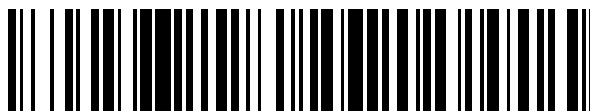


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 132**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2017** **E 17306766 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019** **EP 3336544**

54 Título: **Método para identificar neutralizadores de malos olores**

30 Prioridad:

14.12.2016 EP 16306680

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

16.07.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WARR, JONATHAN y
WINNIG, MARCEL**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 774 132 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 neutralizadores de malos olores

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se refiere a un método para identificar compuestos que pueden neutralizar malos olores, en particular malos olores de sustancias odorantes de azufre.

10 **Antecedentes de la invención**

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

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

20 Pueden detectarse compuestos volátiles de origen natural o artificial mediante un conjunto específico de receptores acoplados a proteínas G ubicados en el epitelio respiratorio. Se ha propuesto que una sustancia odorante es capaz de activar múltiples receptores olfativos (OR) y que un OR es capaz de detectar diferentes sustancias odorantes (Malnic *et al.* 1999). El genoma humano contiene ~400 genes de receptores olfativos intactos que pertenecen a dos clases principales. La clase I, OR de "receptores similares a los peces" detectan presumiblemente sustancias odorantes solubles en agua, mientras que la clase II, OR de "receptores específicos de tetrápodos" responden supuestamente a compuestos volátiles transportados por el aire (Glusman *et al.* 2000).

25 Recientemente se identificó un receptor olfativo de ratón, que responde a metanotiol (metiltio) en células heterólogas (Duan *et al.* 2012).

30 El olor corporal humano se genera a partir de materiales naturales presentes en la superficie de la piel y secreciones de las glándulas sudoríparas y sebáceas. Estos materiales se convierten en compuestos olorosos característicos a través de degradación oxidativa o metabolismo por los microbios de la piel.

35 Se sabe que las secreciones de glándulas sudoríparas apocrinas humanas producen un aroma sumamente individual tras la acción de la flora de la piel que están presentes en altas concentraciones en la axila. Se ha notificado que esteroides volátiles, ácidos grasos alifáticos, ramificados y lineales son los principales contribuyentes al mal olor axilar humano. Se encontró en particular que el ácido 3-hidroxi-3-metil-2-hexanoico se originaba a partir de un conjugado de glutamina presente en secreciones axilares (Troccaz 2009).

40 También se ha encontrado que compuestos que contienen azufre contribuyen al mal olor axilar humano (Troccaz 2009; Natsch *et al.* 2004). También se han identificado compuestos que contienen azufre en ropa usada a partir del catabolismo de L-metionina (Denawaka *et al.* 2016), y de la orina (Troccaz *et al.* 2013).

45 Algunas veces, también se añaden deliberadamente materiales que contienen azufre a productos de consumo o industriales como principios activos, por ejemplo, ácido tioglicólico o sales y cisteína para productos de tratamiento capilar, y dan al producto un olor de base no deseado que es necesario superar.

50 Ahora se ha encontrado que un receptor olfativo humano, OR4E2, responde a las sustancias odorantes de azufre. Por lo tanto, se contempla el uso de este polipéptido para identificar compuestos que puedan neutralizar la percepción de mal olor a partir de sustancias odorantes de azufre.

55 **Sumario de la invención**

En un aspecto, la invención se refiere a un método para determinar si un compuesto de prueba puede neutralizar el mal olor percibido (olfato) a partir de una sustancia odorante de azufre, comprendiendo el método las etapas de:

60 a) poner en contacto el polipéptido OR4E2 con una sustancia odorante de azufre, en presencia y ausencia del compuesto de prueba, en condiciones que permiten la unión de dicha sustancia odorante de azufre a OR4E2 o que permiten la activación de OR4E2 por dicha sustancia odorante de azufre;

65 b) comparar la unión de OR4E2 a dicha sustancia odorante de azufre, o la actividad de OR4E2, en presencia y ausencia del compuesto de prueba, en el que una inhibición de la unión o una disminución de la actividad en presencia del compuesto de prueba, en relación con la unión o actividad en ausencia del compuesto de prueba, identifica el compuesto de prueba como un compuesto que puede neutralizar el mal olor percibido a partir de la

sustancia odorante de azufre, en el que la etapa a) se realiza en o sobre células que expresan OR4E2.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del polipéptido OR4E2 para identificar un compuesto que puede neutralizar el mal olor percibido a partir de una sustancia odorante de azufre.

5

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A-1B muestran la respuesta de OR4E2 a concentraciones crecientes de sustancias odorantes de azufre representativas.

10

Las figuras 2A-2B muestran la respuesta de OR4E2 a concentraciones crecientes de compuestos de prueba.

Las figuras 3A-3B muestran la evaluación (intensidad y agradabilidad) de un mal olor y de compuestos de prueba.

15

Las figuras 4A-4C muestran la evaluación (intensidad y agradabilidad) de mezclas de un mal olor con o bien un blanco o con o bien compuestos de prueba

Descripción de la invención

20

La invención se basa en el hallazgo de que el receptor olfativo humano OR4E2 responde a la estimulación por sustancias odorantes de azufre. En consecuencia, el receptor OR4E2 es una herramienta útil para examinar compuestos que puedan neutralizar el mal olor percibido a partir de sustancias odorantes de azufre.

25

En un aspecto, la invención proporciona un método para determinar si un compuesto de prueba puede neutralizar el mal olor percibido a partir de una sustancia odorante de azufre, comprendiendo el método las etapas de:

30

a) poner en contacto el polipéptido OR4E2 con una sustancia odorante de azufre, en presencia y ausencia del compuesto de prueba, en condiciones que permiten la unión de dicha sustancia odorante de azufre a OR4E2 o que permiten la activación de OR4E2 por dicha sustancia odorante de azufre;

35

b) comparar la unión de OR4E2 a dicha sustancia odorante de azufre, o la actividad de OR4E2, en presencia y ausencia del compuesto de prueba, en el que una inhibición de la unión o una disminución de la actividad en presencia del compuesto de prueba, en relación con la unión o actividad en ausencia del compuesto de prueba, identifica el compuesto de prueba como un compuesto que puede neutralizar el mal olor percibido a partir de la sustancia odorante de azufre, en el que la etapa a) se realiza en o sobre células que expresan OR4E2.

40

El método de la invención comprende por tanto una etapa de poner en contacto el polipéptido OR4E2 con una sustancia odorante de azufre, en presencia y ausencia del compuesto de prueba, en condiciones que permiten la unión de la sustancia odorante de azufre a OR4E2 o que permiten la activación de OR4E2 por dicha sustancia odorante de azufre. En una realización, se usan diferentes concentraciones de la sustancia odorante de azufre para determinar la cantidad eficaz mínima que es capaz de activar OR4E2.

45

En el contexto de la presente invención, una "sustancia odorante de azufre" es un compuesto que contiene azufre que contribuye al mal olor del cuerpo humano o animal, en particular el mal olor del sudor humano o el mal olor axilar humano, o un compuesto que contiene azufre que se origina de una fuente alimentaria, o un compuesto que contiene azufre que se añade deliberadamente a productos de consumo de cuidado personal o del hogar.

50

En una realización, la sustancia odorante de azufre se selecciona de un sulfanilalcanol como 2-mercapto-3-metil-1-butanol, 3-mercapto-2-metil-1-pentanol, 3-mercapto-2-metil-1-propanol, 3-mercapto-3-metil-1-butanol, 3-mercapto-1-hexanol, 3-metil-3(2-metildisulfanil)-butano-1-ol o 3-mercapto-3-metil-1-hexanol; un sulfanil-aldehído o -cetona, tal como 3-mercapto-2-metilpentanal, 1-mercapto-3-pentanona, 2-mercapto-3-pentanona o 3-mercapto-3-pentanona; un éster sulfanílico tal como acetato de 3-metil-3-mercaptobutilo o formiato de 3-metil-3-mercaptobutilo; un tiol tal como 1-metoxiheptano-3-tiol, 4-metoxi-2-metilbutano-2-tiol o 1-propanotiol; ácido tioglicólico; ácido ditioglicólico; un sulfuro tal como disulfuro de metil-2-propenilo, 2,4-ditiapentano, sulfuro de dimetilo, disulfuro de dimetilo, trisulfuro de dimetilo, sulfuro de dialilo o trisulfuro de dialilo; alilmercaptano; alicina; aliina; y cisteína. En una realización preferida, la sustancia odorante de azufre es un sulfanilalcanol o un sulfuro tal como se definió anteriormente, especialmente un sulfuro que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono, tal como uno o dos dobles enlaces carbono-carbono.

