

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 906**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

C07K 14/72 (2006.01)

C11B 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2014** **E 14178866 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018** **EP 2832347**

54 Título: **Método para identificar materiales odorantes de pachulí**

30 Prioridad:

02.08.2013 EP 13306117

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

30.04.2018

73 Titular/es:

**TAKASAGO INTERNATIONAL CORPORATION
(100.0%)
37-1, Kamata 5-chome, Ohta-ku
Tokyo 144-8721, JP**

72 Inventor/es:

**WARR, JONATHAN;
FUJIWHARA, MITSUHIKO;
EMURA, MAKOTO;
LEBRET, DIDIER;
LOHMER, STEFAN y
WINNIG, MARCEL**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 665 906 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para identificar materiales odorantes de pachulí

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se refiere a la identificación de materiales odorantes de pachulí mediante un método que comprende detectar la actividad del receptor olfativo OR11A1 (Receptor Olfativo, familia 11, subfamilia A, miembro 1).

10 **Antecedentes de la invención**

Los seres humanos perciben una inmensa variedad de productos químicos que tienen olores distintos. La percepción del olor se inicia en la nariz, donde los odorantes son detectados por una gran familia de receptores olfativos (OR).

15 Las proteínas receptoras olfativas son miembros de una gran familia de receptores acoplados a la proteína G (GPCR) que surgen de genes de exón de codificación única. Los receptores olfativos comparten una estructura de 7 dominios transmembrana con muchos neurotransmisores y receptores de hormonas y son responsables del reconocimiento y de la transducción mediada por la proteína G de las señales odorantes.

20 Los compuestos volátiles de diferentes orígenes naturales o artificiales son detectados por un conjunto específico de receptores acoplados a la proteína G localizados en el epitelio respiratorio. Se ha propuesto que un odorante es capaz de activar múltiples receptores olfativos (OR) y que un OR es capaz de detectar diferentes odorantes (Malnic et al., 1999). El genoma humano contiene ~400 genes de receptores olfativos intactos que pertenecen a dos clases principales. Los OR de la clase I, "receptores de tipo pescado" presumiblemente detectan odorantes solubles en agua, mientras que los OR "receptores específicos de tetrápodos" de la clase II se supone que responden a los compuestos volátiles transportados por el aire (Glusman et al., 2000).

30 El OR11A1 (Receptor olfativo, familia 11, subfamilia A, miembro 1), también conocido como hs6M1-18, AC004174-A, dJ994E9.6, OR6-30, HsOR6.3.21 u ORL524, pertenece a un pequeño subconjunto de 8 receptores estructuralmente relacionados (<http://genome.weizmann.ac.il/horde>) Recientemente, Adipietro et al., demostraron la activación de OR11A1 por el 2-etilfenicol (Adipietro et al., PLoS Genet. 2012).

35 El documento WO 2008/088633 describe, entre otros, un método para identificar un segundo compuesto de prueba que imita el olor de un primer compuesto o composición de prueba, comprendiendo el método a) poner en contacto un panel de receptores de odorantes con el segundo compuesto de prueba, b) probar el efecto del segundo compuesto de prueba sobre la actividad en un ensayo funcional de al menos dos receptores de odorantes en el panel, y c) comparar el perfil de la actividad odorante del segundo compuesto de prueba obtenido en b) con el perfil de actividad odorante del primer compuesto o composición de prueba.

40 El aceite de pachulí se produce por destilación al vapor de las hojas secas de *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. (*Lamiaceae*). Es un líquido de color marrón rojizo a pardo verdoso, más o menos viscoso, con un olor balsámico leñoso, ligeramente alcanforado característico. Aunque el alcohol sesquiterpénico (-)-pachulol [N.º CAS 5986-55-0] es el principal componente del aceite de pachulí (27 - 35 %), este compuesto contribuye menos al olor característico del aceite que el norpachulenol [N.º CAS 41429-52-1] presente solo en una concentración de 0,35 - 1 %. Otros constituyentes típicos son (+)- α -bulneseno [N.º CAS 3691-11-0] (13 - 21 %), (-)- α -guajeno [N.º CAS 3691-12-1] (11 - 16 %), (-)- β -pachuleno [N.º CAS 514-51-2] (1,8 - 3,5 %), y (-)-seychelleno [N.º CAS 20085-93-2] (1-3 %) (ver 'Common Fragrance and Flavor Materials, 5ª ed. Horst Surburg y Johannes Panten Copyright 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim ISBN: 3-527-31315-X, págs. 223-224).

50 El pachulí es una nota de olor bien conocida por los perfumistas y tiene un olor distintivo bien equilibrado con notas alcanforadas, terrosas y leñosas, acompañado de facetas balsámicas y florales. El aceite de pachulí, o sus componentes, se han usado y aún se usan en muchas fragancias (Kraft en Chemistry & Biodiversity - Vol. 5 (2008), pp 970-999, Verlag Helvetica Chimica Acta AG, Zürich). El aceite de pachulí es clave en particular para la familia olfativa Chipre, en el que se combina con una nota superior de cítricos frescos alrededor del aceite de bergamota, un corazón floral de rosa y jazmín y un fondo musgoso de roble (Kraft, op. cit.).

55 Sin embargo, hasta el día de hoy, no hay sustituyentes sintéticos satisfactorios para el pachulí que estén disponibles para el perfumista debido a los costos y razones de suministro. Dado en particular el costo del material aceite de pachulí, sería por lo tanto ventajoso disponer de tales sustituyentes sintéticos.

60 **Sumario de la invención**

En un aspecto, la presente invención proporciona en consecuencia un método para identificar un material odorante de pachulí candidato, que comprende las etapas de:

65

- 1) poner en contacto una muestra que expresa el receptor OR11A1 con un compuesto de prueba, y
- 2) medir la actividad del receptor OR11A1 como se define en la reivindicación 1.

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para identificar un material odorante de pachulí, que comprende las etapas de:

- a) identificar un material odorante de pachulí candidato por el método descrito anteriormente, y
- b1) someter el material odorante de pachulí candidato identificado a una prueba de persistencia, en la que el candidato pasa la prueba si retiene al menos el 10 % de su concentración inicial después de 1 hora.

10 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para identificar un material odorante de pachulí, que comprende las etapas de:

- a) identificar un material odorante de pachulí candidato mediante el método descrito anteriormente, y
- b2) someter el candidato identificado a una prueba olfativa como se define en la reivindicación 11.

15 En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una muestra que expresa el receptor OR11A1 para identificar un material odorante de pachulí candidato después de aumentar la actividad de dicho receptor por dicho material.

20 **Descripción detallada de la invención**

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar un material odorante de pachulí candidato, que comprende las etapas de o consiste en:

- 25 1) poner en contacto una muestra que expresa el receptor OR11A1 con un compuesto de prueba, y
- 2) medir la actividad del receptor OR11A1 como se define en la reivindicación 1.

30 La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que el receptor olfativo OR11A1 responde específicamente al aceite de pachulí. Como se explica en detalle en los ejemplos, se analizaron 65 receptores olfativos en cuanto a su respuesta al aceite de pachulí. Como resultado de las pruebas, se observó que solamente el OR11A1 responde al aceite de pachulí. En consecuencia, el receptor OR11A1 es una herramienta útil para detectar materiales odorantes de pachulí.

35 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "material odorante de pachulí" significa un ingrediente, agente o compuesto individual o mezclas de los mismos que tienen una nota de olor a pachulí bien caracterizada y que por lo tanto puede usarse para reemplazar, parcial o totalmente, el aceite de pachulí en una composición. Como se explicó anteriormente, el olor a aceite de pachulí es un olor conocido y característico que los perfumistas pueden identificar fácilmente. El aceite de pachulí también se destaca por su persistencia, por lo que se usa con frecuencia

40 en fragancias suavizantes de telas, por ejemplo, para dejar un aroma duradero en la ropa seca después del lavado.

El método de la invención comprende una primera etapa (etapa 1)) en la que una muestra que expresa el receptor OR11A1 se pone en contacto con el compuesto de prueba.

45 Como se usa en la presente memoria, la expresión "expresar el receptor OR11A1" se refiere a la expresión de un receptor olfativo funcional OR11A1. Específicamente, la muestra expresa el receptor OR11A1 que puede activarse, concretamente transducir la señalización aguas abajo, seguido de la interacción con el ligando del receptor de odorante correspondiente.

50 En una realización, la expresión de OR11A1 está localizada en la membrana celular de la muestra. En consecuencia, la muestra también puede expresar, por ejemplo, al menos una proteína auxiliar importante para el tráfico eficaz del receptor a la membrana plasmática. Además, la muestra puede expresar adicionalmente una proteína G estimuladora (también llamada Gas), preferiblemente una proteína G Golf.

55 En una realización preferida, la muestra a usar en el método de la presente invención comprende una célula, y en particular una célula de mamífero.

En realizaciones preferidas, la muestra es una línea celular que expresa el receptor OR11A1 o preparaciones de membranas de las células de dicha línea celular. Ventajosamente, la muestra que expresa el receptor OR11A1 es una línea celular seleccionada del grupo que consiste en HEK293T, CHO (ovario de hámster chino), HeLa y preparaciones de membranas de dichas células. En una realización adicional, la expresión del receptor OR11A1 se proporciona usando las secuencias de nucleótidos o aminoácidos que corresponden al receptor OR11A1.

60 En una realización, se usa el ADNc de OR11A1, preferiblemente el ADNc correspondiente al OR11A1 humano de la secuencia SEQ ID NO: 1:

65

ATGGAAATTG TCTCCACAGG AAACGAACT ATTACTGAAT TTGTCCTCCT TGGCTTCTAT
 GACATCCCTG AACTGCATTT CTTGTTTTTT ATTGTATTCA CTGCTGTCTA TGTCTTCATC
 ATCATAGGGA ATATGCTGAT TATTGTAGCA GTGGTTAGCT CCCAGAGGCT CCACAAACCC
 ATGTATATTT TCTTGGCGAA TCTGTCCTTC CTGGATATTC TCTACACCTC CGCAGTGATG
 CCAAAAATGC TGGAGGGCTT CCTGCAAGAA GCAACTATCT CTGTGGCTGG TTGCTTGCTC
 CAGTTCTTTA TCTTCGGCTC TCTAGCCACA GCTGAATGCT TACTGCTGGC TGTCATGGCA
 TATGACCGCT ACCTGGCAAT TTGCTACCCA CTCCACTACC CACTCCTGAT GGGGCCAGCA
 CGGTACATGG GGCTGGTGGT CACAACCTGG CTCTCTGGAT TTGTGGTAGA TGGACTGGTT
 GTGGCCCTGG TGGCCCAGCT GAGGTTCTGT GGCCCCAACC ACATTGACCA GTTTTACTGT
 GACTTTATGC TTTTCGTGGG CCTGGCTTGC TCGGATCCCA GAGTGGCTCA GGTGACAACT
 CTCATTCTGT CTGTGTTCTG CCTCACTATT CCTTTTGGAC TGATTCTGAC ATCTTATGCC
 AGAATTGTGG TGGCAGTGCT GAGAGTTCCT GCTGGGGCAA GCAGGAGAAG GGCTTTCTCC
 ACATGCTCCT CCCACCTAGC TGTAGTGACC ACATTCTATG GAACGCTCAT GATCTTTTAT
 GTTGCACCCT CTGCTGTCCA TTCCCAGCTC CTCTCCAAGG TCTTCTCCCT GCTCTACACT
 GTGGTCACCC CTCTCTTCAA TCCTGTGATC TATACCATGA GGAACAAGGA GGTGCATCAG
 GCACCTCGGA AGATTCTCTG TATCAAACAA ACTGAAACAC TTGATTGA.

