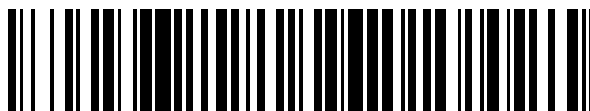


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 449**

51 Int. Cl.:

C12P 5/00 (2006.01)

A01K 27/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2015** **PCT/GB2015/054139**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2016** **WO16110671**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2015** **E 15817521 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019** **EP 3247799**

54 Título: **Ligandos olfativos**

30 Prioridad:

09.01.2015 GB 201500348

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

22.11.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITY COLLEGE CARDIFF CONSULTANTS
LIMITED (50.0%)**

**30-36 Newport Road, Cardiff
South Glamorgan CF24 0DE, GB y
ROTHAMSTED RESEARCH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PICKETT, JOHN ANTHONY;
BIRKETT, MICHAEL ALEXANDER;
MILLER, DAVID JAMES y
ALLEMANN, RUDOLF KONRAD**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 732 449 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

Ligandos olfativos

- 5 La presente descripción se refiere a un ligando olfativo, una composición que comprende dicho ligando olfatorio y un procedimiento para la fabricación de dicho ligando. Además, también se describen las enzimas modificadas que convierten un sustrato en dicho ligando olfatorio.

Antecedentes de la invención

- 10 La creciente población mundial y el consecuente aumento en la demanda de productos agrícolas requieren procedimientos de fitomejoramiento y protección de cultivos cada vez más eficientes y mejorados. Las plagas de los cultivos, tales como los insectos, dan como resultado una reducción significativa del rendimiento, y el control de plagas actual depende de la aplicación de insecticidas; sin embargo, el desarrollo de resistencia a los insecticidas y
15 su impacto a menudo negativo en la salud humana y el medio ambiente exige el desarrollo de compuestos apropiados y alternativos a los que se utilizan en la actualidad.

- Los semioquímicos son una clase de sustancias que median la comunicación intra e interespecífica entre las mismas especies o especies diferentes. El procedimiento mediante el cual se reconocen estas señales se denomina olfato y
20 es el procedimiento por el cual las proteínas de reconocimiento olfativo reconocen la señal olfativa o el ligando, lo que resulta en una respuesta particular. Estas proteínas de reconocimiento olfativo son altamente específicas y capaces de distinguir incluso compuestos relacionados a nivel estructural. Los semioquímicos son claves de reconocimiento clave en perfumes y cosméticos o en alimentos y bebidas, y desempeñan un papel muy importante en el control de plagas, particularmente de insectos y, por lo tanto son compuestos muy buscados. Sin embargo, los
25 semioquímicos suelen ser compuestos extremadamente volátiles e inestables, y su síntesis química es enormemente costosa.

- Los terpenos y los terpenoides son un grupo grande y diverso de compuestos orgánicos que se encuentran comúnmente en plantas, que van desde moléculas primarias esenciales hasta metabolitos secundarios más
30 complejos, y son conocidos por sus propiedades semioquímicas. En el documento WO2013/191758 se describen compuestos y formulaciones de pesticidas que incluyen terpenoides. Los terpenos y los terpenoides son hidrocarburos ensamblados de subunidades de isopreno que proporcionan el esqueleto de carbono que, a continuación, sufre modificaciones adicionales. Los primeros pasos básicos en la biosíntesis de los terpenoides se caracterizan por la utilización de los bloques de construcción primarios isopentenil difosfato (IDP) y dimetilalilfosfato
35 de dimetilal (DMADP), y conducen a la síntesis de los precursores terpenoides del geranilfosillancillancelenajilgrancellancillanca (GGDP). Los terpenos se clasifican secuencialmente en función de su número de subunidades de isopreno como hemiterpenos (una subunidad de isopreno), monoterpenos (dos subunidades de isopreno), sesquiterpenos (tres subunidades de isopreno), etc. Si bien los terpenos y los terpenoides son un objetivo atractivo para la modificación sintética y la modulación de sus propiedades naturales
40 puede conducir a nuevos compuestos medicinales y agroquímicos con funciones mejoradas y alteradas, la complejidad de los esqueletos de hidrocarburos y la inestabilidad química de muchos terpenoides, en particular aquellos con propiedades semioquímicas, pueden presentar un desafío difícil para el químico sintético. Los enfoques de biología sintética se han centrado en la preparación de terpenoides naturales utilizando vías bioquímicas completas en organismos vivos, o en el aumento de la producción de terpenoides endógenos en plantas para
45 repeler o atraer insectos u otros organismos como los descritos en el documento in US2014/0173771 ; sin embargo, los posibles sustratos para las enzimas involucradas en la síntesis de terpenoides son limitados en las células y no resultan en la generación de terpenoides modificados con propiedades alteradas.

- Se sabe que el germacreno D repele insectos, particularmente pulgones como el pulgón de grano (*Sitobion avenae*)
50 y, por lo tanto, hay interés en producir análogos de germacreno D que puedan tener propiedades modificadas.

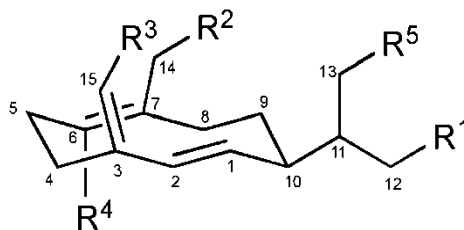
- Cascón y col., en Chem. Commun., 48, 9702-9704 (2012), han descrito la síntesis de varios análogos de germacreno D utilizando fIDP y FDP modificados con metilo como sustrato para la (S) -germacreno D sintasa (GDS). En particular, sintetizaron los análogos 6-F, 14-F, 15-F y 14-metilo.

- 55 Sin embargo, estos análogos de germacreno D demostraron tener una actividad reducida en comparación con el germacreno D.

Estado de la invención

60

Según un aspecto de la invención, se proporciona un análogo (S)-germacreno D de fórmula general (I):



(I)

5 donde

R¹ es H, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo o ciclopropilo;

R² es H, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo o ciclopropilo;

R³ es metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo o ciclopropilo;

10 R⁴ es H, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo o ciclopropilo;

R⁵ es H, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo o ciclopropilo.

Cascón y col., (Chem. Commun., 48, 9702-9704 (2012)) indican que no es posible sintetizar compuestos con un grupo metilo en la posición 15 (es decir, la posición R³ en la fórmula general (I) anterior). Sin embargo, los presentes
15 inventores han obtenido ahora con éxito compuestos con un sustituyente 15 utilizando una modificación del procedimiento descrito por Cascón y col. y han descubierto que tienen propiedades particularmente sorprendentes.

Adecuadamente en los compuestos de fórmula general (I), R¹ es H, metilo o etilo, más adecuadamente H o metilo. Todavía más adecuadamente, R¹ es H.

20

En los compuestos de fórmula general (I), R² es adecuadamente H, metilo o etilo, más adecuadamente H o metilo.

En los compuestos de fórmula general (I), R³ es metilo o etilo y, más adecuadamente, metilo.

25

Adecuadamente en los compuestos de fórmula general (I), R⁴ es H, metilo o etilo, más adecuadamente H o metilo. Todavía más adecuadamente, R⁴ es H. Adecuadamente en los compuestos de fórmula general (I), R⁵ es H, metilo o etilo, más adecuadamente H o metilo. Todavía más adecuadamente, R⁵ es H.

30

Los compuestos de fórmula (I) donde R³ es metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo o ciclopropilo y R¹, R² y R⁴ son hidrógeno tienen propiedades repelentes de insectos.

Por lo tanto, en algunos compuestos adecuados de fórmula general (I):

cada R¹, R² y R⁴ es H;

35

R³ es metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo o ciclopropilo; y

R⁵ es H, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo o ciclopropilo.

Más adecuadamente, en dichos compuestos, R⁵ es H, metilo o etilo, especialmente H o metilo y particularmente H.

Compuestos todavía más adecuados de la fórmula general (I) son aquellos en los cuales:

40

cada R¹, R², R⁴ y R⁵ es H;

R³ es metilo o etilo.

45

El compuesto de la fórmula (I) donde R³ es metilo y R¹, R², R⁴ y R⁵ son hidrógeno, que ha demostrado tener una actividad repelente de insectos mucho mayor que los compuestos sintetizados por Cascón y col. y, por lo tanto, este compuesto es particularmente adecuado.

Otros compuestos adecuados de fórmula (I) son aquellos en los cuales cada R², R³ y R⁵ son, independientemente, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo o ciclopropilo y R¹ y R⁴ son H.

50

Más adecuadamente, en dichos compuestos, R⁵ es H, metilo o etilo, especialmente H o metilo y particularmente H.

Compuestos todavía más adecuados de la fórmula general (I) son aquellos en los cuales:

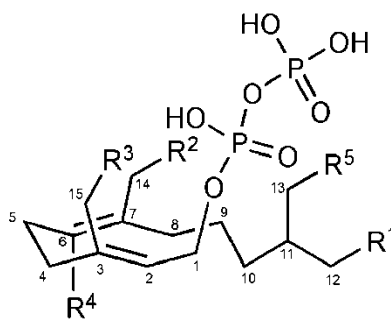
cada R^1 , R^4 y R^5 es H;

5 cada R^2 y R^3 es, independientemente, metilo o etilo.

Sorprendentemente, el compuesto de la fórmula general (I) en el cual R^2 y R^3 son ambos metilo y R^1 , R^4 y R^5 son hidrógeno mostró una inversión de actividad, con fuertes propiedades atrayentes de insectos.

10 Como se discutió anteriormente, los compuestos particularmente adecuados de la fórmula general (I) son aquellos en los cuales R^3 es metilo y R^1 , R^2 , R^4 y R^5 son hidrógeno ((S)-15-metilgermacreno D) o en los cuales R^2 y R^3 son ambos metilo y R^1 , R^4 y R^5 son hidrógeno ((S)-14,15-dimetilgermacreno D).

Los compuestos de la fórmula general (I) se pueden sintetizar a partir de un análogo de farnesil difosfato de fórmula
15 general (II):



(II)

donde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y R^5 son como se define en la fórmula general (I);

20 o una sal de estos;

mediante incubación con germacreno D sintasa (GDS).

Adecuadamente, la germacreno D sintasa es un polipéptido de (S)-germacreno D sintasa que puede ser un polipéptido recombinante producido en cualquier organismo adecuado, por ejemplo, *E. coli*.

25

La GDS recombinante puede comprender una secuencia de etiqueta en el extremo N o C, en particular, una etiqueta de polihistidina. Adecuadamente, la GDS puede comprender una etiqueta de polihistidina C-terminal, por ejemplo, una etiqueta de hexahistidina.

30 Contrariamente a la enseñanza de Cascón y col., los presentes inventores han descubierto que es posible obtener pequeñas cantidades de los compuestos de fórmula general (I) usando germacreno D sintasa nativa de *Solidago canadensis* ID. SEC. NÚM.:1; (I. Prosser y col., *Phytochemistry*, 2002, 60, 691-702; C. O. Schmidt y col., *Chirality*, 1999, 11, 353-362; N. Bulow y W.A. Koning, *Phytochemistry*, 2000, 55, 141-168).

35 No obstante, al utilizar un enfoque racional para explotar la biología química de la (S)-germacreno D sintasa (GDS), se puede lograr un mejor acoplamiento de los sustratos mediante la reducción de aspectos específicos del impedimento estérico relacionado con los nuevos sustratos. De este modo, la alineación de secuencias de GDS con 5-*epi*-aristolocheno sintasa y la comparación de residuos aromáticos en o cerca del sitio activo permitieron a los inventores identificar los residuos que probablemente estén cerca del sustrato durante el ciclo catalítico. En
40 particular, Y406 de GDS es un residuo conservado correspondiente a Y404 en 5-*epi*-aristolochene sintasa y está potencialmente involucrado en asegurar que se produzca el cierre correcto del anillo y así sea proximal a ambos extremos de la cadena de farnesilo plegada dentro del sitio activo. Así, debido a que los átomos de hidrógeno en las posiciones 14 y 15 de (S)-germacreno D están cerca del Y406 de GDS y sus orbitales electrónicos disociados, esta
45 tirosina podría reemplazarse por fenilalanina, estéricamente más pequeña pero similar en términos de densidad electrónica. De hecho, esta enzima mutante dirigida al sitio, (S)-germacreno D sintasa, Y406F, fue considerablemente más efectiva como una sintasa en particular para la producción de los compuestos de la fórmula general (I) y los compuestos donde R^2 es H y R^2 es metilo se produjeron utilizando esta enzima modificada en rendimientos aislados del 45 % y el 73 % respectivamente.

Por lo tanto, adecuadamente, la enzima GDS usada en la producción de los compuestos de la fórmula general (I) se modifica para tener un residuo alternativo en lugar del residuo de tirosina en la posición 406 de la enzima nativa. Adecuadamente, el residuo de tirosina se reemplazará por un residuo más pequeño, por ejemplo fenilalanina, leucina, isoleucina, valina o alanina, siendo particularmente adecuada la fenilalanina.

