

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 156**

51 Int. Cl.:
G01N 33/497 (2006.01)
H01J 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05758750 .3**
96 Fecha de presentación: **15.07.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1771726**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.04.2007**

54 Título: **MÉTODO PARA IDENTIFICAR O EVALUAR COMPUESTOS ÚTILES EN EL SECTOR DE LAS FRAGANCIAS Y LOS AROMAS.**

30 Prioridad:
21.07.2004 GB 0416239

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.11.2011

73 Titular/es:
GIVAUDAN SA
CHEMIN DE LA PARFUMERIE 5
1214 VERNIER-GENÈVE, CH

72 Inventor/es:
SCHILLING, Boris

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

ES 2 368 156 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

Método para identificar o evaluar compuestos útiles en el sector de las fragancias y los aromas

5 ANTECEDENTES

La presente invención se refiere a métodos de identificación o evaluación de compuestos útiles en el sector de las fragancias y los aromas (las partes volátiles del sabor). Los métodos, según la presente invención, tienen en cuenta la aparición de metabolismo enzimático en el tracto respiratorio humano, incluyendo la cavidad oral, en particular la cavidad nasal.

Los compuestos que alcanzan la cavidad nasal y ejercen un efecto particular, tal como la unión a receptores, que es un prerrequisito para percibir los estímulos olfativos, están cambiando constantemente su medio y las diferentes especificidades físico-químicas son ventajosas y desventajosas en cada fase de su vida útil. En primer lugar, el compuesto está en una base, por ejemplo, como parte de un aceite de fragancia, en la que se requiere una presión de vapor concreta para ser volátil. Dependiendo del tipo de liberación de olores (transferencia directa en el espacio de la cabeza, o dispersión, por ejemplo, aerosoles), son ventajosas diferentes propiedades para los constituyentes de la mezcla de perfume. Aunque a menudo es deseable una presión de vapor elevada, el compuesto debe ser capaz de disolverse fácilmente en el fluido de la mucosa nasal que cubre las células neuronales. Finalmente, el compuesto necesita unirse a proteínas receptoras y activar las mismas. Para la mayoría del recorrido desde la base al receptor, los compuestos odorantes parecen mantenerse sin cambios. Sin embargo, la situación parece ser más complicada.

Se ha especulado que el metabolismo hace que los compuestos odorantes sean inactivos para hacerlos más solubles en agua y facilitar su eliminación del epitelio nasal.

Además, se ha especulado que, para algunos ingredientes de las fragancias, el compuesto que es directamente responsable para la percepción del olor (el odorante) no es el propio ingrediente de la fragancia. En vez de ello, el ingrediente de la fragancia puede ser simplemente un precursor no odorante que forma, como metabolito, el odorante real que activa el receptor olfativo para dar lugar a la percepción olfativa. Dichos metabolitos odorantes se pueden formar enzimáticamente en el tracto respiratorio humano, en particular en el epitelio de la nariz humana.

El metabolismo de dichos precursores, que son sustratos de enzimas, puede tener lugar antes de la unión al receptor en la mucosidad fluida o en células que recubren la cavidad o puede tener lugar después de la activación del receptor. Esto puede cambiar sus diversas capacidades que influyen en la percepción del odorante, incluyendo sus propiedades físico-químicas (por ejemplo, solubilidad en el fluido de la mucosidad) y la activación del receptor. El metabolito o metabolitos pueden tener propiedades químicas y/o físicas que son ventajosas para la interacción con los receptores, otras enzimas y/o proteínas de unión a odorantes. Los sustratos pueden ser compuestos odorantes o compuestos no odorantes. En el caso de éstos últimos, uno o más metabolitos del sustrato pueden ser un odorante, y/o pueden tener las propiedades mencionadas anteriormente.

El metabolismo puede inactivar o activar ligandos de receptores. Los compuestos de interés pueden ser agonistas, antagonistas, sustratos de enzimas, inhibidores de enzimas, y reguladores alostéricos de receptores o enzimas. Los metabolitos pueden competir, por ejemplo, por la unión al receptor, interaccionar con receptores y enzimas adicionales, y/o modular la actividad y sensibilidad de receptores y enzimas. Los metabolitos generados a partir de sustratos de enzimas metabólicas pueden tener propiedades que les permiten interaccionar con receptores y enzimas y estos metabolitos pueden ser, de hecho, principalmente responsables de la cualidad percibida y los efectos de los ingredientes del sabor y fragancia y/o competir con sus sustratos para la interacción con receptores y, en particular, para la activación de receptores.

Sin embargo, el metabolismo que implica a los compuestos odorantes en el tracto respiratorio humano, en particular en la mucosa olfativa, no se ha observado *in vivo*.

La presente invención utiliza métodos analíticos conocidos para dar a conocer un método de identificación, análisis o evaluación de compuestos de prueba que es útil en el sector de las fragancias y los aromas.

Los compuestos útiles en el sector de las fragancias y los aromas pueden ser compuestos que son fragancias y aromas como tales, pero también pueden ser moduladores de su percepción. Los moduladores son compuestos que influyen en la percepción olfativa de compuestos odorantes. Un modulador puede dar lugar a cambios de intensidad (agente potenciador o enmascarante general), calidad (cambio de nota olfativa, potenciador o enmascarante de notas particulares), duración/longevidad de la percepción, o combinaciones de éstos. Un modulador puede aumentar la percepción global de un odorante particular o mezcla de odorantes, o una calidad/nota olfativa particular. Un modulador puede alcanzar estos efectos mediante la modulación, influencia o regulación de reacciones metabólicas en el tracto respiratorio. Un modulador puede aumentar o suprimir el metabolismo, por ejemplo, afectando directamente a la enzima. En lugar de influir en las enzimas, un modulador puede afectar (activar o bloquear) uno o más receptores para alcanzar un efecto potenciador o bloqueante/enmascarante, o influir en la calidad o nota

olfativa de la percepción. Un modulador puede alargar la “vida útil” o duración del efecto de un odorante dificultando o suprimiendo su metabolismo habitual y aumentando de este modo su intensidad o longevidad. Un compuesto que influye positivamente en la tasa de actividad enzimática causará un efecto potenciador similar, siempre que el sustrato que se metaboliza para formar su metabolito no sea odorante (o menos odorante) que su metabolito odorante. Los moduladores pueden suprimir el metabolismo que tiene lugar en el tracto respiratorio humano y/o cambiar la calidad olfativa de odorantes individuales.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método de identificar o evaluar compuestos, en el que el compuesto o, como mínimo, uno de sus metabolitos es un odorante, o un precursor de un odorante, o un modulador de la percepción de un odorante, que comprende

- a) Disponer un espacio para la cabeza saturado con un compuesto de prueba
- b) Inhalación de dicho espacio para la cabeza saturado por un individuo humano de prueba
- c) Emisión del aliento exhalado por el individuo humano de prueba
- d) Análisis del aliento exhalado a tiempo real por un método de detección seleccionado entre Metabo-GM, Metabospace y Espectrometría de Masas por Reacción de Transferencia de Protones (PTR-MS).

El espacio para la cabeza se puede disponer tal como se describe en los ejemplos descritos a continuación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En una realización particular, el compuesto se inhala y se exhala a través de la nariz. En otra realización, el compuesto se inhala a través de la boca. En otra realización particular, el compuesto se inhala a través de la boca y se exhala a través de la nariz. En otra realización, el compuesto se inhala y se exhala a través de la boca.

