

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 440**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/72** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2016 PCT/US2016/036776**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016 WO16201152**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2016 E 16732422 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3307770**

54 Título: **Procedimiento de identificación de compuestos de almizcle**

30 Prioridad:

**10.06.2015 US 201562173762 P**

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

**23.02.2021**

73 Titular/es:

**FIRMENICH SA (100.0%)  
7, Rue de la Bergère  
1242 Satigny, CH**

72 Inventor/es:

**PFISTER, PATRICK y  
ROGERS, MATTHEW**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**ES 2 807 440 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**

Procedimiento de identificación de compuestos de almizcle

**Campo**

5 El campo técnico se dirige a los receptores y ensayos de olor y aroma que se pueden usar para identificar compuestos de aroma y/o olor y, más específicamente, potenciadores de compuestos de almizcle.

**Antecedentes**

10 El olfato es uno de los sistemas sensoriales humanos más complejos y poco conocidos. Desde la activación del receptor olfativo (OR) hasta la percepción, hay muchos pasos que aún requieren mayor investigación. Los compuestos de almizcle son parte de un grupo estructuralmente diverso de productos químicos que comprende almizcles macrocíclicos, almizcles policíclicos, almizcles alicíclicos y nitro almizcles. Estos compuestos de almizcle se usan en perfumería y forman las notas base en muchas formulaciones comerciales. Por lo tanto, existe la necesidad de identificar nuevos compuestos de almizcle y compuestos que mejoren la percepción de almizcle en los perfumes.

**Sumario**

15 En la presente memoria se describe una célula huésped transformada para expresar un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4.

Además, en la presente memoria se describe un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4.

20 También se describe en la presente memoria un vector de expresión que tiene un ácido nucleico en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 75 % idéntica a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3.

25 La presente invención se refiere a un procedimiento para identificar un compuesto que activa, imita, bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa por uno o más compuestos de almizcle seleccionados de un almizcle policíclico y un nitro almizcle, en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4, en el que el procedimiento comprende:

30 a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo, reteniendo la capacidad de dicho polipéptido para que se active por uno o más compuestos de almizcle seleccionados de un compuesto de almizcle policíclico y nitro almizcle, o una célula que se modifica mediante recombinación para expresar dicho polipéptido, en el que la célula comprende

1) un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido; o

2) un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido y comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 75 % idéntica a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3

35 con un compuesto en presencia de dicho uno o más compuestos de almizcle seleccionados de un compuesto de almizcle policíclico y nitro almizcle; y

b) detectar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

40 La presente invención se refiere además al uso de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4 para identificar un compuesto de almizcle, en el que el polipéptido tiene la capacidad de ser activado por uno o más compuestos de almizcle.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para identificar un compuesto de almizcle, que comprende utilizar un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4 y que tiene la capacidad de ser activada por uno o más compuestos de almizcle en un ensayo basado en receptor para identificar un compuesto de almizcle.

45 La presente invención se refiere además al uso de un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3 para identificar un compuesto de almizcle.

Todavía más se proporciona una célula que se modifica mediante recombinación para expresar un polipéptido descrito anteriormente.

50 **Descripción detallada de los dibujos**

La **Figura 1** muestra rastros de imágenes de neuronas sensoriales olfativas  $Ca^{2+}$  que respondieron a mezclas de compuestos de almizcle (Figura 1A) y la posterior identificación de los receptores de ratón Olfr96 y Olfr235 (Figura 1 B).

5 La **Figura 2** muestra las curvas de respuesta a la dosis de almizcle de Olfr96 con compuestos de almizcle policíclicos vulcanolide y tonalide.

La **Figura 3** muestra las curvas de respuesta a la dosis de almizcle de Olfr96 y OR11A1 con compuestos de almizcle policíclicos vulcanolide, tonalide y cashmeran, y el compuesto de nitro almizcle, almizcle X.

### Descripción detallada

10 Para las descripciones en la presente memoria y las reivindicaciones adjuntas, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. De forma similar, "comprende", "comprenden", "que comprende", "incluye", "incluyen" y "que incluye" son intercambiables y no pretenden ser limitantes.

Debe entenderse además que cuando las descripciones de diversas realizaciones usan el término "que comprende", los expertos en la técnica entenderán que en algunos casos específicos, una realización se puede describir alternativamente usando el lenguaje "que consiste esencialmente en" o "que consiste en".

15 En la presente memoria se describe una célula huésped que se transforma para expresar un polipéptido en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

20 En la presente memoria se describe una célula huésped que se transforma para expresar un polipéptido en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

En la presente memoria se describe una célula huésped que se transforma para expresar un polipéptido en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

25 En la presente memoria se describe una célula huésped que se transforma para expresar un polipéptido en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

En la presente memoria se describe una célula huésped que se transforma para expresar un polipéptido en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

30 En la presente memoria se describe una célula huésped que se transforma para expresar un polipéptido en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

En la presente memoria se describe una célula huésped que se transforma para expresar un polipéptido en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

35 En la presente memoria se describe una célula huésped que se transforma para expresar un polipéptido en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4.

En la presente memoria se describe una célula huésped que se transforma para expresar un polipéptido en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4.

40 En la presente memoria se describe una célula huésped que se transforma para expresar un polipéptido en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4.

En la presente memoria se describe una célula huésped que se transforma para expresar un polipéptido en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4.

45 En la presente memoria se describe una célula huésped que se transforma para expresar un polipéptido en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4.

50 En la presente memoria se describe una célula huésped que se transforma para expresar un polipéptido en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4.

En la presente memoria se describe una célula huésped que se transforma para expresar un polipéptido en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4.

5 En la presente memoria se describe una célula huésped que se transforma para expresar una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4; más particularmente una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 2; incluso más particularmente una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 4.

Además, en la presente memoria se describe un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

10 Además, en la presente memoria se describe un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

15 Además, en la presente memoria se describe un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

Además, en la presente memoria se describe un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

20 Además, en la presente memoria se describe un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

Además, en la presente memoria se describe un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

25 Además, en la presente memoria se describe un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

Además, en la presente memoria se describe un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4.

30 Además, en la presente memoria se describe un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4.

35 Además, en la presente memoria se describe un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4.

Además, en la presente memoria se describe un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4.

40 Además, en la presente memoria se describe un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4.

Además, en la presente memoria se describe un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4.

45 Además, en la presente memoria se describe un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4.

50 Además, en la presente memoria se describe un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4; más particularmente una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 2; incluso más particularmente una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 4.

También se describe en la presente memoria un vector de expresión que tiene un ácido nucleico en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es idéntica a al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

5 También se describe en la presente memoria un vector de expresión que tiene un ácido nucleico en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

También se describe en la presente memoria un vector de expresión que tiene un ácido nucleico en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

10 También se describe en la presente memoria un vector de expresión que tiene un ácido nucleico en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

También se describe en la presente memoria un vector de expresión que tiene un ácido nucleico en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

15 También se describe en la presente memoria un vector de expresión que tiene un ácido nucleico en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

También se describe en la presente memoria un vector de expresión que tiene un ácido nucleico en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

20 También se describe en la presente memoria un vector de expresión que tiene un ácido nucleico en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es idéntica a al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 3.

También se describe en la presente memoria un vector de expresión que tiene un ácido nucleico en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 3.

25 También se describe en la presente memoria un vector de expresión que tiene un ácido nucleico en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 3.

También se describe en la presente memoria un vector de expresión que tiene un ácido nucleico en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 3.

30 También se describe en la presente memoria un vector de expresión que tiene un ácido nucleico en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 3.

También se describe en la presente memoria un vector de expresión que tiene un ácido nucleico en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 3.

35 También se describe en la presente memoria un vector de expresión que tiene un ácido nucleico en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 3.

También se describe en la presente memoria un vector de expresión que tiene un ácido nucleico en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 1.

40 También se describe en la presente memoria un vector de expresión que tiene un ácido nucleico en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 3.

También se describe en la presente memoria una célula que se modifica mediante recombinación para expresar un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4.

