

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 621**

51 Int. Cl.:  
**A61Q 15/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01971446 .8**  
96 Fecha de presentación: **26.04.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1276456**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.01.2003**

54 Título: **COMPOSICIONES DE OLOR A PARTIR DE MOLÉCULAS HLA.**

30 Prioridad:  
**27.04.2000 DE 10021579**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.11.2011**

73 Titular/es:  
**COTY B.V.**  
**OUDEWEG 147**  
**2031 CC HAARLEM, NL**

72 Inventor/es:  
**ZIEGLER, Andreas;**  
**UCHANSKA-ZIEGLER, Barbara;**  
**GOLZ-BERNER, Karin y**  
**ZASTROW, Leonhard**

74 Agente: **Tomas Gil, Tesifonte Enrique**

**ES 2 368 621 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

Composiciones de olor a partir de moléculas HLA

5 [0001] La invención se refiere a nuevas composiciones de olor, que se pueden atribuir respectivamente a dos portadores potenciales de olor diferentes (compañeros).

[0002] Del estado de la técnica se conocen una multitud de olores de diferente procedencia, con los cuales el usuario ha intentado e intenta influir positivamente, mediante la utilización de aceites esenciales, perfumes o jabones con mejor o peor olor, en el supuestamente insuficiente olor del propio cuerpo. En los últimos años se ha señalado que posiblemente las causas genéticas sean responsables del olor propio de un individuo, y con esto también del efecto de atracción que causan en otros compañeros. Estudios especiales llevados a cabo con personas (al. J. Hum. Genet. 61, 505-51 (1997) permitieron observar que la elección del compañero posiblemente estaba influenciada por el olor, por vía de genes polimorfos del complejo mayor de histocompatibilidad (complejo MHC o HLA en el ser humano) (MHC = complejo mayor de histocompatibilidad; HLA = Antigen Leucocito Humano)). Los genes HLA están en una zona de aproximadamente 4.000.000 de pares de bases (pb) sobre el cromosoma humano 6. Hasta hoy no se ha conseguido una atribución olfatoria de moléculas relacionadas con el desarrollo de un olor específico individual. Sin embargo, hay indicios de que las moléculas MHC son causa de la producción de un perfil de olor específico individual (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 2210-2214, 1997; Proc. Natl. Acad. Sci.

20 USA 96, 1522-1525, 1999.

[0003] La invención se basa en la tarea de desarrollar una composición de olor, que en base a una determinada elección de alelos de genes olfatorios relevantes y en un tratamiento posterior de sus productos de síntesis en sustancias específicas de olor, confiera en forma de dos formulaciones separadas, a diferentes compañeros atractivo diferente pero recíproco.

[0004] Según la invención es dispuesta una composición de olor.

30 [0005] Composición de olor de moléculas HLA, producida según un procedimiento en el que

a) se escogen alelos HLA de clase I, que se produjeron por mutagénesis in-vitro de la bolsa B a partir de alelos HLA clase I ya existentes, que no existen de manera natural y que por lo tanto tienen una frecuencia del 0%, y

35 b) se sintetiza la parte soluble extracelular de la proteína, para la cual se codifica el alelo seleccionado, y después se somete a una ligadura in-vitro en presencia de (~2~ microglobulina ( $\beta_2m$ ), dando lugar a un gran número de diferentes péptidos con una longitud tipificada de 7 a 12 aminoácidos con terminación libre de N y C para la conformación de moléculas HLA de clase I solubles, conformadas por dominios extracelulares  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ ,  $\beta_2m$  y un péptido, donde el péptido enlazado está presente en la bolsa de unión al péptido de la molécula HLA formada por los dominios extracelulares  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ; y

c) las moléculas HLA de clase I formadas con los péptidos enlazados, se separan de los otros componentes en una fase de limpieza, y

45 d) las moléculas HLA de clase I purificadas se someten a una fragmentación con una o varias proteasas, y

e) las sustancias activas olorosas resultado de la fragmentación, se introducen como componente único o como mezcla en un preparado cosmético.

50 [0006] Así como procedimiento para la fabricación de una composición de olor a partir de moléculas HLA, donde al menos

a) se seleccionan entre alelos HLA de clase I conocidos, un alelo que se diferencia por lo menos en una característica de los demás alelos de la molécula HLA clase I, que aparece en menos del 5 % de las personas de la población mundial; o

b) se escogen alelos HLA de clase I, que se produjeron por mutagénesis in-vitro de la bolsa B a partir de alelos HLA clase I ya existentes, que no existen de manera natural y que por lo tanto tienen una frecuencia del 0%, y

60 c) se sintetiza la parte soluble extracelular de la proteína, para la cual se codifica el alelo seleccionado, y después se somete a una ligadura in-vitro en presencia de (~2~ microglobulina ( $\beta_2m$ ), dando lugar a un gran número de diferentes péptidos con una longitud tipificada de 7 a 12 aminoácidos con terminación libre de N y C para la conformación de moléculas HLA de clase I solubles, conformadas por dominios extracelulares  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ ,  $\beta_2m$  y un péptido, donde el péptido está presente enlazado en la bolsa de unión al péptido de la molécula HLA formada por los dominios extracelulares  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ; y

d) las moléculas HLA de clase I formadas con los péptidos ligados se separan de los otros componentes en una fase de limpieza, y

5 e) las moléculas HLA de clase I purificadas se someten a una fragmentación con una o varias proteasas, y

f) las sustancias activas olorosas resultado de la fragmentación, se introducen como componente único o como mezcla en un preparado cosmético.

