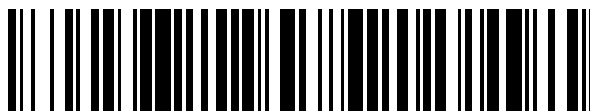


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 112**

51 Int. Cl.:

C07K 5/06 (2006.01)

C07C 229/08 (2006.01)

C07C 229/30 (2006.01)

C07C 229/12 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

C12Q 1/527 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06704528 .6**

96 Fecha de presentación: **11.01.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1846436**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.10.2007**

54 Título: **Inhibición del mal olor del sudor**

30 Prioridad:

31.01.2005 US 647777 P
31.01.2005 EP 05100619

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

18.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

18.12.2012

73 Titular/es:

FIRMENICH S.A. (100.0%)
1, ROUTE DES JEUNES, P.O. BOX 239
1211 GENEVA 8, CH

72 Inventor/es:

STARKENMANN, CHRISTIAN;
CLARK, ANTHONY;
TROCCAZ, MYRIAM y
NICLASS, YVAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 393 112 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

Inhibición del mal olor del sudor

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para cribar compuestos que tienen la capacidad de evitar, tratar o reducir el desarrollo del mal olor en las superficies corporales. La presente invención se refiere también a un compuesto de fórmula (I), que es un precursor de compuestos de azufre volátiles malolientes. Además, la presente invención se refiere a procedimientos para evitar el mal olor y a procedimientos para preparar productos que tienen la capacidad de reducir el desarrollo del mal olor

Antecedente de la invención y problema a resolver

10 La prevención del mal olor en las axilas es un objetivo constante del trabajo científico. Se ha reconocido durante algún tiempo que el propio sudor, tal como se excreta procedente de las glándulas apocrinas del sudor presentes abundantemente en la piel de la axila, es generalmente inodoro. Se desarrolla el mal olor en las axilas esencialmente tras la actividad metabólica de algunas cepas de bacterias que han evolucionado para vivir en este nicho ambiental y que están bien adaptadas a crecer en el peculiar cóctel de precursores inodoros que se encuentran en el sudor apocrino

15 Se han aislado hasta el momento varios tipos de sustancias malolientes, un tipo es de origen esteroideo, otro tipo abarca compuestos de la degradación bacteriana: ácidos grasos de cadena corta del tipo ácido (E/Z)-3-metil-2-hexenoico, descrito como contribuidor olfatorio predominante del mal olor del sudor. En este contexto, Nash y col., en el documento WO 02/092024, han postulado que este tipo de compuestos generadores de mal olor puede estar formado por la escisión de derivados de la L-glutamina que aparecen por la actividad de la N_α-acil-glutamina-aminoacilasa, y han propuesto compuestos capaces de inhibir esta enzima. Se han dado a conocer otras N-acil-glutaminas responsables de la generación de malos olores de ácidos grasos en el documento EP 08158833 A2. Un tercer tipo de compuestos de azufre se han descubierto solo muy recientemente y se han dado a conocer de forma independiente en el documento WO 2004/031766, en Troccaz y col., "3-Metil-3-sulfanilhexan-1-ol as a Major Descriptor for the Human Axilla-Sweat Odour Profile", Profile", Chemistry & Biodiversity, Vol. 1 (2004), páginas 1022 a 1035; y en Natsch y col., "Identification of Odoriferous Sulfanylalkanols in Human Axilla Secretions and Their Formation through Cleavage of Cysteine Precursors by a C-S Lyase Isolated from Axilla Bacteria", Chemistry & Biodiversity, Vol. 1 (2004), páginas 1058 a 1072.

20 Se ha encontrado que un espécimen particularmente maloliente del tipo de los compuestos de azufre era 3-metil-3-sulfanilhexan-1-ol (Troccaz y co., seguido por Natsch y col. y Hasegawa y col. "Identification of New Odoriferous Compounds in Human Axillary Sweat" Chemistry and Biodiversity Vol. 1 (2004), 2042-50). El mismo compuesto se da a conocer también en el documento US 6.610.346, en el que se usa como un aroma en alimentos y bebidas para proporcionar notas vegetales (cebolla) y carnosas a los productos alimenticios.

25 Actualmente, se ha abordado el desarrollo del mal olor de diferentes maneras, por ejemplo, aplicando sustancias antibacterianas a la piel de las axilas, proporcionando composiciones de perfume capaces de enmascarar el mal olor, atrapando moléculas malolientes, aplicando, por ejemplo, ciclodextrina, para inhibir las β-liasas, por ejemplo.

30 Con el objetivo de evitar la formación de compuestos de azufre volátiles (VSC) tal como, por ejemplo, S-3-metil-3-sulfanilhexan-1-ol, es indispensable elucidar su ruta metabólica, y, en particular, su precursor directo. Dicha percepción permitiría diseñar cribado de compuestos que tengan la capacidad de intervenir en la ruta e inhibir de esta manera la formación del VSC.

35 De acuerdo con esto, Natsch y col. han especulado que el conjugado de cisteína de los VSC (Cys-S-3-metil-3-sulfanilhexan-1-ol), era el precursor directo de los VSC y que, la escisión del precursor mediante una C-S β-liasa presente en *Corynebacterium spp.* daría como resultado directamente el VSC. De forma similar, Lyon y col. (documento US 5.213.791), dan a conocer inhibidores de la β-liasa de aminoácidos como desodorantes, considerándose en la columna 2, líneas 5-6 que el conjugado de Cys-S era el precursor más relevante. Estos hallazgos corresponden a la bien informada ruta de los tioles y los metabolitos de tiometilo partiendo de los conjugados de glutatión, que experimentan la hidrólisis enzimática secuencial para dar como resultado el tioéter de cisteína.

40 Un objetivo adicional de la presente invención es identificar las especies o cepas bacterianas que son capaces de convertir precursores no odoríferos del sudor humano en VSC malolientes, permitiendo hacer diana con más precisión en el origen del desarrollo del mal olor. De acuerdo con esto, Natsch y col., han concluido que los precursores no odoríferos de secreciones de la axila se transforman en sustancias volátiles mediante las enzimas bacterianas presentes solo en *Corynebacterium spp.*, y no en *Staphylococcus*.

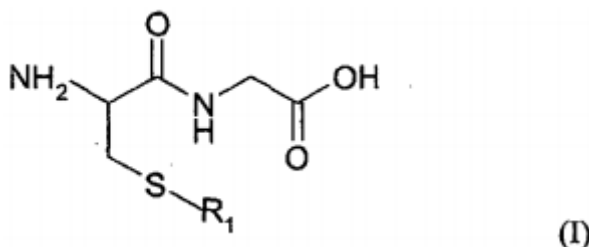
45 A la vista de la técnica anterior, el objetivo de la presente invención es encontrar precursores directos diferentes de los compuestos de azufre volátiles responsables del mal olor de la axila. Es un objetivo adicional identificar cepas bacterianas adicionales responsables de producir compuestos de azufre volátiles. El conocimiento de los

precursores y de las cepas bacterianas que se encuentran en el origen de los compuestos malolientes se puede utilizar a continuación para combatir más eficazmente el desarrollo del mal olor de las axilas en seres humanos, proporcionando, por ejemplo, procedimientos de cribado eficaces de compuestos que inhiban la formación de los VSC. Por tanto, es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar nuevos procedimientos o modos de evitar el desarrollo del mal olor.

Resumen de la invención

Los inventores de la presente invención han encontrado de forma sorprendente que el precursor directo de los compuestos de azufre volátiles (VSC) es el conjugado-S de Cisteína-Glicina, y que el conjugado de Cisteína notificado procedente de la técnica anterior era un precursor claramente menos eficaz de los VSC. En contraste además con la enseñanza de la técnica anterior, cepas de *Staphylococcus haemolyticus* son capaces de convertir el conjugado de Cys-Gly en los VSC con mayor eficacia que las cepas de *Corynebacterium* y *St. Epidermidis*, todas las cuales se encuentran en la axila humana. De acuerdo con esto, la presente invención proporciona, en un primer aspecto un procedimiento para cribar compuestos capaces de evitar, suprimir o reducir el desarrollo del mal olor sobre las superficies corporales, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- proporcionar un medio apropiado que comprenda un compuesto a cribar y al menos una enzima β -liasa funcional o una cepa bacteriana seleccionada entre la familia de los Estafilococos;
- añadir al medio al menos un compuesto precursor de la fórmula



en la que R_1 representa un resto C_1 - C_{20} en la fórmula de un compuesto activo de $HS-R_1$;

- y medir la disminución de la concentración en el medio de dicho precursor y/o aumentar la concentración en el medio en al menos un metabolito de dicho precursor, con el fin de establecer la capacidad del compuesto seleccionado para evitar, suprimir o reducir el desarrollo del mal olor.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) en la que R_1 es un grupo alquilo, alquenoilo o alquiniilo C_1 - C_{20} , que transporta opcionalmente uno o más grupos funcionales seleccionados entre grupos hidroxilo, carbonilo, carboxilo, amino, amido y átomos de halógeno.

En un tercer aspecto la presente invención proporciona el uso de bacterias de la familia de los Estafilococos en los procedimientos de selección, procedimientos de ensayo o investigación del desarrollo, inhibición, y/o aparición del mal olor corporal. De manera correspondiente, la presente invención proporciona un procedimiento para elucidar el desarrollo del mal olor corporal, comprendiendo el procedimiento la etapa de aplicar Estafilococos, o una enzima derivada de estos, a un compuesto precursor del mal olor.

En un cuarto aspecto la presente invención proporciona un procedimiento en el que se utilizan los microorganismos *Staphylococcus haemolyticus* y *St. epidermidis* con los números de depósito CNCM; I-3357 y I-3356 respectivamente.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para evitar el mal olor del sudor, comprendiendo el procedimiento la etapa de aplicar a una superficie corporal, preferiblemente a la piel de las axilas, un compuesto capaz de inhibir la conversión del compuesto (I), tal como se ha definido anteriormente, en uno de sus metabolitos malolientes.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar un producto que tenga la capacidad de reducir el desarrollo del mal olor, comprendiendo la etapa de añadir al producto un compuesto capaz de inhibir la conversión del compuesto (I), tal como se ha definido anteriormente, en un VSC.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para metabolizar un compuesto de la fórmula (I) en condiciones controladas, comprendiendo el procedimiento la etapa de exponer el compuesto de fórmula (I) a un microorganismo y/o a una β -liasa.

En un aspecto más adicional la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (III) dado a continuación.

En las figuras

La Figura 1 muestra el intervalo de masas de la HPLC-MS (cromatogramas iónicos totales de la cromatografía de alto rendimiento-espectrometría de masas) obtenidos del sudor estéril (traza A) y de diferentes fracciones de elución del sudor incubadas con *St. haemolyticus* (traza D) y no incubadas (trazas B y C). Este cromatograma muestra la desaparición de un posible compuesto precursor que tiene un peso molecular de 293 tras la incubación.

La Figura 2 muestra compuestos de azufre volátiles malolientes (1, 2, 3) y posibles compuestos precursores (9, 10, 11), el compuesto 9 ha resultado ser el precursor más eficaz del compuesto 1. Las flechas indican las etapas de síntesis de los precursores.

La Figura 3 muestra los cromatogramas y los espectros de masas obtenidos mediante la LC-MS, del precursor encontrado en la "zona 2" del sudor estéril natural (A, B), y del precursor 9 sintetizado (CD).

La Figura 4 muestra la bioconversión de los compuestos precursores sintéticos 9 y 19 de los VSC malolientes por las cepas bacterianas de *St. haemolyticus*, *St. epidermidis* and *C. xerosis*. Se puede observar que el precursor de la presente invención (9) se ha convertido eficazmente por todas las cepas.

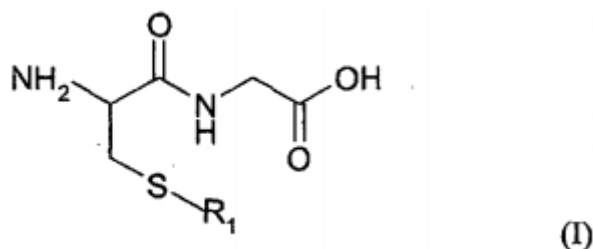
La Figura 5 muestra el resumen de las rutas sintéticas a un VSC principal (1) procedente de precursores del sudor estériles. El compuesto (9) es una realización del precursor a utilizar en el procedimiento de selección de la presente invención.

Descripción

En el contexto de esta memoria descriptiva, la palabra "comprende" se entiende que significa "incluye, entre otras cosas" no se pretende que se tome como "consiste únicamente en"

En el contexto de la presente invención, los porcentajes son porcentajes en peso de materia seca, a no ser que se indique otra cosa. De forma similar, si las proporciones se indican como partes, se entiende que son partes en peso de materia seca.