En otra realización particular, se utiliza Metabospace o PTR-MS. De manera sorprendente, el solicitante descubrió que los metabolitos de compuestos volátiles se detectan de manera instantánea utilizando estos métodos. Esto no pudo haberse predicho. En algunos casos, es incluso posible determinar localización de la enzima de biotransformación en el tracto respiratorio humano realizando los protocolos de inhalación/exhalación descritos anteriormente y analizando los resultados, tal como se muestra en los ejemplos descritos a continuación.

En otra realización particular, además del análisis mediante Metabo-GM, Metabospace y la Espectrometría de Masas por Reacción de Transferencia de Protones (PTR-MS), se puede realizar un análisis con un olfatómetro.

Mediante los métodos, según la presente invención, se pueden identificar los metabolitos que resultan de compuestos (sustratos) que son metabolizados por una enzima. Estos metabolitos pueden ser ellos mismos compuestos odorantes. Asimismo, los sustratos pueden ser ingredientes de fragancias que pueden ser odorantes por sí mismos, o pueden no ser odorantes o ser precursores débilmente odorantes que proporcionan una percepción de olor sólo después del metabolismo debido a su metabolito. Los precursores y metabolitos pueden tener una nota olfativa diferente. La nota olfativa real correspondiente a cierta estructura química es importante para la búsqueda de moléculas de partida. Los métodos que no tienen en cuenta el metabolismo pueden dar lugar a relaciones de estructura-función/nota olfativa incorrectas que dificultan una búsqueda correcta de moléculas de partida. Los métodos de la presente invención dan a conocer una búsqueda eficaz de moléculas de partida, ya que permiten que la búsqueda de moléculas de partida se base en estructuras correctas que activan el receptor y desencadenan la sensación olfativa, en lugar del compuesto precursor a partir del cual resulta el odorante. Para ilustrar esto, el compuesto “A” (ingrediente de fragancia) presenta una nota olfativa particular descrita por un perfumista. A se metaboliza en el compuesto “B” (odorante) en la nariz y B es responsable de la nota particular asociada, en general, con el compuesto A, mediante la activación de uno o varios receptores olfativos que se requieren para percibir la sensación olfativa descrita por el perfumista.

Se puede identificar un modulador por sus efectos en una reacción metabólica detectados mediante los métodos de la presente invención, es decir, cambiando (por ejemplo, aumentando o suprimiendo) la cantidad, la intensidad o la calidad de la percepción olfativa. Un modulador se puede identificar mediante un cambio en la cantidad de un compuesto odorante, el cual puede ser causado por la influencia del modulador en la velocidad del metabolismo, medida mediante la reducción de sustrato o la formación de metabolito por los métodos de análisis y detección descritos a continuación en la presente invención. Además, Los moduladores pueden cambiar la intensidad o la calidad olfativa de un único odorante, el cual se puede identificar o caracterizar mediante la utilización de un olfatómetro. Para ilustrar esto adicionalmente, se puede metabolizar parcialmente un compuesto precursor en la nariz humana para formar un compuesto metabolito, estando ambos compuestos presentes en la nariz en paralelo. Ambos compuestos pueden tener diferentes notas olfativas, las cuales pueden representar la amplia descripción olfativa asignada a algunos compuestos individuales de fragancias o aromas. La presente invención hace que la búsqueda de moléculas de partida con notas olfativas particulares sea más fácil y permite comparar notas olfativas, tanto de un compuesto determinado, como su potencial metabolito. En otra estrategia, se pueden comparar un compuesto de prueba y su metabolito en presencia y ausencia de compuestos que modulan el metabolismo.

Los métodos de detección y análisis descritos a continuación se pueden utilizar para identificar un supresor del metabolismo (por ejemplo, un inhibidor o sustrato competitivo de una enzima metabólica) de la siguiente manera. Se selecciona un sustrato patrón y se analizan los compuestos de prueba por su capacidad de influir o modular la formación del metabolito o metabolitos detectados con dichos métodos. Un supresor se identifica por la reducción en la formación de un metabolito o metabolitos de los sustratos inhalados en comparación con el control sin supresor. Un supresor puede ser un inhibidor o un sustrato competitivo. El término inhibidor pretende incluir compuestos que actúan como reguladores alostéricos negativos de la actividad enzimática. Un inhibidor y un sustrato competitivo se pueden diferenciar entre sí por la presencia o ausencia de señales resultantes de la formación de metabolitos adicionales formados mediante el metabolismo de un sustrato competitivo.

La presente invención también se puede utilizar como un método de evaluación para confirmar *in vivo* los datos que resultan del análisis *in vitro*, en particular ensayos *in vitro* que utilizan enzimas metabólicas del tracto respiratorio humano.

Métodos de detección y análisis

Los métodos de detección y análisis incluyen Metabo-GM, Metabospace, y Espectrometría de Masas por Reacción de Transferencia de Protones (PTR-MS). Se pueden combinar uno o más de estos métodos. En particular, se puede utilizar la PTR-MS adicionalmente a Metabospace.

Además de uno o más de Metabo-GM, Metabospace y PTR-MS, se puede realizar un análisis con olfatómetro para caracterizar adicionalmente los efectos de los moduladores.

Metabospace

La tecnología "Metabospace" permite la detección y el análisis en tiempo real de metabolitos (compuestos volátiles exhalados) generados *in vivo* partiendo de compuestos de interés. En primer lugar, un individuo del estudio inhala el espacio para la cabeza saturado de un compuesto volátil. El espacio para la cabeza saturado puede estar dispuesto tal como se describe en los ejemplos descritos a continuación. El aliento se exhala directamente en un embudo de vidrio, el cual actúa como interfaz con un dispositivo de análisis en el que se registra un espectro de masas mediante un espectrómetro de masas de cuadrupolo equipado con una fuente de iones para la ionización química a presión atmosférica (APCI) con un interfaz modificado que permite la medición de cambios dinámicos rápidos de compuestos volátiles tal como se describe en Grab, W., y Gfeller, H. en: ACS Symposium Series 763 - Flavor Release (Simposium ACS Serie 763 – Liberación de aromas) (Roberts, D.D., y Taylor, A.J., Eds.) American Chemical Society, Washington, DC (2002). El procedimiento se puede realizar, por ejemplo, tal como se describe en detalle en los ejemplos descritos a continuación.