En una realización preferida, se usa una secuencia de nucleótidos que es una secuencia de nucleótidos que codifica el receptor OR11A1 humano (en particular, SEQ ID NO: 1) o cualquier secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 2 (véase más adelante) o un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 85 %, preferiblemente al menos 90 % y más preferiblemente al menos 95 %, con la SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 2

MEIVSTGNET ITEFVLLGFY DIPELHFLFF IVFTAVYVFI IIGNMLIIVA WVSSQRLHKP
 MYIFLANLSF LDILYTSAVM PKMLEGFLQE ATISVAGCLL QFFIFGSLAT AECLLLAVMA
 YDRYLAICYL LHYPLLMGPR RYMGLVTTW LSGFVVDGLV VALVAQLRFC GPNHIDQFYC
 DFMLFVGLAC SDPRVAQVTT LILSVFCLTI PFGLILSYA RIVVAVLRVP AGASRRRAFS
 TCSSHLAVVT TFYGTLMIFY VAPSAVHSQL LSKVFSLLYT VVTPLFNPVI YTMRNKEVHQ
 ALRKILCIKQ TETLD.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "identidad de secuencia" significa la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos sobre la longitud total de las secuencias cuando están óptimamente alineadas, tal como mediante el uso del programa ClustalW (<http://www.clustal.org/>; Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994); *Acids Res.*, 22, 4673-4680) (Penalización por apertura de hueco = 10; penalización por extensión de hueco = 0,1).

A modo de información, la identidad de secuencia (%) del receptor OR11A1 con diversos receptores odorantes como se divulga en el método WO 2006/002161 y WO 2008/137993 se muestra en la tabla a continuación.

	MOR23-1	OR7D4	S50	S6	MOR31-4	MOR31-6	S18	MOR32-11	MOR32-5	S46
OR11A1	28	37	35	34	28	28	29	30	31	28

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos puede incluirse en una construcción dentro de cualquiera de una variedad de vectores de expresión, siempre que sea capaz de replicar y expresar la construcción en un hospedador, lo que conduce a la expresión del polipéptido correspondiente. Las posibles construcciones tampoco están limitadas siempre que la secuencia esté operativamente unida a una secuencia(s) de control de la expresión

apropiada y cualquier otro requisito para dirigir la expresión del receptor OR11A1.

En realizaciones preferidas, la secuencia del receptor OR11A1 está directamente marcada o indirectamente asociada con un sistema indicador que conduce a una señal legible o medible una vez que el receptor OR11A1 es activado por ligando(s), de modo que la transducción de la señal después de la activación del receptor puede ser detectada, medida y/o controlada.

Se puede usar cualquier tipo de sistema indicador en el método de la presente invención. Por ejemplo, la muestra también puede expresar un sistema indicador que comprende un gen cuya transcripción es impulsada por un elemento de respuesta cuya actividad es una indicación de la activación del receptor OR11A1, preferiblemente un elemento de respuesta AMPc que es estimulado por adenilato ciclasa que es activada por la proteína G estimuladora (Gas), como la proteína G G α olf. Puede usarse cualquier método para expresar el receptor OR11A1, y preferiblemente la transfección del vector de expresión que contiene las construcciones que comprenden la secuencia que codifica el receptor OR11A1.

La expresión "compuesto de prueba" se refiere a cualquier entidad química que se puede usar en una composición como odorante, y especialmente en el campo de la perfumería o cosmética en general. Los compuestos de prueba comprenden tanto compuestos odorantes conocidos como potenciales.

En una realización, el método de la presente invención se implementa con un compuesto de prueba que tiene un peso molecular mayor que 183, más preferiblemente igual o mayor que 200. Preferiblemente, el compuesto de prueba tiene un peso molecular de 300 o menos, más preferiblemente de 275 o menos. Incluso más preferiblemente, el método de la presente invención se implementa con un compuesto de prueba que tiene un peso molecular en el intervalo de 200 a 275.

En una realización, el compuesto de prueba no es 2-etilfenchol (N.º CAS 18368-91-7).

En una realización, la etapa de poner en contacto la muestra con el compuesto de prueba se lleva a cabo usando diferentes concentraciones del compuesto de prueba para determinar la cantidad efectiva de dicho compuesto de prueba que puede activar el receptor OR11A1.

En una segunda etapa (etapa 2), se mide la actividad del receptor OR11A1. El compuesto de prueba se considera un material odorante de pachulí candidato si aumenta la actividad de dicho receptor OR11A1.

La etapa de medir la actividad del receptor OR11A1 comprende las etapas de o consiste en:

i) medir la respuesta del receptor OR11A1 al compuesto de prueba y la respuesta del receptor OR11A1 al tampón de ensayo (nivel de referencia), y calcular un primer factor de cambio (FOC1: respuesta de OR11A1 al compuesto de prueba/respuesta de OR11A1 al nivel de referencia);

ii) medir la respuesta de una muestra de control que no expresa el receptor OR11A1 al compuesto de prueba y la respuesta de la muestra de control que no expresa el receptor OR11A1 al tampón de ensayo (nivel de referencia) y calcular un segundo factor de cambio (FOC2: respuesta de la muestra de control al compuesto de prueba/respuesta de la muestra de control al nivel de referencia);

en el que se produce un aumento de la actividad del receptor OR11A1 si la relación de FOC1 a FOC2 es mayor que 1.

En una realización, el aumento de la actividad del receptor OR11A1 ocurre si FOC1 es más alto que FOC2, y si la diferencia entre FOC1 y FOC2 es estadísticamente significativa con $p < 0,01$, como se determina p.ej., mediante la prueba t de Student.

Por ejemplo, una muestra de control usada en la etapa ii) anterior puede ser una muestra que expresa un receptor OR11A1 no funcional o un vector de expresión vacío correspondiente al vector hospedador usado para expresar el receptor OR11A1 en la muestra (vector de control) en la etapa 1) anterior.

En una realización preferida, el aumento de la actividad del receptor OR11A1 ocurre si la relación de FOC1 a FOC2 es mayor que 1 y FOC1 es de al menos 1,5, preferiblemente y FOC1 es de al menos 1,8, más preferiblemente y FOC1 es de al menos 2.

Cualquier método conocido en la técnica puede usarse para leer o medir la respuesta del receptor OR11A1 cuando la muestra se pone en contacto con el compuesto de prueba. La forma específica de medir/leer la respuesta y así determinar la presencia o ausencia de aumento de la actividad del receptor OR11A1 generada por el compuesto de prueba se adapta con relación al sistema de señalización legible o medible que se ha seleccionado en la muestra que expresa el receptor OR11A1.

De acuerdo con una realización preferida, la actividad del receptor OR11A1 se detecta usando un sistema indicador que conduce a una señal legible o medible si el compuesto de prueba provoca una respuesta del receptor OR11A1. Como se ha mencionado anteriormente, y en una realización adicional, el sistema indicador a usar puede ser tal como, pero sin limitarse a, un sistema para la detección mediante imagen, un sistema de fluorescencia, un sistema enzimático, un sistema de unión, etc. Por ejemplo, en una realización preferida adicional se pueden usar los siguientes sistemas indicadores: detección mediante imagen de calcio con tintes fluorescentes, fotoproteínas tales como GFP, aequorina, sistema indicador enzimático tal como luciferasa, cloranfenicol acetiltransferasa, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, prueba de unión a GTPgammaS, medición de cambios en los niveles de AMPc, y similares. Ventajosamente, se puede usar un sistema indicador que comprende un gen cuya transcripción es impulsada por un elemento de respuesta cuya actividad es una indicación de la modulación del receptor OR11A1, preferiblemente la transcripción del gen es impulsada por un elemento de respuesta AMPc estimulado por adenilato ciclasa que se activa por la proteína G estimuladora (Gas), como la proteína G Gaolf.

El método descrito anteriormente permite identificar materiales odorantes de pachulí que potencialmente permiten al menos una sustitución parcial, preferiblemente una sustitución total, del aceite de pachulí o alcohol de pachulí, en particular en perfumería en una composición de fragancia.

Por tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para identificar un material odorante de pachulí que puede sustituirse por aceite de pachulí o cualquier otro constituyente(s) contenido en el aceite de pachulí que contribuye al olor característico del pachulí, cuyo método comprende las etapas de o consiste en:

- a) identificar un material odorante de pachulí candidato por el método descrito anteriormente; y
- b1) someter el candidato identificado a una prueba de persistencia;

en el que el material candidato pasa la prueba si retiene al menos 10 % de su concentración inicial después de 1 hora.

Cualquier método para determinar si un material permanecerá a lo largo del tiempo cuando se aplica a un sustrato especificado/seleccionado se puede usar para la prueba de persistencia. El sustrato puede ser, por ejemplo, piel, tela, cabello, etc.; el sustrato también puede ser una tira de prueba de perfume. Por lo tanto, cualquier método que mida la cantidad/concentración residual después de un cierto tiempo puede usarse para medir la propiedad de persistencia de los materiales odorantes de pachulí según la presente invención. Un ejemplo de un método fácil y reproducible es medir la cantidad/concentración del material en un sustrato a lo largo del tiempo mediante cromatografía de gases, tal como GC-MS (cromatografía de gases/espectrometría de masas).

En una realización, el candidato seleccionado conserva al menos el 20 %, preferiblemente al menos el 30 %, preferiblemente al menos el 40 %, preferiblemente al menos el 50 % o preferiblemente al menos el 60 % de su concentración inicial después de 1 hora, tal como se ha mencionado anteriormente.

En una realización, el candidato seleccionado conserva al menos 30 % de su concentración inicial después de 2 horas, más preferiblemente al menos 20 % de su concentración inicial después de 4 horas, y lo más preferiblemente al menos 10 % de su concentración inicial después de 8 horas, medido como se menciona arriba.

En una realización, el análisis de persistencia se lleva a cabo de la siguiente manera: se aplican 50 μ l de una solución al 1 % del candidato identificado a probar en alcohol, preferiblemente etanol, en una tira de prueba de perfume, preferiblemente una tira de prueba de perfume de celulosa, para ser dosificado. La tira se deja secar en condiciones ambientales de laboratorio, con un movimiento de aire ambiente normal, en particular sin ventilador, calefacción o cualquier medio o dispositivo para acelerar la evaporación. Después de diferentes tiempos, se extrae cada tira o al menos la parte de la tira de prueba de perfume que incluye el área donde se aplicó la solución del candidato identificado a probar utilizando 3 ml de alcohol, preferiblemente etanol, que contiene un patrón interno, como el decanoato de metilo. Los extractos se analizan a continuación por cromatografía de gases y el resultado se normaliza para el ion molecular principal del candidato identificado usando el valor para el patrón interno.

Por ejemplo, los extractos se analizan por GC-MS de acuerdo con cualquier análisis convencional realizado por los expertos en mediciones de GC-MS, o cualquier método estándar proporcionado por el proveedor del instrumento. Este análisis puede realizarse usando una columna de cromatografía de gases polar o no polar, y preferiblemente una columna de cromatografía de gases no polar. Como ejemplo de columnas de cromatografía de gases no polares, se puede mencionar una columna BC-WAX (50 m * 0,25 mm * 0,15 μ m), que es una columna de GC Sciences suministrada por Interchim (Montluçon, Francia), y una columna HP-5MS UI (30 m * 0,25 mm * 0,25 μ m), que es una columna Agilent suministrada por Chromoptic (Courtaboeuf, Francia).

En otro aspecto, la identificación de un material odorante de pachulí adecuado como un sustituto de aceite de pachulí se lleva a cabo mediante un método que comprende las etapas de o consiste en:

- a) identificar un material odorante de pachulí candidato por el método descrito anteriormente; y
b2) someter el candidato identificado a una prueba olfativa.