60

En una realización, la etapa de poner en contacto el polipéptido OR4E2 con una sustancia odorante de azufre se realiza en presencia de iones Cu^{2+} , añadidos como sal de cobre, por ejemplo una sal inorgánica, por ejemplo CuSO_4 , que libera iones Cu^{2+} cuando se disuelve en agua.

65

En una realización, la etapa de poner en contacto el polipéptido OR4E2 con una sustancia odorante de azufre se realiza en o sobre células que expresan dicho polipéptido. Según la presente invención, dichas células pueden ser, pero no se limitan a, células de mamíferos, en particular células de riñón embrionario humano (HEK293T), células de

ovario de hámster chino (CHO), células HeLa o preparaciones de membranas de dichas células. Las células que expresan el polipéptido también pueden expresar al menos una proteína auxiliar importante para el tráfico eficaz de receptores a la membrana plasmática; las células pueden además expresar una proteína G estimulante (también denominada G_s), preferiblemente una proteína G_{olf}.

5 El polipéptido OR4E2 se define por las secuencias a las que se hace referencia actualmente en las bases de datos de secuencias, a partir de la fecha de presentación de la presente solicitud. El experto en la técnica sabe que pueden existir variantes polimórficas dentro de la población humana. Estas variantes polimórficas generalmente difieren en unos pocos aminoácidos (por ejemplo, de 1 a 10 aminoácidos).

10 En una realización, el polipéptido OR4E2 tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO:1):

ES 2 774 132 T3

Met	Asp	Ser	Leu	Asn	Gln	Thr	Arg	Val	Thr	Glu	Phe	Val	Phe	Leu	Gly
1				5					10					15	
Leu	Thr	Asp	Asn	Arg	Val	Leu	Glu	Met	Leu	Phe	Phe	Met	Ala	Phe	Ser
			20					25					30		
Ala	Ile	Tyr	Met	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Asn	Ile	Leu	Ile	Ile	Ile	Ala
		35						40					45		
Thr	Val	Phe	Thr	Pro	Ser	Leu	His	Thr	Pro	Met	Tyr	Phe	Phe	Leu	Ser
		50					55					60			
Asn	Leu	Ser	Phe	Ile	Asp	Ile	Cys	His	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Lys
65					70						75				80
Met	Leu	Glu	Gly	Leu	Leu	Leu	Glu	Arg	Lys	Thr	Ile	Ser	Phe	Asp	Asn
				85					90					95	
Cys	Ile	Thr	Gln	Leu	Phe	Phe	Leu	His	Leu	Phe	Ala	Cys	Ala	Glu	Ile
			100						105					110	
Phe	Leu	Leu	Ile	Ile	Met	Ala	Tyr	Asp	Arg	Tyr	Val	Ala	Ile	Cys	Thr
			115					120					125		
Pro	Leu	His	Tyr	Pro	Asn	Val	Met	Asn	Met	Arg	Val	Cys	Ile	Gln	Leu
						135						140			
Val	Phe	Ala	Leu	Trp	Leu	Gly	Gly	Thr	Val	His	Ser	Leu	Gly	Gln	Thr
145					150						155				160
Phe	Leu	Thr	Ile	Arg	Leu	Pro	Tyr	Cys	Gly	Pro	Asn	Ile	Ile	Asp	Ser
				165					170					175	
Tyr	Phe	Cys	Asp	Val	Pro	Leu	Val	Ile	Lys	Leu	Ala	Cys	Thr	Asp	Thr
			180						185					190	
Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Leu	Ile	Val	Thr	Asn	Ser	Gly	Thr	Ile	Ser	Leu
			195					200					205		
Ser	Cys	Phe	Leu	Ala	Val	Val	Thr	Ser	Tyr	Met	Val	Ile	Leu	Val	Ser
						215					220				
Leu	Arg	Lys	His	Ser	Ala	Glu	Gly	Arg	Arg	Lys	Ala	Leu	Ser	Thr	Cys
225					230						235				240
Ser	Ala	His	Phe	Met	Val	Val	Ala	Leu	Phe	Phe	Gly	Pro	Cys	Ile	Phe
				245						250				255	
Ile	Tyr	Thr	Arg	Pro	Asp	Thr	Ser	Phe	Ser	Ile	Asp	Lys	Val	Val	Ser
			260						265					270	
Val	Phe	Tyr	Thr	Val	Val	Thr	Pro	Leu	Leu	Asn	Pro	Phe	Ile	Tyr	Thr
			275					280					285		
Leu	Arg	Asn	Glu	Glu	Val	Lys	Ser	Ala	Met	Lys	Gln	Leu	Arg	Gln	Arg
						295						300			
Gln	Val	Phe	Phe	Thr	Lys	Ser	Tyr	Thr							
305						310									

En otra realización, el polipéptido OR4E2 tiene una secuencia que tiene al menos el 85%, tal como al menos el 90%,

al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad con SEQ ID NO:1, con la condición de que se conserven los aminoácidos en las posiciones 12, 42, 118, 165, 234, 237, 241 y 270 de SEQ ID NO:1. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "identidad de secuencia" significa la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos a lo largo de la longitud total de las secuencias cuando se alinean de manera óptima, tal como por ejemplo usando el 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).

5 En una realización, el polipéptido OR4E2 está codificado por una secuencia de ácido nucleico que tiene la secuencia (SEQ ID NO: 2):

10

```

atggacagtc taaaccaaac aagagtgact gaatttgtct tcttgggact cactgataac 60
cgggtgctgg aatgctgtt ttcatggca ttctcagcca tttatatgct aacgctttca 120
gggaacattc tcatcatcat tgccacagtc tttactcaa gtctccatac ccccatgtat 180
ttcttctga gcaatctgtc ctttattgac atctgccact catctgtcac tgtgcctaag 240
atggtggagg gtttgctttt agaaagaaag accatctcct ttgacaactg catcacacag 300
ctcttcttcc tacatctctt tgcctgtgcc gagatcttct tgctgatcat tgtggcgat 360
gatcgttacg tggctatctg cactccactc cactacccca atgtgatgaa catgagagtc 420
tgtatacagc ttgtctttgc tctctggttg gggggtaactg ttcactcact agggcagacc 480
ttcttgacta ttcgtctacc ttactgtggc cccaacatta ttgacagcta cttctgtgat 540
gtgcctcttg ttatcaagct ggcctgcaca gatacatacc tcacaggaat actgattgtg 600
accaatagtg gaaccatctc cctctcctgt ttcttggcgg tggtcacctc ctatatggtc 660
atcctggttt ctcttcgaaa acactcagct gaagggcgcc agaaagccct gtctacctgc 720
tcggcccaact tcatggtggt tgcctcttct tttgggccat gtatcttcat ctatactcgg 780
ccagacacca gcttctccat tgacaagggtg gtgtctgtct tctacacagt ggtcacccct 840
ttgctgaatc ccttcattta caccttgagg aatgaggagg taaaaagtgc catgaagcag 900
ctcaggcaga gacaagtttt ttccacgaaa tcatatata 939
    
```

15 En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido OR4E2 puede incluirse en un constructo dentro de un vector de expresión adecuado, que es capaz de replicar y expresar el constructo en un huésped, conduciendo a la expresión del polipéptido correspondiente. Los constructos adecuados no están limitados siempre que la secuencia de ácido nucleico de OR4E2 esté conectada operativamente a una(s) secuencia(s) de control de la expresión apropiada(s) y cualquier otro requisito para dirigir la expresión de OR4E2. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido OR4E2 puede estar directamente etiquetada o indirectamente asociada con un sistema indicador que conduce a una señal legible o medible una vez que se activa OR4E2 por ligando(s), de modo que la transducción de señales después de la activación del receptor puede detectarse, medirse y/o monitorizarse. Cualquier tipo de sistema indicador puede usarse en el contexto de la invención. Por ejemplo, puede usarse un sistema indicador que comprende un gen cuya transcripción se dirige por un elemento de respuesta cuya actividad es una indicación de activación de OR4E2, preferiblemente un elemento de respuesta a AMPc que se estimula por adenilato ciclasa que se activa por la proteína G estimulante (G-s), tal como la proteína G G-olf. Puede usarse cualquier método para expresar OR4E2, y preferiblemente la transfección del vector de expresión que contiene el constructo que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica para OR4E2.