Los barridos del espectro de masas detectan el rango completo de iones pseudomoleculares, así como iones de fragmentos de moléculas. Si los metabolitos candidatos son conocidos, por ejemplo, a partir de datos *in vitro*, el cromatograma de masas correspondiente al ion pseudomolecular se puede visualizar directamente junto con el cromatograma para el sustrato. La acetona siempre está presente en el aliento humano y se puede utilizar para mostrar el patrón de respiración. Los barridos del espectro de masas de compuestos volátiles exhalados de la cavidad nasal o de la cavidad oral se registran en intervalos de tiempo estrechos, por ejemplo dos veces por segundo, para seguir los cambios en la composición del aliento en función del tiempo y los ciclos de respiración. Normalmente, se realizan una serie de barridos para detectar otros iones que pueden estar unidos al sustrato y/o metabolitos, que pueden derivarse, por ejemplo, de fragmentos del sustrato y/o los metabolitos, tal como es conocido por un experto en la materia. Se realizan varios barridos del espectro de masas tal como se conoce en la técnica. En la presente invención, se registra una gran cantidad de barridos de espectro de masas mediante el espectrómetro de masas (por ejemplo, 2 barridos por segundo). El cromatograma de iones total (TIC) proporciona el total de señales. Las señales individuales, por ejemplo, el ion pseudomolecular $[M+H]^+$ para acetona a m/z 59, se pueden diferenciar y analizar con el tiempo en los denominados "cromatogramas de masas". Los metabolitos aparecen como señales adicionales en los barridos y se siguen las señales específicas con el tiempo en los cromatogramas de masas respectivos. Durante los primeros ciclos de inhalación/exhalación, los barridos se analizan por los iones que están presentes en las exhalaciones después de las inhalaciones del aire circundante (blanco, fondo) y no derivan del compuesto de prueba o de los metabolitos. Es bien conocido en la técnica cómo identificar señales desconocidas. Dependiendo de la química del compuesto de prueba y de las posibles reacciones metabólicas que pueden tener lugar, se espera que aparezcan iones particulares si tiene lugar dicho metabolismo. Para estrechar las posibilidades, se utiliza la hipótesis basada en el compuesto de prueba (sustrato de enzima) y las potenciales reacciones de biotransformación que dan lugar a metabolitos. Por ejemplo, los metabolitos que resultan de reacciones del compuesto de prueba con enzimas oxidantes que pertenecen al grupo de enzimas CYP pueden experimentar un metabolismo que incluye reacciones de hidroxilación o epoxidación, y, en general, se pueden hallar señales específicas para dichos metabolitos en el número m/z del sustrato más 16. Entre otras reacciones catalizadas por enzimas CYP se incluyen la desmetilación de un compuesto de prueba, por ejemplo, la desmetilación de grupos N-metilo u O-metilo (metoxi), y, en general, se pueden hallar señales específicas en el m/z del sustrato menos 14. Pueden tener lugar combinaciones de reacciones, tales como múltiples reacciones de

hidroxilación, una combinación de hidroxilación y desmetilación, etc. Es evidente para un experto en la materia cómo analizar estas señales para identificar el metabolito o metabolitos. Si no es posible una identificación definitiva en base a los derivados esperados y a las comparaciones con los datos de los espectros de masas contenidos en las bases de datos analíticos, se pueden sintetizar químicamente un conjunto de compuestos propuestos a efectos de confirmar la estructura hipotética del metabolito o metabolitos. Preferentemente, se confirma la formación de metabolitos mediante un método *in vivo* alternativo, tal como PTR-MS o METABO-GM. Dado que el material exhalado es absorbido en una resina en el caso de METABO-GM, es posible desorber los compuestos y aislar los componentes individuales mediante GC preparativa, y, posteriormente, los compuestos purificados se pueden analizar mediante resonancia magnética nuclear ($^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$) a efectos de elucidar su estructura química.

En la presente invención, los compuestos volátiles son presentados a un individuo del estudio para exhalar y se analiza el aliento exhalado (después de que el potencial metabolismo tenga lugar en el tracto respiratorio humano) mediante la realización de barridos en el espectro de masas que se registran dos veces por segundo. A esta velocidad, es posible seguir los cambios en la composición del aliento en función del tiempo y los ciclos de respiración.

Espectrometría de Masas por Reacción de Transferencia de Protones (PTR-MS)

La PTR-MS se utiliza habitualmente para el análisis de la liberación de aromas y el transporte retronasal de la cavidad oral a la nariz (por ejemplo, Ali y otros (2003) *In vivo* analysis of aroma release while eating food: a novel set-up for monitoring on-line nosespace air. (Análisis *in vivo* de la liberación de aromas mientras se comen alimentos: una nueva estrategia para el seguimiento en línea del aire del espacio nasal) En: 1st International Conference on Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry and Its Applications (1ª Conferencia internacional sobre la Espectrometría de Masas por Reacción de Transferencia de Protones y sus aplicaciones), 2ª Edición (A. Hansel, T. Märk, Eds.) pág. 161-164).

En el contexto de la presente invención, la PTR-MS no sólo permite la detección de compuestos en tiempo real, sino que también se puede utilizar directamente el recuento medido de los compuestos individuales para determinar las concentraciones absolutas del espacio para la cabeza. La PTR-MS se puede llevar a cabo tal como se ha descrito anteriormente en la presente invención para Metabospace.

La PTR-MS es un detector de compuestos orgánicos volátiles y existen diferentes versiones disponibles de dicho dispositivo (IONICON Analytik GmbH, Innsbruck, Austria). El dispositivo consiste principalmente de tres partes, la fuente de iones que convierte el vapor de agua por descarga de plasma en iones H_3O^+ ; un tubo de deriva donde tienen lugar las reacciones de transferencia de protones para rastrear los componentes en el aire, y el detector de iones que proporciona la detección sensible de los iones seleccionados por la masa.

De manera similar a la APCI utilizada en Metabospace, la transferencia de protones da lugar a la formación de un ion pseudomolecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ que se analiza en un espectrómetro de masas de cuadrupolo situado al final del dispositivo. La tecnología, especificidades y características se describen en detalle en Lindinger y otros (1998) *Int. J. Mass Spectrometry and Ion Processes* 173:191. On-line analysis of volatile organic compounds at pptv levels by means of Proton-Transfer-Reaction Mass Spectrometry (PTR-MS) Medical applications, food control and environmental research (Análisis en línea de compuestos orgánicos volátiles a nivel de pptv mediante Espectrometría de Masas por Reacción de Transferencia de Protones (PTR-MS). Aplicaciones médicas, control de alimentos e investigación medioambiental); y las referencias en la misma.

Metabo-GM

Los compuestos exhalados se atrapan en una resina, seguido de la desorción del material unido y el análisis mediante cromatografía de gases, unido a espectrometría de masas (GCMS).

Un individuo del estudio inhala un especio para la cabeza saturado de un compuesto conocido y el aire exhalado se atrapa en una resina adsorbente apropiada que está contenida en un tubo de vidrio que está conectado directamente a, como mínimo, un orificio nasal.

Las resinas adecuadas son Tenax™ TA (Scientific Instrument Services Inc., Estados Unidos), que es una resina polimérica porosa basada en óxido de 2,6-difenileno y Tenax™ GR (Scientific Instrument Services Inc., Estados Unidos), que es un material compuesto de Tenax™ TA y un 30% de grafito. En lugar de estas resinas concretas, se puede utilizar cualquier resina capaz de atrapar compuestos volátiles del aire, los cuales se pueden analizar fácilmente con los compuestos de prueba por el experto en la materia.

Se utiliza un tubo de vidrio de diámetro externo apropiado, por ejemplo, aproximadamente 16 mm de diámetro. Dicho tubo se rellena con una resina (por ejemplo, 0,2-2 gramos, preferentemente 0,5 gramos, dependiendo del volumen de aire exhalado a analizar) y lana de vidrio tratada con silano (Supleco, Estados Unidos). Dicha lana se utiliza en ambas caras de la resina para mantener la resina en el centro del tubo (el tubo de vidrio necesita ajustar el adaptador al Termoextractor tal como se describe a continuación, el cual define el diámetro externo requerido).

Se bloquea uno de los orificios nasales del individuo del estudio. A través del orificio nasal abierto, el individuo del estudio inhala el compuesto de prueba y exhala a través de un tubo que contiene la resina. De manera alternativa, ambos orificios nasales están conectados al tubo, o el tubo está conectado al vacío y el aire exhalado se canaliza a través de un embudo de vidrio para ser adsorbido en la resina.

Los individuos del estudio entrenados normalmente son capaces de inhalar/exhalar un volumen bastante constante. Para asegurar un volumen constante, se pueden conectar fácilmente bolsas de plástico de diferentes tamaños a la salida del tubo de vidrio a efectos de controlar el volumen de aire exhalado. De manera opcional, se instala un medidor de flujo para controlar la velocidad de exhalación además del volumen del volumen (existen bolsas adecuadas para el control del volumen, por ejemplo, Restek Corp., Estados Unidos).

