

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 840**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/72 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2013 PCT/EP2013/061243**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014 WO14191047**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2013 E 13730138 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 3004157**

54 Título: **Receptores olfativos implicados en la percepción de ácidos carboxílicos del sudor y uso de los mismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2018

73 Titular/es:
**CHEMCOM S.A. (100.0%)
Route de Lennik, 802
1070 Brussels, BE**

72 Inventor/es:
**CHATELAIN, PIERRE y
VEITHEN, ALEX**

74 Agente/Representante:
ARIAS SANZ, Juan

ES 2 655 840 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

Receptores olfativos implicados en la percepción de ácidos carboxílicos del sudor y uso de los mismos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la caracterización de receptores olfativos. En particular, la presente invención se refiere a siete receptores olfativos de clase 1 y a la identificación de sus ligandos naturales correspondientes a ácidos carboxílicos presentes en el sudor humano. La presente invención proporciona ensayos y métodos de examen para seleccionar compuestos, particularmente antagonistas o bloqueantes, que modulan la interacción entre receptores olfativos y sus ligandos naturales respectivos. La presente invención proporciona además composiciones y métodos que comprenden los compuestos anteriormente mencionados para contrarrestar malos olores del sudor.

10 Antecedentes de la invención

Receptores olfativos

Los genes que codifican para receptores olfativos (OR) representan la mayor familia de genes (el 3% de todo el genoma) en el cuerpo humano dedicados a una única función fisiológica.

15 Estos OR pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR). Los GPCR son receptores de membrana habitualmente ubicados en la superficie de muchos tipos de células diferentes. Las características comunes de estos receptores consisten en siete extensiones transmembrana que forman un cañón dentro de la membrana celular y en su capacidad para interactuar con GTPasa heterotrimérica y transducir de ese modo una señal tras la unión de sus activadores.

20 En el genoma humano, se han encontrado aproximadamente 900 secuencias que contienen firmas características de receptores olfativos. Sin embargo, el 60% de estas parecen codificar para pseudogenes no funcionales, dejando de ese modo a los seres humanos con aproximadamente 380 proteínas de OR diferentes.

25 Los OR se caracterizan por 6 motivos de aminoácidos conservados en su secuencia. El primer es el motivo FILLG (SEQ ID NO: 17) ubicado en el extremo N-terminal extracelular del receptor. Corresponde a una fenilalanina y glicina altamente conservadas separadas por 3 aminoácidos variables pero principalmente hidrófobos. Los otros motivos incluyen LHTPMY (SEQ ID NO: 18) en el bucle intracelular 1, MAYDRYVAIC (SEQ ID NO: 19) al final del dominio transmembrana 3 y al comienzo del bucle intracelular 2, SY (SEQ ID NO: 20) al final del dominio transmembrana 5, FSTCSSH (SEQ ID NO: 21) al comienzo del dominio transmembrana 6, y PMLNPF (SEQ ID NO: 22) en el dominio transmembrana 7.

30 Los OR de mamífero se subdividen habitualmente en dos clases diferenciadas. Los OR de clase 1, también denominados receptores de tipo pez, forman un grupo homogéneo que está más estrechamente relacionado a OR encontrados en peces y por tanto se supone que representan una reliquia conservada mantenida a lo largo de la evolución de los vertebrados. La persistencia de este grupo de OR ancestrales sugiere que desempeñan un papel importante en la percepción química de mamíferos. En seres humanos, los OR de clase 1 abarcan 68 secuencias no pseudogénicas que corresponden a posibles proteínas funcionales. Estos receptores comparten varios dominios característicos en su secuencia que permiten su clasificación como OR de "clase 1". También debe observarse que algunos aminoácidos ubicados en los dominios transmembrana están altamente conservados dentro de los miembros de los OR de tipo pez. A diferencia de los OR de tipo pez, los OR de clase 2 aparecieron por primera vez en vertebrados tetrápodos y se expandieron hasta formar la mayoría del repertorio de OR actualmente conocido en los seres humanos. Los OR de clase 2 representan probablemente una adaptación a la vida terrestre en la que se requiere la detección de odorizantes transmitidos por el aire.

Mecanismos de percepción del olor.

35 Cada OR puede interactuar con diferentes moléculas, y cada molécula odorizante puede activar más de un OR. Por tanto, la percepción del olor no se basa en la simple activación de un único OR, sino más bien en múltiples activaciones de varios OR. Un olor (que puede ser una única molécula o una mezcla) está emparejado con un conjunto único de OR activados que son suficientes para su distinción y caracterización. La concentración de odorizante puede afectar drásticamente al perfil de un olor ya que algunos OR adicionales pueden reclutarse (alta concentración) o no activarse (baja concentración). Por tanto, el conjunto de OR activados diferirá para diferentes concentraciones de olor, conduciendo a percepciones de olor variables. Con una combinación de 380 OR, el número de combinaciones posibles es casi infinito, explicando por tanto las sorprendentes propiedades de distinción del sistema olfativo. Los receptores de olores se expresan en neuronas sensitivas olfativas (OSN) especializadas ubicadas en la parte superior de la cavidad nasal en una zona pequeña que constituye el epitelio olfativo. Las extensiones filiformes en un extremo de estas células contienen los OR sobre su superficie y flotan en la mucosa nasal en la que se disuelven los odorizantes. En el extremo opuesto, las OSN extienden sus axones a través del hueso etmoides en la base del cráneo para conectarse con el bulbo olfativo, una pequeña región del cerebro dedicada a la integración de los estímulos olfativos. Una característica sorprendente de las decenas de millones de OSN dispersas a lo largo del epitelio olfativo es que cada una expresa únicamente uno de los aproximadamente 400

genes de OR disponibles en el genoma humano. Las OSN que expresan el gen coincidente conectan sus axones a la misma subregión del bulbo olfativo formando una estructura denominada glomérulo. Es a partir de esta organización de OSN que la codificación de un olor mediante un conjunto específico de OR activados se traduce geográficamente en el bulbo mediante un patrón correspondiente de glomérulos activados. Esta información se transmite adicionalmente a la zona olfativa de la corteza en la que se descodifica y se analiza. En las OSN, la activación del OR fomenta la activación de una proteína G específica olfativa (G α -olf) que estimula una adenilato ciclasa de tipo III para producir AMP cíclico; esto desempeña el papel de un segundo mensajero. Tras la unión a un canal de cationes regulado por cAMP, este mensajero induce la entrada de calcio en la célula. El calcio provoca la apertura de otro canal que fomenta la salida de iones cloruro, y por tanto activa un potencial de acción de la neurona que conduce a una señal hacia la zona del cerebro respectiva.

Caracterización de moléculas odorizantes con OR

Se han usado ampliamente líneas celulares cultivadas para caracterizar y estudiar receptores de interés en contextos tanto académico como industrial. Este enfoque implica la introducción del gen correspondiente en las células, y el fomento posterior de su sobreexpresión estable o transitoria. La actividad del receptor puede monitorizarse usando un ensayo funcional. El uso de líneas celulares fáciles de cultivar junto con ensayos funcionales fáciles de realizar facilita varios miles de mediciones al día. Normalmente, en la industria farmacéutica, resulta habitual someter a prueba bibliotecas de 1.000.000 de compuestos al día con receptores no olfativos. Tras el descubrimiento de OR, se realizaron varios intentos de expresar OR en las líneas celulares adecuadas para la expresión de receptores no olfativos, pero fueron ampliamente no satisfactorios. El motivo para tal contratiempo puede encontrarse, no en que la célula no lograra producir el receptor, sino más bien en su incapacidad para enviar el receptor a la superficie de la célula. Una técnica dirigida a mejorar la expresión funcional de OR requiere modificar por ingeniería una línea celular convencional para hacer que sea adecuada para la expresión de OR. De hecho, desde hacía mucho tiempo se había sospechado que la correcta expresión y direccionamiento del OR a la superficie celular requiere una maquinaria intracelular específica de OSN que está ausente en una línea celular no olfativa. Un análisis exhaustivo de la expresión en OSN reveló dos miembros de una nueva familia de proteínas que son específicas para esta célula sensitiva. Cuando se introducen conjuntamente en una línea celular convencional junto con un OR de modelo, las denominadas proteínas de transporte de receptor 1 y 2 (RTP1 y RTP2) potenciaron tanto la expresión en la célula superficie como la respuesta del receptor a sus odorizantes relacionados. La producción de cAMP que surge en la célula tras la activación del OR mediante sus moléculas odorizantes puede detectarse mediante un enfoque indirecto que consiste en el uso de un gen indicador, tal como se describe en (Saito *et al.*, 2004 Cell Vol. 119, 679-691). Este gen está colocado bajo el control de un promotor inducible por cAMP y sólo se expresa tras la inducción mediante cAMP. Pueden usarse diferentes genes con este fin, pero uno de los más populares codifica para la proteína productora de luz, luciferasa. Mientras escinde su sustrato, luciferina, esta enzima libera luz que se detecta y cuantifica fácilmente. La intensidad de luz emitida refleja la cantidad de luciferasa producida, que es proporcional al aumento de cAMP y por tanto está directamente relacionada con la actividad del receptor. Una de las ventajas de ensayos con gen indicador depende de la amplificación de señal entre la activación de receptor y la producción de indicador. Esto hace que el ensayo sea particularmente sensible frente a respuestas débiles que apenas pueden detectarse mediante otros ensayos funcionales. También se han usado otros ensayos funcionales para demostrar la activación de un OR mediante su ligando odorizante. Uno de estos ensayos consiste en monitorizar el aumento de calcio citosólico que se produce tras la activación del receptor, aumento de calcio intracelular (Krautwurtz D. *et al.* 1998. Cell 95, 917-26).

Hasta ahora, la identificación de activadores odorizantes sólo se ha notificado para unos pocos OR de odorizantes de ratón. Se proporcionan ejemplos de desorfanización de OR de ratón en Malnic *et al.*, 1999, Cell 96, 713-23; Saito H. *et al.* 2009. Sci. Signal. 2, 1-14.

También se ha notificado la identificación de activadores de OR humanos. Se facilitan ejemplos de OR humanos desorfanizados, por ejemplo, en Fujita Y *et al.* 2007. J. Recept. Signal. Transduct. Res. 27, 323-34; Keller A. *et al.* 2007. Nature 449, 468-72; Matarazzo V. *et al.* 2005. Chem. Senses 30, 195-207; Saito H. *et al.* 2009. Sci. Signal. 2, 1-14; Sanz G. *et al.* 2005. Chem. Senses 30, 69-80; Schmiedeberg K. *et al.* 2007. J Struct. Biol. 159, 400-12.; Shirokova E. *et al.* 2004. J. Biol. Chem. 280, 11807-15.; Spehr M. *et al.* 2003. Science 299, 2054-58.; Wetzell, K. *et al.* 1999. J. Neurosci. 19, 7426-33; Sallmann *et al.* documento PCT n.º WO2006/094704.

Para varios de los receptores, se ha identificado más de un ligando. Los odorizantes que activan el mismo OR pueden pertenecer a diferentes familias de odorizantes tales como alcohol, aldehído, ésteres, etc. (Sanz G. *et al.* 2005. Chem. Senses 30, 69-80; Saito H. *et al.* 2009. Sci. Signal. 2, 1-14).

Malos olores corporales

En la sociedad moderna, los olores liberados por el cuerpo humano, y más precisamente en el sudor, se consideran con frecuencia desagradables o incluso repugnantes. La industria cosmética ha realizado esfuerzos significativos para contrarrestar la percepción de estos olores. Entre las diversas categorías de moléculas presentes en el sudor humano, los ácidos carboxílicos de cadena corta tienen particular importancia. De hecho, se han identificado más de 50 ácidos diferentes en el sudor. Se supone que una serie de ácidos participan en, o son importantes para, la generación del mal olor (tabla 1). Por ejemplo, el ácido 3-hidroxi-3-metilhexanoico o (E)-3-metil-2-hexenoico

5 presentan un olor acre y se conoce que ambos son factores contribuyentes importantes al mal olor axilar (Zeng *et al.* 1991; J. Chem. Ecol. Vol. 17 págs. 1469-1492; Gautschi *et al.*, 2007, Chimia, Vol. 61 págs. 27-32). El ácido isovalérico, otro ácido carboxílico de cadena corta, se ha identificado como la principal molécula responsable del olor a queso característico liberado por pies sudorosos (Ara *et al.* 2006. Can. J. Microbiol. Vol. 52 págs. 357-364). Los ácidos no se producen directamente por las glándulas apocrinas. Aparecen en forma de conjugados de glutamina y se liberan bajo la acción de enzimas de bacterias cutáneas. Por tanto, la abundancia de varios compuestos que producen mal olor puede variar de un individuo a otro, dependiendo de la composición de su flora bacteriana.

Tabla 1: Ácidos carboxílicos que contribuyen al mal olor del sudor

Molécula	Referencias	Descriptor del olor
ácido acético	1, 2, 3	intenso, acre, agrio, vinagre
ácido propanoico	2, 3	acre, ácido, queso, vinagre
ácido butanoico	1, 2, 3	intenso, acético, queso, mantequilla, afrutado
ácido isovalérico	2, 3	agrio, apestoso, pies, sudor, queso, tropical
ácido pentanoico	3	nauseabundo, pútrido, ácido, sudor, rancio
ácido hexanoico	2, 3, 4, 5	agrio, graso, sudor, queso
ácido 2-metilhexanoico	4	ácido, animales, miel, almizcle, dulce
ácido 3-metilhexanoico	4	sudor, butírico
ácido (E)-3-metil-2-hexenoico	4, 6	ácido, sudor, afrutado, graso, ládano, heno, sopa
ácido 3-hidroxi-3-metilhexanoico	6	acre, sudor
ácido heptanoico	4, 5	rancio, agrio, queso, sudor
ácido 2-metilheptanoico	4	agrio-afrutado, dulce, ligeramente graso-aceitoso
ácido octanoico	2, 3, 4, 5	graso, ceroso, rancio, aceitoso, vegetal, queso
ácido 4-etiloctanoico	4, 6	costo, graso, grasiento
ácido nonanoico	4	ceroso, sucio, queso, producto lácteo cultivado
ácido decanoico	3, 4	ácido, hierro caliente, metálico, ceroso, jabonoso, metal, vela
ácido undecanoico	5	ceroso, cremoso, queso, graso, coco
ácido benzoico	2	dulce; benzoína; polvo
ácido fenilacético	6	dulce, miel animal

1. Yamazaki *et al.* (2010) *Anti-Aging Medicine*. 7(6): 60-652. 2. Gallagher *et al.* (2008) *Br. J. Dermatol.* 159(4) : 780-7913. 3. Ara *et al.* (2006) *Can. J. Microbiol.* 52 : 357-3644. 4. Zeng *et al.* (1991) *J. Chem. Ecol.* 17(7): 1469-14925. 5. Labows *et al.* (1999) *Antiperspirants and Deodorants*, 2ª edición ed K. Laden, *Cosmetic Science and Technology Series Vol. 20* Marcel Dekker Inc, Nueva York, 59-826. 6. Natsch *et al* (2006) *Chem. & Biodiv.* 3 : 1-20

10 Se han desarrollado diferentes estrategias para contrarrestar los malos olores del sudor. Las más convencionales consisten en vencer al mal olor con una fragancia agradable. En un enfoque más sofisticado, la fragancia está diseñada para combinarse bien con el mal olor y desplazar la percepción hacia un carácter más agradable. En este caso, no se necesita que la fragancia sea un odorizante fuerte en sí misma.

15 Una manera alternativa para reducir el mal olor consiste en limitar la producción de moléculas odorizantes. Esto puede lograrse o bien limitando la población de bacterias cutáneas con agentes bacteriostáticos o bien bloqueando las enzimas responsables de la liberación de compuestos que producen mal olor.

También puede considerarse el desarrollo de antagonistas y/o bloqueantes que bloquearán específicamente los receptores para una molécula que produce mal olor. Un bloqueante ideal no tendrá ningún olor en sí mismo, no afectará al buqué y por tanto dará una total libertad creativa a los perfumistas.

20 La solicitud de patente PCT WO2012/029922 da a conocer un método para buscar un agente de control de malos olores, que usa la respuesta de un receptor olfativo como medida, en el que dichos receptores olfativos se seleccionan de OR51E1, OR2W1, OR10A6, OR5112 y OR51L1. Sin embargo, estos receptores no son totalmente específicos de sustancias que producen mal olor tales como los ácidos carboxílicos presentes en el sudor humano.

En la presente invención se ha descubierto sorprendentemente que siete receptores olfativos que pertenecen a la clase 1 de OR se activan mediante ácidos carboxílicos presentes en el sudor humano.

25 Este descubrimiento inesperado permite la identificación de compuestos, lo cual es de interés para las empresas perfumistas y fabricantes de sabores. De hecho, se sabe que los ligandos naturales identificados de estos siete receptores olfativos son constituyentes importantes del mal olor del sudor. La identificación y el uso de bloqueantes o antagonistas de estos receptores olfativos en una composición de fragancia con el fin de modificar la percepción del mal olor del sudor representan un concepto original que puede abrir una nueva posibilidad para el desarrollo de desodorantes.

30

Sumario de la invención

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación se refiere a la identificación de siete receptores olfativos (OR) que pertenecen a la clase 1 de OR, concretamente, OR52L1, OR52E8, OR52B2, OR5112, OR52E1, OR52A5 y OR56A5 (los OR de la invención), como receptores naturales para ácidos carboxílicos presentes en el sudor humano. La divulgación abarca el uso de la interacción de estos polipéptidos de OR y ácidos carboxílicos como base de ensayos de examen para seleccionar agentes que modulan la actividad de los OR de la invención. La invención también abarca kits para realizar métodos de examen basados en la interacción de los 7 OR con ácidos carboxílicos.

Alternativamente, la divulgación se refiere a la identificación de un grupo de seis receptores olfativos (OR) que pertenecen a la clase 1 de OR, concretamente, OR52L1, OR52E8, OR52B2, OR52E1, OR52A5 y OR56A5, como receptores naturales para ácidos carboxílicos presentes en el sudor humano. La divulgación abarca el uso de la interacción de estos polipéptidos de OR y ácidos carboxílicos como base de ensayos de examen para seleccionar agentes que modulan la actividad de los OR de la invención. La divulgación también abarca kits para realizar métodos de examen basados en la interacción de OR52L1, OR52E8, OR52B2, OR52E1, OR52A5 y OR56A5 con ácidos carboxílicos.

La divulgación abarca un método de identificación de un agente que modula la actividad de uno o más de los OR de la invención, comprendiendo dicho método: a) poner en contacto un polipéptido de OR con un ácido carboxílico en presencia y en ausencia de un modulador candidato en condiciones que permiten la unión de dicho ácido carboxílico a dicho polipéptido de OR; y b) medir la unión de dicho polipéptido de OR a dicho ácido carboxílico, en el que una disminución de la unión en presencia de dicho modulador candidato, con respecto a la unión en ausencia del modulador candidato, identifica al modulador candidato como un agente que modula la actividad de OR definidos en el presente documento.

Por tanto, la divulgación proporciona un método para identificar un agente que modula la función de uno o más receptores olfativos (OR) seleccionados del grupo que consiste en: OR52L1, OR52E8, OR52B2, OR5112, OR52E1, OR52A5 y OR56A5 que comprende las etapas de:

a) poner en contacto dichos uno o más OR con uno o más ácidos carboxílicos seleccionados del grupo que consiste en: ácido butanoico, ácido isovalérico, ácido pentanoico, ácido hexanoico, ácido 2-metilhexanoico, ácido 3-metilhexanoico, ácido (E)-3-metil-2-hexenoico, ácido 3-hidroxi-3-metilhexanoico, ácido heptanoico, ácido 2-metilheptanoico, ácido octanoico, ácido 4-etiloctanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico, ácido undecanoico y ácido benzoico, en presencia y en ausencia de dicho agente en condiciones que permiten la unión de dicho(s) ácido(s) carboxílico(s) a dichos OR o que permiten la activación de dichos OR mediante dicho(s) ácido(s) carboxílico(s),

b) comparar la unión de dichos uno o más OR a dichos uno o más ácidos carboxílicos, o la actividad de dichos uno o más OR, en presencia y en ausencia de dicho agente, en el que una diferencia en la unión o actividad en presencia de dicho agente, con respecto a la unión o actividad en ausencia del agente, identifica al agente como un agente que modula la función de dichos uno o más OR en respuesta a dichos uno o más ácidos carboxílicos.

En una realización preferida, dicho agente se somete a prueba para determinar la influencia de la unión de dichos ácidos carboxílicos a los 7 OR indicados ahí, o para determinar la influencia de la activación de los 7 OR indicados ahí mediante dichos ácidos carboxílicos.

La divulgación también proporciona un método para identificar un agente que modula la función de uno o más receptores olfativos (OR) seleccionados del grupo que consiste en: OR52L1, OR52E8, OR52B2, OR52E1, OR52A5 y OR56A5 que comprende las etapas de:

a) poner en contacto dichos uno o más OR con uno o más ácidos carboxílicos seleccionados del grupo que consiste en: ácido butanoico, ácido pentanoico, ácido hexanoico, ácido 3-hidroxi-3-metilhexanoico, ácido heptanoico, ácido 2-metilheptanoico, ácido octanoico, ácido 4-etiloctanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico y ácido undecanoico, en presencia y en ausencia de dicho agente en condiciones que permiten la unión de dicho(s) ácido(s) carboxílico(s) a dichos OR o que permiten la activación de dichos OR mediante dicho(s) ácido(s) carboxílico(s),

b) comparar la unión de dichos uno o más OR a dichos uno o más ácidos carboxílicos, o la actividad de dichos uno o más OR, en presencia y en ausencia de dicho agente, en el que una diferencia en la unión o actividad en presencia de dicho agente, con respecto a la unión o actividad en ausencia del agente, identifica al agente como un agente que modula la función de dichos uno o más OR en respuesta a dichos uno o más ácidos carboxílicos.

En una realización preferida, dicho agente se somete a prueba para determinar la influencia de la unión de dichos ácidos carboxílicos a todos los miembros del grupo de 6 OR indicados ahí, o para determinar la influencia de la activación de todos los miembros del grupo de 6 OR indicados ahí mediante dichos ácidos carboxílicos. Preferiblemente dicho grupo de 6 OR consiste en: OR52L1, OR52E8, OR52B2, OR52E1, OR52A5 y OR56A5.

En una realización adicional, dicho agente se somete a prueba para determinar la influencia de la unión de ácido pentanoico a OR52L1, o para determinar la influencia de la activación de OR52L1 mediante ácido pentanoico.

En otra realización dicho agente se somete a prueba para determinar la influencia de la unión de ácido 3-hidroxi-3-

metilhexanoico a OR52E8, o para determinar la influencia de la activación de OR52E8 mediante ácido 3-hidroxi-3-metilhexanoico.

5 En una siguiente realización, dicho agente se somete a prueba para determinar la influencia de la unión de ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico o ácido undecanoico a OR52B2, o para determinar la influencia de la activación de OR52B2 mediante ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico o ácido undecanoico.

10 En otra realización dicho agente se somete a prueba para determinar la influencia de la unión de ácido butanoico, ácido isovalérico, ácido pentanoico, ácido hexanoico, ácido 2-metilhexanoico, ácido 3-metilhexanoico, ácido (E)-3-metil-2-hexanoico o ácido benzoico a OR5112, o para determinar la influencia de la activación de OR5112 mediante ácido butanoico, ácido isovalérico, ácido pentanoico, ácido hexanoico, 2-metilácido hexanoico, ácido 3-metilhexanoico, ácido (E)-3-metil-2-hexanoico o ácido benzoico.

En una realización adicional dicho agente se somete a prueba para determinar la influencia de la unión de ácido butanoico a OR52E1, o para determinar la influencia de la activación de OR52E1 mediante ácido butanoico.

15 En aún otra realización dicho agente se somete a prueba para determinar la influencia de la unión de ácido 4-etiloctanoico a OR52A5, o para determinar la influencia de la activación de OR52A5 mediante ácido 4-etiloctanoico.

En otra realización, dicho agente se somete a prueba para determinar la influencia de la unión de ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido 2-metilheptanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico o ácido undecanoico a OR56A5, o para determinar la influencia de la activación de OR56A5 mediante ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido 2-metilheptanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico o ácido undecanoico.

20 Preferiblemente, dichos uno o más polipéptidos de OR se definen mediante la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 ó 14. La divulgación abarca además un método de detección en una muestra de la presencia de un agente que modula la actividad de uno cualquiera de los OR definidos en el presente documento en una muestra, comprendiendo dicho método a) poner en contacto un polipéptido de OR con ácido carboxílico en presencia y en ausencia de dicha muestra en condiciones que permiten la unión de dicho ácido carboxílico a dicho polipéptido de OR; y b) medir la unión de dicho polipéptido de OR a dicho ácido carboxílico, en el que una disminución de la unión en presencia de la muestra, con respecto a la unión en ausencia del modulador candidato, indica la presencia, en la muestra, de un agente que modula la actividad de un OR en dicha muestra.

30 La divulgación abarca además un método de identificación de un agente que modula la función de uno cualquiera de los OR definidos en el presente documento, comprendiendo dicho método: a) poner en contacto un polipéptido de OR con un ácido carboxílico en presencia y en ausencia de un modulador candidato, en condiciones que permiten la activación de dicho polipéptido de OR mediante ácido carboxílico; y b) medir una actividad de señalización de dicho polipéptido de OR, en el que un cambio en la actividad en presencia de dicho modulador candidato con respecto a la actividad en ausencia de dicho modulador candidato identifica a dicho modulador candidato como un agente que modula la función de dicho OR.

35 La divulgación abarca además un método de identificación de un agente que modula la función de uno cualquiera de los OR definidos en el presente documento, comprendiendo dicho método: a) poner en contacto un polipéptido de OR con un modulador candidato; b) medir una actividad de señalización de dicho polipéptido de OR en presencia de dicho modulador candidato; y c) comparar la actividad medida en presencia de dicho modulador candidato con dicha actividad medida en una muestra en la que dicho polipéptido de OR se pone en contacto con ácido carboxílico a su CE₅₀, en el que dicho modulador candidato se identifica como un agente que modula la función del OR cuando la cantidad de la actividad medida en presencia del modulador candidato es de al menos el 10% de la cantidad inducida por dicho ácido carboxílico presente a su CE₅₀.

45 La divulgación abarca además un método de detección en una muestra de la presencia de un agente que modula la función de un OR definido en el presente documento, comprendiendo dicho método: a) poner en contacto un polipéptido de OR con ácido carboxílico en presencia y en ausencia de dicha muestra; b) medir una actividad de señalización de dicho polipéptido de OR; y c) comparar la cantidad de dicha actividad medida en una reacción que contiene OR y ácido carboxílico sin dicha muestra con la cantidad de dicha actividad medida en una reacción que contiene OR, ácido carboxílico y dicha muestra, en el que un cambio en dicha actividad en presencia de dicha muestra con respecto a la actividad en ausencia de dicha muestra indica la presencia de un agente que modula la función de OR en dicha muestra.

50 La divulgación abarca además un método de detección en una muestra de la presencia de un agente que modula la función de un OR definido en el presente documento, comprendiendo dicho método: a) poner en contacto un polipéptido de OR con dicha muestra; b) medir una actividad de señalización de dicho polipéptido de OR en presencia de dicha muestra; y c) comparar dicha actividad medida en presencia de dicha muestra con dicha actividad medida en una reacción en la que dicho polipéptido de OR se pone en contacto con ácido carboxílico presente a su CE₅₀, en el que se detecta un agente que modula la función del OR si la cantidad de la actividad medida en presencia de dicha muestra es de al menos el 10% de la cantidad inducida por el ácido carboxílico presente a su CE₅₀.

Según la presente divulgación, cuando se usan métodos de unión el ácido carboxílico puede marcarse de manera detectable. En dichos métodos, el ácido carboxílico puede marcarse de manera detectable con un resto seleccionado del grupo que consiste en un radioisótopo, un fluoróforo y un agente de extinción de la fluorescencia.

5 En una realización de uno cualquiera de los métodos anteriores, la puesta en contacto se realiza en o sobre una célula que expresa dicho polipéptido de OR. Según la presente divulgación, dicha célula puede ser, pero no se limita a, células de riñón embrionario humanas (Hek293), células de hámster chino (CHO), células de mono (COS), células olfativas primarias, células de *Xenopus*, células de insecto, levaduras o bacterias.