El polipéptido GDS modificado forma un aspecto adicional de la invención.

En otros aspectos adicionales de la invención se proporcionan:

- 10 una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido GDS modificado;
un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico; y
una célula transfectada o transformada con una molécula de ácido nucleico o vector.
- 15 Adecuadamente, el vector es un vector de expresión adaptado para expresar la molécula de ácido nucleico según la invención.

La célula puede ser una célula eucariota o una célula procariótica. Por ejemplo, la célula puede seleccionarse del grupo que consiste en: una célula fúngica, una célula de insecto, una célula vegetal, una célula bacteriana.

- 20 Las células bacterianas y fúngicas adecuadas incluyen: células de *E.coli* y células de *S. cerevisiae*, siendo las células de *E.coli* particularmente adecuadas.

- Si se utilizan microorganismos como organismos en el procedimiento según la invención, se cultivarán o
- 25 desarrollarán de la manera en que el experto en la técnica esté familiarizado, dependiendo del organismo huésped. Como norma, los microorganismos se cultivan en un medio líquido que comprende una fuente de carbono, generalmente en forma de azúcares, una fuente de nitrógeno, generalmente en forma de fuentes de nitrógeno orgánico, como el extracto de levadura o sales como el sulfato de amonio, elementos traza tales como sales de hierro, manganeso y magnesio y, si corresponde, vitaminas, a temperaturas entre 0 °C y 100 °C, preferiblemente
- 30 entre 10 °C y 60 °C, mientras se gasea en oxígeno.

- El pH del medio líquido puede mantenerse constante, es decir, regulado durante el período de cultivo, o no. Los cultivos se pueden cultivar por lotes, por semi-lotes o de forma continua. Pueden proporcionarse nutrientes al comienzo de la fermentación o bien proporcionarse de forma semicontinua o continua. Los productos producidos se
- 35 pueden aislar de los organismos como se describió anteriormente, utilizando procedimientos conocidos por el experto, por ejemplo, mediante extracción, destilación, cristalización, si es apropiado, precipitación con sal y/o cromatografía. Con este fin, los organismos pueden ser interrumpidos ventajosamente de antemano. En este procedimiento, el valor de pH se mantiene ventajosamente entre pH 4 y 12, preferiblemente entre pH 6 y 9, especialmente preferiblemente entre pH 7 y 8.

- 40 Se puede encontrar una visión general de los procedimientos de cultivo conocidos en el libro de texto de Chmiel (Bioprozeßtechnik 1). Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Tecnología de bioprocedimientos 1. Introducción a la tecnología de bioprocedimientos (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen [Biorreactores y equipos periféricos] (Vieweg Verlag, Brunswick /
- 45 Wiesbaden, 1994)).

El medio de cultivo a utilizar debe cumplir adecuadamente los requisitos de las cepas en cuestión. Pueden encontrarse descripciones de los medios de cultivo para varios microorganismos en el libro de texto "Manual de Métodos para Bacteriología General" de la Sociedad Americana de Bacteriología (Washington DC, EE. UU., 1981).

- 50 Como se ha descrito anteriormente, estos medios que pueden emplearse según la invención comprenden usualmente una o más fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, vitaminas y/o elementos traza.

- Las fuentes de carbono preferidas son azúcares, tales como mono, di o polisacáridos. Ejemplos de fuentes de
- 55 carbono son glucosa, fructosa, manosa, galactosa, ribosa, sorbosa, ribulosa, lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, almidón o celulosa. Los azúcares también se pueden agregar a los medios a través de compuestos complejos como la melaza u otros subproductos del refinado de azúcar. También puede resultar ventajosa la adición de mezclas de una variedad de fuentes de carbono. Otras posibles fuentes de carbono son aceites y grasas como, por ejemplo, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y/o grasa de coco, ácidos grasos como, por ejemplo, ácido
- 60 palmítico, ácido esteárico y/o ácido linoleico, alcoholes y/o o polialcoholes tales como, por ejemplo, glicerol, metanol

y/o etanol, y/o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético y/o ácido láctico. Las fuentes de nitrógeno son generalmente compuestos de nitrógeno orgánicos o inorgánicos o materiales que comprenden estos compuestos. Ejemplos de fuentes de nitrógeno son amoníaco en solución o en forma gaseosa o sales de amonio tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio o nitrato de amonio, otros nitratos, urea, aminoácidos o fuentes de nitrógeno complejas tales como licor de maíz, harina de soja, proteína de soja, extracto de levadura, extracto de carne y otros. Las fuentes de nitrógeno se pueden utilizar individualmente o como una mezcla. Los compuestos de sales inorgánicas que pueden estar presentes en los medios comprenden las sales de cloruro, fósforo y sulfato de calcio, magnesio, sodio, cobalto, molibdeno, potasio, manganeso, zinc, cobre y hierro.

Los compuestos inorgánicos que contienen azufre tales como, por ejemplo, sulfatos, sulfitos, ditionitos, tetratiónatos, tiosulfatos, sulfuros, o bien compuestos orgánicos de azufre tales como mercaptanos (tioles) pueden utilizarse como fuentes de azufre para la producción de químicos que contienen sulfuro, en particular de metionina. Como fuentes de fósforo se pueden utilizar ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de potasio o hidrogenofosfato dipotásico o las sales correspondientes que contienen sodio.

Se pueden añadir agentes quelantes al medio para mantener los iones metálicos en solución. Los agentes quelantes particularmente adecuados comprenden dihidroxifenoles tales como catecol o protocatecuato y ácidos orgánicos tales como ácido cítrico.

Los medios de fermentación usados según la invención para cultivar microorganismos también comprenden habitualmente otros factores de crecimiento tales como vitaminas o promotores del crecimiento, que incluyen, por ejemplo, biotina, riboflavina, tiamina, ácido fólico, ácido nicotínico, pantotenato y piridoxina. Los factores de crecimiento y las sales se derivan frecuentemente de componentes de medios complejos tales como extracto de levadura, melaza, licor de maíz y similares. Además, es posible añadir precursores adecuados al medio de cultivo. La composición exacta de los compuestos de los medios depende en gran medida del experimento particular y se decide individualmente para cada caso específico. Se puede encontrar información sobre la optimización de los medios en el libro "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Editors P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) pp. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Los medios de crecimiento también pueden obtenerse de proveedores comerciales, por ejemplo, Estándar 1 (Merck) o BHI (infusión de cerebro-corazón, DIFCO) y similares.

Todos los componentes del medio se esterilizan, ya sea por calor (20 min a 1,5 bar y 121 °C) o por esterilización por filtro. Los componentes pueden esterilizarse juntos o, si es necesario, por separado. Todos los componentes de los medios pueden estar presentes al inicio del cultivo o agregarse de forma continua o por lotes, según se desee.

La temperatura del cultivo es normalmente entre 15 °C y 45 °C, preferiblemente de 25 °C a 40 °C, y puede mantenerse constante o alterarse durante el experimento. El pH del medio debe estar en el rango de 5 a 8,5, preferiblemente alrededor de 7,0. El pH para el cultivo puede controlarse durante el cultivo mediante la adición de compuestos básicos como el hidróxido de sodio, el hidróxido de potasio, el amoníaco y el amoníaco acuoso o compuestos ácidos como el ácido fosfórico o el ácido sulfúrico. La formación de espuma se puede controlar empleando antiespumantes tales como, por ejemplo, ésteres de poliglicol de ácidos grasos. Para mantener la estabilidad de los plásmidos, es posible añadir al medio sustancias adecuadas que tengan un efecto selectivo, por ejemplo, antibióticos. Las condiciones aeróbicas se mantienen introduciendo oxígeno o mezclas de gases que contienen oxígeno como, por ejemplo, aire ambiente en el cultivo. La temperatura del cultivo es normalmente de 20 °C a 45 °C y preferiblemente de 25 °C a 40 °C. El cultivo continúa hasta que la formación del producto deseado está al máximo. Este objetivo se logra normalmente en un período de 10 a 160 horas.

Los caldos de fermentación obtenidos de esta manera, en particular los que comprenden ácidos grasos poliinsaturados, contienen usualmente una masa seca del 7,5 a 25 % en peso.

De esta forma, el caldo de fermentación puede procesarse adicionalmente. La biomasa puede, según el requisito, eliminarse total o parcialmente del caldo de fermentación mediante procedimientos de separación tales como, por ejemplo, centrifugación, filtración, decantación o una combinación de estos procedimientos, o puede dejarse por completo en dicho caldo. Es ventajoso procesar la biomasa después de su separación.

Sin embargo, el caldo de fermentación también puede espesarse o concentrarse sin separar las células, utilizando procedimientos conocidos como, por ejemplo, con la ayuda de un evaporador rotatorio, un evaporador de película delgada, un evaporador de película descendente, mediante ósmosis inversa o nanofiltración. Por último, este caldo de fermentación concentrado puede procesarse para obtener los ácidos grasos presentes en él.

Como se discutió anteriormente, los compuestos de la fórmula general (I) tienen propiedades semioquímicas y actúan como repelentes de insectos o como atrayentes de insectos.

- 5 Por lo tanto, en un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición repelente de insectos que comprende un compuesto de la fórmula (I) como se define anteriormente y un portador adecuado, siempre que el compuesto de la fórmula general (I) no sea (S)-14,15-dimetilgermacreno D (es decir, el compuesto de la fórmula general (I) en el cual R^2 y R^3 son metilo y R^1 , R^4 y R^5 son H).

- 10 El término "portador" denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el cual se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Las composiciones según la invención pueden ser sólidas o fluidas, en las cuales el fluido comprende estados de gas y líquido.

Los compuestos adecuados de la fórmula general (I) para utilizar en composiciones repelentes de insectos son aquellos donde:

- 15 cada R^1 , R^2 y R^4 es H;
 R^3 es metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo o ciclopropilo; y
 R^5 es H, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo o ciclopropilo.
- 20 Más adecuadamente, en la composición repelente de insectos, el R^5 de la fórmula general (I) es H, metilo o etilo, especialmente H o metilo y particularmente H.

- Compuestos todavía más adecuados de la fórmula general (I) para su uso en la composición repelente de insectos son aquellos donde cada uno R^1 , R^2 , R^4 y R^5 es H y R^3 es metilo o etilo. Más adecuadamente en la composición
 25 repelente de insectos, el compuesto de la fórmula general (I) es (S) -15-metilgermacreno D, es decir, el compuesto de fórmula general (I) en el cual R^1 , R^2 , R^4 y R^5 es H y R^3 es metilo

- La composición repelente de insectos puede contener uno o más compuestos adicionales repelentes de insectos, por ejemplo aletrinas, DEET (N, N-dietil-m-toluamida), p-mentano-3,8-diol (PMD), picaridina, Bayrepel, KBR3023,
 30 nepetalactona, aceite de citronela, aceite de Neem, mirto de pantano, carbato de dimetilo, éter alílico de triciclododecenilo, IR3535 (3- [N-butil-N-acetil] aminopropiónico, éster etílico) o repelentes de insectos a base de antranilato.

- En una realización, la composición repelente de insectos puede ser adecuada para su aplicación en humanos o
 35 animales, por ejemplo para la piel, y en este caso, el portador será adecuado para su aplicación farmacéutica o veterinaria para uso cutáneo.

- En una realización alternativa, se proporciona una composición atrayente de insectos que comprende un compuesto de la fórmula (I) y un portador adecuado, siempre que el compuesto de la fórmula (I) no sea (S)-15-metilgermacreno
 40 D (es decir, compuesto de la fórmula general (I) en el cual R^2 es hidrógeno).

El portador puede ser como se ha descrito anteriormente para la composición repelente de insectos.

- Los compuestos adecuados de la fórmula (I) para utilizar en la composición atrayente de insectos son aquellos
 45 donde cada R^2 , R^3 y R^5 es, independientemente, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo o ciclopropilo y R^1 y R^4 son ambos hidrógeno.

En compuestos más adecuados de la fórmula general (I) para utilizar en la composición atrayente de insectos:

- 50 cada R^1 y R^4 es H;
 cada R^2 y R^3 es, independientemente, metilo, etilo *n*-propilo, *iso*-propilo o ciclopropilo; y
 R^5 es H, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo o ciclopropilo pero, particularmente H.

- Los compuestos particularmente adecuados de la fórmula general (I) para utilizar en la composición atrayente de
 55 insectos son aquellos donde:

cada R^1 , R^4 y R^5 es H;
 cada R^2 y R^3 es, independientemente, metilo o etilo.

- 60 Adecuadamente, en la composición atrayente de insectos, el compuesto de la fórmula general (I) es (S) -14,15-

dimetilgermacreno D, es decir, el compuesto donde cada R¹, R⁴ y R⁵ es H y cada R² y R³ es metilo.

En algunos casos, la composición atrayente de insectos también comprende un insecticida.