10 [0007] Para una mejor comprensión de la invención, se ofrecen las siguientes explicaciones acerca de la formación intracorporal de las moléculas HLA clase I.

[0008] Es conocido que los mamíferos poseen la facultad de distinguir entre su propio tejido y el de otras especies, así como también entre el de otros individuos de su propia especie. Con la ayuda de estudios sobre trasplantes en el ratón, se han podido identificar en el cromosoma 17 en la región H-2 diferentes genes que son responsables causales del rápido rechazo de tejido extraño. Este complejo de genes es conocido desde entonces como complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El MHC humano se encuentra sobre el brazo corto del cromosoma 6 y es denominado complejo HLA (Antigen leucocito humano). Contiene entre otros, los genes para la proteína MHC clase I HLA-A, HLA-B y HLA-C así como la proteína HLA clase II. Las moléculas HLA enlazan péptidos intracelulares que surgen en la degradación de proteínas citosólicas (típicamente MHC clase I) o extracelulares (típicamente MHC clase II), y las transportan a la superficie celular superior. Allí, los complejos de HLA/péptidos pueden ser reconocidos por los linfocitos T del sistema inmunológico. Otros productos de los genes codificados en el MHC participan de la formación de fragmentos de péptidos y su transporte.

25 [0009] Las moléculas HLA clase I se componen de una cadena pesada anclada a la membrana (43 kDa) y de una cadena ligera asociada no covalente, la  $\beta_2$  - microglobulina ( $\beta_2m$ ; 12 kDa; véase Fig. 1). La cadena pesada está formada por tres dominios extracelulares ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ ) cada uno con aproximadamente 90 aminoácidos, una zona transmembranal de aproximadamente 25 aminoácidos, y una región c-terminal citoplasmática. La asparagina conservada en la posición 86 del dominio  $\alpha_1$  está N-glicosilada en todas las proteínas HLA clase I. La  $\beta_2$  - microglobulina no está ligada a la membrana y sólo posee un dominio.

[0010] Gracias a estudios cristalográficos de rayos X (véase p.ej. Biol J.Mol..

35 Vol. 285, 645-653, 1999) se conoce la estructura tridimensional de la molécula HLA clase I representada en la figura 2. La microglobulina  $\beta_2$  y el dominio proximal de la membrana de la cadena pesada ( $\alpha_3$ ), que poseen el plegado característico de las moléculas de la superfamilia de la inmunoglobulina, soportan y estabilizan la hendidura de unión de los péptidos, formada por los dominios conjuntos  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , donde el péptido queda incluido entre dos hélices  $\alpha$ , que están sobre una superficie de 8 cadenas antiparalelas  $\beta$  (Fig. 3).

40 [0011] La cadena pesada HLA está sometida a un gran polimorfismo, el  $\beta_2 m$ , por el contrario, es idéntico en todas las moléculas HLA clase I y fuera del complejo HLA queda codificado en el cromosoma 15. Hasta ahora se conocen aproximadamente 70 alelos HLA-A, 200 alelos HLA-B y 70 alelos HLA-C, de los cuales cada individuo experimenta como máximo dos alelos por genlocus.

45 La variedad de alelos está casi completamente limitada a los dominios ( $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  afecta principalmente a aminoácidos, cuyas cadenas laterales señalan hacia las hendiduras de enlace de los péptidos o hacia el receptor celular T.

[0012] La base de la hendidura de enlace de los péptidos consiste en 6 cavidades o bolsas de diferente desarrollo, que se forman por las cadenas laterales de los aminoácidos de la proteína HLA. Los péptidos, presentan generalmente una longitud de 8 o 9 aminoácidos y se unen en una conformación alargada (véase Fig. 3). Una red conservada de puentes de hidrógeno, posiciona las terminaciones N y C en las bolsas en los extremos de las hendiduras de enlace y determina por consiguiente la orientación de los péptidos. Entre las cadenas laterales del péptido y los aminoácidos polimorfos de la proteína HLA, se conforman contactos específicos de alelos adicionales. Las formadas por las últimas bolsas, pueden absorber completamente restos de aminoácidos del péptido, que estén dirigidos hacia abajo en la hendidura de enlace. Estas cadenas laterales son también denominadas "anchor residues", puesto que anclan firmemente el péptido a las hendiduras de enlace. Cada proteína HLA posee al menos una bolsa profunda formada por aminoácidos polimorfos específicos del respectivo alelo. Sólo los péptidos con los adecuados "anchor residues" pueden ser enlazados.