La prueba olfativa comprende comparar una muestra que contiene aceite de pachulí, preferiblemente una muestra que contiene solo aceite de pachulí, con una muestra que contiene aceite de pachulí y el candidato identificado, preferiblemente una muestra que contiene aceite de pachulí, el candidato identificado y un disolvente. El candidato identificado pasa la prueba si no hay diferencia sensorial perceptible entre las dos muestras, esta diferencia se evalúa mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica de la perfumería. En una realización, la prueba olfativa se lleva a cabo siguiendo el método de prueba estándar para análisis sensorial (prueba triangular) tal como se define en la norma ASTM (American Society for Testing and Materials) E 1885 - 97 (edición aprobada el 10 de julio de 1997; publicada en agosto de 1998). Este método de prueba cubre un procedimiento para determinar si existe una diferencia sensorial perceptible entre muestras de dos productos. En el protocolo de la prueba olfativa, se realiza una comparación entre dos muestras solamente, a saber, una muestra que contiene 100 % en peso de aceite de pachulí y una muestra que contiene 50 % en peso de aceite de pachulí + x % en peso del "candidato" + (100-50-x) % en peso de disolvente (generalmente dipropilenglicol, DPG). Un material candidato pasa la prueba si no hay diferencia sensorial perceptible entre las dos muestras en la prueba triangular como se define en la norma mencionada anteriormente. El material candidato que pasa la prueba olfativa es por lo tanto adecuado como sustituyente del olor característico de pachulí, y puede formularse en una composición de fragancia. El experto apreciará que la cantidad (x % en peso) de material candidato a usar depende de la concentración olfativa de ese material.

En otro aspecto, la identificación de un material odorante de pachulí adecuado como un sustituto de aceite de pachulí se lleva a cabo mediante un método que comprende las etapas de o consiste en:

- a) identificar un material odorante de pachulí candidato por el método descrito anteriormente;
b1) someter el candidato identificado a una prueba de persistencia;
b2) someter el candidato identificado a una prueba olfativa;
siendo dicha prueba de persistencia y la prueba olfativa como se han definido anteriormente.

En una realización, las etapas de este método se llevan a cabo en el siguiente orden: a), b1), b2).

En otra realización, las etapas de este método se llevan a cabo en el siguiente orden: a), b2), b1).

En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una muestra que expresa el receptor OR11A1 para identificar un material odorante de pachulí candidato después del aumento de la actividad de dicho receptor por dicho material.

Todas las realizaciones preferidas mencionadas anteriormente con respecto al método de identificación de un material odorante de pachulí son también realizaciones preferidas del uso de acuerdo con la presente invención.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitativos y los dibujos adjuntos, en los que:

- Las **Figuras 1A y 1B** muestran las respuestas de cada uno de los 65 receptores olfativos analizados frente a la concentración 10 μ M de isoproterenol o androstenona (A) y a las concentraciones 10 μ M, 30 μ M y 100 μ M de aceite de pachulí (B).
- La **Figura 2** representa un dendrograma de la subfamilia OR11A1.
- Las **Figuras 3A a 3C** muestran las respuestas dependientes de la concentración de OR11A1 y OR11L1 después de la estimulación con aceite de pachulí (A) y R2335 (B) o la comparación directa de las respuestas de OR11A1 frente al aceite de pachulí y R2335 (C).
- La **Figura 4** muestra las respuestas de los receptores relacionados con OR11A1 frente a los odorantes (corte en el eje y en 2) alcohol de pachulí y pacho 315.
- La **Figura 5** muestra las respuestas de OR11A1 frente a los odorantes pacho 315, alcohol de pachulí, terranol, andrano, pogostona y alcohol de norpachulí.
- La **Figura 6** muestra las respuestas dependientes de la concentración de OR11A1 después de la estimulación con los odorantes pogostona, alcohol de norpachulí, alcohol de pachulí y pacho 315.
- Las **Figuras 7A y 7B** muestran el análisis de persistencia del alcohol de pachulí.
- La **Figura 8** muestra el análisis de persistencia de pogostona.

Ejemplos

Líneas celulares, medios y condiciones del cultivo celular

Los experimentos se realizaron usando una línea celular HEK293 (depositada en la ATCC con N.º de acceso CRL-1573) que expresaba establemente la proteína G α olf y la subunidad A2 del canal iónico regulado por nucleótidos cíclicos (CNGA2) (denominada en la presente memoria HEKOlf). Como se describe por Shirokova et al., 2005, el

ADNc de la Golf humana se clonó en el vector de expresión de mamíferos pPuro y se clonó el ADNc de la subunidad A2 del canal iónico regulado por nucleótidos cíclicos (CNGA2) en el vector de expresión de mamíferos pcDNA3. Ambas construcciones se transfectaron usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron clones celulares que expresan establemente Golf y CNGA2 por selección de antibióticos con puromicina 0,5 µg/ml y geneticina 200 µg/ml.

La línea celular HEK0If se mantuvo en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Euroclone) complementado con 10 % de FBS (suero fetal bovino, Euroclone cat. ECS0180L), penicilina/estreptomicina 1 % (Euroclone cat. B3001D), G418 50 µg/ml, higromicina 25 µg/ml y blasticidina 2,5 µg/ml, puromicina 0,5 µg/ml y zeocina 3 µg/ml.

Las condiciones de propagación estándar consisten en sembrar $1,5 - 1,8 \times 10^6$ células en un matraz T75 dos veces por semana, recuperándose aproximadamente $10-15 \times 10^6$ células con ~ 80 % de confluencia.

Clonación de receptores olfativos humanos

El ADNc de los receptores olfativos humanos se obtuvo por PCR a partir de ADN genómico humano (Clonetech), y se clonó en el marco 3' de un epítipo de localización transmembrana en un vector de expresión pcDNA5 (Bufe et al., 2002). La identidad correcta de cada receptor olfativo individual se verificó por secuenciación automática.

La correspondencia entre los nombres de los receptores olfativos como se usa en la presente memoria y en las figuras y los respectivos números de acceso de GeneBank se describen en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1

Receptor	N.º Acceso en GeneBank	Nombre
OR6A2	NM_003696	OR1
OR6Q1	NM_001005186	OR2
OR6C68	NM_001005519	OR3
OR6F1	NM_001005286	OR4
OR6X1	NM_001005188	OR5
OR6N2	NM_001005278	OR6
OR7A10	NM_001005190	OR7
OR7E24	BK004227	OR8
OR7D4	NM_001005191.2	OR9
OR8K5	NM_001004058	OR10
OR8A1	NM_001005194	OR11
OR8B4	NM_001005196	OR12
OR9G1	NM_001005213	OR13
OR9K2	NM_001005243	OR14
OR10A5	NM_178168	OR15
OR10V1	NM_001005324	OR16
OR10G2	NM_001005466	OR17
OR10G8	NM_001004464	OR18
OR11A1	BK004208.1	OR19
OR11L1	NM_001001959.1	OR20
OR12D2	NM_013936	OR21
OR12D3	NM_030959	OR22
OR13C2	NM_001004481	OR23
OR13C3	NM_001001961	OR24
OR13C4	NM_001001919	OR25
OR13C5	NM_001004482	OR26
OR13C8	NM_001004483	OR27
OR13C9	NM_001001956	OR28
OR14A16	NM_001001966	OR29
OR14I1	NM_001004734	OR30
OR1A1	NM_014565	OR31

OR1D2	NM_002548	OR32
OR1L1	NM_001005236	OR33
OR1Q1	NM_012364	OR34
OR2A1	NM_001005287	OR35
OR2A7	NM_001005328	OR36
OR2B11	NM_001004492	OR37
OR2F2	NM_001004685	OR38
OR2J3	NM_001005216	OR39
OR2AE1	NM_001005276	OR40
OR2Z1	NM_001004699	OR41
OR2T1	NM_030904	OR42
OR2T34	NM_001001821	OR43
OR2AJ1	AB065626	OR44
OR2AG2	NM_001004490	OR45
OR2AP1	AB065868	OR46
OR2AT4	NM_001005285	OR47
OR2S2	NM_019897	OR48
OR3A1	NM_002550	OR49
OR3A4	NM_001005334	OR50
OR4A15	NM_001005275	OR51
OR4S1	NM_001004725	OR52
OR4D1	NM_012374	OR53
OR4Q3	NM_172194	OR54
OR4F15	NM_001001674	OR55
OR4E2	NM_001001912	OR56
OR5AP2	NM_001002925	OR57
OR5I1	NM_006637	OR58
OR5AC2	NM_054106	OR59
OR5K4	NM_001005517	OR60
OR5A1	NM_001004728	OR61
OR5AK2	NM_001005323	OR62
OR5D13	NM_001001967	OR63
OR5J2	NM_001005492	OR64
OR5M1	NM_001004740	OR65
pcDNA5		vector vacío
OR7D4	NM_001005191	receptor control positivo
hTAS2R16	NM_016945	receptor control negativo

Ligandos y tampones

- 5 Todos los odorantes se almacenaron en la oscuridad a 4 °C hasta el momento de su utilización. Se prepararon en soluciones madre 100 mM usando DMSO como disolvente y se almacenaron a -20 °C. El día del experimento, las diferentes soluciones madre se diluyeron directamente en el tampón de ensayo (tampón de Tyrode) que tenía la siguiente composición: KCl 5 mM, NaCl 130 mM, CaCl₂ 2 mM, NaHCO₃ 5 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4. Los odorantes se usaron en las concentraciones indicadas en las tablas 2-4 a continuación.

10 Instrumentación y materiales desechables

Los experimentos se realizaron usando FLIPR^{TETRA} (Molecular Devices). Las células se transfectaron y se sembraron en placas de ensayo negras de poliestireno de 384 pocillos, fondo negro/transparente (MATRIX N° Artículo CPL-4332).

15

Transfección transitoria con Lipofectamina 2000

Todas las transfecciones transitorias se realizaron con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se diluyeron 10 μ l de Lipofectamina 2000 en 500 μ l de DMEM y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Al mismo tiempo, se diluyeron 3 μ g de ADN plasmídico en 500 μ l de DMEM y se añadieron a la mezcla de Lipofectamina 2000 hasta obtener un volumen final de 1000 μ l. Después de incubar durante otros 30 minutos a temperatura ambiente, se añadió el complejo ADN-Lipofectamina a 1000 μ l de una suspensión celular que contenía 1.600.000 células/ml. Posteriormente, se sembraron 25 μ l por pocillo de la mezcla completa en placas de ensayo de poliestireno negras de 384 pocillos. Se añadieron 25 μ l de DMEM que contenía FBS 20 % a cada pocillo 3 horas después de la transfección.

Medición de la luminiscencia en FLIPR^{TETRA}

Se cotransfectaron los ADNc de todos los receptores olfativos y un vector de control vacío con pGL4.29 (Promega). El vector pGL4.29 contiene un elemento de respuesta de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) que impulsa la transcripción del gen indicador de luciferasa *luc2P* (*Photinus pyralis*). *luc2P* es una secuencia de luciferasa derivada sintéticamente con optimización de codones humanizados que está diseñada para una alta expresión y una transcripción anómala reducida.

En este ensayo, la interacción de un odorante con su receptor olfativo afín conduce a la activación de la proteína G humana G α olf. G α olf es una proteína G estimuladora (G α s) y activa la adenilato ciclasa, que convierte el adenosín trifosfato (ATP) en AMPc. Por lo tanto, la actividad de la luciferasa transcrita se puede usar como una indicación de la activación del receptor olfativo.