La presente invención proporciona un procedimiento de selección que utiliza un compuesto precursor de la fórmula (I)



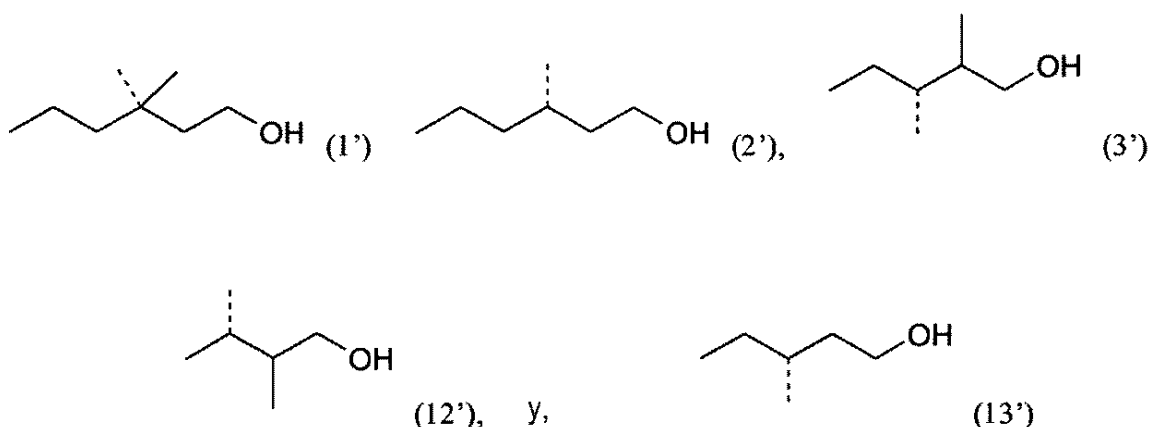
en la que R_1 representa un resto C_1 - C_{20} en la fórmula de un compuesto activo de $HS-R_1$. El término compuesto activo de $HS-R_1$ se refiere a un compuesto orgánico que se puede utilizar en los procedimientos de selección. Por ejemplo, es un compuesto que se puede detectar fácilmente. Preferiblemente, $HS-R_1$ es un compuesto oloroso. Alternativamente, $HS-R_1$ puede ser un compuesto fluorescente. Generalmente, $HS-R_1$ puede ser un compuesto que tiene la calidad de un marcador, por ejemplo, en que este tiene propiedades físicas o químicas diferentes a las del compuesto (I), que se pueden cuantificar fácilmente, por ejemplo, mediante absorbancia o fluorescencia, por ejemplo. Se puede hacer generalmente la cuantificación mediante ensayos espectrofotométricos para una selección de alto rendimiento.

En una realización de la presente invención, R_1 es un compuesto de alquilo, alquénilo o alquínilo C_1 - C_{20} , que transporta opcionalmente uno o más grupos funcionales seleccionados entre grupos hidroxilo, carbonilo, carboxilo, amino, amido y átomos de halógeno.

Más preferiblemente, R_1 es un resto orgánico C_3 - C_{16} , más preferiblemente es un resto orgánico C_5 - C_{10} .

Preferiblemente, R_1 es un alquilo o alquénilo orgánico C_3 - C_{16} que transporta al menos un grupo funcional seleccionado entre un grupo hidroxilo, carbonilo, carboxilo. Más preferiblemente, R_1 transporta un grupo hidroxilo.

Preferiblemente, R_1 se selecciona entre el grupo que consiste en los compuestos:



Los precursores con los anteriores restos $R_1 = 1', 2', \text{ o } 3'$ – liberarán, tras la actividad enzimática, los VSC correspondientes (1); (2), (3), véase la Figura 2. Respectivamente, los precursores con los restos (12') y (13') liberarán el VSC en el que la línea punteada está sustituida por un enlace S. El compuesto (I), junto con los restos $R_1 = (1'), (2'), (3'), (4'), (12'), \text{ o } (13')$, corresponde al precursor más eficaz de los VSC encontrados en el sudor de las axilas, como han establecido los presentes inventores.

Sobre la base de este sorprendente hallazgo, se puede establecer un procedimiento de selección eficaz.

Se puede sintetizar una realización preferida del precursor siguiendo el esquema proporcionado en la Figura 2. Generalmente, en una primera etapa, se puede añadir cisteína N protegida (N-Boc) mediante la adición-1,4 a un aldehído α,β insaturado. La estructura del aldehído está relacionada preferiblemente con el VSC correspondiente tal como se ha dado a conocer por *Natsch y col* (2004), esquema 1. De acuerdo con esto, si se selecciona hex-2-enal como el aldehído α,β insaturado de partida, se obtiene un precursor de fórmula (I) con $R = (2')$. De una manera similar, con el fin de obtener un precursor con $R = (1')$ el precursor se sintetiza a partir de 3-metil-hex-2-enal. Se puede obtener directamente el conjugado de cys tras la desprotección con TFA (ácido trifluoroacético), preferiblemente en un solvente adecuado, por ejemplo CH_2Cl_2 .

En una etapa adicional, se puede acoplar glicina al conjugado de la cisteína protegido obtenido anteriormente (por ejemplo, conjugado de Boc-L-Cys). Se puede llevar a cabo esta etapa con H-Gly-OBz ($\text{Bz} = -\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$) en CH_2Cl_2 en presencia de Benztiazol-1-il-oxitripirridolidino-fosfonio (PyBOP) y diisopropilamina (DIPEA) en condiciones normalizadas para la síntesis peptídica (Troccaz y col. (2004)).

En una etapa adicional, se puede eliminar el grupo α -amino protector, por ejemplo, en condiciones de CH_2Cl_2 y TFA.

En otra etapa adicional, se puede eliminar el grupo protector de benzoilo mediante saponificación en agua, etanol e hidróxido de sodio al 2%, por ejemplo, con el fin de obtener los compuestos de fórmula (I).

Los precursores de acuerdo con la presente invención liberarán, tras la escisión del enlace C-S, el compuesto de fórmula (II) que se proporciona a continuación



en la que R_1 se define tal como anteriormente para el compuesto (I)

Se ha dado a conocer la síntesis de los compuestos de esta fórmula por *Troccaz y col.* (2004).

El procedimiento de selección de la presente invención tiene el objetivo de determinar de una manera eficaz si un compuesto concreto tiene la capacidad de evitar, tratar o reducir el desarrollo del mal olor sobre las superficies corporales. En particular, el desarrollo del mal olor sobre las superficies corporales se refiere a los malos olores vinculados con las excreciones de las glándulas sudoríparas de seres humanos y animales. En las superficies corporales, y especialmente en las axilas de los seres humanos, estas excreciones están expuestas a una flora diversa de microorganismos que metabolizan los precursores no olorosos en compuestos volátiles considerados generalmente como malolientes o desagradables. Por tanto, el término superficies corporales se refiere generalmente a las partes de la piel que contienen glándulas que excretan sudor, y especialmente la región de la axila humana. La capacidad de evitar, tratar o reducir se refiere a la capacidad de un compuesto dado de inhibir de cualquier forma la incidencia del mal olor. Por ejemplo, esta capacidad puede consistir en simplemente detener la liberación adicional de mal olor que se ha desarrollado ya fuertemente, o puede evitarse, por ejemplo, el mal olor, desde el inicio. El término mal olor se refiere generalmente al mal olor asociado con los compuestos volátiles producidos tras la actividad microbiana en el sudor. Preferiblemente, en el contexto de la presente invención, el término mal olor se refiere a los olores de los compuestos de azufre volátiles (VSC), que se consideran generalmente como desagradables.

El procedimiento de selección de la presente invención comprende la etapa de proporcionar un medio que comprende un compuesto a cribar.

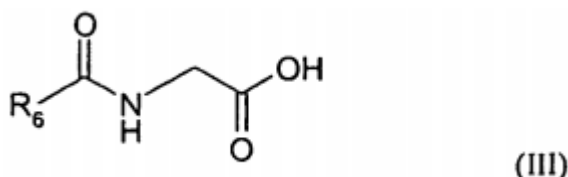
Principalmente, el medio puede ser cualquier líquido en el que puede tener lugar la reacción enzimática. Por ejemplo, el medio puede consistir simplemente en el sudor líquido recogido de individuos humanos o animales. Más prácticamente, el medio es una solución acuosa, que comprende opcionalmente los tampones y/o nutrientes que soportan una rápida actividad metabólica de las enzimas o sistemas biológicos del procedimiento de selección.

Dependiendo de la forma en la que se controla la reacción enzimática, se puede seleccionar un medio adecuado. Por ejemplo, si se diseña la reacción enzimática para llevarse a cabo por un microorganismo, se va a seleccionar un medio que permita la viabilidad o incluso el crecimiento del microorganismo. El tampón fosfato, por ejemplo, permite la supervivencia de microorganismos pero no contiene ningún nutriente adicional y de esta manera es un medio preferido para el procedimiento de selección de la presente invención. Preferiblemente, se utilizan 0,001 – 1M, más preferiblemente 0,05 -0,5 M de tampón fosfato.

Preferiblemente, el pH en el medio está en el intervalo de 3 – 9, más preferiblemente de 4 – 8, lo más preferible de 5 – 7,5.

Por otra parte, si se utiliza una enzima aislada para catalizar la reacción enzimática, el medio se puede seleccionar o ajustarse para permitir la actividad enzimática optimizada dependiendo de las preferencias de la enzima. Las variables típicas para ajustar una solución a las condiciones óptimas de una enzima incluyen, por ejemplo, la temperatura, el pH, presencia o ausencia de sales, BSA, agentes tamponantes, EDTA, y otras. Se añade al medio un compuesto a cribar. La persona experta en la técnica puede seleccionar aleatoriamente el compuesto a cribar por su capacidad de evitar el desarrollo del mal olor, o se puede seleccionar este de acuerdo con criterios estructurales. Se prefieren inhibidores conocidos de las β -liasas candidatos de los compuestos que se van a seleccionar. De manera sorprendente, sin embargo, no se ha notificado que *Staphylococcus* tenga una β -liasa que posea una similitud significativa con las β -liasas conocidas, y, de esta manera, otros compuestos pueden demostrar ser eficientes inhibidores.

En una realización de la presente invención, el compuesto a cribar es un compuesto de la fórmula (III) siguiente:



en la que R_6 es un resto alquilo, alquenoilo, alquinoilo o arilo C_2 - C_{20} , lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido y que comprende opcionalmente uno o más heteroátomos.

Preferiblemente, si se sustituye R_6 , se sustituye con un resto alquilo, alquenoilo, alquinoilo o arilo C_1 - C_{10} , lineal, ramificado o cíclico, que comprende opcionalmente uno o más heteroátomos. Más preferiblemente, si se sustituye R_6 , se sustituye, por ejemplo, con un alquilo, alcoxilo, amina, alcohol, tiol, carboxilo, y/o hidroxilamina.

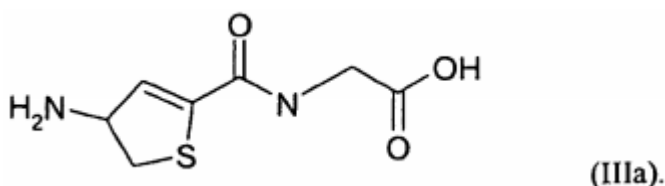
Preferiblemente, el al menos un heteroátomo se selecciona entre N, O, S, F, Cl, Br, I.

Preferiblemente, R_6 lleva al menos un grupo amino.

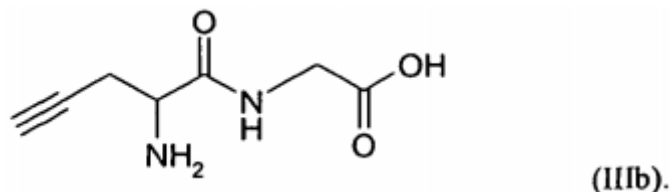
Preferiblemente, R_6 es un resto alquilo, alquenoilo, alquinoilo o arilo C_2 - C_{10} , lineal, ramificado o cíclico, que comprende opcionalmente uno o más heteroátomos.

Preferiblemente, R_6 es un anillo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido que comprende opcionalmente un heteroátomo seleccionado entre O, N, y S. Más preferiblemente, R_6 es un anillo de 5 o 6 miembros que comprende S.

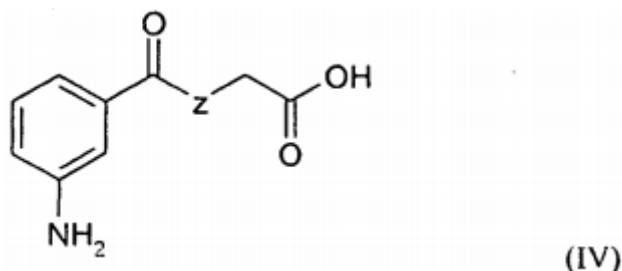
Preferiblemente, R_6 comprende un anillo de 5 miembros sustituido con al menos un grupo amino. De acuerdo con una realización preferida, el compuesto a cribar tiene la fórmula (IIIa)



Más preferiblemente es un compuesto de fórmula (IIIb) siguiente:



Alternativamente, el compuesto a cribar puede ser



- 5 definiéndose Z como NH. Tras la selección del compuesto (IV) se ha encontrado, de forma muy sorprendente, que este compuesto no inhibe realmente la formación de metabolitos del tipo del compuesto II, sino que, por el contrario, da como resultado un claro y confirmado incremento de metabolitos. Esto hace del compuesto (IV) un compuesto útil para aumentar la producción de mal olor. El compuesto (IV) es de esta manera útil como modulador de la producción de compuestos volátiles sobre las superficies corporales o in vitro, por ejemplo, para probar potencialmente la inhibición de compuestos en condiciones más severas en el procedimiento de selección de la presente invención. El procedimiento de selección de la presente invención comprende la etapa de añadir al medio al menos un compuesto precursor. El precursor se puede seleccionar entre los compuestos de fórmula (I) proporcionados anteriormente.