45 Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento para identificar un compuesto que activa, imita, bloquea, inhibe, modula y/o mejora la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante uno o más compuestos de almizcle seleccionados de un almizcle policíclico y un nitro almizcle, en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4, en el que el procedimiento comprende:

50 a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo, reteniendo la capacidad de dicho polipéptido para que se active por uno o más compuestos de almizcle seleccionados de un compuesto de

almizcle policíclico y nitro almizcle, o una célula que se modifica mediante recombinación para expresar dicho polipéptido, en el que la célula comprende

1) un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido; o

5 2) un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido y comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 75 % idéntica a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3

con un compuesto en presencia de dicho uno o más compuestos de almizcle seleccionados de un compuesto de almizcle policíclico y nitro almizcle; y

b) detectar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

10 Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un almizcle policíclico en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 en el que el procedimiento comprende:

a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

15 Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un almizcle policíclico en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 en el que el procedimiento comprende:

a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

20 b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un almizcle policíclico en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 en el que el procedimiento comprende:

25 a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

30 Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un almizcle policíclico en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 95 %, 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 en el que el procedimiento comprende:

a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

35 Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un almizcle policíclico en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 en el que el procedimiento comprende:

a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

40 Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un almizcle policíclico en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 en el que el procedimiento comprende:

a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

45 Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un

almizcle policíclico en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 en el que el procedimiento comprende:

- a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;
- b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

5 Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un almizcle policíclico en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 en el que el procedimiento comprende:

- a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

10 b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un almizcle policíclico en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 en el que el procedimiento comprende:

15 a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

- b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un almizcle policíclico en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 en el que el procedimiento comprende:

20 a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

- b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un almizcle policíclico en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 95 %, 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 en el que el procedimiento comprende:

25 a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

- b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un almizcle policíclico en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 en el que el procedimiento comprende:

30 a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

- b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

35 Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un almizcle policíclico en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 en el que el procedimiento comprende:

- a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

40 b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un almizcle policíclico en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 en el que el procedimiento comprende:

45 a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

- b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un almizcle policíclico en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 4 en el que el procedimiento comprende:

- 5 a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;  
b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un almizcle policíclico en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 2 en el que el procedimiento comprende:

- 10 a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;  
b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa por un nitro almizcle en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4 en el que el procedimiento comprende:

- 15 a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;  
b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa por un nitro almizcle en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 en el que el procedimiento comprende:

- 20 a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;  
b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa por un nitro almizcle en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 en el que el procedimiento comprende:

- 25 a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;  
30 b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa por un nitro almizcle en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 en el que el procedimiento comprende:

- 35 a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;  
b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un nitro almizcle en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 95 %, 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 en el que el procedimiento comprende:

- 40 a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;  
b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un nitro almizcle en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 en el que el procedimiento comprende:

- 45 a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un nitro almizcle en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 en el que el procedimiento comprende:

a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa por un nitro almizcle en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 en el que el procedimiento comprende:

a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa por un nitro almizcle en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 en el que el procedimiento comprende:

a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa por un nitro almizcle en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 en el que el procedimiento comprende:

a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa por un nitro almizcle en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 en el que el procedimiento comprende:

a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un nitro almizcle en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 95 %, 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 en el que el procedimiento comprende:

a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un nitro almizcle en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 en el que el procedimiento comprende:

a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un nitro almizcle en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 98 % y 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 en el que el procedimiento comprende:

- a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;
- b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

5 Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa por un nitro almizcle en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 en el que el procedimiento comprende:

- a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;
- b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

10 Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa por un nitro almizcle en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 4 en el que el procedimiento comprende:

- a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;
- b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

15 Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa por un nitro almizcle en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 2 en el que el procedimiento comprende:

- a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto;

20 b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

Además, se proporciona uno cualquiera de una serie de compuestos de almizcle que activa, imita, bloquea, inhibe, modula y/o mejora la actividad de un receptor olfativo y que se identifica por los procedimientos que se divulgan en la presente memoria.

25 Otra realización de la invención se refiere al uso de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4 para identificar un compuesto de almizcle que activa, imita, bloquea, inhibe, modula y/o mejora la actividad de un receptor olfativo, en el que el polipéptido tiene la capacidad de ser activado por uno o más compuestos de almizcle.

Todavía más se proporciona una célula que se modifica mediante recombinación para expresar un polipéptido descrito anteriormente.

30 En una realización, se proporciona en la presente memoria una célula no humana transformada para expresar un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4; más particularmente una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 2; incluso más particularmente una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 4.

35 Además, se proporciona en la presente memoria un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4; más particularmente una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 2; incluso más particularmente una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 4.

40 En una realización que se proporciona en la presente memoria, hay una célula que se modifica mediante recombinación para expresar un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4.

En una realización que se proporciona en la presente memoria, hay una célula que se modifica mediante recombinación para expresar un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4; más particularmente una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 2; incluso más particularmente una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 4.

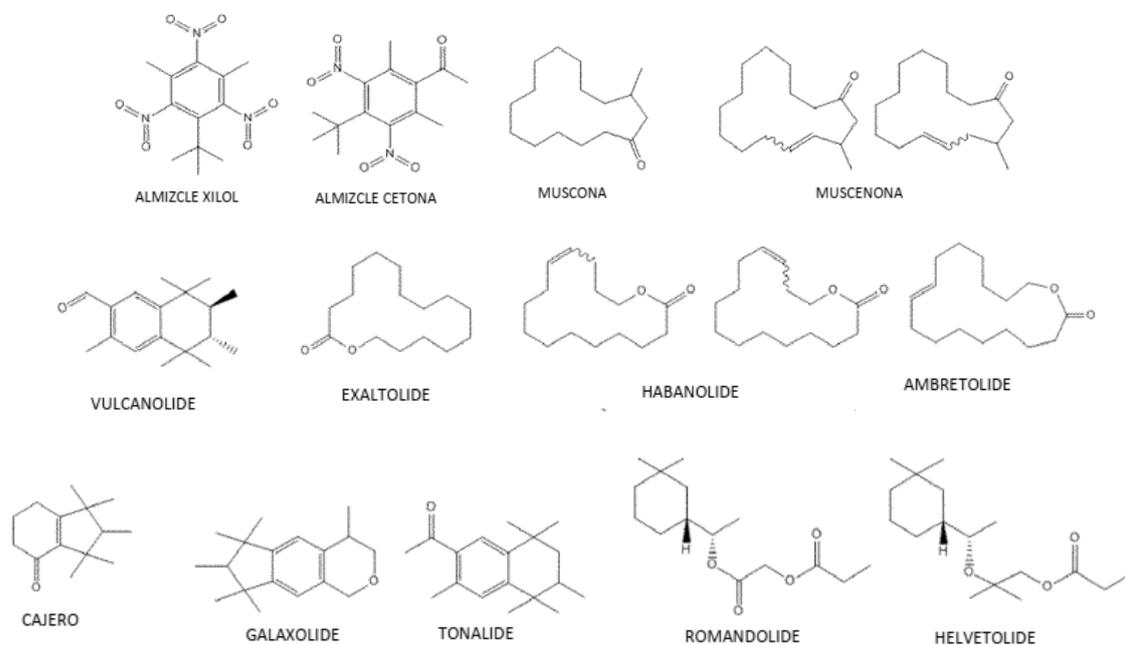
45 Además, se proporciona en la presente memoria un procedimiento de acuerdo con la invención para identificar un compuesto que bloquea, inhibe, modula y/o aumenta la actividad de un receptor olfativo que se activa mediante un almizcle policíclico en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4, más particularmente una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 2; incluso más particularmente una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 4. en el que  
50 el procedimiento comprende:

- a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo con un compuesto; y
- b) determinar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.

En una realización, que se proporciona en la presente memoria hay una célula en la que la célula es una célula procarionota. En otra realización, la célula que se proporciona en la presente memoria es una célula eucariota. En una realización particular, la célula que se proporciona en la presente memoria se selecciona de un grupo que consiste en una célula de levadura y una célula vegetal. En una realización más particular que se proporciona en la presente memoria, la célula se selecciona del grupo que consiste en HEK293, CHO, ovocitos de Xenopus, COS, levadura, bacterias y células derivadas de la placoda olfatoria.

Para identificar receptores específicos de almizcle desconocidos, se utilizan mezclas representativas de almizcles para detectar neuronas sensoriales olfativas disociadas (OSN). Los compuestos de almizcle individuales se pueden utilizar adicionalmente para experimentos de dosis-respuesta que se basan en células que se realizan en receptores de almizcle específicos para evaluar tanto la especificidad como la sensibilidad de los receptores.

Por ejemplo, los compuestos de almizcle son parte de un grupo estructuralmente diverso de productos químicos que comprende almizcles macrocíclicos, almizcles policíclicos, almizcles alicíclicos y nitro almizcles como se expone a continuación.



En un aspecto, se proporcionan en la presente memoria procedimientos para identificar receptores de olor de mamíferos para compuestos de perfume de almizcle y el uso del receptor para el cribado, particularmente para el cribado de alto rendimiento (HTS) de moduladores de almizcle (por ejemplo, potenciadores) y de nuevos compuestos de almizcle. En particular, en la presente memoria se proporcionan receptores de ratón, por ejemplo, Olfr96 (SEQ ID NO: 2) y su homólogo humano OR11A1 (SEQ ID NO: 4) como receptores para compuestos de almizcle que comprenden Vulcanolide, Cashmeran, Tonalide y Almizcle X.

Si bien no desea estar vinculado a ninguna teoría, el receptor de ratón Olfr235 es un parálogo del receptor Olfr1440 y un ortólogo del receptor humano OR5AN1. Estos receptores se identificaron previamente como receptores sensibles a muscona y muscenona (WO2015/020158; Shirasu y otros., Neuron (2013)).

En una realización adicional, los indicadores para controlar la actividad de los receptores olfativos se seleccionan de un colorante indicador fluorescente de calcio, una proteína indicadora de calcio, un indicador fluorescente AMPc, una proteína indicadora mediada por el elemento de respuesta AMPc (CRE), un ensayo bioquímico AMPc HTRF, un ensayo de beta-arrestina, o un registro electrofisiológico. En particular, se selecciona un colorante indicador de calcio que se puede usar para controlar la actividad de los receptores olfativos que se expresan en la membrana de las neuronas olfativas (por ejemplo, Fura-2 AM).

