacionados con AMP inhibieron de forma potente la activación de transducina por DEN/receptor gustativo: timidina 5'-monofosfato, ADP, 3'-AMP, adenosina 5'-succinato, ATP (figura 2) y adenosina 2'-monofosfato. El ácido 5'-citidílico y el ácido inosínico inhibieron parcialmente la activación de transducina por DEN/membranas gustativas (figura 2). Como con GMP (figura 1E), adenosina 5'-carboxilato, adenosina 5'-monosulfato, teofilina, adenina, adenosina, AMPc y cafeína no bloquearon la activación de transducina por membranas gustativas estimuladas por DEN (figura 2).

Para determinar si el AMP, de forma diferente a GMP, disminuiría las respuestas gustativas a compuestos amargos, se llevaron a cabo pruebas de preferencia a dos botellas (Harder, D. B., *et al.*, 1989, *Chem. Senses* **14**:547-564) en ratones a los que se presentaron varios estimulantes del gusto $\pm$ AMP o GMP. El AMP, pero no el GMP, inhibieron las respuestas de aversión de los ratones a DEN (figuras 3A y 3B) y QUI (figuras 3C y 3D). El efecto inhibitor del AMP disminuyó gradualmente al aumentar la concentración del estimulante del gusto amargo y se eliminó a las concentraciones mayores de DEN y QUI probadas (5,0 y 1,0 mM, respectivamente) (figuras 3A-D). También se probaron algunos otros estimulantes del gusto que los seres humanos caracterizan como amargos [esparteína y (-) epicatequina (Glendinning, J. 1., 1994, *Physiol. Behav.* **56**:1217-1227)], dulces [sacarosa y el edulcorante artificial de gran potencia SC45647 (Nofre, C., *et al.*, inventores, Universidad Claude Bernard, Lyon 1, Francia, cesionario, "Sweetening Agents", Patente de los Estados Unidos 4921939, 1 de mayo, 1990)], agrios (HCl) o salados (NaCl) $\pm$ AMP. El AMP inhibió las respuestas de aversión a los dos compuestos amargos, esparteína y epicatequina, pero no afectó a las respuestas de comportamiento a sacarosa, SC45647, NaCl o HCl (figura 3E).

Para determinar si la inhibición de las respuestas de aversión a compuestos amargos por AMP era debida a la inhibición periférica del gusto (como predicen los datos bioquímicos de las figuras 1 y 2) se registraron respuestas acumuladas de los nervios glossofaríngeos de ratones (Ninomiya, Y., *et al.*, 1997, *Am. J. Physiol. (Londres)* **272**:R1002-R1006) a varios estimulantes del gusto $\pm$ AMP o GMP. El nervio glossofaríngeo inerva las células receptoras del gusto de la lengua posterior y en ratones responde a estímulos salados, dulces, agrios y amargos (Ninomiya, Y., *et al.* 1984, *Brain Res.* **302**:305-314). El AMP (0,1 mM) inhibió significativamente las respuestas nerviosas a DEN, QUI, esparteína, estricnina y atropina (figuras 4A-F). El GMP (0,1 mM) no tuvo efecto en las respuestas glossofaríngeas a ninguno de estos compuestos amargos (figura 4C). Las respuestas glossofaríngeas aumentaron al aumentar las concentraciones de QUI o DEN: el AMP (0,1 y 1,0 mM) inhibió significativamente estas respuestas nerviosas (figuras 4D-H). Por el contrario, el AMP no afectó a las respuestas nerviosas a NH₄Cl, HCl, NaCl o sacarosa (figura 4I), consistente con las respuestas de comportamiento. De forma interesante, aunque el AMP inhibió ligeramente las respuestas glossofaríngeas al edulcorante artificial SC45647 (figura 4I), no disminuyó las respuestas de comportamiento a este compuesto (figura 3E).