30 En algunas realizaciones, la sustancia odorante de azufre puede ponerse en contacto además con al menos otro receptor olfativo humano, seleccionado del polipéptido OR2C1, el polipéptido OR2T11 y el polipéptido OR2M3, opcionalmente en presencia de iones Cu²⁺. El *modus operandi* descrito anteriormente con respecto a la etapa de poner en contacto el polipéptido OR4E2 con la sustancia odorante de azufre también puede aplicarse a la etapa de poner en contacto la sustancia odorante de azufre con el/los otro(s) receptor(es) olfativo(s). Pueden encontrarse detalles sobre los receptores OR2C1, OR2T11 y OR2M3 en la base de datos GeneCards® (<http://www.genecards.org/>). Se ha notificado que OR2T11 y OR2C1 están activados por tioles (Li *et al.* 2016). También se ha notificado que OR2M3 está activado por tioles (Noe *et al.* 2016). Si una sustancia odorante de azufre dada activa al menos uno de los polipéptidos OR2C1, OR2T11 y OR2M3 (además de activar el polipéptido OR4E2), entonces dicha sustancia odorante puede considerarse como una sustancia odorante especialmente preferida para su uso en el método de la invención.

40

5 El método de la invención también comprende una etapa de comparar la unión de OR4E2 con la sustancia odorante de azufre, o la actividad de OR4E2, en presencia y ausencia del compuesto de prueba, en el que una inhibición de la unión o una disminución de la actividad en presencia del compuesto de prueba, en relación con la unión o actividad en ausencia del compuesto de prueba, identifica el compuesto de prueba como un compuesto que puede neutralizar el mal olor percibido a partir de la sustancia odorante de azufre.

10 En una realización, el compuesto de prueba se identifica (o no) como un compuesto que puede neutralizar el mal olor percibido a partir de una sustancia odorante de azufre en comparación con la actividad de OR4E2 (en contacto con la sustancia odorante de azufre) en presencia y ausencia de dicho compuesto de prueba. Tal como se ha indicado anteriormente, una disminución de la actividad en presencia del compuesto de prueba, en relación con la actividad en ausencia del compuesto de prueba, lleva a la conclusión de que el compuesto de prueba es capaz de neutralizar el mal olor percibido a partir de la sustancia odorante de azufre.

15 Cualquier método conocido en la técnica puede usarse para leer o medir la respuesta de OR4E2 a la sustancia odorante de azufre en presencia o ausencia del compuesto de prueba.

20 En una realización, la actividad de OR4E2 se detecta usando un sistema indicador que conduce a una señal legible o medible si el compuesto de prueba provoca una respuesta de OR4E2. Los sistemas indicadores que pueden usarse en el contexto de la invención incluyen, pero no se limitan a, un sistema de obtención de imágenes, un sistema de fluorescencia, un sistema enzimático y un sistema de unión. Por ejemplo, pueden usarse los siguientes sistemas indicadores: obtención de imágenes de calcio con colorantes fluorescentes, fotoproteínas tales como GFP, aequorina, sistema indicador enzimático tal como luciferasa, cloranfenicol acetiltransferasa, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa del rábano, prueba de unión de GTP γ S, medición de cambios en los niveles de AMPc, y similares. Ventajosamente, puede utilizarse un sistema indicador que comprende un gen cuya transcripción se dirige por un elemento de respuesta cuya actividad es una indicación de la activación de OR4E2, preferiblemente la transcripción génica se dirige por un elemento de respuesta a AMPc que se estimula por adenilato ciclasa que se activa por la proteína G estimulante (G-s), como la proteína G \cdot olf.

30 En una realización, la etapa b) comprende o consiste en:

- i) medir la respuesta de OR4E2 a un control;
- ii) medir la respuesta de OR4E2 a la sustancia odorante de azufre en ausencia del compuesto de prueba;
- 35 iii) calcular un primer coeficiente de cambio [FOC1 = respuesta obtenida en la etapa ii) dividido entre la respuesta obtenida en la etapa i)];
- iv) medir la respuesta de OR4E2 a la sustancia odorante de azufre en presencia del compuesto de prueba;
- 40 v) calcular un segundo coeficiente de cambio [FOC2 = respuesta obtenida en la etapa iv) dividido entre la respuesta obtenida en la etapa i)];
- vi) comparar FOC1 y FOC2, donde el compuesto de prueba se identifica como un compuesto que puede neutralizar el mal olor percibido a partir de la sustancia odorante de azufre si $FOC2 < FOC1$.

45 En una realización, el control es un tampón usado para diluir la sustancia odorante de azufre y/o el compuesto de prueba.

50 En una realización, el compuesto de prueba se identifica como un compuesto que puede neutralizar el mal olor percibido a partir de la sustancia odorante de azufre si la razón FOC2/FOC1 obtenida en la etapa vi) es menor de 0,8, tal como, por ejemplo, menor de 0,7, menor de 0,5, menor de 0,3, menor de 0,1, menor de 0,05 o menor de 0,01.

55 En una realización, la confirmación de que un compuesto de prueba identificado mediante el método de la invención neutraliza efectivamente el mal olor percibido a partir de una sustancia odorante de azufre, puede obtenerse mediante una prueba de "inhalación". Por ejemplo, puede pedirse a un panel de participantes que huelan por separado el mal olor de una sustancia odorante de azufre y del compuesto de prueba, luego que huelan una mezcla del mal olor y el compuesto de prueba, y evalúen cada vez la intensidad y la agradabilidad de lo que han oído. Ventajosamente, el mal olor se huele en primer lugar, luego el compuesto de prueba y, finalmente, la mezcla de mal olor y compuesto de prueba.

60 El método de la invención hace posible identificar compuestos que pueden neutralizar el mal olor percibido a partir de sustancias odorantes de azufre y, por tanto, que se incorporen a diversos productos de consumo.

65 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del polipéptido OR4E2 para identificar un compuesto que pueda neutralizar el mal olor percibido a partir de una sustancia odorante de azufre.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, no limitativos.

Ejemplos

5 Líneas celulares, medio y condiciones de cultivo celular

Los experimentos se realizaron usando células HEK293T (disponibles, por ejemplo, de GE Healthcare) que expresaban de manera endógena la proteína auxiliar hRTP1s, esencial para el tráfico eficaz de receptores a la membrana plasmática (Saito *et al.*, 2004; Von Dannecker *et al.*, 2005/2006). La línea celular se mantuvo en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Euroclone) suplementado con FBS al 10% (suero bovino fetal, cat. de Euroclone ECS0180L), penicilina/estreptomina al 1% (cat. de Euroclone B3001D), G418 50 µg/ml, higromicina 25 µg/ml y zeocina 10 µg/ml.

15 Las condiciones convencionales de propagación consistieron en sembrar $1,5 - 1,8 \times 10^6$ células en un frasco T75 dos veces a la semana, recuperando aproximadamente $10 - 15 \times 10^6$ células a ~80% de confluencia.

Clonación de receptores olfativos humanos

20 Se generó el ADNc para OR4E2 mediante síntesis génica personalizada (Life Technologies). Entonces se subclonó ADN del receptor en marco en 3' con respecto a un epítipo de localización transmembrana en un vector de expresión pcDna5 (Bufo *et al.*, 2002). La identidad correcta del receptor se comprobó mediante secuenciación automatizada.

Ligandos y tampones

25 Todas las sustancias odorantes de azufre se prepararon como disoluciones madre 100 mM usando DMSO como disolvente y se almacenaron a -20°C. Se preparó sulfato de cobre (II) como una disolución acuosa 30 mM. El día del experimento, las diferentes disoluciones madre se diluyeron directamente en el tampón de ensayo (tampón de Tyrode), cuya composición es: KCl 5 mM, NaCl 130 mM, CaCl₂ 2 mM, NaHCO₃ 5 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4.

Las sustancias odorantes se usaron en las concentraciones indicadas en la tabla 1 a continuación.