10 En otra realización de uno cualquiera de los métodos anteriores, la puesta en contacto se realiza en o sobre liposomas sintéticos (véase Tajib *et al.*, 2000, Nature Biotechnology 18: 649-654, que se incorpora en el presente documento como referencia) o membranas en gemación inducidas por virus que contienen un polipéptido de OR (véase el documento WO0102551, 2001, incorporado en el presente documento como referencia).

En otra realización de uno cualquiera de los métodos anteriores, el método se realiza usando una fracción de membrana de células que expresan dicho polipéptido de OR.

15 En una realización preferida de uno cualquiera de los métodos anteriores, el método se realiza sobre un chip de proteína.

En otra realización preferida de uno cualquiera de los métodos anteriores, la medición se realiza usando un método seleccionado de desplazamiento de marcador, resonancia de plasmón superficial, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, extinción de fluorescencia y polarización de fluorescencia.

20 En otra realización de uno cualquiera de los métodos anteriores, el agente se selecciona del grupo que consiste en un péptido, un polipéptido, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, un lípido, un hidrato de carbono, un ácido nucleico y una molécula orgánica pequeña.

Según la presente divulgación, cuando se usa un ensayo funcional, la etapa de medir una actividad de señalización de los OR definidos en el presente documento puede comprender detectar un cambio en el nivel de un segundo mensajero.

25 En otra realización, la etapa de medir una actividad de señalización comprende la medición de unión/acoplamiento o intercambio de nucleótido de guanina, actividad adenilato ciclasa, cAMP, actividad proteína cinasa C, actividad proteína cinasa A descomposición de fosfatidilinositol, diacilglicerol, trifosfato de inositol, calcio intracelular, flujo de calcio, ácido araquidónico, actividad MAP cinasa, actividad tirosina cinasa, ensayo de melanóforos, ensayo de inicialización de receptores o expresión de gen indicador. Cuando se mide la unión/acoplamiento o intercambio de proteína G, de todas las subunidades $G\alpha$ posibles, preferiblemente se estudian los comportamientos de la subunidad alfa-olf (olfativa) de proteína G de proteína de unión a GTP, también G-olf. La secuencia de la subunidad G-olf humana se ha depositado anteriormente en el Genbank con el número de registro L10665. Sin embargo, pueden usarse y estudiarse subunidades G-olf de otras especies.

30

35 En una realización preferida, la medición de la actividad de señalización comprende usar un ensayo de fluorescencia o luminiscencia. Los ensayos de fluorescencia y luminiscencia pueden comprender el uso de fluoróforos sensibles a Ca^{2+} incluyendo fluo3, Fluo4 o Fura, (Molecular probes); familia de Ca3-kit (Molecular Device) y aequorina. Además, dichos ensayos pueden aplicar un lector fluorométrico o luminiscente automatizado tal como FDSS (Hammamatsu) o FLIPR (Molecular Device).

40 La divulgación abarca además un método de modulación de la actividad de un OR definido en el presente documento en una célula, comprendiendo dicho método la etapa de administrar a dicha célula, un ácido carboxílico o agente que modula la actividad de un polipéptido de OR, de manera que se modula la actividad del OR.

En otra realización de uno cualquiera de los métodos anteriores, el método es un método de examen de alto rendimiento.

45 En otra realización de uno cualquiera de los métodos anteriores, el agente es parte de una biblioteca química o extractos de órganos de animales.

50 Según la presente divulgación, el agente identificado o detectado mediante cualquiera de los métodos anteriores, o la composición que comprende dicho agente, puede usarse para contrarrestar el mal olor a sudor. Alternativamente, estos pueden usarse para la preparación de bloqueantes de odorizantes o antagonistas de odorizantes. Por ejemplo, puede usarse un bloqueante o antagonista de OR como desodorante. Puede añadirse un bloqueante o antagonista de OR a una formulación de fragancia o de perfume ya usada como desodorante para reforzar su eficacia.

La presente divulgación también abarca una composición que comprende un polipéptido de OR aislado y un ácido carboxílico. En una realización preferida, dicha composición abarca los 7 OR identificados en el presente documento, o cualquier combinación de los mismos de 2, 3, 4, 5 ó 6 receptores. Preferiblemente, dicho grupo de 6 OR consiste en: OR52L1, OR52E8, OR52B2, OR52E1, OR52A5 y OR56A5.

La presente divulgación se refiere además al uso de ácidos carboxílicos para la producción de un kit para examinar agentes que modulan la señalización de OR definidos en el presente documento, o en combinación con OR definidos en el presente documento para la producción de un kit para examinar bloqueantes de odorizantes o antagonistas de odorizantes.

- 5 Además, lo presente definido en el presente documento abarca el uso de un ácido carboxílico presente en sudor de mamífero como ligando para OR definidos en el presente documento.

La presente divulgación también se refiere a un anticuerpo que reconoce el complejo de ácido carboxílico/OR definido en el presente documento o fragmentos del mismo.

- 10 La divulgación abarca además un kit que comprende un polipéptido de OR aislado o varios polipéptidos de OR aislados, un ácido carboxílico y materiales de embalaje para los mismos; un polinucleótido aislado que codifica para un polipéptido de OR o varios polinucleótidos aislados que codifican para un polipéptido de OR, un ácido carboxílico, y materiales de embalaje para los mismos; un kit que comprende una célula que expresa un polipéptido de OR o membranas de la misma o varias células que expresan un polipéptido de OR o membranas de las mismas, un ácido carboxílico y materiales de embalaje para los mismos. Dicha célula puede transformarse con un polinucleótido que
15 codifica para dicho OR. En una realización preferida, dicho kit abarca los 7 OR identificados en el presente documento, o cualquier combinación de los mismos de 2, 3, 4, 5 ó 6 receptores y sus ácidos carboxílicos respectivos. Preferiblemente, dicho grupo de 6 OR consiste en: OR52L1, OR52E8, OR52B2, OR52E1, OR52A5 y OR56A5.

Breve descripción de las figuras

- 20 La figura 1 muestra el ADN y las secuencias de polipéptido correspondientes que codifican para los siete receptores olfativos (OR) definidos en el presente documento.

Las figuras 2 A a G corresponden a un análisis de concentración-respuesta de los siete receptores definidos en el presente documento con sus diferentes activadores que son todos ácidos carboxílicos encontrados en el sudor. Estos análisis se realizaron según el procedimiento descrito en el "procedimiento experimental".

25 Descripción detallada de la invención

Definiciones

- Tal como se usa en el presente documento, el término "polipéptidos de receptor olfativo (OR)" se refiere en general a polipéptidos de la familia de receptor acoplado a proteína G generados en neuronas olfativas. Los OR pueden tener la capacidad de interactuar con moléculas odorizantes y transducir la señal odorizante. Los términos "receptores olfativos (OR) definidos en el presente documento" o "polipéptidos de receptor olfativo definidos en el presente documento" se refieren al grupo de 7 receptores olfativos que se ha mostrado que pueden detectar selectivamente ácidos carboxílicos. Los ejemplos de dichos receptores olfativos incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos que tienen una identidad de aminoácidos de al menos el 80%, y preferiblemente el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o superior, incluyendo una identidad de aminoácidos del 100%, con respecto a la secuencia representada en la figura 1 (SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14). Dicha homología puede referirse a todo el polipéptido o sólo a parte del polipéptido tal como un dominio CDR (dominio de unión un ligando del receptor). Según Pilpel y Lancet (Protein Science 8:969-977, 1999), el dominio CDR de un GPCR puede definirse siguiendo las indicaciones publicadas: TM3-#4, TM3-#8, TM3-#11, TM3-#12, TM3-#15, TM4-#11, TM4-#15, TM4-#19, TM4-#22, TM4-#23, TM4-#26, TM5-#3, TM5-#6, TM5-#7, TM5-#10, TM5-#11 y TM5-#13, en el que TMx indica la región transmembrana de dicho receptor, y # indica la posición de aminoácido dentro de dicha región.

- 40 Tal como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido de OR" se refiere a un polinucleótido que codifica para los polipéptidos de OR definidos en el presente documento. Preferiblemente, dicho polinucleótido tiene una identidad de al menos el 80% o más, preferiblemente el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o superior, incluyendo una identidad de ácido nucleico del 100%, con respecto a la secuencia representada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13).

Tal como se usa en el presente documento, el término "unión a OR" se refiere a unión específica de una molécula odorizante mediante un polipéptido de OR. Los ejemplos de moléculas odorizantes incluyen, pero no se limitan a, ácidos carboxílicos, ésteres, alcoholes y aminas.

- 50 Tal como se usa en el presente documento, el término "actividad de señalización de OR" se refiere al inicio o la propagación de señalización mediante un polipéptido de OR. La actividad de señalización de OR se monitoriza mediante medición de una etapa detectable en una cascada de señalización sometiendo a ensayo uno o más de los siguientes: estimulación de GDP para intercambio de GTP en una proteína G y lo más particularmente G-olf; alteración de la actividad adenilato ciclasa; modulación de proteína cinasa C; modulación de proteína cinasa A; descomposición de fosfatidilinositol (generando segundos mensajeros diacilglicerol y trifosfato de inositol); flujo de calcio intracelular; activación de MAP cinasas; modulación de tirosina cinasas; ensayo de internalización; modulación de actividad de genes o de genes indicadores; o ensayo de melanóforos. Se considera que una etapa

detectable en una cascada de señalización se inicia o se media si la actividad medible se ve alterada en el 10% o más por encima o por debajo de un nivel inicial establecido en ausencia sustancial de un ácido carboxílico con respecto a cualquiera de los ensayo de actividad de OR descritos en el presente documento. La actividad medible puede medirse directamente, tal como, por ejemplo, en la medición de niveles de cAMP o diacilglicerol. Alternativamente, la actividad medible puede medirse indirectamente, tal como, por ejemplo, en un ensayo de genes indicadores. Para la mayoría de estos ensayos hay kits comercialmente disponibles.

Los ácidos carboxílicos definidos en el presente documento son ácidos carboxílicos presentes en el sudor de mamíferos, preferiblemente el sudor humano, que participan en o son importantes para la generación del mal olor a sudor (véase, por ejemplo, la tabla 1).

Un “bloqueante” o “compuesto de bloqueo” definido en el presente documento es una molécula que atenúa o elimina la percepción de un olor provocado por una o más moléculas odorizantes. Un bloqueante puede actuar interaccionando con un OR que transduce dicho olor o interaccionando con el ligando natural para el receptor. Un “compuesto de bloqueo” definido en el presente documento puede disminuir la respuesta intracelular inducida por un agonista, por ejemplo un ácido carboxílico presente en el sudor humano, en al menos el 10%, preferiblemente el 15-25%, más preferiblemente el 25-50% y lo más preferiblemente el 50-100%. Un “bloqueante” también puede referirse a una secuencia de nucleótidos que codifica para un bloqueante. Un bloqueante, útil según la presente divulgación, incluye, pero no se limita a, un anticuerpo, molécula pequeña, aptámero, fotoaptámero, ligando natural modificado, etc., que se une específicamente a al menos una parte de un OR que se requiere para la transducción de señales mediante ácidos carboxílicos (tal como el sitio de unión a ligando), o que puede bloquear o reducir (por ejemplo, en al menos el 10%) la ruta de transducción de señales que está acoplada al OR. Preferiblemente, el agente de bloqueo es preferiblemente volátil, o puede volverse volátil en combinación con disolventes o aditivos apropiados.

Tal como se usa en el presente documento, un “antagonista” es un ligando que se une a un receptor e inhibe la respuesta intracelular inducida por un ligando o un agonista, por ejemplo un ácido carboxílico presente en el sudor humano, en al menos el 10%, preferiblemente el 15-25%, más preferiblemente el 25-50% y lo más preferiblemente el 50-100%, en comparación con la respuesta intracelular en presencia de un agonista y en ausencia de un antagonista. El antagonista puede ser competitivo, es decir, se une al mismo sitio que el agonista o ligando, pero no activa una respuesta intracelular iniciada por una forma activa del receptor y por tanto evita la activación mediante dicho ligando o agonista. Alternativamente, el antagonista puede ser no competitivo, es decir, se une a un sitio distinto del sitio de unión de agonista o ligando y bloquea el receptor en una conformación inactiva y por tanto evita la transducción de la señal olfativa por parte del agonista.

Tal como se usa en el presente documento, “natural ligando” se refiere a un ligando que se produce de manera natural que se une a un receptor de una manera que es al menos equivalente a un ácido carboxílico presente en el sudor humano, tal como los ácidos carboxílicos mostrados a modo de ejemplo en el presente documento. Un “ligando natural” no se refiere a un ligando modificado por ingeniería que no se encuentra en la naturaleza y que se modifica por ingeniería para unirse a un receptor, en el que no lo hacía anteriormente de una manera diferente, ya sea en cuanto al grado o a la clase, de la que se modificó por ingeniería para hacer. Un ligando modificado por ingeniería de este tipo ya no se produce de manera natural sino que es “no natural” y se deriva de una molécula que se produce de manera natural.

Tal como se usa en el presente documento, un “modulador” se refiere a un compuesto que aumenta o disminuye la expresión en la superficie celular de un receptor definido en el presente documento, aumenta o disminuye la unión de un ligando a OR definidos en el presente documento, o cualquier compuesto que aumenta o disminuye la respuesta intracelular iniciada por una forma activa de los OR definidos en el presente documento, o bien en presencia o bien en ausencia de un ligando para el receptor, por ejemplo un ácido carboxílico presente en el sudor humano. Un modulador incluye un antagonista, o bloqueante, definido en el presente documento. Un modulador puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña, un polipéptido, un péptido, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, un lípido, un hidrato de carbono, un ácido nucleico, un aptámero, un fotoaptámero o un compuesto químico pequeño o una molécula orgánica pequeña. Los moduladores candidatos pueden ser compuestos naturales o sintéticos, incluyendo, por ejemplo, moléculas pequeñas sintéticas, compuestos contenidos en extractos de células animales, vegetales, bacterianas o fúngicas, así como medio acondicionado a partir de tales células.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “aumentar” y “disminuir” se refieren a un cambio en la cantidad de ligando que se une a los OR definidos en el presente documento y/o la señalización celular mediante OR definidos en el presente documento de al menos el 10%. Un “aumento” o “disminución” en la unión o señalización se mide preferiblemente en respuesta a poner en contacto OR definidos en el presente documento con un ligando en presencia de un modulador candidato, en el que el cambio en la unión o señalización es con respecto a la unión o señalización en ausencia del modulador candidato.

Tal como se usa en el presente documento, el término “molécula pequeña” se refiere a un compuesto que tiene una masa molecular de menos de 3000 Dalton, preferiblemente menos de 2000 ó 1500, todavía más preferiblemente menos de 1000, y lo más preferiblemente menos de 600 Dalton. Una “molécula orgánica pequeña” es una molécula pequeña que comprende carbono.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “cambio”, “diferencia”, “disminución” o “aumento” aplicados, por ejemplo, a la unión o actividad de señalización o cantidad de una sustancia se refieren a un aumento o disminución de al menos el 10% en la unión, actividad de señalización o por ejemplo, nivel de ARNm, polipéptido o ligando con respecto a un patrón en un ensayo dado.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “condiciones que permiten la unión de ácido carboxílico a un OR definido en el presente documento” se refiere a condiciones, por ejemplo, de temperatura, concentración de sal, pH y concentración de proteína en las que el OR se une a un ácido carboxílico. Las condiciones de unión exactas variarán dependiendo de la naturaleza del ensayo, por ejemplo, si el ensayo usa células viables o sólo una fracción de membrana de células. Sin embargo, dado que los OR definidos en el presente documento son proteínas de
10 superficie celular, las condiciones favorecidas incluirán generalmente sal fisiológica (90 mM) y pH (de aproximadamente 7,0 a 8,0). Las temperaturas para la unión pueden variar entre 15°C y 37°C, pero estarán preferiblemente entre temperatura ambiente y aproximadamente 30°C. La concentración de ácido carboxílico en una reacción de unión también variará entre aproximadamente 0,5 y 2 μ M, pero será preferiblemente de aproximadamente 1 μ M.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “muestra” se refiere a la fuente de moléculas que están sometidos a prueba para determinar la presencia de un agente o compuesto modulador que modula la unión a, actividad de señalización de, un OR definido en el presente documento. Una muestra puede ser una muestra del entorno, un extracto natural de células o tejidos animales, vegetales, de levaduras o bacterianos, una muestra clínica, una muestra sintética o un medio acondicionado para células recombinantes o de un procedimiento de
20 fermentación.

Tal como se usa en el presente documento, un “tejido” es un agregado de células que realiza una función particular en un organismo. El término “tejido” tal como se usa en el presente documento se refiere a material celular de una región fisiológica particular. Las células en un tejido particular pueden comprender varios tipos de células diferentes. Un ejemplo no limitativo de esto sería el tejido cerebral que comprende además neuronas y células de la glía, así como células endoteliales capilares y células sanguíneas, todas contenidas en una muestra o sección de tejido
25 dada. Además de tejidos sólidos, también se pretende que el término “tejido” abarque tejidos no sólidos, tales como la sangre.

Tal como se usa en el presente documento, el término “fracción de membrana” se refiere a una preparación de membranas lipídicas celulares que contienen un OR definido en el presente documento. Tal como se usa el término en el presente documento, una “fracción de membrana” es distinto de un homogeneizado celular, ya que se ha retirado al menos una parte (es decir, al menos el 10%, y preferiblemente más) de constituyentes celulares no asociados con membrana. El término “asociado con membrana” se refiere a los constituyentes celulares que o bien están integrados en una membrana lipídica o bien están físicamente asociados con un componente que está integrado en una membrana lipídica.
30

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “ensayo de segundo mensajero” comprende preferiblemente la medición de unión o intercambio de nucleótido de guanina, adenilato ciclasa, cAMP intracelular, fosfato de inositol intracelular, concentración de diacilglicerol intracelular, concentración de ácido araquidónico, MAP cinasa(s) o tirosina cinasa(s), actividad proteína cinasa C o expresión de gen indicador o un ensayo basado en aequorina según métodos conocidos en la técnica y definidos en el presente documento.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término “segundo mensajero” se refiere a una molécula, generada o cuya concentración se hace que varíe mediante la activación de un receptor acoplado a proteína G que participa en la transducción de una señal de ese GPCR. Los ejemplos no limitativos de segundos mensajeros incluyen cAMP, diacilglicerol, trifosfato de inositol, liberación de ácido araquidónico, trifosfato de inositol y calcio intracelular. El término “cambio en el nivel de un segundo mensajero” se refiere a un aumento o disminución de al menos el 10% en el nivel detectado de un segundo mensajero dado con respecto a la cantidad detectada en un ensayo realizado en ausencia de un modulador candidato.
45

Tal como se usa en el presente documento, el término “ensayo basado en aequorina” se refiere a un ensayo para determinar la actividad de GPCR que mide el flujo de calcio intracelular inducido por GPCR activados, en el que el flujo de calcio intracelular se mide mediante la luminiscencia de aequorina expresada en la célula.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “unión” se refiere a la asociación física de una molécula (por ejemplo, un ligando tal como un ácido carboxílico o un anticuerpo) con un receptor (por ejemplo, OR definido en el presente documento). Tal como se usa el término en el presente documento, la unión es “específica” si se produce con una CE_{50} o una K_d de 1 mM menos, generalmente en el intervalo de 1 mM a 10 nM. Por ejemplo, la unión es específica si la CE_{50} o K_d es de 1 mM, 500 μ M, 100 μ M, 10 μ M, 9,5 μ M, 9 μ M, 8,5 μ M, 8 μ M, 7,5 μ M, 7 μ M, 6,5 μ M,
55 6 μ M, 5,5 μ M, 5 μ M, 4,5 μ M, 4 μ M, 3,5 μ M, 3 μ M, 2,5 μ M, 2 μ M, 1,5 μ M, 1 μ M, 750 nM, 500 nM, 250 nM o 100 nM o menos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “ CE_{50} ” se refiere a la concentración de un compuesto a la que una actividad dada, incluyendo unión de un ácido carboxílico u otro ligando y una actividad funcional de un OR, es el

50% del máximo de esa actividad de OR medible usando el mismo ensayo en ausencia de compuesto. Dicho de otro modo, la "CE₅₀" es la concentración de compuesto que da una activación del 50%, cuando la activación del 100% se establece como la cantidad de actividad que no aumenta con la adición de más agonista.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "saturación" se refiere a la concentración de un ácido carboxílico presente en el sudor humano u otro ligando a la que un aumento adicional de la concentración de ligando no logra aumentar la unión de ligando o actividad de señalización específica de OR.

Tal como se usa en el presente documento, el término "CI₅₀" es la concentración de un antagonista o bloqueante que reduce la activación máxima de un OR definido en el presente documento en el 50%.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "disminución de la unión" se refiere a una disminución de al menos el 10% en la cantidad de unión de ligando detectada en un ensayo dado con un modulador conocido o sospechado de OR definido en el presente documento con respecto a la unión detectada en un ensayo que carece de ese modulador conocido o sospechado.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "receptor acoplado a proteína G" o "GPCR" se refiere a un polipéptido asociado con membrana con 7 dominios transmembrana helicoidales alfa. Los GPCR funcionales se asocian con un ligando o agonista y también se asocian con, y activan, proteínas G. Los polipéptidos de OR definidos en el presente documento son GPCR.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" es la molécula de inmunoglobulina convencional, así como fragmentos de la misma que también son específicamente reactivos con uno de los polipéptidos objeto. Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales y examinarse los fragmentos para determinar la utilidad de la misma manera que se describe a continuación en el presente documento para anticuerpos completos. Por ejemplo, pueden generarse fragmentos F(ab)₂ tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab)₂ resultante puede tratarse para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab. Adicionalmente se pretende que el anticuerpo incluya moléculas biespecíficas, de cadena sencilla y quiméricas y humanizadas que tienen afinidad por un polipéptido conferida por al menos una región CDR del anticuerpo. En realizaciones preferidas, el anticuerpo comprende además un marcador unido al mismo y que puede detectarse (por ejemplo, el marcador puede ser un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto quimioluminiscente, enzima o cofactor enzimático). Los anticuerpos, monoclonales o policlonales, y la parte hipervariable de los mismos (FAB, FAB", etc.) así como la célula de hibridoma que produce los anticuerpos son un aspecto adicional que encuentra una aplicación industrial específica en el campo del diagnóstico y la monitorización de enfermedades específicas, preferiblemente las descritas a continuación en el presente documento. Los inhibidores incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales o policlonales marcados o partes hipervariables de los anticuerpos.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "actividad constitutiva de OR" se refiere a una actividad medible de un receptor olfativo expresado en una célula que se produce de manera espontánea sin adición de un ligando para dicho receptor olfativo.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "agonista inverso" se refiere a una molécula que se une a, y disminuye o suprime la actividad constitutiva de, un OR.

40 La invención se refiere al descubrimiento de que los ácidos carboxílicos presentes en el sudor humano son ligandos naturales para grupos específicos de receptores olfativos, los polipéptidos de OR definidos en el presente documento. La interacción OR/ácidos carboxílicos es útil para ensayos de examen para seleccionar agentes que modulan tal interacción y por tanto la función del OR. Esta interacción OR/ácido carboxílico también proporciona la identificación de moduladores que pueden ser de interés en la industria.

Ensayos para la identificación de agentes que modulan la actividad de OR

45 Pueden identificarse agentes que modulan la actividad de OR de varias maneras que aprovechan la interacción de dichos receptores con ácidos carboxílicos. Por ejemplo, la capacidad de reconstituir la unión OR/ácido carboxílico *in vitro*, en células cultivadas o *in vivo* proporciona una diana para la identificación de agentes que alteran esa unión. Ensayos basados en la alteración de la unión pueden identificar agentes, tales como moléculas orgánicas pequeñas, de bibliotecas o colecciones de tales moléculas. Alternativamente, tales ensayos pueden identificar agentes en muestras o extractos de fuentes naturales, incluyendo extractos vegetales, fúngicos o bacterianos o incluso en muestras de tejido humano. Entonces pueden examinarse moduladores de la unión OR/ácido carboxílico usando un ensayo de unión o un ensayo funcional que mide la señalización aguas abajo mediante dicho receptor. Tanto los ensayos de unión como los ensayos funcionales se validan usando ácidos carboxílicos.

50 Otro enfoque que usa la interacción OR/ácido carboxílico más directamente para identificar agentes que modulan la función de OR mide cambios en la señalización aguas abajo de OR inducidos por agentes candidatos o moduladores candidatos. Estos ensayos funcionales pueden realizarse en fracciones de membrana celular aisladas o con células que expresan el receptor sobre sus superficies.

55 La siguiente descripción proporciona métodos para ensayos tanto de unión como funcionales basándose en la

interacción de OR y ácidos carboxílicos.

A. Polipéptidos de OR.

Los ensayos que usan la interacción de polipéptidos de OR y ácidos carboxílicos requieren una fuente de polipéptidos de OR. La secuencia de polinucleótido y polipéptido de OR humanos se presentan en el presente documento en la figura 1. Las secuencias de polinucleótido de OR52L1, OR52E8, OR52B2, OR51I2, OR52E1, OR52A5 y OR56A5 humanos también están disponibles en GenBank, n.^{os} de registro NM_001005173 (SEQ ID NO: 1), NM_001005168 (SEQ ID NO: 3), NM_001004052 (SEQ ID NO: 5), NM_001004754 (SEQ ID NO: 7), NG_033197 (SEQ ID NO: 9), NM_001005160 (SEQ ID NO: 11), NM_001146033 (SEQ ID NO: 13), respectivamente. Las secuencias de polipéptido también están registradas con los n.^{os} de registro Q8NGH7 (SEQ ID NO: 2), Q6IFG1 (SEQ ID NO: 4), Q96RD2 (SEQ ID NO: 6), Q9H344 (SEQ ID NO: 8), Q8NGJ3 (SEQ ID NO: 10), Q9H2C5 (SEQ ID NO: 12), y P0C7T3 (SEQ ID NO: 14) respectivamente en la base de datos Uniprot.

Un experto en la técnica puede amplificar fácilmente una secuencia de OR a partir de una muestra que contiene ARNm que codifica para la proteína mediante técnicas básicas de PCR y clonación molecular usando cebadores o sondas diseñados a partir de las secuencias conocidas. Además, dado que los genes de OR son genes sin intrones, un experto en la técnica puede amplificar una secuencia de OR a partir de ADN genómico.

La expresión de polipéptidos recombinantes se conoce bien en la técnica. Los expertos en la técnica pueden seleccionar fácilmente vectores y secuencias de control de la expresión para la expresión de polipéptidos de OR definidos en el presente documento en células eucariotas o procariontas. Los polipéptidos de OR están preferiblemente asociados con la membrana celular o liposomas sintéticos con el fin de tener función de señalización o unión. En la técnica se conocen métodos para la preparación de fracciones de membrana celular, por ejemplo, el método notificado por Hubbard & Cohn, 1975, J. Cell Biol. 64: 461-479, que se incorpora en el presente documento como referencia. Con el fin de producir membranas que comprenden polipéptidos de OR, puede aplicarse por ejemplo tales técnicas de aislamiento de membrana a células que expresan de manera endógena o recombinante uno de los polipéptidos de OR definidos en el presente documento. Alternativamente, pueden integrarse polipéptidos de OR en preparaciones de membrana mediante dilución de disolución de detergente del polipéptido (véase, por ejemplo, Salamon *et al.*, 1996, Biophys. J. 71:283-294, que se incorpora en el presente documento como referencia).

B. Ácidos carboxílicos presentes en sudor.

La estructura de tales ácidos carboxílicos la conoce bien un experto. Además, el experto en la técnica puede derivar fácilmente ácidos equivalentes a partir de dicha estructura y puede someter a prueba fácilmente si dichos equivalentes pueden unirse a y/o modular los polipéptidos de OR. Pueden aislarse ácidos carboxílicos de muestras naturales o sintetizarse químicamente.

Los métodos que pueden usarse para cuantificar dichos ácidos pueden ser, pero no se limitan a, a) para la extracción y purificación: extracción con disolvente, extracción con aceite, extracción con vapor, extracción con CO₂ supercrítico, cromatografía de líquidos, destilación, cromatografía de gases; b) para la cuantificación: cromatografía de gases, cromatografía de líquidos y espectrometría de masas. Dichos métodos se conocen bien en la técnica.