En una realización, el procedimiento de selección de la presente invención comprende además las etapas de añadir al medio al menos una cepa bacteriana seleccionada entre los taxones de estafilococos, corinebacterias y bacilos, o una preparación que comprende una β -liasa funcional. Preferiblemente, la cepa se selecciona entre la familia bacteriana del *Staphylococcus* spp. y/o *Corynebacterium* spp. Preferiblemente, la cepa bacteriana se selecciona entre la familia bacteriana de los Estafilococos. Más preferiblemente, la cepa se selecciona entre el grupo que consiste en *St. epidermidis*, *St. haemolyticus*, *St. capitis* y *St. homidis*. Incluso de manera más preferible, la cepa bacteriana se selecciona entre *St. haemolyticus* y *St. epidermidis*. Lo más preferible, la cepa bacteriana se selecciona entre *St. epidermidis* con número de depósito CNCM I-3356 y *St. haemolyticus* CNCM I-3357.

Tal como se ha mencionado anteriormente, los presentes inventores han encontrado de manera sorprendente que las cepas de *Staphylococcus* que colonizan la región de la axila humano liberan eficazmente VSC. La técnica anterior es hasta el momento silenciosa sobre este tema y las cepas de *Staphylococcus* se usan de esta manera preferiblemente en el procedimiento de selección de la presente invención. Por otra parte, los presentes inventores han demostrado también que las cepas de *Corynebacterium* metabolizan eficazmente el novedoso compuesto precursor (I) y pueden de esta manera utilizarse casi de forma equivalente en el procedimiento de selección de la presente invención.

Preferiblemente, el microorganismo, antes de la adición a medio del procedimiento de selección, se hace crecer en un medio nutritivo. Por ejemplo, para los microorganismos de los géneros *Staphylococcus* o *Corynebacterium*, se puede utilizar un caldo de Mueller-Hinton (Difco) o un caldo triptico de soja (Difco), suplementado preferiblemente con 0,005 a 0,5% de Tween 80, por ejemplo.

Preferiblemente, el microorganismo, antes de añadirlo al medio del procedimiento de selección, se cultiva en el medio de crecimiento hasta que el crecimiento aumenta exponencialmente y/o hasta que el aumento de la biomasa por unidad de tiempo es máximo. Preferiblemente, el medio de crecimiento comprende en esta etapa $10^{0,5}$ - 10^{14} ufc/ml. Posteriormente, se puede eliminar del medio de crecimiento, lavarse opcionalmente, y añadirse al medio del procedimiento de selección. Este último tiene preferiblemente bajo o ningún nutriente diferente del precursor de la presente invención, incitando de esta manera al microorganismo a metabolizar el precursor.

De forma alternativa, el microorganismo se puede sustituir o suplementar mediante la enzima funcional capaz de escindir el precursor en la sustancia maloliente. La enzima puede originarse a partir de una preparación de enzimas sobre la base de microorganismos, por ejemplo, o puede ser una enzima aislada. La enzima aislada se puede obtener mediante ingeniería genética y/o biotecnología.

La concentración de los constituyentes del procedimiento de selección de la presente invención se adapta

preferiblemente a niveles que permitan, por ejemplo, la cuantificación mediante procedimientos analíticos normalizados. Debido a que los VSC potencialmente liberados a partir del precursor son generalmente detectables por la nariz humana a bajas concentraciones, se pueden utilizar los correspondientes precursores en concentraciones correspondientemente bajas.

5 Generalmente, se añade el compuesto a cribar al menos a concentraciones iguales o mayores que el precursor.

Como ejemplo, el medio del procedimiento de selección comprende preferiblemente 2-500, preferiblemente 3-200, lo más preferible 4-100 $\mu\text{mol/l}$, del compuesto a cribar.

10 Preferiblemente, se añade el precursor en cantidades en generalmente los mismos intervalos que se han indicado anteriormente para el compuesto a cribar. A discreción de las personas expertas, la relación del compuesto a cribar y el precursor puede estar por encima de 1, por debajo de 1 o ser igual a 1. Por ejemplo, el compuesto a cribar puede añadirse en exceso.

El microorganismo está preferiblemente presente en cantidades de 10^2 - 10^{14} , más preferiblemente 10^5 - 10^{12} , lo más preferible 10^6 - 10^{10} ufc/ml.

15 En el caso de que el microorganismo se sustituya por una preparación de la enzima o por una enzima aislada, la cantidad de enzima que se va a añadir depende de la actividad y de la longevidad de la enzima. Dependiendo de estos factores, se puede añadir la preparación de enzima para proporcionar unidades de acción enzimática en el intervalo de 1-20.000.000.

20 El orden en el que los diferentes constituyentes de procedimiento de selección se añaden al medio del procedimiento de selección no es decisivo en general, a no ser que el compuesto que se vaya a seleccionar se añada en último lugar y una significativa actividad enzimática haya conducido ya a la formación de VSC u otros metabolitos. Por tanto, el precursor se añade preferiblemente después del compuesto a cribar, y más preferiblemente se añade el precursor después del compuesto a cribar, y después del microorganismo o la enzima. Con el fin de imitar las condiciones de la axila que conducen a la formación de los VSC después del sudor, se puede añadir el precursor de 30 s a 2 horas después de la adición del compuesto a cribar y del microorganismo o la enzima al medio.

El procedimiento de selección de la presente invención comprende preferiblemente la etapa de incubar el precursor comprendido, un compuesto a cribar y un microorganismo o una enzima a una temperatura de 25-45° C, preferiblemente 30-40° C durante 1 a 48 horas, más preferiblemente, durante 4 a 24 horas.

30 En una etapa adicional, el procedimiento de selección comprende la etapa de determinar el aumento de los metabolitos del precursor en el medio, y/o la desaparición del precursor. La concentración de la sustancia del metabolito o del precursor en el medio se puede analizar con equipo analítico normalizado. Por ejemplo, se puede emplear la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) acoplada a una detección de emisión atómica (AED). De acuerdo con esto, los metabolitos que pueden ser VSC, se extraen preferiblemente en el medio, por ejemplo, con acetato de etilo, y se inyectan en una columna GC_{SPB1}. En el caso de los VSC, el patrón interno puede ser, por ejemplo, octanol, añadido a acetato de etilo a 10 ppm con un volumen de inyección de 1 μl .

35 Se pueden emplear otros procedimientos analíticos. Debido al valor de percepción del umbral relativamente bajo de los VSC, se pueden evaluar convenientemente estos metabolitos en el medio del procedimiento de la presente invención mediante, por ejemplo, inhalación. Si el compuesto precursor contiene un resto fluorescente, que llega a ser fluorescente o, de forma alternativa, que pierde la fluorescencia tras la escisión del precursor, se puede determinar la concentración o la cantidad del metabolito comprobando la fuerza fluorescente en el medio después de la incubación.

45 En una etapa adicional, el procedimiento de selección de la presente invención comprende la etapa de concluir, a partir de la capacidad del compuesto para evitar el aumento del metabolito o de evitar la desaparición de los precursores, la capacidad del compuesto para evitar o tratar el desarrollo del mal olor. Lógicamente, puede sacarse la conclusión de que el compuesto a cribar tiene la capacidad de evitar el desarrollo del mal olor en el caso en el que la concentración de metabolitos que se encuentran en el medio tras la incubación sea, por ejemplo, 0 o menor que la concentración inicial del precursor añadido al medio. De manera similar, si la concentración del precursor permanece constante durante la incubación en el medio del procedimiento de selección, el compuesto a cribar tiene una fuerte capacidad de evitar el desarrollo del mal olor.

50 Opcionalmente, puede adelantarse un control negativo del procedimiento de selección de la presente invención, que esté desprovisto del compuesto a cribar pero que tenga por otra parte los mismos constituyentes a las mismas concentraciones y las mismas etapas de proceso que el procedimiento de selección de la presente invención. A partir de los diferentes resultados analíticos del control frente al procedimiento de selección, la persona experta puede concluir si el compuesto a cribar puede inhibir eficazmente el desarrollo del mal olor. Pueden imaginarse diferentes escenarios o parámetros experimentales que pueden tener la consecuencia de que el resultado analítico (concentración del precursor o de los metabolitos) puede tener que interpretarse de diferentes formas. Sin embargo, la persona experta adaptará estos escenarios de una manera que se pueda establecer una conclusión clara tras los

resultados analíticos.

La presente invención proporciona un procedimiento para evitar el mal olor del sudor. De acuerdo con esto, los compuestos que tienen la capacidad de evitar el desarrollo del mal olor sobre las superficies del cuerpo, se puede identificar con el método de cribado de la presente invención. Estos compuestos son capaces de inhibir la conversión del compuesto (I) en los VSC. Para los fines de administración o aplicación a la superficie corporal una cantidad suficiente de al menos un compuesto puede ponerse de tal forma que se pueda administrar o aplicar a la piel fácilmente.

Por ejemplo, el compuesto para la prevención del mal olor se puede añadir, por ejemplo, a un producto para el aseo corporal, tal como una loción corporal, un desodorante, un ungüento, un jabón, un champú, una fragancia fina. El compuesto puede añadirse simplemente a una solución acuosa. Por ejemplo, el compuesto puede añadirse a una emulsión. Dependiendo de la solubilidad del compuesto, la persona experta seleccionará la forma adecuada de aplicación. Si el compuesto es hidrófilo, por ejemplo, se puede añadir a la fase acuosa de una emulsión, que a continuación se aplica a la superficie de la piel. Si el compuesto es lipófilo, por ejemplo, se añadirá a la fase oleosa de una emulsión, o a un ungüento basado en aceite.

Preferiblemente, el compuesto para la prevención del mal olor se añade en cantidades suficientes para inhibir eficazmente la formación de los VSC sobre la superficie del cuerpo. Las concentraciones necesarias del producto en el que se incorpora el compuesto dependen de la eficacia del compuesto y de la forma del producto que se va a administrar y pueden de esta manera establecerse por la persona experta como una función de estos parámetros. Por ejemplo, 10^{-12} a 10^{-4} mol, preferiblemente 10^{-11} - 10^{-5} moles del compuesto se administran por cm^2 de la superficie corporal.

La presente invención proporciona un procedimiento para preparar un producto que tiene la capacidad de reducir el desarrollo del mal olor, que comprende la etapa de añadir al producto un compuesto capaz de inhibir la conversión del compuesto (I) a un compuesto de azufre volátil. Se puede seleccionar el producto, por ejemplo, entre los productos para el cuidado personal mencionados anteriormente. Lo anteriormente mencionado relacionado con la solubilidad y la concentración del compuesto en el producto se aplica igualmente al producto que tiene la capacidad de reducir el desarrollo del mal olor. Dependiendo de la cantidad usualmente administrada a la piel, se adapta la concentración de acuerdo con esto para obtener suficiente eficacia. Por ejemplo, si el producto es un desodorante que aplica una película sobre la piel de las axilas humanas, el compuesto está presente preferiblemente en una concentración en el intervalo, por ejemplo, de 0,1 a 1000 mmol/l, más preferiblemente 1 a 500 mol/l.

La presente invención proporciona un procedimiento para metabolizar un compuesto de la fórmula (I) en condiciones controladas, comprendiendo el procedimiento la etapa de exponer el compuesto de fórmula (I) a un microorganismo y/o a una β -liasa. El término "condiciones controladas" se refiere a condiciones diferentes de las condiciones naturales sobre la piel humana, especialmente de la región de la axila. El término "condición controlada", en contraste, se refiere a condiciones en las que la concentración del compuesto de fórmula (I) y/o del microorganismo y/o de la β -liasa puede determinarse a discreción de la persona experta. Preferiblemente, el término "condiciones controladas" se refiere, por ejemplo, a las condiciones que se encuentran en un laboratorio, y/o en las instalaciones de fabricación. El procedimiento de selección tal como se ha dado a conocer anteriormente, por ejemplo, representa una condición controlada en este sentido. Preferiblemente, el término condiciones controladas se refiere al hecho de que el compuesto (I) se metaboliza en el interior de un recipiente que comprende el compuesto (I), y un microorganismo y/o una β -liasa, todos los cuales se disuelven o suspenden en 5 μl a 1000 l de agua en cantidades y concentraciones determinadas.