En una primera etapa, el compuesto de prueba se coloca en un recipiente, por ejemplo, un recipiente de vidrio de un volumen de 0,25-2 litros, preferentemente 0,5-1 litros.

En una segunda etapa, el espacio para la cabeza saturado se inhala lentamente y el aire exhalado se atrapa tal como se ha descrito anteriormente. Esta etapa se repite varias veces para incrementar la concentración del compuesto volátil y los metabolitos en la resina de adsorción. La velocidad de repetición óptima necesita ajustarse a cada compuesto de prueba dependiendo de la presión de vapor y la extensión del metabolismo.

En una tercera etapa, se utiliza un Termoextractor (por ejemplo, de GERSTEL, Alemania) para transferir los compuestos atrapados en la resina a un tubo de análisis de diámetro más pequeño (por ejemplo, aproximadamente de 6 mm, que se ajusta al adaptador del Termoextractor y cumple las normas para la carga en el auto-muestreador). El tubo de análisis se puede cargar en un auto-muestreador en el análisis posterior. Esta etapa también elimina el agua de la muestra que pueda interferir con el análisis posterior.

En la cuarta etapa, el tubo de análisis se coloca en un auto-muestreador (por ejemplo, Automuestreador de Termodesorción TDS-A, GERSTEL, Alemania) y se inicia una secuencia de análisis controlada por ordenador.

El análisis comprende 3 etapas.

En primer lugar, la muestra se criofocaliza en el alineador de inyección de GC mediante la desorción térmica de los compuestos unidos a resina (por ejemplo, sistema de Termodesorción TDS, GERSTEL, Alemania) y se concentra en un Cryo-Trap (por ejemplo, Sistema de Inyección Enfriada CIS (del inglés, "Cooled Injection System"), enfriado con nitrógeno líquido, GERSTEL, Alemania) para un posterior calentamiento y transferencia a la columna de separación.

A continuación, los compuestos contenidos en la muestra se separan mediante GC (por ejemplo, Hewlett Packard Modelo 5890, equipado con una columna DB-Wax, Macherey-Nagel, Alemania) y se analizan mediante espectrometría de masas (por ejemplo, Hewlett Packard Modelo 5972). La columna de GC se selecciona según las propiedades de separación requeridas en vista de los compuestos de interés, tal como se conoce en la técnica.

Por último, los patrones de MS de los compuestos detectados se comparan con las bases de datos para determinar la estructura química de los compuestos.

De manera alternativa, los compuestos ya conocidos como moduladores de la actividad enzimática de las enzimas de biotransformación (por ejemplo, supresores), o compuestos que se demuestran que lo son mediante los métodos de la invención descritos anteriormente en la presente invención, se inhalan de forma simultánea o antes de la inhalación del compuesto de prueba de interés. Dado que el compuesto de prueba y sus metabolitos se detectan mediante Metabo-GM, este método permite la determinación de la extensión del metabolismo y la influencia de los moduladores de la enzima de biotransformación *in vivo*.

Los moduladores, supresores, potenciadores que han sido identificados por cualquiera de los métodos descritos anteriormente se pueden analizar por su efecto en la percepción de compuestos y mezclas de fragancias individuales utilizando un Olfatómetro de Cascada, tal como se describe a continuación.

Análisis con olfatómetro

Mediante la utilización de un olfatómetro se puede conseguir una concentración concreta de odorante mediante la dilución de una fase vapor saturada.

Los olfatómetros, particularmente el tipo de Olfatómetro descrito en el documento EP0883049, se pueden utilizar para identificar un compuesto de prueba como modulador de la percepción de compuestos de fragancias y aromas. Se puede utilizar para evaluar los cambios en la intensidad (umbral) y la calidad. Se utiliza para determinar las influencias de los moduladores en la percepción olfativa, particularmente cuando se evalúan los moduladores del metabolismo de odorantes o antagonistas de los receptores.

Un individuo del estudio huele un compuesto de prueba determinado a una concentración concreta desde un puerto de esnifado (por ejemplo, un embudo de vidrio) del olfatómetro y se califica la intensidad y calidad del olor. Se utilizan diferentes diluciones del espacio para la cabeza saturado del compuesto de interés (la dilución puede ser con aire, preferentemente con aire seco). Aunque también se puede utilizar aire húmedo, a menudo parece ser negativo para la percepción olfativa. De manera alternativa, una cámara de mezcla permite añadir un segundo compuesto (por ejemplo, para identificar un modulador) al espacio para la cabeza diluido alcanzando el puerto de esnifado.

El olfatómetro de cascada utiliza más de un olfatómetro de manera simultánea. Uno proporciona una referencia mientras que un segundo proporciona el compuesto de prueba a una concentración diferente o en combinación con un segundo compuesto de prueba a analizar por sus efectos en el primero. La referencia puede ser, por ejemplo, un patrón de un olor particular, un compuesto de prueba utilizado en una concentración fijada, una mezcla de olores concretas, o una mezcla concreta de olor y modulador. El segundo compuesto de prueba puede ser un modulador potencial o un compuesto a analizar por los efectos enmascarantes, bloqueadores o potenciadores.

El análisis con el olfatómetro es particularmente de interés en los métodos de la presente invención después de haber realizado los métodos de detección y análisis descritos anteriormente en la presente invención, y cuando la calidad sensorial y/o cantidad (intensidad; umbral olfativo) de sustrato y metabolito son diferentes. El análisis con el olfatómetro se realiza de la siguiente manera: Durante el análisis, varía la concentración de los compuestos de prueba (por ejemplo, un sustrato determinado y un modulador potencial). Si se conocen varios sustratos de la misma enzima de biotransformación, éstos se pueden analizar para su confirmación, tal como se describe a continuación. Para ser capaz de validar el efecto sensorial causado por el modulador, el compuesto de prueba (sustrato o metabolito o metabolitos respectivos o ambos) deben ser compuestos odorantes. Se evalúan la concentración e intervalos para los compuestos de prueba antes de llevar a cabo los experimentos con un conjunto de individuos del estudio. Se les pide a los individuos del estudio que huelan una serie de muestras alteradas al azar mediante el puerto de esnifado y que califiquen ya sea la intensidad y/o la calidad de la muestra presentada. Esto se puede realizar de manera eficiente mediante un protocolo controlado por ordenador. También se les puede pedir a los individuos del estudio que comparen éstas con una "muestra patrón" que se proporciona a través de un segundo puerto de esnifado y que indiquen las diferencias.

Se pueden utilizar diferentes protocolos de evaluación sensorial para describir la cantidad (intensidad) y/o calidad y/o efectos de los compuestos de prueba, olores patrón, mezclas de olores, etc. Un protocolo bien conocido por los expertos en la materia es el protocolo de escalas de magnitudes marcadas (LMS, del inglés "labeled-magnitude scales"), en el que se pide a los individuos del estudio que indiquen sus calificaciones, tal como se conoce en el sector del análisis sensorial. El LMS es una escala semántica de intensidad perceptiva caracterizada por una escala cuasi-logarítmica de sus etiquetas verbales, tal como se ha descrito por Green y otros (1996) *Chemical Senses* (Sentidos químicos) 21: 323-334. Las posiciones de las etiquetas verbales en el LMS, como porcentaje de la longitud completa de la escala, son: apenas detectable, 1,4; débil, 6,1; moderado, 17,2; fuerte, 53,2; lo más fuerte imaginable, 100.