60 [0013] Ambas cadenas de una molécula HLA clase I son sintetizadas por separado en la célula y transportadas de forma cotranslacional al retículo endoplasmático (ER). Aquí se lleva a cabo el ensamblaje de la cadena pesada (HC, Heavy Chain) con la  $\beta_2$ -microglonulina ( $\beta_2m$ ) y un péptido, que da lugar a complejos útiles.

En este proceso de plegado coordinado participan una serie de proteínas diferentes (Immunol. Today 21, (2000) 83-88.

65 [0014] Este procedimiento intracelular puede efectuarse de forma parecida in vitro cuando los tres componentes del

producto final trimolecular, es decir, de una molécula HLA clase I, se llevan a la interacción en un medio idóneo.

De esta forma es posible dar expresión en una, dos o tres construcciones a las moléculas de ADN codificadas en estos tres componentes, para que así, estos tres componentes existan en forma de proteína única, dimérica o trimérica para su uso. Entre los alelos conocidos se selecciona de tal manera, que se da prioridad a un alelo lo más raro posible (es decir, existente en menos del 5 % de la población mundial) sobre un alelo que aparezca con más frecuencia entre la población. Sirvan como ejemplo los alelos HLA-A\*6601 o HLA-B\*7301, que aparecen rara vez (por debajo del 1 % de la población de Europa central). Hay que tener en cuenta, que las diferencias de secuencia entre los alelos HLA clase I, por regla general conciernen a más de una posición nucleótida única, de tal manera que los correspondientes productos de las proteínas se diferencian por el número variable de aminoácidos. Estas diferencias conducen característicamente a diferentes comportamientos en el enlace de los péptidos. Como ejemplo pueden tomarse las moléculas HLA, HLA-B35 y HLA-B53, que se sólo se diferencian por la existencia de las determinantes Bw6- (B35) o Bw4- (B53), es decir, por cinco aminoácidos modificados. Los péptidos ligados contienen generalmente como "Anchor" C terminal una tirosina (B35), mientras varios aminoácidos se toleran como C terminal del péptido de las moléculas HLA-B53. El otro "Anchor" en la posición 2 del péptido, es por el contrario en ambas moléculas una prolina, condicionado por la identidad de las moléculas en el área de la bolsa B, que enlaza esta prolina.

[0015] Los datos relevantes para esta selección de alelos y péptidos están disponibles para el experto y para el público en general (e.o. en Internet en <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/> para secuencias de proteína de moléculas HLA; <ftp://ftp.wehi.deu.au/pub/biology/mhcpep/> o <http://134.2.96.221/scripts/hlaserver.dll/home.htm> para secuencias de péptidos).

Con esto el experto también puede deducir, qué alelos tienen qué características y con qué frecuencia aparecen.

[0016] Otra forma de realización de la invención consiste en construir alelos artificiales HLA clase I y en sintetizar las proteínas correspondientes, que según el conocimiento actual no aparecen en la población y que probablemente tengan un comportamiento de enlace de péptidos modificado. Así es posible sustituir por medio de la mutagénesis in-vitro la bolsa B de la molécula HLA-B27, que liga preferentemente una arginina de la posición 2 del péptido, por la bolsa B de la molécula HLA-A2, lo que lleva a la ligadura de péptidos que contienen un aminoácido hidrófobo, p.ej. leucina, en la posición 2 de los péptidos. El concepto "alelo" por lo tanto, engloba tanto alelos naturales como también alelos artificiales.

[0017] Tras la selección, según la invención, se realiza la síntesis de la parte soluble, extracelular de la proteína (de las proteínas) e.d. De los dominios  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ , y después, la ligadura in-vitro, de manera que en presencia de  $\beta_2$  m en una solución reconstituyente, a una temperatura en el área de 0 hasta 40 °C, la proteína del alelo HLA seleccionado se introduce en una piscina de péptidos con diferentes péptidos de 7 a 12 aminoácidos, preferiblemente 8 a 9 aminoácidos, por un periodo de incubación de 1 hasta 7 días. La piscina de péptidos contiene sobre todo péptidos con "Anchors" adecuados (aminoácidos de ancla; véase más arriba), como prolina en la posición 2 y tirosina en la posición 8 o 9 de un péptido en el caso de la molécula HLA-B35. Como tal péptido se puede utilizar por ejemplo el octámero VPLRPMTY o el nonámero LPPLDITPY (J.Mol.Biol. 285, 645-653, 1999).