Veinticuatro horas después de la transfección, el medio se eliminó de las células transfectadas y se añadieron 30 μ l de tampón de Tyrode que contenía los odorantes diluidos y se incubaron durante 6 horas a 37 °C. Las células se transfirieron luego a un lector de placa de imagen fluorométrica automatizado (FLIPR^{TETRA}, Molecular Devices). Posteriormente, se añadieron 25 μ l de una mezcla compuesta de Triton X- 100 y luciferina (1:1). La adición de esta mezcla dio lugar a lisis celular y permitió la interacción de la luciferasa con su sustrato luciferina dando como resultado una emisión detectable de luz.

Análisis de los datos

Los datos obtenidos de diferentes réplicas de pocillos se analizaron con Excel, ScreenWorks y SigmaPlot 10. Las respuestas de cada receptor a los odorantes se dividieron por las respuestas medias del receptor hacia el tampón de Tyrode (factor de cambio FOC1). La especificidad de FOC1 se verificó mediante la comparación con un segundo FOC (FOC2) obtenido estimulando una muestra de control, que consistía en un vector de expresión vacío, con los mismos odorantes y el tampón de Tyrode. Se calculó la media y la desviación estándar de los valores de los factores de cambio resultantes y se trazaron en gráficos de barras verticales o curvas de concentración-respuesta ajustadas mediante el software SigmaPlot 10.

RESULTADOS

Ejemplo 1: Identificación del OR humano para el odorante de pachulí

Para identificar posibles interacciones del aceite esencial de pachulí con diferentes receptores olfativos humanos, las células HEK293 se transfectaron transitoriamente con ADN plasmídico para 65 receptores olfativos humanos y, por separado, con un plásmido de control que sirvió como control negativo, como se describió anteriormente.

La androstenona se usó como un activador de OR7D4, que sirvió como un control positivo para la actividad del receptor olfativo general (Keller et al., 2007). Isoproterenol activa el receptor beta-2-adrenérgico que se expresa endógenamente y se acopla a la G α olf humana en células HEK293. La actividad celular provocada por isoproterenol demostró la viabilidad de las células y la funcionalidad correcta de la cascada de señalización.

Los diferentes odorantes probados en los receptores olfativos humanos se mencionan en la Tabla 2:

Tabla 2

Compuesto	Concentraciones utilizadas (μ M)	Proveedor
androstenona	10	Sigma-Aldrich
isoproterenol	10	Sigma-Aldrich
aceite de pachulí	0,1/0,3/1/3/10/30/60/100	Takasago

Cada placa de compuesto contenía solo un odorante para probar y se aplicó a las tres placas transfectadas de forma diferente que contenían los 65 receptores olfativos disponibles. Además, OR7D4 (control positivo) y un vector de expresión de pcDNA5 vacío (simulado, control negativo) estaban presentes en cada placa. El receptor de sabor

amargo humano TAS2R16 (Bufe et al., 2002) sirvió como un control negativo adicional.

5 La aplicación de 10 μM de isoproterenol condujo a señales detectables en todas las células transfectadas, lo que corroboró la vitalidad celular y la funcionalidad correcta de la cascada de señalización. Además, la androstenona 10 μM activó intensamente el OR7D4, mientras que los 65 receptores olfativos ensayados, incluido el receptor de control negativo (hTAS2R16), no respondieron a este compuesto.

10 El cribado de los odorantes frente al conjunto de 65 receptores olfativos humanos (OR) identificó que OR11A1 es específicamente sensible al aceite de pachulí. Ningún otro OR humano respondió a este odorante. Además, todas las concentraciones probadas activaron este receptor. Las Figuras 1A y 1B muestran las respuestas del OR ensayado a isoproterenol, androstenona y a tres concentraciones de aceite esencial de pachulí.

Ejemplo 2: Caracterización del receptor olfativo humano identificado para el aceite de pachulí

15 Para determinar la potencia y la eficacia del aceite de pachulí, las células HEK293 se transfectaron con el ADNc del OR11A1 (SEC ID N°: 1). Adicionalmente, las células también se transfectaron con el ADNc de OR11L1 de la secuencia SEC ID N°: 3, un receptor olfativo humano que pertenece a la misma subfamilia que OR11A1.

SEQ ID NO: 3

ATGGAGCCCC AAAATACCTC CACTGTGACT AACTTTCAGC TGTTAGGATT CCAGAACCTT
 CTTGAATGGC AGGCCCTGCT CTTTGTCACT TTCCTGCTCA TCTACTGCCT GACCATTATA
 GGAATGTTG TCATCATCAC CGTGGTGAGC CAGGGCCTGC GACTGCACTC CCCTATGTAC
 ATGTTCTCC AGCATCTCTC CTTTCTGGAG GTCTGGTACA CGTCCACCAC TGTGCCCTT
 CTCCTAGCCA ACCTGCTGTC CTGGGGCCAA GCCATCTCCT TCTCTGCCTG CATGGCACAG
 CTCTACTTCT TCGTATTCTT CGGCGCCACC GAGTGCTTTC TCCTGGCCTT CATGGCCTAT
 GACCGTTACC TGGCCATCTG CAGCCCACTC CGTACCCCT TCCTCATGCA TCGTGGGCTC
 TGTGCCAGGT TGGTGGTGGT CTCTGGTGC ACAGGGGTCA GCACAGGCTT TCTGCCTTCC
 CTGATGATTT CCAGGTTGGA CTTCTGTGGG CGCAATCAGA TTAACCATTT CTTCTGCGAC
 CTCCCGCCAC TCATGCAGCT CTCCTGTTCC AGAGTTTATA TCACCGAGGT GACCATCTTC
 ATCCTGTCAA TTGCCGTGCT GTGCATTTGT TTTTTTCTGA CACTGGGGCC CTATGTTTTT
 ATTGTGTCCT CCATATTGAG AATCCCTTCC ACCTCTGGCC GGAGAAAGAC CTTTTCCACA
 TGTGGCTCCC ACCTGGCTGT TGCTACTCTC TACTACGGGA CCATGATCTC CATGTATGTG
 TGTCCCAGTC CCCACCTGTT GCCTGAAATC AACAAAGATCA TTTCTGTCTT CTACACTGTG
 GTCACACCAC TGCTGAACCC AGTTATCTAC AGCTTGAGGA ACAAAGACTT CAAAGAAGCT
 GTTAGAAAGG TCATGAGAAG GAAATGTGGT ATTCTATGGA GTACAAGTAA AAGGAAGTTC
 CTTTATTGA

20 La Figura 2 representa un dendrograma de la subfamilia OR11A1.

25 Las células transfectadas con los ADNc de OR11A1 y OR11L1 se estimularon después con concentraciones crecientes (0,1 μM /0,3 μM /1 μM /3 μM /10 μM /30 μM /60 μM /100 μM) de aceite de pachulí (Takasago, peso molecular: 500) y una fracción de aceite de pachulí enriquecida en alcohol de pachulí, denominado R2335, disponible comercialmente y proporcionado por Robertet con la referencia "Patchouli Heart" o "Patchouli Coeur".

30 Las células transfectadas con OR11A1 respondieron al aceite de pachulí y R2335 de una manera dependiente de la concentración (figura 3C). Curiosamente, ninguno de los compuestos pudo activar OR11L1, un OR humano que pertenece a la misma subfamilia de 8 receptores (figuras 3A y 3B). R2335 tenía una potencia ligeramente mayor sobre OR11A1 (EC_{50} 3,3 \pm 0,8 mM) que el aceite de pachulí (EC_{50} 7,6 \pm 0,6 mM). Notablemente, la aplicación de ambos odorantes en concentraciones superiores a 30 μM condujo a una fuerte reducción de la señal, presumiblemente debido a interacciones tóxicas inespecíficas de ambos compuestos con las células. En conjunto,

estos resultados muestran que OR11A1 responde específicamente a los odorantes de pachulí.

Ejemplo 3: Respuesta de receptores relacionados con OR11A1 frente a diferentes odorantes

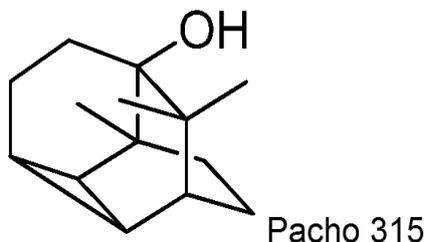
5 Para investigar la respuesta de los receptores relacionados con OR11A1 frente a diferentes odorantes (alcohol de pachulí (peso molecular (MW) 222) y pacho 315 (MW 220), la estructura de este último se muestra a continuación), las células fueron transfectadas transitoriamente con ADN plasmídico de siete receptores relacionados con OR11A1 que pertenecen a un pequeño subconjunto de receptores relacionados estructuralmente (ver figura 2) y un plásmido de control que sirvió como control negativo.

10 Los diferentes odorantes probados en receptores relacionados con OR11A1 y OR11L1 son como se menciona en la Tabla 3:

Tabla 3

Compuesto	Concentraciones utilizadas (μM)
Alcohol de pachulí	10/30/100
Pacho 315*	10/30/100

15 * 6a, 7,7-trimetildecahidro-1,4-metanociclopropana[de]naftalen-1-ol (Fórmula química: $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}$; masa exacta: 206,17), divulgado en solicitudes de patente japonesa N.º 2012-103867 y N.º 2012-103868.



20 Veinticuatro horas después de la transfección, las células se estimularon con tres concentraciones diferentes de los odorantes como se menciona anteriormente.

25 Los resultados se muestran en la Figura 4. Como se observó en experimentos previos, pacho 315 y el alcohol de pachulí activaron fuertemente OR11A1 pero no pudieron provocar una respuesta detectable en células transfectadas con OR11L1. Además, ninguno de los otros siete receptores olfativos relacionados con OR11A1 respondieron a los odorantes probados (figura 4, factor de cambio alrededor de 1).

30 Una posible explicación para esto podría ser la identidad de aminoácidos relativamente baja de los siete receptores olfativos relacionados con OR11A1 en comparación con OR11A1, que no es superior al 46 %.

Ejemplo 4: Respuesta de OR11A1 frente a diferentes odorantes

35 Para investigar la respuesta del receptor OR11A1 frente a diferentes odorantes (alcohol de pachulí, pacho 315, terranol (N.º CAS 57566-26-4, MW 222), andrano (N.º CAS 13567-39-0, MW 220), pogostona (N.º CAS 23800-56-8, MW 224), alcohol norpachulí, MW 206), las células HEKO1f se transfectaron transitoriamente con el ADN del plásmido para el receptor OR11A1 como se describió anteriormente.

40 Los diferentes odorantes probados en el receptor OR11A1 son como se menciona en la Tabla 4:

Tabla 4

Compuesto	Concentraciones utilizadas (μM)
Alcohol de pachulí	0,03/0,1/0,3/1/3/6/10/30/100
Pacho 315	0,03/0,1/0,3/1/3/6/10/30/100
Terranol	3/10/30
Andrano	3/10/30
Pogostona	0,03/0,1/0,3/1/3/6/10/30/100
Alcohol de norpachulí	0,03/0,1/0,3/1/3/6/10/30/100

Los resultados obtenidos con concentraciones de prueba de 3, 10 y 30 μM se muestran en la Figura 5.

Como se observó en experimentos previos, pachó 315 activó fuertemente OR11A1. Además, el alcohol de pachulí también activó OR11A1. Esto confirma nuevamente la actividad de estos dos odorantes de pachulí sobre OR11A1. De los cuatro odorantes recién probados, solo el alcohol de pogostona y el alcohol de norpachulí pudieron provocar la activación en células transfectadas con OR11A1. El terranol y el andrano no activaron OR11A1 hasta 100 μM . Las células que se transfectaron con el plásmido de control no respondieron a ninguno de los odorantes probados (no mostrados).