El protocolo de diferencia mínima perceptible (JND), (del inglés, "just-noticeable-difference") también se utiliza en el sector del análisis sensorial y es fácilmente adaptable para evaluar los efectos descritos en la presente invención por un experto en psicofísica sensorial. Se les pide a los individuos del estudio que comparen los estímulos presentados que contienen un compuesto de prueba con un estímulo que ha sido presentado previamente en el estudio, o con un estímulo que es presentado de manera simultánea en un segundo olfatómetro (la referencia). Se prefiere el dispositivo de Olfatómetro de Cascada donde se utilizan de manera simultánea dos olfátómetros, proporcionando uno la referencia. El procedimiento completo en el protocolo JND está controlado por ordenador y se les pide a los individuos del estudio que indiquen sus calificaciones de un estímulo presentado con respecto a la referencia. Las posibles respuestas con respecto a la intensidad relativa se presentan como puntos de referencia en una escala (por ejemplo, "igual", "más débil", "mucho más débil", "más fuerte", "mucho más fuerte") y los individuos del estudio marcan con el ratón la respuesta con respecto a la intensidad del estímulo presentado (por ejemplo, el compuesto de prueba, una mezcla, el compuesto de prueba con modulador, etc.) a lo largo de la escala que se visualiza en la pantalla del ordenador.

Los compuestos moduladores (por ejemplo, supresores del metabolismo y, en particular, inhibidores de enzimas metabólicas) se identifican por su efecto dependiente de la dosis sobre la intensidad y/o calidad de los odorantes. Estos odorantes pueden ser, por ejemplo, sustratos de dichas enzimas de biotransformación. Caracterizados por sus efectos identificados mediante el análisis con el olfatómetro, los moduladores pueden ser, por ejemplo, agentes enmascarantes que enmascaran la percepción de un compuesto de prueba particular o una composición de compuestos de prueba, o una cualidad olfativa concreta de un compuesto de prueba. Un modulador identificado mediante el análisis con el olfatómetro puede ser un compuesto de prueba o un metabolito del mismo. Además, un modulador identificado durante el análisis con el olfatómetro puede influir en la percepción de un compuesto de prueba en uno o varios niveles, tales como, por ejemplo, a nivel del metabolismo (modulador de actividad enzimática), a nivel de receptores olfativos (el modulador es un agonista, o un antagonista = bloqueador, o un regulador alostérico) y/o a nivel de la cascada de transducción de señales (modulador de la actividad de los componentes de la cascada de transducción de señales, por ejemplo, el canal CNG).

Por ejemplo, se les pide a los individuos del estudio que califiquen la intensidad de un compuesto de prueba volátil odorante cuando se presenta al azar con diferentes concentraciones (diluciones de espacio para la cabeza saturado) de un segundo compuesto de prueba. Preferentemente, el segundo compuesto de prueba se elige entre compuestos sin olor, o un compuesto con un umbral de olor elevado. De este modo, este segundo compuesto de prueba sin olor/con un olor débil se puede identificar como un modulador, por ejemplo, por su influencia en la intensidad percibida del compuesto de prueba odorante.

En otro ejemplo, dicho segundo compuesto de prueba se puede identificar como modulador por su capacidad de alterar la calidad de otro compuesto de prueba odorante volátil.

Los efectos identificados de los compuestos de prueba (por ejemplo, la actividad modulante) se pueden utilizar para definir estructuras candidatas a efectos de diseñar, buscar e identificar derivados útiles para el sector de los odorantes.

La elección de los odorantes que son, por ejemplo, sustratos de enzimas de biotransformación, puede ser crítica para el éxito del procedimiento de evaluación y el conocimiento sobre las propiedades físico-químicas, tales como la presión de vapor, umbral de percepción olfativa, logP (clogP) es indispensable, y las tecnologías requeridas para realizar las mediciones apropiadas son obvias para el experto en la materia.

Moléculas de partida

Después de identificar un compuesto mediante un método según la presente invención, los compuestos de prueba identificados (que pueden ser, por ejemplo, sustratos o metabolitos o moduladores de una enzima metabólica) se pueden utilizar como moléculas de partida y se pueden sintetizar derivados a efectos de encontrar compuestos útiles de calidades de interés deseadas particulares. Los derivados se utilizan de nuevo como compuestos de prueba en un método, según la presente invención, tal como se ha descrito anteriormente en la invención. El procedimiento se puede repetir hasta identificar un compuesto de una nota olfativa de interés particular deseada, o un efecto ventajoso particular en combinación con otros compuestos odorantes. Los compuestos de interés pueden ser compuestos odorantes por sí mismos, o pueden presentar un efecto en la percepción olfativa. Los compuestos pueden ser metabolitos o sus precursores de odorantes, los compuestos pueden mejorar la acción de los odorantes, o suprimir o enmascarar la percepción de notas de compuestos odorantes olfativos no deseados. Estos últimos, que tienen un efecto sobre la percepción olfativa, pueden presentar o no un olor por sí mismos.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Procedimiento general que utiliza Metabospace

El Metabospace se realiza tal como se describe a continuación.

Se prepara un espacio para la cabeza A saturado de un compuesto de prueba puro. Para compuestos líquidos, esto se consigue mojando 5 tiras de papel secante en el compuesto de prueba y colocándolas en una matraz de vidrio (volumen de 250 ml) cerrado con un tapón de vidrio y permitiendo que se equilibre durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los compuestos sólidos se pueden añadir fácilmente al matraz de vidrio, preferentemente en forma de un área superficial grande.

A efectos de asegurar que el compuesto de prueba es puro y no contiene contaminantes, dependiendo del origen, el compuesto de prueba puede tener que purificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía "flash".

Para registrar las señales de base que están presentes en el aliento de cada individuo del estudio, el individuo del estudio inhala el aire circundante y exhala en un embudo de vidrio que sirve como interfaz en la cámara de ionización de un APCI-MS. Esta inhalación/exhalación continúa aproximadamente 30 veces sin separar la nariz del embudo.

Posteriormente, el individuo del estudio inhala el espacio para la cabeza saturado preparado que contiene el compuesto de prueba A a través de la nariz y exhala a través de la nariz directamente al embudo de vidrio en el dispositivo. Sin separar la nariz del embudo, se continúa la inhalación/exhalación 30 veces.

Después de una pausa de 5 minutos, el individuo exhala de nuevo 30 veces en el embudo para mostrar los cambios en la exhalación de base en comparación con la base registrada en el inicio.

Esto se repite de nuevo después de 15 minutos, en cuyo momento la base (que carece de la señal resultante del sustrato y el metabolito) es idéntica o muy similar al primer registro base antes de la exposición al compuesto de prueba.

A efectos de seguir el patrón de respiración y la presencia de compuestos de interés, tales como el sustrato y un metabolito, se analizan los cromatogramas de masa particulares.

5 Para identificar el metabolito del compuesto de prueba A en tiempo real tal como se produce en la nariz humana, se analizan las abundancias relativas de los siguientes iones pseudomoleculares: acetona ($[M+H]^+$ a m/z 59) que siempre está presente en el aire exhalado de los seres humanos, el compuesto de prueba ($[M+H]^+$ elegido según sea apropiado), su metabolito o metabolitos ($[M+H]^+$ elegido según sea apropiado); y el cromatograma de iones total (TIC) del espectro de masas registrado (2 barridos por segundo).

10

Ejemplo 2:

Compuesto de prueba 2-metoxiacetofenona

15

El procedimiento se realiza tal como se describe en el ejemplo 1 con 2-metoxiacetofenona como compuesto de prueba individuo a las siguientes modificaciones:

20

A efectos de empezar con una muestra que no contenga 2-hidroxiacetofenona como contaminante, se purificó adicionalmente la calidad disponible comercialmente (Fluka, Buchs, Suiza) mediante cromatografía súbita.