- 5 Los insecticidas son sustancias que son tóxicas para los insectos y tienen una amplia aplicación en la agricultura, la sanidad pública y la industria, así como otros usos domésticos y comerciales. Los insecticidas se clasifican típicamente según su estructura y modo de acción, por ejemplo, muchos insecticidas actúan sobre el sistema nervioso del insecto (por ejemplo, la inhibición de la colinesterasa (ChE)) mientras que otros actúan como reguladores del crecimiento o endotoxinas.
- 10 Además, la composición atrayente de insectos puede comprender un medio de liberación controlada seleccionado del grupo que consiste en caucho, polietileno, fibras huecas, emparedados plásticos, membranas plásticas y materiales celulósicos, de modo que el atrayente se libera durante un período de días a una concentración efectiva para atraer insectos.
- 15 La composición atrayente de insectos de la invención se puede utilizar en combinación con un dispositivo para atrapar insectos y, por lo tanto, en un aspecto adicional de la invención, se proporciona un dispositivo para atrapar insectos que comprende la composición atrayente de insectos de la presente invención.
- 20 La composición atrayente de insectos actúa como cebo para insectos tales como, por ejemplo, hormigas, cucarachas, moscas, pulgones, mosquitos o polillas. En particular, la composición puede ser un atrayente para pulgones como el pulgón de grano (*Sitobion avenae*).
- En algunos casos, la composición puede ser una composición de liberación controlada que incluye un medio de liberación controlada como se describe anteriormente.
- 25 El dispositivo para atrapar insectos también puede comprender un insecticida que puede incluirse en la composición atrayente de insectos o, alternativamente, puede proporcionarse como una composición separada.
- 30 Según un aspecto de la invención, se proporciona una composición según la invención para utilizar en el tratamiento de infestaciones de insectos en animales o plantas. La composición puede ser la composición repelente, en cuyo caso puede aplicarse al animal o planta. Alternativamente, puede ser la composición atrayente, en cuyo caso puede aplicarse en un lugar adyacente a las plantas, por ejemplo, en un dispositivo para atrapar insectos.
- 35 El animal que sufre una infestación de insectos puede ser un mamífero, que puede ser un mamífero humano o no humano, tal como un gato, perro, roedor, ganado, ovejas, aves de corral o cerdos.
- Las plantas que sufren infestaciones de insectos pueden ser plantas leñosas, por ejemplo, álamo; eucalipto; abeto de Douglas pino; nuez; fresno; abedul; roble; teca; abeto. Alternativamente, la planta puede seleccionarse de plantas de cultivo, por ejemplo: maíz (*Zea mays*), canola (*Brassica napus*, *Brassica rapa ssp.*), alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), girasol (*Helianthus annuus*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), papa (*Solanum tuberosum*), cacahuetes (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium*), batata (*Ipomoea batatas*), yuca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea spp.*), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Ananas comosus*), árbol citris (*Citrus spp.*) cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia sinensis*), plátano (*Musa spp.*), avacado (*Persea americana*), higo (*Ficus carica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifera indica*), oliva (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), anacardo (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), avena, cebada, hortalizas y plantas ornamentales.
- 40 Más adecuadamente, las composiciones de la presente invención se utilizan para la protección de plantas de cultivo (por ejemplo, cereales y legumbres, maíz, trigo, cebada, centeno, patatas, tapioca, arroz, sorgo, mijo, mandioca, cebada, etc.). guisantes, plantas de semillas oleaginosas como algodón, soja, cártamo, girasol, Brassica, maíz, alfalfa, palma, coco, etc. o leguminosas y otros cultivos de raíces, tubérculos o semillas. Los cultivos importantes son la colza, la remolacha azucarera, el maíz, el girasol, la soja y el sorgo. Las plantas hortícolas a las que se puede aplicar la presente invención pueden incluir lechuga, endibia y brasicas vegetales, incluidas col, brócoli y coliflor, y claveles y geranios. La presente invención se puede aplicar al tabaco, cucurbitáceas, zanahoria, fresa, girasol, tomate, pimiento, crisantemo. Las plantas leguminosas incluyen habas y guisantes. Las habas incluyen guar, algarrobo, fenogreco, soja, alubia, judía, mostaza, alubia de Lima, lenteja, garbanzo, etc.
- 45 Más adecuadamente, las composiciones de la presente invención se utilizan para la protección de plantas de cultivo (por ejemplo, cereales y legumbres, maíz, trigo, cebada, centeno, patatas, tapioca, arroz, sorgo, mijo, mandioca, cebada, etc.). guisantes, plantas de semillas oleaginosas como algodón, soja, cártamo, girasol, Brassica, maíz, alfalfa, palma, coco, etc. o leguminosas y otros cultivos de raíces, tubérculos o semillas. Los cultivos importantes son la colza, la remolacha azucarera, el maíz, el girasol, la soja y el sorgo. Las plantas hortícolas a las que se puede aplicar la presente invención pueden incluir lechuga, endibia y brasicas vegetales, incluidas col, brócoli y coliflor, y claveles y geranios. La presente invención se puede aplicar al tabaco, cucurbitáceas, zanahoria, fresa, girasol, tomate, pimiento, crisantemo. Las plantas leguminosas incluyen habas y guisantes. Las habas incluyen guar, algarrobo, fenogreco, soja, alubia, judía, mostaza, alubia de Lima, lenteja, garbanzo, etc.
- 50 Según un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para repeler insectos que comprende
- 55
- 60

proporcionar una composición repelente de insectos según la invención en un área afectada por infestación de insectos.

Según un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para atraer insectos que comprende proporcionar una composición atrayente de insectos según la invención en un área afectada por infestación de insectos.

En la descripción de la presente invención, excepto cuando el contexto requiera lo contrario debido a un lenguaje expreso o una implicación necesaria, la palabra "comprende", o variaciones tales como "comprenden" o "que comprende" se utiliza en un sentido inclusivo, es decir, para especificar la presencia de las características indicadas, pero no para excluir la presencia o adición de características adicionales en diversas realizaciones de la invención.

A continuación se describirá la invención en mayor detalle con referencia a los ejemplos y a los dibujos en los cuales:

La figura 1 es un cromatograma de gases de los productos extraíbles con pentano de la incubación de difosfato de 14,15-dimetilfarnesilo (compuesto de fórmula general (II) donde R^1 , R^4 y R^5 son H y R^2 y R^3 son metilo) con Y406F-GDS-His₆(S) -14,15-dimetilgermacreno D (compuesto de fórmula general (I) donde R^1 , R^4 y R^5 son H y donde R^2 y R^3 son metilo) eluido a 32,83 min.

La figura 2 es un espectro de masas del producto que se eluye a los 32,83 minutos a partir de la incubación de difosfato de 14,15-dimetilfarnesilo con Y406F-GDS-His₆.

La figura 3 es un cromatograma de gases de los productos extraíbles con pentano de la incubación de difosfato de 15-dimetilfarnesilo (compuesto de fórmula general (II) donde R^1 , R^2 , R^4 y R^5 son H y R^3 es metilo) con Y406F-GDS-His₆. 15-metil (S) -germacreno D (compuesto de fórmula general (I) donde R^1 , R^2 , R^4 y R^5 son H y R^3 es metilo) eluido a 29,54 min.

La figura 4 es un espectro de masas del producto que se eluye a los 29,54 minutos a partir de la incubación de difosfato de 15-dimetilfarnesilo con Y406F-GDS-His₆.

La figura 5 es un cromatograma de gases de los productos extraíbles con pentano de la incubación de difosfato de 12-metilfarnesilo (compuesto similar a la fórmula general (II) donde R^2 , R^3 , R^4 y R^5 son H y R^1 es metilo). El análogo de germacreno D (compuesto similar a la fórmula general (I) donde R^2 , R^3 , R^4 y R^5 son H y R^1 es metilo) eluido a 29,35 minutos.

La figura 6 es una cromatografía de gases acoplada-electroantenografía (GC-EAG) con el áfido del grano, *Sitobion avenae*. Trazas superiores = respuesta EAG, trazas inferiores = respuesta GC.A - (S)-germacreno D (compuesto comparador Ia); B - (R)-germacreno D (III); C - (S)-14-metilgermacreno D ; D - (S)-12-metilgermacreno D; E - (S)-15-metilgermacreno D ; F - (S)-14,15-dimetilgermacreno D (compuesto de la fórmula general (I) donde R^2 y R^3 son metilo); G-(S)-1-fluorgermacreno D ; H - germacrano (IV).

Materiales y procedimientos

Todos los productos químicos se adquirieron de Sigma-Aldrich, a menos que se indique lo contrario. Todos fueron de calidad analítica o mejor y se utilizaron tal como se recibieron, a menos que se indique lo contrario.

Los espectros de RMN ^1H , ^{31}P y ^{13}C se midieron en un espectrómetro de RMN Bruker® Avance III 600, un espectrómetro de RMN Bruker® Avance 500 o un espectrómetro de RMN Bruker® Avance DPX400 y se indican como cambios químicos en partes por millón campo abajo desde tetrametilsilano, multiplicidad (s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuarteto, m = multiplete), constante de acoplamiento (a los 0,5 Hz más cercanos) y asignación, respectivamente. Las asignaciones se realizan a las limitaciones de los espectros COSY, DEPT 90/135, gradiente HSQC y gradiente HMBC. El CDCl_3 se filtró a través de alúmina básica antes de su uso en espectroscopia de RMN. Los espectros de masas EI^+ se midieron en un espectrómetro de masas Micromass™ LCT Premier™ XE (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.). El GCMS se realizó en un Hewlett Packard Agilent™ 6890 GC equipado con una columna J&W Scientific DB-5MS (30 mx 0,25 mm de diámetro interno) y un Micromass™ GCT Premier™ detectando en el rango m/z 50-800 en EI^+ . El análisis se realizó una vez por segundo con un tiempo de escaneado de 0,9 s. Las inyecciones se realizaron en modo dividido (relación de división 5: 1) a 50 °C. Los cromatogramas se iniciaron con una temperatura del horno de 50 °C (a menos que se indique lo contrario) a 4 °C min^{-1} durante 25 min (hasta 150 °C) y después a 20 °C min^{-1} durante 5 min (temperatura final: 250 °C).

Preparación y purificación de proteínas

La germacreno D sintasa recombinante y los mutantes se produjeron en exceso en *E. coli* (DE3) Star como
5 proteínas de fusión C-terminales etiquetadas en His y se purificaron mediante cromatografía de afinidad con Ni²⁺
como lo describe Cascón, O. y col. Chemoenzymatic preparation of germacrene analogues. Chem. Commun. 48,
9702-9704 (2012).

Mutagénesis dirigida al sitio de GDS recombinante

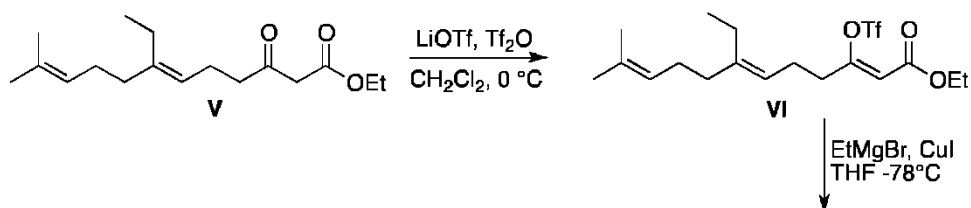
10 Se utilizó el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quickchange (Stratagene) para introducir las mutaciones deseadas según las instrucciones del fabricante. Los cebadores utilizados para la mutagénesis fueron los siguientes:

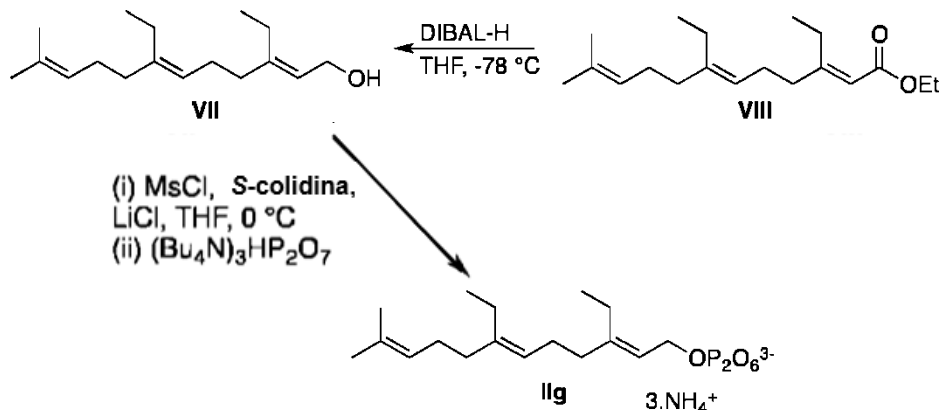
5' CTGGTAGAGCTGTACTTTTTCGGGTACTGGGCGTTTATTTC 3' (ID. SEC. Nº:2) y
15 5' GAAATAAACGCCAGTACCGCAAAGTACAGCTCTACCAG 3' (SEC. ID. Nº:3) para W275A;
5' CTGGTAGAGCTGTACTTTTCTGGTACTGGGCGTTTATTTC 3' (SEC. ID. Nº:4) y
5' GAAATAAACGCCAGTACCGAAAAGTACAGCTCTACCAG 3' (SEC. ID. Nº:5) para W275L;
5' GGTAGAGCTGTACTTTTTCTGTAAGTACGCTCTACC 3' (SEC. ID. Nº:6) y
5' GAAATAAACGCCAGTACGAAAAGTACAGCTCTACC 3' (SEC. ID. Nº:7) para W275F;
20 5' CGTGATCGACATGCTGGCGAAGAATGACGACAACC 3' (SEC. ID. Nº:8) y
5' GGTTGTCGTCATTCTTCGCCAGCATGTCGATCACG 3' (SEC. ID. Nº:9) para Y524A;
5' GCGTGATCGACATGCTGCTGAAGAATGACGACAACC 3' (SEC. ID. Nº:10) y
5' GGTTGTCGTCATTCTTCAGCAGCATGTCGATCACGC 3' (SEC. ID. Nº:11) para Y524L;
5' GTGATCGACATGCTGTTCAAGAATGACGACAAC 3' (SEC. ID. Nº:12) y
25 5' GTTGTCGTCATTCTTGAACAGCATGTCGATCAC 3' (SEC. ID. Nº:13) para Y524F;
5' GAATCTGACGGGTGGCGCAAAATGCTGACGACG 3' (SEC. ID. Nº:14) y
5' CGTCGTCAGCATTTTCTGCCACCCGTCAGATTTC 3' (SEC. ID. Nº:15) para Y406S;
GAATCTGACGGGTGGCGGCAAAATGCTGACGACG 3' (SEC. ID. Nº:16) y
5' CGTCGTCAGCATTTTTCGCCACCCGTCAGATTTC 3' (SEC. ID. Nº:17) para Y406G;
30 5' GAATCTGACGGGTGGCGCGAAAATGCTGACGACG 3' (SEC. ID. Nº:18) y
5' CGTCGTCAGCATTTTTCGCCACCCGTCAGATTTC 3' (SEC. ID. Nº:19) para Y406A;
5' GAATCTGACGGGTGGCGTGAAAATGCTGACGACG 3' (SEC. ID. Nº:20) y
5' CGTCGTCAGCATTTTTCAGCCACCCGTCAGATTTC 3' (SEC. ID. Nº:21) para Y406V;
5' GAATCTGACGGGTGGCATTAAATGCTGACGACG 3' (SEC. ID. Nº:22) y
35 5' CGTCGTCAGCATTTTAAATGCCACCCGTCAGATTTC 3' (SEC. ID. Nº:23) para Y406I;
5' GAATCTGACGGGTGGCCTGAAAATGCTGACGACG 3' (SEC. ID. Nº:24) y
5' CGTCGTCAGCATTTTTCAGGCCACCCGTCAGATTTC 3' (SEC. ID. Nº:25) para Y406L;
5' GAATCTGACGGGTGGCTTTAAATGCTGACGACG 3' (SEC. ID. Nº:26) y
5' CGTCGTCAGCATTTTAAAGCCACCCGTCAGATTTC 3' (SEC. ID. Nº:27) para Y406F;
40 5' CTGACGGGTGGCTGGAAAATGCTGACGAC 3' (SEC. ID. Nº:28) y
5' GTCGTCAGCATTTTCCAGCCACCCGTCAG 3' (SEC. ID. Nº:29) para Y406W.

Los plásmidos se purificaron a partir de cultivos durante la noche (10 ml de medio LB que contiene ampicilina 50 μ mol/ml) utilizando el kit miniprep QIAGEN de conformidad con la descripción del fabricante. Las mutaciones se confirmaron mediante el análisis de secuencia de ADN utilizando las instalaciones internas de Walesbiogrid (School of Bioscience, Cardiff University, Reino Unido).

Ejemplo 1: Síntesis de 14,15-dimetilfarnesil difosato (IIg)

50 El compuesto del título se preparó a partir de β -cetoéster V según el Esquema de reacción 1.





5 A. Síntesis de (2E,6E) 3,7-dietil-11-metildodeca-2,6,10-trienoato de etilo (VII)

A una solución agitada de **V** (Cascón y col.; ChemPlusChem 78, 1334-1337 (2013)), (0,35 g, 1,50 mmol) (0,35 g, 1,50 mmol) y trifluorometanosulfonato de litio (0,78 g, 5,0 mmol) en seco CH_2Cl_2 (38 ml) bajo argón a 0°C se añadió trietilamina (0,7 ml, 5,0 mmol) seguida de anhídrido trifluorometanosulfónico (0,32 ml, 1,90 mmol). La mezcla se agitó a 0°C durante 2 h antes de inactivar con la adición de una solución saturada de NH_4Cl (20 ml). Esta mezcla se diluyó con CH_2Cl_2 (20 ml) y la fase acuosa separada se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 10 ml). Los extractos orgánicos reunidos se lavaron con agua (30 ml) y salmuera (30 ml) antes de proceder al secado (MgSO_4), filtración y concentración a presión reducida. Esto dio el triflato **VI** de enol como un aceite oscuro que se utilizó directamente sin purificación adicional (0,58 g, 83 %).

A una suspensión agitada de CuI (0,95 g, 5,00 mmol) en THF (12 ml) a 0°C se añadió gota a gota bromuro de etilmagnesio (solución 3,0 M en éter dietílico, 3,33 ml, 10,0 mmol). La solución se agitó durante 30 minutos, después de lo cual se formó un color negro opaco. La mezcla de reacción agitada se enfrió luego a -78°C y se añadió una solución de **VI** (0,58 g, 1,25 mmol) en THF anhidro (4 ml) a través de una aguja y la reacción se agitó a esta temperatura durante 2,5 h antes de apagarla. Adición de una solución acuosa saturada de NH_4Cl (20 ml). Las emulsiones resultantes se disolvieron mediante la adición de una solución acuosa concentrada de NH_4OH y se agitaron durante la noche. La capa acuosa separada se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 ml) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (2 x 30 ml) y salmuera (30 ml) antes de secar (MgSO_4), filtrar y concentrar a presión reducida. El aceite residual se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (19: 1 hexano; acetato de etilo). El compuesto del título se aisló como un aceite incoloro (185 mg, 52 %).

HRMS (m/z ES^+): calcul. para $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_2$ 292,2402; resultado 292,2407; δ_{H} (400MHz, CDCl_3) 0,95 (3 H, t, $J = 7,5$ Hz, $\text{C}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$), 1,07 (3 H, t, $J = 7,5$ Hz, $\text{C}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$), 1,27 (3 H, t, $J = 7,0$ Hz, OCH_2CH_3), 1,59 (3 H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}$), 1,67 (3 H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}$), 1,98-2,05 y 2,03-2,04 (12 H, m, 2 x CH_2CH_2 y 2 x $\text{CH}=\text{CCH}_2\text{CH}_3$), 4,25 (2 H, q, $J = 7,0$ Hz, OCH_2CH_3), 5,01-5,20 (2 H, m, 2 x $\text{C}=\text{CH}$), 5,72 (1 H, s, $\text{C}=\text{CHCO}_2\text{Et}$); δ_{C} (62,5 MHz, CDCl_3) 12,97, 13,18, 14,29, 17,68 y 23,15 (CH_3), 25,34, 25,67, 25,78, 26,84, 36,43, 38,27 y 59,13 (CH_2), 114,79, 122,51 y 124,31 (3 x $\text{C}=\text{CH}$), 131,33 141,91 y 165,53 (3 x $\text{C}=\text{CH}$), 166,45 ($\text{C}=\text{O}$).

B. Síntesis de (2E,6E) 3,7-Dietil-11-metildodeca-2,6,10-trienol (VIII)

A una suspensión agitada de **VII** (0,18 mg, 0,60 mmol) en tolueno (3,1 ml) a -78°C se añadió DIBAL-H (1,5 M en tolueno, 1,30 ml, 1,80 mmol), la solución se agitó a esta temperatura durante 2 h. La reacción se detuvo mediante la adición de HCl 2 M (10 ml), se diluyó con CH_2Cl_2 (10 ml) y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La capa acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 10 ml) y las capas orgánicas reunidas se lavaron con solución acuosa saturada de NaHCO_3 (3 x 10 ml), salmuera (2 x 15 ml), se secaron sobre MgSO_4 y luego se concentraron a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyendo con hexano-acetato de etilo 3: 1) para dar al compuesto del título forma de un aceite incoloro (0,16 mg, 73% de rendimiento).

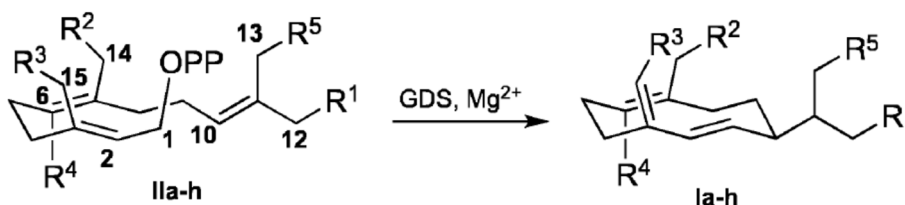
HRMS (m/z APCI [$\text{M}+\text{H}^+-\text{H}_2\text{O}$]) calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{29}$ 233,2269; resultado 233,2275; δ_{H} (400MHz, CDCl_3) 0,94-1,01 (6 H, m, 2 x CH_2CH_3), 1,60 (3 H, s, $\text{CH}=\text{CCH}_3$), 1,68 (3 H, s, $\text{CH}=\text{CCH}_3$), 1,97-2,13 (12 H, m, 6 x CH_2), 4,16 (2 H, d, $J = 7,0$ Hz, CH_2O), 5,09 (2 H, m, 2 x $\text{C}=\text{CH}$), 5,38 (1 H, t, $J = 7,0$ Hz, $\text{C}=\text{CHCH}_2\text{O}$). δ_{C} (62,5 MHz, CDCl_3) 13,20, 13,65, 17,68 y 23,21 (CH_3), 23,54, 25,65, 26,22, 26,96, 36,51 y 36,75 (CH_2), 59,09 (CH_2OH), 122,89, 123,43 y 124,46 ($\text{C}=\text{CH}$), 131,26, 141,25 y 145,69 ($\text{C}=\text{CH}$).

C. Síntesis de trisamonio (2E,6E)-3,7-dietil-11-metildodeca-2,6,10-trienil difosfato (14,15-dimetilfarnesil difosfato) (IIg)

- 5 Una suspensión agitada de LiCl (0,27 g, 6,4 mmol) en DMF anhidra (5,3 ml) se enfrió a 0 °C (baño de hielo) y luego se añadieron S-solidina (0,3 ml, 2,4 mmol) y cloruro de metanosulfonilo (50 µl, 0,64 mmol). La solución se agitó durante 15 minutos, tiempo durante el cual se formó un precipitado turbio blanco. Se añadió gota a gota alcohol **VII** (100 mg, 0,40 mmol) como una solución en DMF anhidra (1 ml) y la reacción se agitó a 0 °C durante 3 h. La mezcla se diluyó con pentano frío (4 ml), luego se vertió en hielo (25 g) y la capa acuosa resultante se extrajo con pentano (3 x 10 ml). Las capas orgánicas reunidas se lavaron con solución saturada de CuSO₄ (3x 10 ml), solución saturada de NaHSO₄ (2 x 10 ml) y salmuera (2 x 10 ml) antes de proceder con el secado (MgSO₄) y la filtración. La solución se concentró a presión reducida y el cloruro alílico bruto resultante se utilizó directamente sin purificación adicional.
- 10 A una solución del cloruro alílico crudo en CH₃CN anhidro (1 ml) se le añadió hidrogendifosfato de tris-(tetrabutilamonio) (0,7 g, 1,8 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 h. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se disolvió en un tampón de intercambio iónico (25 mM NH₄HCO₃ contenía 2 % de *i*-PrOH, 1 ml). Esta solución se pasó lentamente a través de una columna que contenía 30 equiv. de la resina de intercambio catiónico DOWEX 50W-X8 (malla 100-200) (forma NH₄⁺) que se había equilibrado previamente con dos volúmenes de columna de tampón de intercambio iónico. La columna se eluyó con dos volúmenes de columna de tampón de intercambio iónico a un caudal de un volumen de columna por 15 min. Una vez que se completó el
- 20 intercambio iónico, las fracciones que contenían el producto (según lo juzgado por TLC en 6:3:1 *i*-PrOH:c. NH₃:H₂O, tinción con tinción de Hanessian) se liofilizaron hasta la sequedad. El sólido blanco se trituró con MeOH (3 x 10 ml) y los extractos orgánicos se concentraron hasta la sequedad proporcionando un sólido amarillo que se limpió con Et₂O (3 x 3 ml) para dar el compuesto del título en forma de un sólido blanco (64 mg, 36 %). El residuo de la trituración se purificó adicionalmente mediante HPLC de fase inversa (columna Phenomenex Luna™ de 150 x 21,2 mm, eluyendo con B al 10 % durante 20 min, luego un gradiente lineal a 60 % B durante 25 min y finalmente un gradiente lineal a 100 % B durante 5 minutos; solvente A:25 mM NH₄HCO₃ en agua, solvente B:CH₃CN, caudal de 5,0 ml/min, detectando a 220 nm, tiempo de retención 39,3 min). Una vez que se completó la purificación, la solución se liofilizó nuevamente hasta la sequedad, dando un lote adicional del compuesto del título en forma de un sólido blanco esponjoso (34 mg, 18,9 % de rendimiento). HRMS (*m/z* ES⁻) calculado para C₁₇H₃₁O₇P₂ 409,2545; resultado
- 30 409,2539;
 δ_H (400MHz, D₂O) 0,8-0,91 (6 H, m, 2 x CH₂CH₃), 1,50 (3 H, s, C=CCH₃), 1,56 (3H, s, C=CCH₃) 1,92-2,03 (12 H, m, 6 x CH₂), 4,37 (2H, m, CH₂O), 5,07 (2 H, t, *J* = 6,0 Hz, 2 x C=CH), 5,32 (1H, t, *J* = 6,5 Hz, C=CHCH₂O);
 δ_P (202,5 MHz, ²H₂O) -10,41 (d, *J*_{PP} = 22,5 Hz), -8,30 (d, *J*_{PP} = 22,5 Hz).
- 35 Se pueden sintetizar otros compuestos de la fórmula general (II) mediante un procedimiento análogo a partir de un β-cetoéster alternativo.