35 Tabla 1

Compuesto	Concentraciones usadas (µM)
3-mercapto-3-metilbutanol	300/150/75/30/15/7,5/3
3-metil-3-sulfanilhexan-1-ol	300/150/75/30/15/7,5/3
trisulfuro de dimetilo	300/150/75/30/15/7,5/3
ácido ditioglicólico	300/150/75/30/15/7,5/3
trisulfuro de dialilo	300/150/75/30/15/7,5/3
sulfato de cobre (II)	30

Instrumentación y desechables

40 Los experimentos se realizaron usando el sistema de examen celular de alto rendimiento FLIPR Tetra® (Molecular Devices). Se transfectaron las células y se sembraron en placas de ensayo de poliestireno negras de 384 pocillos, de fondo negro/transparente (MATRIX n.º de parte CPL-4332).

Transfección transitoria con Lipofectamine 2000

45 Todas las transfecciones transitorias se realizaron con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Se diluyeron 10 µl de Lipofectamine 2000 en 500 µl de DMEM y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Mientras tanto, se diluyeron 3 µg de ADN de plásmido en 500 µl de DMEM y se añadieron a la mezcla de Lipofectamine 2000 para obtener un volumen final de 1000 µl. Después de la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, se añadió el complejo de ADN-Lipofectamine a 1000 µl de una suspensión celular que contenía 1.600.000 células/ml. Posteriormente, se sembraron 25 µl por pocillo de la mezcla completa en placas de ensayo de poliestireno negras de 384 pocillos. Se añadieron 25 µl de DMEM que contenía FBS al 20% a cada pocillo 3 horas después de la transfección.

Medición de luminiscencia usando FLIPR Tetra®

55 El ADNc para el receptor OR4E2 se cotransfectó con pNL (NlucP/CRE/Hygro) (Promega). El vector pNL (NlucP/CRE/Hygro) contiene un elemento de respuesta (CRE) a adenosina monofosfato cíclico (AMPc) que dirige la

transcripción del gen indicador de luciferasa *NanoLuc*. La luciferasa *NanoLuc* es una enzima pequeña (19,1 kDa) modificada por ingeniería genética para un rendimiento óptimo como indicador luminiscente. La enzima es aproximadamente 100 veces más brillante que la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) o *Renilla reniformis* luciferasa que usa un sustrato novedoso, furimazina, para producir luminiscencia de tipo brillante de alta intensidad.

En este ensayo, la interacción de la sustancia odorante de azufre con su supuesto receptor olfativo conduce a la activación de la proteína *Gαs* humana expresada endógenamente. *Gαs* es una proteína G estimulante que activa la adenilato ciclasa, que convierte adenosina trifosfato (ATP) en AMPc. Por tanto, la actividad de la luciferasa transcrita puede usarse como una indicación de la activación del receptor olfativo.

24 horas después de la transfección, se retiró el medio de las células transfectadas y se añadieron 30 µl de tampón de Tyrode que contenía la sustancia odorante de azufre diluido a lo largo de 4 horas a 37°C. Entonces se transfirieron las células a un lector de placas de obtención de imágenes fluorométricas automatizado (FLIPR Tetra®, Molecular Devices). Entonces se añadieron 20 µl de una mezcla de sustratos que contiene furimazina. Esta adición dio como resultado lisis celular y permitió la interacción de la luciferasa con su sustrato furimazina, dando como resultado una emisión detectable de luz.

Análisis de datos

Los datos obtenidos a partir de diferentes réplicas de pocillos (n=4) se analizaron con Excel, ScreenWorks y SigmaPlot 11. Las respuestas del receptor a las sustancias odorantes de azufre se dividieron entre las respuestas medias del receptor hacia el tampón de Tyrode (veces de cambio - FOC). Se calcularon la media y la desviación estándar de los valores de FOC resultantes y se representaron gráficamente en diagramas de barras verticales o curvas de concentración-respuesta ajustadas mediante el software SigmaPlot 11.

Protocolo para el examen de compuestos de prueba

Se evaluó el efecto inhibitorio de los compuestos de prueba sobre la activación de OR4E2. Los compuestos de prueba y los controles se prepararon de manera reciente en tampón de Tyrode el día del experimento. Todos los compuestos de prueba se sometieron a prueba a 30 µM en combinación con una concentración activadora de una sustancia odorante de azufre.

Para evitar la evaporación de sustancias odorantes, las placas de compuesto de prueba se prepararon tan solo 2-3 horas antes del examen. Por consiguiente, los compuestos se pipetearon directamente con un cabezal de 384 pipetas desde las placas madre hasta las placas de examen que contenían una cantidad adecuada de tampón de Tyrode. Luego, se añadieron los controles y la sustancia odorante de azufre a los pocillos. Entonces se transfirieron las placas de compuestos preparadas sobre las placas de células transfectadas y se incubaron durante 3-4 horas a 37°C, seguido por un período de equilibrio de 30 minutos a temperatura ambiente antes de la lectura. Este procedimiento genera señales uniformes y evita un patrón similar a un paraguas, que a veces se observa en lecturas de luminiscencia.

El examen de compuestos de prueba se realizó por triplicado. Los datos obtenidos de las diferentes réplicas de pocillos se analizaron con un instrumento GeneData Screener. Los valores medios de FOC1 de los triplicados de cada compuesto individual en combinación con la sustancia odorante de azufre se fijaron en relación con el valor de actividad obtenido para la sustancia odorante de azufre en ausencia de cualquier compuesto de prueba (FOC2).

Ejemplo 1

Para investigar la respuesta de OR4E2 a las cinco sustancias odorantes de azufre de la tabla 1, las células se transfectaron de manera transitoria con ADN de plásmido para el receptor. 24 horas después de la transfección, se estimularon las células con siete concentraciones diferentes de las sustancias odorantes de azufre (véase la tabla 1). 4 horas después de la estimulación, se lisaron las células con la mezcla de sustratos y se detectó la actividad luciferasa. Las figuras 1A-B muestran la respuesta de OR4E2 a concentraciones crecientes de 3-mercapto-3-metilbutanol y trisulfuro de dialilo, respectivamente. Ambas sustancias odorantes tuvieron un efecto positivo sobre la activación de OR4E2.

Ejemplo 2

Se transfectaron de manera transitoria células con ADN plásmido para OR4E2. 24 horas después de la transfección, se estimularon las células con siete concentraciones diferentes de los siguientes compuestos de prueba: aceite de flores o extracto de flores de *Tagetes minuta* L. (n.º CAS 8016-84-0, respectivamente 91770-75-1) y aceite de opoponax (n.º CAS 8021-36-1). Se realizó la estimulación en presencia de 300 µM del activador de OR4E2 2,4-ditiapentano. 4 horas después de la estimulación, se lisaron las células con la mezcla de sustratos y se detectó la actividad luciferasa. Además, los compuestos de prueba también se sometieron a prueba en células que no expresan OR4E2 (simulado). Se estimularon esas células con los mismos compuestos de prueba en presencia de

isoproterenol 30 nM para controlar que no hubiera efectos inhibidores relacionados con OR4E2 de los compuestos de prueba. Los datos obtenidos de las diferentes réplicas de pocillos se analizaron con Graphpad PRISM calculando la media y la desviación estándar. La respuesta de OR4E2 a 2,4-ditiopentano en ausencia de cualquier compuesto de prueba se fijó al 100% y se calcularon curvas de concentración-respuesta.

Las figuras 2A-2B muestran la respuesta de células transfectadas con OR4E2 (azul/punto) y células de control (negro/cuadrado) a concentraciones crecientes de los compuestos mencionados anteriormente (*Tagetes minuta* l., respectivamente aceite de opoponax) en presencia de 2,4-ditiopentano 300 μ M (OR4E2) o isoproterenol 30 nM (simulado), respectivamente.

Ejemplo 3

Para ilustrar el efecto activo de algunos compuestos contra el mal olor, se diseñó una prueba para evaluar su eficacia.

Participantes

Las pruebas incluyeron 24 participantes. Todos ellos eran capaces de oler, y se les dio información detallada sobre la prueba antes de aceptar participar. Las mujeres no estaban embarazadas.