6.3 Discusión

El AMP y compuestos estrechamente relacionados inhibieron la activación *in vitro* de la transducina por membranas gustativas más DEN, QUI y algunos otros compuestos amargos. Este efecto era específico a los receptores heptahelicoidales que responden a lo amargo presumiblemente presentes en las membranas gustativas y no estaba producido por activación no específica o general de receptores similares a rodopsina. El AMP y compuestos similares también bloquearon las respuestas de comportamiento y de nervios gustativos a DEN, QUI y otros compuestos amargos, pero no afectaron las respuestas a NaCl, HCl o sacarosa. El AMP disminuyó las respuestas glossofaríngeas al edulcorante de gran potencia SC45647, aunque no afectó las respuestas de comportamiento a este compuesto. AMP, ADP, ATP, timidina 5'-monofosfato, ácido 5'-citidílico y ácido inosínico inhibieron todas las respuestas de receptores gustativos *in vitro*, mientras que el GMP no, lo que indica selectividad en la unión de estos compuestos. La rapidez en las acciones del AMP en los ensayos electrofisiológicos argumenta contra un sitio intracelular de acción y sugiere que probablemente el AMP actúe sobre un receptor de superficie celular. Sin embargo, los datos actuales no distinguen entre modos de acción competitivos y no competitivos del AMP sobre el receptor.

Las concentraciones altas de DEN, QUI y otros estimulantes del gusto amargos superaron la inhibición del AMP a las respuestas aversivas, lo que sugiere que el AMP actúa como un inhibidor competitivo o que los estimulantes del gusto amargos activaron otras vías de transducción amargas resistentes al AMP además de las vías mediadas por gustducina/transducina, consistente con la capacidad de respuesta residual a compuestos amargos en ratones deficientes en gustducina y transgénicos que expresan una forma mutada de gustducina que desorganiza la transducción de señales (Wong, G. T., *et al.*, 1996, *Nature (Londres)* **381**:796-800; Ming, D., *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:8933-8938). La existencia de múltiples vías de transducción amargas también está apoyada por la observación de que la inhibición por AMP de las respuestas glossofaríngeas a concentraciones crecientes de QUI alcanzó una meseta en la que las respuestas glossofaríngeas a QUI no se pudieron reducir más.

En estudios recientes, se ha determinado que ciertos edulcorantes artificiales inhiben la activación *in vitro* de receptores gustativos por DEN, QUI y otros compuestos amargos; estos edulcorantes también inhibieron las respuestas de comportamiento y de nervios gustativos a estos compuestos amargos acoplados a gustducina/transducina. Este fe-