Se probaron adicionalmente cuatro odorantes relacionados con el pachulí diferentes como se describió anteriormente para determinar su capacidad de activar OR11A1, el receptor identificado que responde específicamente a los odorantes de pachulí.

Los resultados obtenidos con concentraciones mayores de pachó 315, alcohol de pachulí, alcohol de norpachulí y pogostona desde 0,1 hasta 100 μM se muestran en la Figura 6.

Los resultados muestran que las células transfectadas con el receptor OR11A1 respondían a los diferentes odorantes de una manera dependiente de la concentración. La potencia y eficacia en OR11A1 fue más alta para Pachó 315. La activación de OR11A1 por el alcohol de pachulí, el alcohol de norpachulí y la pogostona fue comparable, lo que está indicada por solo pequeñas diferencias en los valores EC_{50} (tabla 5).

Tabla 5

Compuesto	EC_{50} (μM)
Pachó 315	$2,9 \pm 0,9$
Alcohol de pachulí	$12,1 \pm 1,7$
Pogostona	$14,8 \pm 3,3$
Alcohol de norpachulí	$14,8 \pm 3,3$

Ejemplo 5: Análisis de persistencia del alcohol de pachulí

Se añadieron 50 μl de una solución al 1 % de alcohol de pachulí en etanol con una pipeta a la punta a una serie de diferentes tiras de prueba de perfume (SARL H. GRANGER-VEYRON, Privas, Francia). Las tiras se dejaron secar en condiciones ambientales de laboratorio.

Después de diferentes tiempos (t_0 , $t_0 + 1$ hora, $t_0 + 2$ horas, $t_0 + 4$ horas, $t_0 + 8$ horas), se cortó la punta de una tira donde se habían aplicado los 50 μl de la solución del material ensayado y se colocó en una botella de 30 ml y se extrajo usando 3 ml de etanol, que contenía 50 μl de decanoato de metilo como patrón interno (10.000 ppm de solución en ciclohexano), añadido a cada botella. Se tuvo cuidado de asegurar que toda el área alrededor del punto de aplicación se incluyera en el área que se cortó y se extrajo. El contenido de las botellas se mezcló durante 30 minutos en un lecho de rodillos, y se llenaron viales de 2 ml con cada muestra.

Las muestras se triplicaron, es decir, se analizaron 3 puntas de tira de prueba de perfume para cada punto temporal.

En una primera serie de experimentos, las muestras tomadas a t_0 , $t_0 + 1$ hora y $t_0 + 2$ horas se analizaron por GC-MS en una columna de cromatografía de gases no polar (columna BC-WAX (50 m * 0,25 mm * 0,15 μm) que es una Columna GC Sciences suministrada por Interchim, Montluçon, Francia). Los resultados se muestran en las Tablas 6-8 y en la Figura 7A.

En una segunda serie de experimentos, las muestras tomadas a t_0 , $t_0 + 4$ horas y $t_0 + 8$ horas se analizaron por GC-MS en una columna de cromatografía de gases no polar (HP-5MS UI (30 m * 0,25 mm * 0,25 μm) que es una Columna Agilent suministrada por Chromoptic, Courtaboeuf, Francia). Los resultados se muestran en las Tablas 9-11 y en la Figura 7B.

En las Tablas 6-11, AP significa alcohol de pachulí y PI significa el patrón interno, es decir, decanoato de metilo. Cuando se trazó la concentración residual de pachulí en la tira de prueba de perfume en función del tiempo, la relación media en t_0 se normalizó a 100 y luego se calcularon $t_0 + 1$ h, $t_0 + 2$ h, $t_0 + 4$ h y $t_0 + 8$ h; t_0 se define como 2 minutos después de dosificar los 50 μl de la solución del material analizado, que se aplicó hacia la punta de la tira de prueba de perfume.

Estos resultados muestran que el AP conserva al menos 10 % de su concentración inicial después de 1 hora cuando se aplica a un sustrato específico.

Tabla 6: t_0 (AP)

	muestra 1	muestra 2	muestra 3	valor medio	desv. est. %
AP	2,98E+06	2,87E+06	2,94E+06	2,93E+06	1,84
PI	3,16E+06	2,90E+06	3,03E+06	3,03E+06	4,28
Relación AP/PI	9,42E-01	9,89E-01	9,69E-01	9,67E-01	2,47

Tabla 7: t0 + 1 h (AP)

	muestra 1	muestra 2	muestra 3	valor medio	desv. est. %
AP	2,10E+06	2,12E+06	2,05E+06	2,09E+06	1,66
PI	3,23E+06	2,96E+06	3,19E+06	3,13E+06	4,76
Relación AP/PI	6,50E-01	7,16E-01	6,43E-01	6,70E-01	6,07

Tabla 8: t0 + 2 h (AP)

	muestra 1	muestra 2	muestra 3	valor medio	desv. est. %
AP	1,38E+06	1,32E+06	1,35E+06	1,35E+06	2,38
PI	3,70E+06	2,91E+06	2,93E+06	3,18E+06	14,04
Relación AP/PI	3,74E-01	4,52E-01	4,62E-01	4,29E-01	11,25

5

Tabla 9: t0 (AP)

	muestra 1	muestra 2	muestra 3	valor medio	desv. est. %
AP	9,37E+06	9,23E+06	8,94E+06	9,18E+06	2,41
PI	7,51E+06	7,57E+06	7,09E+06	7,39E+06	3,54
Relación AP/PI	1,25E+00	1,22E+00	1,26E+00	1,24E+00	1,71

Tabla 10: t0 + 4 h (AP)

	muestra 1	muestra 2	muestra 3	valor medio	desv. est. %
AP	3,83E+06	2,94E+06	3,00E+06	3,26E+06	15,28
PI	8,21E+06	7,57E+06	7,71E+06	7,83E+06	4,33
Relación AP/PI	4,67E-01	3,89E-01	3,89E-01	4,15E-01	10,80

Tabla 11: t0 + 8 h (AP)

	muestra 1	muestra 2	muestra 3	valor medio	desv. est. %
AP	2,02E+06	1,37E+06	1,35E+06	1,58E+06	24,26
PI	9,36E+06	7,73E+06	8,17E+06	8,42E+06	10,02
Relación AP/PI	2,16E-01	1,77E-01	1,65E-01	1,86E-01	14,37

10

Ejemplo 6: Análisis de persistencia de pogostona

Se realizó un análisis de persistencia de pogostona como se describe en el Ejemplo 5 con muestras tomadas a t0, t0 + 1 hora y t0 + 2 horas. Los resultados se muestran en las tablas 12-14 y en la Figura 8.

15

En las Tablas 12-14 a continuación, POG significa pogostona y PI significa el patrón interno, es decir, decanoato de metilo. La relación media en t0 se normalizó como se describe en el Ejemplo 5.

Estos resultados muestran que POG retiene al menos el 10 % de su concentración inicial después de 1 hora.

20

Tabla 12: t0 (POG)

	muestra 1	muestra 2	muestra 3	valor medio	desv. est. %
POG	1,17E+06	1,06E+06	1,09E+06	1,11E+06	4,71
PI	4,00E+06	4,34E+06	4,42E+06	4,25E+06	5,27
Relación POG/PI	2,92E-01	2,45E-01	2,48E-01	2,61E-01	10,01

Tabla 13: t0 + 1 h (POG)

	muestra 1	muestra 2	muestra 3	valor medio	desv. est. %
POG	1,05E+06	9,11E+05	9,09E+05	9,55E+05	8,19
PI	4,71E+06	4,60E+06	4,47E+06	4,59E+06	2,58
Relación POG/PI	2,22E-01	1,98E-01	2,03E-01	2,08E-01	6,05

25

Tabla 14: t0 + 2 h (POG)

	muestra 1	muestra 2	muestra 3	valor medio	desv. est. %
POG	8,11E+05	8,75E+05	8,15E+05	8,34E+05	4,32
PI	4,64E+06	4,69E+06	4,39E+06	4,57E+06	3,43
Relación POG/PI	1,75E-01	1,87E-01	1,85E-01	1,82E-01	3,59

Referencias

- Bufe B, Hofmann T, Krautwurst D, Raguse JD, Meyerhof W.
The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to beta-glucopyranosides. Nat Genet. 2002 Nov;32(3):397-401.
- Von Dannecker LE, Mercadante AF, Malnic B.

30

- Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein Galphaolf.
 J Neurosci. 2005 Apr 13;25(15):3793-800.
- 5 - Von Dannecker LE, Mercadante AF, Malnic B.
 Ric-8B promotes functional expression of odorant receptors.
 Proc Natl Acad Sci USA. 2006 Jun 13;103(24):9310-4.
 - Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB.
 Combinatorial receptor codes for odors.
 Cell. 1999 Mar 5;96(5):713-23.
 - 10 - Glusman G, Bahar A, Sharon D, Pilpel Y, White J, Lancet D.
 The olfactory receptor gene superfamily: data mining, classification, and nomenclature. Mamm Genome. 2000
 Nov;11(11): 1016-23.
 - Keller A, Zhuang H, Chi Q, Vosshall LB, Matsunami H.
 Genetic variation in a human odorant receptor alters odour perception.
 15 Nature. 2007 Sep 27;449(7161):468-72.
 - Shirokova E, Schmiedeberg K, Bedner P, Niessen H, Willecke K, Raguse JD, Meyerhof W, Krautwurst D.
 Identification of specific ligands for orphan olfactory receptors.
 J Biol Chem. 2005 Mar 25;280(12):11807-15.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> TAKASAGO INTERNATIONAL CORPORATION
- <120> MÉTODO PARA IDENTIFICAR MATERIALES ODORANTES DE PACHULÍ
- 25 <130> 3J248230 0132 EP OEB
- <160> 3
- 30 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 948
- <212> ADN
- 35 <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 665 906 T3

```

atggaaattg tctccacagg aaacgaaact attactgaat ttgtcctcct tggcttctat    60
gacatccctg aactgcattt ctgttttttt attgtattca ctgctgtcta tgtottcato    120
atcatagggg aatagctgat tattgtagca gtggttagct ccagagggt ccacaaaccc    180
atgtatattt tcttggegaa tctgtccttc ctggatattc tctacacctc cgcagtgatg    240
ccaaaaatgc tggagggctt cctgcaagaa gcaactatct ctgtggctgg ttgcttgctc    300
cagttcttta tctteggctc tctagccaca gctgaatgct tactgctggc tgtcatggca    360
tatgaccgct acctggcaat ttgctacca ctccactacc cactcctgat ggggccaga    420
cgttacatgg ggctgggtgt cacaacctgg ctctctggat ttgtggtaga tggactggtt    480
gtggccctgg tggcccagct gaggttctgt ggcccacaac acattgacca gttttactgt    540
gactttatgc ttttcgtggg cctggcttgc tcggatccca gagtggctca ggtgacaact    600
ctcattctgt ctgtgttctg cctcactatt ccttttggac tgattctgac atcttatgcc    660
agaattgtgg tggcagtgct gagagttcct gctggggcaa gcaggagaag ggctttctcc    720
acatgctcct ccacctagc tgtagtgacc acattctatg gaacgctcat gatcttttat    780
gttgaccctc ctgctgtcca ttcccagctc ctctccaagg tcttctccct gctctacact    840
gtggtcacc cctctctcaa tcctgtgatc tataccatga ggaacaagga ggtgcatcag    900
gcacttcgga agattctctg tatcaaaaa actgaaacac ttgattga                    948