Ejemplo 2: Preparación de análogos de (S)-germacreno D

- 40 Los análogos de germacreno se produjeron a partir del difosfato de farnesilo apropiado según el Esquema 2 por cobertura enzimática utilizando un PIB o un PIB modificado.

Esquema 2

45

Sustrato	Producto
Ila	Compuesto comparador Ia (S) -germacreno D
Ilb	Compuesto comparador Ib (S) -12-metilgermacreno D
Ilc	Compuesto comparador Ic (S) -14-metilgermacreno D
Ild	Compuesto comparador Id (S) -14-fluorogermacreno D
Ile	Compuesto comparador Ie (S) -15-fluorogermacreno D
Ilf	Compuesto If (S) -15-metilgermacreno D
Ilg	Compuesto Ig (S) -14,15-dimetilgermacreno D
Ilh	Compuesto comparador Ih (S) -1-fluorogermacreno D

Se optimizaron las incubaciones de análogos de FDP con GDS-His₆ y Y406F GDS-His₆ para generar conversiones máximas como se ha descrito anteriormente (Cascon y col., en Chem. Commun., 48, 9702-9704 (2012) y Cascón y col.; ChemPlusChem 78, 1334-1337 (2013)).

Resultados de los experimentos de cinética enzimática

Los parámetros cinéticos para la conversión de farnesil difosfato y análogos del mismo en (S) -germacreno D y análogos del mismo que utilizan diferentes enzimas GDS variantes se muestran en las tablas 1 a 3.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de los mutantes Y524F y W275F

GDS	K _M (μM)		k _{cat} (s ⁻¹)		k _{cat} /K _M 10 ³ (M ⁻¹ ·s ⁻¹)	
	valor	error	valor	error	valor	error
WT (peso)	3,60	0,26	0,0094	0,0002	2,612	0,191
Y524F	5,34	0,43	0,0143	0,0004	2,669	0,227
W275F	2,06	0,21	0,0082	0,0002	3,971	0,405

Tabla 2. Parámetros cinéticos de los mutantes Y406

GDS	K _M (μM)		k _{cat} (s ⁻¹)		k _{cat} /K _M 10 ³ (M ⁻¹ ·s ⁻¹)	
	valor	error	valor	error	valor	error
WT (GDS-His ₆)	3,60	0,26	0,0094	0,0002	2,612	0,191
Y406W	3,14	0,26	0,0005	0,00001	0,139	0,012
Y406F	12,75	0,81	0,0853	0,0003	6,692	0,426
Y406L	8,13	0,53	0,0543	0,0012	6,679	0,459
Y406I	4,37	0,44	0,0319	0,0010	7,299	0,782
Y406V	4,17	0,57	0,0131	0,0003	4,363	0,394
Y406A	1,46	0,09	0,0132	0,0002	9,043	0,562
Y406S	--	--	--	--	--	--
Y406G	--	--	--	--	--	--

Tabla 3. Cinética de rotación de of Ila, Ilg, and Ilf con GDS-His₆ e Y406F-GDS.

	GDS-His ₆			Y406F-GDS-His ₆		
	K _M mM	k _{cat} s ⁻¹	k _{cat} /K _M M ⁻¹ s ⁻¹	K _M mM	k _{cat} s ⁻¹	k _{cat} /K _M M ⁻¹ s ⁻¹
Ila	3,60 ± 0,26	0,0094 ± 0,0002	2600 ± 200	12,75 ± 0,81	0,0853 ± 0,0003	6700 ± 400
Ilg	2,63 ± 0,39	0,0043 ± 0,0004	1600 ± 300	12,39 ± 3,85	0,0228 ± 0,0028	1800 ± 600
Ilf	5,02 ± 1,62	0,0068 ± 0,0008	1400 ± 500	5,82 ± 1,20	0,0222 ± 0,0011	3800 ± 800

Para ambos compuestos (If) e (Ig), la conversión se realizó de la manera más adecuada utilizando una enzima GDS-Y406F modificada. Sin embargo, para el nativo (S) -Germacreno D y los otros análogos, se utilizó la enzima GDS nativa en lugar de una enzima modificada.

A. Preparación de (S)-14,15-Dimetilgermacreno D (Compuesto Ig)

Para la producción de (S)-14,15-dimetilgermacreno D 14,15-dimetil-FDP (Ilg) (19 mg, concentración final 0,40 mM) e Y406F-GDS-His₆ (concentración final 12 μM) se mezclaron en tampón de incubación (20 mM Tris, 5 mM βME y 10 mM MgCl₂, pH 7,5, glicerol al 10 % para GDS, volumen final de 50 ml) superpuesto con pentano (10 ml). La mezcla

se agitó suavemente durante 5 días a temperatura ambiente y luego la capa acuosa separada se extrajo a fondo con porciones adicionales de pentano hasta que GCMS no pudo detectar ningún producto. Los extractos de pentano reunidos se concentraron a sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía preparativa de capa fina sobre gel de sílice impregnado con AgNO_3 al 1 %, eluyendo con acetona al 5 % en pentano. El compuesto del título se

- 5 aisló como un aceite incoloro (14 mg, 73 %). HRMS (m/z , EI^+) calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{28}$ 232,2191; resultado 232,2191; δ_{H} (600 MHz, CDCl_3) 0,79 (3 H, d, $J = 7,0$ Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 0,85 (3 H, d, $J = 7,0$ Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 0,86 - 0,90 (2 H, m, $(\text{CH}_3)_2\text{CHCHCH}_2$), 0,94 (3 H, t, $J = 7,5$ Hz, CH_3CH_2), 1,37-1,42 (1 H, m, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 1,68 (3 H, d, $J = 6,0$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}=\text{C}$), 1,70-1,75 (2 H, m, CH_2CET), 1,85-1,90 (1 H, m, 1 x $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CET}$), 1,97-2,02 (1 H, m, 1 x $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CET}$), 2,02-2,09 (1 H, m, $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}$), 2,14-2,20 (1 H, m, 1 x $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CCH}_2$), 2,25-2,32 (2 H, m, CH_3CH_2), 2,36-2,43 (1 H, m, 1 x $\text{CH}_2\text{C}=\text{CET}$), 2,44-2,52 (1 H, m, 1 x $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CCH}_2$), 5,03 (1 H, dd, $J = 6$ y 11 Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}=\text{CH}$), 5,08 (1 H, dd, $J = 10$ y 16 Hz, $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CCH}=\text{CH}$), 5,38 (1 H, q, $J = 6,0$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}=\text{C}$), 5,72 (1 H, d, $J = 6,0$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CCH}=\text{CH}$); δ_{C} (150 MHz, CDCl_3) 12,66 (CH_3CH_2), 13,18 ($\text{CH}_3\text{CH}=\text{C}$), 14,13 (1 x $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 19,28 (1 x $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 20,75 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCHCH}_2$), 21,30 (CH_3CH_2), 22,70 (CH_2CET), 27,09 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CET}$), 32,83 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 36,96 ($\text{CH}_3\text{CH}=\text{CCH}_2$), 52,57 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}$), 120,0 ($\text{CH}_3\text{CH}=\text{C}$), 130,1 ($\text{CH}=\text{CET}$), 133,6 ($\text{CH}=\text{CHCHCH}(\text{CH}_3)_2$), 136,1 ($\text{CH}=\text{CHCHCH}(\text{CH}_3)_2$), 139,4 ($\text{CH}=\text{CET}$), 140,2 ($\text{CH}_3\text{CH}=\text{C}$); m/z (EI^+), 232,2 (22 %, M^+), 203,2 (8, $[\text{M}-\text{Et}]^+$), 189,2 (100, $[\text{M}-(\text{CH}_3)_2\text{CH}]^+$), 175,2 (2), 161,1 (11), 147,1 (30), 133,1 (31), 119,1 (33), 105,1 (25), 91,1 (29), 79,1 (18), 67,1 (7), 55,1 (4).

20 B. Preparación de (S)-15-metilgermacreno D (If)

El compuesto del título se produjo de manera similar al **Compuesto (Ig)**. 15-metil-FDP (If) (19 mg, concentración final 0,40 mM) e Y406F-GDS-His₆ (concentración final 12 μM) se mezclaron en tampón de incubación (20 mM Tris, 5 mM βME y 10 mM MgCl_2 , pH 7,5, glicerol al 10 % para GDS, volumen final de 200 ml) cubierto con pentano (10 ml).

- 25 La mezcla se agitó suavemente durante 5 días a temperatura ambiente y luego la capa acuosa separada se extrajo a fondo con porciones adicionales de pentano hasta que GCMS no pudo detectar ningún producto. Los extractos de pentano reunidos se concentraron a sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía preparativa de capa fina sobre gel de sílice impregnado con AgNO_3 al 1 %, eluyendo con acetona al 5 % en pentano. El compuesto del título se aisló como un aceite incoloro (8 mg, 45 %). HRMS (m/z , EI^+) calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{28}$ 232,2191; resultado 232,2191; δ_{H} (600 MHz, CDCl_3) 0,72 - 0,80 (3 H, m, $(\text{CH}_3)_2\text{CHCHCH}_2$), 0,83 (3 H, d, $J = 7,0$ Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 0,90 (3 H, d, $J = 7,0$ Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 1,56 (3 H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}$), 1,71 (3 H, d, $J = 7,0$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}=\text{C}$), 1,95-2,05, 2,16-2,18, 2,21-2,25, 2,30-2,37 y 2,52-2,54 (7 H, m, CH alílicos), 5,14-5,18 (2 H, m, $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CCH}=\text{CH}$ y $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}$), 5,42 (1 H, q, $J = 7,0$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}=\text{C}$), 5,76 (1 H, d, $J = 6,0$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CCH}=\text{CH}$); m/z (EI^+), 218,2 (28 %, M^+), 203,2 (10, $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$), 189,2 (9), 175,1 (100), 143,1 (18), 133,1 (20), 119,1 (22), 105,1 (25), 91,1 (20), 79,1 (10), 67,1 (4), 55,1 (3).

Ejemplo 3

40 Electrofisiología

Los registros del electroantenograma (EAG) se realizaron utilizando electrodos de vidrio de Ag-AgCl rellenos con solución salina [composición como en Maddrell y col., J. Exp. Biol. 51, 71 (1969) pero sin glucosa]. Se cortó la cabeza de un áfido de grano virginoparoso alado, *Sitobion avenae*, y se colocó dentro del electrodo indiferente y las

45 puntas de ambas antenas se retiraron antes de insertarse en el electrodo de registro. Las señales se pasaron a través de un amplificador de alta impedancia (UN-06, Syntech, Hilversum, Países Bajos) y se analizaron utilizando un paquete de software personalizado (Syntech).

- El sistema de electrofisiología y cromatografía de gases acoplados (GC-EAG), donde el efluente de la columna GC se dirige simultáneamente a la preparación de la antena y al detector GC, se ha descrito anteriormente (Wadhams, The use of Coupled Gas Chromatography Electrophysiological Techniques in the Identification of Insect Pheromones. Chromatographic Society Symposium, Reading, Inglaterra, Reino Unido, 21 al 23 de marzo de 1989, XIV+376P, Plenum Press: Nueva York, EE. UU., páginas 289-298 (1990)). La separación del análogo de
- 50 germacreno D requerido y cualquier contaminante presente en la muestra se logró en un Agilent® 6890 GC equipado con una entrada de columna fría y un FID, utilizando una columna HP-1 (50 mx 0,32 mm, DO x 0,52 μm , espesor de fase) con helio como gas portador (caudal de 2,5 ml/min). La temperatura del horno se mantuvo a 30 °C durante 2 minutos y luego se incrementó a 15 °/minuto a 250 °C.