Pueden usarse ácidos carboxílicos en forma purificada o usarse como composiciones. Las cantidades del ácido necesarias en un ensayo de unión o funcional dado variarán dependiendo del ensayo, pero usarán generalmente de 1 μM a 1000 μM de ácido marcado y de 10 μM a 10 mM de ácido sin marcar por ensayo. Si es necesario para un ensayo dado, un ácido carboxílico puede marcarse mediante la incorporación o adición de marcadores radiactivos tal como se indicó anteriormente.

C. Ensayos para identificar moduladores de la actividad de OR

El descubrimiento de que los ácidos carboxílicos son ligandos de siete OR que pertenecen a la familia de receptores olfativos de clase 1 permite el desarrollo de ensayos de examen para identificar moduladores de la actividad de OR. Los ensayos de examen tendrán dos enfoques generales.

1) Ensayos de unión de ligando, en los que células que expresan uno o más OR definidos en el presente documento, extractos de membrana de tales células, o membranas lipídicas inmovilizadas que comprenden uno o más OR definidos en el presente documento se exponen a un ácido carboxílico marcado que se sabe que se une a dichos uno o más OR y un compuesto candidato. Tras la incubación, se mide la mezcla de reacción para determinar la unión específica del ácido carboxílico marcado a dichos OR. Los compuestos que interfieren con, o desplazan, ácido carboxílico marcado de los OR pueden identificarse como moduladores, preferiblemente bloqueantes o antagonistas de actividades de OR. Puede realizarse un análisis funcional con compuestos positivos para determinar a cuál de estas categorías pertenecen.

La unión de un compuesto puede clasificarse en 3 categorías principales: unión competitiva, unión no competitiva y unión sin competencia. Un compuesto de unión competitiva se parece a un segundo compuesto (de referencia) y se une a la misma cavidad de unión de una molécula diana (en este caso, receptor). Tras la adición, el compuesto de unión competitiva desplaza a dicho segundo compuesto de dicha diana. Un compuesto de unión no competitiva no

se une a la misma cavidad de unión de la molécula diana que un segundo compuesto (de referencia) pero puede interactuar con el efecto de dicho segundo compuesto sobre dicha molécula diana. El segundo compuesto no se desplaza tras la adición del compuesto de unión no competitiva. Un compuesto de unión sin competencia se une a la molécula diana cuando un segundo compuesto ya está unido. La unión cooperativa significa que un compuesto
5 facilita la unión de otro compuesto que puede ser un compuesto de referencia. Por tanto, el efecto cooperativo se observa en el análisis de la Kd de dicho otro compuesto.

2) Ensayos funcionales, en los que se mide una actividad de señalización de OR.

a) Para el examen de agonistas, se incuban células que expresan OR o membranas preparadas a partir de las mismas con un compuesto candidato, y se mide una actividad de señalización de OR. Los ensayos se validan usando un ácido carboxílico como agonista, y se compara la actividad inducida por compuestos que modulan la actividad de receptor con la inducida por el ácido carboxílico. Un agonista o agonista parcial tendrá una actividad biológica máxima correspondiente a al menos el 10% de la actividad máxima del ácido carboxílico cuando el agonista o agonista parcial está presente a 100 μM o menos, y preferiblemente tendrá el 50%, el 75%, el 100% o más, incluyendo 2 veces, 5 veces, 10 veces o más actividad que el ácido carboxílico.

b) Para el examen de antagonista, se someten a ensayo células que expresan OR o membranas aisladas a partir de las mismas para determinar la actividad de señalización en presencia de un ácido carboxílico con o sin un compuesto candidato. Los antagonistas reducirán el nivel de actividad de receptor estimulada por ácido carboxílico en al menos el 10%, con respecto a reacciones que carecen del antagonista.

c) Para el examen de agonistas inversos, se usan células que expresan actividad de OR constitutiva o membranas aisladas a partir de las mismas en un ensayo funcional que mide una actividad del receptor en ausencia de ligandos de ácido carboxílico. Los agonistas inversos son aquellos compuestos que reducen la actividad constitutiva del OR en al menos el 10%. La sobreexpresión de OR puede conducir a la activación constitutiva. Puede sobreexpresarse un OR colocándolo bajo el control de un promotor constitutivo fuerte, por ejemplo, el promotor temprano de CMV. Alternativamente, determinadas mutaciones de aminoácidos o dominios de aminoácido de GPCR conservados tienden a conducir a actividad constitutiva. Véase, por ejemplo: Kjelsberg *et al.*, 1992, J. Biol. Chem. 267:1430; McWhinney *et al.*, 2000, J. Biol. Chem. 275:2087; Ren *et al.*, 1993, J. Biol. Chem. 268:16483; Samama *et al.*, 1993, J. Biol. Chem. 268:4625; Parma *et al.*, 1993, Nature 365:649; Parma *et al.*, 1998, J. Pharmacol. Exp. Ther. 286:85; y Parent *et al.*, 1996, J. Biol. Chem. 271:7949.

Ensayo de unión de ligando y desplazamiento:

Pueden usarse polipéptidos de OR expresados en una célula, o membranas aisladas que contienen polipéptidos de receptor, junto con un ácido carboxílico con el fin de examinar para seleccionar compuestos que inhiben la unión de ácidos carboxílicos a polipéptidos de OR. Cuando se identifican en un ensayo que mide la unión o el desplazamiento de ácido carboxílico solo, tendrán que someterse los compuestos a pruebas funcionales para determinar si actúan como agonistas, antagonistas o agonistas inversos.

Para experimentos de desplazamiento, se incuban células que expresan un polipéptido de OR (generalmente 25.000 células por ensayo o de 1 a 100 μg de extractos de membrana) en tampón de unión (por ejemplo, Hepes 50 mM pH 7,4; CaCl_2 1 mM; albúmina sérica bobina 0,5% (BSA) libre de ácidos grasos; y MgCl_2 0,5 mM) durante 1,5 h (por ejemplo, a 27°C) con ácido carboxílico marcado en presencia o en ausencia de concentraciones crecientes de un modulador candidato. Para validar y calibrar el ensayo, pueden realizarse reacciones de competición de control usando concentraciones crecientes de ácido carboxílico sin marcar. Tras la incubación, se lavan las células de manera extensa, y se mide ácido carboxílico marcado y unido según sea apropiado para el marcador dado (por ejemplo, recuento de centelleo, ensayo enzimático, fluorescencia, etc.). Una reducción de al menos el 10% en la cantidad de ácido carboxílico marcado unido en presencia del modulador candidato indica desplazamiento de la unión por el modulador candidato. Se considera que los moduladores candidatos se unen específicamente en este u otros ensayos descritos en el presente documento si desplazan el 50% del ácido carboxílico marcado.

Alternativamente, puede monitorizarse la unión o el desplazamiento de la unión mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Pueden usarse ensayos de resonancia de plasmón superficial como método cuantitativo para medir la unión entre dos moléculas mediante el cambio de masa cerca de un sensor inmovilizado provocado por la unión o pérdida de unión de ácido carboxílico a partir de la fase acusa a un polipéptido de OR inmovilizado en una membrana sobre el sensor. Este cambio de masa se mide como unidades de resonancia frente al tiempo tras la inyección o retirada del ácido carboxílico o modulador candidato y se mide usando un biosensor de Biacore (Biacore AB). Pueden inmovilizarse polipéptidos de OR sobre un chip sensor (por ejemplo, chip CM5 de calidad para investigación; Biacore AB) en una membrana lipídica de película delgada según métodos descritos por Salamon *et al.* (Salamon *et al.*, 1996, Biophys J. 71: 283-294; Salamon *et al.*, 2001, Biophys. J. 80: 1557-1567; Salamon *et al.*, 1999, Trends Biochem. Sci. 24: 213-219, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia). Sarrio *et al.* demostraron que puede usarse SPR para detectar la unión de ligando al receptor de adenosina GPCR A(1) inmovilizado en una capa lipídica sobre el chip (Sarrio *et al.*, 2000, Mol. Cell. Biol. 20: 5164-5174, incorporado en el presente documento como referencia). Las condiciones para la unión de ácido carboxílico a

un OR definido en el presente documento en un ensayo de SPR pueden ajustarse de manera precisa por un experto en la técnica usando las condiciones notificadas por Sarrio *et al.* como punto de partida.

SPR puede someter a ensayo para detectar moduladores de unión al menos de dos maneras. En primer lugar, puede unirse previamente un ácido carboxílico a polipéptido de OR inmovilizado, seguido por inyección del modulador candidato a una velocidad de flujo de aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ y una concentración que oscila entre 1 nM y 1000 μM , preferiblemente de aproximadamente 100 μM . Puede cuantificarse el desplazamiento del ácido carboxílico unido, permitiendo la detección de unión de modulador. Alternativamente, puede incubarse previamente el polipéptido carboxílico unido a membrana con un modulador candidato y exponerse a un ácido carboxílico. Una diferencia en la unión de ácido carboxílico al OR expuesto al modulador con respecto a aquél sobre un chip no expuesto previamente al modulador demostrará la unión. En cualquier ensayo, una disminución del 10% o más en la cantidad de ácido carboxílico unido en presencia de modulador candidato, con respecto a la cantidad de ácido carboxílico unido en ausencia de modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción del OR y el ácido carboxílico. Puede acoplarse un sistema de Biacore a un sistema que identifica el modulador candidato tal como espectrometría de masas o cromatografía de gases.

Otro método de medir la inhibición de la unión de ácido carboxílico a OR usa transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). FRET es un fenómeno mecánico cuántico que se produce entre un donador de fluorescencia (D) y un aceptor de fluorescencia (A) en estrecha proximidad entre sí (habitualmente $< 100 \text{ \AA}$ de separación) si el espectro de emisión de D se solapa con el espectro de excitación de A. Las moléculas que van a someterse a prueba, por ejemplo, un ácido carboxílico y un polipéptido de OR, se marcan con un par complementario de fluoróforos donador y aceptor. Mientras están cerca uno de otro debido a la interacción OR/ácido carboxílico, la fluorescencia emitida con la excitación del fluoróforo donador tendrá una longitud de onda diferente de la emitida en respuesta a la longitud de onda de excitación cuando las moléculas no están unidas, permitiendo por tanto la cuantificación de polipéptidos unidos frente a no unidos mediante medición de la intensidad de emisión a cada longitud de onda. Los pares de fluoróforos donador/aceptor con los que marcar las moléculas dianas se conocen bien en la técnica.

Una variación de FRET usa la extinción de fluorescencia para monitorizar interacciones moleculares. Una molécula en el par de interacción puede marcarse con un fluoróforo y la otra con una molécula que extingue la fluorescencia del fluoróforo cuando se pone en estrecha yuxtaposición a la misma. Un cambio en fluorescencia tras la excitación es indicativo de un cambio en la asociación de las moléculas marcadas con el par fluoróforo:agente de extinción. Generalmente, un aumento en la fluorescencia del polipéptido de OR marcado es indicativo de que se ha desplazado el ácido carboxílico que porta el agente de extinción. Para ensayos de extinción, un aumento del 10% o más en la intensidad de emisión fluorescente en muestras que contienen un modulador candidato, con respecto a muestras sin el modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción OR/ácido carboxílico.

La transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET) es un sistema para monitorizar interacciones intermoleculares *in vivo*. El ensayo se basa en transferencia de energía no radiativa entre proteínas de fusión que contienen luciferasa de *Renilla* (Rluc) y por ejemplo proteína amarilla fluorescente (YFP) o proteína verde fluorescente (GFP). La señal de BRET se genera mediante la oxidación de un sustrato derivado de coelenterazina. Dicho sistema puede aplicar un sustrato derivado de coelenterazina que puede penetrar en la célula y no tóxico DeepBleuCTM (DBC) y un mutante de la proteína verde fluorescente (GFP) como aceptor. Cuando el donador y el aceptor están en estrecha proximidad, la energía resultante de la degradación catalítica del DBC se transfiere de Rluc a GFP, que entonces emitirá fluorescencia a su longitud de onda característica. Este método permite una mayor distancia entre las dos moléculas sometidas a prueba y es independiente del ángulo de fluoróforo.

Además de los métodos de resonancia de plasmón superficial, FRET y BRET, la medición de la polarización de fluorescencia es útil para la cuantificación de unión ácido carboxílico-receptor. El valor de polarización de fluorescencia para una molécula marcada de manera fluorescente depende del tiempo de correlación rotacional o la velocidad de volteo. Los complejos de proteínas, tales como los formados por un OR que se asocia con un ácido carboxílico marcado de manera fluorescente, tienen mayores valores de polarización que el ácido carboxílico marcado, no complejo. La inclusión de un inhibidor candidato de la interacción OR/ácido carboxílico da como resultado una disminución de la polarización de fluorescencia, con respecto a una mezcla sin el inhibidor candidato, si el inhibidor candidato altera o inhibe la interacción del OR con el ácido carboxílico. La polarización de fluorescencia está bien adecuada para la identificación de moléculas pequeñas que alteran la formación de complejos de polipéptidos o proteínas. Una disminución del 10% o más en la polarización de fluorescencia en muestras que contienen un modulador candidato, con respecto a la polarización de fluorescencia en una muestra que carece del modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción OR/ácido carboxílico.

Otra alternativa para monitorizar interacciones OR/ácido carboxílico usa un ensayo de biosensor. Se han descrito biosensores de ICS por AMBRI (Australian Membrane Biotechnology Research Institute; <http://www.ambri.com.au/>). En esta tecnología, la asociación de moléculas tales como un OR y un ácido carboxílico se acopla al cierre de canales de iones activados por gramacidina en bicapas de membranas en suspensión y por tanto a un cambio medible de la admitancia (similar a la impedancia) del biosensor. Este enfoque es lineal a lo largo de seis órdenes de magnitud de cambio de admitancia y es adecuado de manera ideal para el examen de alto rendimiento, a gran escala, de bibliotecas combinatorias de moléculas pequeñas. Un cambio del 10% o más (aumento o disminución) en

la admitancia en una muestra que contiene un modulador candidato, con respecto a la admitancia de una muestra que carece del modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción de OR y ácido carboxílico.

- 5 Es importante observar que en ensayos de interacción ácido-proteína, es posible que un modulador de la interacción no necesite interactuar necesariamente de manera directa con el/los dominio (s) de las proteínas que interactúan físicamente. También es posible que un modulador interactúe en una ubicación alejada del sitio de interacción ácido-proteína y provoque, por ejemplo, un cambio conformacional en los polipéptidos de OR. No obstante, los moduladores (inhibidores o agonistas) que actúan de esta manera son de interés como agentes para modular la actividad de OR.
- 10 Cualquiera de los ensayos de unión descritos puede usarse para determinar la presencia de un agente en una muestra, por ejemplo, una muestra de tejido, que se une a una molécula de OR, o que afecta a la unión de ácido carboxílico a OR. Para ello, se hacen reaccionar polipéptidos de OR con ácido carboxílico u otro ligando en presencia o en ausencia de la muestra, y se mide la unión de ácido carboxílico o ligando según sea apropiado para el ensayo de unión que esté usándose. Una disminución del 10% o más en la unión de ácido carboxílico u otro
- 15 ligando indica que la muestra contiene un agente que modula la unión de ácido carboxílico o ligando a polipéptidos de OR.

Chips de proteínas

- Los métodos pueden aplicarse sobre chips de proteína. Dicho chip de proteína puede ser, pero no se limita a, un portaobjetos de vidrio o una membrana de nitrocelulosa. En la técnica se conocen bien métodos basados en matriz para chips de proteína. Las matrices de proteína comprenden preferiblemente uno o más polipéptidos de OR definidos en el presente documento o fragmentos de los mismos que son responsables de la unión con ácidos carboxílicos. El chip de proteína comprende preferiblemente los 7 polipéptidos de OR definidos en el presente documento, o fragmentos de los mismos que son responsables de la unión con ácidos carboxílicos.
- 20

Ensayos funcionales de la actividad de receptor

- 25 i. Ensayos de unión de GTPasa/GTP:

Para GPCR tales como polipéptidos de OR, una medida de la actividad de receptor es la unión de GTP a membranas celulares que contienen receptores. En el método descrito por Traynor y Nahorski, 1995, Mol. Pharmacol. 47: 848-854, incorporado en el presente documento como referencia, se mide esencialmente el acoplamiento de proteína G a membranas midiendo la unión de GTP marcado a la membrana. Para ensayos de

30 unión de GTP, se incuban membranas aisladas de células que expresan el receptor en un tampón que contiene HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM y MgCl₂ 10 mM, 35S-GTP γ S 80 pM y GDP 3 μ M. Se incubaba la mezcla de ensayo durante 60 minutos a 30°C, tras lo cual se retira GTP marcado sin unir mediante filtración sobre filtros de GF/B. Se mide el GTP marcado y unido mediante recuento de centelleo en líquido. Con el fin de someter a ensayo la modulación de actividad de OR inducida por ácido carboxílico, se mezclan membranas preparadas a partir de

35 células que expresan un polipéptido de OR con un ácido carboxílico, y se realiza el ensayo de unión de GTP en presencia y en ausencia de un modulador candidato de la actividad de OR. Una disminución del 10% o más en la unión de GTP marcado medida mediante recuento de centelleo en un ensayo de esta clase que contiene el modulador candidato, con respecto a un ensayo sin el modulador, indica que el modulador candidato inhibe la actividad de OR.

- 40 Puede realizarse un ensayo de unión de GTP similar sin el ácido carboxílico para identificar compuestos que actúan como agonistas. En este caso, se usa la unión de GTP estimulada por ácido carboxílico como patrón. Se considera que un compuesto es un agonista si induce al menos el 50% del nivel de unión de GTP inducido por el ácido carboxílico cuando el compuesto está presente a 1 mM o menos, y preferiblemente inducirá un nivel igual o superior al inducido por el ácido carboxílico.

45 La actividad GTPasa se mide incubando las membranas que contienen un polipéptido de OR con gamma-32P-GTP. La GTPasa activa liberará el marcador como fosfato inorgánico, lo cual se detecta mediante separación de fosfato inorgánico libre en una suspensión al 5% de carbón activado en H₃PO₄ 20 mM, seguido por recuento de centelleo. Los controles incluyen ensayos que usan membranas aisladas de células que no expresan OR (sometidas a transfección simulada), con el fin de excluir posibles efectos no específicos del compuesto candidato.

- 50 Con el fin de someter a ensayo el efecto de un modulador candidato sobre la actividad GTPasa regulada por OR, se incuban muestras de membrana con ácido carboxílico, con y sin el modulador, seguido por el ensayo de GTPasa. Un cambio (aumento o disminución) del 10% o más en el nivel de unión de GTP o actividad GTPasa con respecto a muestras sin modulador es indicativo de modulación carboxílica por un modulador candidato.

ii. Ensayos de activación de la ruta aguas abajo:

- 55 a. Flujo de calcio – El ensayo basado en aequorina.

El ensayo de aequorina aprovecha la sensibilidad de apoaequorina mitocondrial o citoplasmática a la liberación de calcio intracelular o al flujo de calcio (entrada) inducido por la activación de GPCR (Stables *et al.*, 1997, *Anal. Biochem.* 252:115-126; Deteux *et al.*, 2000, *J. Exp. Med.*, 192 1501-1508; ambos de los cuales se incorporan en el presente documento como referencia). En resumen, se transfectan clones que expresan OR para coexpresar apoaequorina mitocondrial o citoplasmática y G-alfa-16 o G-olf. Se incuban las células con coelenterazina H 5 μM o derivados (Molecular Probes) durante 4 horas a temperatura ambiente, se lavan en medio de cultivo DMEM-F12 y se resuspenden a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/ml. Después se mezclan las células con péptidos agonistas de prueba y se registra la emisión de luz de la aequorina con un luminómetro durante 30 s. Los resultados se expresan como unidades de luz relativas (RLU). Los controles incluyen ensayos usando membranas aisladas de células que no expresan C356 (sometidas a transfección simulada), con el fin de excluir posibles efectos no específicos del compuesto candidato.

La actividad de aequorina o los niveles de calcio intracelular “cambian” si la intensidad de la luz aumenta o disminuye en el 10% o más en una muestra de células, que expresan un polipéptido de OR y tratadas con un modulador candidato, con respecto a una muestra de células que expresan el polipéptido de OR pero no tratadas con el modulador candidato o con respecto a una muestra de células que no expresan el polipéptido de OR (células sometidas a transfección simulada) pero tratadas con el modulador candidato.

Cuando se realiza en ausencia de un ácido carboxílico, el ensayo puede usarse para identificar un agonista o agonista inverso de una actividad de OR. Cuando el ensayo se realiza en presencia de un ácido carboxílico, puede usarse para someter a ensayo para detectar un antagonista.

1) Un ensayo basado en Fluo3, 4, Fura2 y calcio3 (Molecular Device).

Los ensayos basados en fluorescencia aprovechan los flujos de calcio desencadenados por la activación de receptor: o bien entrada de calcio a través de CNG por ejemplo o bien liberación de calcio a partir del retículo endoplasmático. Se sabe que algunos fluoróforos, incluyendo, pero sin limitarse a, Fluo3, Fluo4 y Fura2 (Molecular Probes) y la serie de kits calcio3 (Molecular Device) se unen a calcio. Tales complejos de fluoróforo-calcio emiten fluorescencia a longitudes de onda específicas. De ese modo, tras la activación de un receptor acoplado a proteína G, el calcio liberado del retículo endoplasmático o que entra a través de CNG se une a fluoróforo conduciendo a emisión de fluorescencia específica. Se incuban las células que sobreexpresan OR durante de 30 a 60 minutos con una disolución de fluoróforo a de 1 a 8 μM a 37°C. Tras lavar exhaustivamente con tampón de solución salina, se vierten 50 μl del mismo tampón en cada pocillo que contiene células (de 6 a 1536). Después se inyectan los agonistas sometidos a prueba en tales células cargadas y la activación de un OR va seguida por la medición de fluorescencia.

Los niveles de calcio intracelular “cambian” si la intensidad de fluorescencia aumenta o disminuye en el 10% o más en una muestra de células, que expresan un polipéptido de OR y se tratan con un modulador candidato, con respecto a una muestra de células que expresan un polipéptido de OR pero no tratadas con el modulador candidato o con respecto a una muestra de células que no expresan un polipéptido de OR (células sometidas a transfección simulada) pero tratadas con el modulador candidato.

2) Ensayo de membrana de despolarización/hiperpolarización (fluoróforo DiBac, por ejemplo).

El principio de este ensayo es seguir la despolarización de la membrana celular. La sonda aniónica DiBAC4(3) se reparte entre compartimentos intra y extracelular de una manera dependiente del potencial de membrana. Con potencial de membrana creciente (despolarización), la sonda se reparte adicionalmente en la célula dando como resultado un aumento de fluorescencia. A la inversa, la hiperpolarización conduce a una disminución de la fluorescencia debido a la extrusión de colorante.

La sonda DiBAC4(3) se excita con una longitud de onda de 488 nm, y emite a una longitud de onda de 540 nm.

En el día del experimento, se añade la glucosa al tampón de ensayo (tampón de solución salina) hasta una concentración final de 10 mM y la sonda DiBAC4(3) hasta una concentración final de 5 μM . Se mantiene el tampón de ensayo a 37°C. Se retira el medio de cultivo celular y se aclara dos veces cada pocillo que contiene células que sobreexpresan OR con 200 μl de tampón de ensayo previamente calentado. Se colocan 180 μl de tampón de ensayo que contiene DiBAC4(3) y se incuban las células durante 30 min a la temperatura apropiada. Las placas celulares estarán listas para el ensayo después de esta incubación de 30 min. Se recopila el nivel inicial durante 2 min antes de cualquier adición. Se añaden 20 μl de moduladores candidatos al pocillo apropiado y se recopilan los datos durante 25 min adicionales.

La polarización de membrana “cambia” si la intensidad de fluorescencia aumenta o disminuye en el 10% o más en una muestra de células, que expresan un polipéptido de OR y tratadas con un modulador candidato, con respecto a una muestra de células que expresan un polipéptido de OR pero no tratadas con el modulador candidato o con respecto a una muestra de células que no expresan un polipéptido de OR (células sometidas a transfección simulada) pero tratadas con el modulador candidato.

3) Ensayo de melanóforos. El ensayo de melanóforos es un ensayo basado en color. Básicamente, las células usadas para este ensayo se derivan de la piel de la rana *Xenopus Laevis*. Estas células inmortalizadas contienen melanosomas, que son orgánulos que contienen un pigmento oscuro. La activación de GPCR endógeno o recombinante que desencadena la activación de adenilato ciclasa o fosfolipasa C conduce a la dispersión de melanosoma y por tanto al oscurecimiento de las células. Alternativamente, un GPCR que inhibe adenilato ciclasa o fosfolipasa C conduce al aclaramiento de las células. De ese modo, en lugar de medir concentraciones de segundo mensajero, pueden localizarse fácilmente resultados positivos observando el cambio de coloración de las células. Este cambio de color puede cuantificarse fácilmente con un lector de microplacas que mide la absorbancia a 650 nM o examinando en un sistema de imágenes de vídeo.

10 b. Ensayo de adenilato ciclasa:

Se describen ensayos para detectar actividad adenilato ciclasa por Kenimer & Nirenberg, 1981, Mol. Pharmacol. 20: 585-591, incorporado en el presente documento como referencia. Ese ensayo es una modificación del ensayo enseñado por Solomon *et al.*, 1974, Anal. Biochem. 58: 541-548, también incorporado en el presente documento como referencia. En resumen, reacciones de 100 µl contienen Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), MgCl₂ 5 mM, fosfato de creatina 20 mM (sal de disodio), 10 unidades (71 µg de proteína) de creatina fosfocinasa, α-32P-ATP 1 mM (sal de tetrasodio, 2 µCi), AMP cíclico 0,5 mM, AMP cíclico marcado con G-3H (aproximadamente 10.000 cpm), Ro20-1724 0,5 mM, etanol al 0,25% y 50-200 µg de homogeneizado de proteína que va a someterse a prueba (es decir, homogeneizado a partir de células que expresan o que no expresan un polipéptido de OR, tratadas o no tratadas con ácido carboxílico con o sin un modulador candidato). Normalmente se incuban las mezclas de reacción a 37°C durante 6 minutos. Tras la incubación, se desproteinizan las mezclas de reacción mediante la adición de 0,9 ml de ácido tricloroacético al 6% frío. Se centrifugan los tubos a 1800 x g durante 20 minutos y se añade cada disolución sobrenadante a una columna Dowex AG50W-X4. Se eluye la fracción de cAMP de la columna con 4 ml de imidazol-HCl 0,1 mM (pH 7,5) en un vial de recuento. Deben realizarse los ensayos por triplicado. También deben realizarse reacciones de control usando homogeneizado de proteína de células que no expresan un polipéptido de OR.

25 Deben realizarse ensayos usando células o extractos de células que expresan un OR, tratadas o no tratadas con un ácido carboxílico con o sin un modulador candidato. Deben realizarse reacciones de control usando células sometidas a transfección simulada, o extractos de las mismas con el fin de excluir posibles efectos no específicos de algunos moduladores candidatos.

30 La actividad adenilato ciclasa "cambia" si aumenta o disminuye en el 10% o más en una muestra tomada de células tratadas con un modulador candidato de la actividad de OR, con respecto a una muestra similar de células no tratadas con el modulador candidato o con respecto a una muestra de células que no expresan un polipéptido de OR (células sometidas a transfección simulada) pero tratadas con el modulador candidato. Alternativamente, puede someterse a prueba una disminución de la actividad en el 10% o más mediante el modulador candidato de polipéptidos de OR en una muestra tratada con un compuesto de referencia.

35 c. Ensayo de cAMP:

Se mide el cAMP intracelular usando un radioinmunoensayo de cAMP (RIA) o proteína de unión a cAMP según métodos ampliamente conocidos en la técnica. Por ejemplo, Horton & Baxendale, 1995, Methods Mol. Biol. 41: 91-105, que se incorpora en el presente documento como referencia, describen un RIA para cAMP.

40 Hay varios kits para la medición de cAMP comercialmente disponibles, tales como el ensayo homogéneo basado en polarización de fluorescencia de alta eficacia comercializado por LJL Biosystems y NEN Life Science Products. Deben realizarse reacciones de control usando extractos de células sometidas a transfección simulada para excluir posibles efectos no específicos de algunos moduladores candidatos.