El análisis, tal como se describe en el ejemplo 1, muestra la siguiente inhalación de 2-metoxiacetofenona que se detecta a m/z 151, a m/z 137 se detecta un compuesto que corresponde a 2-hidroxiacetofenona.

25

Ejemplo 3:

Compuesto de prueba 2-metoxiacetofenona, diferentes protocolos de inhalación/exhalación

30

El procedimiento se realiza, tal como se describe en el ejemplo 2, con 2-metoxiacetofenona como compuesto de prueba individuo a las siguientes modificaciones.

35

El protocolo de inhalación/exhalación se ajustó de la siguiente manera. Se inhalaron aire de la habitación (control) o espacio para la cabeza saturado de 2-metoxiacetofenona a través de la nariz o a través de la boca y se exhalaban a través de la nariz o la boca. Se analizan dos de las cuatro posibles variantes para el compuesto de prueba y el aire de la habitación = control. En la primera variante, la inhalación y la exhalación tienen lugar ambas a través de la boca. En la segunda variante, la inhalación tiene lugar a través de la boca y la exhalación a través de la nariz.

40

Con respecto al control, ninguno de estos protocolos de inhalación/exhalación produjo el fragmento de masa indicativo de la presencia de 2-hidroxiacetofenona (el metabolito).

Para el compuesto de prueba, existe una clara diferencia entre los protocolos de respiración.

En la primera variante, no se detectó señal correspondiente al metabolito.

45

En la segunda variante, la presencia de una señal (m/z 137) indica la formación de 2-hidroxiacetofenona (metabolito).

50

Esto demuestra que el metabolismo del tracto respiratorio de la 2-metoxiacetofenona tiene lugar predominantemente como resultado de la actividad enzimática en la cavidad nasal.

Ejemplo 4:

Comparación de la liberación de 2-hidroxiacetofenona en aliento exhalado con la 2-metoxiacetofenona exhalada: análisis de las intensidades de señal, liberación retardada.

55

El procedimiento se realiza tal como se describe en el ejemplo 2. Se analizan las intensidades de las señales del cromatograma de masas específicas para el sustrato 2-metoxiacetofenona y para la 2-hidroxiacetofenona (metabolito) y sus disminuciones en función del tiempo (ciclos de inhalación/exhalación).

60

La intensidad de la señal específica para 2-metoxiacetofenona (m/z 151) disminuye de forma relativamente rápida, en aproximadamente 30 ciclos de inhalación/exhalación, mientras que la señal específica para el metabolito 2-hidroxiacetofenona (m/z 137) está aún próxima a la intensidad máxima después de 30 registros de inhalación/exhalación.

65

El efecto de retardo detectado puede ser debido a mayor solubilidad en agua del metabolito que se forma en el moco acuoso, dando lugar a un periodo de tiempo prolongado durante el que se exhala el metabolito.

Ejemplo 5:**Compuesto de prueba cetanona (metil-frambuesa cetona)**

5 El procedimiento se realiza tal como se describe en el ejemplo 2, con cetanona (metil-frambuesa cetona) como compuesto de prueba.

10 El análisis de las señales muestra que después de la inhalación de la cetanona que se detecta a m/z 179, se detecta un compuesto a una m/z 165 que corresponde a 4-(4-hidroxifenil)-2-butanona (cetona de frambuesa) (metabolito). Se cree que esto es debido a la desmetilación del grupo metoxi del compuesto de prueba por las enzimas presentes en el tracto respiratorio. La 4-(4-hidroxifenil)-2-butanona (cetona de frambuesa) es un compuesto característico para el aroma de frambuesa y tiene un umbral olfativo muy bajo. La cetanona se describe por tener cierto carácter de frambuesa, aunque es significativamente menos intenso (Winter (1961) Helv. Chim. Acta 44:2110).

15 El ejemplo se repite tal como se describe en el ejemplo 4 y se analizan las intensidades de las señales. Se observa una liberación retardada del metabolito más hidrofílico con respecto al sustrato.

20 Se cree que el aspecto de la cetanona de frambuesa descrito no es debido a la cetanona, sino que deriva de la percepción de pequeñas cantidades de su metabolito que es un ingrediente característico de umbral bajo en el aroma de frambuesa. De manera alternativa, el sustrato puede ya presentar un aroma de frambuesa débil (umbral olfativo más elevado).

Ejemplo 6A:**Supresor de enzima que metaboliza la 2-metoxiacetofenona**

25 El procedimiento se realiza tal como se describe en el ejemplo 2 individuo a las siguientes modificaciones: se inhala un compuesto supresor volátil (inhibidor de la enzima metabólica nasal CYP2A13) inmediatamente antes de la inhalación del compuesto de prueba 2-metoxiacetofenona.

30 El individuo del estudio realiza tres pruebas en una fila: (1) compuesto de prueba solo; (2) supresor seguido de compuesto de prueba; (3) compuesto de prueba solo. Antes y entre las pruebas, se registran blancos de control (inhalación de aire de habitación y registro de 30 ciclos de inhalación/exhalación)

35 En las pruebas 1 y 3, el análisis muestra una señal intensa a m/z 137 correspondiente a cantidades significativas de hidroxiacetofenona (metabolito).

40 En la prueba (2), la señal m/z 137 (metabolito) es menor en comparación, demostrando que se forma considerablemente menos metabolito en presencia del supresor.

Ejemplo 6B:**Supresor de enzima que metaboliza cetanona**

45 El procedimiento se realiza tal como se describe en el ejemplo 6A, aunque como compuesto de prueba se utiliza cetanona y se detectan la cetanona y su metabolito 4-(4-hidroxifenil)-2-butanona (cetona de frambuesa) tal como se describe en el ejemplo 5.

50 Los resultados son análogos al ejemplo 6A. La prueba con supresor muestra una intensidad de señal significativamente disminuida para el metabolito 4-(4-hidroxifenil)-2-butanona (cetona de frambuesa).

Ejemplo 7:**Metabo-GM, procedimiento general**

55 Los compuestos exhalados se atrapan en una resina, seguido de la desorción del material unido y el análisis mediante cromatografía de gas, unido a espectrometría de masas (GCMS).

60 Un individuo del estudio inhala un espacio para la cabeza saturado de un compuesto conocido y el aire exhalado se atrapa en una resina Tenax™ TA.

65 Se utiliza un tubo de vidrio de 16 mm de diámetro. Dicho tubo se rellena con aproximadamente 0,5 gramos de resina y lana de vidrio tratada con silano (Supelco, Estados Unidos). Dicha lana se utiliza en ambas caras de la resina para mantener la resina en el centro del tubo.

Un individuo del estudio inhala el compuesto de prueba y exhala lentamente a través de un tubo que contiene la resina. Esto se consigue fácilmente bloqueando uno de los orificios nasales y exhalando unilateralmente a través de un tubo conectado al orificio nasal abierto. Los individuos del estudio entrenados capaces de inhalar/exhalar un volumen bastante constante. En una primera etapa, el compuesto de prueba se coloca en un recipiente de aproximadamente 0,75 litros. En una segunda etapa, el espacio para la cabeza saturado se inhala lentamente y el aire exhalado se atrapa utilizando la resina. Esta etapa se puede repetir, por ejemplo, aproximadamente 30 veces, para incrementar la concentración de los compuestos volátiles y los metabolitos en la resina de adsorción. La velocidad de repetición óptima debe ajustarse para cada compuesto de prueba dependiendo de la presión de vapor y la extensión del metabolismo. En una tercera etapa, se utiliza un Termoextractor (GERSTEL, Alemania) para transferir los compuestos atrapados en la resina a un tubo de análisis de un diámetro más pequeño (aproximadamente 6 mm se ajustan al adaptador del Termoextractor y cumple con las normas para una carga con automuestreador). El tubo de análisis se carga en un automuestreador en el posterior análisis. Esta etapa también elimina el agua de la muestra que pueda interferir con el posterior análisis. En la cuarta etapa, el tubo de análisis se coloca en un automuestreador (Automuestreador de Termodesorción TDS-A, GERSTEL, Alemania) y se inicia una secuencia de análisis controlada por ordenador.