[0018] La molécula trimérica HLA clase I reconstruida, se separa a continuación, p.ej. cromatográficamente por la cromatografía líquida de alta frecuencia (HPLC) o por el FPLC, de otros componentes de la mezcla, como péptidos desligados,  $\beta_2$ m, etc. El plegado correcto de la molécula reconstruida y con esto, conformación nativa, se prueba p.ej. con ayuda de anticuerpos de conformación dependiente en el Test ELISA y mediante inmunoprecipitación (Eur.-J.-Immunol. Vol.23, 734-738, 1993; Hum. Immunol. 61, 408-418, 2000).

[0019] En una forma de realización especial de la invención, la molécula HLA clase I producida, después del punto c) o d), y antes de la fragmentación, se introduce por un periodo de 1 a 36 horas, preferiblemente de 18 a 36 horas en un suero de sangre animal de 4 hasta 40 °C, preferiblemente 37 °C, preferiblemente en suero de sangre de ratón, particularmente en un suero de ratones  $\beta_2$ m(-/-). Así, probablemente, se ligan otras sustancias a la molécula HLA.

[0020] A continuación, en la fragmentación de la molécula HLA clase I purificada, se pueden usar una multitud de proteasas.

[0021] Preferiblemente, se seleccionan las proteasas entre proteinasas como serin-proteinisinas, cisteín-proteinisinas, aspartato proteinasas y metal-proteinisinas, así como también peptidasas, como aminopeptidasas, dipeptidasas, dipéptido carbopeptidasa, carbopeptidasa, omega-peptidasa. Se prefiere p.ej. La pronasa de *Streptomyces griseus* (Sigma Pronasa, tipo XIV), Proc.Natl.Acad.Sci.-USA Vol.96, 1522-1525, 1999.

[0022] La fragmentación con pronasas puede durar a temperatura ambiente 2 horas, la concentración puede variar según las circunstancias experimentales.

[0023] En caso necesario, para la reconstrucción de los complejos solubles de péptidos HLA-A o HLA-B complejos se puede añadir un reconstituyente, por ejemplo 400 mM L-Arg-HCl, 2 mM EDTA, 5 mM glutatión reducido, 0,55 mM de glutatión oxidado, 100mM Tris/HCl, pH 7,5.

[0024] Tras la separación de las sustancias olorosas activas, por ejemplo, a través de procedimientos cromatográficos (HPLC, FPLC) o procedimientos inmunológicos, estas sustancias pueden agregarse en las concentraciones correspondientes a preparados cosméticos como perfumes, emulsiones, jabones, aceites, geles, cremas y similares. Estas fórmulas también son objeto de la invención.

5

[0025] Una particularidad de la composición de olor según la invención consiste en que puede estar constituida por dos productos de formulación por separado. También pueden formularse tres productos diferentes.

10

[0026] En la composición de olor preferida según la invención, el producto producido según la reivindicación 1 conforma una unidad de combinación con un segundo producto, que según el procedimiento, también ha sido producido según la reivindicación 1, con la condición de que el alelo escogido para el segundo producto sea un alelo diferente al alelo del primer producto. En este caso, el alelo para el segundo producto también se diferencia en al menos una característica de otros alelos de la molécula HLA clase I. Esta característica es una de las características denominadas como raras, que aparece en menos del 5% de la población, preferiblemente en menos de 1% de la población mundial (frecuencia alélica).

15

[0027] La unidad de combinación comprende dos formulaciones de olor de las cuales cada una respectivamente está prevista para un compañero diferente, preferiblemente compañeros de diferentes sexos.

20

[0028] Las composiciones de olor preferidas se caracterizan por el hecho de, que los alelos HLA-A\*6601 y HLA-B\*7301, los alelos HLA-B\*1301 y HLA-B\*2709, los alelos HLA-B\*2705 con sustitución de la bolsa "B" a través de la bolsa "B" del alelo HLA A\*0201 y HLA-B\*7301, pueden utilizarse como sustancias de partida para composiciones de olor separadas. De esta forma, las citadas parejas de alelos producen sustancias de partida para determinadas parejas de composición de olor, p.ej. A y B, de los cuales el olor A se adjudica al partner A y el olor B al compañero B para aumentar el atractivo recíproco de los compañeros A y B.

25

[0029] A continuación, se describe detalladamente la invención con ejemplos. Las ilustraciones que acompañan muestran

30

Fig. 1 una representación esquemática de una molécula HLA clase I con dominios extracelulares  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ ; la cadena pesada anclada en la membrana no se asocia covalentemente con  $\beta_2m$ .

Fig. 2 una estructura de la parte extracelular de una molécula HLA clase I.

35

Fig. 3 una vista desde arriba de la bosa de enlace del péptido con el péptido insertado en zigzag (HLA B\*3501, con péptido LPPLDITPY).

#### **Ejemplo 1** fabricación del componente de olor A

40

Inducción

[0030] Medio LB = 10 g Bacto-triptona , 5 g de extracto de levadura, 10 g NaCl disuelto en 1 l ddH<sub>2</sub>O.