45 Deben realizarse ensayos usando células o extractos de células que expresan un polipéptido de OR, tratadas o no tratadas con un ácido carboxílico con o sin un modulador candidato. Deben realizarse reacciones de control usando células sometidas a transfección simulada, o extractos de las mismas con el fin de excluir posibles efectos no específicos de algunos moduladores candidatos

50 El nivel de cAMP "cambia" si el nivel de cAMP detectado en células, que expresan un polipéptido de OR y tratadas con un modulador candidato de la actividad de OR (o en extractos de tales células), usando el ensayo basado en RIA de Horton & Baxendale, 1995, citado anteriormente, aumenta o disminuye en al menos el 10% con respecto al nivel de cAMP en células similares no tratadas con el modulador candidato.

d. Descomposición de fosfolípidos, producción de DAG y niveles de trifosfato de inositol:

55 Pueden monitorizarse receptores que activan la descomposición de fosfolípidos para detectar cambios debidos a la actividad de moduladores conocidos o sospechados de un OR monitorizando la descomposición de fosfolípidos, y la producción resultante de segundos mensajeros DAG y/o trifosfato de inositol (IP3). Se describen métodos de medición de cada uno de ellos en Phospholipid Signaling Protocols, editado por Ian M. Bird. Totowa, NJ, Humana Press, 1998, que se incorpora en el presente documento como referencia. Véase también Rudolph *et al.*, 1999, J. Biol. Chem. 274: 11824-11831, incorporado en el presente documento como referencia, que también describe un

ensayo para detectar la descomposición de fosfatidilinositol. Deben realizarse ensayos usando células o extractos de células que expresan un OR, tratadas o no tratadas con ácido carboxílico con o sin un modulador candidato. Deben realizarse reacciones de control usando células sometidas a transfección simulada, o extractos de las mismas con el fin de excluir posibles efectos no específicos de algunos moduladores candidatos.

- 5 La descomposición de fosfatidilinositol, y los niveles de diacilglicerol y/o trifosfato de inositol “cambian” si aumentan o disminuyen en al menos el 10% en una muestra de células que expresan un polipéptido de OR y tratadas con un modulador candidato en presencia o en ausencia de ácido carboxílico, con respecto al nivel observado en una muestra de células que expresan un polipéptido carboxílico que no se trata con el modulador candidato.

e. Ensayos de activación de PKC:

- 10 Las tirosina cinasas receptoras de factor de crecimiento tienden a señalar a través de una ruta que implica la activación de proteína cinasa C (PKC), que es una familia de proteína cinasas activadas por fosfolípidos y calcio. La activación de PKC da como resultado en última instancia la transcripción de una matriz de genes que codifican para factor de transcripción de protooncogenes, incluyendo c-fos, c-myc y c-jun, proteasas, inhibidores de proteasa, incluyendo inhibidor de activador del plasminógeno y colagenasa tipo I, y moléculas de adhesión, incluyendo molécula de adhesión intracelular I (ICAM I). Pueden usarse ensayos diseñados para detectar aumentos en productos génicos inducidos por PKC para monitorizar la activación de PKC y de ese modo la actividad de receptor. Además, puede monitorizarse la actividad de receptores que señalan a través de PKC mediante el uso de constructos de genes indicadores impulsados por las secuencias de control de genes activados mediante la activación de PKC. Este tipo de ensayo basado en genes indicadores se comenta en más detalle a continuación.

- 20 Para una medición más directa de la actividad de PKC, puede usarse el método de Kikkawa *et al.*, 1982, J. Biol. Chem. 257: 13341, incorporado en el presente documento como referencia. Este ensayo mide la fosforilación de un péptido sustrato de PKC, que posteriormente se separa mediante unión a papel de fosfocelulosa. Este sistema de ensayo de PKC puede usarse para medir la actividad de cinasa purificada, o la actividad en extractos celulares en bruto. La muestra de proteína cinasa C puede diluirse en HEPES 20 mM/DTT 2 mM inmediatamente antes del ensayo.

- 25 El sustrato para el ensayo es el péptido Ac-FKKSFKL-NH₂ (SEQ ID NO: 15), derivado de la proteína sustrato de proteína cinasa rica en alanina miristoilada (MARCKS). La Km de la enzima para este péptido es de aproximadamente 50 μM. También pueden usarse otros péptidos básicos selectivos para proteína cinasa C conocidos en la técnica, a una concentración de al menos 2-3 veces su Km. Los cofactores requeridos para el ensayo incluyen calcio, magnesio, ATP, fosfatidilserina y diacilglicerol. Dependiendo de la intención del usuario, el ensayo puede realizarse para determinar la cantidad de PKC presente (condiciones de activación) o la cantidad de PCK activa presente (condiciones no activantes). Para la mayoría de los fines, se usarán condiciones no activantes, de tal manera que se mide la PKC que está activa en la muestra cuando se aísla, en vez de medir la PKC que puede activarse. Para condiciones no activantes, se omite el calcio en el ensayo en favor de EGTA.

- 35 El ensayo se realiza en una mezcla que contiene HEPES 20 mM, pH 7,4, DTT 1-2 mM, MgCl₂ 5 mM, ATP 100 μM, γ-32P-ATP ~1 μCi, sustrato peptídico 100 μg/ml (~100 μM), membranas de fosfatidilserina/diacilglicerol 140 μM/3,8 μM, y calcio 100 μM (o lo más preferiblemente EGTA 500 μM). Se usan 48 μl de muestra, diluidos en HEPES 20 mM, pH 7,4, DTT 2 mM en un volumen de reacción final de 80 μl. Se realizan reacciones a 30°C durante 5-10 minutos, seguido por adición de 25 μl de una disolución que contiene ATP 100 mM y EDTA 100 mM con un valor de pH de 8,0, lo cual detiene las reacciones.

- 40 Tras detenerse la reacción, se colocan una parte (85 μl) de cada reacción sobre un filtro de fosfato de celulosa de Whatman P81, seguido por lavados: cuatro veces con 500 ml de ácido fosfórico al 0,4%, (5-10 min por lavado); y un lavado final en 500 ml de EtOH al 95%, durante 2-5 min. Se mide la radiactividad unida mediante recuento de centelleo. Se determina la actividad específica (cpm/nmol) del ATP marcado colocando una muestra de la reacción sobre papel P81 y realizando el recuento sin lavar. Las unidades de actividad de PKC, definidas como nmol de fosfato transferido por min, se calculan de la siguiente manera:

La actividad, en UNIDADES (nmol/min) es:

$$= \frac{\text{cpm sobre papel} \times (105 \mu\text{l totales} / 85 \mu\text{l colocados})}{\text{tiempo de ensayo, min}}$$

$$\times \text{actividad específica de ATP, cpm/nmol}$$

- 50 Puede realizarse un ensayo alternativo usando un kit de ensayo de proteína cinasa C comercializado por PanVera (n.º de cat. P2747).

- 55 Se realizan los ensayos con extractos de células que expresan un polipéptido de OR, tratadas o no tratadas con un ácido carboxílico con o sin un modulador candidato. Deben realizarse reacciones de control usando células sometidas a transfección simulada, o extractos de las mismas con el fin de excluir posibles efectos no específicos de algunos moduladores candidatos.

La actividad de PKC “cambia” mediante un modulador candidato cuando las unidades de PKC medidas mediante cualquier ensayo descrito anteriormente aumentan o disminuyen en al menos el 10%, en extractos de células que expresan un OR y tratadas con un modulador candidato, con respecto a una reacción realizada con una muestra similar de células no tratadas con un modulador candidato.

5 f. Ensayos de activación de PKA

La actividad de PKA puede someterse a ensayo usando cualquiera de varios kits comercialmente disponibles, por ejemplo de Molecular Device el kit de ensayo de PKA IMAP, o de Promega el kit de ensayo de PKA ProFluor.

10 Deben realizarse ensayos usando células o extractos de células que expresan un OR, tratadas o no tratadas con un ácido carboxílico con o sin un modulador candidato. Deben realizarse reacciones de control usando células sometidas a transfección simulada, o extractos de las mismas con el fin de excluir posibles efectos no específicos de algunos moduladores candidatos

La actividad de PKA “cambia” si el nivel de actividad aumenta o disminuye en el 10% o más en una muestra de células, que expresan un polipéptido de OR, tratadas con un modulador candidato con respecto a actividad cinasa de PKA en una muestra de células similares no tratadas con el modulador candidato.

15 g. Ensayos de cinasa:

Puede someterse a ensayo la actividad MAP cinasa usando cualquiera de varios kits comercialmente disponibles, por ejemplo, el kit de ensayo de MAP Cinasa p38 comercializado por New England Biolabs (n.º de cat. 9820) o los ensayos de MAP cinasa FlashPlate™ comercializados por Perkin-Elmer Life Sciences.

20 Deben realizarse ensayos usando células o extractos de células que expresan un OR, tratadas o no tratadas con un ácido carboxílico con o sin un modulador candidato. Deben realizarse reacciones de control usando células sometidas a transfección simulada, o extractos de las mismas con el fin de excluir posibles efectos no específicos de algunos moduladores candidatos

25 La actividad MAP cinasa “cambia” si el nivel de actividad aumenta o disminuye en el 10% o más en una muestra de células, que expresan un polipéptido de OR, tratadas con un modulador candidato con respecto a la actividad MAP cinasa en una muestra de células similares no tratadas con el modulador candidato.

30 Se conocen bien ensayos directos para determinar la actividad tirosina cinasa usando sustratos de tirosina cinasa sintéticos o naturales, conocidos, y fosfato marcado, al igual que se conocen ensayos similares para determinar otros tipos de cinasas (por ejemplo, Ser/Thr cinasas). Pueden realizarse ensayos de cinasa tanto con cinasas purificadas como con extractos en bruto preparados a partir de células que expresan un polipéptido de OR, tratadas con o sin un ácido carboxílico, con o sin un modulador candidato. Deben realizarse reacciones de control usando células sometidas a transfección simulada, o extractos de las mismas con el fin de excluir posibles efectos no específicos de algunos moduladores candidatos. Los sustratos pueden ser o bien proteína de longitud completa o bien péptidos sintéticos que representan el sustrato. Pinna & Ruzzene (1996, Biochem. Biophys. Acta 1314: 191-225, incorporado en el presente documento como referencia) indica varios sitios de sustratos de fosforilación útiles para medir actividades cinasa. Hay varios péptidos de sustratos de cinasa comercialmente disponibles. Uno que es particularmente útil es el “péptido relacionado con Src”, (RRLIEDAEYAARG (SEQ ID NO: 16); disponible de Sigma n.º A7433), que es un sustrato para muchas tirosina cinasas receptoras y no receptoras. Dado que el ensayo descrito a continuación requiere la unión de sustratos peptídicos a filtros, los sustratos peptídicos deben tener una carga positiva neta para facilitar la unión. Generalmente, los sustratos peptídicos deben tener al menos 2 residuos básicos y un extremo amino-terminal libre. Las reacciones usan generalmente una concentración de péptido de 0,7-1,5 mM.

45 Generalmente se llevan a cabo los ensayos en un volumen de 25 µl que comprende 5 µl de tampón de cinasa 5X (BSA 5 mg/ml, Tris-Cl 150 mM (pH 7,5), MgCl₂ 100 mM; dependiendo de la cinasa exacta sometida a ensayo, puede usarse MnCl₂ en lugar de, o además de, MgCl₂), 5 µl de ATP 1,0 mM (concentración final de 0,2 mM), gamma-32P-ATP (100-500 cpm/pmol), 3 µl de sustrato peptídico 10 mM (concentración final de 1,2 mM), extracto celular que contiene cinasa que va a someterse a prueba (los extractos celulares usados para ensayos de cinasa deben contener un inhibidor de fosfatasa (por ejemplo, ortovanadato de sodio 0,1-1 mM)) y H₂O hasta 25 µl. Se realizan las reacciones a 30°C, y se inician mediante la adición del extracto celular.

50 Se realizan reacciones de cinasa durante de 30 segundos a aproximadamente 30 minutos, seguido por la adición de 45 µl de ácido tricloroacético al 10% helado (TCA). Se centrifugan las muestras durante 2 minutos en una microcentrífuga, y se colocan 35 µl del sobrenadante sobre círculos de filtro de fosfato de celulosa de Whatman P81. Se lavan los filtros tres veces con 500 ml de ácido fosfórico al 0,5% frío, seguido por un lavado con 200 ml de acetona a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se secan los filtros y se mide el ³²P incorporado mediante recuento de centelleo. Se determina la actividad específica de ATP en la reacción de cinasa (por ejemplo, en cpm/pmol) colocando una pequeña muestra (2-5 µl) de la reacción sobre un círculo de filtro P81 y realizando el recuento directamente, sin lavado. Después se dividen las cuentas por minuto obtenidas en la reacción de cinasa

(menos el blanco) entre la actividad específica para determinar los moles de fosfato transferidos en la reacción.

Deben realizarse ensayos usando células o extractos de células que expresan un OR, tratadas o no tratadas con un ácido carboxílico con o sin un modulador candidato. Deben realizarse reacciones de control usando células sometidas a transfección simulada, o extractos de las mismas con el fin de excluir posibles efectos no específicos de algunos moduladores candidatos.

La actividad tirosina cinasa “cambia” si el nivel de cinasa actividad aumenta o disminuye en el 10% o más en una muestra de células, que expresan un polipéptido de OR, tratadas con un modulador candidato con respecto a cinasa actividad en una muestra de células similares no tratadas con el modulador candidato.

h. Indicadores de la transcripción para la activación de la ruta aguas abajo:

La señal intracelular iniciada por la unión de un modulador a un receptor, por ejemplo, un polipéptido de OR definido en el presente documento, pone en movimiento una cascada de acontecimientos intracelulares, cuya consecuencia final es un cambio rápido y detectable en la transcripción y/o traducción de uno o más genes. Por tanto, la actividad del receptor puede monitorizarse midiendo la expresión de un gen indicador impulsada por secuencias de control sensibles a la activación de OR.

Tal como se usa en el presente documento “promotor” se refiere a los elementos de control de la transcripción necesarios para la regulación mediada por el receptor de la expresión génica, incluyendo no sólo el promotor basal, sino también cualquier potenciador o sitio de unión a factor de transcripción necesario para la expresión regulada por receptor. Al seleccionar promotores que son sensibles a las señales intracelulares resultantes de la unión de agonistas, y unir operativamente los promotores seleccionados a genes indicadores cuya transcripción, traducción o actividad final puede detectarse y medirse fácilmente, el ensayo de indicador basado en la transcripción proporciona una rápida indicación de si un receptor dado está activado.

En la técnica se conocen bien genes indicadores tales como luciferasa, cloranfenicol acetil transferasa (CAT), proteína verde fluorescente (GFP), beta-lactamasa o beta-galactosidasa, al igual que se conocen ensayos para la detección de sus productos.

Genes particularmente bien adecuados para monitorizar la actividad de receptor son los genes “inmediatos tempranos”, que se inducen rápidamente, generalmente en el plazo de minutos tras el contacto entre el receptor y la proteína o el ligando efector. La inducción de la transcripción de genes inmediatos tempranos no requiere la síntesis de nuevas proteínas reguladoras. Además de la rápida sensibilidad a la unión de ligando, las características de genes preferidos útiles para producir constructos de indicador incluyen: expresión baja o no detectable en células quiescentes; inducción que es transitoria e independiente de la síntesis de nuevas proteínas; la desactivación posterior de la transcripción requiere la síntesis de nuevas proteínas; y los ARNm transcritos a partir de estos genes tienen una semivida corta. Se prefiere, pero no es necesario, que un elemento de control de la transcripción tenga todas estas propiedades para que sea útil.

Con el fin de someter a ensayo la actividad de OR con constructo de indicador de la transcripción sensible a ácido carboxílico, se transfectan de manera estable células que expresan de manera estable un polipéptido de OR con el constructo de indicador. Para examinar para detectar agonistas, se exponen células no tratadas a moduladores candidatos, o se exponen a un ácido carboxílico, y se mide la expresión del indicador. Los cultivos tratados con ácido carboxílico sirven como patrón para el nivel de transcripción inducido por un agonista conocido. Un aumento de al menos el 10% en la expresión de indicador en presencia de un modulador candidato en comparación con la expresión de indicador en ausencia de cualquier modulador indica que el candidato es un modulador de la actividad de OR. Un agonista inducirá al menos tanta, y preferiblemente la misma cantidad o más de, expresión de indicador que el ácido carboxílico. Los agonistas parciales pueden activar el receptor en menor medida en comparación con el ácido carboxílico. Este enfoque también puede usarse para examinar para detectar agonistas inversos en los que las células expresan un polipéptido de OR a niveles tales que hay una actividad basal elevada del indicador en ausencia de ácido carboxílico u otros agonistas. Una disminución de la actividad de indicador del 10% o más en presencia de un modulador candidato, con respecto a su ausencia, indica que el compuesto es un agonista inverso.

Para examinar para detectar antagonistas, las células que expresan un OR y que portan el constructo de indicador se exponen a un ácido carboxílico (u otro agonista) en presencia y ausencia de un modulador candidato. Una disminución del 10% o más en la expresión de indicador en presencia de modulador candidato, con respecto a la ausencia del modulador candidato, indica que el candidato es un antagonista de la actividad de OR.

Los controles para ensayos de transcripción incluyen células que no expresan un OR definido en el presente documento pero que portan el constructo de indicador, así como células con un constructo de indicador sin promotor. Los compuestos que se identifican como moduladores de la transcripción regulada por OR también deben analizarse para determinar si afectan a la transcripción impulsada por otras secuencias reguladoras y por otros receptores, con el fin de determinar la especificidad y el espectro de su actividad.

El ensayo de indicador de la transcripción, y la mayoría de los ensayos basados en células, están bien adecuados para examinar bibliotecas químicas de compuestos químicos para seleccionar aquellos que modulan la actividad de

OR. Las bibliotecas pueden ser, por ejemplo, bibliotecas de fuentes naturales, por ejemplo, plantas, animales, bacterias, etc.

Moduladores candidatos útiles

5 Pueden examinarse moduladores candidatos a partir de grandes bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Actualmente se usan numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de diversas clases de compuestos. Hay bibliotecas de compuestos sintéticos comercialmente disponibles de varias empresas incluyendo, por ejemplo, Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, R.U.), Comgenex (Princeton, NJ), Brandon Associates (Merrimack, NH) y Microsource (New Milford, CT). Hay una biblioteca química poco común disponible de Aldrich (Milwaukee, WI). Hay bibliotecas combinatorias de moléculas orgánicas pequeñas disponibles y pueden prepararse. Alternativamente, hay 10 bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y de animales disponibles, por ejemplo, de Pan Laboratories (Bothell, WA) o MycoSearch (NC), o pueden producirse fácilmente mediante métodos bien conocidos en la técnica. Adicionalmente, bibliotecas y compuestos naturales y producidos de manera sintética se modifican fácilmente mediante medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales.

Ejemplos

15 La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Procedimiento experimental:

Cultivo celular y generación de líneas celulares

Se mantuvieron células en medio esencial mínimo (EMEM, Lonza) que contenía suero bovino fetal al 10% (M10). Se generaron células HEK293T-RTP1A1/RTP2 transfectando HEK293T con un vector de expresión que contenía las 20 secuencias de las proteínas chaperonas RTP1A1 y RTP2 y un gen de resistencia para puromicina, usando Lipofectamine 2000. Se seleccionó una población celular recombinante añadiendo 10 µg/ml de puromicina al medio de cultivo. Se obtuvieron además poblaciones monoclonales mediante un procedimiento de dilución limitante. En resumen, se diluyó una suspensión celular para que contuviese 1 célula per ml y se dispuso esta dilución a placas de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina (200 µl de dilución por pocillo). Después de 5 días de cultivo, se comprobó la presencia y el número de colonias celulares por pocillo bajo un microscopio de contraste de fase. 25 Después de 5 días de cultivo adicionales, se recogieron los pocillos que contenían una colonia individual y se amplificó independientemente cada población recogida.

Dilución de moléculas odorizantes

Se diluyeron moléculas odorizantes a una concentración de 1 mol/litro (M) en dimetilsulfóxido (DMSO) para generar 30 disoluciones madre. Para experimentos de examen, se diluyeron disoluciones madre de moléculas odorizantes en EMEM dispuesto en placas de 96 pocillos. Se prepararon placas que contenían las moléculas sometidas a prueba (1 molécula/pocillo) a una concentración de 2 mM, a una concentración de 632 µM y a una concentración de 200 µM.

Para análisis de concentración-respuesta, se prepararon diluciones en serie de las moléculas sometidas a prueba a partir de las disoluciones madre en EMEM sembradas en placas de 96 pocillos.

35 *Ensayo de luciferasa.*

Para el examen de desorfanización inicial y el análisis de dosis-respuesta, se usó un ensayo de indicador génico basado en luciferasa (Promega, Leiden, Países Bajos) tal como se describe en Saito *et al.* (2004). En resumen, se sembraron células sobre placas de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina (BD Bioscience, Erembodegem-Dorp, 40 Bélgica) y se transfecaron con un plásmido que contenía CRE-luciferasa y un plásmido que contenía el receptor olfativo. Dieciséis horas después de la transfección, se reemplazó el medio de cultivo por EMEM libre de suero que contenía el ligando sometido a prueba a una determinada concentración. Después de cuatro horas de incubación a 37°C, se lisaron las células y se procesaron para una medición de luminiscencia según los protocolos del fabricante. Se registró la emisión de luminiscencia en un lector Spectra Max M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se expresaron los resultados como el porcentaje de la respuesta inducida por 10 µM del activador de adenilato ciclasa, 45 forskolina.

Ejemplo 1: Examen de bibliotecas de moléculas odorizantes

Se usaron bibliotecas de moléculas odorizantes que contenían ácidos carboxílicos y otros tipos de moléculas para identificar activadores de los siete OR definidos en el presente documento. Se realizó la campaña de desorfanización con los siete receptores olfativos con una serie de 148 moléculas odorizantes. Se incluyeron 50 dieciséis ácidos carboxílicos presentes en el sudor dentro de los 148 odorizantes sometidos a prueba. Los cuadrados de color negro corresponden a una respuesta de un receptor a una molécula odorizante. Se ha encerrado en un recuadro en negrita la parte de la tabla correspondiente a ácidos carboxílicos. Los siete receptores de clase 1 sometidos a prueba han respondido todos de manera específica y exclusiva a los ácidos carboxílicos.

Se sometió a prueba cada molécula a 3 concentraciones diferentes (1 μ M, 316 μ M, 100 μ M). Se dispusieron diferentes moléculas de las bibliotecas sometidas a prueba a la misma concentración en placas de 96 pocillos (1 pocillo/molécula) que contenían células que expresan el receptor de interés. Se midió la actividad de las moléculas sometidas a prueba usando la actividad luciferasa tal como se explicó anteriormente. Se determinaron la mediana de la actividad luciferasa inducida por las moléculas sometidas a prueba y la desviación estándar asociada. Se definieron las moléculas supuestamente activas (coincidencias) como moléculas que inducen una actividad luciferasa mayor o igual a la mediana + 2 desviaciones estándar.

La tabla 2 resume los resultados de esta desorfanización. Cada par de OR-molécula activante se indica mediante un cuadrado de color negro en la intersección de la columna correspondiente al receptor y la fila correspondiente a la molécula. Los resultados muestran claramente que los siete OR definidos en el presente documento se activan por ácidos carboxílicos que están presentes en el sudor humano.

Los 7 OR definidos en el presente documento se incluyeron además en una gran campaña de examen que tenía el objetivo de someter a prueba diferentes bibliotecas de moléculas que no contienen ácidos carboxílicos. Se realizaron estos exámenes tal como se describió anteriormente. Se sometió a prueba un total de 823 moléculas con OR52L1, OR52E8, OR5112, OR52A5 y OR56A5. Se sometió a prueba un total de 592 moléculas con OR52B2 y se sometió a prueba un total de 777 con OR52E1. En la tabla 3, se facilita la lista completa de las moléculas sometidas a prueba. Ninguna de las moléculas proporcionó una coincidencia con ninguno de los 7 OR definidos en el presente documento. Este resultado confirma la selectividad muy alta de los 7 OR definidos en el presente documento para ligandos de ácido carboxílico. Por tanto, se encontró que los 7 OR sometidos a prueba de la clase 1, (correspondientes a los OR definidos en el presente documento, concretamente: OR52L1, OR52E8, OR52B2, OR5112, OR52E1, OR52A5 y OR56A5) respondían de manera específica y exclusiva a los ácidos carboxílicos.

Ejemplo 2: Análisis de dosis-respuesta de la interacción ligando-OR

Se validaron las coincidencias mediante análisis de concentración-respuesta. Se sometieron a prueba diluciones en serie semilogarítmicas de moléculas de coincidencia, desde 1 μ M hasta 316 nM, con los OR que responden usando el ensayo de luciferasa tal como se describió anteriormente.

En la tabla 2, se facilitan los resultados. En las figuras 2 A a G, se facilitan resultados completos.

Se observó que cada uno de los 7 OR sometidos a prueba responden a al menos una molécula que contiene una función carboxílica. Una comparación atenta de estos activadores con los ácidos carboxílicos conocidos que aparecen en el sudor humano reveló que cada uno de los receptores responde a al menos un ácido carboxílico liberado en el sudor. Se sabe que algunos de estos ácidos, tales como ácido hexanoico, ácido 3-metilhexanoico, ácido (E)-3-metil-2-hexenoico, ácido 3-hidroxi-3-metilhexanoico, ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido 4-etiloctanoico, (Zeng *et al.* 1991; J. Chem. Ecológ. Vol. 17 págs. 1469-1492; Natsch *et al.* 2006 Chem. & Biodiv. Vol. 3 págs. 1-20) son promotores importantes del mal olor del sudor humano.

Por tanto, estos 7 OR definidos en el presente documento están implicados en la percepción de mal olor del sudor provocada por los ácidos carboxílicos y constituyen receptores candidatos valiosos para la identificación de antagonistas y/o bloqueantes que bloquearán la percepción de mal olor.

Tabla 2: Activación de OR definidos en el presente documento según los ácidos carboxílicos que se originan a partir del sudor.