En una realización particular, los compuestos se seleccionan secuencialmente y los cambios dependientes del olor en la fluorescencia del colorante de calcio se miden usando un microscopio fluorescente o un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS).

En una realización adicional, se usa el modelado molecular del receptor 3D de los receptores olfativos para evaluar el potencial de unión *in silico* e identificar compuestos que pueden activar, imitar, bloquear, inhibir, modular y/o potenciar la actividad de un receptor olfativo.

5 Como ejemplo, las neuronas olfativas se aíslan mediante uno o más compuestos de almizcle utilizando un microelectrodo de vidrio que se conecta a un micromanipulador o una máquina FACS. Las neuronas sensoriales olfativas del ratón se examinan por imágenes de  $Ca^{2+}$  similares a los procedimientos descritos previamente (Malnic y otros, 1999; Areneda y otros, 2004; WO2014/210585). Particularmente, se usa una platina de microscopio móvil motorizada para aumentar el número de células que se pueden examinar de al menos 1.500 por experimento. Dado que hay aproximadamente 1.200 receptores olfativos diferentes en el ratón y cada neurona sensorial olfativa expresa solo 1 de 1.200 genes de receptores olfativos, esta capacidad de cribado cubrirá prácticamente todo el repertorio de receptores de olores del ratón. En otras palabras, la combinación de imágenes de calcio para el cribado de neuronas sensoriales olfativas de alto rendimiento conduce a la identificación de casi todos los receptores de olor que responden a un perfil particular de olores. En un aspecto particular, se pueden aislar los receptores de olor que responden a los compuestos de almizcle. Por ejemplo, al menos una neurona se aísla.

15 Para obtener imágenes de calcio de las neuronas olfativas, el epitelio olfativo principal se puede diseccionar de un ratón antes de la disociación neuronal. El epitelio olfativo diseccionado se puede luego transferir a un tampón de disociación para la disociación mecánica y enzimática. Las neuronas disociadas se pueden sembrar en un cubreobjetos que permite el cribado de miles de células mediante microscopía de fluorescencia y las células se pueden cargar con un colorante sensible al calcio (Fura-2 AM), por ejemplo, durante aproximadamente 30 minutos a 20 31 °C y se transfieren al microscopio listo para el cribado. Las células se estimulan perfundiendo soluciones de olor diluidas (en solución salina fisiológica) sobre las neuronas olfativas disociadas. Las células raras que responden al compuesto de mal olor se identifican, por ejemplo, estimulando los receptores con 50  $\mu$ m de los compuestos de almizcle y luego monitoreando el flujo de  $Ca^{2+}$  intracelular que se indica por cambios en la fluorescencia de Fura-2. Después del análisis, las células que responden se pueden recuperar de un cubreobjetos de vidrio con una micropipeta de succión. Las células aisladas se agrupan en una muestra para la posterior identificación de los genes del receptor de olor que se expresan como ARNm en las células que responden.

En una realización particular, el ARNm de las neuronas olfativas se purifica y amplifica de acuerdo con el procedimiento que se describe generalmente en Marko, NF, y otros, (2005) A robust method for the amplification of RNA in the sense orientation. BMC genomics, 6, 27; doi:10.1186/1471-2164-6-27 (Procedimiento Eberwine). Al menos una parte del transcriptoma (hasta incluir todo el transcriptoma) se secuencian usando la secuenciación de próxima generación (NGS) o se hibrida con genes conocidos usando tecnologías de micromatrices. NGS se discute y describe generalmente en Metzker, ML (2010). Sequencing technologies - the next generation. Nature reviews. Genetics, 11 (1), 31-46; doi:10.1038/nrg262. En una realización particular, se agrupan un mínimo de 5 neuronas que presentan el mismo perfil de respuesta. El ARNm se libera por lisis celular inmediatamente después de la recolección; no se llevan a cabo etapas de DNasa ni de purificación. El ARNm se amplifica por dos rondas consecutivas de transcripción *in vitro* (IVT). La amplificación se puede realizar de acuerdo con el kit de ARNA MesageAmpII (Ambion, AMA1751) con los siguientes parámetros: dos rondas de IVT consecutivas de 14 horas de duración.

40 En una realización adicional, la identidad de un grupo o familia de genes de receptores olfativos de almizcle se determina (por ejemplo, hasta el número de neuronas recogidas) comparando los resultados de las lecturas de NGS que se obtienen de las neuronas sensoriales olfativas activadas que se aíslan con una secuencia de genoma de referencia de la misma especie. En particular, los supuestos receptores de almizcle serán los ARNm más abundante en la muestra de NGS derivada de neuronas olfativas o estarán presentes en más de una réplica biológica independiente. Debido a la naturaleza combinatoria del código olfativo (un compuesto activa muchas OR y un OR se puede activar por muchos compuestos), la agrupación de varias neuronas que se activan por determinados compuestos permite la recuperación de prácticamente todos los receptores responsables de la percepción de estas moléculas en un solo experimento NGS. Agrupar neuronas funcionalmente similares mejora enormemente el rendimiento y la velocidad de desorfanización.

50 Las herramientas de bioinformática estándares se utilizan para identificar los receptores de olor humanos más estrechamente relacionados con otros supuestos receptores de almizcle de mamíferos (no humanos) bajo el supuesto de que los receptores de secuencias homólogas conservan una función similar. Adipietro y otros. (2012) Functional Evolution of Mammalian Odorant Receptors. PLoS Genet 8 (7): e1002821. doi: 10.1371/journal.pgen.1002821. Se pueden usar los parámetros predeterminados del algoritmo BLASTP y/o BLASTN.

55 Los receptores de almizcle de mamífero humano o no humano se pueden adaptar a un ensayo funcional que se puede usar para identificar compuestos que activan, imitan, bloquean, modulan y/o potencian la actividad de un compuesto de almizcle. En particular, el ensayo puede ser un ensayo que se basa en células o un ensayo de unión y el procedimiento para identificar compuestos puede ser un ensayo de cribado de alto rendimiento. Más particularmente, en la presente memoria se proporcionan ensayos que se basan en receptores adaptables para el cribado de receptores de alto rendimiento con librerías de compuestos para el descubrimiento de compuestos moduladores (por ejemplo, bloqueo, mejora y enmascaramiento).

En una realización particular, las secuencias de genes del receptor de almizcle se identifican a partir de células sensibles a compuestos de almizcle como sigue: Las neuronas agrupadas se calientan a 75 °C durante 10 minutos para romper la membrana celular y hacer que su ARNm esté disponible para la amplificación. Este paso de amplificación es importante cuando se aplican tecnologías NGS con una cantidad limitada de material de partida, típicamente entre 5 y 15 celdas. Una amplificación lineal de acuerdo con el procedimiento Eberwine (IVT) asegura el mantenimiento de los niveles relativos de transcripción de los genes que se expresan. Dos rondas consecutivas durante la noche (14h) de transcripción *in vitro* se usan para producir cantidades suficientes de ARNc; el ARNc amplificado se usa luego para generar una librería de ADNc en un Illumina HiSeq. Las secuencias cortas resultantes de típicamente 150 pares de bases (comúnmente conocidas como "lecturas") se alinean contra el genoma de referencia del ratón (como la versión UCSC mm9 o mm10) para construir el transcriptoma completo de estas células. El análisis cuantitativo de los datos del transcriptoma produce una lista de transcritos de genes de receptores de olores y sus respectivos niveles de expresión. Los genes receptores de olor que muestran los niveles más abundantes de ARNm ("lecturas" más abundantes) o están presentes en más de un experimento repetido, se consideran supuestos receptores de compuestos de almizcle.

Los genes OR de ratón pronosticados se utilizan para extraer las últimas versiones de las bases de datos del genoma humano y del ratón para identificar los receptores más estrechamente relacionados (es decir, la mayor similitud de secuencia) en el ratón (genes parálogos) y en el humano (genes ortólogos). Este procedimiento se puede realizar utilizando el algoritmo de búsqueda BLAST (disponible públicamente en el sitio web de NCBI), una herramienta de búsqueda de similitud de secuencia, donde cada secuencia de supuestos genes que se obtuvo previamente del análisis de transcriptoma inicial se usa como una secuencia de consulta. Los genes recientemente identificados a partir de este procedimiento de minería de datos también se consideran receptores potenciales de almizcle bajo el supuesto de que los genes parálogos y ortólogos tienen muchas probabilidades de poseer actividades similares. En una realización particular, la comparación por pares de homología de secuencia se lleva a cabo para identificar receptores estrechamente relacionados en ratones y humanos usando el siguiente esquema iterativo:

Secuencia de consulta de paso	Resultado BLASTN/BLASTP
1. Candidato 1 de ratón →	Parálogo 1 de ratón y ortólogo 1 de humano
2. Parálogo 1 de ratón →	Ortólogo 2 humano
3. Ortólogo 1 de humano →	Parálogo 2 de humano
4. Ortólogo 2 de humano →	Parálogo 3 de humano

Parálogo = homólogo en la misma especie Ortólogo = homólogo en otras especies

Los genes parálogos se alinean usando una herramienta de alineamiento múltiple para generar un árbol filogenético. Los datos funcionales *in vitro* se pueden interpretar a la luz de tal relación filogenética entre receptores estrechamente relacionados pero distintos. Este paso es esencial en la identificación de familias completas de genes OR que responden, en diversos grados, a los compuestos de prueba, por ejemplo, vulcanolide.