45

300 ml de medio LB-Amp fueron inoculados en un 1 matraz con 3ml de cultivo nocturno (a temperatura ambiente) y centrifugados a 37 °C hasta un OD<sub>560</sub> de 0,7 a 300 r.p.m. Tras disponer la concentración IPTG (IPTG = isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido) a 0,4 mM las bacterias se desarrollaron otras 4 horas a 37 °C antes de ser centrifugadas a 2700 g durante 20 minutos. El Pellet se utilizó para la preparación de "cuerpos de inclusión".

50

[0031] Para la identificación de clones de expresión de proteínas tras la transformación se llevó a cabo una inducción en menor medida. Se incubaron en cada caso 200  $\mu$ l LB/Amp en un cultivo en una placa de 96 agujeros inoculados con una colonia durante la noche. Después fueron separados 100  $\mu$ l, y puestos en una cavidad junto con  $\mu$ l 100 LB/Amp/2xIPTG durante 4 horas a 37 °C. A continuación, se centrifugó el cultivo en un tubo de microcentrífuga, las bacterias se recogieron en un tampón de muestra 100  $\mu$ l SDS (SDS = sulfato de laurilo de sodio), se analizaron 10 minutos a 95 °C y se aplica una alícuota sobre un SDS-gel de poliacrilamida. Los clones de expresión de proteínas mostraban una banda adicional.

55

Preparación de "cuerpos de inclusión"

60

[0032] En las bacterias, las proteínas extrañas se depositan habitualmente como precipitado desnaturalizado en el citoplasma. Estos "cuerpos de inclusión" pueden eliminarse tras la disgregación de célula a través de varios pasos de centrifugación, convertirse en urea y reconstruirse como proteínas funcionales.

65

[0033] El Pellet obtenido tras la inducción bacteriana se recoge en 10 ml de tampón de lisina (25 % sacarosa / 1mM EDTA / 50 mM Tris/HCl, pH 8,0) y 1mM de fluoruro de ácido de fenilmetansulfonato, se congela a -20 °C durante la noche o se utiliza directamente. Tras añadir 0,5 ml de lisozima (10 mg/ml tampón de lisina) e incubar durante 30 minutos sobre hielo, la solución adquirió una consistencia viscosa a raíz de la liberación de DNS. La adición de MgCl<sub>2</sub> (a 10

mM),  $MnCl_2$  (a 1 mM) y DNase I (a 10  $\mu g/ml$ ) licuó el nuevamente el lisado.

Tras una centrifugación de 10 Min a 10,000 g el Pellet se resuspendió mediante ultrasonido en 10 ml de tampón de detergente (0,2 M NaCl/1 % de ácido desoxicolico (Sigma) / 1 % Nonidet P-40 (sigma) / 2 mM de EDTA / 2 mM DTT (ditiotreitolo) / 20 mM Tris/HCl, pH 7,5) y tras una incubación de 10 minutos sobre hielo se centrifugó de nuevo. Los cuerpos de inclusión se lavaron 4 veces en tampón tritón (100 mM NaCl/1mM EDTA/2mM DTT/0,5%TritonX100 (serva)/50mMTris/HCl, pH 8,0) y se recogieron en 4ml 20mM Tris/HCl, pH 7,5/.150mM NaCl/ 10DTT.

Reconstitución de los complejos funcionales de HLA/péptidos

[0034] La molécula funcional HLA A\*6601 se reconstituyó a partir de la disolución de la cadena pesada en la urea (Dominios  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ ),  $\beta_2$ -microglobulina y el péptido

T	R
X XXXXXX	
V	K

según el protocolo de dilución de V K Garboczi et al. (Proc.Natl.Acad.Sci.-USA Vol. 89, 3429-3433, 1992).

[0035] Las subunidades purificadas en forma de "Inclusion Bodies" se disolvieron en urea (50% urea / 50 mM NaCl / 20 mM Tris/HCl, pH 7,5) recién filtrada (30 min a temperatura ambiente en el agitador), se centrifugaron (20 min, 10. 000 g) y se determinó su concentración. Ambas cadenas se unieron, se rellenaron con tampones de urea a 5 ml y se diluyeron en 200 ml de reconstituyente que contenía el péptido (400 mM 1-arginina/HCl (Sigma) / 2mM EDTA / 5 mM glutati6n reducido / 0,5 mM glutati6n oxidado,100mM Tris/HCl, pH 7,5).

La concentración final de la cadena HLA ascendía a 1  $\mu M$ ,  $\beta_2$ -microglobulina 2  $\mu M$  y del péptido 10  $\mu M$ . El sedimento reposó 36 horas a 4  $^{\circ}C$  y se fraccionó en concentración de 1ml con ayuda de tubos de concentrado de Centiprep-10 en una columna de filtraci6n en gel.