Métodos

La prueba usó una serie de frascos de 6x60 ml con una o dos mechas saturadas con una molécula en su interior. Los tres primeros frascos contenían, respectivamente, el mal olor solo (3-mercapto-2-metilbutanol), compuesto T* (AMT) solo y compuesto O* (AMO) solo. Los otros tres frascos contenían mezclas de compuestos: "Mal olor + blanco (nada)", "mal olor + AMT", "mal olor + AMO". Se estableció que la concentración del mal estuviera próxima a la vida real. Las intensidades de los compuestos de prueba se fijaron para coincidir con las del mal olor. (* T = *Tagetes minuta* l., O = aceite de opoponax, tal como se identifica en el ejemplo 2).

Las pruebas se realizaron en 3 partes. En la primera parte, los participantes comenzaron las pruebas oliendo solo el mal olor y clasificaron su intensidad en una escala de intensidad de 0 "No huelo nada" a 9 "extremadamente fuerte" y su gusto en una escala de intensidad de 0 "extremadamente desagradable" a 9 "extremadamente agradable". También se les dijo que olieran el tiempo suficiente para ser capaces de reconocerlo más adelante en la prueba.

En la segunda parte, el participante olió los dos compuestos de prueba en un orden aleatorio. Se les pidió que clasificaran de nuevo la intensidad de lo que olían y el gusto.

En la tercera parte, los participantes olieron las mezclas en orden aleatorio y clasificaron la intensidad global del olor dentro del frasco y el gusto global de lo que olieron. También tuvieron que clasificar la intensidad de la presencia del mal olor en una escala de intensidad de desde 0 "el mal olor no está presente" hasta 9 "el mal olor es extremadamente fuerte".

Resultados

Los resultados de las dos primeras partes de la prueba se muestran en las figuras 3A-B. La figura 3A muestra la puntuación de intensidad para cada compuesto solo en el frasco. La figura 3B muestra la puntuación de gusto para cada compuesto solo en el frasco. Las barras vinculadas con una misma letra no son diferentes (prueba de Duncan al 95%). La barra de error muestra el intervalo de confianza al 95%. El análisis de ANOVA mostró que el mal olor fue más intenso ($F=10,49$, $p<0,01$) y más desagradable ($F=9,16$, $p<0,01$) que los dos compuestos de prueba.

Los resultados de la tercera parte de la prueba se muestran en las figuras 4A-4C. La figura 4A muestra que la intensidad global no fue diferente para los tres frascos con una mezcla de moléculas en su interior. El análisis de ANOVA no fue significativo. Sin embargo, el análisis de ANOVA mostró que el mal olor solo (combinado con blanco) se consideró menos agradable que las dos mezclas mal olor + compuesto de prueba (véase la figura 4B) ($F=3,20$, $p<0,05$). La figura 4C muestra que la presencia del mal olor no se evalúa de la misma manera cuando se combina con un compuesto de prueba. Su intensidad es menor cuando se combina con un compuesto de prueba ($F=3,28$; $p<0,05$).

En conjunto, estos resultados muestran que los compuestos que activan el receptor OR4E2 permiten una reducción de la intensidad del mal olor objetivo cuando se combina con dicho mal olor. Esta prueba demuestra que el efecto no se debe a una diferencia de intensidad. Cuando se consideran solos, los compuestos de prueba se perciben como menos intensos que el mal olor. Cuando se consideran en una mezcla, las diferentes mezclas no tienen una intensidad diferente. La evaluación del gusto muestra que los compuestos de prueba no son demasiado agradables. El gusto global muestra que la combinación de cada uno de los compuestos de prueba con el mal olor disminuye la sensación desagradable. También disminuye la intensidad del mal olor detectado en las mezclas.

Bibliografía

- 5 Bufo B, Hofmann T, Krautwurst D, Raguse JD, Meyerhof W. *The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to beta-glucopyranosides*. Nat. Genet. 2002 32(3):397-401.
- Denawaka C, Fowles I, Dean J. *Source, impact and removal of malodour from soiled clothing*. Journal of Chromatography A 2016 (1438): 216-225.
- 10 Duan X, Block E, Li Z, Connelly T, Zhang J, Huang Z, Su X, Pan Y, Wu L, Chi Q, Thomas S, Zhang S, Ma M, Matsunami H, Chen GQ, Zhuang H. *Crucial role of copper in detection of metal-coordinating odorants*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012 109(9):3492-7.
- 15 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 11(11):1016-23.
- Li S, Ahmed L, Zhang R, Pan Y, Matsunami H, Burger JL, Block E, Batista VS, Zhuang H. *Smelling sulfur: copper and silver regulate the response of human odorant receptor OR2T11 to low-molecular-weight thiols*. Journal of the American Chemical Society 2016 (doi:10.1021/jacs6b06983).
- 20 Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB. *Combinatorial receptor codes for odors*. Cell 1999 96(5):713-23.
- Natsch A, Schmid J, Flachsmann F. *Identification of odiferous sulfanylalkanols in human axilla secretions and their formation through cleavage of cysteine precursors by a C-S lyase isolated from axilla bacteria*. Chemistry & Biodiversity 2004 1(7):1058-1072.
- 25 Noe F, Polster J, Geithe C, Kotthoff M, Schieberle P, Krautwurst D. *OR2M3: A highly specific and narrowly tuned human odorant receptor for the sensitive detection of onion key food odorant 3-mercapto-2-methylpentan-1-ol*. Chemical Sciences 2016, 00:1-16 (doi:10.1093/chemse/bjw118).
- 30 Saito H, Kubota M, Roberts RW, Chi Q, Matsunami H. *RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors*. Cell 2004 119(5):679-91 Troccaz. *The biosynthetic pathway of sulphur-containing molecules in Human Axillary Malodor: from precursors to odorous volatiles*. Thèse de doctorat: Univ. Genève, 2009, no. Sc. 4102 (<https://archive-ouverte.unige.ch/unige:4563>).
- 35 Troccaz M, Niclass Y, Anziani P, Starkenmann C. *The influence of thermal reaction and microbial transformation on the odour of human urine*. Flavour & Fragrance Journal 2013 (28) : 200-211.
- Von Dannecker LE, Mercadante AF, Malnic B. *Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein Galphao1f*. J Neurosci. 13 de abril de 2005; 25(15):3793-800.
- 40 Von Dannecker LE, Mercadante AF, Malnic B. *Ric-8B promotes functional expression of odorant receptors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006 103(24):9310-4.

Lista de secuencias

- 45 <110> TAKASAGO INTERNATIONAL CORPORATION
- <120> Método para identificar neutralizadores de malos olores
- 50 <130> 3J248230 0143 WO
- <150> Documento EP16306680.6
- <151> 14-12-2016
- 55 <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 60 <211> 313
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1
- 65

ES 2 774 132 T3

Met Asp Ser Leu Asn Gln Thr Arg Val Thr Glu Phe Val Phe Leu Gly
 1 5 10 15

Leu Thr Asp Asn Arg Val Leu Glu Met Leu Phe Phe Met Ala Phe Ser
 20 25 30

Ala Ile Tyr Met Leu Thr Leu Ser Gly Asn Ile Leu Ile Ile Ala
 35 40 45

Thr Val Phe Thr Pro Ser Leu His Thr Pro Met Tyr Phe Phe Leu Ser
 50 55 60

Asn Leu Ser Phe Ile Asp Ile Cys His Ser Ser Val Thr Val Pro Lys
 65 70 75 80

Met Leu Glu Gly Leu Leu Leu Glu Arg Lys Thr Ile Ser Phe Asp Asn
 85 90 95

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

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

Pro Leu His Tyr Pro Asn Val Met Asn Met Arg Val Cys Ile Gln Leu
 130 135 140

Val Phe Ala Leu Trp Leu Gly Gly Thr Val His Ser Leu Gly Gln Thr
 145 150 155 160

Phe Leu Thr Ile Arg Leu Pro Tyr Cys Gly Pro Asn Ile Ile Asp Ser

ES 2 774 132 T3

165 170 175
 Tyr Phe Cys Asp Val Pro Leu Val Ile Lys Leu Ala Cys Thr Asp Thr
 180 185 190
 Tyr Leu Thr Gly Ile Leu Ile Val Thr Asn Ser Gly Thr Ile Ser Leu
 195 200 205
 Ser Cys Phe Leu Ala Val Val Thr Ser Tyr Met Val Ile Leu Val Ser
 210 215 220
 Leu Arg Lys His Ser Ala Glu Gly Arg Arg Lys Ala Leu Ser Thr Cys
 225 230 235 240
 Ser Ala His Phe Met Val Val Ala Leu Phe Phe Gly Pro Cys Ile Phe
 245 250 255
 Ile Tyr Thr Arg Pro Asp Thr Ser Phe Ser Ile Asp Lys Val Val Ser
 260 265 270
 Val Phe Tyr Thr Val Val Thr Pro Leu Leu Asn Pro Phe Ile Tyr Thr
 275 280 285
 Leu Arg Asn Glu Glu Val Lys Ser Ala Met Lys Gln Leu Arg Gln Arg
 290 295 300
 Gln Val Phe Phe Thr Lys Ser Tyr Thr
 305 310