- Los resultados del amplificador EAG y el FID se controlaron simultáneamente y se analizaron utilizando el paquete
- 60 de software Syntech. Los picos que se eluyen de la columna de GC se consideraron activos si provocaron la

actividad de EAG en tres o más ejecuciones acopladas.

Ensayo de comportamiento

- 5 Las respuestas de los áfidos de grano individuales, *Sitobion avenae*, a los compuestos de prueba se observaron utilizando un olfatómetro de cuatro brazos Perspex (Pettersson, J.; Ent. Scand. 1, 63-73 (1970); Webster, B., y col. Animal Behav. 79, 451-457 (2010)), que se mantuvo a 23 °C y se encendió desde arriba. Se colocó un disco de papel de filtro en la sección inferior del olfatómetro para proporcionar tracción al pulgón y las secciones media y superior se ajustaron en su lugar de forma muy apretada para obtener un buen sellado. Los cuatro brazos, que
- 10 consisten en los barriles de jeringas desechables de 10 ml (Plastipak), se ajustaron firmemente en los orificios de la sección central, y se filtró aire a través de ellos y al cuerpo del olfactómetro a través de un tubo insertado en un orificio en el centro de la sección superior y unido a una bomba. El caudal total medido fue de 200 ml/min y se asumió que el caudal a través de cada brazo fue de 50 ml/min. Cada uno de los tres brazos de control contenía una tira de papel de filtro a la que se había aplicado 10 μ L hexano que se había dejado evaporar durante 30 s. El brazo
- 15 de tratamiento contenía una tira de papel de filtro a la que se había aplicado el compuesto de prueba en 10 μ L de hexano (20 - 200 ng μ L⁻¹), dejando reposar durante 30 s para que el hexano se evaporara. Se introdujo un solo áfido a través del orificio central y el tubo de succión se volvió a introducir rápidamente. Se registró el tiempo empleado en cada brazo y en la zona central utilizando un software especializado (OLFA, Udine, Italia), durante los siguientes 16 minutos. El olfatómetro se giró 90 ° cada 2 minutos para eliminar cualquier sesgo direccional. Cada ensayo
- 20 comprendió 10 réplicas y el tiempo medio empleado en los brazos tratados y de control se comparó utilizando una prueba *t*-pareada (Genstat).

En la tabla 5 a continuación se muestran los resultados para compuestos y compuestos comparadores de fórmula (I) junto con (R)-germacreno D (III) y germacrano (IV).

25

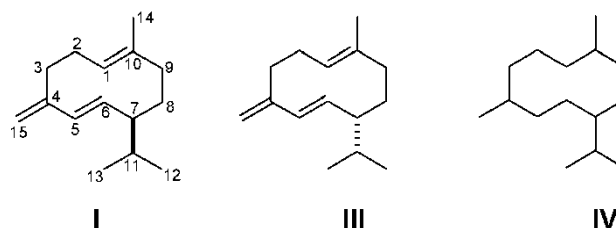


Tabla 5. Respuesta del comportamiento de los áfidos del cereal, *Sitobion avenae*, a los análogos del germacreno D utilizando un olfatómetro de 4 vías

Compuesto	Dosificación (μ g)	Tiempo (min.) empleado en: -		Significado (p)
		Brazos de control (media de 3)	Brazo de tratamiento	
(S)-(-)-germacreno D (Ia)*	0,2	2,31 (0,26)	1,14 (0,25)	0,005
	1,0	2,67 (0,190)	1,63 (0,35)	0,007
	2,0	2,29 (0,41)	0,50 (0,14)	0,012
(S)-1-fluorogermacreno D (Ih)*	1,0	2,54 (0,27)	2,62 (0,50)	0,447
	2,0	2,60 (0,26)	2,46 (0,39)	0,402
(S)-12-metilgermacreno D (Ib)*	0,9	2,21 (0,42)	1,20 (0,24)	0,039
	1,2	2,66 (0,17)	2,13 (0,25)	0,075
(S)-14-metilgermacreno D (Ic)*	0,2	2,21 (0,27)	2,41 (0,73)	0,409
	1,0	2,61 (0,28)	3,27 (0,68)	0,225
	2,0	2,01 (0,23)	1,65 (0,39)	0,209
(S)-15-metilgermacreno D (If)*	0,8	2,61 (0,26)	1,38 (0,38)	0,008
	1,0	2,52 (0,23)	1,92 (0,31)	0,094
(S)-14,15-dimetilgermacreno D (Ig)*	0,8	2,60 (0,22)	3,38 (0,38)	0,069
	1,0	2,27 (0,11)	2,77 (0,31)	0,052
	1,0	2,39 (0,20)	2,97 (0,40)	0,032

	1,2	1,96 (0,21)	2,92 (0,23)	0,001
(R)-(+)-germacreno D (III)	1,0	2,57 (0,19)	3,15 (0,53)	0,447
	2,0	1,86 (0,29)	2,65 (0,52)	0,108
germacrano (IV)	1,0	2,45 (0,30)	2,04 (0,58)	0,265
	2,0	2,39 (0,24)	2,38 (0,50)	0,485

* Análogo preparado a partir de FDP utilizando GDS.

Los datos se registraron como tiempo medio ($\pm$ SE) empleado en el control (solo disolvente) o en los brazos de tratamiento y se analizaron utilizando la prueba T de Students.

5 Ejemplo 4: Análisis mediante GC-MS

Los cromatogramas de gases para los productos aislados a partir de la rotación de difosfato de 14-metilfenosilo, difosfato de 14 fluorofarnesilo, difosfato de 15 fluorofarnesilo y difosfato de 6 fluorofarnesilo fueron los publicados previamente (Cascón y col. Chem. Commun., 48, 9702-9704 (2012),..

10

LISTA DE SECUENCIAS

<110> University College Cardiff Consultants Limited

15 Rothamsted Research

Pickett, John A

Birkett, Michael

Miller, David

Allemann, Rudolf

20

<120> Ligandos olfativos

<130> 0184P/GB

25 <150> GB1500348.6

<151> 2014-01-09

<160> 29

30 <170> Versión 3.5 de la patente

<210> 1

<211> 550

<212> PRT

35 <213> Solidago canadensis

<400> 1

Met Ala Ala Lys Gln Gly Glu Val Val Arg Pro Asp Ala Asp Tyr Ser

1 5 10 15

40

Tyr His Pro Ser Leu Trp Gly Asp Gln Phe Leu His Tyr Asp Glu Gln

20 25 30

ES 2 732 449 T3

Glu Asp Asp Gln Val Glu Val Asp Gln Gln Ile Glu Ile Leu Lys Glu
35 40 45

Glu Thr Arg Arg Glu Ile Leu Ser Ser Leu Asp Asp Pro Ala Lys His
50 55 60

Thr Asn Leu Leu Lys Leu Ile Asp Val Ile Gln Arg Leu Gly Ile Ala
65 70 75 80

Tyr Tyr Phe Glu His Glu Ile Thr Gln Ala Leu Asp His Ile Tyr Asn
85 90 95

Val Tyr Gly Asp Glu Trp Asn Gly Gly Ser Thr Ser Leu Trp Phe Arg
100 105 110

5

Leu Leu Arg Gln Gln Gly Phe Tyr Val Ser Cys Asp Ile Phe Asn Ile
115 120 125

Tyr Lys Leu Asp Asn Gly Ser Phe Lys Asp Ser Leu Thr Lys Asp Ile
130 135 140

Glu Cys Met Leu Glu Leu Tyr Glu Ala Ala Tyr Met Arg Val Gln Gly
145 150 155 160

Glu Ile Ile Leu Asp Glu Ala Leu Glu Phe Thr Lys Thr His Leu Glu
165 170 175

10

Gln Ile Ala Lys Asp Pro Leu Arg Cys Asn Asn Thr Leu Ser Arg His

ES 2 732 449 T3

180 185 190

Ile Tyr Glu Ala Leu Lys Arg Pro Ile Arg Lys Arg Leu Pro Arg Val

195 200 205

Asp Ala Leu Gln Tyr Met Pro Phe Tyr Glu Gln Gln Asp Ser His Asn

210 215 220

Lys Ser Leu Leu Arg Leu Ala Lys Leu Gly Phe Asn Arg Leu Gln Ser

225 230 235 240

Leu His Lys Lys Glu Leu Ser Gln Leu Ser Lys Trp Trp Lys Glu Phe

245 250 255

Asp Ala Pro Lys Asn Leu Arg Tyr Val Arg Asp Arg Leu Val Glu Leu

260 265 270

Tyr Phe Trp Val Leu Gly Val Tyr Phe Glu Pro Gln Tyr Ser Arg Ser

275 280 285

Arg Ile Phe Leu Thr Lys Val Ile Lys Met Ala Thr Ile Leu Asp Asp

290 295 300

Thr Tyr Asp Ile His Gly Thr Tyr Glu Glu Leu Glu Ile Phe Thr Lys

305 310 315 320

Ala Val Gln Arg Trp Ser Ile Thr Cys Met Asp Thr Leu Pro Asp Tyr

325 330 335

5

10

Met Lys Met Ile Tyr Lys Ser Leu Leu Asp Val Tyr Glu Glu Met Glu
340 345 350

Glu Ile Ile Glu Lys Asp Gly Lys Ala Tyr Gln Val His Tyr Ala Lys
355 360 365

Asp Ser Met Ile Asp Leu Val Thr Ser Tyr Met Thr Glu Ala Lys Trp
370 375 380

Leu His Glu Gly His Val Pro Thr Phe Glu Glu Tyr Asn Ser Ile Thr
385 390 395 400

5

Asn Leu Thr Gly Gly Tyr Lys Met Leu Thr Thr Ser Ser Phe Val Asp
405 410 415

Met Pro Gly Asp Ile Val Thr Gln Glu Ser Phe Arg Trp Ala Leu Asn
420 425 430

Asn Pro Pro Leu Ile Lys Ala Ser Ala Asp Val Ser Arg Ile Met Asp
435 440 445

Asp Ile Val Gly His Lys Glu Glu Gln Gln Arg Lys His Leu Pro Ser
450 455 460

Arg Val Glu Met Tyr Met Lys Lys Tyr His Leu Ala Glu Glu Asp Val
465 470 475 480

10

Tyr Asp Leu Leu Lys Gln Arg Val Glu Asp Ala Trp Lys Asp Leu Asn
485 490 495

Arg Glu Thr Leu Thr Cys Lys Asp Ile His Met Ala Leu Lys Met Arg
500 505 510

Pro Ile Asn Leu Ala Arg Val Ile Asp Met Leu Tyr Lys Asn Asp Asp
515 520 525

Asn Leu Lys Asn Val Gly Gln Glu Ile Gln Asp Tyr Ile Lys Ser Cys
530 535 540

Phe Ile Asn Ala Ile Ser

5 545 550

<210> 2
<211> 39
<212> ADN

10 <213> Solidago canadensis

<400> 2
ctggtagagc tgtactttgc ggtactgggc gtttatttc 39

15 <210> 3
<211> 39
<212> ADN
<213> Solidago canadensis

20 <400> 3
gaaataaacg ccagtagcg caaagtagc ctctaccag 39

<210> 4
<211> 39
25 <212> ADN
<213> Solidago canadensis

<400> 4
ctggtagagc tgtactttct ggtactgggc gtttatttc 39

30 <210> 5
<211> 39
<212> ADN
<213> Solidago canadensis

35 <400> 5
gaaataaacg ccagtagca gaaagtagc ctctaccag 39

<210> 6
 <211> 37
 <212> AND
 <213> Solidago canadensis
 5
 <400> 6
 ggtagagctg tacttttctg tactgggcgt ttatttc 37
 <210> 7
 10 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis
 <400> 7
 15 gaaataaacg cccagtacga aaaagtacag ctctacc 37
 <210> 8
 <211> 35
 <212> ADN
 20 <213> Solidago canadensis
 <400> 8
 cgtgatcgac atgctggcga agaatacgca caacc 35
 25 <210> 9
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis
 30 <400> 9
 ggtgtcgtc attcttcgcc agcatgtcga tcacg 35
 <210> 10
 <211> 36
 35 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis
 <400> 10
 40 gcgtgatcga catgctgctg aagaatgacg acaacc 36
 <210> 11
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis
 45 <400> 11
 ggtgtcgtc attcttcagc agcatgtcga tcacgc 36
 <210> 12
 50 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis
 <400> 12
 55 gtgatcgaca tgctgtcaa gaatgacgac aac 33
 <210> 13
 <211> 33
 <212> ADN
 60 <213> Solidago canadensis

<400> 13
 gttgtcgtca ttctgaaca gcatgtcgat cac 33
 5 <210> 14
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis
 10 <400> 14
 gaatctgacg ggtggcagca aaatgctgac gacg 34
 <210> 15
 <211> 34
 15 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis
 <400> 15
 cgtcgtcagc attttgctgc caccgctcag attc 34
 20 <210> 16
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis
 25 <400> 16
 gaatctgacg ggtggcggca aaatgctgac gacg 34
 <210> 17
 30 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis
 <400> 17
 35 cgtcgtcagc attttgccgc caccgctcag attc 34
 <210> 18
 <211> 34
 <212> ADN
 40 <213> Solidago canadensis
 <400> 18
 gaatctgacg ggtggcgcga aaatgctgac gacg 34
 45 <210> 19
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis
 50 <400> 19
 cgtcgtcagc attttcgcgc caccgctcag attc 34
 <210> 20
 <211> 34
 55 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis
 <400> 20
 60 gaatctgacg ggtggcgtga aaatgctgac gacg 34