Filtraci6n de gel

[0036] La limpieza del complejo de HLA/péptidos se realizó mediante una columna 20mM Tris/HCl, ph 7,5/ 150 M NaCl superdex 75 HR equilibrada (Farmacia), en la cual el sedimento de restituci6n se fraccionó con un índice de flujo de 1ml/min.

Fragmentaci6n

[0037] Se mezcla 1mg de complejo de HLA/péptidos purificado con 1ml de tamp6n (20 mM Tris/HCl, pH 7,5//7,5/ 150 mM NaCl) bien directamente con la pronasa bacteriana Tipo XIV de Streptomyces griseus (concentraci6n final 0,1 mg/ml), o bien en suero de ratones  $\beta_2m$  (-/-), que por tener genes defectuosos para  $\beta_2 m$ , no pueden producir proteína  $\beta_2 m$  (concentraci6n final del complejo de HLA/péptidos 1mg/ml).Antes de a6adir la enzima, puede llevarse a cabo una incubaci6n de los complejos HLA/péptidos en serum de 4-40 $^{\circ}C$  hasta 24 horas. Entonces se mezcla con pronasa bacteriana Tipo XIV de Streptomyces griseus (concentraci6n final 2 mg/ml). La degradaci6n de la proteína se lleva a cabo durante dos horas a temperatura ambiente. Son posibles otras concentraciones de los complejos HLA/péptidos y de la enzima, así como el tiempo de degradaci6n y la temperatura. Las proteínas fragmentadas se procesan directamente o se congelan a - 80  $^{\circ}C$ .

Separaci6n

[0038] La separaci6n de los componentes inactivos ocurre mediante Sephadex G-100 con el procedimiento Batch. Aquí, la muestra que contiene la proteína degradada, se mezcla con Sephadex (1/10 del volumen), se incuba durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifuga un instante. El sobrante contiene los componentes activos de la muestra. De esta manera se obtuvo el componente de olor A.

**Ejemplo 2 fabricaci6n del componente de olor B**

[0039] Se trabajó como en el ejemplo 1, sin embargo, como alelo se escogi6 HLA 7301 y como péptido XRXXXXXP. Los pasos sucesivos corresponden a los del ejemplo 1 y tras la fragmentaci6n y separaci6n se obtuvo el componente de olor B.

**Ejemplo 3** composición de perfume (Eau de Parfume)

Composición A

5 [0040] Se mezclaron a temperatura ambiente los siguientes componentes (porcentaje en peso).

Componente de olor A	11%
Etanol	q.s. ad 100
Agua	1%
Color azul	0,05%

[0041] Simultáneamente se mezclaron los siguientes componentes entre sí.

10 Composición B

[0042]

Componente de olor B	10%
Etanol	q.s. ad 100
Agua	1%
Color amarillo	0,06%

15 [0043] Ambas composiciones se almacenaron 10 días a una temperatura de 5 a 10°C y fueron confeccionados como una unidad de venta. A continuación, la composición A se puso a disposición de un compañero de una comunidad y la composición B a disposición del otro compañero de la comunidad. Ambos compañeros juzgaron el olor del otro respectivamente como muy erótico y atrayente.

20 **Ejemplo 4** crema corporal y facial

Parte A

[0044]

25

Fase A (en porcentaje en peso)	
Propilenos glicol dicaprilato	4
Cetearilo Isononanoato	2,5
Manteca de karité	1,0
Dimeticonas	1,2
Fase B	
Agua	q.s. ad 100
Glicerina	3
Fase C	
Conservantes	0,5
Componente de olor A	1,5
Colorante naranja	0,08

[0045] La fase A se calentó a 70 °C y la fase B igualmente por separado a 70 ° C. Después ambas fases se mezclaron entre sí y la mezcla se enfrió a 40 °C. Entonces se realizó la adición de la fase C y se homogeneizó la mezcla conjunta.

30 Parte B

[0046] Se utilizó la misma composición de fases A y B como en la parte A del ejemplo 4.

Fase C

35

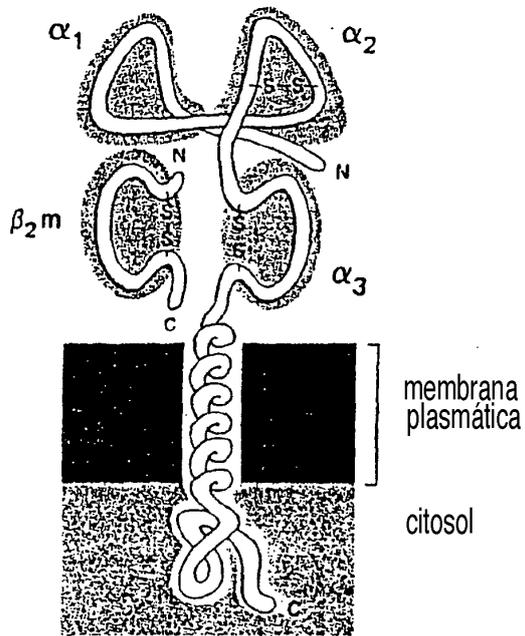
Conservantes	0,5
Componente de olor B	1,5
Colorante azul	0,08

40 [0047] La elaboración se realizó como en la parte A del ejemplo 4. Las partes A y B de la crema del ejemplo 4 fueron confeccionadas como una unidad de venta. A continuación, la composición A se puso a disposición de un compañero de una comunidad y la composición B a disposición del otro compañero de la comunidad. Ambos compañeros juzgaron el olor del otro respectivamente como muy atractivo y atrayente.