<210> 2
 <211> 939
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

atggacagtc taaaccaaac aagagtgact gaatttgtct tcttgggact cactgataac 60
 cgggtgctgg aaatgctggt ttcataggca ttctcagcca tttatatgct aacgctttca 120
 gggaacattc tcatcatcat tgccacagtc tttactccaa gtctccatac ccccatgtat 180
 ttcttctga gcaatctgtc ctttattgac atctgcccact catctgtcac tgtgcctaag 240
 atgttgagg gtttgctttt agaaagaaag accatttcct ttgacaactg catcacacag 300
 ctcttcttcc tacatctctt tgctgtgccc gagatcttcc tgctgatcat tgtggcgtat 360
 gatggttaag tggctatctg cactccactc cactacccca atgtgatgaa catgagagtc 420
 tgtatacagc ttgtctttgc tctctggttg gggggactg ttcactcact agggcagacc 480
 ttcttgacta ttcgtctacc ttactgtggc cccaacatta ttgacagcta cttctgtgat 540
 gtgcctcttg ttatcaagct ggctgcaca gatacatacc tcacaggaat actgattgtg 600
 accaatagtg gaaccatctc cctctcctgt ttcttggccg tggtcacctc ctatatggtc 660
 atcctggttt ctcttcgaaa aactcagct gaagggcgcc agaaagccct gtctacctgc 720
 tcggccact tcatgggtgt tgccctcttc tttgggcat gtatcttcat ctatactcgg 780
 ccagacacca gcttctccat tgacaagggt gtgtctgtct tctacacagt ggtcaccctc 840
 ttgctgaatc cttcattta cacctgagg aatgaggagg taaaaagtgc catgaagcag 900
 ctgaggcaga gacaagtttt ttccacgaaa tcatataca 939

10

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para determinar si un compuesto de prueba puede neutralizar el mal olor percibido a partir de una sustancia odorante de azufre, comprendiendo el método las etapas de:
- 5 a) poner en contacto el polipéptido OR4E2 con una sustancia odorante de azufre, en presencia y ausencia del compuesto de prueba, en condiciones que permiten la unión de dicha sustancia odorante de azufre a OR4E2 o que permiten la activación de OR4E2 por dicha sustancia odorante de azufre;
- 10 b) comparar la unión de OR4E2 a dicha sustancia odorante de azufre, o la actividad de OR4E2, en presencia y ausencia del compuesto de prueba;
- 15 en el que una inhibición de la unión o una disminución de la actividad en presencia del compuesto de prueba, en relación con la unión o actividad en ausencia del compuesto de prueba, identifica el compuesto de prueba como un compuesto que puede neutralizar el mal olor percibido a partir de la sustancia odorante de azufre;
- en el que la etapa a) se realiza en o sobre células que expresan OR4E2.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, en el que dichas células son células de mamífero.
3. Método según la reivindicación 2, en el que dichas células de mamífero se seleccionan de células de riñón embrionario humano, células de ovario de hámster chino, células HeLa y preparaciones de membranas de dichas células.
- 25 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa a) se realiza en presencia de iones Cu^{2+} .
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polipéptido OR4E2 tiene la secuencia (SEQ ID NO:1).
- 30 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polipéptido OR4E2 tiene una secuencia que tiene al menos un 85% de identidad con SEQ ID NO:1, con la condición de que se conserven los aminoácidos en las posiciones 12, 42, 118, 165, 234, 237, 241 y 270 de SEQ ID NO:1.
- 35 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polipéptido OR4E2 está codificado por un ácido nucleico que tiene la secuencia (SEQ ID NO:2).
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende en la etapa b) comparar la actividad de OR4E2, en contacto con la sustancia odorante de azufre, en presencia y ausencia del compuesto de prueba.
- 40 9. Método según la reivindicación 8, en el que la etapa b) comprende:
- 45 i) medir la respuesta de OR4E2 a un control;
- ii) medir la respuesta de OR4E2 a la sustancia odorante de azufre en ausencia del compuesto de prueba;
- 50 iii) calcular un primer coeficiente de cambio [FOC1 = respuesta obtenida en la etapa ii) dividido entre la respuesta obtenida en la etapa i)];
- iv) medir la respuesta de OR4E2 a la sustancia odorante de azufre en presencia del compuesto de prueba;
- 55 v) calcular un segundo coeficiente de cambio [FOC2 = respuesta obtenida en la etapa iv) dividido entre la respuesta obtenida en la etapa i)];
- 60 vi) comparar FOC1 y FOC2, donde el compuesto de prueba se identifica como un compuesto que puede neutralizar el mal olor percibido a partir de la sustancia odorante de azufre si la razón FOC2/FOC1 es menor de 0,8.
10. Método según la reivindicación 9, en el que el compuesto de prueba se identifica como un compuesto que puede neutralizar el mal olor percibido a partir de la sustancia odorante de azufre si la razón FOC2/FOC1 es menor de 0,7, tal como, por ejemplo, menor de 0,5, menor de 0,1, menor de 0,05 o menor de 0,01.
- 65 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la sustancia odorante de azufre se selecciona de un sulfanilalcanol tal como 2-mercapto-3-metil-1-butanol, 3-mercapto-2-metil-1-pentanol, 3-

- 5 mercapto-2-metil-1-propanol, 3-mercapto-3-metil-1-butanol, 3-mercapto-1-hexanol, 3-metil-3(2-metildisulfanil)-butan-1-ol o 3-mercapto-3-metil-1-hexanol; un sulfanil-aldehído o -cetona, tal como 3-mercapto-2-metilpentanal, 1-mercapto-3-pentanona, 2-mercapto-3-pentanona o 3-mercapto-3-pentanona; un éster sulfanílico tal como acetato de 3-metil-3-mercaptobutilo o formiato de 3-metil-3-mercaptobutilo; un tiol tal como 1-metoxiheptano-3-tiol, 4-metoxi-2-metilbutano-2-tiol o 1-propanotiol; ácido tioglicólico; ácido ditioglicólico; un sulfuro tal como disulfuro de metil-2-propenilo, sulfuro de dimetilo, disulfuro de dimetilo, trisulfuro de dimetilo, sulfuro de dialilo, disulfuro de dialilo o trisulfuro de dialilo; alilmercaptano; alicina; aliina; y cisteína.
- 10 12. Método según la reivindicación 11, en el que la sustancia odorante de azufre es un sulfanilalcanol o un sulfuro.
13. Uso *in vitro* del polipéptido OR4E2 para identificar un compuesto que pueda neutralizar el mal olor percibido a partir de una sustancia odorante de azufre.
- 15 14. Uso según la reivindicación 13, en el que el polipéptido OR4E2 tiene la secuencia (SEQ ID NO:1).
- 20 15. Uso según la reivindicación 13, en el que el polipéptido OR4E2 está codificado por un ácido nucleico que tiene la secuencia (SEQ ID NO:2).