La presente invención proporciona además un líquido y/o una solución acuosa que comprende el compuesto precursor (I) y 1-10, preferiblemente 1-5, más preferiblemente 1-2 cepas bacterianas en concentraciones de 10^1 - 10^{13} ufc/ml cada una, o para suplementar o sustituir las cepas bacterianas, las cantidades equivalentes de una β -liasa funcional. Estas son las concentraciones preferidas requeridas para metabolizar el compuesto precursor de fórmula (I).

La presente invención se refiere también al uso de compuesto de fórmula (I) en los procedimientos de selección, ensayos o procedimientos de investigación del desarrollo, inhibición, y/o aparición del mal olor corporal.

Ejemplos

En los Ejemplos 1 a 5 siguientes, se identificó el precursor directo de los VSC responsables del mal olor del sudor y se notificaron las cepas bacterianas de Estafilococos que tenían la capacidad de producir los VSC. Se llevó a cabo esto comparando los análisis de HPLC del sudor fermentado y sin fermentar y excluyendo la presencia del precursor postulado en la técnica anterior mediante la comparación de los pesos moleculares y los tiempos de retención de la LC, que sugerían la presencia de otro precursor en el Ejemplo 1.

En los Ejemplos 2 y 3, se identificaron las estructuras de los VSC obtenidos mediante la actividad metabólica de las cepas bacterianas.

En los Ejemplos 4 y 5 se probó si el precursor propuesto produce los mismos VSC que el precursor que se

encuentra en el sudor natural, lo que se llevó a cabo sintetizando los precursores de la técnica presente y de la técnica anterior (Ejemplo 4) y exponiéndolos a diferentes microorganismos, seguido por el análisis de los metabolitos.

- 5 En el Ejemplo 6, un procedimiento para seleccionar compuestos que tienen un potencial efecto de inhibición del mal olor, debido a su posible capacidad de convertir el precursor del mal olor en los VSC malolientes.

En los siguientes ejemplos se llevó a cabo la GC analítica en un equipo Agilent 6890 acoplado a detección de emisión atómica (AED de Jass, Alemania); He como gas portador; columnas capilares OV1701 de sílice fundida. DMePeBetacdx®, 10 m x 0,25 mm de d.i. con película de 0,25 µm (de Mega, Brechbühler A.G., Suiza). EI-MS: sistema Agilent 6890-GC acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolo HP-MSD-5973; energía aproximada del electrón 70 eV; fragmentos de iones m/z (rel. Int., en % del pico base, SPB-1, 30 m x 0,25 mm de d.i. con una película de 0,25 µm, todo de Supelco). Se determinaron los índices de retención (I) relativos al tiempo de retención (tR) de una serie de n-alcenos con interpolación lineal por medio de un programa normalizado de temperatura de una GC (50° C durante 5 min, a continuación 5° C/min a 240° C y 20 min a 240° C) con una precisión del 0,5%. ¹H-, ¹³C, espectrómetro Spectra Brucker-AMX-360; en CDCl₃; valores δ en ppm campo abajo desde Me Si (= 0 ppm), J en Hz; asignaciones mediante experimentos COSY45 y HMCQ.

Las columnas de HPLC fueron Nucleodur C18 Pyramid® 250 mm x 2 mm de d.i., la columna preparativa fue una Nucleodur C18 Pyramid® de 250 mm x 10 mm (de Machery-Nagel, Suiza).

Se llevaron a cabo los análisis de HPLC-MS utilizando el sistema de LC-MS Agilent 1100 equipado con una bomba binaria B1312A, un detector de UV G1314A y un espectrómetro de masas G1946D con una fuente de ionización química a presión atmosférica (APCI), se registraron los espectros de masa en modo ion positivo y negativo (intervalo de barrido 50-800 Da) simultáneamente. Se llevaron a cabo separaciones mediante HPLC en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente.

De forma alternativa, se llevó a cabo una ionización química a presión atmosférica positiva (APCI) Thermo Finnigan utilizando un voltaje de pulverización de 4,5 kV, temperatura del capilar a 200° C, gas N₂ a un caudal de 55 (unidades arbitrarias Finnigan) con un caudal de gas auxiliar ajustado a ESI (unidades arbitrarias Finnigan). El solvente para la elución fue CH₃CN y agua que contenía ácido fórmico al 0,1%. El gradiente de la LC comenzó a un 100% de agua durante 5 min que aumentó a continuación desde 0% de CH₃CN a 50% de CH₃CN en 30 min a un caudal de 0,25 ml/min y en el modo preparativo se utilizó un caudal de 6 ml/min.

Las cepas bacterianas utilizadas en los siguientes experimentos son:

30 *Staphylococcus epidermidis* CNCM I-3356
Staphylococcus haemolyticus CNCM 1-3357
Corynebacterium xerosis DSMZ 207 43 (correspondiente a la ATCC 373) fueron proporcionadas por la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania), conocida como una cepa de referencia procedente de la bibliografía

35 Ejemplos 1

Sugerencia de precursor del mal olor mediante recogida y fermentación del sudor

Se recogieron secreciones apocrinas y ecrinas de las axilas debido a una transpiración excesiva. Estas secreciones se esterilizaron inmediatamente a través de un filtro doble que consistía en una membrana de 1 µm seguido por un filtro estéril de 0,2 µm y se congelaron tal como se notificó en M. Troccaz, C. Starkenmann, Y. Niclass, M. van de Waal, A. J. Clark, Chem. Biodiversity, 2004, 1, 1022-1035. Se liofilizaron un total de 250 ml de sudor axilar estéril y a continuación se volvió a diluir el sólido en agua destilada y se percoló a través de una columna Lobar® RP-18 SiO₂. Se llevó a cabo la elución con porciones de 200 ml de agua, a continuación se aumentó la proporción de etanol hasta el 100%.

Se trató una porción pequeña de cada fracción (10%) con *Staphylococcus haemolyticus*. Se registró la HPLC-MS (APCI⁺ y APCI⁻) antes y después de la incubación. Los compuestos volátiles extraídos del caldo fermentado se inyectaron en una columna de GC apolar acoplada a MS. Fue posible a partir de estas medidas identificar una traza de 3-metil-3-sulfanilhexan-1-ol en la fracción 3 fermentada (agua:etanol = 4:1) y solo esta fracción produjo una nota olfativa sulfurosa del sudor típica de cebolla, pomelo, *Salvia sclarea*.

Se llevó a cabo una separación preparativa de la fracción 3 en un HPLC. Se recogieron los tres picos principales así como cuatro zonas de elución entre los picos (Figura 1, traza B). a continuación, la fracción de la "zona 2" (fermentada y no fermentada) se reinyectó sobre una columna de HPLC acoplada a un espectrómetro de masas APCI (Figura 1, las trazas C y D corresponden a la zona 2 de la traza B). Todas las fracciones, zonas y picos, se trataron con *St haemolyticus* y la fracción correspondiente a la "zona 2" (Figura 1, traza D) se retuvo debido a que tenía el típico olor maloliente del sudor. Tras la incubación, resultó claro a partir de la traza de la HPLC que M+1 correspondiente a 279 y M+1 correspondiente a 293 se han transformado (véanse las flechas en la Figura 1, traza D). Todas las inyecciones se llevaron a cabo en modo MS-3 en modo positivo y negativo. El compuesto principal en

M+1 293 mostró un m/z 276, pérdida de NH₃, a continuación m/z 179, interpretado como una pérdida de 3-metilhexanol, a continuación m/z de 162, 144, 166 atribuido a una pérdida de NH₃, H₂O y CO. En modo negativo, M-1 se fragmentó en m/z 143 correspondiente a una β eliminación de 3-metil-3-sulfanilhexan-1-ol.

- 5 A partir de estas observaciones fue posible excluir el glutatión S-conjugado (M+1 422) o la cisteína S-conjugada (M+1 236) por ser precursores de 3-metil-3-sulfanilhexan-1-ol, por lo que la cisteína-glicina S-conjugada, de fórmula molecular C₁₂H₂₄N₂O₄S, que corresponde a un peso molecular de 292, fue por tanto propuesta para ser el precursor de 3-metil-3-sulfanilhexan-1-ol (véase la Figura 3).

Ejemplo 2

Identificación de 3-S-cys-gly—metil-hexano-1-ol en la fracción 3

- 10 Se liofilizó la fracción 3 (16 mg) y se purificó adicionalmente en un HPLC preparativo. Se recogieron zonas entre los picos y los picos por separado. Se inyectaron cada una de las fracciones y zonas en un LCMS, se extrajo tal como se describe a continuación y se inyectó en un GC-MS. La Zona 2 (< 0,5 mg) tenía tres APCI + señales; una señal amplia de 10,5 a 21 min., que tenía M+1 = 279 y en 21,5 min, M+1 = 293 seguido a 22 min., por M+1 = 181. Se registraron también los APCI y se registraron los MS 3 también automáticamente. Tras la incubación con *St.*
- 15 *Haemolyticus*, las dos señales de la LC-MS fueron a los 20 min y 21,5 min. La Zona 2 produjo tres compuestos de azufre observados en GC-MS: **3** < 1 % : *I*_{SPB-1} 1080, MS : 134 (40, M+), 100 (80), 74 (98), 71 (70), 55 (65), 41 (100); **2** = 5 %: *I*_{SPB-1} 1093, MS : 134 (5), 100 (50), 67 (40), 57 (60), 55 (100); **1** = 94 %: *I*_{SPO-1} 1149, MS : 148 (4), 114 (20), 97 (70), 71 (60), 55 (100). Inyección en una columna quiral GC *DMePeBetacdx*: **1**-S (rt. 17,6 min.) 62,4%, **1**-R (rt. 17,62 min.) 16,2%, **1**-R/S = 0,005 mg (+/- 0,001), ee de S = 65%. Compuesto **2**-R (rt. 16,79 min.), **2**-S (rt. 16,80 min.), **2**-R/S = 14,7%, S-principal debido al solapamiento del pico, sin cuantificar. El compuesto **3** no se observó casi.
- 20

Ejemplo 3

Determinación de la estructura de los compuestos de azufre volátiles encontrados en el sudor fermentado

- Se extrajo la Zona 2 de la fracción 3 del caldo fermentado con acetato de etilo y se inyectó en una columna GC *SPB-1* acoplada a un MS. Los inventores observaron un hombro muy pequeño con m/z 134 para un índice de retención correspondiente a *I*_{SPB1} de 1080 y con un modelo de fragmentación cercano a 2-metil-3-sulfanil-1-pentan-1-ol. A continuación un pico más grande con m/z en 134 con un índice de retención *I*_{SPB-1} de 1093, que corresponde a 3-sulfanilhexano-1-ol y teniendo el producto principal formado un m/z de 148 con un *I*_{SPB-1} de 1149 y de acuerdo con el modelo de fragmentación de la MS se atribuyó este a (R/S)-3-metil-3-sulfanilhexan-1-ol. Fue también posible establecer después de una inyección en la columna quiral, montada en un GC equipado con detección de emisión atómica (AED), que el enantiómero principal formado era el S-3-metil-3-sulfanilhexan-1-ol S-1, con un exceso enantiomérico del 60%. En el caso del (R/S)-3-sulfanilhexano-1-ol no fue posible medir con precisión la relación enantiomérica debido a una mala separación de ambos enantiómeros, pero el enantiómero S-2 fue claramente el isómero principal formado.
- 25
- 30

- Por tanto, se encontró que 2-metil-3-sulfanil-1-pentan-1-ol, 3-sulfanilhexano-1-ol y (R/S)-3-metil-3-sulfanilhexan-1-ol eran importantes compuestos de azufre volátiles del sudor metabolizados por *St. haemolyticus*.
- 35

Ejemplo 4

Síntesis de derivados de sulfanilo y derivados de conjugados de cisteína como precursores de los VSC

- La Figura 2 ilustra la síntesis de diversos derivados y los precursores de los VSC (Compuestos **9**, **10**, **11**). Se ha descrito anteriormente la preparación de compuestos de azufre volátiles (Troccaz y col, 2004). Se llevó a cabo la 1,4-adición de cisteína a aldehídos α,β-insaturados mediante la adición de t-butoxicarbonilo (Boc)-L-cisteína a 3-metil-2-hexenal seguido por la reducción con NaBH₄ (Natsch y col 2004) (etapa a). Se obtuvo el conjugado S-Cys **11** tras la desprotección del compuesto **6** con TFA (ácido trifluoroacético en CH₂Cl₂ (etapa b). se llevó a cabo el acoplamiento de H-Gly-OBz a **6** (etapa b) en CH₂Cl₂ en presencia de PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio) y DIPEA (diisopropilamina), en condiciones normalizadas para la síntesis peptídica, para preparar **7**. El grupo protector α-amino de **7** se eliminó en condiciones de CH₂Cl₂ y (TFA) (etapa c) para producir **8**. No fue posible eliminar el grupo protector benzoilo mediante hidrogenólisis, pero fue posible llevar a cabo una saponificación en agua, etanol e hidróxido de sodio al 2% (etapa d) para preparar **9**. Los precursores más probables de los compuestos de azufre volátiles son los conjugados de glutatión. Por este motivo, se acopló **8** a Boc-Glu-OBz, tal como se describe para **7**, los grupos α-amino se escindieron en CH₂Cl₂, las condiciones de TFA y los ésteres de bencilo se hidrolizaron en disolución acuosa de hidróxido de sodio y etanol para dar **10** (etapa e).
- 40
- 45
- 50