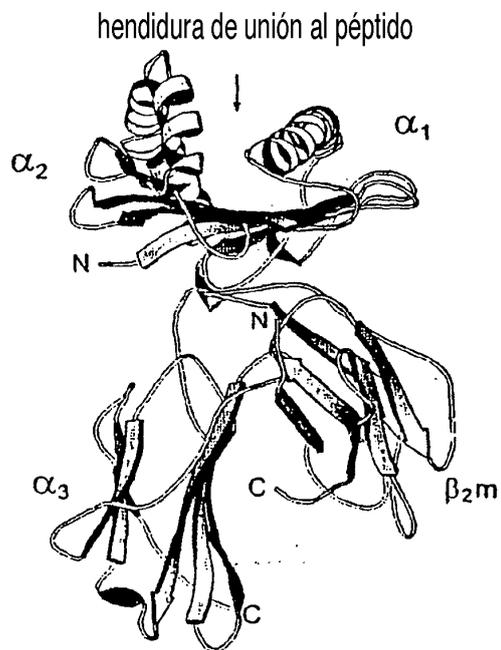
## REIVINDICACIONES

1. Composición de olor a partir de moléculas HLA producida según un procedimiento en el que
- 5 a) son escogidos alelos HLA de clase I, que fueron producidos por mutagénesis in-vitro de la bolsa B a partir de alelos HLA clase I ya existentes, que no existen de manera natural y que por lo tanto tienen una frecuencia del 0%, y
- 10 b) se sintetiza la parte soluble extracelular de la proteína, para la cual codifica el alelo seleccionado, y después la somete a un ensamblamiento in-vitro en presencia de  $\beta_2$  –microglobulina ( $\beta_2m$ ), dando lugar a un gran número de diferentes péptidos con una longitud tipificada de 7 a 12 aminoácidos con terminación libre de N y C para la conformación de moléculas HLA de clase I solubles, conformadas por dominios extracelulares  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ ,  $\beta_2m$  y un péptido, con lo cual el péptido está presente enlazado en la bolsa de unión al péptido de la molécula HLA formada por los dominios extracelulares  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  ;
- 15 c) las moléculas HLA de clase I formadas con los péptidos ligados se separan de los otros componentes en una fase de limpieza, y
- d) las moléculas HLA de clase I purificadas se someten a una fragmentación con una o varias proteasas, y
- 20 e) se introducen las sustancias activas olorosas resultado de la fragmentación como componente único o como mezcla en un preparado cosmético.
2. Composición de olor según la reivindicación 1, **caracterizada por el hecho de que** en el punto e) las sustancias activas tras la separación previa de otras sustancias se introducen en composiciones cosméticas.
- 25 3. Composición de olor según reivindicación 1, **caracterizada por el hecho de que** las proteasas se seleccionan entre proteinasas como serín-proteinasa, cisteín-proteinasa, aspartato proteinasas y metal-proteinasa, aminopeptidasas, dipeptidasas, dipeptido carbopeptidasas, carbopeptidasas, omega-peptidasas.
- 30 4. Composición de olor según la reivindicación 1, **caracterizada por el hecho de que** la molécula HLA de clase I producida, según el punto c) o d) debe mezclarse antes de la fragmentación por un periodo de 1 a 36 horas a una temperatura de 4 a 40°C con suero de ratones  $\beta_2m$ (-/-).
- 35 5. Composición de olor según la reivindicación 1, **caracterizada por el hecho de que** el producto producido según la reivindicación 1 conforma una unidad de combinación con un segundo producto, que según el procedimiento de la reivindicación 1, se produce con la condición de que el alelo escogido para el segundo producto sea un alelo diferente al del primer producto, donde el alelo para el segundo producto debe diferenciarse en al menos una característica de otros alelos de la molécula HLA clase I, que aparezca en menos del 5% de la población mundial.
- 40 6. Composición de olor según reivindicación 5, **caracterizada por el hecho de que** la unidad de combinación abarca dos formulaciones de olor separadas.
- 45 7. Composición de olor según reivindicación 5, **caracterizada por el hecho de que** aparece como una solución clara en un jabón, un gel cosmético, una emulsión cosmética, una crema, en una concentración de 0, 0001 a 21 % en peso, en relación a la composición total.
8. Procedimiento para la fabricación de una composición de olor de moléculas HLA, donde
- 50 a) se selecciona entre alelos HLA de clase I conocidos, un alelo que se diferencia al menos en una característica de otros alelos de la molécula HLA clase I, que aparezca en menos del 5% de las personas de la población mundial.
- b) se escogen alelos HLA de clase I, que se produjeron por mutagénesis in-vitro de la bolsa B a partir de alelos HLA clase I ya existentes, que no existen de manera natural y que por lo tanto tienen una frecuencia del 0%, y
- 55 c) se sintetiza la parte soluble extracelular de la proteína, para la cual codifica el alelo seleccionado y después se somete a un ensamblamiento in-vitro en presencia de  $\beta_2$  –microglobulina ( $\beta_2m$ ), dando lugar a un gran número de diferentes péptidos con una longitud tipificada de 7 a 12 aminoácidos con terminación libre de N y C para la conformación de moléculas HLA de clase I solubles, conformadas por dominios extracelulares  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ ,  $\beta_2m$  y un péptido, presente en la bolsa de unión al péptido de la molécula HLA formada por los dominios extracelulares  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  ; y
- 60 d) las moléculas HLA de clase I formadas con los péptidos ligados se separan de los otros componentes en una fase de limpieza, y
- e) las moléculas HLA de clase I purificadas se someten a una fragmentación con una o varias proteasas, y
- 65