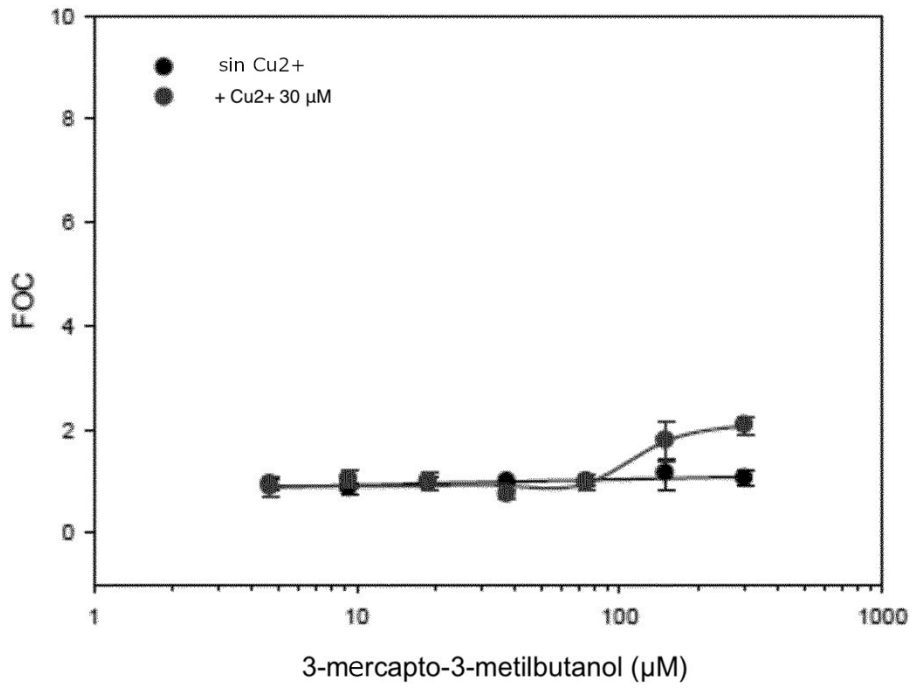


Fig.1A

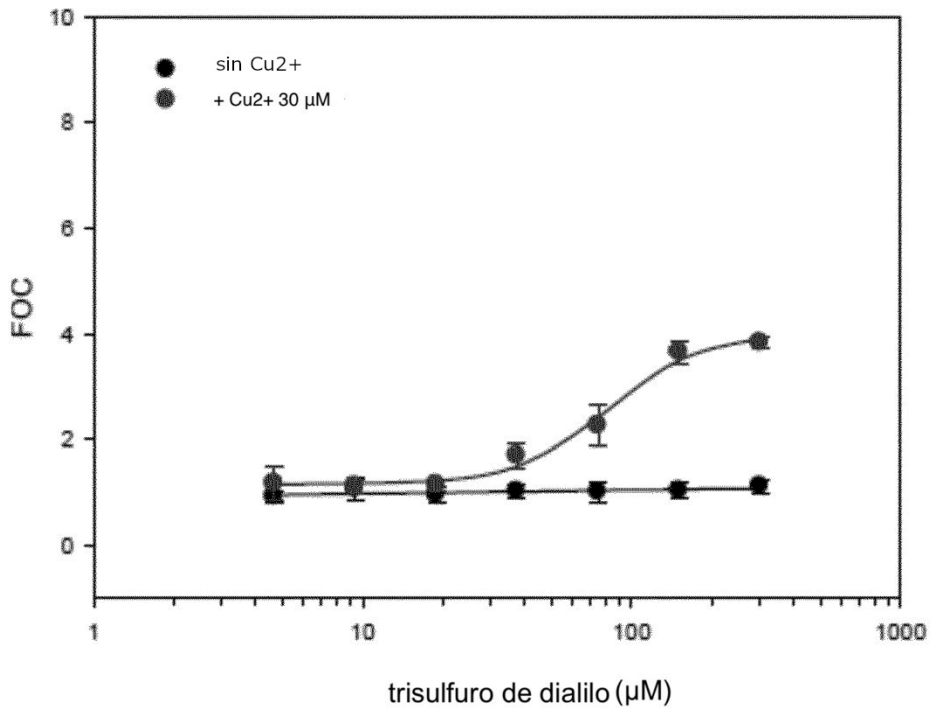


Fig.1B

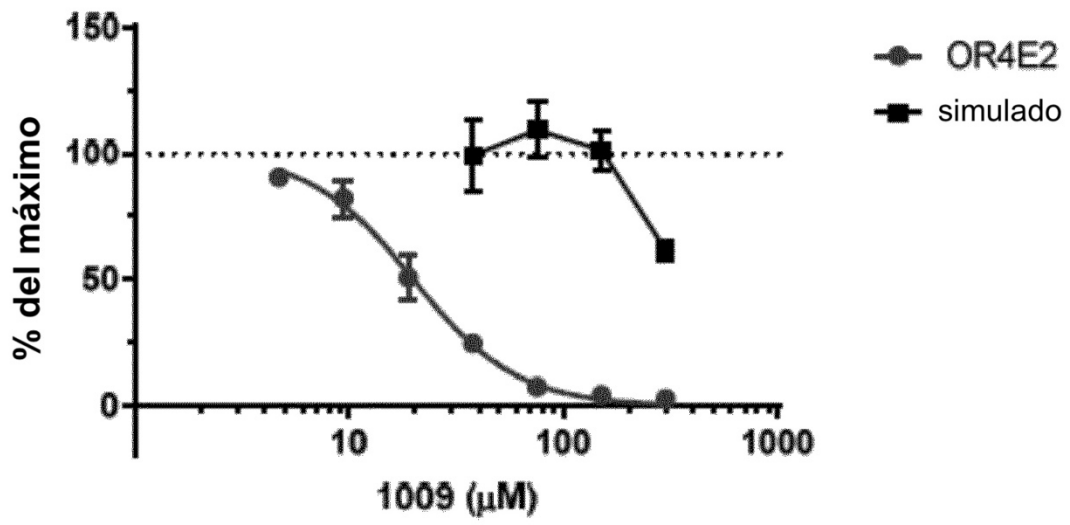


Fig.2A

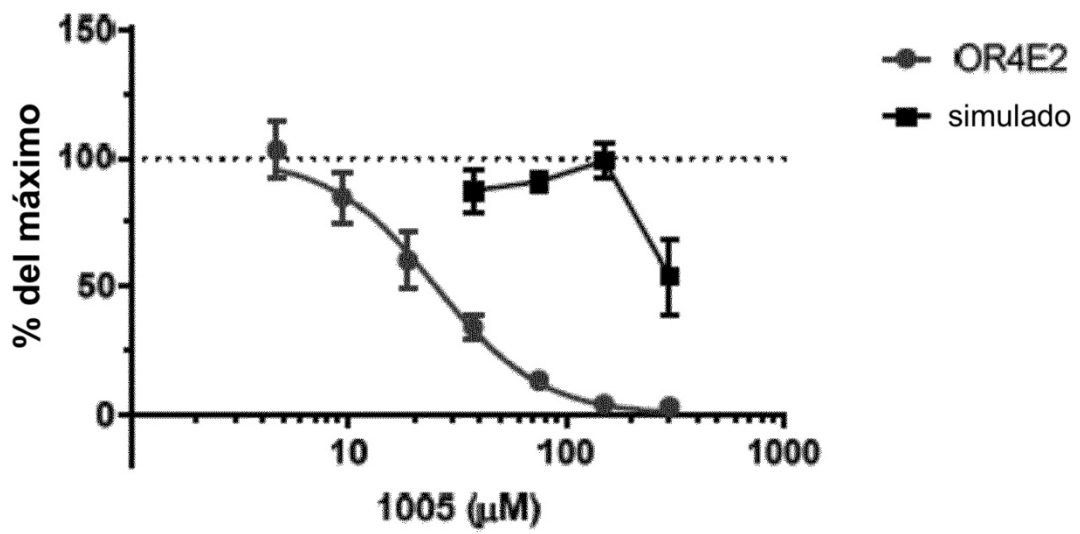


Fig.2B

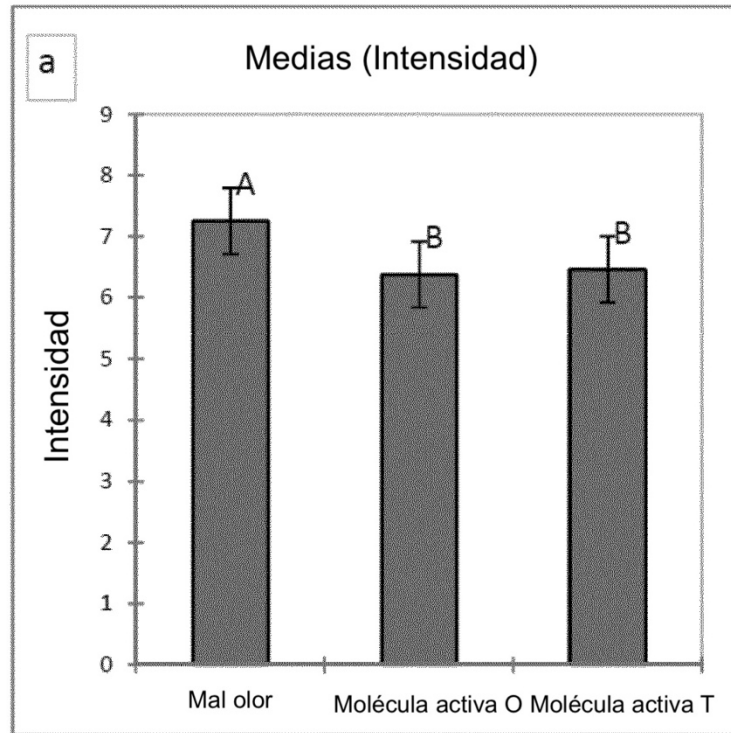