	OR52L1	OR52E8	OR52B2	OR5112	OR52E1	OR52A5	OR56A5
ácido butanoico							
ácido isovalérico							
ácido pentanoico							
ácido hexanoico							
ácido 2-metilhexanoico							
ácido 3-metilhexanoico							
ácido (E)-3-metil-2-hexenoico							
ácido 3-hidroxi-3-metilhexanoico							
ácido heptanoico							
ácido 2-metilheptanoico							
ácido octanoico							
ácido 4-etiloctanoico							
ácido nonanoico							
ácido decanoico							
ácido undecanoico							
ácido benzoico							

- Metil-isoeugenol
- 4-Isopropilciclohexanol
- Etil-maltol
- Benzoato de prenilo
- 5 2-Metil-3-(p-metoxifenil)propanal
- (+)-Canfeno
- Cetal de etilenglicol de acetoacetato de etilo
- Acetanisol
- 4,5-Dihidro-3(2H)tiofenona
- 10 Estireno
- Alcohol bencílico
- Benzaldehído
- Bencilmercaptano
- 2-Etilpiridina
- 15 Alcohol alfa,alfa-dimetilfenetílico
- butirato de dimetil-bencil-carbinilo
- alfa-Metilcinamaldehído
- Fenilacetato de metilo
- Dimetil acetal de fenilacetaldehído
- 20 Difenil éter
- Alcohol alfa-amilcinamílico
- alfa-Hexilcinamaldehído
- Fenilacetato de p-tolilo
- Fenilacetato de isobutilo
- 25 Fenilacetato de bencilo
- Fenilacetato de anisilo
- Triacetina
- 2-Metil-4-fenil-2-butanol
- Cinamato de metilo
- 30 Isobutirato de bencilo
- Cinamato de etilo
- Butirato de bencilo
- Cinamato de bencilo
- Acetato de fenetilo
- 35 Bencil éter
- Cinamato de fenetilo
- Acetato de cinamilo

- Isobutirato de 2-fenoxietilo
- 1-Bromo-2-feniletileno
- 2,2-Dimetil-3-(3-metilfenil)propanol
- 2-Metil-3-(p-isopropilfenil)propionaldehído
- 5 p-Tolilacetaldehído
- 1-Fenil-3-metil-3-pentanol
- Acetato de anisilo
- p-Propil-anisol
- gamma-Octalactona
- 10 Alcohol cinámico
- Cinamaldehído
- gamma-Nonalactona
- 2-Ciclohexiliden-2-fenilacetónitrilo
- Formiato de fenetilo
- 15 gamma-Undecalactona
- (-)- α -terpineol
- 4-Metilanisol
- 6-Acetoxihexanoato de etilo
- Alcohol anisílico
- 20 3-Decen-2-ona
- gamma-Heptalactona
- propionato de etilo
- malonato de dietilo
- butirato de etilo
- 25 Acetal
- Acetato de geranilo
- Brasilato de etileno
- omega-Pentadecalactona
- laurato de butilo
- 30 3,7-Dimetil-1-octanol
- Citronelol
- (\pm)-citronelal
- Geraniol
- Nerol
- 35 Butirato de isoamilo
- Heptanoato de etilo

- Octanoato de etilo
- p-Cresol
- succinato de dimetilo
- 2,6-Dimetil-5-heptenal
- 5 1-Propanotiol
- Hidroxicitronelal
- Isopentilamina
- Isovalerato de etilo
- Bencenotiol
- 10 3-Metilpiridina
- 2-Metilpiridina
- 2-Metilpirazina
- Isobutirato de octilo
- 1,16-Hexadecalactona
- 15 10-Undecenoato de butilo
- Butilamina
- 1-Butanotiol
- 1,3-Propanoditiol
- Pirrol
- 20 Miristato de isopropilo
- Sebacato de dietilo
- Decanoato de metilo
- 2-Heptanona
- Formiato de isoamilo
- 25 n-Valeraldehído
- Piridina
- Piperidina
- 6-Metil-5-hepten-2-ona
- 2-Octinoato de metilo
- 30 Hexilamina
- Alcohol hexílico
- Octadecanoato de etilo
- Heptaldehído
- Octanoato de hexilo
- 35 2-Nonenoato de metilo
- 2-Noninoato de metilo
- 10-Undecenoato de metilo

- Laurato de metilo
- Acetato de mircenilo
- 2-Undecanona
- Acetato de octilo
- 5 Acetato de decilo
- 2-Acetilpiridina
- Decanal
- 10-Undecen-1-ol
- Undecanal
- 10 10-Undecenal
- Aldehído dodecílico
- Estearato de metilo
- Linoleato de metilo
- Dihidrojazmona
- 15 Acetato de linalilo
- Formiato de linalilo
- (2,6,6-Trimetilciclohexa-1,3-dienil)metanal
- 2(2,4-Dimetilciclohex-3-en-1-il)-5-metil-5-(1-metilpropil-)
- Salicilato de bencilo
- 20 Maltol
- 2,6-Dimetiltiofenol
- 1,4-Butanoditiol
- Acetato de prenilo
- 1,8-Octanoditiol
- 25 2-Furil metil cetona
- Salicilato de metilo
- 2-Acetil-5-metilfurano
- Fenchona
- Benzofenona
- 30 Propionato de estiralilo
- Benzoato de isobutilo
- Benzoato de bencilo
- Heliotropina
- Indol
- 35 Etil-vainillina
- Vainillina
- Sulfuro de amonio

- 3-Fenilglicidato de etilo
- Trietilamina
- p-Anisato de metilo
- 4'-Metilacetofenona
- 5 Cuminaldehído
- Disolución de 1,3,4,6,7,8-hexahidro-4,6,6,7,8,8-hexametilciclopenta[g]-2-benzopirano
- alfa-Amilcinamaldehído
- Propionato de bencilo
- Cinamato de cinamilo
- 10 Acetato de-3-fenilpropilo
- Fenilacetaldehído
- 3-Fenil-1-propanol
- Fenoxietanol
- 4-Etilfenol
- 15 4-Hidroxibenzaldehído
- p-Anisaldehído
- 4-Heptanona
- Nonanoato de etilo
- 2,5-Dimetilpirazina
- 20 Mirceno
- Propionaldehído
- Alcohol isoamílico
- Hexanoato de etilo
- Hexanoato de alilo
- 25 Pirrolidina
- Acetato de butilo
- Acetato de isoamilo
- Miristato de etilo
- Acetato de isobornilo
- 30 alfa-Ionona
- 3-metil-4-(2,6,6-trimetil-2-ciclohex-1-il-3-buten-2-ona) / alfa-isometil-ionona
- Hidroxitolueno butilado
- 9-Decen-1-ol
- 2-Hexilciclopentanona
- 35 2,4,-Dimetil-2-(1,1,4,4-tetrametiltetralinil)-1,3-dioxolano
- 2,6-Dimetil-2-heptanol
- Mentalactona

- 2-Furoato de amilo
- Antranilato de metilo
- Acetato de madera de guayaco
- 3-Careno
- 5 3-Nonenoato de metilo
- 3,5-Dimetil-1,2-ciclopentadiona
- Siringaldehído
- 3-(Metiltio)propionato de metilo
- 6-Isopropilquinolina
- 10 3-Metilbutanoato de furfurilo
- 2-n-Heptilciclopentanona
- Cuminil-nitrilo
- cis-4-(1-Metiletil)ciclohexanometanol
- Acetato de 1,3,3-trimetil-2-norbornanilo
- 15 3,7-Dimetil-1,3,6-octatrieno
- d,l-Limoneno
- 2-t-Butilciclohexiloxi-2-butanol
- Acetato de bencilo
- Isovalerato de fenetilo
- 20 Acetato de p-metilfenilo
- 4-Alilanisol
- (-)-Mentona
- Acrilato de etilo
- 2,6,10-Trimetil-9-undecenal
- 25 Propionato de citronelilo
- Dimetil-acetal de hidroxicitronelal
- Acetoacetato de etilo
- Heptanoato de aliilo
- Propionato de octilo
- 30 Acetato de hexilo
- Alcohol nonílico
- Acetato de nonilo
- Sulfuro de furfurilo y metilo
- 1-Furfurilpirrol
- 35 Metil-2,5,10-trimetil-2,5,9-ciclododecatrien-1-il-cetona
- Propionato de linalilo
- 2-sec-Butilciclohexanona

- beta-Ionona
 7-Acetil-1,1,3,4,4,6-hexametiltetralina
 p-Dimetoxibenceno
 Acetato de citronelilo
- 5 Acetato de alfa,alfa-dimetilfenetilo
 2-Etil-3-metilpirazina
 Alcohol (1R)-(+)-fenchílico
 1,3,5-Undecatrieno
 Tetrahidro-4-metil-2-(2-metil-1-propenil)-(2H)pirano
- 10 Butirato de cis-3-hexenilo
 4-terc-Amilciclohexanona
 1,1-Dietoxiciclohexano
 Tiglato de hexilo
 Dihidro-beta-ionona
- 15 Undecanoato de metilo
 3-Propiliden-ftalida
 Propionato de triciclodecenilo
 trans-Cinamato de metilo
 1,8,12-Bisabolatrieno
- 20 Bourgeonal
 (1S)-(-)-β-pineno
 Androstenona
 trans-3-Octen-2-ona
 1,2-Dihidrolinalool
- 25 Tetrahidromircenol
 2,6-Dimetil-7-octen-2-ol
 2-Isobutiltiazol
 beta-Farneseno
 trans-2-Heptenal
- 30 Acetato de 3-pentiltetrahidro[2H]piranilo
 trans-2-Butenoato de hexilo
 Fumarato de dihexilo
 1,10-Dimetil-9-decalol
 2-Mercaptopropionato de etilo
- 35 Cedril metil éter
 4-Metil-4-mercaptopentan-2-ona

- Octanoato de isoamilo
- trans-2-Dodecen-1-al
- Benzoato de isoamilo (natural)
- Salicilato de amilo
- 5 Levulinato de butilo
- 4-(Metiltio)butanol
- Isobutirato de vainillina
- 3-Metilbut-2-enoato de citronelilo
- Acetato de tetrahidrolavandulilo
- 10 2-Pentanotiol
- cis-4-Decenal
- Acetato de ciclohexanoetilo
- 2-Metilpentanoato de metilo
- Disulfuro de metilo y propilo
- 15 5-Metil-2-fenil-2-hexenal
- 2-Acetilpirazina
- (-)-Mentol
- d-Carvona
- Oxima de 5-metil-3-heptanona
- 20 2-Tridecenonitrilo
- Acetato de nerolidilo
- Isobutirato de geranilo
- Damascenona
- β -Damascona
- 25 (5H)-5-Metil-6,7-dihidrociclopenta(b)pirazina
- 2,3 ó 10-Mercaptopinano
- 3-Hexenoato de etilo
- 2,6,10-Trimetilundeca-5,9-dienal
- 2-Metoxi-3-(1-metilpropil)pirazina
- 30 1,3-Butanoditiol
- 2-Heptiltetrahidrofurano
- Dodecanonitrilo
- Propionato de hexilo
- Isovalerato de 2-metilbutilo
- 35 2-Isobutil-3-metoxipirazina
- 2-Metilcrotonato de 3,7-dimetil-6-octenilo

- alfa-Damascona
- 2-Metilbutirato de fenetilo
- Dihidrojazmonato de metilo
- 4-Hexen-3-ona
- 5 2-Ciclohexilpropionato de etilo
- trans,trans-2,4-Decadienal
- Benzoato de cis-3-hexenilo
- Formiato de a,3,3-trimetilciclohexilmetilo
- Formiato de dihidromircenilo
- 10 Diacetina
- 2,5-Dimetil-2-octen-6-ona
- 4-Fenilbutano-2-ona
- Butirato de hexilo
- 4-Metil-2-fenil-2-pentenal
- 15 Ciclohexanopropionato de alilo
- 2-Metoxi-4-propilfenol
- trans-2,cis-6-Nonadien-1-ol
- Etil-(Z)-3-hexenil-acetal de acetaldehído
- 2-Metil-4-(2,2,3-trimetil-3-ciclopenten-1-il)but-2-en-1-ol
- 20 2-Etil-4-(2,2,3-trimetil-3-ciclopenten-1-il)-2-buten-1-ol
- 2-Metoxi-3-metilpirazina
- 2-Metil-3-furantiol
- 4,5-Dimetil-3-hidroxi-2,5-dihidrofuran-2-ona
- Tiazol
- 25 Cetona de sandía
- 2-Hexilacetoacetato de etilo
- Hexahidro-1,1,5,5-tetrametil[2H]-2,4a-metanonaftalen-8[5H]ona
- Gliceril-acetal de fenilacetaldehído
- 2-Acetil-2-tiazolina
- 30 4-(Octahidro-4,7-metano[5H]inden-5-iliden)butanal
- 2-trans-4-cis-Decadienoato de etilo
- 2-Metoxipirazina
- 4-(4-Hidroxi-4-metilpentil)-3-ciclohexeno-1-carboxaldehído
- Acetato de 4-t-butilciclohexilo
- 35 Acetilcedreno
- Acetato de 6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ilo (cis y trans)
- 3-(Metiltio)propionaldehído

- 6-(3-Pentenil)tetrahidro[2H]piran-2-ona
 delta-Nonalactona
 Propionato de (Z)-3-hexenilo
 Dihidro-4-metil-5-pentilfuran-2(3H)ona
- 5 6,7-Dihidro-1,1,2,3,3-pentametil-4(5H)indanona
 6,6-Dimetil-2-norpinenpropionaldehído
 1-Octen-3-ol
 4-(Metiltio)-2-butanona
 6-Isopropil-2[1H]octahidronaftalenona
- 10 5,6,7,8-Tetrahidroquinoxalina
 3,5,5-Trimetil-1-hexanol
 1,9-Nonanoditiol
 Deshidrociclogeranato de etilo
 2-Isopropil-5-metil-2-hexenal
- 15 Metil fenetil éter
 3,3,5,5-Tetrametil-4-(1-etoxietenil)ciclohexanona
 Disolución de 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona
 Acetato de cis-3-hexen-1-ilo
 Acetato de trans-3-hexenilo
- 20 Acetato de 1-vinil-2-(1-metilpropil)ciclohexilo
 Dodecahidrotetrametilnaftofurano
 5-Ciclohexadecen-1-ona
 Isohexeniltetrahidrobenzaldehído
 2-Heptilfurano
- 25 (E)-6,10-Dimetilundeca-5,9-dien-2-ona
 2,4-Dimetil-5-acetiltiazol
 Acetato de 5-metil-3-butiltetrahidropiran-4-ilo
 p-Menta-8-tiol-3-ona
 (p-Toliloxi)acetato de metilo
- 30 3-Propilbicyclo-(2.2.1)hept-5-en-2-carboxialdehído
 2-Furoato de octilo
 Octanoato de alfa-furfurilo
 2-Metilpentanoato de etilo
 Heptanoato de furfurilo
- 35 9-Decenal
 3,7-Dimetil-octanonitrilo
 trans-Nerolidol

- 2,5-Dimetil-4-metoxi-3(2H)furanona
 Etil-linalil-acetal de acetaldehído
 Isobutirato de (Z)-3-hexenilo
 Octahidro-7-metil-1,4-metanonaftalen-6-[2H]-ona
- 5 Anetol
 3,7-Dimetil-7-metoxioctan-2-ol
 Disulfuro de diisopropilo
 p-Mentano-3,8-diol
 Diacetilo
- 10 Acetal de etilenglicol de 2-etilhexanal
 Cinamil-nitrilo
 2-Fenil-2-butenal
 Octahidrocumarina
 2,2'-(Ditiodimetilen)difurano
- 15 3,4-Hexanodiona
 Farnesol
 NOOTKATONA
 D-Fenchona
 ALFA-CEDRENO ((-)- α -cedreno; 1S,2R,5S)-2,6,6,8-tetrametiltriciclo[5.3.1.0^{1.5}]undec-8-eno)
- 20 1,4-Cineol
 Atrarato de metilo
 Eucaliptol
 2-Pentilciclopentanona
 cis-Jazmona
- 25 Acetovainillona
 Dihidro-alfa-terpineol
 Ciclopentadecanona
 1,4-Ditiano
 Borneol
- 30 Fenilacetato de n-amilo
 Acetoína
 3,7-Dimetil-2,6-octadienonitrilo
 L-Citronelil-nitrilo
 3-(Metiltio)-1-hexanol
- 35 2,4,6-Trimetil-4-fenil-1,3-dioxano
 (6)-2-Hidroxiproato de etilo

- 3,3-Dimetilbicyclo[2.2.1]heptan-3-carboxilato de metilo
- Feniletil n-butil éter
- trans-2-Undecenal
- Alcohol 4-isopropilbencílico
- 5 3-Etilpiridina
- Metil bencil éter
- Valerato de etilo
- Hexanoato de amilo
- Propionato de isobutilo
- 10 3-Hidroxibutirato de etilo
- Acetato de triciclodecenilo
- 3-Metil-1-ciclopentadecanona
- Fenilacetato de hexilo
- 2-Acetil-3,5(6)-dimetilpirazina
- 15 3,5,5-Trimetilhexanal
- Octahidro-2,3,8,8-tetrametil-2-acetonaftona
- 2-Butil-4,4,6-trimetil-1,3-dioxano
- Tujona
- 4-(4-Hidroxifenil)-2-butanona
- 20 Dodecanodioato de etileno
- 3-Metil-5-fenil-1-pentanol
- 3-Metil-5-fenil-1-pentanal
- 3-Butiliden-ftalida
- 2-Cumaranona
- 25 Isovalerato de metilo
- 3-Metil-2-buten-1-ol
- 2,6-Nonadienal (trans, cis)
- Feniletil isoamil éter
- 4-Carvomentenol
- 30 Acetato de cariofileno
- 2-Metil-3-tetrahidrofuranotiol
- delta-Damascona
- 2,6-Xilenol
- 1-Fenil-1,2-propanodiona
- 35 2-Etil-6,6-dimetil-2-ciclohexenocarboxilato de etilo
- Tiglato de etilo
- Acetato de 3,5,5-trimetilhexilo

- Ciclododecil-etil-acetal de formaldehído
- Terpinoleno
- D-(+)-Xilosa
- 2-Butenoato de isobutilo
- 5 3-Heptanol
- Acetato de mentanilo
- Acetoximetil-isolongifoleno
- 2,3-Dimetilpirazina
- 2-Metil-6-pentil-4-oxociclohex-2-enocarboxilato de etilo
- 10 Formiato de butilo
- Sulfuro de alilo
- Tetrahidrogeranial
- D-Limoneno
- 2,3-Pentanodiona
- 15 Tributirina
- Alcohol fenético
- Butirato de-2-pentilo
- 2-Furoato de metilo
- cis-3-Hexenoato de cis-3-hexenilo
- 20 Lactato de L-mentilo
- Tiglato de isobutilo
- Piruvato de etilo
- 3,7-Dimetil-2,6-nonadienonitrilo
- Dihidrocarveol
- 25 Acetato de ciclohexilo
- Acetato de furfurilo
- Butirato de furfurilo
- Butirato de metilo
- trans-2-Butenoato de etilo
- 30 Acetato de-2-metilbutilo
- 6-Metilheptan-3-ona
- Sulfuro de etilo y metilo
- Disulfuro de dimetilo
- 3-Penten-2-ona
- 35 Salicilato de hexilo
- Malato de dietilo
- Hexanoato de propilo

- Undecanoato de etilo
- Palmitato de etilo
- 2-Metilvalerato de butilo
- Laurato de isoamilo
- 5 2-Isobutil-4-hidroxi-4-metiltetrahidropirano
- Butirato de isopropilo
- Octanoato de amilo
- Fenetilamina
- Isobutirato de propilo
- 10 4-Propilfenol
- L-Carvona
- 5-(2,2,3-Trimetilciclopent-3-en-1-il)-3-metilpentan-2-ol
- trans-4-Decenal
- Formiato de 2,5,9,10-tetrametil-5,6-deshidro-1-decalilo
- 15 Isobutirato de maltol
- 2,2,5-Trimetil-5-pentilciclopentanona
- Acetato de 4-metil-5-tiazol-etanol
- Isovalerato de isoamilo
- Tiglato de metilo
- 20 Hexanal
- 4-Alil-2,6-dimetoxifenol
- 2-Metilbutirato de isopropilo
- p-Isobutil-alfa-metilhidrocinamaldehído
- trans-2-Hexen-1-al
- 25 4-Heptenal
- Formiato de 3,5,5-trimetilhexilo
- 3,3,5-Trimetilciclohexil etil éter
- Alcohol isopropílico
- Metilcarbonato de cis-3-hexenilo
- 30 Amilglicolato de alilo
- para-Etil-alfa,alfa-dimetildihidrocinamaldehído
- Acetal de propilenglicol de hidratropaldehído
- Pivalato de fenetilo
- 1,1-Dimetoxi-2,2,5-trimetil-4-hexeno
- 35 Metilsulfóxido
- 2-t-Butilciclohexilcarbonato de etilo
- 7-Formil-5-isopropil-2-metilbicyclo[2,2,2]oct-2-eno

- Acetato de amilciclohexilo (isómeros mixtos)
 Tiglato de cis-3-hexenilo
 Benzoato de hexilo
 (-)-Ambróxido
- 5 Epóxido de isolongifoleno
 Feniletil isopropil éter
 Acetato de 4-metil-4-fenil-2-pentilo
 Grisolva
 2-Etoxi-9-metilen-2,6,6-trimetilbiciclo[3.3.1.]nonano
- 10 1-Metil-4-isopropilbiciclo[2.2.2]oct-5-enocarboxilato de metilo
 Sorbato de metilo
 Cyclomugual
 2-Metildecanonitrilo
 6- o 7-Etilidenoctahidro-5,8-metano[2H]-1-benzopiran-2-ona
- 15 5-Etil-3-hidroxi-4-metil-2(5H)furanona
 delta-Decalactona
 gamma-Decalactona
 1-(2,2,6-Trimetilciclohexil)-3-hexanol
 productos de reacción de 2-metoxifenol con 2,2-dimetil-3-metilenbiciclo[2.2.1]heptano hidrogenado
- 20 delta-Undecalactona
 1-p-Menteno-8-tiol
 1-Propanol
 delta-Dodecalactona
 2-Furoato de fenetilo
- 25 2,5,5-Trimetiloctahidro-2-naftol
 2-Metil-4-(2,6,6-trimetil-2-ciclohexenil)butanal
 trans-2-Octenoato de metilo
 2,2,6-Trimetil-6-viniltetrahidropirano
 2,2-Dimetil-5-(1-metilpropen-1-il)tetrahidrofurano
- 30 2-Metilbutirato de etilo
 Citroneliloxiacetaldehído
 Butiril-lactato de butilo
 Fenetil-propil-acetal de acetaldehído
 Fenoxiacetato de alilo
- 35 Etilamina
 Acetaldehído
 Etanotiol

- Oxima de 1,5-dimetil-biciclo(3.2.1)octan-8-ona
- Sulfuro de dimetilo
- Dimetil-acetal de citral
- (±)-Alcanfor
- 5 Alcoholes de aceite de cedro
 - Acetato de cedrilo
 - Isobutirato de terpinilo
 - 3-Metil-3-pentanol
 - ω-6-Hexadecenlactona
- 10 Cinamato de isoamilo
 - Acetoacetato de isobutilo
 - Isobutil-bencil-carbinol
 - 3-Metil-3-fenilglicidato de etilo
 - (1S)-(-)-α-Pineno
- 15 L-Fenchona
 - Citrato de trietilo
 - Isobutirato de linalilo
 - Cinamato de linalilo
 - Linalool
- 20 Isobutilamina
 - Alcohol isobutílico
 - Isobutiraldehído
 - 2-Butanol
 - 2-Butanona
- 25 Piruvaldehído
 - Acetato de metilo
 - alfa-Irona
 - Alil-alfa-ionona
 - Geranio de Bourbon
- 30 Isobutirato de 1,3-dimetilbut-3-enilo
 - Aceite de coñac, verde
 - Acetato de alfa-terpinilo
 - Aldehído p-terc-butil-alfa-metildihidrocinámico
 - alfa-Pineno
- 35 Octahidro-4,7-metano[3aH]indeno-3a-carboxilato de etilo
 - Cetona de almizcle

- Xilol de almizcle
- 4-Metil-3-decen-5-ol
- Oxima de 2,4,4,7-tetrametil-6,8-nonadien-3-ona
- Acetil-diisoamileno
- 5 3,5,6,6-Tetrametil-4-metilen-2-heptanol
- 2-Nonanona
- 2,4-Dimetil-4-feniltetrahidrofurano
- Escatol
- N-Metil-N-fenil-2-metilbutiramida
- 10 Ftalato de dietilo
- 3-Metildodecanonitrilo
- Isobutirato de isobornilo
- 2-Metoxibifenilo
- 2-Metilbutirato de metilo
- 15 Alil-mercaptano
- Salicilato de isoamilo
- Cariofileno
- p-Metoxibenzonitrilo
- Tetrahidrolinalool
- 20 L-Tartrato de dietilo
- Acetato de o-t-butilciclohexilo
- 2-Isopropilfenol
- Acetato de isopulegilo
- (-)-Isopulegol
- 25 Mentona
- Timol
- Salicilaldehído
- 1-Metilnaftaleno
- Acetato de triclorometil-fenil-carbinilo
- 30 2-Metilpentanoato de 2-metilpentilo
- Dimetil-acetal de 2-fenilpropionaldehído
- Naftaleno
- 2-Naftalentiol
- Cumarina
- 35 trans-Isoeugenil bencil éter
- trans-2-Hexen-1-ol
- cis-3-Hexen-1-ol

- Metil beta-naftil cetona
- 4-Alil-1,2-dimetoxibenceno
- beta-Naftil etil éter
- 2-Fenilpropionaldehído
- 5 Benzoato de metilo
- Nicotinato de metilo
- Benzoato de etilo
- Acetato de alfa-metilbencilo
- Tiglato de 1-etilhexilo
- 10 p-Anisato de etilo
- Benzoato de isoamilo
- Benzoato de geranilo
- Piperina
- Propenilguaetol
- 15 2-Hexil-2-ciclopenten-1-ona
- o-Cresol
- 2,5-Xilenol
- 2-(2-(4-Metil-3-ciclohexen-1-il)propil)ciclopentanona
- 2,3-Heptanodiona
- 20 Eugenol
- Isoeugenol
- Isobutirato de etilo
- Isobutirato de isobutilo
- Isobutirato de citronelilo
- 25 Alcohol tetrahidrofurfurílico
- alfa-Terpineol
- alcohol alfa-metilbencilico
- alfa-Felandreno
- gamma-Terpineno
- 30 alfa-Terpineno
- p-Cimeno
- Compuesto desconocido
- Forskolina
- Sulfuro de sodio hidratado
- 35 Metanotiolato de sodio
- 3-Mercapto-1-pentanol
- 3-Mercapto-2-metil-1-butanol

- 3-mercapto-3-metil-1-hexanol
- Trimetilamina HCL
- putrescina
- cadaverina
- 5 morfolina
- 4-Metilmorfolina
- Urea
- Androstadienol
- geovortol
- 10 metilgeosmina
- 1,3,5-tricloro-2-metoxibenceno
- N-etil-pirrol
- 2,3,5-trimetil-piridina
- hidróxido de amonio
- 15 1-ciclohexiletanol
- acetato de 1-ciclohexiletilo
- butirato de 1-ciclohexiletilo
- propionato de 1-ciclohexiletilo
- Agarbois
- 20 Anapear
- Anjeruk
- Azurona
- Belambre
- Camonal
- 25 salicilato de cis-3-hexenilo
- Cosmone
- Dihidrofarnesal
- Acetato de dihidromircenilo
- Monofenoxiacetato de etilenglicol
- 30 Florymoss
- Geogywood
- Heliotropina
- Nirvanolide
- Opalal
- 35 paradisamida
- laurel de California
- Faraona

- rositol
- Serenolide
- (E)-6-etil-3-metil-oct-6-en-1-ol
- Tanaisone
- 5 Tonkarose
- Ultravanil
- undecanol
- yara yara
- 1,3-dimetilciclohexano-1-carboxilato de metilo
- 10 1,4-dimetilciclohexano-1-carboxilato de metilo
- undec-10-enonitrilo
- (9Z)-undec-9-enonitrilo
- (9E)-undec-9-enonitrilo
- 1-{espiro[4,5]dec-7-en-7-il}pent-4-en-1-ona
- 15 1-{espiro[4,5]dec-7-en-7-il}pent-4-en-1-ona
- decenilacetato de triciclo
- Propionato de triciclodecenilo
- 2-etil-3,5-dimetil-pirazina
- 2-etil-3,6-dimetil-pirazina
- 20 Tetrahidro-4-metil-2-(2-metil-1-propenil)-(2H)pirano
- Helional
- 6-etil-3-metil-oct-5-en-1-ol
- Galaxolide
- Ambrettolide
- 25 Habanolide
- Muscenona
- Traseolide
- Moxalona
- Florhydral
- 30 Furnisal
- Polysantol
- Ebanol
- Javanol
- Marenil
- 35 Indoclear
- Pivacicleno
- Neocaspireno

- Herbanate
- Metil-laitona
- Etil-laitona
- Cetal ámbar
- 5 Ambermax (compuesto 1)
- Ambermax (compuesto 2)
- Ambrocenide
- Metambrate
- Spirambrene
- 10 1-(3,3-dimetilciclohex-1-en-1-il)pent-4-en-1-ona
- 1-(5,5-dimetilciclohex-1-en-1-il)pent-4-en-1-ona
- Reseda Body
- Ligustral
- Verdoracine
- 15 Vethymine
- Alicate
- Undeceno-2-nitrilo
- Methyl diantilis
- Toscanol
- 20 Safraleine
- Levistamel
- Dihidroisozajmonato
- Carvacrol
- Nitrilo violeta
- 25 4-metiliden-2-feniloxano
- 4-metil-2-fenil-3,6-dihidro-2H-pirano
- Pelargene
- Dispirone
- Gyrane
- 30 Glycolierral
- Gardocyclene
- Felvinone
- Azarbre
- PTBCHA de alto contenido en cis
- 35 Isobutilquinoleno
- Tetrahidronaftol
- Epizajmonato de metilo

- 1(R)-2(S)-epijazmonato de metilo
 4-ciclohexil-2-metilbutan-2-ol
 2-(Metilamino)benzoato de metilo
 2-[2-(3,3,5-trimetilciclohexil)acetil]ciclopentan-1-ona
- 5 Acetato de [4-(4-metilpent-3-en-1-il)ciclohex-3-en-1-il]metilo
 NEROLIONE
 1-{10,10-dimetil-2,6-dimetilidenbiciclo[7.2.0]undecan-5-il}etan-1-ona
 1-(4-terc-butilfenil)-3-(4-metoxifenil)propano-1,3-diona
 2-[(E)-(7-hidroxi-3,7-dimetiloctiliden)amino]benzoato de metilo
- 10 2-(2-metilfenil)etan-1-ol
 2-hidroxibenzoato de 2-feniletilo
 4-(2H-1,3-benzodioxol-5-il)butan-2-ona
 (8E)-1,5,9-trimetil-13-oxabicyclo[10.1.0]trideca-4,8-dieno
 2-etoxi-4-[(propan-2-iloxi)metil]fenol
- 15 3,4'-dimetilespiro[oxirano-2,9'-tricyclo[6.2.1.0^{2,7}]undecan]-4'-eno
 3,4'-dimetilespiro[oxirano-2,9'-tricyclo[6.2.1.0^{2,7}]undecan]-4'-eno
 3,4'-dimetilespiro[oxirano-2,9'-tricyclo[6.2.1.0^{2,7}]undecan]-4'-eno
 (9E)-9-etiliden-3-oxatriciclo[6.2.1.0^{2,7}]undecano
 2,4,4,7-tetrametiloct-6-en-3-ona
- 20 2-Hidroxibenzoato de ciclohexilo
 (6E)-3,7-dimetilnona-1,6-dien-3-ol
 Acetato de (6Z)-3,7-dimetilnona-1,6-dien-3-ilo
 2-hidroxibenzoato de etilo
 1-(3,3-dimetilciclohexil)pent-4-en-1-ona
- 25 2-metil-5-fenilpentan-1-ol
 9-metoxitriciclo[5.2.1.0^{2,6}]decano-3-carbaldehído
 8-metoxitriciclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-3-eno
 2-[[[(1E)-3-(4-terc-butilfenil)-2-metilprop-1-en-1-il]amino]benzoato de metilo
 1,4a-dimetil-7-(propan-2-il)-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,8,10,10a-dodecahidrofenanthreno-1-carboxilato de metilo
- 30 1-metil-4-(4-metilpentil)ciclohex-3-eno-1-carbaldehído
 metilcarbonato de (4Z)-ciclooct-4-en-1-ilo
 2-[[[(1E)-2-(2H-1,3-benzodioxol-5-il)metil]prop-1-en-1-il]amino]benzoato de metilo
 2-metildodecanal
 4,4,8-trimetiltricyclo[6.3.1.0^{2,5}]dodecan-1-ol
- 35 2H,4H,4aH,5H,9bh-indeno[1,2-d][1,3]dioxina
 8,8-bis(1H-indol-3-il)-2,6-dimetiloctan-2-ol
 2-fenilbutanoato de etilo

(1E)-1-(2,6,6-trimetilciclohex-2-en-1-il)pent-1-en-3-ona

propanoato de 3,5,5-trimetilhexilo

2-hidroxibenzoato de 2-metilpropilo de metilo

2,4,6-trimetilciclohex-3-eno-1-carbaldehído

5 3-(4-etilfenil)-2,2-dimetilpropanonitrilo

8-(propan-2-il)-1-oxaespíro[4.5]decan-2-ona

2-(5-etenil-5-metiloxolan-2-il)propan-2-ol

2,4-dimetil-2H,4H,4aH,5H,9bH-indeno[1,2-d][1,3]dioxina

propanoato de 1-[1-(3,3-dimetilciclohexil)etoxi]-2-metilpropan-2-ilo

10 propanoato de 2-[1-(3,3-dimetilciclohexil)etoxi]-2-metilpropilo

(3aR,5aS,9aS,9bS)-3a,6,6,9a-tetrametil-2,4,5,5a,7,8,9,9b-octahidro-1H-benzo[e]benzofurano

Lista de secuencias

<110> CHEMCOM S.A.