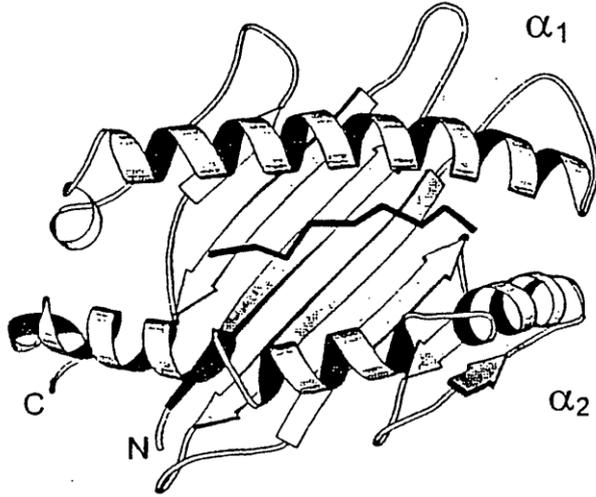
- f) las sustancias activas olorosas resultado de la fragmentación, se introducen como componentes únicos o como mezcla en un preparado cosmético.
- 5 9. Procedimiento según reivindicación 8, **caracterizado por el hecho de que** en el punto e) las sustancias olorosas activas, después de haber sido separadas de las demás sustancias, se introducen en las composiciones cosméticas.
- 10 10. Procedimiento según reivindicación 8, **caracterizado por el hecho de que** las proteasas se seleccionan entre proteinasas como comoserin-proteinadas, cisteín-proteinadas, aspartato proteinadas y metal-proteinadas, aminopeptidasas, dipeptidasas, dipetido carbopeptidasas, carbopeptidasas, omega-peptidasas.
- 15 11. Procedimiento según reivindicación 8, **caracterizado por el hecho de que** los alelos HLA-A\*6601 y HLA-B\*730, los alelos HLA-B\*1301 y HLA-B\*2709, los alelos HLA-B\*2705 con sustitución de la bolsa "B" por la bolsa "B" del alelo HLA A\*0201 y HLA-B\*7301, se utilizan como sustancias de partida para composiciones de olor separadas.
- 20 12. Procedimiento según reivindicación 8, caracterizado por el hecho de que la molécula HLA de clase I producida, según el punto c) o d) se introduce antes de la fragmentación por un periodo de 1 a 36 horas a una temperatura de 4 a 40°C en suero de ratones  $\beta_2m(-/-)$ .
- 25 13. Procedimiento según reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** el producto producido según la reivindicación 8, conforma una unidad de combinación con un segundo producto, que según el procedimiento de la reivindicación 8, se produce con la condición de que el alelo escogido para el segundo producto sea un alelo diferente al del primer producto, donde el alelo para el segundo producto debe diferenciarse en al menos una característica de otros alelos de la molécula HLA clase I, que aparezca en menos del 5% de la población mundial.
- 30 14. Procedimiento según reivindicación 13, **caracterizado por el hecho de que** la unidad de combinación abarca dos formulaciones de olor separadas.
- 35 15. Procedimiento según reivindicación 13, **caracterizado por el hecho de que** la composición de olor se introduce en una solución clara, un jabón, un gel cosmético, una emulsión cosmética, una crema, en una concentración de 0, 0001 a 21 % en peso, en relación a la composición total.
16. Composición de olor, producida según el procedimiento establecido en la reivindicación 13, en la cual aparece como una solución clara, un jabón, un gel cosmético, una emulsión cosmética, una crema, en una concentración de 0, 0001 a 21 % en peso, en relación a la composición total.



**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**