```

<210> 2
 <211> 315
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

5

```

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

```

```

Leu Gly Phe Tyr Asp Ile Pro Glu Leu His Phe Leu Phe Phe Ile Val

```

10

ES 2 665 906 T3

			20						25						30
Phe	Thr	Ala	Val	Tyr	Val	Phe	Ile	Ile	Ile	Gly	Asn	Met	Leu	Ile	Ile
		35					40					45			
Val	Ala	Val	Val	Ser	Ser	Gln	Arg	Leu	His	Lys	Pro	Met	Tyr	Ile	Phe
	50					55					60				
Leu	Ala	Asn	Leu	Ser	Phe	Leu	Asp	Ile	Leu	Tyr	Thr	Ser	Ala	Val	Met
65					70					75					80
Pro	Lys	Met	Leu	Glu	Gly	Phe	Leu	Gln	Glu	Ala	Thr	Ile	Ser	Val	Ala
				85					90					95	
Gly	Cys	Leu	Leu	Gln	Phe	Phe	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	Thr	Ala	Glu
			100					105					110		
Cys	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	Met	Ala	Tyr	Asp	Arg	Tyr	Leu	Ala	Ile	Cys
			115				120					125			
Tyr	Pro	Leu	His	Tyr	Pro	Leu	Leu	Met	Gly	Pro	Arg	Arg	Tyr	Met	Gly
	130					135					140				
Leu	Val	Val	Thr	Thr	Trp	Leu	Ser	Gly	Phe	Val	Val	Asp	Gly	Leu	Val
145					150					155					160
Val	Ala	Leu	Val	Ala	Gln	Leu	Arg	Phe	Cys	Gly	Pro	Asn	His	Ile	Asp
				165					170					175	
Gln	Phe	Tyr	Cys	Asp	Phe	Met	Leu	Phe	Val	Gly	Leu	Ala	Cys	Ser	Asp
			180					185					190		
Pro	Arg	Val	Ala	Gln	Val	Thr	Thr	Leu	Ile	Leu	Ser	Val	Phe	Cys	Leu
		195					200					205			
Thr	Ile	Pro	Phe	Gly	Leu	Ile	Leu	Thr	Ser	Tyr	Ala	Arg	Ile	Val	Val
	210					215					220				
Ala	Val	Leu	Arg	Val	Pro	Ala	Gly	Ala	Ser	Arg	Arg	Arg	Ala	Phe	Ser
225					230					235					240
Thr	Cys	Ser	Ser	His	Leu	Ala	Val	Val	Thr	Thr	Phe	Tyr	Gly	Thr	Leu
				245					250					255	
Met	Ile	Phe	Tyr	Val	Ala	Pro	Ser	Ala	Val	His	Ser	Gln	Leu	Leu	Ser
			260					265					270		

ES 2 665 906 T3

Lys Val Phe Ser Leu Leu Tyr Thr Val Val Thr Pro Leu Phe Asn Pro
 275 280 285

Val Ile Tyr Thr Met Arg Asn Lys Glu Val His Gln Ala Leu Arg Lys
 290 295 300

Ile Leu Cys Ile Lys Gln Thr Glu Thr Leu Asp
 305 310 315

<210> 3
 <211> 969
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

atggagcccc aaaatacctc cactgtgact aactttcagc tgtaggatt ccagaacott 60
 cttgaatggc aggcocctgct ctttgtcatt ttctctgctca tctactgcct gaccattata 120
 gggaatgttg tcatcatcac cgtgggtgagc cagggcctgc gactgcactc ccctatgtac 180
 atgttctctc agcatctctc ctttctggag gtctgggtaca cgtccaccac tgtgcccctt 240
 ctctagcca acctgctgtc ctggggccaa gccatctctt tctctgcctg catggcacag 300
 ctctacttct tcgtattctt cggcgccacc gagtgccttc tcttggcctt catggcctat 360
 gaccggtacc tggccatctg cagccactc cgctaccctt tcctcatgca tcgtgggctc 420
 tgtgccaggt tgggtgggtgt ctctgggtgc acaggggtca gcacaggctt totgcottcc 480
 ctgatgattt ccaggttgga cttctgtggg cgcaatcaga ttaaccattt cttctgcgac 540
 ctcccgccac tcatgcagct ctctgttcc agagtttata tcaccgaggt gaccatcttc 600
 atcctgtcaa ttgccgtgct gtgcatttgt tttttctga cactggggcc ctatgttttc 660
 attgtgtcct ccatattgag aatcccttcc acctctggcc ggagaaagac cttttccaca 720
 tgtggctccc acctggctgt tgtcactctc tactacggga ccatgatctc catgtatgtg 780
 tgtcccagtc cccacctgtt gcctgaaatc aacaagatca tttctgtctt ctacaactgtg 840
 gtcacaccac tgctgaacc agttatctac agcttgagga acaaagactt caaagaagct 900
 gtagaaagg tcatgagaag gaaatgtggt attctatgga gtacaagtaa aaggaagttc 960
 ctttattga 969

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un material odorante de pachulí candidato, que comprende las etapas de:
 - 5 1) poner en contacto una muestra que expresa el receptor OR11A1 con un compuesto de prueba, y
2) medir la actividad del receptor OR11A1 mediante un método que comprende:
 - 10 i) medir la respuesta del receptor OR11A1 al compuesto de prueba y la respuesta del receptor OR11A1 al tampón de ensayo (nivel de referencia), y calcular un primer factor de cambio (FOC1: respuesta de OR11A1 al compuesto de prueba/respuesta de OR11A1 al nivel de referencia);
 - 15 ii) medir la respuesta de una muestra de control que no expresa el receptor OR11A1 al compuesto de prueba y la respuesta de la muestra de control que no expresa el receptor OR11A1 al tampón de ensayo (nivel de referencia) y calcular un segundo factor de cambio (FOC2: respuesta de la muestra de control al compuesto de prueba/respuesta de la muestra de control al nivel de referencia);

en el que el compuesto de prueba se identifica como un material odorante de pachulí candidato si la relación de FOC1 a FOC2 es mayor que 1.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha muestra expresa un receptor OR11A1 funcional.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha muestra comprende una célula.
4. El método de la reivindicación 3, en el que dicha célula es una célula de mamífero.
- 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, en el que la muestra es una línea celular seleccionada del grupo que consiste en HEK293T, CHO (ovario de hámster chino), HeLa y preparaciones de membranas de dichas células.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el receptor OR11A1 es el receptor OR11A1 humano codificado (i) por la secuencia de nucleótidos de secuencia SEQ ID NO: 1, o (ii) por una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 2, o (iii) mediante una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 85 %, preferiblemente al menos 90 % y más preferiblemente al menos 95 %, con la SEQ ID NO: 2.
- 35 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho compuesto de prueba tiene un peso molecular superior a 183, preferiblemente igual o superior a 200.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho compuesto de prueba tiene un peso molecular de 300 o menos, preferiblemente de 275 o menos.
- 40 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que FOC1 es de al menos 1,5, preferiblemente de al menos 1,8 y más preferiblemente de al menos 2.
- 45 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha activación del receptor OR11A1 se detecta usando un sistema indicador que conduce a una señal legible o medible si el receptor OR11A1 se activa tal como, pero sin limitarse a, detección mediante imagen de calcio con tintes fluorescentes, fotoproteínas tales como GFP, aequerina, sistema indicador enzimático tal como luciferasa, cloranfenicol acetiltransferasa, β-galactosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, prueba de unión a GTPγS, medición de cambios en los niveles de AMPc, y similares, preferiblemente usando un sistema indicador que comprende un gen cuya transcripción es impulsada por un elemento de respuesta cuya actividad es una indicación de la activación del receptor OR11A1, preferiblemente impulsada por el elemento de respuesta de AMPc que es estimulado por la adenilato ciclasa que es activada por la proteína G estimulante (Gαs), como la proteína G Gαolf.
- 50 11. Un método para identificar un material odorante de pachulí, que comprende las etapas de:
 - 55 a) identificar un material odorante de pachulí candidato por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y
 - b1) someter el candidato identificado a una prueba de persistencia, en la que el candidato pasa la prueba si retiene al menos el 10 % de su concentración inicial después de 1 hora y/o
 - 60 b2) someter el candidato identificado a una prueba olfativa en la que se compara una muestra que contiene aceite de pachulí con una muestra que contiene aceite de pachulí y el candidato identificado, en la que el candidato pasa la prueba si no hay diferencia sensorial perceptible entre las dos muestras.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la prueba de persistencia comprende las etapas de:
 - 65 - aplicar 50 µl de una solución al 1 % en alcohol del candidato identificado, en una tira de prueba de perfume;
 - permitir que la tira de prueba de perfume se seque en condiciones ambientales;

ES 2 665 906 T3

- extraer al menos la parte de la tira de prueba de perfume, incluida el área donde se aplicó la solución del candidato identificado con 3 ml de alcohol que contiene un patrón interno;
- analizar el extracto por cromatografía de gases;
- normalizar el resultado para el ion molecular principal del candidato identificado usando el valor para el patrón interno.

- 5
13. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la prueba olfativa se lleva a cabo siguiendo el protocolo definido en la norma ASTM E 1885 - 97.
- 10
14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, que comprende las etapas a), b1) y b2), en el que las etapas se llevan a cabo en el siguiente orden: a), b1), b2).
- 15
15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, que comprende las etapas a), b1) y b2), en el que las etapas se llevan a cabo en el siguiente orden: a), b2), b1).
16. Uso de una muestra que expresa el receptor OR11A1 para identificar un material odorante de pachulí candidato después de aumentar la actividad de dicho receptor por dicho material.
- 20
17. El uso de la reivindicación 16, en el que el receptor OR11A1 es el receptor OR11A1 humano codificado por la secuencia de nucleótidos de secuencia SEQ ID NO: 1, o por una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 2