Se proporciona a continuación el protocolo exacto para la preparación del compuesto **9**:

- (2R)-S-[1-(2-hidroxietil)-1-metilbutil]- tBoc-Cys (**6**), preparada de acuerdo con Natsch y col (2004), (679 mg, 2 mmoles) se diluyó en CH₂Cl₂ (6 ml) y H-Gly-OBzl (741 mg, 2.2 mmoles), Pybop (1.14 g, 2.2 mmoles) en presencia de diisopropiletilamina (774 mg, 6 mmoles) se agitaron durante la noche a temperatura ambiente. La elaboración habitual continuó con la desprotección del grupo α-amino de (2R)-S-[1-(2-hidroxietil)-1-
- 55

metilbutil]- tBoc-Cys-Gly-OBzl **7** en CH₂Cl₂ (6 ml) ácido trifluoroacético (9 ml) durante 1,3 horas a temperatura ambiente. El producto oleoso bruto **8** (1 g) se diluyó en agua (70 ml) MeOH 50 ml y NaOH (2 g) y se calentó durante 1 hora a 60° C. Se llevó el pH hasta 4 con HCl 1 M. Se eliminó el metanol a vacío, y se liofilizó la mezcla. Se volvió a diluir el sólido en agua (1 ml) y se sometió a cromatografía instantánea en SiO₂-RP18 (columna de 5 cm de d.i., altura de la sílice 12 cm). La elución comenzó con agua y se eluyó el producto **9** con agua etanol en una relación 4 a 1. Los inventores obtuvieron **9** (340 mg, rendimiento del 58%). HPLC, r.t. 22,2 min, APCI+: M + 1 = 293, MS2 276, MS3 179, MS4 162, MS5 144, MS6 116, APCI- : M - 1 = 291, MS2 143, MS3 99, 58, RMN ¹H en D₂O: 4,16-4,19 (m, 1 H, C(4)); 3,95 (d, J = 17,5 Hz, 1H, C(2)); 3,74 (t, J = 7 Hz, 2H, C(8)) ; 3,70 (d, J = 17,5 Hz, 1 H, C(2)) ; 3,09 (dd, J = 13,5, 5,5 Hz, 1H, C(5)), 2,99 (dd, J = 13,5, 8,0 Hz, 1H, C(5)) ; 1,83 (t, J = 6,5 Hz, 2H, C(7)), 1,50-1,55 (m, 2 H, C (9)); 1,38 (m, 2 H, C (10)); 1,29 (s, 3 H, C(12)); 0,95 (t, J = 7 Hz, 3 H, C(11)), RMN ¹³C: 178,8 (s, C(1)); 171,0 (s, C(3)) ; 61,1 (t, C(8)); 55,8 (d, C(4)); 51,9 (s, C(6)); 46,2 (t, C(2)); 44,8 (t, C(9)) ; 43,7 (t, C(7)) ; 30,6 (t, C(5)); 28,3 (q, C(12)), 19,9 (t, C(10)); 16,5 (q, C(11)).

Ejemplo 5

Producción de (R/S)-3-metil-3-sulfanil-hexano-1-ol procedente de la exposición de precursores sintetizados con *St. haemolyticus*, *C. xerosis* y *St. epidermidis*

Los inventores han mostrado anteriormente que de la biodegradación del sudor estéril con diferentes microorganismos, *St. haemolyticus* produjo el olor del sudor, típicamente sulfuroso, a pesar que la declaración de la técnica anterior de que *Staphylococci*, y específicamente *St. epidermidis* no tiene una actividad β-liasa y únicamente *Corynebacterium spp.*, fueron capaces de liberar tioles a partir de la cisteína S-conjugada (Natsch y col. (2004)). De forma sorprendente, en los presentes experimentos, *C. xerosis* produjo un olor de tipo sulfuroso más débil en comparación con *St. haemolyticus* y los inventores estuvieron interesados en observar las diferencias entre estas tres cepas, cuando se incubaron con los precursores **9**, **10**, o **11**, en el que el precursor **9** es una realización del compuesto (I) de la presente invención.

Se incubaron aislados de bacterias que crecían aeróbicamente (5 ml, 8 x 10⁸ ufc/ml), con 0,1 mg de cada uno de los precursores a 35° C, durante un periodo de 18 horas. Se extrajeron los compuestos de azufre volátiles con EtOAc y se analizaron el GC-AED en una columna quiral. Se repitió cada bioconversión al menos tres veces, un blanco que contenía únicamente la bacteria, y se preparó el otro blanco a partir en el medio de crecimiento solo con el precursor. No se detectaron compuestos de azufre en estos controles. Se usó octano tiol como un patrón interno, las curvas de calibración mostraron que la mejor reproducibilidad fue en el intervalo de 1 a 10 ppm, cuando se inyectó 1 µl, con menos de un 5% de variabilidad. Las variaciones de la concentración observadas para **1** se correlacionaron con la variación de la concentración de los microorganismos en los 5 ml utilizados para la incubación, pero todos los resultados de los inventores fueron consistentes; **9** proporcionó siempre un mejor rendimiento químico en comparación con **11**. Se prepararon los precursores a partir de aminoácidos naturales ópticamente activos. La adición tipo Michael de la Boc-cisteína a *E/Z*-3 metil-2-hexenal no fue estereoselectiva y por este motivo, los inventores esperaban producir una mezcla racémica de **1** a partir de **9** con *St. haemolyticus* que se confirmó. El derivado **10** nunca produjo ninguna traza de **1**.

Se proporciona a continuación el protocolo de fermentación detallado.

Se hicieron crecer aislados de bacterias aeróbicamente en los medios líquidos adecuados a 37° C hasta una DO₆₀₀ = 1,0. Se cosecharon las células mediante centrifugación a 3000 g, 10 min, se lavaron una vez con tampón fosfato 0,1 M estéril (pH 6,0) y se volvieron a suspender en tampón reciente. La concentración de las cepas individuales incubadas con el precursor del sudor estuvo entre 1.10⁺⁸ y 1.10⁰⁺¹⁰ ufc/ml. Estas bacterias preparadas de forma reciente (5 ml), se incubaron con 0,1 ml de precursores (5 mg en 10 ml de agua), (o la fracción del sudor, en el Ejemplo 1 anterior), a 37° C pH 6 en un frasco cerrado. Después del tiempo de incubación de 1, 4 y 18 horas, se añadió 1 ml de acetato de etilo que contenía octanotiol y octanodecano en 0,02 mg/ml y se centrifugó el caldo de la fermentación a 16.000 g. La fase orgánica se inyectó directamente en una columna GC *SPB1* acoplada a un MS y en una columna quiral GC *DMePeBetaedx* acoplada a una detección AED.

Se repitieron estos experimentos tres veces, se llevaron a cabo dos blancos con los microorganismos sin el precursor y uno con el precursor en el tampón de crecimiento solo. No se detectó formación de compuestos de azufre en los blancos. Se calculó el factor de respuesta para 1 µl inyectado de una solución de 0,01 mg/ml de octanotiol en comparación de 1 µl inyectado de una solución racémica de 0,01 mg/ml de 3-metil-3-sulfanilhexano-1-ol. La adición de ambas áreas de los picos (R/S) proporcionó las superficies de los picos 280 (+/- 5) y octanotiol 303 (+/- 3) en cuatro inyecciones, de tal manera que los inventores utilizaron como una aproximación un factor de respuesta de 1. El factor de correlación para 1 µl inyectado en ambas columnas, fue superior a 0,998 en el intervalo de 1 a 10 ppm de (R/S)-3-metil-3-sulfanilhexano-1-ol.

Estos resultados muestran que el compuesto **9**, que es una realización preferida del compuesto (I), se convierte más eficazmente en el compuesto maloliente **1**, y de esta manera es el probable precursor. El compuesto **11**, sin embargo, que se ha sugerido en la técnica anterior como potencial precursor, proporciona un rendimiento

claramente inferior de **1**, incluso en *C. spp*, que se consideraba hasta ese momento que era el único microorganismo que liberaba los VSC. Por tanto, no se puede considerar que el compuesto **11** es el precursor directo en la principal ruta sintética de **1**.

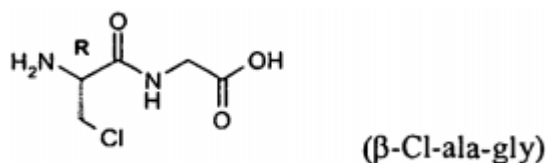
Ejemplo 6

5 Selección de compuestos que inhiben potencialmente el mal olor mediante el procedimiento de la invención

Se evaluó en este ejemplo el efecto inhibitor de β -Cl-ala-gly sobre la formación de mal olor.

Microorganismos suspendidos en tampón reciente (Ejemplo 5, protocolo de fermentación detallado) se dividieron en dos muestras X e Y (control negativo) de 5 ml.

Un compuesto a cribar de la fórmula



- 10 (obtenido en el Ejemplo 9) se añadió a la muestra X a una concentración de 2 μ mol/l.
- Las muestras que comprendían los microorganismos suspendidos y el compuesto que se iba a seleccionar se incubaron a 37° C durante 30 min.
- 15 Posteriormente, ambas muestras se incubaron adicionalmente con 0,1 ml del precursor (2R)-S-[1-(2-hidroxietil)-1-metilbutil]-Cys-Gly (5 mg en 10 ml de agua) (obtenido en el ejemplo 4), a 37° C pH 6 en un frasco cerrado. Esto corresponde a un total de 2 μ mol/l de precursor en ambas muestras.
- La concentración de cepas individuales incubadas con el precursor del mal olor está normalmente entre $1,1 \times 10^8$ y $1,1 \times 10^{10}$ ufc/ml.
- 20 Después de los tiempos de incubación de 1, 4 y 18 horas, el aumento de la sustancia maloliente (compuesto **1** en la Figura 2) se determinó de manera breve mediante la inhalación de una persona entrenada.
- Si β -Cl-ala-gly tiene la capacidad de evitar o tratar el desarrollo del mal olor, presentará menos o ningún sabor acre típico del compuesto **1**, en la Figura 2 (véase el Ejemplo 1).
- Además, se llevó a cabo un análisis cuantitativo de los compuestos de azufre en el medio fermentado con el fin de determinar la eficacia de la β -Cl-ala-gly para evitar el desarrollo del mal olor.
- 25 De acuerdo con esto, se añadió 1 ml de acetato de etilo que contenía octanotiol y octadecano en 0,02 mg/ml a las muestras (X) e (Y) seguido por la centrifugación a 16.000 g. La fase orgánica se inyectó directamente en una columna GC SPB1 acoplada a un MS y en una columna quiral GC DMePeBetacdx acoplado a una detección AED.
- Para el patrón interno, se calculó el factor de respuesta para 1 μ l inyectado de una solución de 0,01 mg/ml de octanotiol en comparación de 1 μ l inyectado de una solución racémica de 0,01 mg/ml de 3-metil-3-sulfanilhexano-1-ol. La adición de ambas áreas de los picos (R/S) proporcionó 280 (+/- 5) y octanotiol (+/- 3) para las superficies de los picos durante las inyecciones, de tal manera que los inventores utilizaron como una aproximación un factor de respuesta de 1. Para la muestra (X), el factor de correlación para 1 μ l inyectado en ambas columnas, fue superior a 0,998, en el intervalo de 1 a 10 ppm de (R/S)-3-metil-3-sulfanilhexano-1-ol.
- 30 Estequiométricamente, 0,2 μ mol de precursor producen 0,025 mg de VSC en 1 ml de acetato de etilo, si se metaboliza todo el precursor. Si se miden menos de 0,25 mg de VSC en la muestra X mediante el sistema AED, el compuesto seleccionado, β -Cl-ala-gly, tiene la capacidad de reducir el desarrollo del mal olor. En otras palabras, no se metaboliza todo el precursor. Cuanto más VSC se encuentra en la muestra X, que contiene también un posible inhibidor, menos propiedades inhibitoras tiene el compuesto. El procedimiento de la presente invención permite seleccionar eficazmente los compuestos para su capacidad de evitar o tratar el desarrollo del mal olor sobre las superficies corporales.
- 40

Ejemplo 7

Síntesis de N-([4R]-4-amino-4,5-dihidro-2-tienil)carbonil} glicina (compuesto IIIa)

Etapas 1: Preparación de N-(terc-butoxicarbonil)-S-(2-etoxi-2-oxoetil)-L-cisteinato de etilo **12**.