Este enfoque tiene varias ventajas importantes sobre los procedimientos de RT-PCR de una sola célula previamente establecidos. Primero, al agrupar múltiples neuronas que comparten propiedades de unión similares, un experimento único de secuenciación de ARNm (NGS) identifica prácticamente todos los receptores que se activan por los compuestos de almizcle diana. Por lo tanto, el rendimiento es más alto de lo que se logró anteriormente. En segundo lugar, debido a que se pueden agrupar varias células en una muestra, este enfoque permite la selección de genes mediante una comparación exhaustiva de muestras replicadas a través de experimentos. En tercer lugar, la NGS no requiere el uso de cebadores de PCR específicos para un OR. La NGS tampoco requiere el uso de cebadores degenerados específicos para OR, que son problemáticos y a menudo conducen a falsos positivos debido a la amplificación por PCR no lineal o no específica. En particular, dado que las secuencias de codificación OR se encuentran dentro de un solo exón, la contaminación de la muestra con ADN genómico puede conducir fácilmente a una amplificación específica de las secuencias del gen OR. Cuarto, el análisis de RT-PCR es difícil de realizar en muestras agrupadas debido a la tasa de falsos positivos inherente. Se han realizado experimentos de hibridación de ARNm de células individuales utilizando chips de micromatrices de ADN de alta densidad. Sin embargo, este enfoque generalmente es menos sensible que la NGS y se restringe aún más a los genes conocidos para los cuales se deben sintetizar las sondas de ADN correspondientes. Por lo tanto, el uso de NGS es significativamente ventajoso para identificar rápidamente OR y, en última instancia, da como resultado una selección más precisa de receptores candidatos en comparación con los enfoques estándares (por ejemplo, RT-PCR y micromatrices). Si bien se prefiere el enfoque NGS, se pueden usar otros enfoques como RT-PCR y enfoques de micromatrices.

En una realización adicional, para completar el procedimiento de desorfanización, los genes OR candidatos se expresan adicionalmente *in vitro* para confirmar la actividad contra los compuestos utilizados para aislar las neuronas sensoriales olfativas y otros compuestos de interés estructuralmente relacionados. Los receptores de ratón identificados a partir de neuronas olfativas aisladas que responden a ambos compuestos de almizcle se modifican en su N-terminal con secuencias cortas de polipéptidos (por ejemplo, secuencias Flag (SEQ ID NO: 6), Rho (SEQ ID

NO: 8; 20 primeros aminoácidos del receptor de rodopsina bovina), o Lucy (SEQ ID NO: 10), que se expresan de forma transitoria en células HEK 293T, y se estimulan por separado con compuestos de almizcle para confirmar su identidad como receptores de compuestos de almizcle de buena fe. La coexpresión de la subunidad G alfa humana  $G\alpha_{olf}$  en este ensayo que se basa en células, activa la vía de transducción de Gs que conduce a un aumento de AMPc interno al unirse al ligando apropiado. Alternativamente, la coexpresión de la subunidad G alfa humana  $G\alpha_{15}$  en el ensayo que se basa en células, activa la ruta de transducción de Gq que conduce a un aumento de  $Ca^{2+}$  interno al unirse al ligando apropiado. El procedimiento anterior y los resultados que se obtuvieron hasta ahora sirven para validar el procedimiento para la identificación rápida y confiable de los receptores de olores de mamíferos para los compuestos de almizcle.

## 10 Definiciones

Los siguientes términos tienen los significados atribuidos a éstos, a menos que se especifique lo contrario.

"OR" se refiere a uno o más miembros de una familia de receptores acoplados a proteínas G que se expresan en células olfativas. Las células receptoras olfativas también se pueden identificar en base a la morfología o mediante la expresión de proteínas que se expresan específicamente en células olfativas. Los miembros de la familia OR pueden tener la capacidad de actuar como receptores para la transducción olfativa.

Los ácidos nucleicos "OR" codifican una familia de GPCR con siete regiones transmembrana que tienen "actividad del receptor acoplado a proteínas G", por ejemplo, se pueden unir a proteínas G en respuesta a estímulos extracelulares y promover la producción de segundos mensajeros como IP3, AMPc, GMPc y  $Ca^{2+}$  a través de la estimulación de enzimas como la fosfolipasa C y la adenilato ciclasa.

La región del "dominio N terminal" comienza en el N-terminal y se extiende hasta una región cercana al comienzo de la primera región transmembrana. El "dominio transmembrana", que comprende las siete "regiones transmembrana", se refiere al dominio de polipéptidos OR que se encuentra dentro de la membrana plasmática, y también puede incluir los lazos citoplasmáticos (intracelulares) y extracelulares correspondientes. Las siete regiones transmembrana y los lazos extracelulares y citoplasmáticos se pueden identificar utilizando procedimientos estándares, como se describe en Kyte y Doolittle, J. Mol. Biol., 157: 105-32 (1982) o en Stryer. La estructura secundaria y terciaria general de los dominios transmembrana, en particular los siete dominios transmembrana de los receptores acoplados a proteínas G, como los receptores olfativos, son conocidos en la técnica. Por lo tanto, la secuencia de estructura primaria se puede diseñar o predecir en base a secuencias de dominio transmembrana conocidas, como se describe en detalle a continuación. Estos dominios transmembrana son útiles para ensayos de unión a ligando *in vitro*, tanto en fase soluble como sólida.

La expresión "efectos funcionales" en el contexto de ensayos para probar compuestos que modulan la transducción olfativa mediada por un miembro de la familia OR incluye la determinación de cualquier parámetro que esté indirectamente o directamente bajo la influencia del receptor, por ejemplo, efectos funcionales, físicos y químicos. Incluye la unión de ligandos, cambios en el flujo de iones, potencial de membrana, flujo de corriente, transcripción, unión de proteínas G, fosforilación o desfosforilación de GPCR, interacciones receptor-ligando de transducción de señales, concentraciones de segundo mensajero (por ejemplo, AMPc, GMPc IP3 o  $Ca^{2+}$ ) intracelular, *in vitro*, *in vivo*, y *ex vivo* y también incluye otros efectos fisiológicos tales como aumentos o disminuciones de la liberación de neurotransmisores u hormonas.

Por "determinar el efecto funcional" o "confirmar la actividad" en el contexto de los ensayos se entiende ensayos para un compuesto que aumenta o disminuye un parámetro que está indirectamente o directamente bajo la influencia de un miembro de la familia OR, por ejemplo, efectos funcionales, físicos y químicos. Dichos efectos funcionales se pueden medir por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, cambios en las características espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice de refracción), propiedades hidrodinámicas (por ejemplo, forma), cromatográficas o de solubilidad, fijación con parche, colorantes sensibles al voltaje, corrientes de células enteras, eflujo de radioisótopos, marcadores inducibles, expresión génica de OR de ovocitos; expresión de OR en células de cultivo de tejidos; activación transcripcional de genes OR; ensayos de unión a ligandos; voltaje, potencial de membrana y cambios de conductancia; ensayos de flujo de iones; cambios en los mensajeros secundarios intracelulares tales como AMPc, GMPc e inositol trifosfato (IP3); cambios en los niveles de calcio intracelular; liberación de neurotransmisores, y similares.

Los "inhibidores", "activadores", "contrarrestantes" y "moduladores" de genes o proteínas OR se usan indistintamente para referirse a moléculas inhibitoras, activadoras o moduladoras identificadas usando ensayos *in vivo*, *in vitro* e *in vivo* para la transducción olfativa, por ejemplo, ligandos, agonistas, antagonistas, potenciadores y sus homólogos y miméticos. Los inhibidores son compuestos que, por ejemplo, se unen, bloquean parcial o totalmente la estimulación, disminuyen, evitan, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan o regulan negativamente la transducción olfativa, por ejemplo, los antagonistas. Los activadores son compuestos que, por ejemplo, se unen a, estimulan, aumentan, abren activan, facilitan, mejoran la activación, sensibilizan o regulan positivamente la transducción olfativa, por ejemplo, agonistas. Los moduladores incluyen compuestos que, por ejemplo, alteran la interacción de un receptor con: proteínas extracelulares que se unen a activadores o inhibidores (por ejemplo, proteínas de unión al olor, eberina y otros miembros de la familia de vehículos hidrófobos); proteínas

G; quinasas (p. ej., homólogos de rodopsina quinasa y beta quinasas de receptores adrenérgicos que están involucradas en la desactivación y desensibilización de un receptor); y arrestinas, que también desactivan y desensibilizan los receptores. Los moduladores pueden incluir versiones genéticamente modificadas de miembros de la familia OR, por ejemplo, con actividad alterada, así como ligandos de origen natural o sintéticos, antagonistas, agonistas, moléculas químicas pequeñas y similares. Dichos ensayos para inhibidores y activadores incluyen, por ejemplo, expresar miembros de la familia OR en células o membranas celulares, aplicar supuestos compuestos moduladores, en presencia o ausencia de moléculas de aroma o sabor, por ejemplo, almizcles, y luego determinar los efectos funcionales sobre la transducción olfativa, como se describió arriba. Las muestras o ensayos que comprenden miembros de la familia OR que se tratan con un posible activador, inhibidor o modulador se comparan con muestras de control sin el inhibidor, activador o modulador para examinar el grado de modulación. A las muestras de control (no tratadas con moduladores) se les asigna un valor relativo de actividad OR del 100 %. La inhibición de un OR se logra cuando el valor de la actividad de OR en relación con el control es de aproximadamente 80 %, opcionalmente 50 % o 25-0 %. La activación de un OR se logra cuando el valor de la actividad de OR en relación con el control es 110 %, opcionalmente 150 %, opcionalmente 200-500 % o mayor que 1.000-3.000 %.