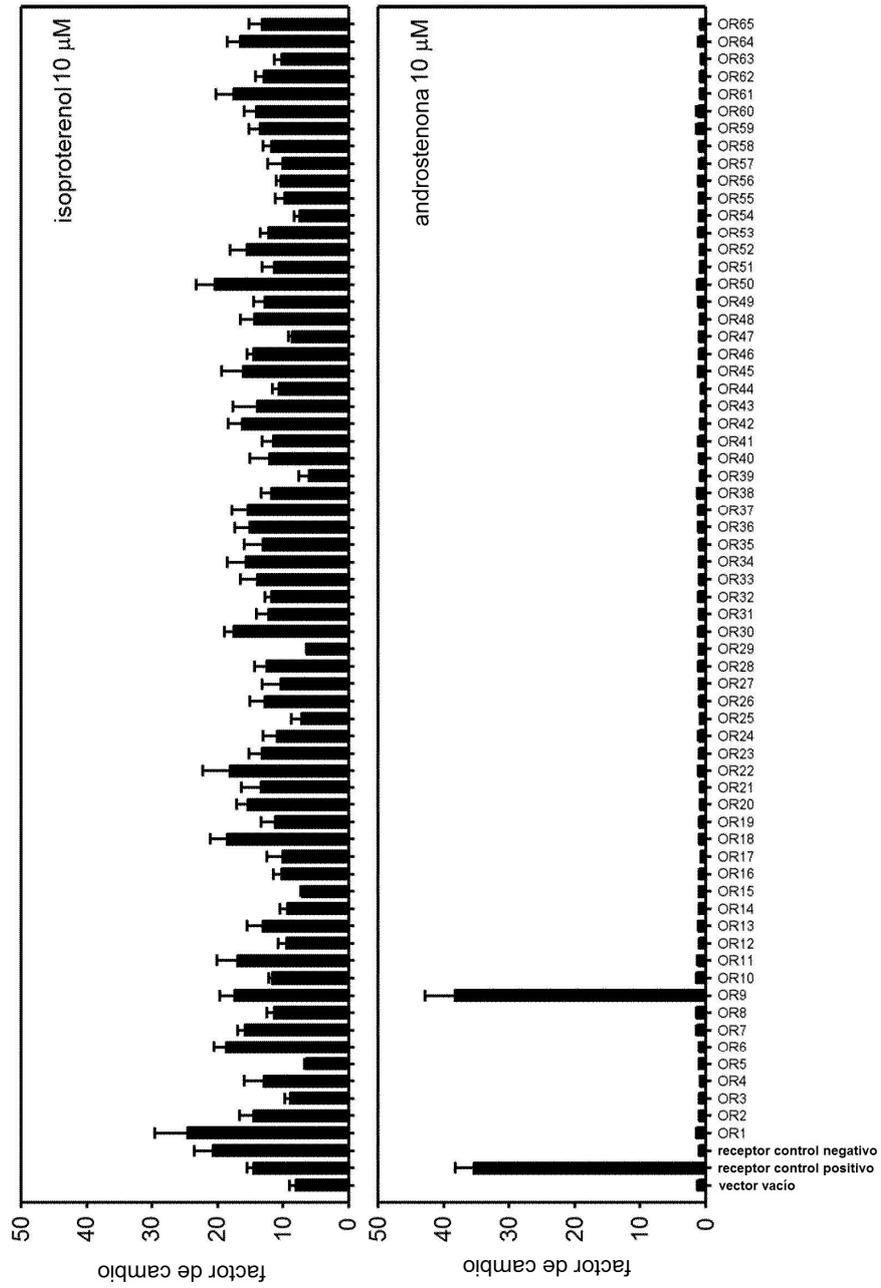


FIG.1A

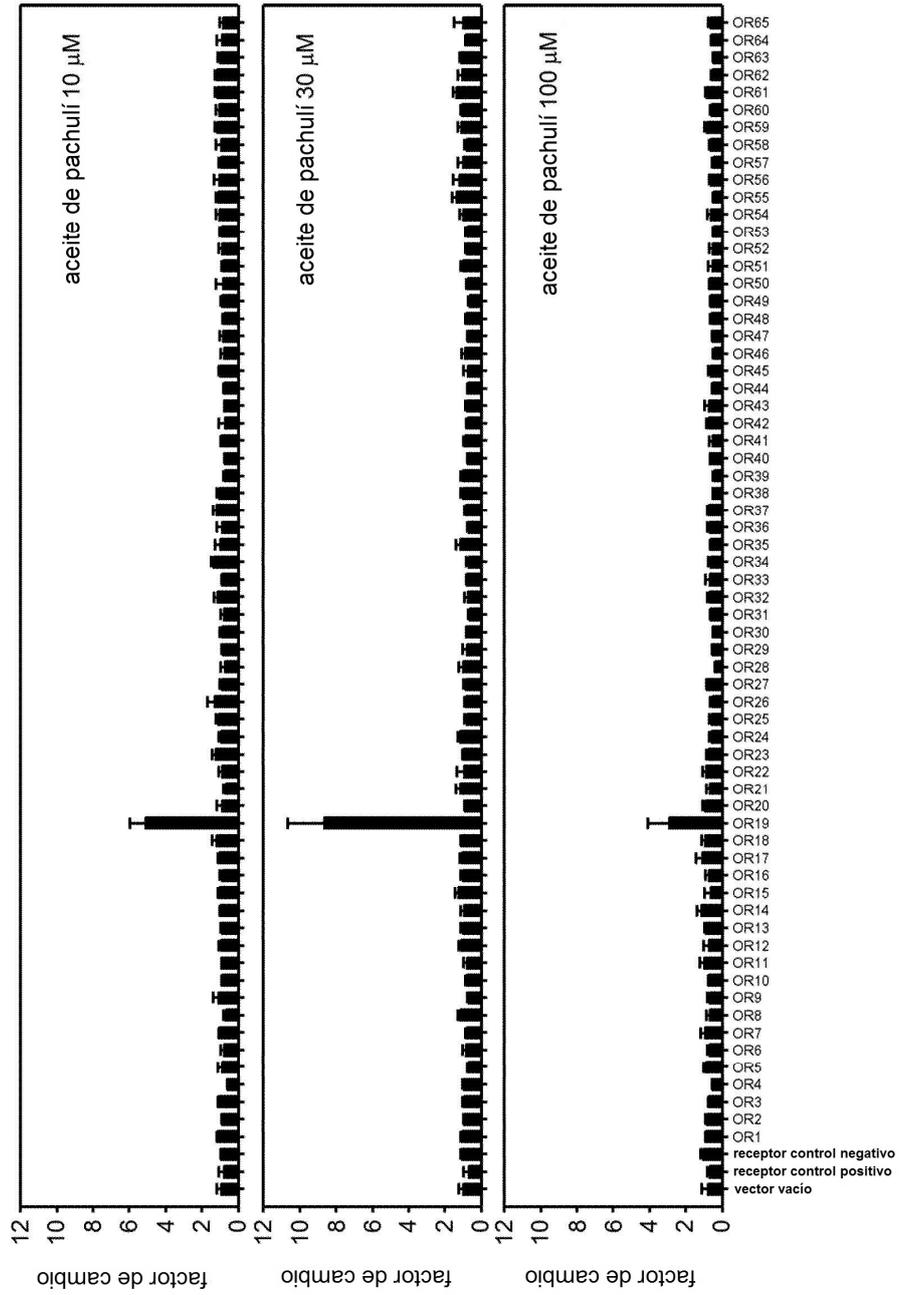


FIG.1B

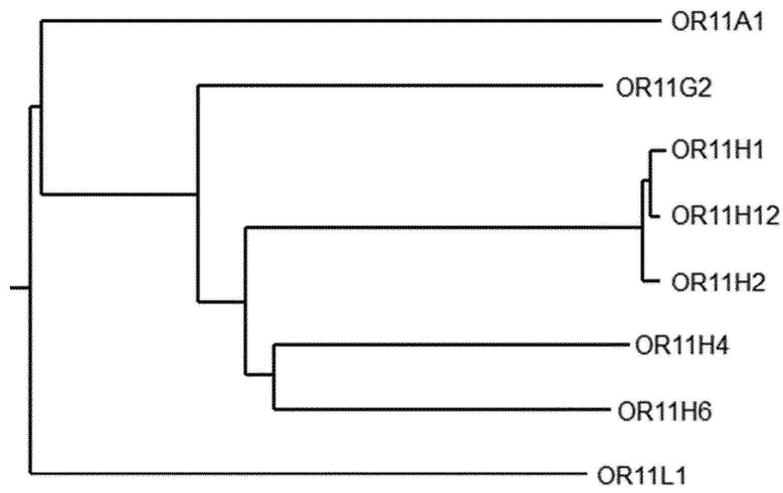


FIG.2

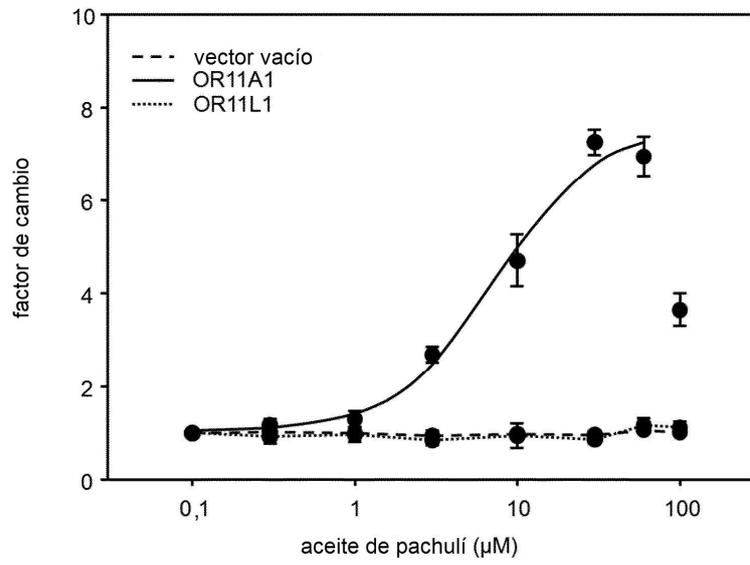


FIG.3A

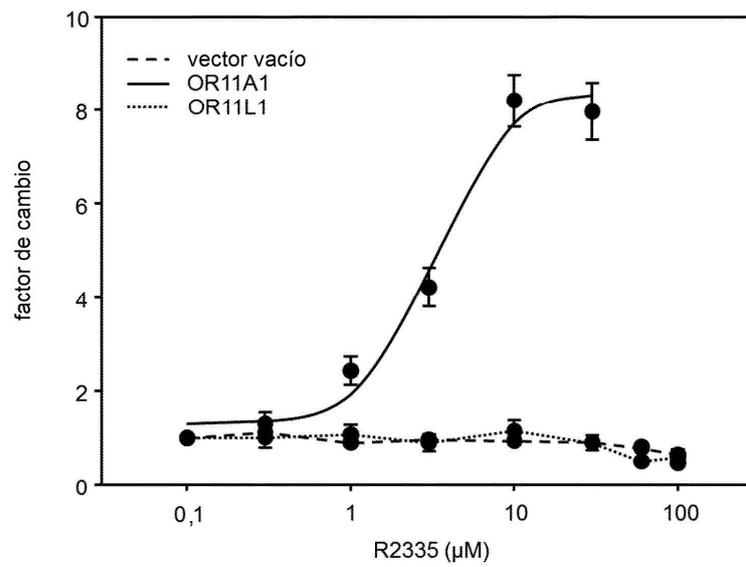


FIG.3B

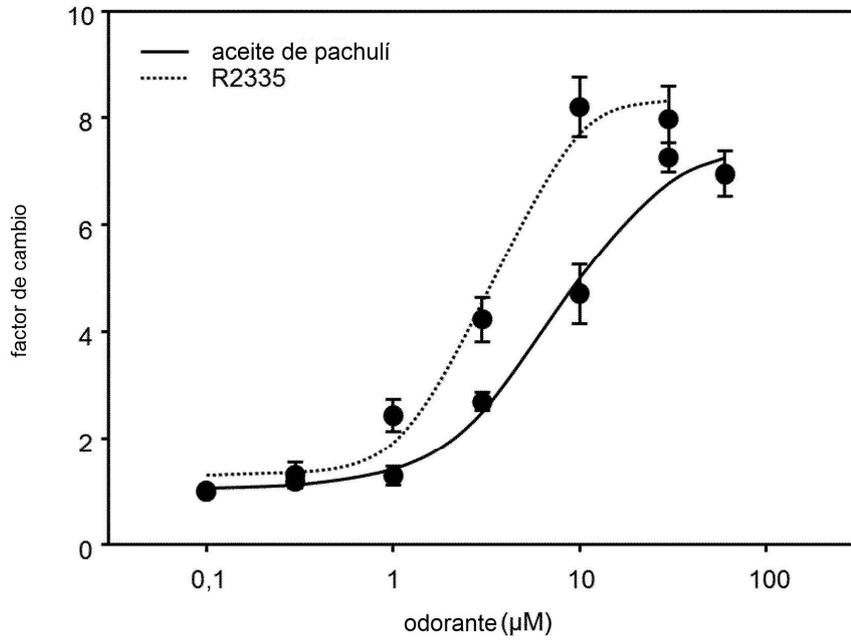


FIG.3C