Al clorhidrato del éster etílico de L-cisteína ACROS (13,5 g, 72,8 mmoles) se añadieron 128 ml de CH_2Cl_2 y di-terc-

butildicarbonato (16,9 g, 77,5 mmoles) a 0° C gota a gota, seguido por trietilamina (39 ml, 279 mmoles). Se eliminó el baño de hielo y se agitó la reacción durante 5 horas. Se añadió etilbromoacetato (10,5 ml, 94,6 mmoles) a 0° C. Después de 30 min, se retiró el baño de hielo y se agitó la reacción durante 1 hora a temperatura ambiente.

- 5 El CH₂Cl₂ se eliminó mediante destilación; se volvió a diluir la mezcla de reacción con salmuera y se extrajo dos veces con dietiléter. Tras la concentración, el producto bruto (25,7 g) se sometió a cromatografía instantánea (diámetro de la columna 7,5 cm, SiO₂ 15 cm de altura), la elución con ciclohexano-etilacetato (75/25) proporcionó 13,76 g de (**12**) (rendimiento del 56%).

Etapas 2: Preparación de (R)-Etil-4-f(terc-butoxicarbonil)amino]tetrahydro-3-oxo-2-tiofenocarboxilato **13**.

- 10 NaH (1,64 g, 55%-65% Fluka, 41 mmoles) lavado con pentano dos veces, se suspendió en THF (20 ml), a continuación se añadió lentamente EtOH anhidro (2,4 ml, 41 mmoles). Cuando se detuvo la producción de H₂, se añadió más THF (160 ml) y a continuación se añadió **12** (13,73 g, 41 mmoles) en THF (20 ml). Después de 40 min., se añadieron 4 ml de ácido acético. Se eliminó el disolvente a vacío. Se extrajo el producto bruto con dietiléter y se lavó con salmuera. El producto bruto (12 g) se sometió a cromatografía instantánea (diámetro de la columna 7,5 cm, SiO₂ 15 cm de altura), la elución con ciclohexano-etilacetato (4/1) proporcionó 9,22 g de **13** (rendimiento del 78%)

- 15 Etapas 3: Preparación de ácido (R)-4-[(terc-butoxicarbonil)amino]-4,5-dihidro-2-tiofenocarboxílico **14**.

- 20 **3.1: reducción:** El oxoéster (**13**) (9,16 g, 31,7 mmoles) en 90 ml de EtOH se redujo con NaBH₄ (844 mg, 22 mmoles) añadido en partes a -30° C. Después de 30 min a -30° C, se añadieron 8,7 ml de acetona seguidos con 1,1 ml de ácido acético. Se concentró la mezcla bruta a 40°C a 100 mbar (10 kPa), se extrajo con EtOAc y salmuera a pH 7. Se eliminó el solvente a 0,1 mbar (10 Pa), 9,20 g (rendimiento del 99%) de (R)-etil-4-[(terc-butoxicarbonil)amino]tetrahydro-3-hidroxi-2-tiofenocarboxilato bruto.

- 25 **3.2: eliminación:** El hidroxioéster (9,15 g, 31 mmoles) se diluyó en 130 ml de CH₂Cl₂, en presencia de 17,5 ml de trietilamina. A 0° C, se añadió mesilcloruro (4,88 ml, 62,9 mmoles) gota a gota. Después de 4 horas con agitación, se añadió CH₂Cl₂, y se extrajeron las fases orgánicas hasta la neutralidad con salmuera. Se evaporó el solvente y el producto bruto (9,12 g) se sometió a cromatografía instantánea (diámetro de la columna 7,5 cm, SiO₂ 15 cm de altura) la elución con ciclohexano-etilacetato (85/15) proporcionó 6,5 g (rendimiento del 77%) de (R)-etil-4-[(terc-butoxicarbonil)amino]-4,5-dihidro-2-tiofenocarboxilato.

- 30 **3.3: saponificación.** El éster (6,5 g, 23,8 mmoles) se saponificó en 76 ml de una solución de EtOH. A 0° C, se añadieron lentamente 32 ml de una solución acuosa de LiOH 1 N y a continuación, la reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadió HCl 3 N, se eliminó el EtOH a vacío, a continuación se extrajo el producto con Et₂O, 5,93 g de producto bruto de un polvo de color marrón (**14**).

Etapas 4: Preparación del compuesto (IIIa)

- 35 **4.1: acoplamiento:** El ácido carboxílico N-boc protegido (**14**) (2,45 g, 10 mmoles) en 30 ml de una solución de CH₂Cl₂ se trató con H-Gly-OBzl-p-tosilato (3,7 g, 11 mmoles, *Novabiochem*) y diisopropiletilamina (3,88 g, 30 mmoles) durante 16 horas a temperatura ambiente. Se extrajo la mezcla con CH₂Cl₂ y se lavó con salmuera. 11 g del producto bruto se sometieron a cromatografía instantánea (diámetro de la columna 7,5 cm, SiO₂ 15 cm de altura) la elución con EtOAc, proporcionó 3,66 g de un sólido de color blanco (rendimiento del 93%) de N-((4R)-4-[(terc-butoxicarbonil)amino]-4,5-dihidro-2-tienil)carbonil) glicinato de bencilo.

- 40 **4.2: desprotecciones:** el compuesto protegido (3,60 g, 9,18 mmoles) en 12 ml de una solución de CH₂Cl₂ se trató con 26 ml de TFA durante 4 horas a temperatura ambiente. Se eliminó mediante destilación el TFA en modo azeotrópico añadiendo 3 porciones de tolueno (3 x 80 ml). El producto bruto (3,11 g) se disolvió directamente en 55 ml de agua, 55 ml de metanol, 2,2 g de hidróxido de sodio, y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación se enfrió la reacción a 0° C y se añadió HCl 3 M a pH 1. La mezcla resultante se concentró a 10 mbar (1 kPa), 30° C y se cromatografió (columna de 2,5 cm, 80 g Dowex 50WX8 siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Los inventores obtuvieron 1,2 g (rendimiento del 65%) del compuesto IIIa.

45 APCI+: M + 1 = 202, RMN ¹H en D₂O: 6,37 (d, J = 3,0 Hz, 1 H, C(4)); 4,82-4,90 (m, 1 H, C(3)); 3,88-3,80 (m, 1 H, C(2)); 3,84 (s, 2 H, C(7)); 3,43 (dd, J = 13,0, 3,0, 1 H, C(7)), RMN ¹³C: 179,0 (s, C(8)); 166,3 (s, C(6)); 148,0 (s, C(5)); 125,4 (d, C(4)); 61,3 (d, C(3)); 46,4 (t, C(7)); 38,6 (t, C(2)).

50 **Ejemplo 8**

Síntesis del inhibidor: Preparación de la N-[(2S)-2-amino-4-pentinoil]glicina (compuesto IIIb)

Al H-propargil-DL-gly-OH de *Bachem* (25 mmoles, 2,83 g) en 50 ml de NaOH 0,1 N y 50 ml de dioxano se añadió dicarbonato de di-tbutilo de *Fluka* (75 mmoles, 16,35 g) durante 10 min., y se mantuvo el pH a 9,5 mediante la adición de NaOH 1 N. Después de 2 horas, se eliminó el dioxano a vacío, se acidificó la solución con HCl 1 M, se

extrajo con etilacetato, se lavó tres veces con KHSO_4 al 5%, se secó en Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a vacío. La mezcla bruta (25 mmoles, 5,4 g) en CH_2Cl_2 se acopló al H-gly-Obz-p tosilato con Pybop (27 mmoles, 14 g) y diisopropil etilamina (75 mmoles, 9,67 g). Se agitó durante 3 horas a 22° C. A continuación se diluyó la mezcla bruta con 700 ml de CH_2Cl_2 y se lavó con salmuera dos veces. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se sometió a cromatografía instantánea (SiO_2 , 15 cm de altura, en una columna con un diámetro de 7 cm), la elución con etilacetato proporcionó 8,4 g. Este producto bruto (23 mmoles, 8,3 g) se trató con 22 ml de CH_2Cl_2 con 50 ml de TFA. Después de 2 horas, se eliminó el TFA mediante destilación azeotrópica con benceno, 200 ml tres veces, para dar 6,5 g del producto bruto.

Únicamente la mitad de este producto bruto (12,5 mmoles, 3,25 g) se saponificó con NaOH (75 mmoles, 3 g), en 75 ml de MeOH, y 75 ml de agua. Después de 2 horas, se acidificó la mezcla con HCl 1 M, se eliminó el solvente a vacío y se sometió a cromatografía instantánea el residuo (SiO_2 -RP18, 15 cm de altura, diámetro de la columna, 4,5 cm). La columna se eluyó con EtOH/agua 7:3, se eliminó el solvente a vacío y se obtuvieron 1,36 g del compuesto (IIIb).

APCI+: $M + 1 = 171$, RMN ^1H en D_2O : 4,33-4,28 (m, 1 H, C(2)); 4,08 (m, 2 H, C(6)); 3,01-2,88 (m, 2 H, C(3)); 2,61 (dd, $J = 2$ Hz, 1 H, C(5)), RMN ^{13}C : 175,7 (s, C(7)), 171,6 (s, C(1)); 79,2 (s, C(5)), 77,4 (d, C(5)), 54,2 (d, C(2)), 44,2 (t, C(3)); 23,9 (t, C(4)).

Ejemplo 9

Preparación de 3-Cloro-Ala-Gly (IIIc)

Etapa 1: acoplamiento: N-Boc- β -cloro-Ala-OH de Bachem (5 mmoles, 1,12 g), en CH_2Cl_2 y H-Gly-Obz-p-tosilato de Novabiochem (5,5 mmoles, 1,85 g), PyBOP de Novabiochem (5,5 mmoles, 2,86 g), diisopropil etilamina (15 mmoles, 1,94 g) se agitaron a 22° C. A continuación se filtró la mezcla bruta en SiO_2 , se eluyó con etilacetato (50 ml) para dar un producto bruto tras concentración de 1,84 g (rendimiento del 99%).

Etapa 2: desprotección: El producto obtenido (4,8 mmoles, 1,8 g) se diluyó en 9 ml de CH_2Cl_2 y se añadieron 20 ml de TFA. Se agitó la mezcla durante 3 horas a 22° C y se purificó mediante destilación azeotrópica con benceno (3 x 100 ml) a alto vacío. El producto bruto (5 mmoles, 1,7 g) se diluyó en 10 ml de agua más 20 ml de etanol y se hidrogenó con H_2 en presencia de una cantidad catalítica de Pd al 5% sobre carbono activo. Tras 16 horas, se filtró la mezcla en celite, se enjuagó dos veces con agua. Se eliminó el etanol a vacío y se sometió a cromatografía el producto bruto en una Dowex 50WX8 (columna de 2,5 cm., diámetro, 80 g). Se cargó en 5 ml de agua, se enjuagó la columna con 150 ml de agua. Se realizó la elución sucesivamente con porciones de 100 ml de NH_4OH 0,4 M, 0,8 M, 1,2 M, 1,6 M, 2,0 M. La elución se continuó por la HP-TLC (SiO_2 , Merck 1.05628.0001), fase móvil $\text{AcOH}/\text{tBuOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$ 2/1/1/1. Se eluyó el compuesto IIIc con amonio 1,6 M y tras la concentración, se obtuvieron 730 mg de IIIc (rendimiento del 81 %).

APCI+: $M + 1 = 181$, RMN ^1H en D_2O : 4,53-4,51 (m, 1 H, C(2)); 4,16-4,02 (m, 2 H, C(3)); 4,03 (d, $J = 8$ Hz, 1 H, C(4)); 3,98 (d, $J = 8$ Hz, 1 H, C(4)). RMN ^{13}C : 176,7 (s, C(5)), 169,9 (s, C(1)); 56,8 (d, C(2)), 45,4 (t, C(3)); 44,9 (t, C(4)).

Ejemplo 10

Preparación de N-[3-amino-benzoil]glicina (compuesto IV)

Al ácido 3-aminobenzoico ABCR 11 (6,85 g, 50 mmoles) en 90 ml de CH_2Cl_2 se añadió ditterc-butildicarbonato (11,66 g, 53,3 mmoles) y a 0° C, trietilamina (27 ml, 193 mmoles) gota a gota. Después de 4 horas de agitación a 22° C, se añadió agua y se extrajo el ácido N-boc-orto-aminobenzoico con CH_2Cl_2 para dar 11,94 g de producto bruto, tras la concentración. Al producto bruto (5,93 g, 25 mmoles) en 75 ml de CH_2Cl_2 se añadió H-Gly-Obz p-tosilato de Novabiochem (14,3 g, 27,5 mmoles), PyBOP (14,3 g, 27,5 mmoles) y diisopropiletilamina (9,67 g, 75 mmoles) se agitó esta mezcla durante la noche, a continuación se volvió a diluir en 200 ml de agua, se extrajo con CH_2Cl_2 , se secó en Na_2SO_4 anhidro y se concentró. El producto bruto se sometió a cromatografía instantánea (diámetro de la columna 7,5 cm, SiO_2 15 cm de altura), la elución con ciclohexano-etilacetato (2/3) proporcionó 4,19 g (rendimiento del 43,6%). Estos (4,19 g, 10,9 mmoles) se volvieron a diluir en 13 ml de CH_2Cl_2 , y se trataron con 26 ml de ácido trifluoroacético. Después de 3 horas, se añadió tolueno en tres porciones de 50 ml y se eliminó el exceso de TFA mediante destilación azeotrópica a vacío. 3,57 g de producto bruto. A continuación se llevó a cabo la saponificación mediante hidrogenación catalítica, con H_2 sobre Pd/C al 5% en 20 ml de agua y 40 ml de etanol, durante 15 horas a 22°C. La mezcla bruta se filtró en celita, se concentró a vacío y se sometió a cromatografía instantánea (diámetro de la columna 4,5 cm, SiO_2 -RP18 15 cm de altura), la elución con 200 ml de agua y 100 ml de agua etanol (471) proporcionó 1,4 g de 12 (rendimiento del 54,7%).