Fig.3A

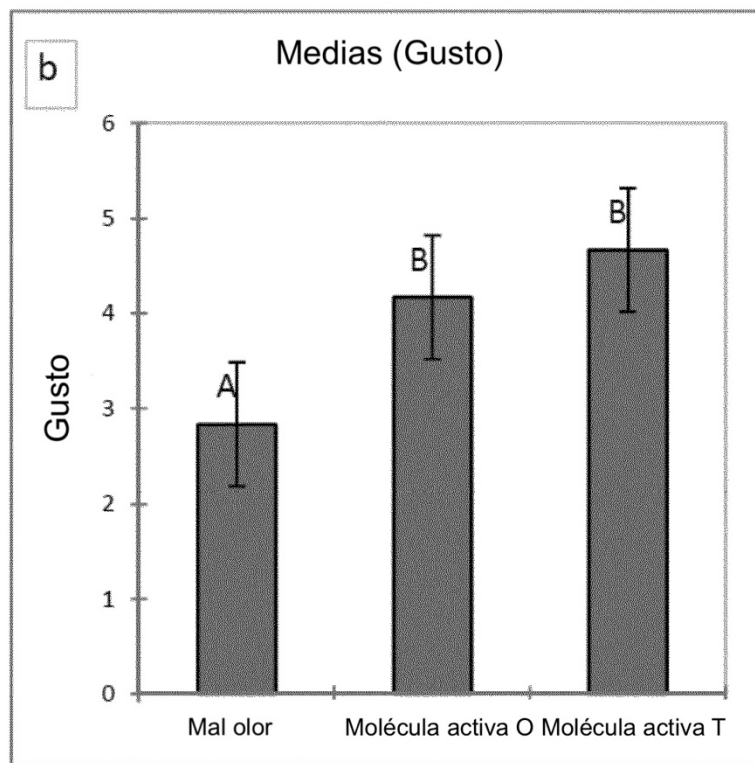


Fig.3B

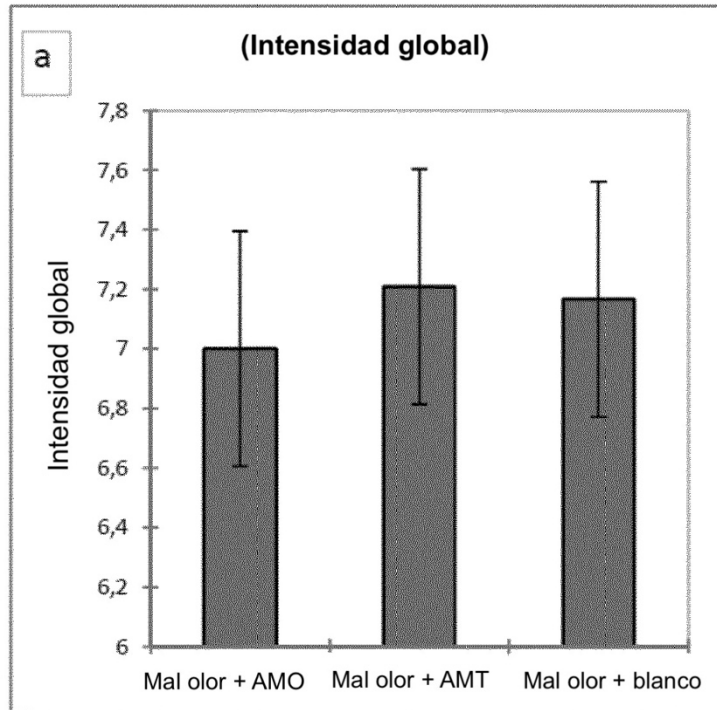


Fig.4A

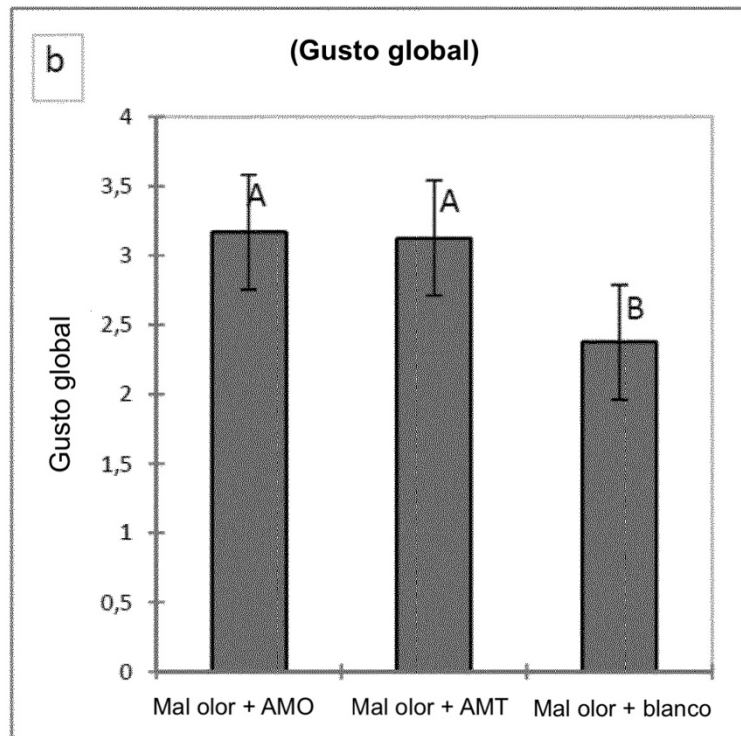


Fig.4B

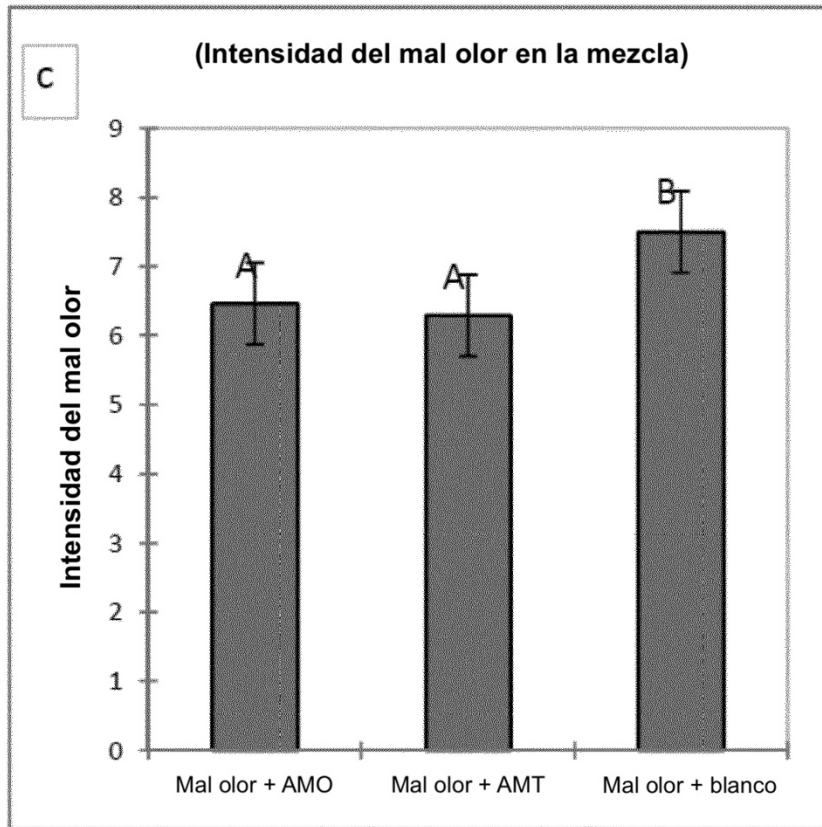


Fig.4C