nómeno de “supresión mezcla” dulce-amargo (Bartoshuk, L. M., 1975, *Physiol. Behav.* **14**:643-649; Formaker, B. K. & Frank, M. E., 1996, *Brain Res.* **727**: 79-90) se puede explicar en parte mediante la unión antagonista de edulcorantes a los mismos receptores dianas que unen compuestos amargos y puede estar relacionado con observaciones previas de similitudes químicas de edulcorantes de gran potencia y compuestos amargos de gran potencia (Lee, C. K., 1987, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **45**:199-351; Benedetti, E., *et al.*, 1995, *J. Pept. Sci.* **1**:349-359; Shin, W., *et al.*, 1995, *J. Med. Chem.* **38**:4325-4331 21-23). Múltiples líneas de evidencia implican a gustducina/transducina, sus receptores acoplados y enzimas efectoras (por ejemplo, fosfodiesterasas y fosfolipasa C) en la transducción de lo amargo (revisado en Kinnamon, S. C. & Margolskee, R. F., 1996, *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**: 506-513; Lindemann, B., 1996, *Physiol. Rev.* **76**: 719-766). Además de gustducina y transducina, las proteínas G G_s , G_{i3} y G_{i4} también están presentes en células receptoras del gusto (Kinnamon, S. C. & Margolskee, R. F., 1996, *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**: 506-513; McLaughlin, S. K., *et al.*, 1992, *Nature (Londres)* **357**:563-569) y pueden estar implicadas en la transducción del gusto. Los estudios bioquímicos y electrofisiológicos implican nucleótidos cíclicos, inositol trifosfato, diacilglicerol y Ca^{2+} como segundos mensajeros en la transducción del gusto amargo y/o dulce (Tonosaki, K. & Funakoshi, M., 1988, *Nature (Londres)* **331**:354-356; Behe, P., *et al.*, 1990, *J. Gen. Physiol.* **96**:1061-1084; Bernhardt, S. J., *et al.*, 1996, *J. Physiol. (Londres)* **490**: 325-336; Cummings, T. A., *et al.*, 1996, *J. Neurophysiol.* **75**:1256-1263; Spielman, A. I., *et al.*, 1996, *Am. J. Physiol.* **270**:C926-C931 24-28). Los datos bioquímicos y genéticos claramente implican a gustducina en la transducción de cualidades de sabor tanto amargas como dulces: (i) los ratones deficientes en gustducina tienen respuestas de comportamiento y de nervios gustativos marcadamente disminuidas a compuestos tanto amargos como dulces (Wong, G. T., *et al.*, 1996, *Nature (Londres)* **381**:796-800); (ii) una forma mutada de gustducina desorganizada en sus interacciones con receptores actúa como un dominante negativo para bloquear la capacidad de respuesta *in vivo* tanto a amargo como a dulce; (iii) estudios *in vitro* demuestran que las membranas bovinas que contienen receptores gustativos y receptores gustativos solubilizados activan gustducina/transducina en presencia de DEN, QUI y algunos otros compuestos amargos (Ming, D., *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:8933-8938); (iv) aunque los compuestos dulces no activan gustducina/transducina en este ensayo, los datos demuestran que ciertos edulcorantes bloquean la activación *in vitro* de gustducina/transducina y por lo tanto producen una “supresión mezcla” dulce-amargo.

Aunque los estudios bioquímicos y genéticos de proteínas G del gusto han proporcionado nuevas percepciones en la naturaleza molecular de las cascadas de transducción de lo dulce y lo amargo, los estudios físicos de los receptores gustativos implicados en la transducción amarga y dulce (Cagan, R. H. & Morris, R. W., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**:1692-1696; Shimazaki, K., *et al.*, 1986, *Biochim. Biophys. Acta* **884**:291-298) han sido de utilidad limitada debido a la escasez de material y a la falta de ligandos de alta afinidad. Los estimulantes del gusto amargos y dulces naturales típicos son activos en el intervalo de 10-500 mM, mientras que los estimulantes del gusto dulces o amargos más potentes tienen umbrales para la detección de 10-100 nM. La probabilidad de familias de receptores y vías independientes múltiples agrava más las dificultades de caracterizar receptores gustativos. Los análisis de relación estructura-actividad de edulcorantes de gran potencia han producido modelos de trabajo de la naturaleza física del bolsillo de unión del receptor (revisado en Roy, G., 1992, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **31**:59-77; Schiffrin S. S. & Gatlin, C. A., 1993, *Neurosci. Biobehav. Rev.* **17**:313-345); sin embargo, estos planteamientos están muy limitados por la posibilidad de la heterogeneidad de los receptores y múltiples vías independientes para la función edulcorante.

REIVINDICACIONES

1. Un método de inhibir el sabor amargo en una sustancia que puede entrar en contacto con tejido gustativo, seleccionada de alimentos, bebidas, fármacos, productos dentales, cosméticos, pegamentos humectables usados para sobres y sellos, jabones, champús y composiciones tóxicas usadas para control de plagas,

el método comprende incorporar en la sustancia de 1 a 50 mM de un compuesto seleccionado de adenosina 5'-monofosfato, timidina 5'-monofosfato, adenosina 5'-difosfato, adenosina 3'-monofosfato, adenosina 5'-succinato, adenosina 5'-trifosfato y adenosina 2'-monofosfato.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la sustancia es un alimento.