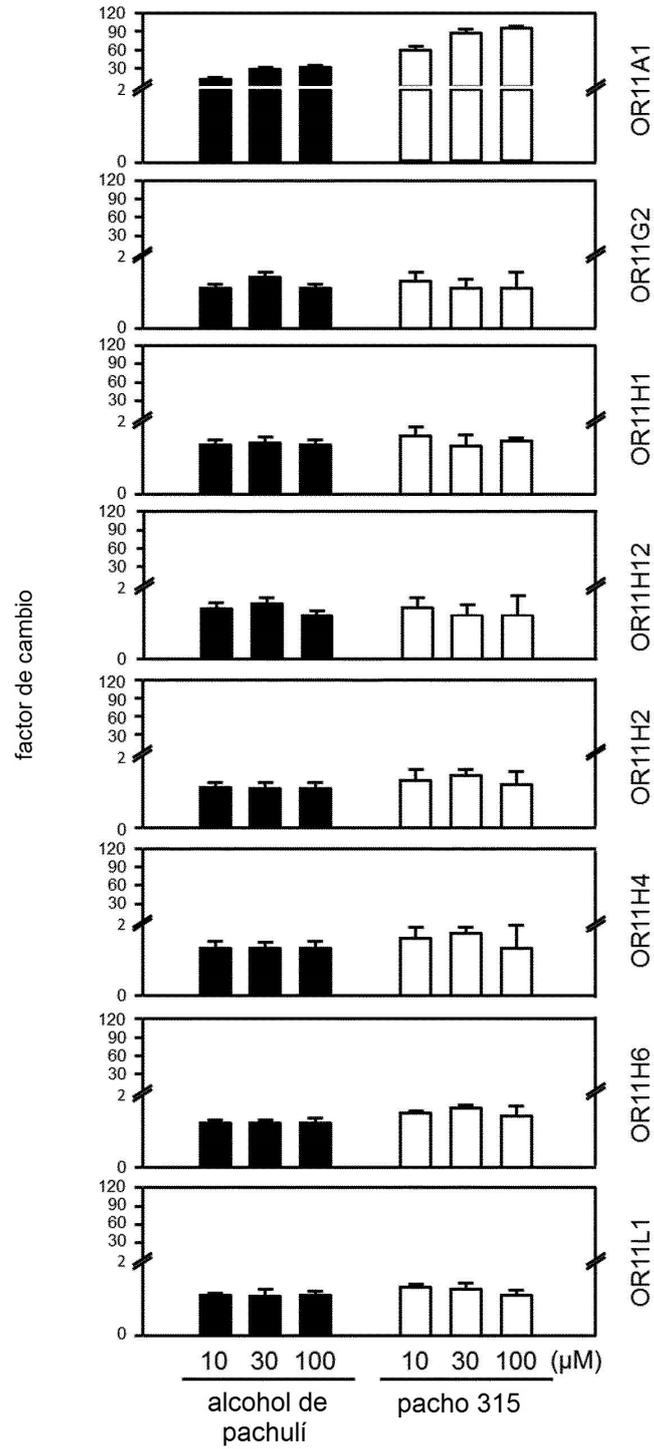


FIG.4

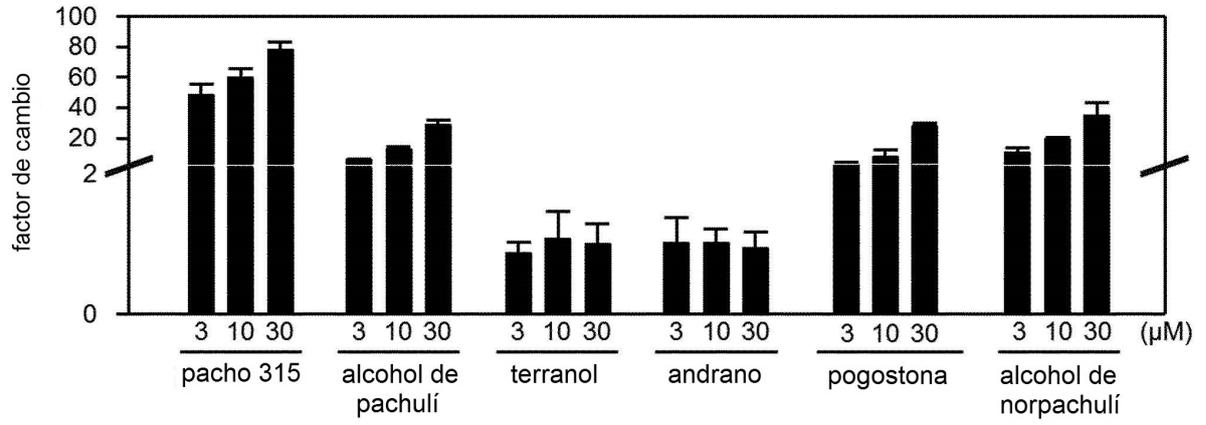


FIG.5

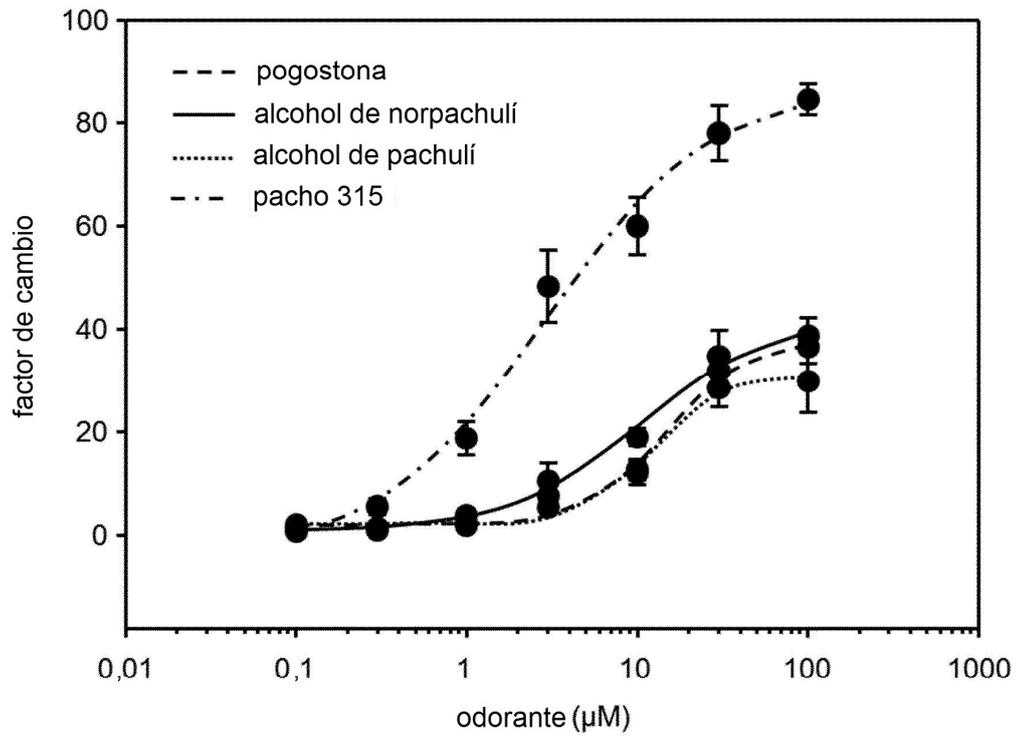


FIG.6

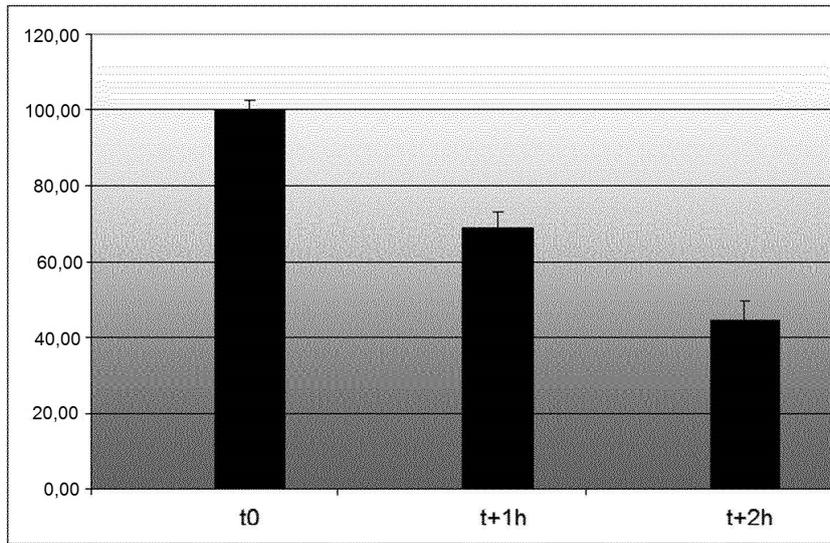


FIG.7A

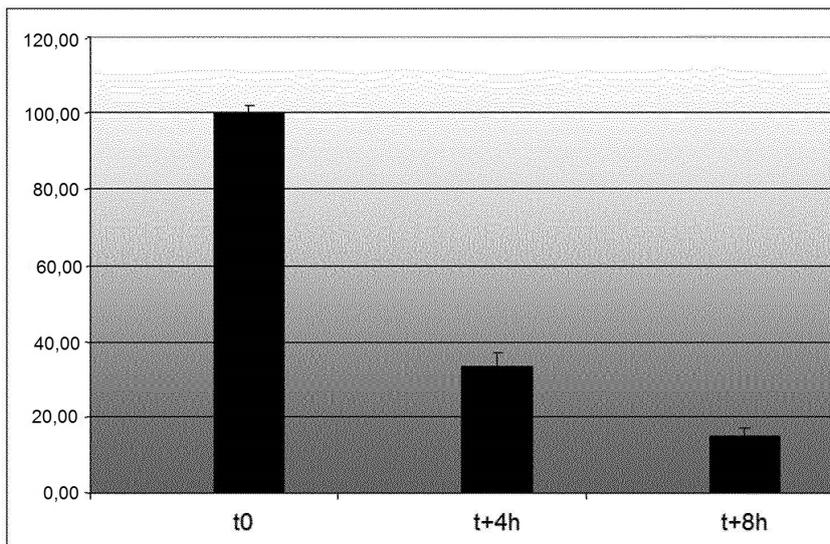


FIG.7B

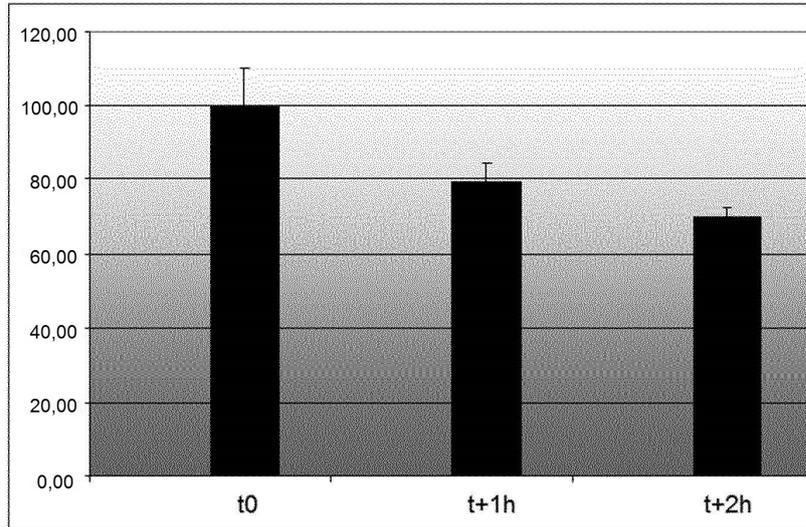


FIG.8