Dicho análisis comprende 3 etapas. En primer lugar, la muestra se criofocaliza en el alineador de inyección de GC mediante la desorción térmica de los compuestos unidos a resina (sistema de Termodesorción TDS, GERSTEL, Alemania) y se concentra en un Cryo-Trap (Sistema de Inyección Enfriada CIS enfriado con nitrógeno líquido, GERSTEL, Alemania) para un posterior calentamiento y transferencia a la columna de separación.

A continuación, los compuestos contenidos en la muestra se separan mediante GC (Hewlett Packard Modelo 5890, equipado con una columna DB-Wax, Macherey-Nagel, Alemania) y se analizan mediante espectrometría de masas (Hewlett Packard Modelo 5972). Por último, los patrones de MS de los compuestos detectados se comparan con las bases de datos para determinar la estructura química de los compuestos.

Ejemplo 8:

Metabo-GM, 2-metoxiacetofenona

El procedimiento se realiza tal como se describe en el ejemplo 7 con 2-metoxiacetofenona como compuesto de prueba

Como control, el espacio para la cabeza del compuesto de prueba se aspira directamente sobre la resina. Sólo se encuentra la 2-metoxiacetofenona.

Además, en el aliento exhalado de un individuo del estudio se detecta 2-hidroxiacetofenona (metabolito) con GC-MS.

Ejemplo 9:

Metabo-GM, 2-metoxiacetofenona

El procedimiento se realiza tal como se describe en los ejemplos 7 y 8 individuo a la siguiente modificación.

El individuo del estudio inhala y exhala de manera diferente.

En la primera variante, la inhalación y la exhalación tienen lugar ambos a través de la boca y el aire exhalado se sopla lentamente de forma directa en el tubo de vidrio. En la segunda variante, la inhalación tiene lugar a través de la boca y la exhalación a través de la nariz.

En la primera variante, se hallan cantidades mínimas de 2-hidroxiacetofenona (metabolito), aunque sólo en una pequeña cantidad apenas detectable. En la segunda variante (exhalación a través de la nariz), se detecta metabolito de manera más significativa.

Esto indica que el metabolismo en el tracto respiratorio de la 2-metoxiacetofenona tiene lugar de manera predominante como resultado de la actividad enzimática en la cavidad nasal.

Ejemplo 10:

Metabo-GM, supresor del metabolismo de 2-metoxiacetofenona

El procedimiento se realiza tal como se describe en el ejemplo 6A con un compuesto supresor volátil que se inhala antes de inhalar el compuesto de prueba. La detección del compuesto de prueba y el metabolito se realiza tal como se describe en el ejemplo 7.

El compuesto de prueba es 2-metoxiacetofenona.

En presencia del supresor, se detectan sólo pequeñas cantidades de 2-hidroxiacetofenona (metabolito) en comparación con la cantidad detectada en su ausencia.

- 5 Esto confirma que el supresor influye en la formación de metabolitos que se originan del compuesto de prueba que alcanza el tracto respiratorio, más específicamente la cavidad nasal.

Ejemplo 11A:

10 Metabo-GM, acetato de estiralilo, inhalación/exhalación a través de la nariz.

El procedimiento se realiza tal como se describe en el ejemplo 7.

15 El compuesto de prueba es acetato de estiralilo que es un éster. Un éster se puede potencialmente hidrolizar a sus metabolitos mediante una enzima hidrolasa. Para el acetato de estiralilo, se esperan los metabolitos alcohol estiralílico y ácido acético. Este tipo de reacción es catalizada por una enzima de la clase de carboxil esterases.

20 En la muestra de aire exhalado se detectan cantidades significativas de alcohol estiralílico y ácido acético (metabolitos).

Esto indica la presencia de actividad de una carboxil esterasa en el tracto respiratorio que metabolizaba el acetato de estiralilo en ácido acético y alcohol estiralílico.

Ejemplo 11B:

25 Metabo-GM, acetato de estiralilo, inhalación/exhalación a través de la boca.

30 El procedimiento se realiza tal como se describe en el ejemplo 11A individuo a las siguientes modificaciones: El espacio para la cabeza del compuesto de prueba se inhala y exhala a través de la boca tal como se describe en el experimento 9.

35 Se detecta menos alcohol estiralílico (metabolito) en comparación con el ejemplo 11A, en el que la inhalación y la exhalación se realizan a través de la nariz (se compararon las proporciones de metabolito con respecto a sustrato a efectos de comparar los experimentos). Sin embargo, la cantidad de metabolito aún es suficiente para ser fácilmente detectable mediante GC-MS, indicando que la actividad de la carboxil esterasa está ampliamente distribuida en el tracto respiratorio y no se limita a la cavidad nasal.

Ejemplo 12A:

40 Metabo-GM, acetato de fenetilo y supresor del metabolismo (inhibidor de la carboxil esterasa)

El procedimiento se realiza tal como se describe en los ejemplos 7 y 10 individuo a las siguientes modificaciones:

45 Como supresor, se utiliza un inhibidor de la carboxil esterasa. Como compuesto de prueba, se utiliza acetato de fenetilo, que es un sustrato para la carboxil esterasa.

50 En el aliento exhalado, se detecta alcohol fenetílico (metabolito). Cuando se inhala primero el supresor, seguido de la inhalación del compuesto de prueba, la proporción de metabolito detectado es significativamente inferior (disminuido hasta aproximadamente un 50%) en comparación con el análisis sin el supresor.

Ejemplo 12B:

Metabo-GM, acetato de estiralilo y supresor del metabolismo (inhibidor de la carboxil esterasa)

55 El procedimiento se realiza tal como se describe en el ejemplo 12A con un inhibidor para la carboxil esterasa como supresor, individuo a las siguientes modificaciones:

Como compuesto de prueba, se utiliza acetato de estiralilo, que es un sustrato para la carboxil esterasa.

60 En el aliento exhalado, se detecta alcohol estiralílico (metabolito). Cuando se inhala primero el supresor, seguido de la inhalación del compuesto de prueba, la proporción de metabolito detectado es significativamente inferior en comparación con el análisis sin el supresor. Por lo tanto, existe una velocidad reducida en la disminución del compuesto de prueba (sustrato de la enzima) en presencia del supresor.

Ejemplo 13:Olfatómetro de cascada, identificación de modulador (inhibidor)

5 Se identifica un modulador utilizando un Olfatómetro. Como compuestos de prueba de referencia se utilizan ésteres odorantes. Se analiza un segundo compuesto de prueba (modulador potencial, compuesto de prueba modulador) en combinación con estos compuestos de prueba odorantes. El compuesto de prueba de referencia odorante se mantiene a una concentración constante variando la concentración del modulador.