Los términos "purificado", "sustancialmente purificado" y "aislado", como se usan en la presente memoria, se refieren al estado de estar libre de otros compuestos diferentes con los que el compuesto de la invención se asocia normalmente en su estado natural, de modo que el sujeto "purificado", "sustancialmente purificado" y "aislado" comprende al menos 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 % o 20 %, y más preferentemente al menos 50 % o 75 % de la masa, en peso, de una muestra dada. En una realización preferida, estos términos se refieren al compuesto de la invención que comprende al menos el 95 % de la masa, en peso, de una muestra dada. Como se usa en la presente memoria, los términos "purificado", "sustancialmente purificado" y "aislado", cuando se refieren a un ácido nucleico o proteína, de ácidos nucleicos o proteínas, también se refieren a un estado de purificación o concentración diferente al que ocurre naturalmente en el cuerpo de los mamíferos, especialmente humano. Cualquier grado de purificación o concentración mayor que la que ocurre naturalmente en el cuerpo de los mamíferos, especialmente el humano, que incluye (1) la purificación de otras estructuras o compuestos asociados o (2) la asociación con estructuras o compuestos a los que normalmente no está asociada en el cuerpo de los mamíferos, especialmente humanos, están dentro del significado de "aislado". El ácido nucleico o proteína o clases de ácidos nucleicos o proteínas, que se describen en la presente memoria, se pueden aislar o asociar de otra manera con estructuras o compuestos a los que normalmente no están asociados en la naturaleza, de acuerdo con una variedad de procedimientos y procesos conocidos por los expertos en la técnica.

Como se usa en la presente memoria, el término "aislado", cuando se refiere a un ácido nucleico o polipéptido, se refiere a un estado de purificación o concentración diferente al que ocurre naturalmente en el cuerpo de los mamíferos, especialmente humanos. Cualquier grado de purificación o concentración mayor que el que ocurre naturalmente en el cuerpo, que incluye (1) la purificación de otras estructuras o compuestos asociados de origen natural, o (2) la asociación con estructuras o compuestos a los que normalmente no está asociado en el cuerpo está dentro del significado de "aislado" como se usa en la presente memoria. Los ácidos nucleicos o polipéptidos descritos en la presente memoria se pueden aislar o asociar de otro modo con estructuras o compuestos a los que normalmente no están asociados en la naturaleza, de acuerdo con una variedad de procedimientos y procesos conocidos por los expertos en la técnica.

Como se usa en la presente memoria, los términos "amplificar" y "amplificación" se refieren al uso de cualquier metodología de amplificación adecuada para generar o detectar un ácido nucleico que se expresa de manera natural o recombinante, como se describe en detalles a continuación. Por ejemplo, la invención proporciona procedimientos y reactivos (por ejemplo, pares de cebadores oligonucleotídicos degenerados específicos) para amplificar (por ejemplo, por reacción en cadena de la polimerasa, PCR) ácidos nucleicos expresados de manera natural (por ejemplo, ADN genómico o ARNm) o recombinantes (por ejemplo, ADNc) de la invención *in vivo* o *in vitro*.

El término "receptor 7-transmembrana" significa un polipéptido que pertenece a una superfamilia de proteínas transmembrana que tiene siete dominios que abarcan la membrana plasmática siete veces (por lo tanto, los siete dominios se denominan dominios "transmembrana" o "TM" TM I a TM VII). Las familias de receptores olfativos y de ciertos gustos pertenecen a esta superfamilia. Los polipéptidos del receptor 7-transmembrana tienen características y estructuras primarias, secundarias y terciarias similares, como se analiza con más detalle a continuación.

La expresión "ácido nucleico" o "secuencia de ácidos nucleicos" se refiere a un oligonucleótido de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos ya sea en forma monocatenaria o bicatenaria. El término abarca ácidos nucleicos, es decir, oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales. El término abarca, además, estructuras similares a ácidos nucleicos con cadenas principales sintéticas. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácidos nucleicos particular implícitamente abarca las variantes de estos modificadas de forma muy conservadora (por ejemplo, las sustituciones de codones degenerados) y las secuencias complementarias, así como la secuencia que se indica explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr mediante la generación de, por ejemplo, secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados se sustituye con residuos con base mezclada y/o desoxiinosina.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en el que uno o más

- residuos de aminoácido es un mimético químico artificial de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como de polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. El término "heterólogo" cuando se usa con referencia a las porciones de un ácido nucleico indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la naturaleza en igual relación entre sí. Por ejemplo, el ácido nucleico típicamente se produce por vía recombinante, con dos o más secuencias a partir de genes no relacionados dispuestos para preparar un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor a partir de una fuente y una región de codificación a partir de otra fuente. Del mismo modo, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la naturaleza en igual relación entre sí (por ejemplo, una proteína de fusión).
- Un "promotor" se define como un arreglo de secuencias de ácidos nucleicos que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Como se usa en la presente memoria, un promotor incluye las secuencias de ácidos nucleicos necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tal como, en el caso de un promotor de polimerasa tipo II, un elemento TATA. Un promotor además incluye opcionalmente los elementos potenciadores o represores distales, que se pueden localizar hasta diversos miles de pares de bases a partir del sitio de inicio de la transcripción. Un promotor "constitutivo" es un promotor que se activa bajo la mayoría de las condiciones ambientales y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que se activa bajo la regulación ambiental o de desarrollo. El término "enlazado operativamente" se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de ácidos nucleicos control para la expresión (tales como, un promotor, o un arreglo de sitios de unión del factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácidos nucleicos, en el que la secuencia control para la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente con la segunda secuencia.
- Como se usa en la presente memoria "recombinante" se refiere a un polinucleótido que se sintetiza o manipula de cualquier otra manera *in vitro* (por ejemplo, "polinucleótido recombinante"), para procedimientos que usan polinucleótidos recombinantes para producir productos génicos en células u otros sistemas biológicos, o para un polipéptido ("proteína recombinante") que codifica para un polinucleótido recombinante. "Recombinante" significa también la unión de ácidos nucleicos que tienen diversas regiones o dominios o secuencias promotoras codificadoras de diferentes fuentes en un casete o vector de expresión para la expresión de, por ejemplo, expresión inducible o constitutiva de una proteína de fusión que comprende un dominio de translocación de la invención y una secuencia de ácidos nucleicos que se amplifica usando un cebador de la invención. "Recombinante" significa también modificaciones que se obtienen por técnicas de edición del genoma, como CRISPR/Cas9, de una célula que conduce a la expresión estable o transitoria de genes endógenos como el gen receptor al que se hace referencia en la presente memoria.
- El término "vector de expresión" se refiere a cualquier sistema de expresión recombinante con el propósito de expresar una secuencia de ácidos nucleicos de la invención *in vitro* o *in vivo*, de manera constitutiva o inducible, en cualquier célula, que incluye células procariotas, de levaduras, fúngicas, vegetales, de insectos o de mamíferos. El término incluye sistemas de expresión lineales o circulares. El término incluye sistemas de expresión que permanecen episomales o se integran en el genoma de la célula huésped. Los sistemas de expresión pueden tener la capacidad de autorreplicarse o no, es decir, conducir solo la expresión transitoria en una célula. El término incluye casetes de expresión recombinante que contienen solo los elementos mínimos necesarios para la transcripción del ácido nucleico recombinante.
- Por "célula huésped" se entiende una célula que contiene un vector de expresión y soporta la replicación o expresión del vector de expresión. Las células huésped pueden ser células procariotas como *E. coli*, o células eucariotas como levaduras, insectos, anfibios o células de mamíferos como CHO, HeLa, HEK-293 y similares, por ejemplo, cultivos celulares, explantes y células *in vivo*.
- Los ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos que se identifican y/o utilizan en la presente memoria se enumeran a continuación:

**Olf96 de ratón (SEQ ID NO: ADN 1; SEQ ID NO: Proteína 2)**

**SEQ ID NO: 1**

atgggaatcctttccacaggaaatcaaactgtcactgagtttgtacttcttggtttccatgaagtcctgggctg  
cacctcctgttttttctgtgttcaccatcctctatgcctccatcatcacaggaacatgctcattgcagtggtg  
gtggtagctcccagaggcttcacacacccatgtatcttcttctggatctgtccttcatagagattgtctat  
acctccacagtggtgcccataatgctggaaggcttcttacaggaggccaccatatctgtggctggctgcttgc  
cagttcttggttttggctctctggccacagatgagtggttctgctggctgtgatggcatatgatcgatatctc  
gcaatttgtcaccctctacgataccacacctcatggggcctcaatggtgctggggttggctcacagctgg  
ctgtctggcttcatggtagatggactagttgttctgctgatggccagttgagattctgtggcccaacttagtt  
gatcacttttactgtgattttcacctttagtggtcctggcttgcagatacccaagtggcccaggtgactaca  
tttgttctctctgtggcttctcctgactgtccccttgggctggttctgatctcctatgctcagattgtagtgact  
gtgctgagagttccttctgggaccagaagaaccaaggccttctccacatgctcctctcacctggctgtgggtcc  
acgttctatggaacactcatgggtattgtacattgtgccctctgctgttcattctcagctcctctccaaggtcatt  
gccctgctctacacagtggtcactcccactctcaaccctgtcatctacaccttgaggaaccaggaggtgcagcag  
gcactaagaaggcttctctactgcaaaccaactgaaatgtga

**SEQ ID NO: 2**

mgilstgnqvtvtefvllgfhevpglhllffsvftilyasiitgnmliavvvvssqrlhtpmyfflnlsfieivy  
tstvvpkmllegflqeatisvagcllqffvfgslatdecfllavmaydrylaichplryphlmgpqwclglvltvw  
lsgfmvdglvvalmaqlrfcgpnlvdhfycdfsplmvlacsdtqvaqvttfvlsvvfltpfglvlisyaqivvt  
vlrvpsgtrrtkafstcshlavvstfygtlmvlyivpsavhsqllskviallytvvtpi fnpviytlrnqevqq  
alrrllyckptem

**5 OR11A1 humano (SEQ ID NO: ADN 3; SEQ ID NO: Proteína 4)**

**SEQ ID NO: 3**

atggaaattgtctccacaggaaacgaaactattactgaatttgcctccttggcttctatgacatccctgaactg  
catttcttgttttttattgtattcactgctgtctatgtcttcatcatcataggaatatgctgattattgtagca  
gtggttagctcccagaggctccacaaacccatgtatatttcttggcgaatctgtccttctggatattctctac  
acctccgagtgatgccaaaaatgctggagggttctctgcaagaagcaactatctctgtggctgggtgcttgc  
cagttctttatcttggctctctagccacagctgaatgcttactgctggctgtcatggcatatgaccgctacctg  
gcaatttgcaccactccactaccactcctgatggggcccagacggtacatggggctgggtggtcacaacctgg  
ctctctggatttgtggtagatggactgggttggccctgggtggcccagctgaggttctgtggcccaaccacatt  
gaccagtttactgtgactttatgcttttctggtggcctggcttgcctggatcccagagtggtcaggtgacaact  
ctcattctgtctgtgttctgcctcactattccttttggactgattctgacatcttatgccagaattgtgggtggca  
gtgctgagagttcctgctggggcaagcaggagaagggtttctccacatgctcctccacctagctgtagtgacc  
acattctatggaacgctcatgatctttttagttgcaccctctgctgtccattccagctcctctccaaggtcttc  
tccctgctctacactgtggtcaccctctcttcaatcctgtgatctataccatgaggaacaaggaggtgcatcag  
gcacttcggaagattctctgtatcaaacaaactgaaacacttgattga

**SEQ ID NO: 4**

meivstgnetitefvllgfydipelhflffivftavyvfiignmliivavvssqrlhkpmyiflanlsfldily  
 tsavmpkmllegflqeatisvagcllqffifgslataecllllavmaydrylaicyplhypllmgprrymglvvttw  
 lsgfvvdglvvalvaqlrfcgpnhidqfycdfmlfvglacsdrvaqvttlilsvfcltipfgliltstrarivva  
 vlrvpagasrrrafstcsshlavvttfygtlmi fyvapsavhsqllskvfllytvvtplfnpviytmrnkevqh  
 alrkilcikqtetld

**Secuencia Flag (SEQ ID NO: ADN 5; SEQ ID NO: Proteína 6)****SEQ ID NO: 5**

gattacaaggacgacgacgataag

**SEQ ID NO: 6** dykdddk**Secuencia Rho (SEQ ID NO: ADN 7; SEQ ID NO: Proteína 8)****SEQ ID NO: 7**

atgaacgggaccgagggcccaacttctacgtgccttctccaacaagacgggctggtg

**SEQ ID NO: 8**

mngtegnfyvpsnktgvv

**Secuencia Lucy (SEQ ID NO: ADN 9; SEQ ID NO: Proteína 10)****SEQ ID NO: 9**

atgagacccagatcctgctgctcctggccctgctgaccctaggcctggct

**SEQ ID NO: 10**

mrpqillllalltlla

Los siguientes ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden limitar el ámbito de la invención como se establece en el Sumario, Descripción o en las Reivindicaciones.

**Ejemplos****Ejemplo 1****20 Identificación de receptores de almizcle policíclicos de ratón Olfr96 y OR11A1 humano**

Las células sensibles al almizcle se aislaron y se procesaron adicionalmente para el análisis del transcriptoma en base a secuenciación de próxima generación (NGS). Se preparó una mezcla de cashmeran, tonalide y galaxolide (mezcla A). También se preparó una mezcla de muscona, muscenona y habanolide (mezcla B). Cada almizcle individual se mezcló a una concentración final de 50  $\mu$ M. Se registraron trazas de imágenes de  $Ca^{2+}$  para distintas neuronas sensoriales olfativas (OSN) que se activaron mediante la mezcla A y/o la mezcla B. El eje Y de la Figura 1A muestra la intensidad promedio de la unidad fluorescente relativa como resultado de una grabación de imágenes de radiometría a 340/380 nm de  $Ca^{2+}$ . El eje X de la Figura 1A muestra los marcos de tiempo (8s/marco). Las células que respondieron se agruparon para la extracción de ARN y posterior experimento de secuenciación de próxima generación (es decir, ARNseq). Todos los niveles de expresión se normalizaron además para la proteína marcadora olfativa (OMP). El análisis del transcriptoma resultante reveló los receptores de olor más altamente expresados (es decir, los recuentos de lectura más abundantes, normalizados por FPKM): Olfr235 y Olfr96 (Figura 1B). Corresponden a los siguientes genes ortólogos humanos: OR5AN1 y OR11A1, respectivamente.

**Ejemplo 2****Caracterización funcional de receptores de almizcle de ratón Olfr96 y humanos OR11A1**

Se realizaron experimentos de dosis-respuesta funcional para evaluar el nivel de actividad funcional de la línea celular modificada. Utilizando un ensayo en base a células, el Olfr96 de ratón se probó en una línea celular HEK293T en la que el gen endógeno RTP1 se activó y se expresó la chaperona del receptor de olor. Los genes del receptor marcado con la secuencia Rho se cotransfectaron con la proteína G canónica olfativa, gen  $G_{olf}$  y se expusieron a concentraciones crecientes de los olores de almizcle Tonalide, Vulcanolide y Muscona. La actividad inducida por el olor se detectó midiendo el aumento de AMPc en el citosol usando un kit basado en HTRF (CisBio, kit cAMP dynamic 2, 62AM4PEJ). Se observa un aumento dependiente de la dosis de la actividad del receptor Olfr96 para los 2 almizcles policíclicos (Tonalide y Vulcanolide), pero no para el almizcle macrocíclico, Muscona (Figura 2). En un experimento de repetición adicional que usa las mismas condiciones, Olfr96 de ratón y el correspondiente

ortólogo humano OR11A1 se probaron uno al lado del otro por duplicado con un conjunto de diversidad de almizcle para la evaluación de la especificidad. Los genes receptores marcados como Lucy-Flag-Rho se cotransfectaron con la proteína G canónica olfativa, gen  $G_{olf}$  y se expusieron a concentraciones crecientes de los olores de almizcle macrocíclicos Muscenona, Muscona, Habanolide y Exaltolide; los olores de almizcle policíclicos Tonalide, Vulcanolide, Cashmeran, Galaxolide; los olores de almizcle alicíclico Helvetolide, Ambretolide y Romandolide; y los olores de almizcle nitro Almizcle C y Almizcle X. Se observa un aumento dependiente de la dosis de la actividad del receptor Olfr96 para 3 almizcles policíclicos (tonalide, cashmeran y vulcanolide) y un almizcle nitro (Almizcle X), pero no almizcle C, Galaxolide, los almizcles macrocíclicos o almizcles alicíclicos (Figura 3); y se observa un aumento dependiente de la dosis de la actividad del receptor OR11A1 para 1 almizcle policíclico (Vulcanolide), pero no para los almizcles macrocíclicos, los almizcles alicíclicos o el almizcle nitro u otros almizcles policíclicos (Figura 3).