APCI+: $M + 1 = 195$, RMN ^1H en D_2O : 7,50-7,42 (m, 2H), 7,36-7,22 (m, 1H), 3,9 (s, 2H), RMN ^{13}C : 179,1 (s), 172,9 (s); 143 (s), 137,8 (s), 133,05 (d), 125,2 (d); 124,5 (d), 120,3 (d), 46,3 (t).

Ejemplo 11

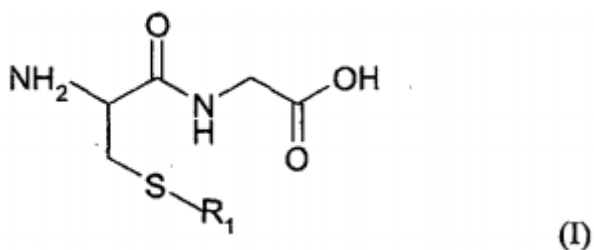
Efecto inhibidor de los compuestos (IIIa), (IIIb); Efecto creciente del compuesto (IV)

- 5 Se probaron los compuestos IIIa, IIIb y IV de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 6. Se añadieron a 2 μ moles, los compuestos IIIa y IIIb dieron como resultado un 25% y un 75% de inhibición de la producción de (S)-3-metil-3-sulfanilhexan-1-ol. Estos compuestos son de esta manera eficaces en la inhibición de la producción de compuestos volátiles malolientes a partir de precursores presentes en el sudor. El compuesto IV dio como resultado una producción creciente de (S)-3-metil-3-sulfanilhexan-1-ol si se le comparaba con el control

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para cribar compuestos capaces de evitar, suprimir o reducir el desarrollo del mal olor sobre superficies del cuerpo, comprendiendo el procedimiento las etapas de

- 5 - proporcionar un medio apropiado que comprende un compuesto a cribar y al menos una enzima β -liasa funcional o una cepa bacteriana seleccionada entre la familia de los Estafilococos;
 - añadir al medio al menos un compuesto precursor de la fórmula

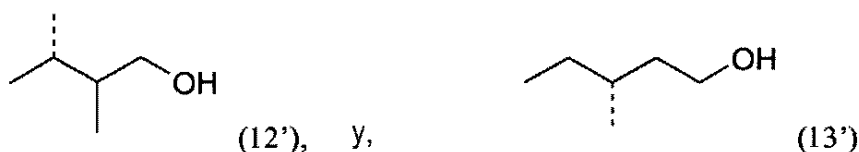
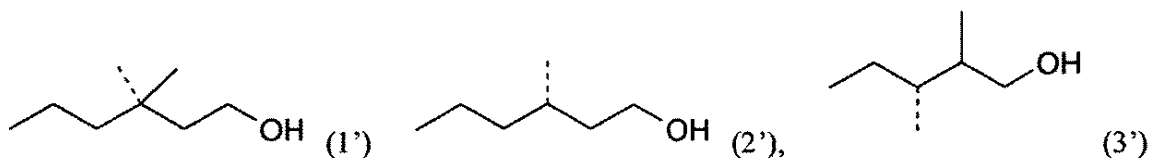


- 10 en la que R_1 representa un resto C_1 - C_{20} en la fórmula del compuesto activo HS- R_1 ;
 - y medir la disminución de la concentración en el medio en dicho precursor y/o aumentar la concentración en el medio en al menos un metabolito de dicho precursor, con el fin de establecer la capacidad del compuesto cribado para evitar, suprimir o reducir el desarrollo del mal olor

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cepa bacteriana es una cepa de *Staphylococcus haemolyticus*, preferiblemente *Staphylococcus haemolyticus* CNCM I-3357.

- 15 3. el procedimiento de la reivindicación 1, en el que se añade un precursor de fórmula (I), en la que R_1 es un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo C_1 - C_{20} , que transporta opcionalmente uno o más grupos funcionales seleccionados entre grupos hidroxilo, carbonilo, carboxilo, amino, amido y átomos de halógeno.

4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el precursor es un compuesto de fórmula (I), en la que R_1 es un resto seleccionado entre el grupo que consiste en



en el que la línea punteada representa la localización del enlace de carbono que se une al átomo de azufre.

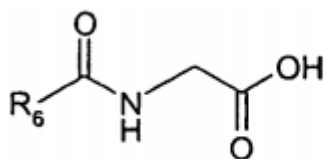
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho al menos un metabolito del precursor es un compuesto de la fórmula (II)



- 25 en la que R_1 se define como una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4.

6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho metabolito es el 3-metil-3-sulfanilhexan-1-ol.

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el compuesto a cribar es un compuesto de fórmula

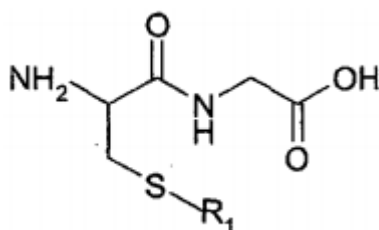


(III)

en la que R_6 es un compuesto alquilo, alqueniilo, alquinilo o arilo C_2-C_{20} lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido y que comprende opcionalmente uno o más heteroátomos

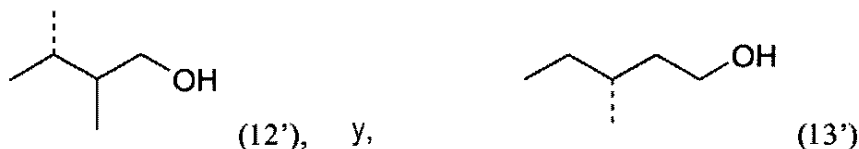
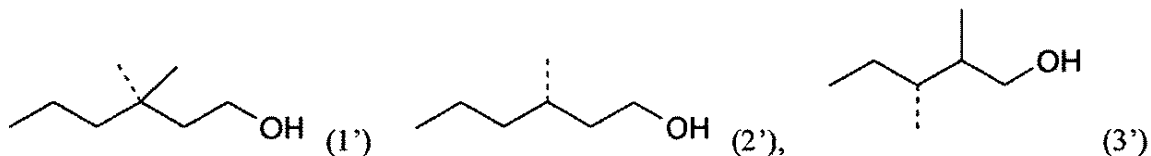
5 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho compuesto precursor se añade al medio tras la cepa bacteriana o la β -lasiase y el compuesto a cribar se añade a dicho medio.

9. Un compuesto de fórmula



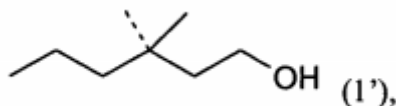
(I)

en la que R_1 es un resto seleccionado entre el grupo que consiste en



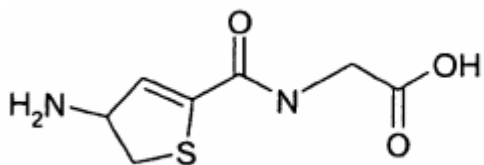
10 la línea punteada representa la localización del enlace de carbono que se une al átomo de azufre.

10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 9, en el que R_1 es el resto de fórmula

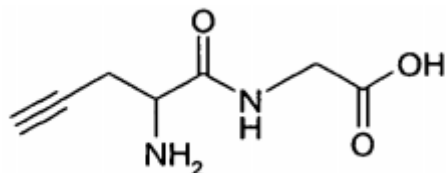


en la que la línea punteada representa la localización del enlace de carbono que se une al átomo de azufre.

15 11. Un procedimiento para evitar, suprimir o reducir el mal olor del sudor, que comprende la etapa de aplicar a la superficie del cuerpo, preferiblemente a la piel de las axilas, un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en los compuestos de fórmulas

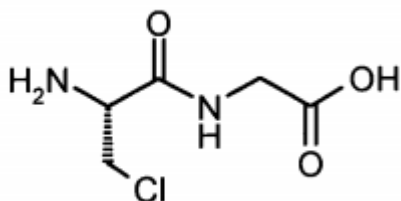


(IIIa).



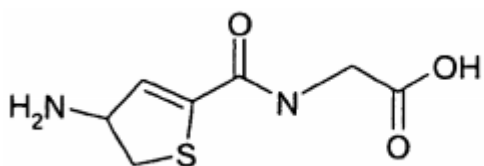
(IIIb).

y

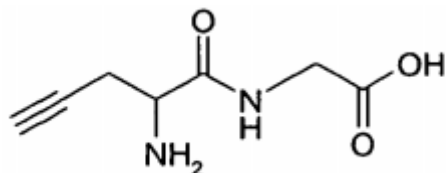


(IIIc).

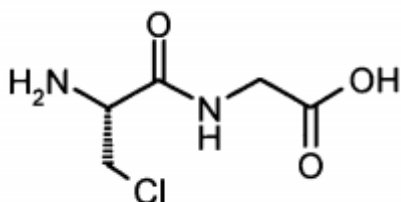
- 5 **12.** Un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en los compuestos de fórmulas



(IIIa).



(IIIb).



(IIIc).

- 10 **13.** un producto adaptado para la aplicación a las superficies corporales, que comprende un compuesto tal como se ha definido en la reivindicación 12.

14. Un producto de acuerdo con la reivindicación 13, en la forma de un producto para el aseo corporal, tal como una loción corporal, un desodorante, un ungüento, un jabón, un champú, y una fragancia fina.

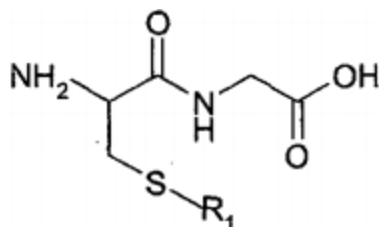
15. Un procedimiento para evitar, suprimir o reducir el mal olor del sudor, que comprende las etapas de:

- 15 a) identificar, de acuerdo con el procedimiento de cribado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 un compuesto capaz de evitar, suprimir o reducir el desarrollo del mal olor;

b) aplicar dicho compuesto a una superficie del cuerpo, preferiblemente a la piel de las axilas.

16. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho compuesto se aplica en la forma de un producto tal como se ha definido en la reivindicación 14.

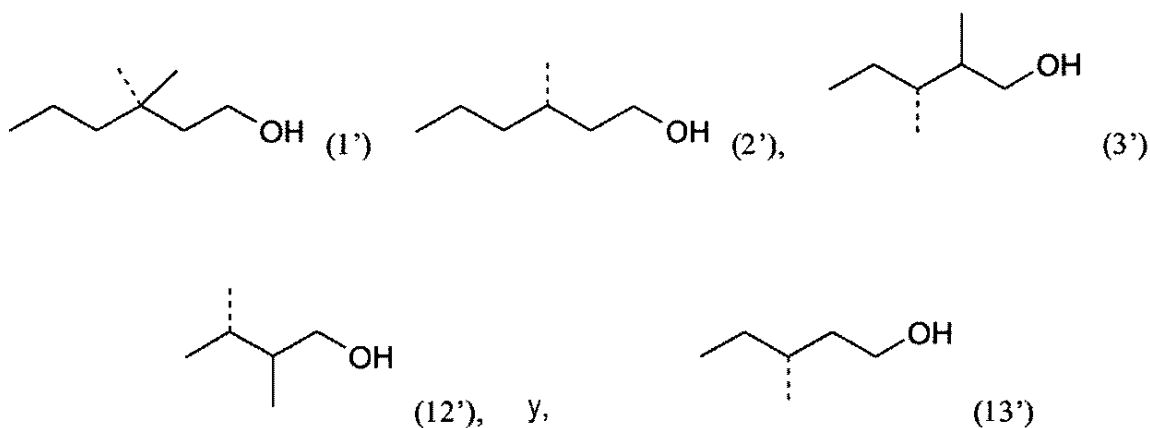
17. Uso de un compuesto de fórmula



(I)

en la que R_1 representa u resto C_1 - C_{20} en la fórmula de un compuesto activo HS- R_1 en un procedimiento para identificar los compuestos capaces de inhibir la capacidad de una enzima β -liala, o de una cepa bacteriana seleccionada entre la familia de los Estafilococos, para metabolizar dicho compuesto (I) en sus derivados malolientes.