<120> Receptores olfativos implicados en la percepción de ácidos carboxílicos del sudor y uso de los mismos

15 <130> CHEMC-008PCT

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 990

20 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 655 840 T3

atgactttgg tttctttttt ctctttcctc tccaagccat tgataatgct ccttagcaat 60
tcaagctgga ggctatccca gccttctttt ctctctggtag ggattccagg ttttagaggaa 120
agccagcact ggattgcact gccctgggc atcctttacc tccttgcttt agtgggcaat 180
gttaccattc tcttcatcat ctggatggac ccatccttgc accaatctat gtacctcttc 240
ctgtccatgc tagctgccat cgacctggtt ctggcctcct cactgcacc caaagccctt 300
gcagtgctcc tggttcatgc ccacgagatt gggtagatcg tctgcctgat ccagatgttc 360
ttcatccatg cattctcctc catggagtta ggggtacttg tggccatggc tctggattgc 420
tatgtagcca tttgtcacc cttgcacccat tccacaatcc tgcattccagg ggtcataggg 480
cgcatcggaa tgggtggtgct ggtgagggga ttactactcc ttatcccctt cccattttg 540
ttgggaacac ttatcttctg ccaagccacc atcataggcc atgcctattg tgaacatatg 600
gctgttgatga aacttgcctg ctcaaaaacc acagtcaatc gagcttatgg gctgactatg 660
gccttgcttg tgattgggct ggatgttctg gccattggtg tttcctatgc ccacatcctc 720
caggcagtgc tgaaggtacc agggagtgag gcccgactta aggcgtttag cacatgtggc 780
tctcatatth gtgtcatcct ggtcttctat gtccttgga ttttctcctt cctcactcac 840
cgctttggtc atcatgtacc ccatcatgtc catgttcttc tggccacacg gtatctcctc 900
atgccacctg cgctcaatcc tcttgtctat ggagtgaaga ctacagcagat ccgccagcga 960
gtgctcagag tgtttacaca aaaggattaa 990

<210> 2

<211> 329

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Thr Leu Val Ser Phe Phe Ser Phe Leu Ser Lys Pro Leu Ile Met
1 5 10 15

ES 2 655 840 T3

Leu Leu Ser Asn Ser Ser Trp Arg Leu Ser Gln Pro Ser Phe Leu Leu
 20 25 30
 Val Gly Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ser Gln His Trp Ile Ala Leu Pro
 35 40 45
 Leu Gly Ile Leu Tyr Leu Leu Ala Leu Val Gly Asn Val Thr Ile Leu
 50 55 60
 Phe Ile Ile Trp Met Asp Pro Ser Leu His Gln Ser Met Tyr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Ser Met Leu Ala Ala Ile Asp Leu Val Leu Ala Ser Ser Thr Ala
 85 90 95
 Pro Lys Ala Leu Ala Val Leu Leu Val His Ala His Glu Ile Gly Tyr
 100 105 110
 Ile Val Cys Leu Ile Gln Met Phe Phe Ile His Ala Phe Ser Ser Met
 115 120 125
 Glu Leu Gly Val Leu Val Ala Met Ala Leu Asp Cys Tyr Val Ala Ile
 130 135 140
 Cys His Pro Leu His His Ser Thr Ile Leu His Pro Gly Val Ile Gly
 145 150 155 160
 Arg Ile Gly Met Val Val Leu Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Ile Pro
 165 170 175
 Phe Pro Ile Leu Leu Gly Thr Leu Ile Phe Cys Gln Ala Thr Ile Ile
 180 185 190
 Gly His Ala Tyr Cys Glu His Met Ala Val Val Lys Leu Ala Cys Ser
 195 200 205
 Glu Thr Thr Val Asn Arg Ala Tyr Gly Leu Thr Met Ala Leu Leu Val
 210 215 220
 Ile Gly Leu Asp Val Leu Ala Ile Gly Val Ser Tyr Ala His Ile Leu
 225 230 235 240
 Gln Ala Val Leu Lys Val Pro Gly Ser Glu Ala Arg Leu Lys Ala Phe
 245 250 255
 Ser Thr Cys Gly Ser His Ile Cys Val Ile Leu Val Phe Tyr Val Pro

ES 2 655 840 T3

260

265

270

Gly Ile Phe Ser Phe Leu Thr His Arg Phe Gly His His Val Pro His
 275 280 285

His Val His Val Leu Leu Ala Thr Arg Tyr Leu Leu Met Pro Pro Ala
 290 295 300

Leu Asn Pro Leu Val Tyr Gly Val Lys Thr Gln Gln Ile Arg Gln Arg
 305 310 315 320

Val Leu Arg Val Phe Thr Gln Lys Asp
 325

<210> 3

<211> 954

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

atggcaggaa gaatgtctac gtctaatacac acccagttcc atccttcttc attcctactg 60
 ctgggtatcc cagggctaga agatgtgcac atttggattg gtgtcccttt tttctttgtg 120
 tatcttgttg cactcctggg aaacactgct ctcttgtttg tgatccagac tgagcagagt 180
 ctccatgagc ctatgtacta cttcctggcc atgttggatt ccattgacct gggcttgtct 240
 acagccacca tccccaaaat gttgggcatc ttctggttca ataccaaaga aatatctttt 300
 ggaggctgcc tttctcacat gttcttcatc catttcttca ctgctatgga gagcattgtg 360
 ttggtggcca tggcctttga ccgctacatt gccatttgca aacctcttcg gtacaccatg 420
 atcctcacca gcaaaatcat cagcctcatt gcaggcattg ctgtcctgag gagcctgtac 480
 atggttgttc cactgggtgtt tctccttctg aggctgccct tctgtgggca tcgtatcatc 540
 cctcactactt attgtgagca catgggcatt gccctctgag cctgtgccag catcaaagtc 600
 aacattaggt ttggccttgg caacatatct ctcttgttac tggatgttat ccttattatt 660
 ctctcctatg tcaggatcct gtatgctgtc ttctgcctgc cctcctggga agctcgactc 720
 aaagctctca acacctgtgg ttctcatatt ggtgttatct tagccttttt tacaccagca 780
 tttttttcat tcttgacaca tcgttttggc cataatatcc cacagtatat acatattata 840
 ttagccaacc tgtatgtggt tgtcccacca gccctcaatc ctgtaatcta tggagtcagg 900
 acaaagcaga ttcgagagag agtgctgagg atttttctca agaccaatca ctaa 954

<210> 4

<211> 317

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

ES 2 655 840 T3

Met Ala Gly Arg Met Ser Thr Ser Asn His Thr Gln Phe His Pro Ser
 1 5 10 15

Ser Phe Leu Leu Leu Gly Ile Pro Gly Leu Glu Asp Val His Ile Trp
 20 25 30

Ile Gly Val Pro Phe Phe Phe Val Tyr Leu Val Ala Leu Leu Gly Asn
 35 40 45

Thr Ala Leu Leu Phe Val Ile Gln Thr Glu Gln Ser Leu His Glu Pro
 50 55 60

Met Tyr Tyr Phe Leu Ala Met Leu Asp Ser Ile Asp Leu Gly Leu Ser
 65 70 75 80

Thr Ala Thr Ile Pro Lys Met Leu Gly Ile Phe Trp Phe Asn Thr Lys
 85 90 95

Glu Ile Ser Phe Gly Gly Cys Leu Ser His Met Phe Phe Ile His Phe
 100 105 110

Phe Thr Ala Met Glu Ser Ile Val Leu Val Ala Met Ala Phe Asp Arg
 115 120 125

Tyr Ile Ala Ile Cys Lys Pro Leu Arg Tyr Thr Met Ile Leu Thr Ser
 130 135 140

Lys Ile Ile Ser Leu Ile Ala Gly Ile Ala Val Leu Arg Ser Leu Tyr
 145 150 155 160

Met Val Val Pro Leu Val Phe Leu Leu Leu Arg Leu Pro Phe Cys Gly
 165 170 175

His Arg Ile Ile Pro His Thr Tyr Cys Glu His Met Gly Ile Ala Arg
 180 185 190

Leu Ala Cys Ala Ser Ile Lys Val Asn Ile Arg Phe Gly Leu Gly Asn
 195 200 205

Ile Ser Leu Leu Leu Leu Asp Val Ile Leu Ile Ile Leu Ser Tyr Val
 210 215 220

Arg Ile Leu Tyr Ala Val Phe Cys Leu Pro Ser Trp Glu Ala Arg Leu
 225 230 235 240

Lys Ala Leu Asn Thr Cys Gly Ser His Ile Gly Val Ile Leu Ala Phe

ES 2 655 840 T3

245

250

255

Phe Thr Pro Ala Phe Phe Ser Phe Leu Thr His Arg Phe Gly His Asn
260 265 270

Ile Pro Gln Tyr Ile His Ile Ile Leu Ala Asn Leu Tyr Val Val Val
275 280 285

Pro Pro Ala Leu Asn Pro Val Ile Tyr Gly Val Arg Thr Lys Gln Ile
290 295 300

Arg Glu Arg Val Leu Arg Ile Phe Leu Lys Thr Asn His
305 310 315

<210> 5

<211> 972

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

atgagtcaca ccaatgttac catcttccat cctgcagttt ttgtccttcc tggcatccct 60
gggttggagg cttatcacat ttggctgtca atacctcttt gcctcattta catcactgca 120
gtcctgggaa acagcatcct gatagtgggtt attgtcatgg aacgtaacct tcatgtgccc 180
atgtatttct tcctctcaat gctggccgtc atggacatcc tgctgtctac caccactgtg 240
cccaaggccc tagccatctt ttggcttcaa gcacataaca ttgcttttga tgctgtgtgc 300
acccaaggct tctttgtcca tatgatgttt gtgggggagt cagctatcct gttagccatg 360
gcctttgatc gctttgtggc catttgtgcc cactgagat atacaacagt gctaacatgg 420
cctgttgtgg ggaggattgc tctggccgtc atcacccgaa gcttctgcat catcttccca 480
gtcatattct tgctgaagcg gctgcccttc tgcctaacca acattgttcc tctactctac 540
tgtgagcata ttggagtggc tcgtttagcc tgtgctgaca tctactgtaa catttgggat 600
ggcttctcag tgcccattgt catggtcatc ttggatgta tcctcatcgc tgtgtcttac 660
tactgatcc tccgagcagt gtttcgtttg ccctcccagg atgctcggca caaggccctc 720
agcacttgtg gctcccacct ctgtgtcatc cttatgtttt atgttccatc cttctttacc 780
ttattgacct atcatttttg gcgtaaatatt cctcaacatg tccatatctt gctggccaat 840
ctttatgtgg cagtgccacc aatgctgaac ccattgtct atgggtgtgaa gactaagcag 900
atacgtgagg gtgtagccca ccggttcttt gacatcaaga ctgggtgctg tacctcccct 960
ctgggctcat aa 972

<210> 6

<211> 323

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

ES 2 655 840 T3

Met Ser His Thr Asn Val Thr Ile Phe His Pro Ala Val Phe Val Leu
1 5 10 15

Pro Gly Ile Pro Gly Leu Glu Ala Tyr His Ile Trp Leu Ser Ile Pro
20 25 30

Leu Cys Leu Ile Tyr Ile Thr Ala Val Leu Gly Asn Ser Ile Leu Ile
35 40 45

Val Val Ile Val Met Glu Arg Asn Leu His Val Pro Met Tyr Phe Phe
50 55 60

Leu Ser Met Leu Ala Val Met Asp Ile Leu Leu Ser Thr Thr Thr Val
65 70 75 80

Pro Lys Ala Leu Ala Ile Phe Trp Leu Gln Ala His Asn Ile Ala Phe
85 90 95

Asp Ala Cys Val Thr Gln Gly Phe Phe Val His Met Met Phe Val Gly
100 105 110

Glu Ser Ala Ile Leu Leu Ala Met Ala Phe Asp Arg Phe Val Ala Ile
115 120 125

Cys Ala Pro Leu Arg Tyr Thr Thr Val Leu Thr Trp Pro Val Val Gly
130 135 140

Arg Ile Ala Leu Ala Val Ile Thr Arg Ser Phe Cys Ile Ile Phe Pro
145 150 155 160

Val Ile Phe Leu Leu Lys Arg Leu Pro Phe Cys Leu Thr Asn Ile Val
165 170 175

Pro His Ser Tyr Cys Glu His Ile Gly Val Ala Arg Leu Ala Cys Ala
180 185 190

Asp Ile Thr Val Asn Ile Trp Tyr Gly Phe Ser Val Pro Ile Val Met
195 200 205

Val Ile Leu Asp Val Ile Leu Ile Ala Val Ser Tyr Ser Leu Ile Leu
210 215 220

Arg Ala Val Phe Arg Leu Pro Ser Gln Asp Ala Arg His Lys Ala Leu
225 230 235 240

ES 2 655 840 T3

Ser Thr Cys Gly Ser His Leu Cys Val Ile Leu Met Phe Tyr Val Pro
 245 250 255

Ser Phe Phe Thr Leu Leu Thr His His Phe Gly Arg Asn Ile Pro Gln
 260 265 270

His Val His Ile Leu Leu Ala Asn Leu Tyr Val Ala Val Pro Pro Met
 275 280 285

Leu Asn Pro Ile Val Tyr Gly Val Lys Thr Lys Gln Ile Arg Glu Gly
 290 295 300

Val Ala His Arg Phe Phe Asp Ile Lys Thr Trp Cys Cys Thr Ser Pro
 305 310 315 320

Leu Gly Ser

<210> 7

<211> 939

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

atgggggttg tcaatgtcac tcaccctgca ttcttctctc tgactggtat ccctgggtctg 60
 gagagctctc actcctggct gtcagggccc ctctgctgga tgtatgctgt ggccttggg 120
 ggaaatacag tgatcctgca ggctgtgca gtggagcca gcctccatga gccatgtac 180
 tacttctgt ccatgttgct cttcagtgat gtggccatat ccatggccac actgcccact 240
 gtactccgaa ctttctgcct caatgcccgc aacatcactt ttgatgcctg tctaattcag 300
 atgtttctta ttcacttctt ctccatgatg gaatcaggta ttctgctggc catgagtttt 360
 gaccgctatg tggccatttg tgacccttg cgctatgcag ctgtgctcac cactgaagtc 420
 attgctgcaa tgggtttagg tgcagctgct cgaagcttca tcaccctttt ccctcttccc 480
 tttcttatta agaggctgcc tatctgcaga tccaatgttc tttctcactc ctactgcctg 540
 caccagaca tgatgaggct tgcctgtgct gatatcagta tcaacagcat ctatggactc 600
 tttgttcttg tatccacctt tggcatggac ctgtttttta tcttctctc ctatgtgctc 660
 attctgcggt ctgtcatggc cactgcttcc cgtgaggaa gcctcaaagc tctcaacaca 720
 tgtgtgtcac atatacctggc tgtacttgca ttttatgtgc caatgattgg ggtctccaca 780
 gtgcaccgct ttgggaagca tgtcccagtc tacatacatg tcctcatgctc aatgtgtac 840
 ctatttgtgc ctctgtgct caaccctctc atttatagcg ccaagacaaa ggaaatccgc 900
 cgagccattt tccgcatggt tcaccacatc aaaatatga 939

<210> 8

<211> 312

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 8

ES 2 655 840 T3

Met Gly Leu Phe Asn Val Thr His Pro Ala Phe Phe Leu Leu Thr Gly
 1 5 10 15

Ile Pro Gly Leu Glu Ser Ser His Ser Trp Leu Ser Gly Pro Leu Cys
 20 25 30

Val Met Tyr Ala Val Ala Leu Gly Gly Asn Thr Val Ile Leu Gln Ala
 35 40 45

Val Arg Val Glu Pro Ser Leu His Glu Pro Met Tyr Tyr Phe Leu Ser
 50 55 60

Met Leu Ser Phe Ser Asp Val Ala Ile Ser Met Ala Thr Leu Pro Thr
 65 70 75 80

Val Leu Arg Thr Phe Cys Leu Asn Ala Arg Asn Ile Thr Phe Asp Ala
 85 90 95

Cys Leu Ile Gln Met Phe Leu Ile His Phe Phe Ser Met Met Glu Ser
 100 105 110

Gly Ile Leu Leu Ala Met Ser Phe Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Asp
 115 120 125

Pro Leu Arg Tyr Ala Ala Val Leu Thr Thr Glu Val Ile Ala Ala Met
 130 135 140

Gly Leu Gly Ala Ala Ala Arg Ser Phe Ile Thr Leu Phe Pro Leu Pro
 145 150 155 160

Phe Leu Ile Lys Arg Leu Pro Ile Cys Arg Ser Asn Val Leu Ser His
 165 170 175

Ser Tyr Cys Leu His Pro Asp Met Met Arg Leu Ala Cys Ala Asp Ile
 180 185 190

Ser Ile Asn Ser Ile Tyr Gly Leu Phe Val Leu Val Ser Thr Phe Gly
 195 200 205

Met Asp Leu Phe Phe Ile Phe Leu Ser Tyr Val Leu Ile Leu Arg Ser
 210 215 220

ES 2 655 840 T3

Val Met Ala Thr Ala Ser Arg Glu Glu Arg Leu Lys Ala Leu Asn Thr
 225 230 235 240

Cys Val Ser His Ile Leu Ala Val Leu Ala Phe Tyr Val Pro Met Ile
 245 250 255

Gly Val Ser Thr Val His Arg Phe Gly Lys His Val Pro Cys Tyr Ile
 260 265 270

His Val Leu Met Ser Asn Val Tyr Leu Phe Val Pro Pro Val Leu Asn
 275 280 285

Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Lys Thr Lys Glu Ile Arg Arg Ala Ile Phe
 290 295 300

Arg Met Phe His His Ile Lys Ile
 305 310

<210> 9

<211> 927

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

atgaatacca ctctatattca tccttactct ttccttcttc tgggaattcc tgggctggaa 60
 agtatgcac tctgggttgg ttttccttcc tttgctgtgt tcctgacagc tgtccttggg 120
 aatatcacca tcctttttgt gattcagact gacagtagtc tccatcatcc catgttctac 180
 ttctggcca ttctgtcatc tattgaccgg ggctgtcta catccacat ccctaaaatg 240
 cttggcacct tctggtttac cctgagagaa atctcctttg aaggatgcct taccagatg 300
 ttcttcatcc acctgtgcac tggcatggaa tcagctgtgc ttgtggccat ggcctatgat 360
 tgctatgtgg ccatctgtga ccctctttgc tacacgttgg tgctgacaaa caaggtggtg 420
 tcagttatgg cactggccat ctttctgaga cccttagtct ttgtcatacc ctttgttcta 480
 tttatcctaa ggcttccatt ttgtggacac caaattattc ctcatactta cggtgagcac 540
 atgggcattg cccgcctgtc ttgtgccagc atcaggggta acatcatcta tggcttatgt 600
 gccatctcta tcctggctct tgacatcata gcaattgtca tttcctatgt acagatcctt 660
 tgtgctgtat ttctactctc ttcacatgat gcacgactca aggcattcag cacctgtggc 720
 tctcatgtgt gtgtcatgtt gactttctat atgcctgcat tgttctcatt catgacccat 780
 aggtttggtc ggaatatacc tcactttatc cacattcttc tggctaattt ctgtgtagtc 840
 attccacctg ctctcaactc tgtaatttat ggtgtcagaa ccaaacagat tagagcacia 900
 gtgctgaaaa tgtttttcaa taaataa 927

<210> 10

<211> 308

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 10

ES 2 655 840 T3

Met Asn Thr Thr Leu Phe His Pro Tyr Ser Phe Leu Leu Leu Gly Ile
 1 5 10 15

Pro Gly Leu Glu Ser Met His Leu Trp Val Gly Phe Pro Phe Phe Ala
 20 25 30

Val Phe Leu Thr Ala Val Leu Gly Asn Ile Thr Ile Leu Phe Val Ile
 35 40 45

Gln Thr Asp Ser Ser Leu His His Pro Met Phe Tyr Phe Leu Ala Ile
 50 55 60

Leu Ser Ser Ile Asp Pro Gly Leu Ser Thr Ser Thr Ile Pro Lys Met
 65 70 75 80

Leu Gly Thr Phe Trp Phe Thr Leu Arg Glu Ile Ser Phe Glu Gly Cys
 85 90 95

Leu Thr Gln Met Phe Phe Ile His Leu Cys Thr Gly Met Glu Ser Ala
 100 105 110

Val Leu Val Ala Met Ala Tyr Asp Cys Tyr Val Ala Ile Cys Asp Pro
 115 120 125

Leu Cys Tyr Thr Leu Val Leu Thr Asn Lys Val Val Ser Val Met Ala
 130 135 140

Leu Ala Ile Phe Leu Arg Pro Leu Val Phe Val Ile Pro Phe Val Leu
 145 150 155 160

Phe Ile Leu Arg Leu Pro Phe Cys Gly His Gln Ile Ile Pro His Thr
 165 170 175

Tyr Gly Glu His Met Gly Ile Ala Arg Leu Ser Cys Ala Ser Ile Arg
 180 185 190

Val Asn Ile Ile Tyr Gly Leu Cys Ala Ile Ser Ile Leu Val Phe Asp
 195 200 205

Ile Ile Ala Ile Val Ile Ser Tyr Val Gln Ile Leu Cys Ala Val Phe
 210 215 220

ES 2 655 840 T3

Leu Leu Ser Ser His Asp Ala Arg Leu Lys Ala Phe Ser Thr Cys Gly
225 230 235 240

Ser His Val Cys Val Met Leu Thr Phe Tyr Met Pro Ala Leu Phe Ser
245 250 255

Phe Met Thr His Arg Phe Gly Arg Asn Ile Pro His Phe Ile His Ile
260 265 270

Leu Leu Ala Asn Phe Cys Val Val Ile Pro Pro Ala Leu Asn Ser Val
275 280 285

Ile Tyr Gly Val Arg Thr Lys Gln Ile Arg Ala Gln Val Leu Lys Met
290 295 300

Phe Phe Asn Lys
305

<210> 11

<211> 945

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

ES 2 655 840 T3

atgccgacat tcaatggctc agtcttcatg ccctctgcgt ttataactaat tgggattcct 60
 ggtctggagt cagtgcagtg ttggattggg attcctttct ctgccatgta tcttattggg 120
 gtgattggaa attccctaatt tttagttata atcaaatatg aaaacagcct ccatataccc 180
 atgtacattt ttttggccat gttggcagcc acagacattg cacttaacac ctgcattcct 240
 cccaaaatgt taggcatcct ctggtttcat ttgccagaga tttcttttga tgcctgtcct 300
 tttcaaagt ggcttattca ctcatccag gcaattgaat cgggtatcct tctggcaatg 360
 gccctggatc gctatgtggc catctgtatc cccttgagac atgccacat cttttcccag 420
 cagttcttaa ctcatattgg acttggggtg aactcaggg ctgccattct tataatacct 480
 tccttagggc tcatcaaagt ctgtctgaaa cactatcgaa ctacagtcac ctctcactct 540
 tactgtgagc acatggccat cgtgaagctg gctactgaag atatccgagt caacaagata 600
 tatggcctat ttgttgctt tgcaatccta gggtttgaca taatatttat aaccttgtcc 660
 tatgtccaaa tttttatcac tgtctttcag ctgccccaga aggaggcacg attcaaggcc 720
 ttaatacat gcattgcca catttgtgtc ttctacagt tctaccttct tgccttcttc 780
 tctttcttca cacacaggtt tggttcacac ataccacat atattcatat cctcttgtca 840
 aatctttacc tgttagtccc accttttctc aaccctattg tctatggagt gaagaccaag 900
 caaatcgtg accatattgt gaaagtgtt ttcttcaaaa agtaa 945