10 El compuesto de prueba de referencia es el acetato de estiralilo odorante, que presenta un umbral inferior que su metabolito alcohol estiralílico. Si tiene lugar el metabolismo, disminuye la cantidad de acetato de estiralilo que estimula el sistema olfativo. El descubrimiento de una mayor intensidad en presencia del compuesto de prueba modulador por los individuos del estudio junto con el descubrimiento de una velocidad reducida en la disminución del acetato de estiralilo (sustrato), pero sin un metabolito adicional, tal como se muestra en el ejemplo 12B para el acetato de estiralilo, demuestra la presencia de un modulador que es un inhibidor (es decir, se reduce el metabolismo en presencia del inhibidor y el sustrato no se metaboliza o lo hace lentamente). En consecuencia, el metabolito se forma a una velocidad reducida.

20 Se proporciona como referencia una concentración patrón (dilución apropiada del espacio para la cabeza saturado) del compuesto de prueba odorante en un Olfatómetro (cascada 1), mientras que en el segundo olfatómetro (cascada 2) el compuesto de prueba odorante se proporciona en la concentración patrón complementada con varias concentraciones del modulador (diluciones apropiadas del espacio para la cabeza saturado).

25 En primer lugar, se determina para cada individuo del estudio el umbral para el acetato de estiralilo odorante. La concentración patrón se elige de manera que se perciba como intensidad de débil a moderada según el criterio de cada individuo del estudio.

30 Las concentraciones del compuesto de prueba modular se eligen para que estén por debajo del umbral olfativo del individuo del estudio.

35 Se proporciona una muestra como espacio para la cabeza en una cámara de saturación. El flujo de dicha cámara se añade al suministro de gas portador y se mezcla en la cámara que está conectada con el puerto de esnifado en el que el individuo del estudio detecta el estímulo. Dicho flujo (el espacio para la cabeza de la muestra antes de la adición al portador) se determina y se ajusta, de manera que el individuo del estudio califica dicho flujo como flujo de intensidad media. Esta es la referencia que se utiliza en la cascada 1. Para el acetato de estiralilo, se utiliza un flujo de 20 ml/min del odorante.

40 En la cascada 2, el odorante se dispone en el mismo flujo que la referencia (20 ml/min) y el flujo del compuesto de prueba modulador añadido se varía entre 1 y 900 ml/min en 6 etapas de dilución. Las diluciones de un compuesto de prueba odorante con un gas portador se ajustan para proporcionar una concentración final constante de un compuesto de prueba odorante, mientras que el compuesto de prueba modulador se varía en su concentración final.

En presencia del modulador potencial, el individuo del estudio observa que se incrementa la intensidad del odorante.

45 El control negativo (un disolvente, en este caso ftalato de dietilo) se utiliza en el mismo flujo que el compuesto modulador potencial. El individuo del estudio no observa ninguna diferencia en la intensidad cuando compara con la sonda sin modulador potencial.

Ejemplo 14:Olfatómetro de cascada, identificación de un compuesto potenciador.

50 El análisis se realiza tal como se describe en el ejemplo 13 con el odorante acetato de estiralilo como compuesto de prueba, individuo a las siguientes modificaciones: Se varía la concentración de odorante, mientras que se mantiene constante la concentración de modulador.

El efecto del modulador en el umbral olfativo de acetato de estiralilo se determina de la siguiente manera.

60 En la cascada 1, se utiliza una concentración de referencia (20 ml/min) de acetato de estiralilo ligeramente por encima del umbral olfativo de los individuos del estudio

En la cascada 2, el acetato de estiralilo está presente en combinación con una concentración constante del modulador potencial (5 ml/min). La concentración de acetato de estiralilo se varía diluyendo el espacio para la cabeza saturado del odorante (flujo desde 5 a 80 ml/min).

65

ES 2 368 156 T3

Los individuos del estudio comparan la cascada 1 (acetato de estiralilo de referencia) con la cascada 2 (modulador + acetato de estiralilo a una concentración diferente). Para cada pareja (la cascada 1 en comparación con la cascada 2), se les pide a los individuos del estudio que indiquen si la intensidad es igual, superior, muy superior, inferior o muy inferior utilizando un protocolo JND (es decir, indican la "diferencia mínima perceptible").

5 Para la comparación en el que la concentración final de acetato de estiralilo en las cascadas 1 y 2 es la misma (20 ml/min), los individuos del estudio identifican que la intensidad del olor de la muestra de acetato de estiralilo en presencia del compuesto modulador en la cascada 2 es más intenso que la concentración de referencia en la cascada 1.

10 Para el control negativo (ftalato de dietilo), el individuo del estudio no observa ninguna diferencia en la intensidad.

15 De manera alternativa, se registra una curva de dosis-respuesta utilizando un olfatómetro (cascada 2) mediante la disposición de muestras por encima y por debajo del umbral olfativo detectado de los individuos del estudio. Esto se compara con el umbral conocido del compuesto que se registra de antemano.

Los individuos del estudio identifican que el umbral olfativo para acetato de estiralilo combinado con el modulador es inferior que el umbral olfativo determinado para acetato de estiralilo solo.

20 El compuesto de prueba modulador que se utilizó es un inhibidor de carboxil esterasas y disminuye la velocidad de hidrólisis de ésteres. Consecuentemente, aumenta la cantidad de éster disponible para estimular el sistema olfativo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de identificación o evaluación de compuestos de prueba, en el que el compuesto o, como mínimo, uno de sus metabolitos, es un odorante, o un precursor de un odorante, o un modulador de la percepción de un odorante, que comprende
- a) Disponer un espacio para la cabeza de un compuesto de prueba, saturado, opcionalmente diluido,
 - b) Inhalación de dicho espacio para la cabeza por un individuo humano de prueba
 - c) Emisión del aliento exhalado por el individuo humano de prueba
 - 10 d) Análisis del aliento exhalado mediante un método de detección seleccionado entre un método de atrapado de compuestos volátiles exhalados en una resina, desorción del material unido de la resina y análisis del material desorbido mediante cromatografía de gas unido a espectrometría de masas (Metabo-GM), un método en el que los metabolitos volátiles exhalados generados *in vivo* se exhalan en un interfaz para un dispositivo de análisis que registra los espectros de masas mediante un
 - 15 espectrómetro de masas con cuadrupolo equipado con una fuente de iones para la ionización química a presión atmosférica capaz de medir los intervalos dinámicos de los compuestos volátiles (Metabospace) y la Espectrometría de Masas por Reacción de Transferencia de Protones (PTR-MS), o una combinación de los mismos.
- 20 2. Método, según la reivindicación 1, en el que el compuesto de prueba se inhala y exhala a través de la nariz.
3. Método, según la reivindicación 1, en el que el compuesto de prueba se inhala a través de la nariz y se exhala a través de la boca.
- 25 4. Método, según la reivindicación 1, en el que el compuesto de prueba se inhala a través de la boca y se exhala a través de la nariz.
5. Método, según la reivindicación 1, en el que el compuesto de prueba se inhala y exhala a través de la boca.
- 30 6. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se realiza un análisis con olfatómetro además del análisis mediante un método de atrapado de compuestos volátiles exhalados en una resina, desorción del material unido de la resina y análisis del material desorbido mediante cromatografía de gas unido a espectrometría de masas (Metabo-GM), un método en el que los metabolitos volátiles exhalados generados *in vivo* se exhalan en un interfaz para un dispositivo de análisis que registra los espectros de masas mediante un
- 35 espectrómetro de masas con cuadrupolo equipado con una fuente de iones para la ionización química a presión atmosférica capaz de medir los intervalos dinámicos de los compuestos volátiles (Metabospace) o la Espectrometría de Masas por Reacción de Transferencia de Protones (PTR-MS), o una combinación de los mismos.