<210> 21
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis
 5
 <400> 21
 cgctgctcagc attttcacgc caccgctcag attc 34
 <210> 22
 10 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis
 <400> 22
 15 gaatctgacg ggtggcatta aaatgctgac gacg 34
 <210> 23
 <211> 34
 <212> ADN
 20 <213> Solidago canadensis
 <400> 23
 cgctgctcagc attttaatgc caccgctcag attc 34
 25 <210> 24
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis
 30 <400> 24
 gaatctgacg ggtggcctga aaatgctgac gacg 34
 <210> 25
 <211> 34
 35 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis
 <400> 25
 40 cgctgctcagc attttcaggc caccgctcag attc 34
 <210> 26
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis
 45 <400> 26
 gaatctgacg ggtggcttta aaatgctgac gacg 34
 <210> 27
 50 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis
 <400> 27
 55 cgctgctcagc attttaagc caccgctcag attc 34
 <210> 28
 <211> 29
 <212> ADN
 60 <213> Solidago canadensis

<

400> 28

ctgacgggtg gctggaaaat gctgacgac 29

5 <210> 29

<211> 29

<212> ADN

<213> Solidago canadensis

10 <400> 29

gtcgtcagca tttccagcc acccgtcag 29

LISTA DE SECUENCIAS

15 <110> University College Cardiff Consultants Limited Research Rothamsted Pickett, John A Birkett, Michael Miller, David Allemann, Rudolf

<120> Ligandos olfativos

20 <130> 0184P/GB

<150> GB1500348.6

<151> 2014-01-09

25 <160> 29

<170> Versión 3.5 de la patente

<210> 1

30 <211> 550

<212> PRT

<213> Solidago canadensis

<400> 1

ES 2 732 449 T3

Met Ala Ala Lys Gln Gly Glu Val Val Arg Pro Asp Ala Asp Tyr Ser
1 5 10 15

Tyr His Pro Ser Leu Trp Gly Asp Gln Phe Leu His Tyr Asp Glu Gln
20 25 30

Glu Asp Asp Gln Val Glu Val Asp Gln Gln Ile Glu Ile Leu Lys Glu
35 40 45

Glu Thr Arg Arg Glu Ile Leu Ser Ser Leu Asp Asp Pro Ala Lys His
50 55 60

Thr Asn Leu Leu Lys Leu Ile Asp Val Ile Gln Arg Leu Gly Ile Ala
65 70 75 80

Tyr Tyr Phe Glu His Glu Ile Thr Gln Ala Leu Asp His Ile Tyr Asn
85 90 95

Val Tyr Gly Asp Glu Trp Asn Gly Gly Ser Thr Ser Leu Trp Phe Arg
100 105 110

Leu Leu Arg Gln Gln Gly Phe Tyr Val Ser Cys Asp Ile Phe Asn Ile
115 120 125

Tyr Lys Leu Asp Asn Gly Ser Phe Lys Asp Ser Leu Thr Lys Asp Ile
130 135 140

5

10

ES 2 732 449 T3

Glu Cys Met Leu Glu Leu Tyr Glu Ala Ala Tyr Met Arg Val Gln Gly
 145 150 155 160
 Glu Ile Ile Leu Asp Glu Ala Leu Glu Phe Thr Lys Thr His Leu Glu
 165 170 175
 Gln Ile Ala Lys Asp Pro Leu Arg Cys Asn Asn Thr Leu Ser Arg His
 180 185 190
 Ile Tyr Glu Ala Leu Lys Arg Pro Ile Arg Lys Arg Leu Pro Arg Val
 195 200 205
 Asp Ala Leu Gln Tyr Met Pro Phe Tyr Glu Gln Gln Asp Ser His Asn
 210 215 220
 Lys Ser Leu Leu Arg Leu Ala Lys Leu Gly Phe Asn Arg Leu Gln Ser
 225 230 235 240
 Leu His Lys Lys Glu Leu Ser Gln Leu Ser Lys Trp Trp Lys Glu Phe
 245 250 255
 Asp Ala Pro Lys Asn Leu Arg Tyr Val Arg Asp Arg Leu Val Glu Leu
 260 265 270
 Tyr Phe Trp Val Leu Gly Val Tyr Phe Glu Pro Gln Tyr Ser Arg Ser
 275 280 285
 Arg Ile Phe Leu Thr Lys Val Ile Lys Met Ala Thr Ile Leu Asp Asp
 290 295 300
 Thr Tyr Asp Ile His Gly Thr Tyr Glu Glu Leu Glu Ile Phe Thr Lys
 305 310 315 320
 Ala Val Gln Arg Trp Ser Ile Thr Cys Met Asp Thr Leu Pro Asp Tyr
 325 330 335
 Met Lys Met Ile Tyr Lys Ser Leu Leu Asp Val Tyr Glu Glu Met Glu
 340 345 350
 Glu Ile Ile Glu Lys Asp Gly Lys Ala Tyr Gln Val His Tyr Ala Lys
 355 360 365
 Asp Ser Met Ile Asp Leu Val Thr Ser Tyr Met Thr Glu Ala Lys Trp
 370 375 380
 Leu His Glu Gly His Val Pro Thr Phe Glu Glu Tyr Asn Ser Ile Thr
 385 390 395 400

5

10

15

Asn Leu Thr Gly Gly Tyr Lys Met Leu Thr Thr Ser Ser Phe Val Asp
405 410 415

Met Pro Gly Asp Ile Val Thr Gln Glu Ser Phe Arg Trp Ala Leu Asn
420 425 430

Asn Pro Pro Leu Ile Lys Ala Ser Ala Asp Val Ser Arg Ile Met Asp
435 440 445

Asp Ile Val Gly His Lys Glu Glu Gln Gln Arg Lys His Leu Pro Ser
450 455 460

Arg Val Glu Met Tyr Met Lys Lys Tyr His Leu Ala Glu Glu Asp Val
465 470 475 480

Tyr Asp Leu Leu Lys Gln Arg Val Glu Asp Ala Trp Lys Asp Leu Asn
485 490 495

Arg Glu Thr Leu Thr Cys Lys Asp Ile His Met Ala Leu Lys Met Arg
500 505 510

Pro Ile Asn Leu Ala Arg Val Ile Asp Met Leu Tyr Lys Asn Asp Asp
515 520 525

Asn Leu Lys Asn Val Gly Gln Glu Ile Gln Asp Tyr Ile Lys Ser Cys
530 535 540

Phe Ile Asn Ala Ile Ser
545 550

5

10

<210> 2
<211> 39
<212> ADN

15 <213> Solidago canadensis

<400> 2
ctggtagagc tgtactttgc ggtactgggc gtttatttc 39

20 <210> 3
<211> 39
<212> ADN
<213> Solidago canadensis

25 <400> 3
gaaataaacg cccagtaccg caaagtacag ctctaccag 39

<210> 4
<211> 39
30 <212> ADN
<213> Solidago canadensis

<400> 4
ctggtagagc tgtactttct ggtactgggc gtttatttc 39

<210> 5
 <211> 39
 <212> ADN
 5 <213> Solidago canadensis

 <400> 5
 gaaataaacg cccagtacca gaaagtacag ctctaccag 39

 10 <210> 6
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis

 15 <400> 6
 ggtagagctg tacttttcg tactgggcgt ttatttc 37

 <210> 7
 <211> 37
 20 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis

 <400> 7
 gaaataaacg cccagtacga aaaagtacag ctctacc 37
 25
 <210> 8
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis
 30
 <400> 8
 cgtgatcgac atgctggcga agaattgacga caacc 35

 <210> 9
 35 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis

 <400> 9
 40 ggtgtcgtc attcttcgcc agcatgtcga tcacg 35

 <210> 10
 <211> 36
 <212> ADN
 45 <213> Solidago canadensis

 <400> 10
 gcgtgatcga catgctgctg aagaattgacg acaacc 36

 50 <210> 11
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis

 55 <400> 11
 ggtgtcgtc attcttcagc agcatgtcga tcacgc 36

 <210> 12
 <211> 33
 60 <212> ADN

<213> Solidago canadensis

<400> 12
 gtgatcgaca tgctgttcaa gaatgacgac aac 33

5 <210> 13
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis

10 <400> 13
 gttgtcgtca ttctgaaca gcatgtcgat cac 33

<210> 14

15 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis

<400> 14

20 gaatctgacg ggtggcagca aaatgctgac gacg 34

<210> 15
 <211> 34
 <212> ADN

25 <213> Solidago canadensis

<400> 15
 cgtcgtcagc attttgctgc caccgctcag attc 34

30 <210> 16
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis

35 <400> 16
 gaatctgacg ggtggcggca aaatgctgac gacg 34

<210> 17
 <211> 34

40 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis

<400> 17
 cgtcgtcagc atttgccgc caccgctcag attc 34

45 <210> 18
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis

50 <400> 18
 gaatctgacg ggtggcgcga aaatgctgac gacg 34

<210> 19

55 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis

<400> 19

60 cgtcgtcagc attttcgcgc caccgctcag attc 34

<210> 20
 <211> 34
 <212> ADN
 5 <213> Solidago canadensis

 <400> 20
 gaatctgacg ggtggcgtga aaatgctgac gacg 34

 10 <210> 21
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis

 15 <400> 21
 cgtcgtcagc attttcacgc caccgctcag attc 34

 <210> 22
 <211> 34
 20 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis

 <400> 22
 gaatctgacg ggtggcatta aaatgctgac gacg 34
 25
 <210> 23
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis
 30
 <400> 23
 cgtcgtcagc attttaatgc caccgctcag attc 34

 <210> 24
 35 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis

 <400> 24
 40 gaatctgacg ggtggcctga aaatgctgac gacg 34

 <210> 25
 <211> 34
 <212> ADN
 45 <213> Solidago canadensis

 <400> 25
 cgtcgtcagc attttcaggc caccgctcag attc 34

 50 <210> 26
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Solidago canadensis

 55 <400> 26
 gaatctgacg ggtggcttta aaatgctgac gacg 34

 <210> 27
 <211> 34
 60 <212> ADN

<213> Solidago canadensis

<400> 27

cgctcgtcagc attttaaagc caccgcgtcag attc 34

5

<210> 28

<211> 29

<212> ADN

<213> Solidago canadensis

10

<400> 28

ctgacgggtg gctggaaaat gctgacgac 29

<210> 29

15

<211> 29

<212> ADN

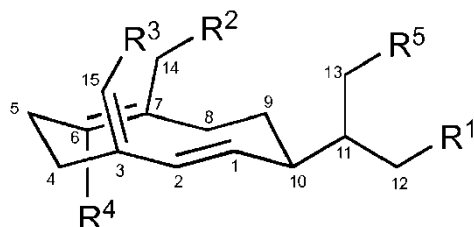
<213> Solidago canadensis

<400> 29

20 gtcgtcagca tttccagcc acccgtcag 29

REIVINDICACIONES

1. Análogo de A (S)-germacreno D de fórmula general (I):



5 (I)

donde

- R¹ es H, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo o ciclopropilo;
 10 R² es H, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo o ciclopropilo;
 R³ es metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo o ciclopropilo;
 R⁴ es H, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo o ciclopropilo;
 R⁵ es H, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo o ciclopropilo.

- 15 2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el cual, independientemente, o en cualquier combinación:

- R¹ es H, metilo o etilo;
 R² es H, metilo o etilo;
 R³ es metilo o etilo;
 20 R⁴ es H, metilo o etilo;
 R⁵ es H, metilo o etilo.

3. Un compuesto, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el cual:

- 25 cada R¹, R² y R⁴ es H;
 R³ es metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo o ciclopropilo; y
 R⁵ es H, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo o ciclopropilo.

4. Un compuesto según la reivindicación 3, en el cual R⁵ es H.

30

5. Un compuesto según la reivindicación 4, que es (S)-15-metilgermacreno D.

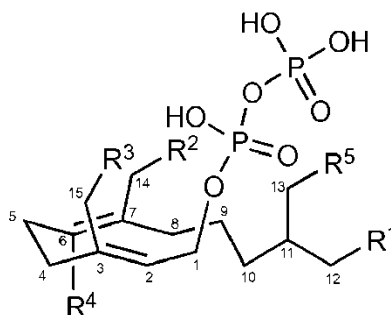
6. Un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde cada R², R³ y R⁵ es, independientemente, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo o ciclopropilo y cada R¹ y R⁴ es H;

35

7. Un compuesto según la reivindicación 6, en el cual R⁵ es H.

8. Un compuesto según la reivindicación 7, que es ((S)-14,15-dimetilgermacreno D.

- 40 9. Un procedimiento para la preparación de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, procedimiento que comprende incubar un análogo de farnesilfosfato de fórmula general (II):



(II)

donde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y R^5 son como se define en la fórmula general (I);
o una sal de estos;

5 con germacreno D sintasa (GDS).