<210> 12

<211> 314

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

ES 2 655 840 T3

Met Pro Thr Phe Asn Gly Ser Val Phe Met Pro Ser Ala Phe Ile Leu
 1 5 10 15

Ile Gly Ile Pro Gly Leu Glu Ser Val Gln Cys Trp Ile Gly Ile Pro
 20 25 30

Phe Ser Ala Met Tyr Leu Ile Gly Val Ile Gly Asn Ser Leu Ile Leu
 35 40 45

Val Ile Ile Lys Tyr Glu Asn Ser Leu His Ile Pro Met Tyr Ile Phe
 50 55 60

Leu Ala Met Leu Ala Ala Thr Asp Ile Ala Leu Asn Thr Cys Ile Leu
 65 70 75 80

Pro Lys Met Leu Gly Ile Phe Trp Phe His Leu Pro Glu Ile Ser Phe
 85 90 95

Asp Ala Cys Leu Phe Gln Met Trp Leu Ile His Ser Phe Gln Ala Ile
 100 105 110

Glu Ser Gly Ile Leu Leu Ala Met Ala Leu Asp Arg Tyr Val Ala Ile
 115 120 125

Cys Ile Pro Leu Arg His Ala Thr Ile Phe Ser Gln Gln Phe Leu Thr
 130 135 140

His Ile Gly Leu Gly Val Thr Leu Arg Ala Ala Ile Leu Ile Ile Pro
 145 150 155 160

Ser Leu Gly Leu Ile Lys Cys Cys Leu Lys His Tyr Arg Thr Thr Val
 165 170 175

Ile Ser His Ser Tyr Cys Glu His Met Ala Ile Val Lys Leu Ala Thr
 180 185 190

Glu Asp Ile Arg Val Asn Lys Ile Tyr Gly Leu Phe Val Ala Phe Ala
 195 200 205

Ile Leu Gly Phe Asp Ile Ile Phe Ile Thr Leu Ser Tyr Val Gln Ile
 210 215 220

ES 2 655 840 T3

Phe Ile Thr Val Phe Gln Leu Pro Gln Lys Glu Ala Arg Phe Lys Ala
225 230 235 240

Phe Asn Thr Cys Ile Ala His Ile Cys Val Phe Leu Gln Phe Tyr Leu
245 250 255

Leu Ala Phe Phe Ser Phe Phe Thr His Arg Phe Gly Ser His Ile Pro
260 265 270

Pro Tyr Ile His Ile Leu Leu Ser Asn Leu Tyr Leu Leu Val Pro Pro
275 280 285

Phe Leu Asn Pro Ile Val Tyr Gly Val Lys Thr Lys Gln Ile Arg Asp
290 295 300

His Ile Val Lys Val Phe Phe Phe Lys Lys
305 310

<210> 13

<211> 942

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

ES 2 655 840 T3

atgacattac ccagcaacaa ctccacttcc ccagtctttg aattcttcct catttgtttc 60
 cccagtttcc agagctggca gcactggctg tctctgcccc tcagcctcct cttcctcctg 120
 gccatggggg ccaatgccac ctttctgatc accatctatc tggaagcctc tctgcaccag 180
 cccctgtact acctgctcag cctcctctcc ctgctggaca tcgtactctg cctcacctgc 240
 atccccaagg tcctggccat cttctggttt gacctcagat caatcagctt ccctgcctgc 300
 ttccttcaga tgttcatcat gaacagtttt ctgactatgg agtcctgcac attcatgatc 360
 atggcctatg accgctatgt ggccatctgc aagcccctac agtactcatc catcatcact 420
 gatcaatttg ttgctagggc tgccatcttt gttgtggcca ggaatggcct tcttactatg 480
 cctatcccca tactttcttc tcgactcaga tactgtgcag gacacatcat caagaactgc 540
 atctgtacta acgtgtctgt gtctaaactc tcttgtgatg acatcacctt gaatcagagc 600
 taccagtttg ttataggttg gaccctgctg ggctctgacc tcatecttat tgttctctct 660
 tactttttta tcttgaaaac tgtgctaagg attaaggtg agggagatat ggccaaagct 720
 ctaggtactt gtggttccca cttcatcctc atcctcttct tcaccacagt cctgctggtt 780
 ctggtcatca ctaacctggc caggaagaga attcctccgg atgtcccat cctgctcaac 840
 atcctgcacc accttattcc cccagctctg aacccattg tttatggtgt gagaaccaag 900
 gagatcaagc agggaatcca gaacctgctg aagaggttgt aa 942

<210> 14

<211> 313

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

ES 2 655 840 T3

Met Thr Leu Pro Ser Asn Asn Ser Thr Ser Pro Val Phe Glu Phe Phe
 1 5 10 15

Leu Ile Cys Phe Pro Ser Phe Gln Ser Trp Gln His Trp Leu Ser Leu
 20 25 30

Pro Leu Ser Leu Leu Phe Leu Leu Ala Met Gly Ala Asn Ala Thr Leu
 35 40 45

Leu Ile Thr Ile Tyr Leu Glu Ala Ser Leu His Gln Pro Leu Tyr Tyr
 50 55 60

Leu Leu Ser Leu Leu Ser Leu Leu Asp Ile Val Leu Cys Leu Thr Val
 65 70 75 80

Ile Pro Lys Val Leu Ala Ile Phe Trp Phe Asp Leu Arg Ser Ile Ser
 85 90 95

Phe Pro Ala Cys Phe Leu Gln Met Phe Ile Met Asn Ser Phe Leu Thr
 100 105 110

Met Glu Ser Cys Thr Phe Met Ile Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Val Ala
 115 120 125

Ile Cys Lys Pro Leu Gln Tyr Ser Ser Ile Ile Thr Asp Gln Phe Val
 130 135 140

Ala Arg Ala Ala Ile Phe Val Val Ala Arg Asn Gly Leu Leu Thr Met
 145 150 155 160

Pro Ile Pro Ile Leu Ser Ser Arg Leu Arg Tyr Cys Ala Gly His Ile
 165 170 175

Ile Lys Asn Cys Ile Cys Thr Asn Val Ser Val Ser Lys Leu Ser Cys
 180 185 190

Asp Asp Ile Thr Leu Asn Gln Ser Tyr Gln Phe Val Ile Gly Trp Thr
 195 200 205

Leu Leu Gly Ser Asp Leu Ile Leu Ile Val Leu Ser Tyr Phe Phe Ile
 210 215 220

ES 2 655 840 T3

Leu Lys Thr Val Leu Arg Ile Lys Gly Glu Gly Asp Met Ala Lys Ala
 225 230 235 240

Leu Gly Thr Cys Gly Ser His Phe Ile Leu Ile Leu Phe Phe Thr Thr
 245 250 255

Val Leu Leu Val Leu Val Ile Thr Asn Leu Ala Arg Lys Arg Ile Pro
 260 265 270

Pro Asp Val Pro Ile Leu Leu Asn Ile Leu His His Leu Ile Pro Pro
 275 280 285

Ala Leu Asn Pro Ile Val Tyr Gly Val Arg Thr Lys Glu Ile Lys Gln
 290 295 300

Gly Ile Gln Asn Leu Leu Lys Arg Leu
 305 310

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Synthetic

<400> 15

Phe Lys Lys Ser Phe Lys Leu
 1 5

<210> 16

<211> 13

10 <212> PRT

<213> Synthetic

<400> 16

Arg Arg Leu Ile Glu Asp Ala Glu Tyr Ala Ala Arg Gly
 1 5 10

<210> 17

15 <211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 17

Phe Ile Leu Leu Gly
 1 5

20 <210> 18

<211> 6

<212> PRT

ES 2 655 840 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Leu His Thr Pro Met Tyr
1 5

<210> 19

5 <211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 19

Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys
1 5 10

10 <210> 20

<211> 2

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 20

Ser Tyr
1

15

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 21

Phe Ser Thr Cys Ser Ser His
1 5

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 22

Pro Met Leu Asn Pro Phe
1 5

REIVINDICACIONES

1. Método para identificar un agente que puede contrarrestar el mal olor a sudor que comprende identificar un agente que modula la función de uno o más receptores olfativos (OR) seleccionado del grupo que consiste en: OR52L1, OR52E8, OR52B2, OR52E1, OR52A5 y OR56A5 que comprende las etapas de:
 - 5 a) poner en contacto los 6 de dichos OR con uno o más ácidos carboxílicos presente(s) en el sudor humano seleccionado(s) del grupo que consiste en: ácido butanoico, ácido isovalérico, ácido pentanoico, ácido hexanoico, ácido 2-metilhexanoico, ácido 3-metilhexanoico, ácido (E)-3-metil-2-hexenoico, ácido 3-hidroxi-3-metilhexanoico, ácido heptanoico, ácido 2-metilheptanoico, ácido octanoico, ácido 4-etiloctanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico, ácido undecanoico y ácido benzoico, en presencia y en ausencia de dicho agente en condiciones que permiten la unión de dicho(s) ácido(s) carboxílico(s) a dichos OR o que permiten la activación de dichos OR mediante dicho(s) ácido(s) carboxílico(s),
 - 10 b) comparar la unión de los 6 de dichos uno o más OR con dichos uno o más ácidos carboxílicos, o la actividad de dichos OR, en presencia y en ausencia de dicho agente, en el que una diferencia en la unión o actividad en presencia de dicho agente, con respecto a la unión o actividad en ausencia del agente, identifica al agente como un agente que modula la función de dichos uno o más OR en respuesta a dichos uno o más ácidos carboxílicos.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho agente se somete adicionalmente a prueba para determinar la modulación de la unión de dichos ácidos carboxílicos a OR51I2, o para determinar la modulación de la activación de OR51I2 mediante dichos ácidos carboxílicos.
- 20 3. Método según la reivindicación 1, en el que dicho agente se somete a prueba para determinar la modulación de la unión de ácido pentanoico a OR52L1, o para determinar la modulación de la activación de OR52L1 mediante ácido pentanoico; en el que dicho agente se somete a prueba para determinar la modulación de la unión de ácido 3-hidroxi-3-metilhexanoico a OR52E8, o para determinar la modulación de la activación de OR52E8 mediante ácido 3-hidroxi-3-metilhexanoico; en el que dicho agente se somete a prueba para determinar la modulación de la unión de ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico o ácido undecanoico a OR52B2, o para determinar la modulación de la activación de OR52B2 mediante ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico o ácido undecanoico; en el que dicho agente se somete a prueba para determinar la modulación de la unión de ácido butanoico a OR52E1, o para determinar la modulación de la activación de OR52E1 mediante ácido butanoico; en el que dicho agente se somete a prueba para determinar la modulación de la unión de ácido 4-etiloctanoico a OR52A5, o para determinar la modulación de la activación de OR52A5 mediante ácido 4-etiloctanoico; o en el que dicho agente se somete a prueba para determinar la modulación de la unión de ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido 2-metilheptanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico o ácido undecanoico a OR56A5, o para determinar la modulación de la activación de OR56A5 mediante ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido 2-metilheptanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico o ácido undecanoico.
- 35 4. Método según la reivindicación 2, en el que dicho agente se somete a prueba para determinar la modulación de la unión de ácido butanoico, ácido isovalérico, ácido pentanoico, ácido hexanoico, ácido 2-metilhexanoico, ácido 3-metilhexanoico, ácido (E)-3-metil-2-hexanoico o ácido benzoico a OR51I2, o para determinar la modulación de la activación de OR51I2 mediante ácido butanoico, ácido isovalérico, ácido pentanoico, ácido hexanoico, ácido 2-metilhexanoico, ácido 3-metilhexanoico, ácido (E)-3-metil-2-hexanoico o ácido benzoico.
- 40 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichos uno o más ácidos carboxílicos pueden marcarse de manera detectable con un resto seleccionado del grupo que comprende: un radioisótopo, un fluoróforo y un agente de extinción de la fluorescencia.
- 45 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, usado para detectar la presencia de un agente que modula la actividad de uno o más OR que detectan ácidos carboxílicos presentes en el sudor humano en una muestra.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho agente está presente en una muestra.
- 50 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dichos uno o más polipéptidos de OR se ponen en contacto con dichos uno o más ácidos carboxílicos a su concentración CE₅₀.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho agente se identifica como un agente que modula la función de OR según la invención cuando dicho agente reduce la respuesta intracelular inducida por dicho(s) ácido(s) carboxílico(s) en al menos el 10%.
- 55 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la puesta en contacto se realiza en o

sobre células que expresan dichos polipéptidos de OR, preferiblemente en el que dichas células pueden seleccionarse de: células de riñón embrionario humanas (Hek293), células de hámster chino (CHO), células de mono (COS), células olfativas primarias, células de *Xenopus*, células de insecto, levaduras o bacterias;

- 5 en el que dicha puesta en contacto se realiza en o sobre liposomas sintéticos o membranas en gemación inducidas por virus que contienen dichos polipéptidos de OR; en el que dicho método se realiza usando una fracción de membrana de células que expresan dichos polipéptidos de OR; en el que dicho método se realiza sobre un chip de proteína; o en el que dicha medición se realiza usando un método seleccionado de desplazamiento de marcador, resonancia de plasmón superficial, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, extinción de fluorescencia y polarización de fluorescencia.
- 10 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho agente se selecciona del grupo que consiste en un péptido, un polipéptido, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, un lípido, un hidrato de carbono, un ácido nucleico y una molécula orgánica pequeña.
12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicha etapa de medir una actividad de señalización del/de los OR comprende detectar un cambio en el nivel de un segundo mensajero;
- 15 en el que dicha etapa de medir una actividad de señalización de los OR comprende la medición de unión/acoplamiento o intercambio de nucleótido de guanina, actividad adenilato ciclasa, cAMP, actividad proteína cinasa C, actividad proteína cinasa A descomposición de fosfatidilinositol, diacilglicerol, trifosfato de inositol, calcio intracelular, flujo de calcio, ácido araquidónico, actividad MAP cinasa, actividad tirosina cinasa, ensayo de melanóforos, ensayo de inicialización de receptores o expresión de gen indicador; o en el que dicha etapa de medir la actividad de señalización de los OR comprende usar un ensayo de fluorescencia o luminiscencia, preferiblemente en el que dichos ensayos de fluorescencia y luminiscencia comprenden el uso de fluoróforos sensibles a Ca^{2+} incluyendo fluo3, Fluo4 o Fura; familia de Ca3-kit o aequorina, más preferiblemente en el que dichos ensayos pueden aplicar un lector fluorométrico o luminiscente automatizado tal como FDSS o FLIPR.
- 20 13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que es un método de examen de alto rendimiento.
14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el agente es parte de una biblioteca química o extractos de órganos de animales.
- 25 15. Uso de un kit para realizar métodos de examen para seleccionar moduladores de receptores olfativos (OR) que detectan ácido(s) carboxílico(s) presente(s) en el sudor humano, comprendiendo dicho kit:
- 30 a) polinucleótidos aislados que codifican para los polipéptidos de OR: OR52L1, OR52E8, OR52B2, OR52E1, OR52A5 y OR56A5; opcionalmente un polinucleótido aislado que codifica para el polipéptido de OR OR51I2;
- 35 b) ácido(s) carboxílico(s) seleccionado(s) del grupo que consiste en: ácido butanoico, ácido isovalérico, ácido pentanoico, ácido hexanoico, ácido 2-metilhexanoico, ácido 3-metilhexanoico, ácido (E)-3-metil-2-hexenoico, ácido 3-hidroxi-3-metilhexanoico, ácido heptanoico, ácido 2-metilheptanoico, ácido octanoico, ácido 4-etiloctanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico, ácido undecanoico y ácido benzoico; y
- c) materiales de embalaje para los mismos.
- 40 16. Uso de un kit para realizar métodos de examen para seleccionar moduladores de receptores olfativos (OR) que detectan ácido(s) carboxílico(s) presente(s) en el sudor humano, comprendiendo dicho kit:
- a) una célula, varias células o membranas de las mismas que expresan los polipéptidos de OR: OR52L1, OR52E8, OR52B2, OR52E1, OR52A5 y OR56A5; opcionalmente una célula, varias células o membranas de las mismas que expresan el polipéptido de OR OR51I2;
- 45 b) ácido(s) carboxílico(s) seleccionado(s) del grupo que consiste en: ácido butanoico, ácido isovalérico, ácido pentanoico, ácido hexanoico, ácido 2-metilhexanoico, ácido 3-metilhexanoico, ácido (E)-3-metil-2-hexenoico, ácido 3-hidroxi-3-metilhexanoico, ácido heptanoico, ácido 2-metilheptanoico, ácido octanoico, ácido 4-etiloctanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico, ácido undecanoico y ácido benzoico; y
- c) materiales de embalaje para los mismos.
- 50 17. Uso según la reivindicación 16, en el que dicha célula está, o en el que dichas células están, transformadas con uno o más polinucleótidos que codifican para los 6 receptores olfativos.
18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, usando un kit que comprende:
- a) polipéptidos aislados OR52L1, OR52E8, OR52B2, OR52E1, OR52A5 y OR56A5; opcionalmente

polipéptido OR5112; y

- 5 b) ácido(s) carboxílico(s) seleccionado(s) del grupo que consiste en: ácido butanoico, ácido isovalérico, ácido pentanoico, ácido hexanoico, ácido 2-metilhexanoico, ácido 3-metilhexanoico, ácido (E)-3-metil-2-hexenoico, ácido 3-hidroxi-3-metilhexanoico, ácido heptanoico, ácido 2-metilheptanoico, ácido octanoico, ácido 4-etiloctanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico, ácido undecanoico y ácido benzoico; y
- c) materiales de embalaje para los mismos.

Figura 1

SEQ ID NO: 1 ADN de OR52L1

Atgacitttggttcttttctcttctcctccaagccattgataatgctccttagcaattcaagctggaggctatccagccttcttctctggtaggattc
cagggttagaggaagccagcactgattgcaactgcccctgggcatccttaccctcttgcttagtgggcaatgtaccattctctcatcatctggatgg
accatccttgaccatcatgtactctctctgctcatgctagctgcatgacctggctctgctcctccactgcaccaaaagcccttgagctcct
ggttcatgccacagagattgggtacatgctgctgctgatccagatgcttccatccatgattctcctccatggagtaggggtacttgggccatgctct
ggattgctatgtagcatttgcacccttgaccattccacaactctgcatccaggggcatagggcgcatcggaaatgggtgctgggtaggggatta
ctactcttatcccttccccatttggggaacattatctctgccaagccacatagggccatgctattggaacataggtggtgaaacttgc
ctgctcagaaccacagcaatcagcctatgggctgactatggcctgctgctgattgggctggatgctgctgctcattgggttctatgccacatcct
ccaggcagtgctgaaggtaccagggagtgaggcccgaacttaaggcgttagacacatgctgctcatttggctatcctggtctctatgctcctgga
atttctcctcactcaccgcttggctcatgtaccccatcatgctcatgctctctgccaacggatctcctcatgcccctgctcaatcctctg
tctatggagtagaagactcagcagatcccgacgagtgctcagagtggttaccaaaaggattaa

SEQ ID NO: 2 Polipéptido de OR52L1

MTLVSSFFSFLSKPLIMLLSNSSWRLSQPSFLLVGIPLGLEESQHWIAPLGLYLLALVGNVITLFIWMDPSLHQSMYFLS
MLAAIDLVLASSTAPKALAVLLVHAHEIGYIVCLIQMFFIHAFSSMELGVLVAMALDCYVAICHPLHHSTILHPGVIGRIGM
VVLVRGLLLIPFPILLGTLIFCQATIIGHAYCEHMAVVKLACSETTVNRAYGLTMALLVIGLDVLAIGVSYAHILQAVLKVP
GSEARLKAFSTCGSHICVILVFYVPGIFSFLTHRFHGHVPHHVHLLATRYLLMPPALNPLVYGVKTKQIRQRVLRVFTQK
D

SEQ ID NO: 3 ADN de OR52E8

Atggcaggaagaatgctcagctcaatcacaccagttccatcctctctcctcactgctgggatccagggctagaagatgacacatttgattg
tgctccttttcttctgtatctgtgactcctggaacactgctctctgttggatccagactgagcagagctccatgagcctatgactactctct
gccatggtgattcattgacctggctgctacagccacatcccaaaatggtggcatctctggtcaataccaaagaaatcttggaggctg
cttctcacatgctctcactcatttctcactgctatggagagcattggtggtggccatggccttgaccgctacattgcaattgcaaacctctcggta
accatgactcaccagcaaaatcagcctcattgagggcattgctgctcagaggcctgacatggttccatgctggttctcctctgaggctg
ccctctggtggcatcgtatcctcactatcttattgtagcactggcctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg
ggcaacatactctctgttactggatgtatccttattctcctcctatgtagcagatcctgctgctctctgctgctcctgctgctgctgctgctg
gctcacaacacctggtgctcattggtgctatctagcctttttaccaccagcatttttctctgacacatgcttggccataatccacagtat
acatattatagccaacctgtagtggtgctccaccagcctcaatcctgtaatctatggagtcaggacaagcagattcagagagagtgctgag
gatttttcaagaccaatcactaa

SEQ ID NO: 4 Polipéptido de OR52E8

MAGRMSTSNHTQFHPSSFLLLGIPLEDVHIWIGVPPFFVYVALLGNTALLFVIQTEQSLHEPMMYFLAMLDSIDLGLST
ATIPKMLGIFWNTKEISFGGCLSHMFFIHFFTTAMESIVLVAMAFDRYAICKPLRYTMILTSKIIISLIAGI AVLRSLYMVPVL
VFLRLPFCGHRIPHTYCEHMGJARLACASIKVNI RFGNGISLLLLDVLIIILSYRILYAVFCLPSWEARLKALNTCGSH
IGVILAFFTPAFFSLTHRFHGNIPQYIHILANLYVVPALNPVIYGVRTKQIRERVLRIFLKTNH

SEQ ID NO: 5 ADN de OR52B2

Atgagtcacaccaatgtaccatcttccatcctgagttttgctcctctggcctcctgggtggaggttaccacattggctgcaatcctcttgcctc
atttaccatcactgagctcctgggaacagcactcctgtagtggttattgcatggaagctaaccttcatgcccagatcttctcctcaatgctggccg
tcattggacatcctgctgctaccaccctgctgcccagggcctagccatcttggctcaagcacaataacattgcttggatgctgctgctcaccaggtt
ctttgcatatgattggtggggagtcagctatcctgtagccatggccttggatgcttggccattgctgcccactgagatatacaacagtgct
acatggcctggtggggaggatgctcctgcccctacaccgaaactctgcatcctcctcagctatcttctgctgaaagcggctgcccctctgct
accacattgctcactcctactgtagcattgtagtgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg
catggctccttggatgattcctcactgctgctgcttactcactgctcctcagcagcagtgcttctgctcctccaggatgctggcacaagccctcagc
acttggctcccactctgctatccttattgctcctcttacccttattgaccatcatttggcgtaatactcacaacatgctcattctg
ctgccaatcttattgctgagtgccaccaatgctgaaacccatgctatggtggaagactaagcagatcctgaggtgtagcccccggtcttgg
acatcaagacttgctgctacctccctctgggctcataa

SEQ ID NO: 6 Polipéptido de OR52B2

MSHTNVTIFHPAVFVLPGIPGLEAYHIWLSIPLCLYITAVLGNISILVIVMERNLHVPMYFFLSMLAVMDILLSTTVPKAL
AIFWLQAHNIAFDACVTQGGFFVHMFMVGESAILLAMAFDRVAICAPLRYTTLVTPVVGRIALAVITRSFCIIFPVIFLLK
RLPFCLTNIVPHSYCEHIGVARLACADITVNIWYGFVPIVMVILDVILIAVSYSILRAVFRLPQDARHKALSTCGSHLC
VILMFYVPSFFLLTHHFRNIPQVHILANLYVAVPPMLNPVIYGVKTKQIREGVAHRFFDIKTWCCTSPLS

SEQ ID NO: 13 ADN de OR56A5

Atgacattaccagcaacaactccacttcccagctcttgaattcttctcattgtttccccagttccagagctggcagcactggctgtctctgccctcagcctcctctctctctctgcccattggggccaatgccaccctctgatcaccatctatctggaagcctctgcaccagcccctgtactacctgctcagcctcctctcctctgctggacatcgactctgcctcaccgtcatccccaaggtcctggccatctctggtttgacctcagatcaatcagcttccctgctgcttctcagatgttcatcatgaacagtttctgactatggagtctgcacattcatgatcatggcctatgaccgctatgaggccatctgaagcccctacagtactcatccatcatcactgatcaattgttgctagggctgccatcttgtgtggccaggaatggccttctactatgcctatccccatacttctctcgactcagatactgtcaggacacatcatcaagaactgcatctgtactaacgtgtctgtctaaactctcttgatgacatcacctgaaatcagagctaccagttgttataggtggacctgctgggctctgacctcatccttattgttctcttactttttatcttgaaaactgtgctaaggattaagggtagggagatatggccaaagctcagggtactgtggttcccacttcatcctcatcctcttctccaccagctcctgctggttctggtcatcactaacctggccaggaagagaattcctccggatgctccatcctgctcaacatcctgcaccaccttattccccagctctgaacccattgttatgtgtgagaaccaaggagatcaagcagggaatccagaaccgtgtaagaggtgtaa

SEQ ID NO: 14 Polipéptido de OR56A5

MTLPSNNSTSPVFEFFLICFPSFQSWQHWLSLPLSLLFLLAMGANATLLITIYLEASLHQPLYLLSLLSLLDIVLCLTVIPKVLAIWFDFLRSISFPACFLQMFIMNSFLTMESCTFMIMAYDRYVAICKPLQYSSIIDQFVARAAIFVVARNGLLTMPILSSRLRYCAGHIIKNCICTNVSVKLSLSCDDITLNQSYQFVIGWTLGSDLILIVLSYFFILKTVLRIKGEEDMAKALGTCGSHFILIFFTTVLLVLVITNLARKRIPPDVPILLNILHHLIPPALNPVYGVRTKEIKQGIQNLLKRL

SEQ ID NO: 15

Ac-FKKSFKL-NH2

SEQ ID NO: 16

RRLIEDAEYAARG

Figura 2A: activación dependiente de la concentración de OR52L1, medida con el ensayo de luciferasa

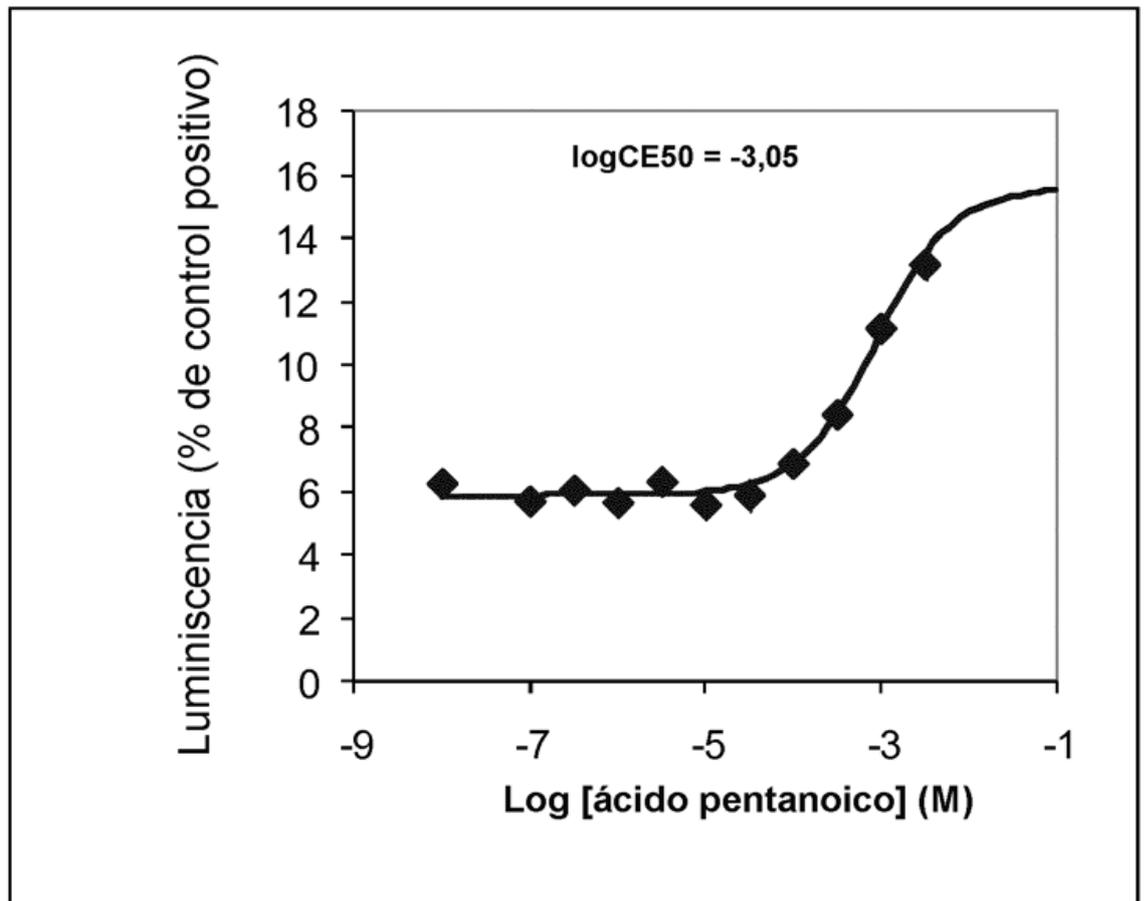


Figura 2B: activación dependiente de la concentración de OR52E8, medida con el ensayo de luciferasa