3. El método de la reivindicación 1, en donde la sustancia es una bebida.

4. El método de la reivindicación 1, en donde la sustancia es un fármaco.

5. El método de la reivindicación 1, en donde la sustancia es un cosmético.

6. El método de la reivindicación 1, en donde la sustancia es un jabón.

7. El método de la reivindicación 1, en donde la sustancia es un champú.

8. El método de la reivindicación 1, en donde la sustancia es un producto dental.

9. El método de la reivindicación 1, en donde la sustancia es un pegamento humectable usado para sobres y sellos.

10. El método de la reivindicación 1, en donde la sustancia es una composición tóxica usada en el control de plagas.

11. El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto es adenosina 5'-monofosfato.

12. El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en timidina 5'-monofosfato, adenosina 5'-difosfato, adenosina 3'-monofosfato, adenosina 5'-succinato, adenosina 5'-trifosfato y adenosina 2'-monofosfato.

13. El método de la reivindicación 1, en donde la sustancia comprende entre aproximadamente 1 y 20 mM del compuesto.

14. El método de la reivindicación 13, en donde la sustancia comprende entre aproximadamente 1 y 5 mM del compuesto.

15. El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto endulza la sustancia.



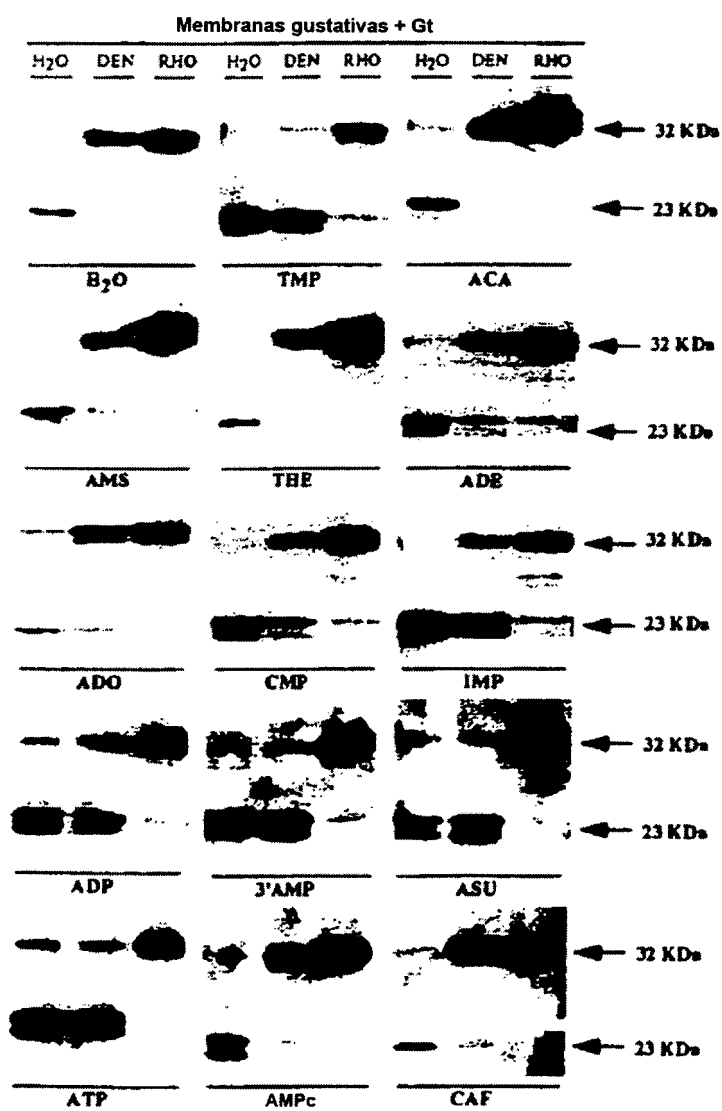


FIGURA 2

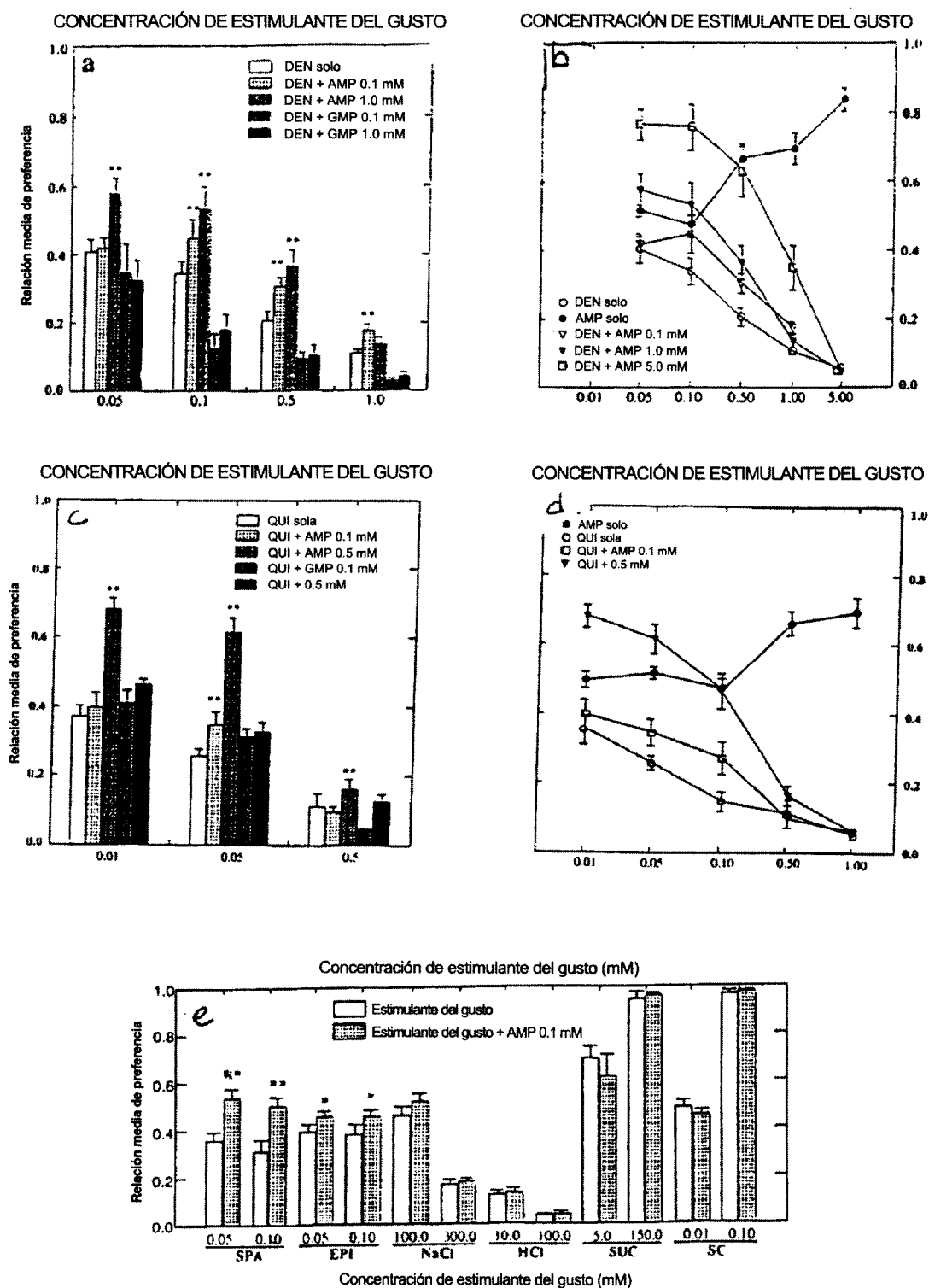


FIGURA 3A-E

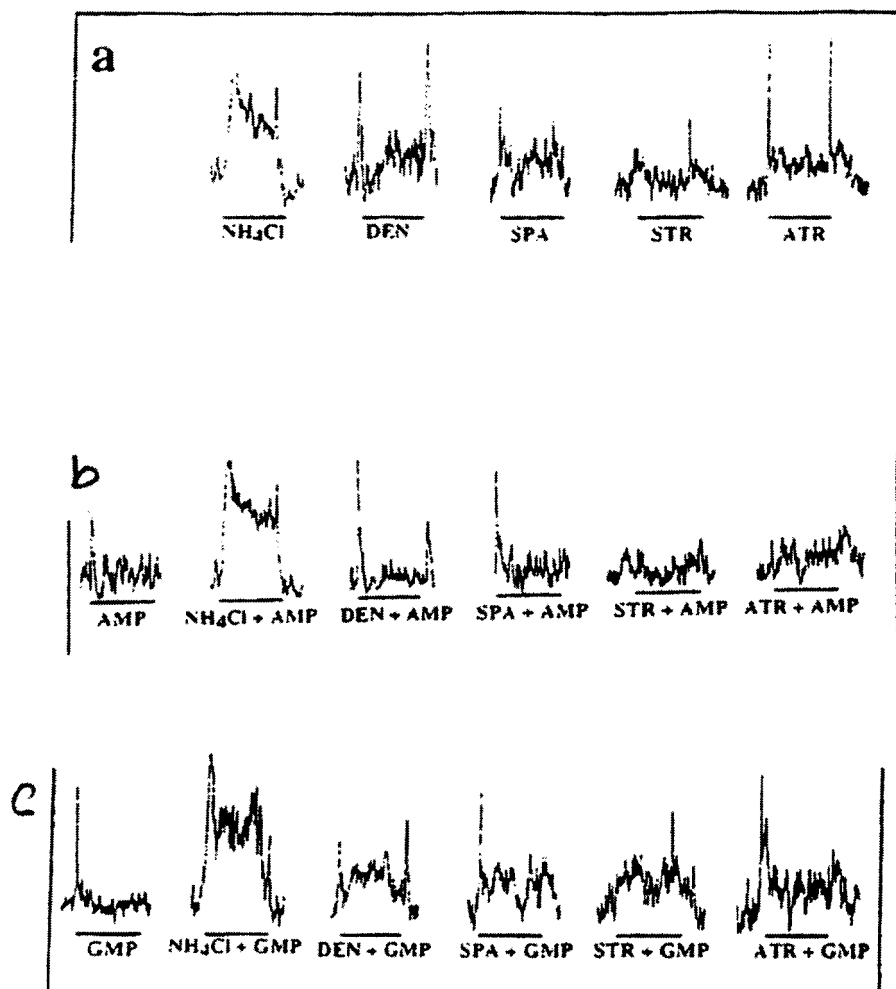


FIGURA 4A-C

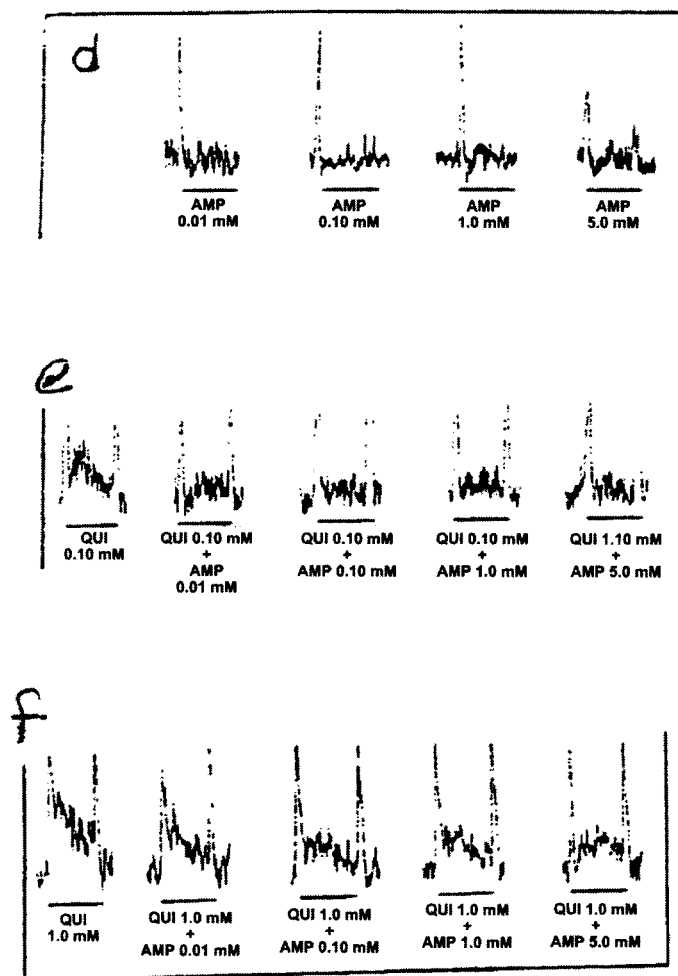


FIGURA 4D-F

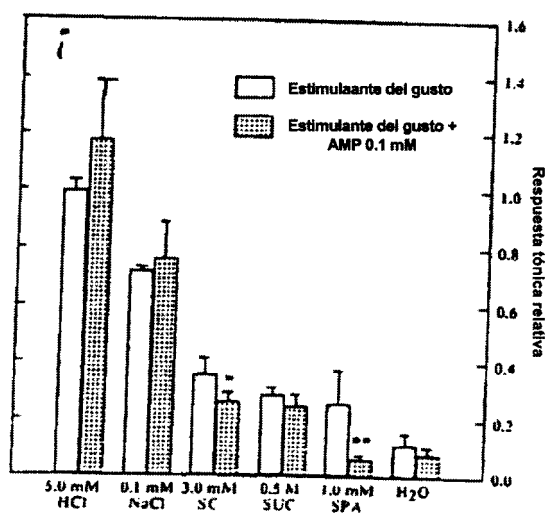
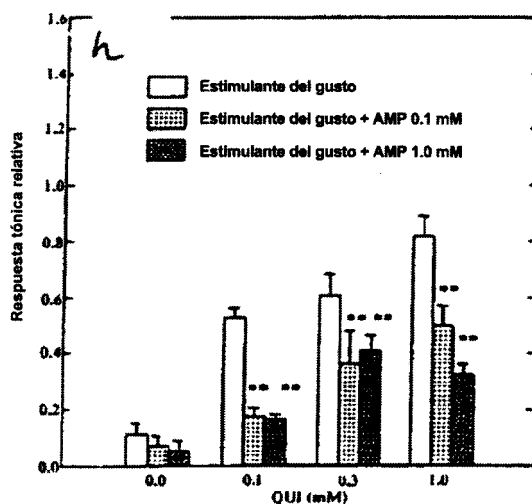
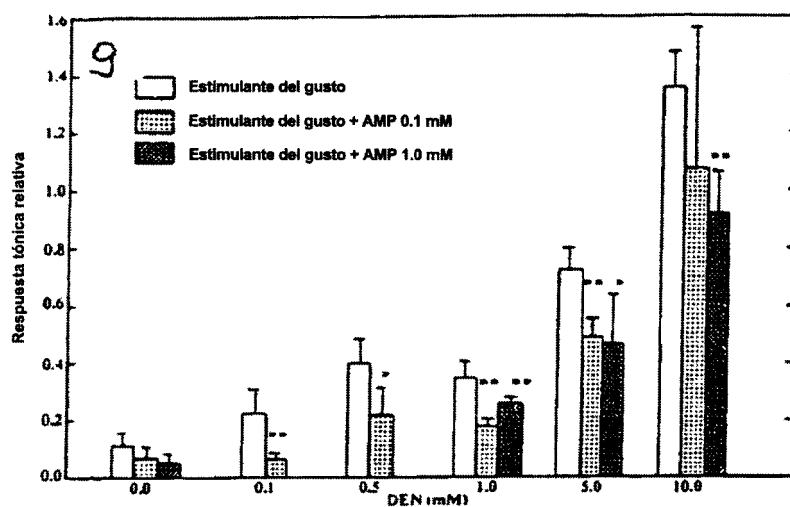


FIGURA 4G-I