18. Uso de acuerdo con la reivindicación 17 de un compuesto de fórmula (I) en el que R_1 es un resto seleccionado entre el grupo que consiste en



la línea punteada que representa la localización del enlace de carbono que se une al átomo de azufre.

Figura 1

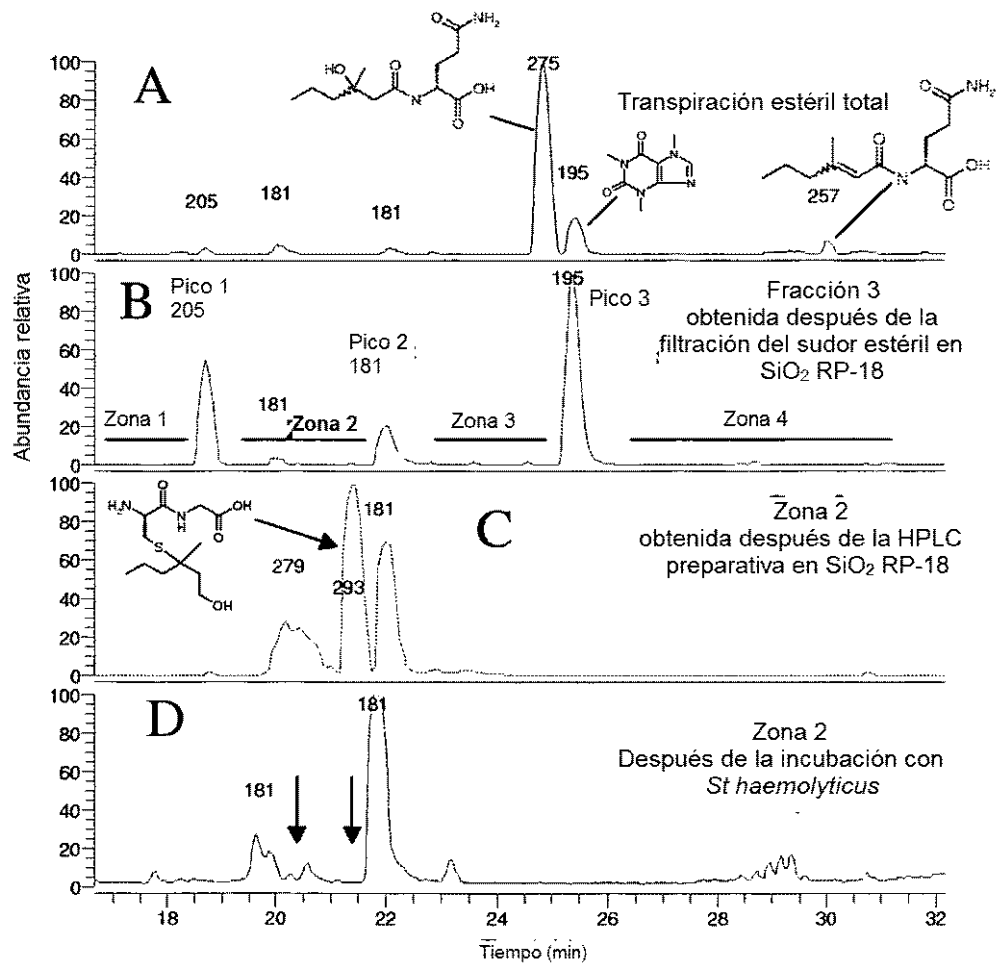


Figura 2

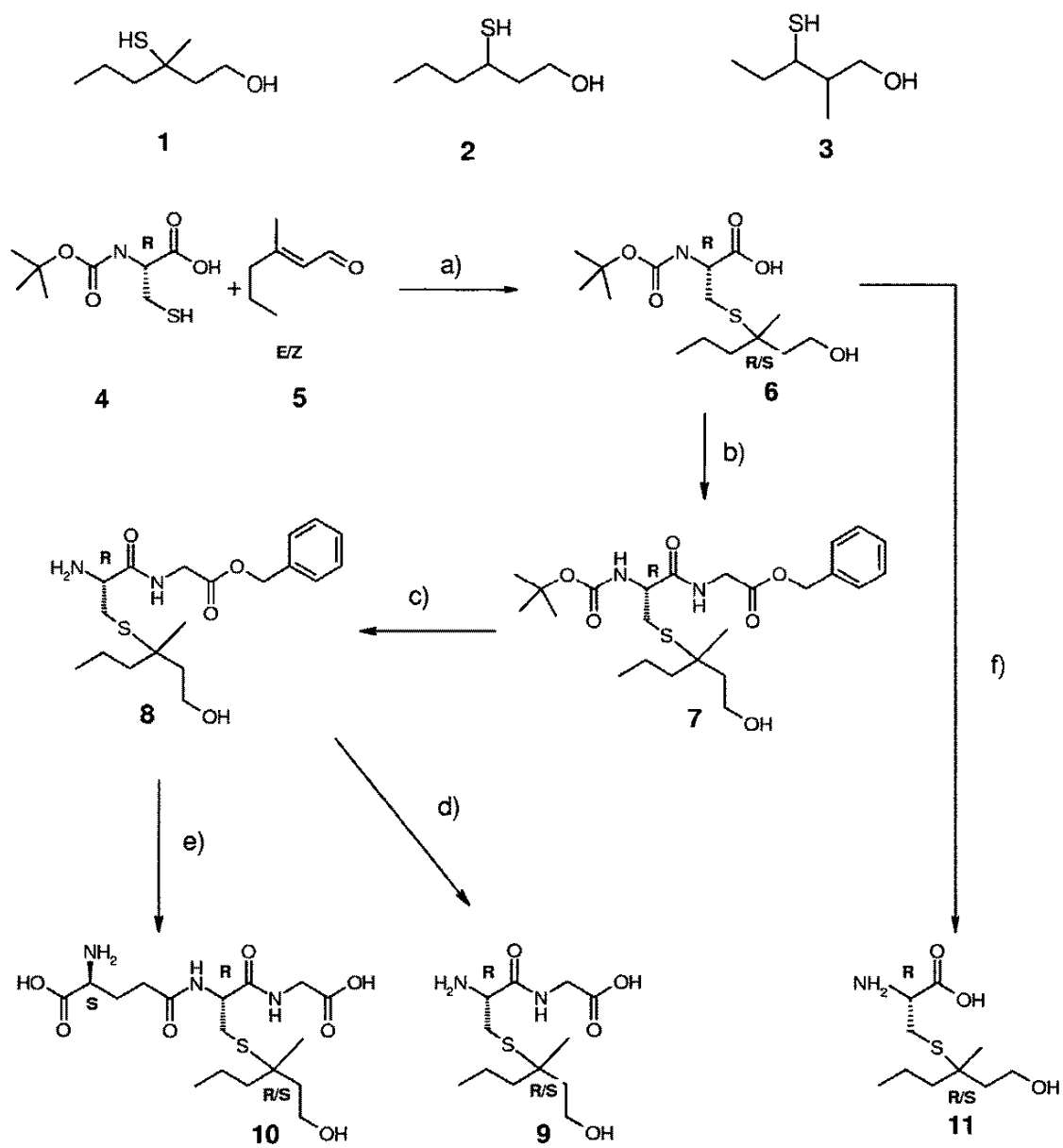


Figura 3

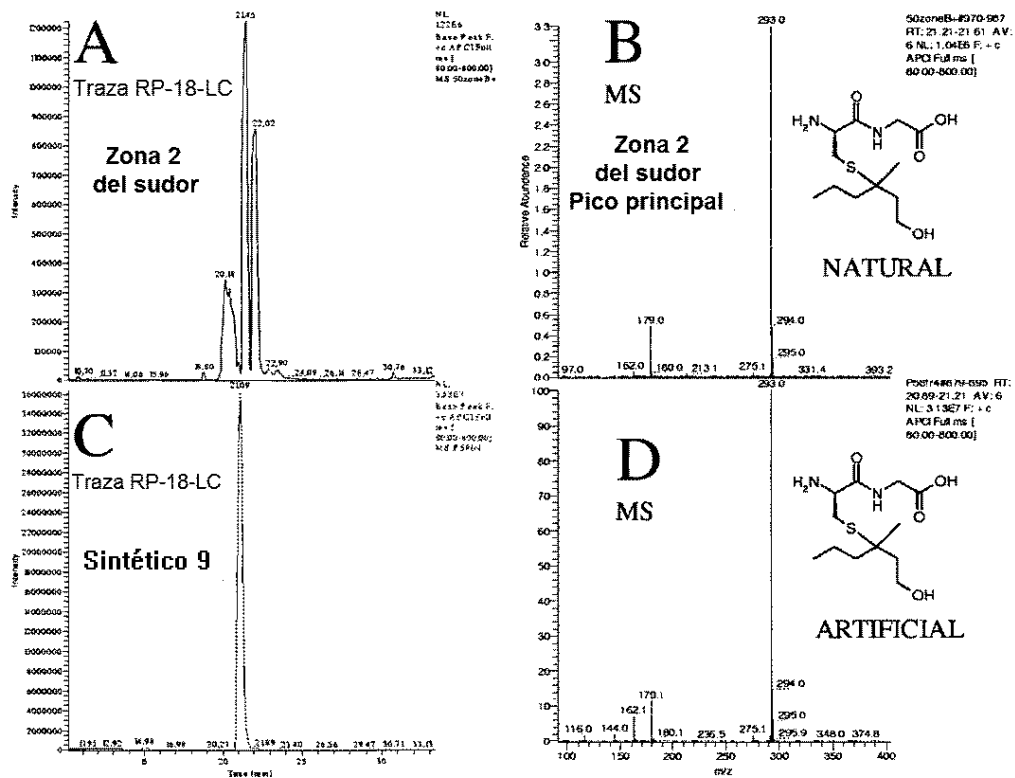


Figura 4

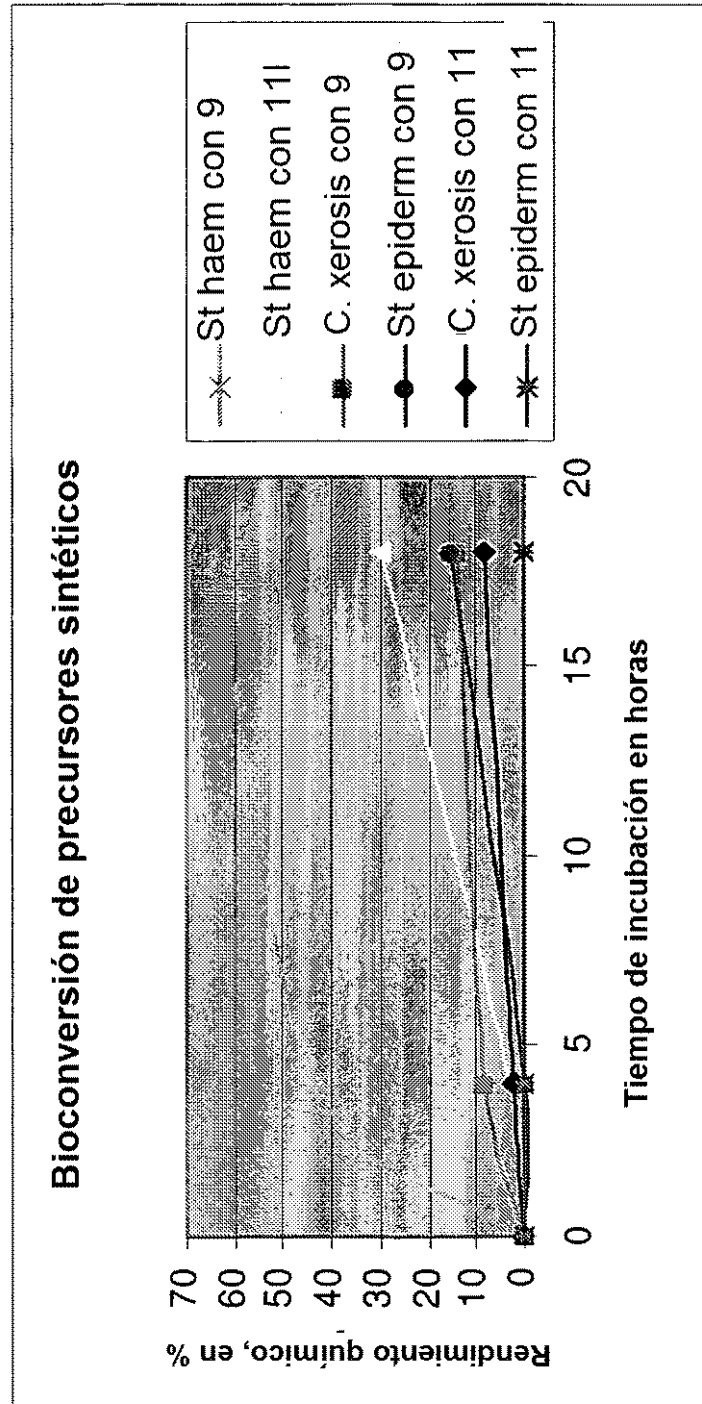


Figura 5