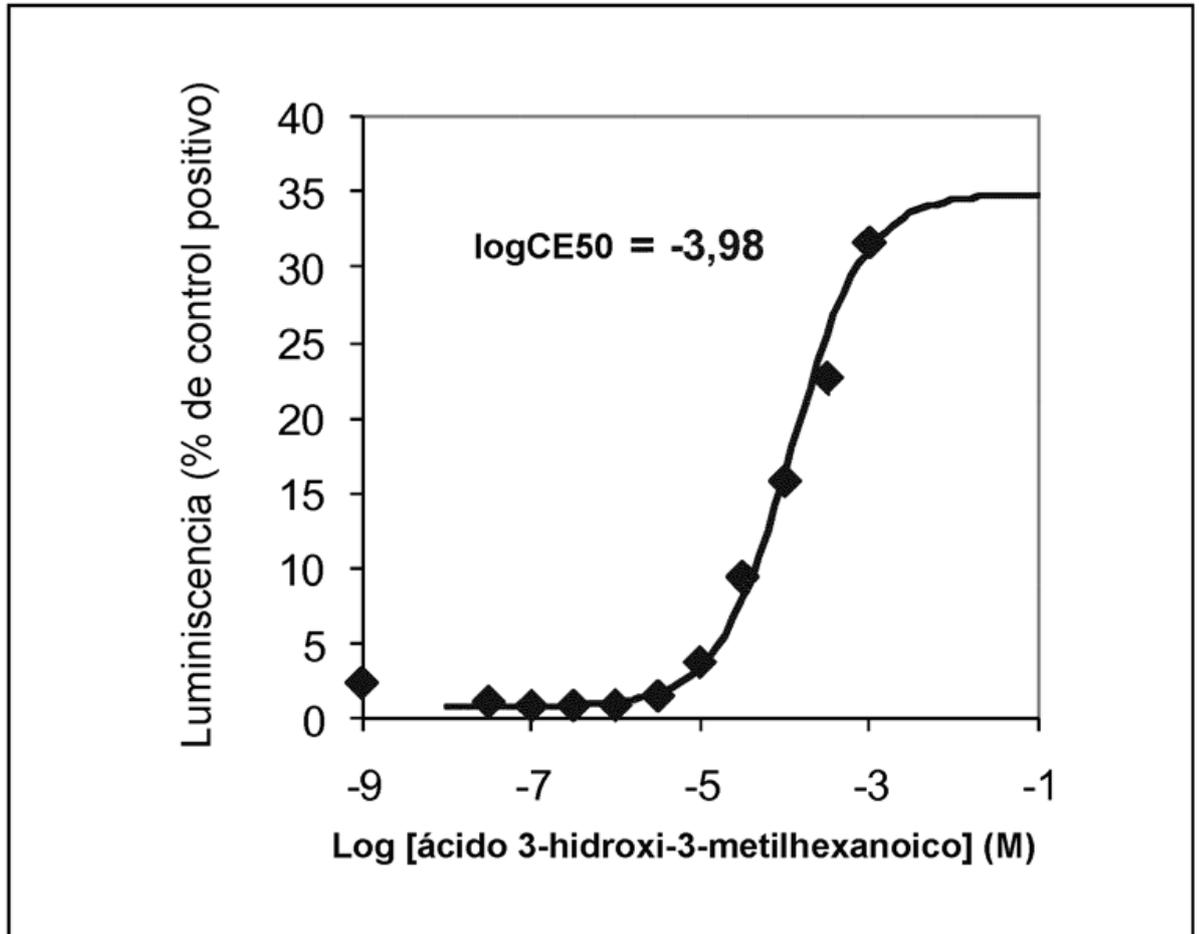


Figura 2C: activación dependiente de la concentración de OR52E1, medida con el ensayo de luciferasa

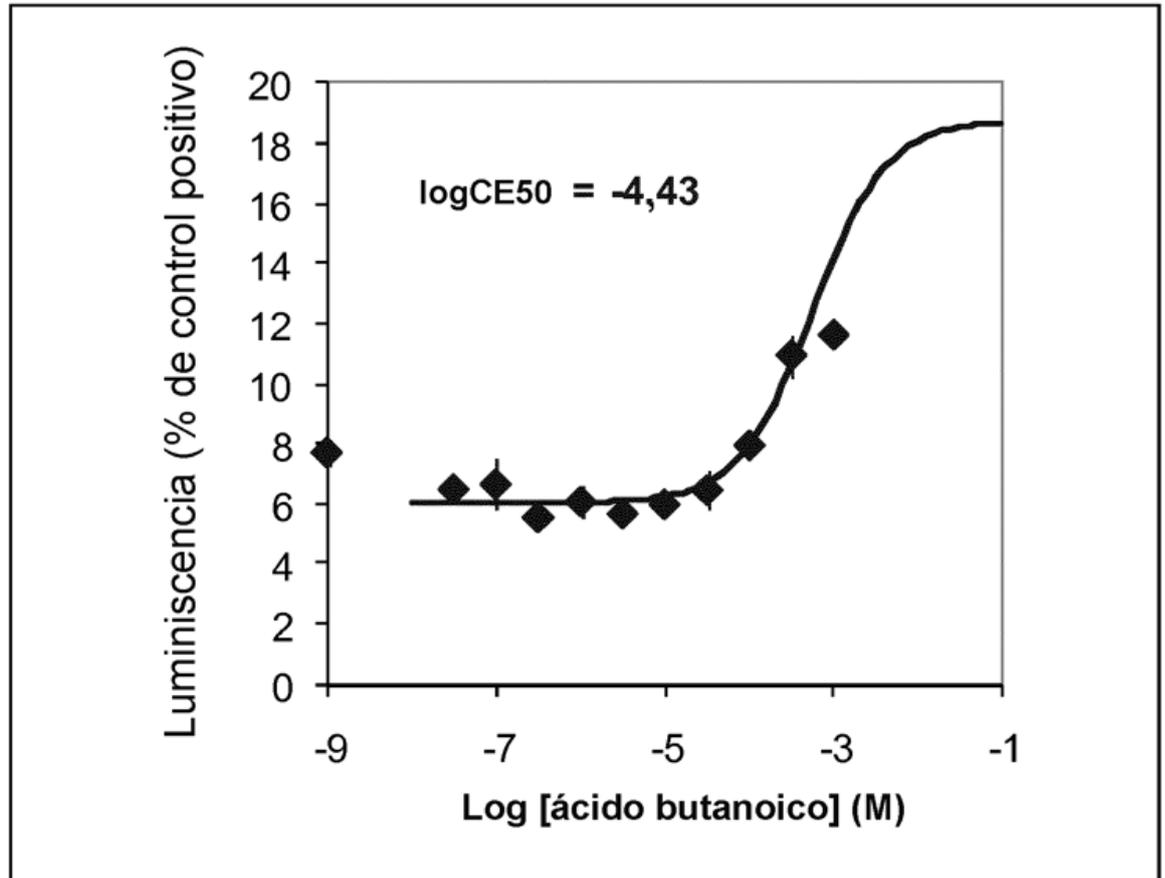


Figura 2D: activación dependiente de la concentración de OR52A5, medida con el ensayo de luciferasa

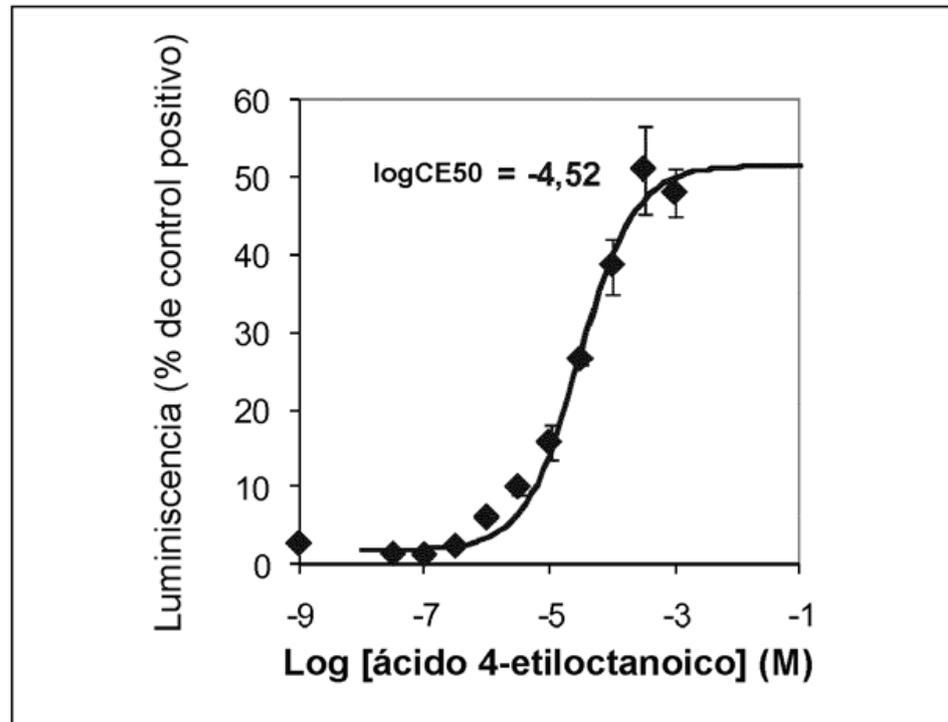


Figura 2E: activación dependiente de la concentración de OR51I2, medida con el ensayo de luciferasa

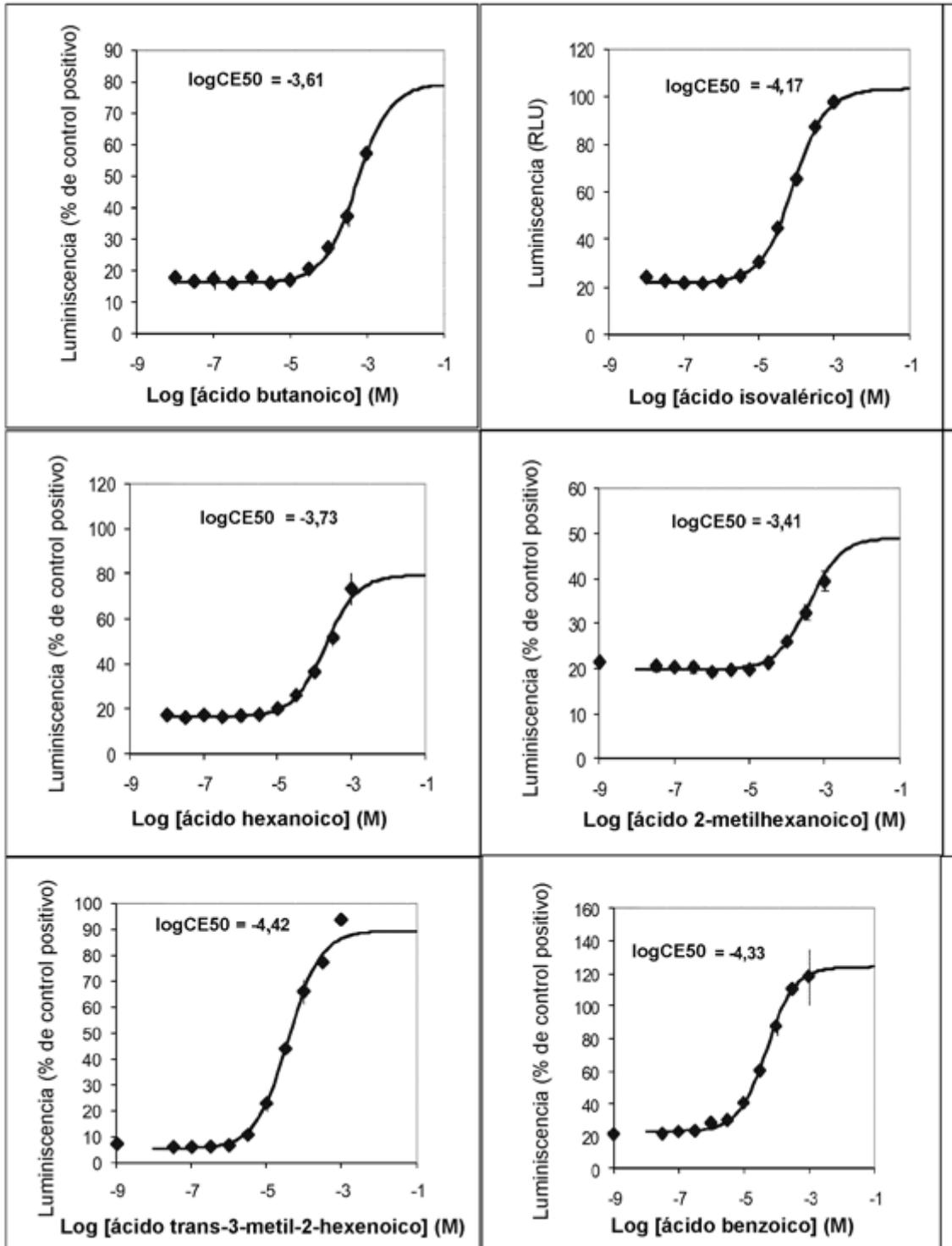


Figura 2E (continuación)

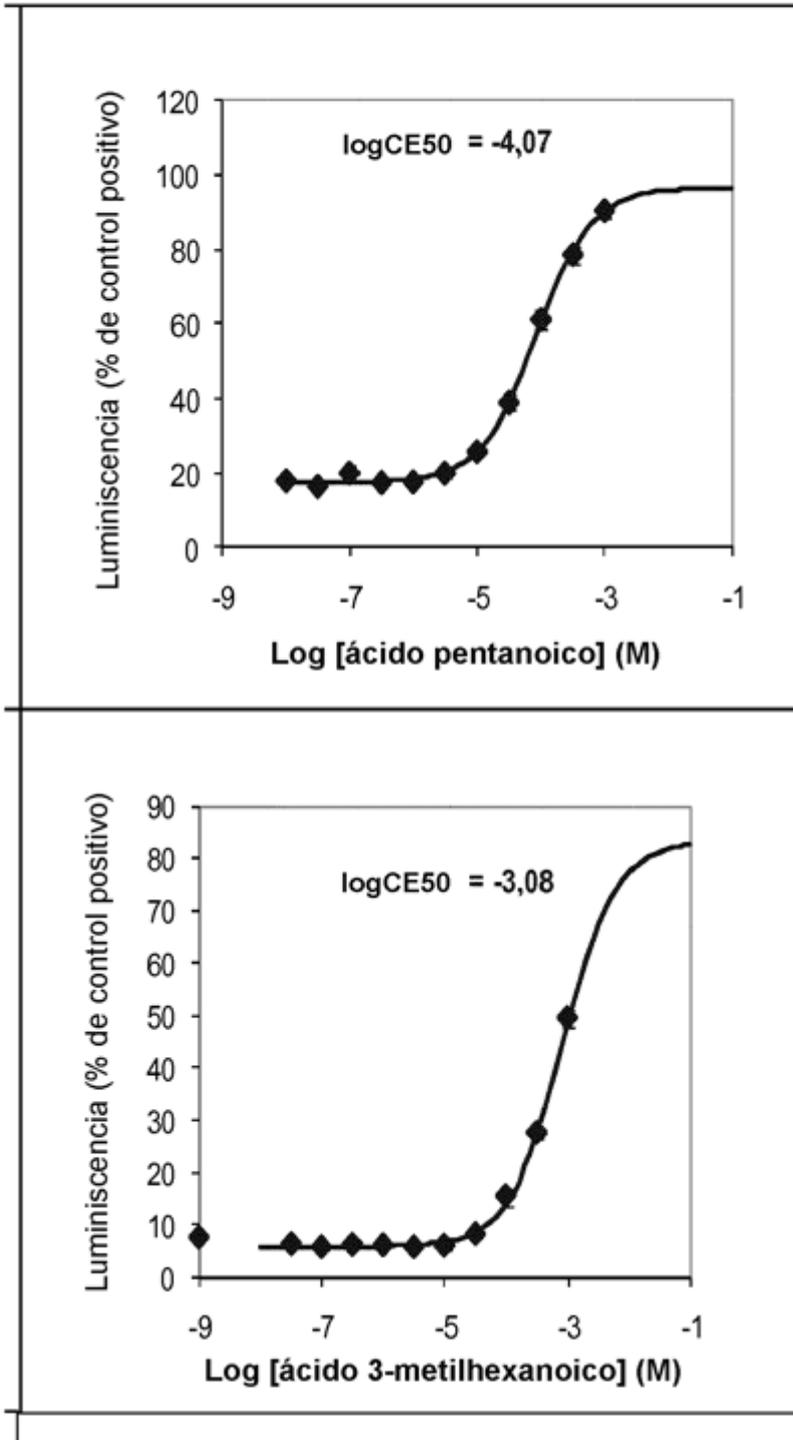


Figura 2F: activación dependiente de la concentración de OR52B2, medida con el ensayo de luciferasa

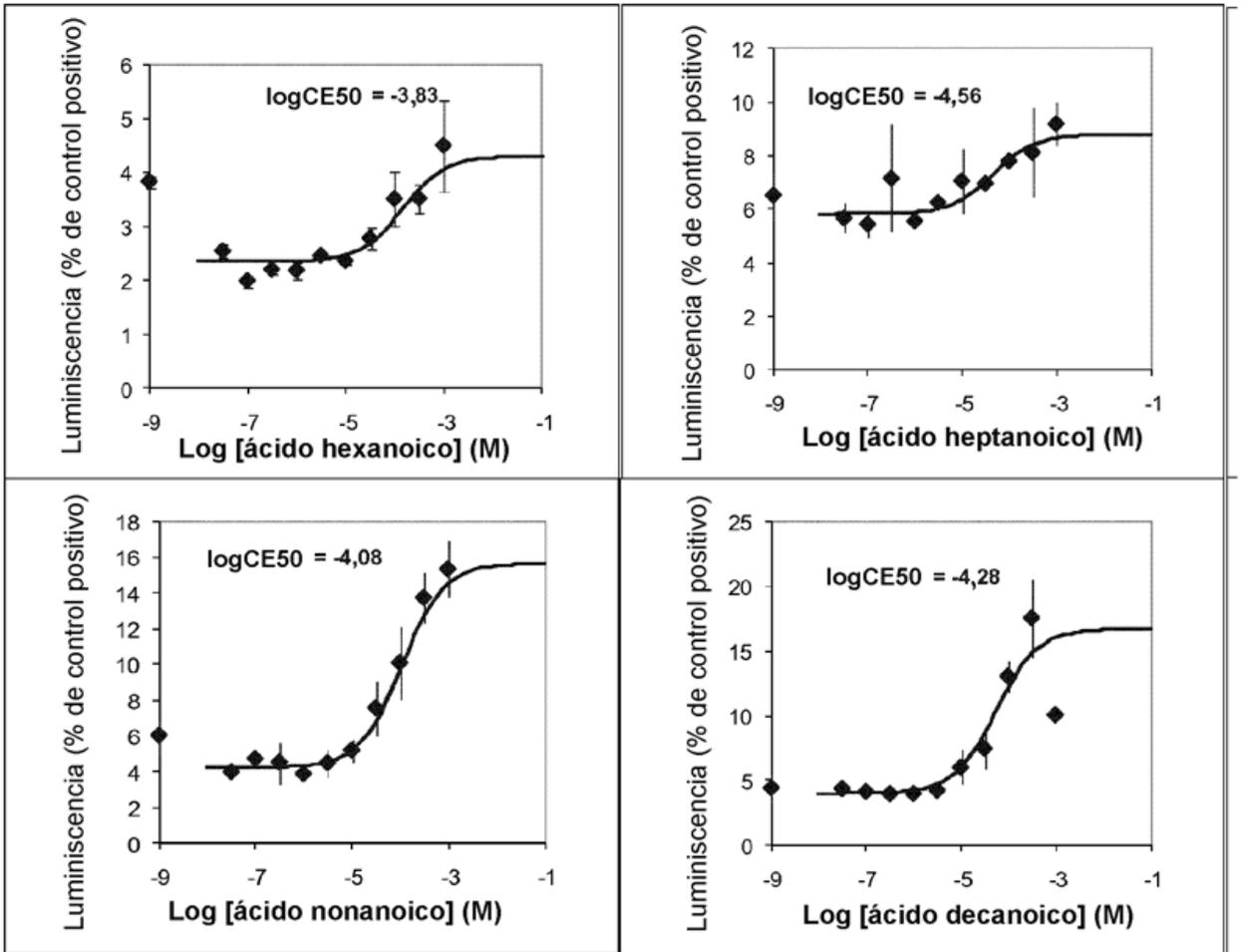


Figura 2F (continuación)

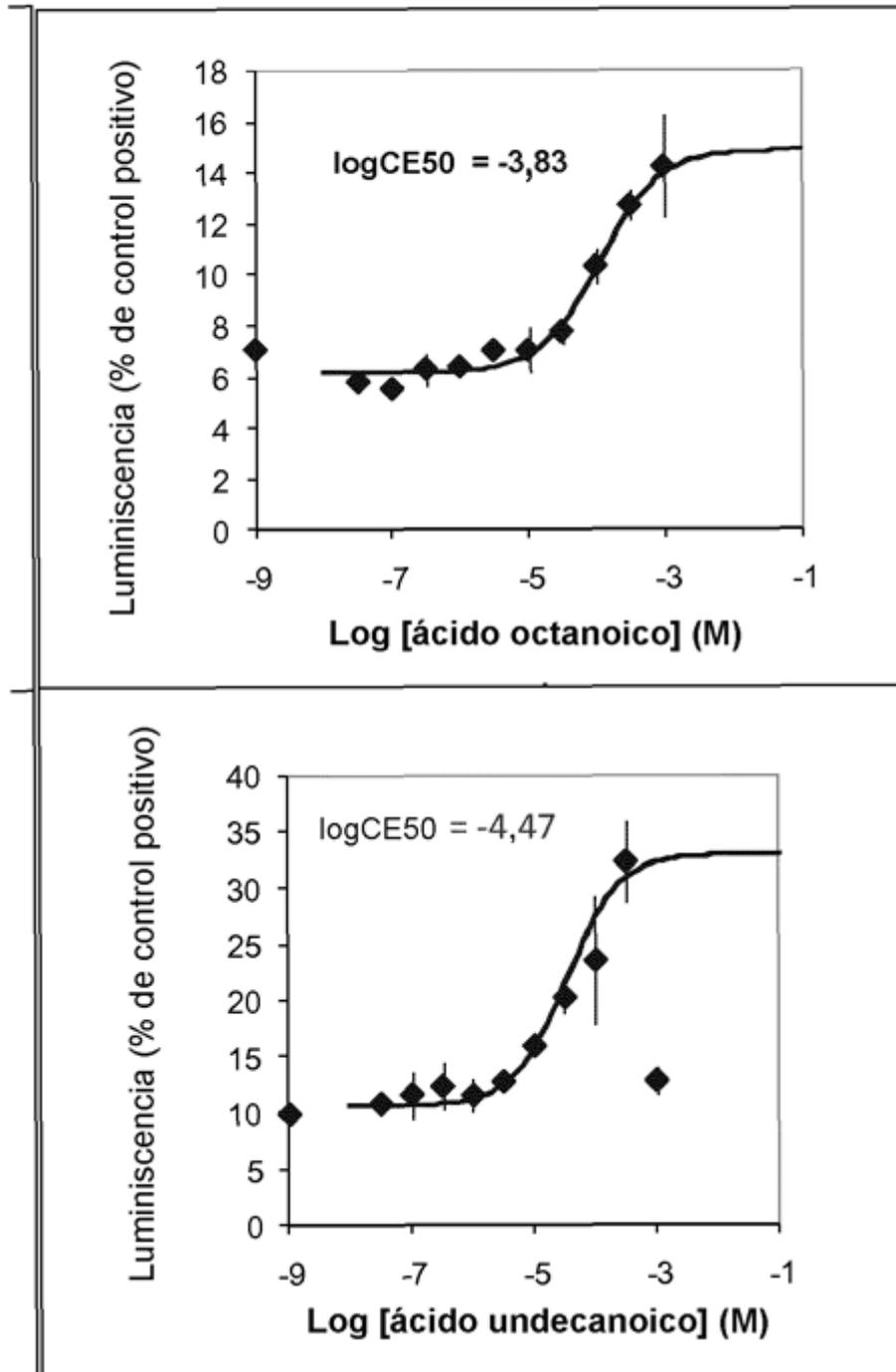


Figura 2G: activación dependiente de la concentración de OR56A5, medida con el ensayo de luciferasa

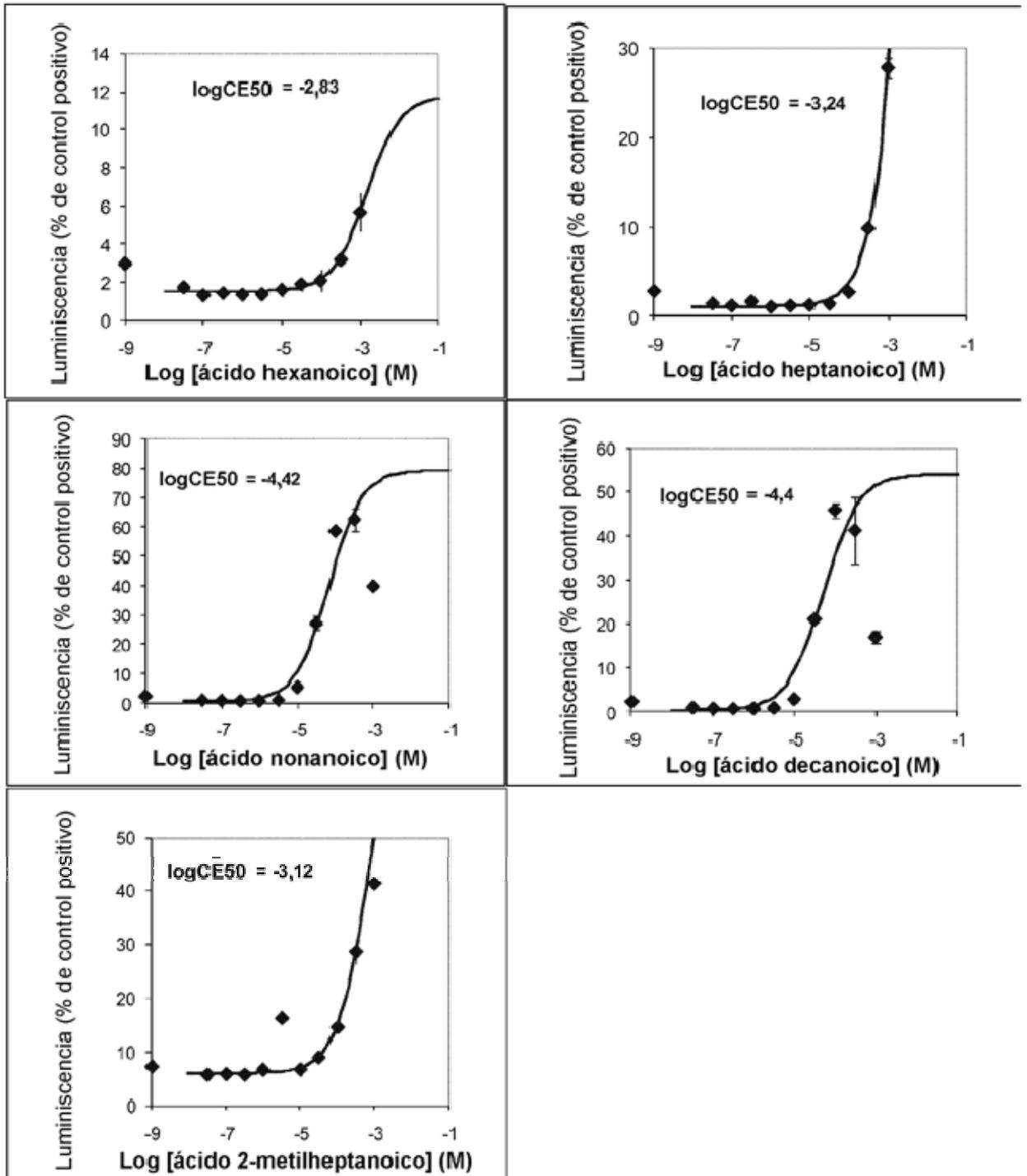


Figura 2G (continuación)