10. Un procedimiento según la reivindicación 9, donde la germacreno D sintasa es un polipéptido recombinante de (S)-germacreno D sintasa.

10 11. Un procedimiento según la reivindicación 10, donde la GDS recombinante comprende una secuencia de etiqueta en el extremo N o C, en particular una etiqueta de polihistidina.

12. Un procedimiento según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, donde la GDS comprende una etiqueta de polihistidina C-terminal, por ejemplo una etiqueta de hexahistidina.

15 13. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, donde la GDS es germacreno D sintasa nativa de *Solidago canadensis* SEC. ID N°:1.

14. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, donde la GDS es germacreno D
20 sintasa nativa, por ejemplo *Solidago canadensis* SEC. ID. N°:1, que tiene una o más de las siguientes modificaciones:

residuo de tirosina en la posición 406 reemplazado por fenilalanina, leucina, isoleucina, valina o alanina;
residuo de triptófano en la posición 275 reemplazado por fenilalanina, leucina, isoleucina, valina o alanina, pero
25 especialmente por fenilalanina;
residuo de tirosina en la posición 524 reemplazado por fenilalanina, leucina, isoleucina, valina o alanina, pero especialmente por fenilalanina.

15. Un procedimiento según la reivindicación 14, donde la GDS tiene uno o más de tirosina en la posición
30 406, triptófano en la posición 275 de la tirosina en la posición 524 reemplazada por fenilalanina.

16. Un polipéptido GDS modificado de *Solidago canadensis* SEC. ID. N°:1 que comprende una germacreno D sintasa nativa, que tiene una o más de las siguientes modificaciones:

35 residuo de tirosina en la posición 406 reemplazado por fenilalanina, leucina, isoleucina, valina o alanina;
residuo de triptófano en la posición 275 reemplazado por fenilalanina, leucina, isoleucina, valina o alanina, pero especialmente por fenilalanina;
residuo de tirosina en la posición 524 reemplazado por fenilalanina, leucina, isoleucina, valina o alanina, pero especialmente por fenilalanina.

40 17. Un polipéptido de GDS según la reivindicación 16, donde la GDS tiene uno o más de tirosina en la posición 406, triptófano en la posición 275 de la tirosina en la posición 524 reemplazada por fenilalanina.

18. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido GDS modificado según la reivindicación
45 16 o la reivindicación 17.

19. Un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 18.

20. Una célula transfectada o transformada con una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 18 o un vector según la reivindicación 19.
21. Una composición repelente de insectos que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un conductor adecuado, siempre que el compuesto de fórmula general (I) no sea (S)-14,15-dimetilgermacreno D (es decir, el compuesto de fórmula general (I) en el cual R² es metilo).
22. Una composición repelente de insectos según la reivindicación 21, donde el compuesto de fórmula general (I) es un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5.
23. Una composición repelente de insectos según la reivindicación 21 o la reivindicación 22, que comprende además uno o más compuestos repelentes de insectos por adición, por ejemplo aletrinas, DEET (N, N-dietil-m-toluamida), p-mentano-3,8-diol (PMD), picaridina, Bayrepel, KBR 3023, nepetalactona, aceite de citronela, aceite de Neem, mirto de pantano, carbato de dimetilo, éter triciclodecenil alílico, IR3535 (ácido 3- [N-butil-N-acetil] -aminopropiónico, éster etílico) o repelentes de insectos basados en antranilato.
24. Un repelente de insectos según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, que comprende un portador adecuado para su aplicación a seres humanos o animales.
25. Una composición atrayente de insectos que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 6 a 8 y un portador adecuado, siempre que el compuesto no sea (S)-15-metilgermacreno D (es decir, el compuesto de fórmula general (I) en el cual R² es hidrógeno).
26. Una composición atrayente de insectos según la reivindicación 25, donde el compuesto de fórmula general (I) es (S)-14, 15-dimetilgermacreno D.
27. Una composición atrayente de insectos según la reivindicación 25 o la reivindicación 26, que comprende además un insecticida.
28. Una composición atrayente de insectos según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, que comprende además un medio de liberación controlada seleccionado del grupo que consiste en caucho, polietileno, fibras huecas, emparedados de plástico, membranas plásticas y materiales celulósicos, de modo que el atrayente se libera durante un período de días a una concentración efectiva para atraer a los insectos.
29. Un dispositivo para atrapar insectos que comprende una composición atrayente de insectos según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28.
30. Una composición repelente o atrayente de insectos según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 28 para su uso en el tratamiento de infestaciones de insectos en animales o plantas.
31. Un procedimiento para repeler insectos que comprende proporcionar una composición repelente de insectos según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24 en una zona afectada por la infestación de insectos.
32. Un procedimiento para atraer insectos que comprende proporcionar una composición atrayente de insectos según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28 en una zona afectada por la infestación de insectos.

Figura 1.

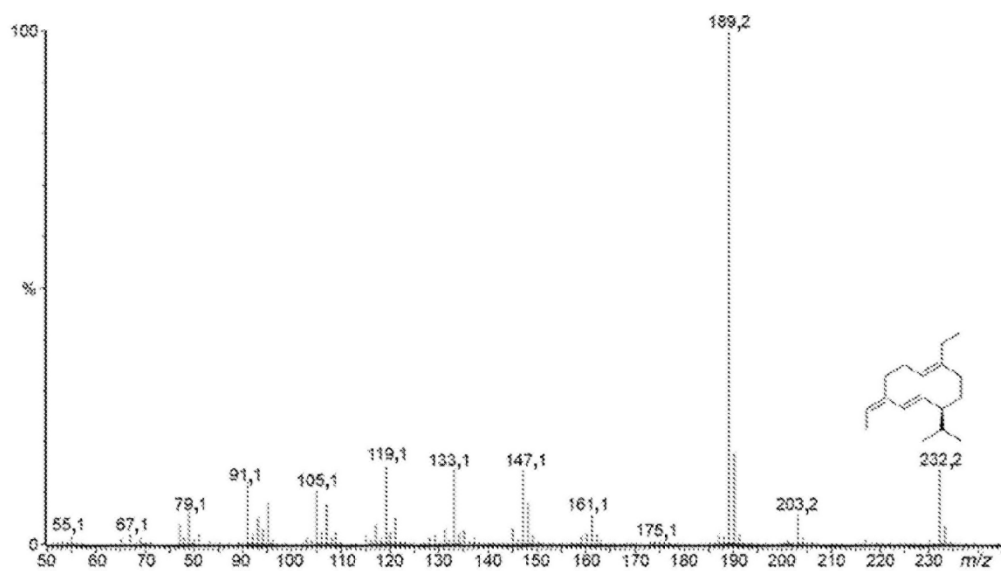


Figura 2.

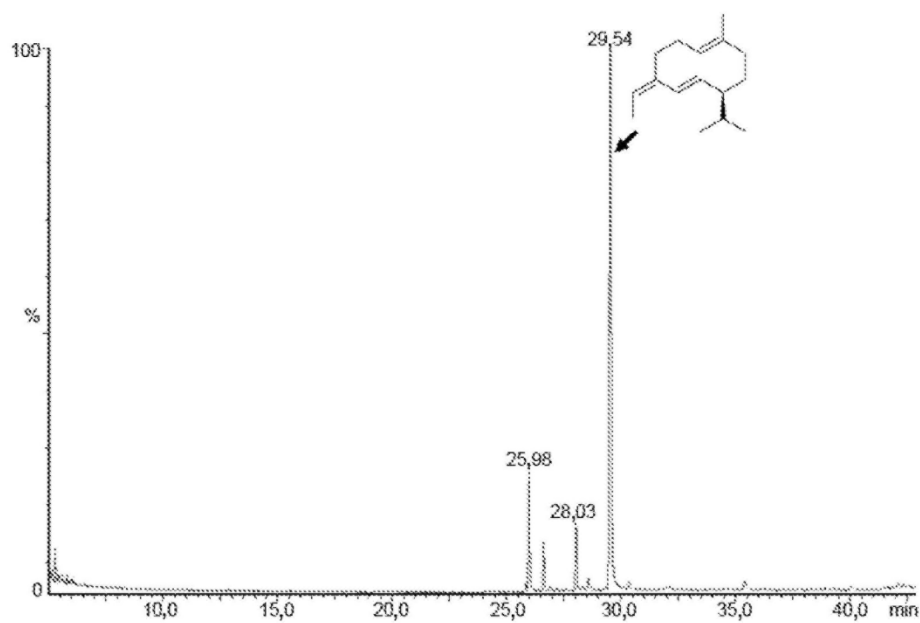


Figura 3.

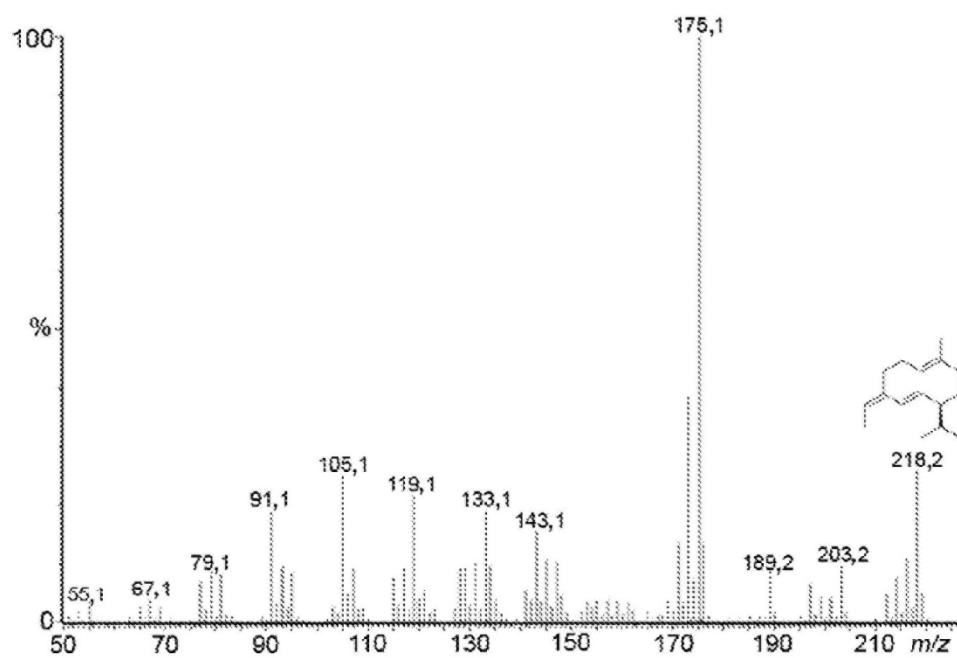


Figura 4.

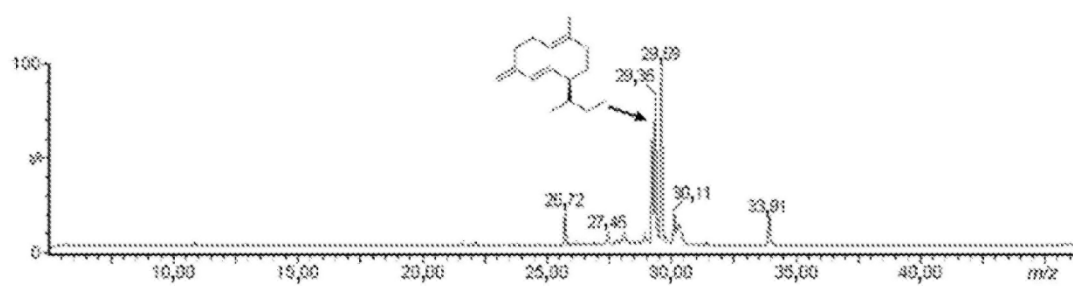


Figura 5.

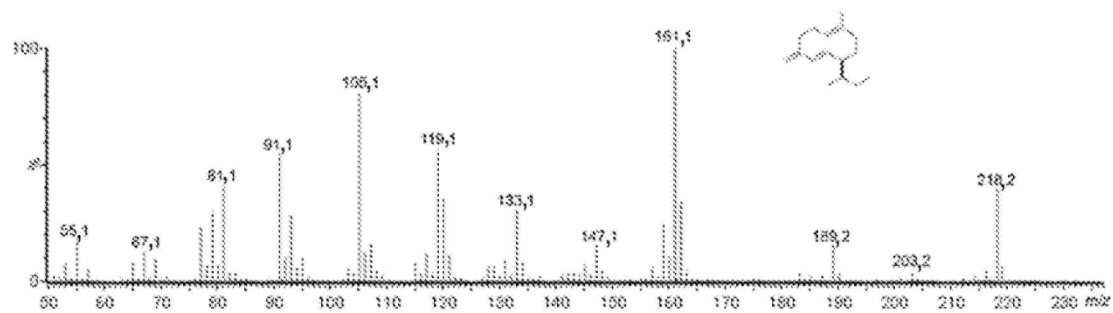


Figura 6.