### Ejemplo 3

#### Identificación de compuestos que mejoran la activación de los receptores de almizcle.

Un receptor de almizcle se expone a una mezcla binaria de un compuesto de almizcle que se conoce y un compuesto a evaluar. Se mide cualquier mejora de la actividad del receptor "Almizcle" que se proporciona por el compuesto. Esto se realiza mediante la medición de la respuesta a la dosis del almizcle en presencia y en ausencia de compuestos específicos que mejoran la actividad del receptor. Se usa el mismo ensayo que se basa en células que en el ejemplo 2. Si el compuesto mejora la actividad del receptor, entonces se reduce la concentración del compuesto de almizcle necesaria para alcanzar el nivel equivalente de activación del receptor en ausencia del compuesto. Por lo general, esto se realiza con un experimento de respuesta a la dosis y se ilustra con una curva de respuesta a la dosis que, por ejemplo, se muestra o indica mediante un desplazamiento hacia la izquierda en la curva y una reducción en el valor calculado de EC50.

#### Listado de secuencias

<110> Firmenich SA  
 <120> Procedimiento de identificación de compuestos de almizcle  
 <130> 81455-94501  
 <150> 62/173,762  
 <151> 2015-06-10  
 <160> 10  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 942  
 <212> ADN  
 <213> ratón  
 <400> 1

ES 2 807 440 T3

atgggaatcc tttccacagg aatcaaact gtcactgagt ttgtacttct tggtttccat 60  
 gaagtcacct ggctgcacct cctgtttttt tctgtgttca ccatacctcta tgcctccatc 120  
 atcacagga acatgctcat tgcagtgggt gtgggtgagct cccagaggct tcacacaccc 180  
 atgtatttct ttctgggtgaa tctgtccttc atagagattg tctatacctc cacagtgggt 240  
 cccaaaatgc tgggaaggctt cttacaggag gccaccatat ctgtggctgg ctgcttgctc 300  
 cagttctttg tttttggctc tctggccaca gatgagtgtt ttctgctggc tgtgatggca 360  
 tatgatcgat atctcgcaat ttgtcaccct ctacgatacc cacacctcat ggggcctcaa 420  
 tgggtgcctgg ggttgggtgct cacagtctgg ctgtctggct tcatggtaga tggactagtt 480  
 gttgctctga tggcccagtt gagattctgt ggccccaaact tagttgatca cttttactgt 540  
 gatttttcac ctttgatggt cctggcttgc tcagataccc aagtggcca ggtgactaca 600  
 tttgttctct ctgtggtctt cctgactgtc ccctttgggc tggttctgat ctctatgct 660  
 cagattgtag tgactgtgct gagagttcct tctgggacca gaagaaccaa ggccttctcc 720  
 acatgctcct ctcacctggc tgtgggtgtcc acgttctatg gaacactcat ggtattgtac 780  
 attgtgccct ctgctgttca ttctcagctc ctctccaagg tcattgccct gctctacaca 840  
 gtggtcactc ccatcttcaa ccctgtcatc tacaccttga ggaaccagga ggtgcagcag 900  
 gcactaagaa ggcttctcta ctgcaaacca actgaaatgt ga 942

<210> 2  
 <211> 313  
 <212> PRT  
 <213> ratón

5

<400> 2

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

ES 2 807 440 T3

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

ES 2 807 440 T3

260

265

270

Lys Val Ile Ala Leu Leu Tyr Thr Val Val Thr Pro Ile Phe Asn Pro  
275 280 285

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

Leu Leu Tyr Cys Lys Pro Thr Glu Met  
305 310

<210> 3  
<211> 948  
<212> ADN  
<213> humano

5

<400> 3

atggaaattg tctccacagg aaacgaaact attactgaat ttgtcctcct tggcttctat 60  
gacatccctg aactgcattt cttgtttttt attgtattca ctgctgtcta tgtcttcac 120  
atcatagga atatgctgat tattgtagca gtggtagct cccagaggct ccacaaacc 180  
atgtatattt tcttggcgaa tctgtccttc ctggatattc tctacacctc cgcagtgatg 240  
ccaaaaatgc tggagggctt cctgcaagaa gcaactatct ctgtggctgg ttgcttgctc 300  
cagttcttta tcttcggctc tctagccaca gctgaatgct tactgctggc tgtcatggca 360  
tatgaccgct acctggcaat ttgctaccca ctccactacc cactcctgat ggggccaga 420  
cggtacatgg ggctggtggt cacaacctgg ctctctggat ttgtggtaga tggactggtt 480  
gtggccctgg tggcccagct gaggttctgt ggcccacc acattgacca gttttactgt 540  
gactttatgc ttttcgtggg cctggcttgc tggatccca gagtggctca ggtgacaact 600  
ctcattctgt ctgtgttctg cctcactatt ccttttggac tgattctgac atcttatgcc 660  
agaattgtgg tggcagtgct gagagttcct gctggggcaa gcaggagaag ggctttctcc 720  
acatgctcct cccacctagc tgtagtgacc acattctatg gaacgctcat gatcttttat 780  
gttgaccct ctgctgtcca ttcccagctc ctctccaagg tcttctcct gctctacact 840  
gtggtcacc ctctcttcaa tctgtgatc tataccatga ggaacaagga ggtgcatcag 900  
gcacttcgga agattctctg tatcaaaaa actgaaacac ttgattga 948

<210> 4  
<211> 315  
<212> PRT  
<213> humana

10

<400> 4

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

ES 2 807 440 T3

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



ES 2 807 440 T3

<220>

<223> Secuencia Lucy

<400> 9

atgagacccc agatcctgct gtcctggcc ctgctgaccc taggcctggc t 51

5

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> Secuencia Lucy

<400> 10

Met Arg Pro Gln Ile Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Thr Leu Gly Leu  
1 5 10 15

Ala

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de identificación de un compuesto que activa, imita, bloquea, inhibe, modula y/o mejora la actividad de un receptor olfativo que es activado por uno o más compuestos de almizcle seleccionados de un compuesto de almizcle policíclico y nitro almizcle, en el que el receptor es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4, en el que el procedimiento comprende:
- 5 a) poner en contacto el receptor, o una quimera o fragmento del mismo, reteniendo la capacidad de dicho polipéptido para ser activado por uno o más compuestos de almizcle seleccionados de un compuesto de almizcle policíclico y nitro almizcle, o una célula que se modifica mediante recombinación para expresar dicho polipéptido, en el que la célula comprende
- 10 1) un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido; o
- 2) un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido y comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 75 % idéntica a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3
- 15 con un compuesto en presencia de dicho uno o más compuestos de almizcle seleccionados de un compuesto de almizcle policíclico y nitro almizcle; y
- b) detectar si el compuesto tiene un efecto sobre la actividad del receptor.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto policíclico se selecciona del grupo que consiste en un tonalide, vulcanolide y cashmeran.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2 en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o a la SEQ ID NO: 4.
- 20 4. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, en el que la célula es una célula eucariota.
5. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, en el que la célula es una célula procariota.
6. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que la célula se selecciona del grupo que consiste en HEK293, CHO, ovocitos de Xenopus, COS, levadura y células derivadas de la placoda olfatoria.
- 25 7. Uso de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4 para identificar un compuesto de almizcle, en el que el polipéptido tiene la capacidad de ser activado por uno o más compuestos de almizcle.
8. Un procedimiento de identificación de un compuesto de almizcle, que comprende utilizar un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4 y que tiene la capacidad de ser activado por uno o más compuestos de almizcle en un ensayo basado en receptor para identificar un compuesto de almizcle.
- 30 9. Uso de un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3 para identificar un compuesto de almizcle.
10. Uso de una célula que se modifica mediante recombinación para que exprese un polipéptido, en el que la célula comprende el vector de expresión de la reivindicación 9 para la identificación de un compuesto de almizcle.
- 35 11. El uso según la reivindicación 10 en el que la célula es una célula eucariota.
12. El uso según la reivindicación 10 en el que la célula es una célula procariota.
13. El uso según la reivindicación 11, en el que la célula se selecciona del grupo que consiste en HEK293, CHO, ovocitos de Xenopus, COS, levadura y células derivadas de la placoda olfatoria.
- 40

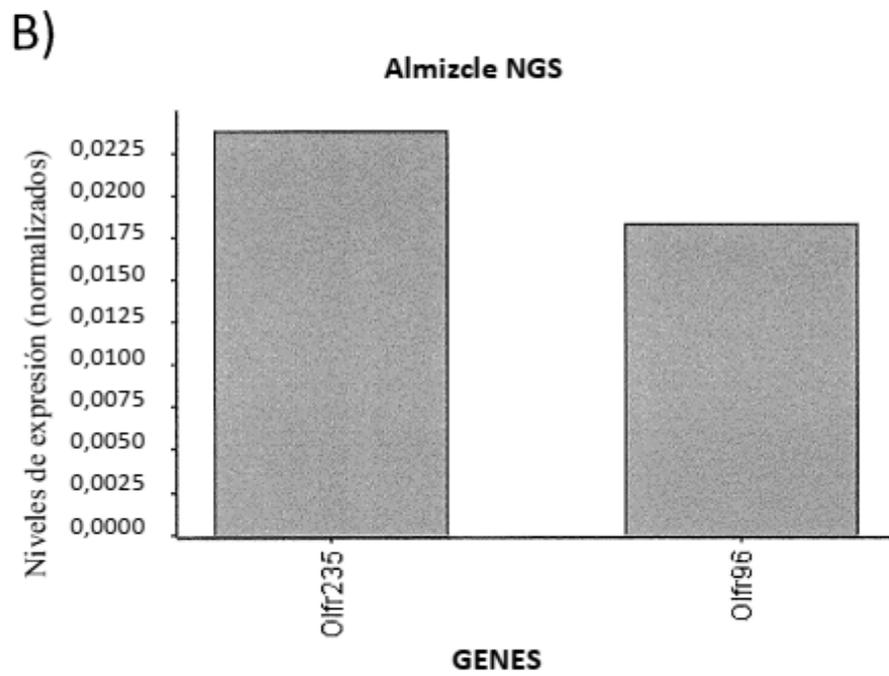
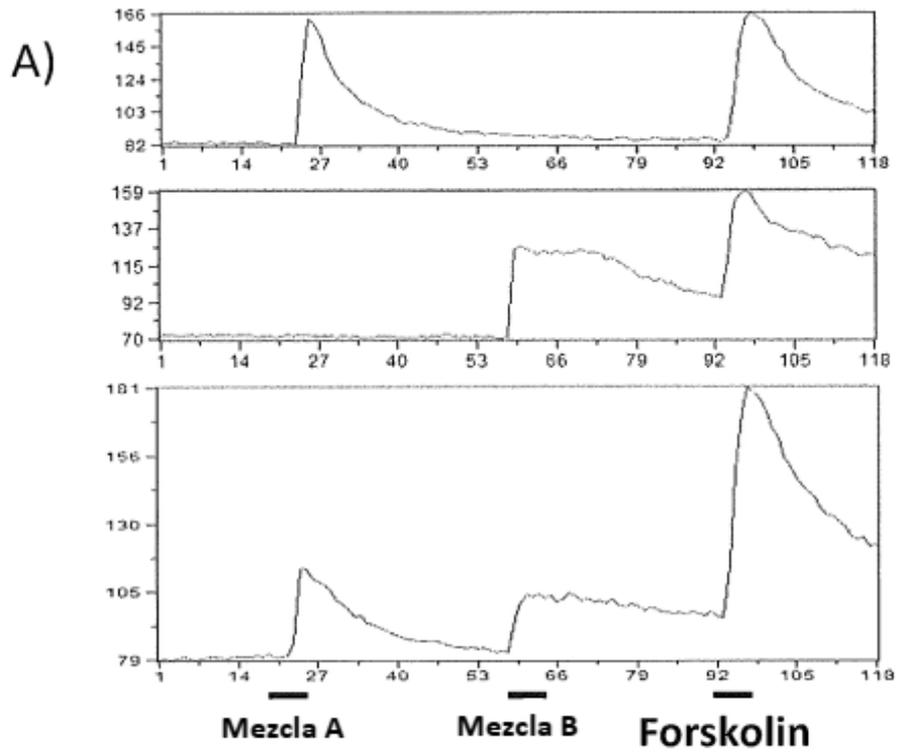


Figura 1

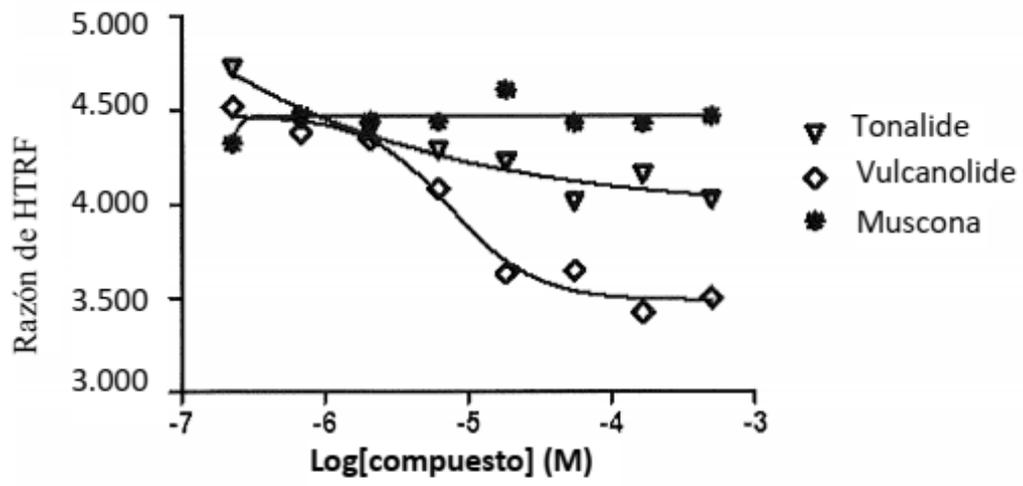


Figura 2

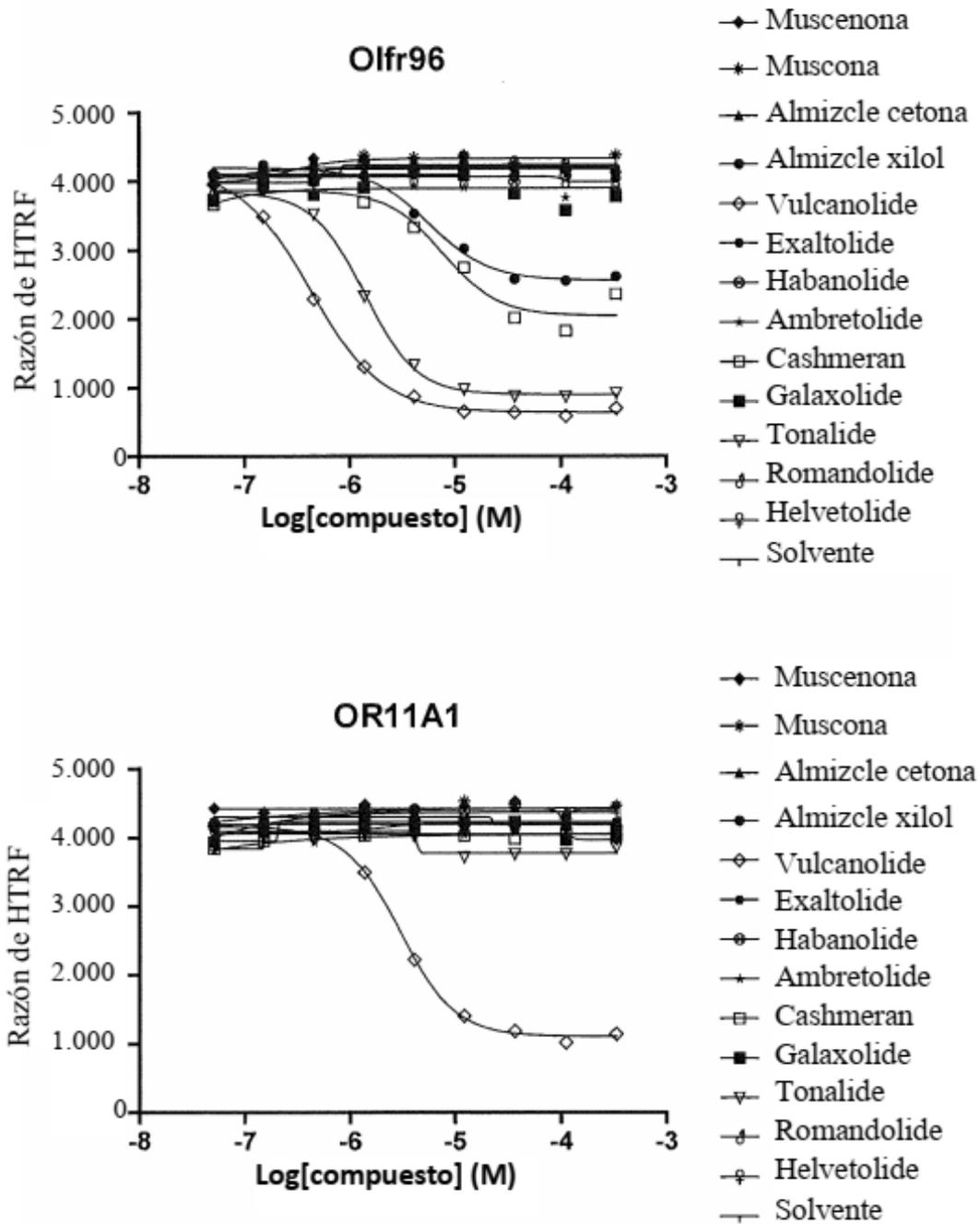


Figura 3