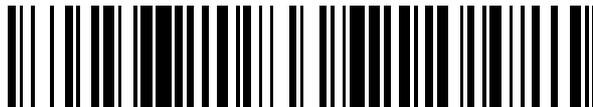


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 736**

51 Int. Cl.:

A01N 37/46 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

C07K 14/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2008 E 08846851 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2214494**

54 Título: **Raticida**

30 Prioridad:

08.11.2007 GB 0721937

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

15.04.2016

73 Titular/es:

**THE SECRETARY OF STATE FOR DEFENCE
(100.0%)**

**DSTL, Porton Down
Salisbury, Wiltshire SP4 0JQ, GB**

72 Inventor/es:

**OYSTON, PETRA CLAIRE FARQUHAR y
CLARK, GRAEME CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 566 736 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

Raticida.

Antecedentes

5 Esta invención se refiere a nuevos raticidas, métodos para matar los roedores y métodos para la fabricación de nuevos raticidas.

Hace tiempo que se ha considerado que los roedores plantean un serio problema para la salud humana, las propiedades y los cultivos. Se sabe que la rata, por sí sola, transporta unas 70 enfermedades, muchas de las cuales son transmisibles a los seres humanos, entre las que se incluyen la peste bubónica, el tifus y la leptospirosis. Sin embargo, los agricultores se esfuerzan en proteger sus cultivos de los roedores y se ha estimado que probablemente el 10% del suministro mundial de alimentos es consumido o dañado por las ratas.

10 Los gobiernos de los países desarrollados y en vías desarrollo están preocupados porque el riesgo de roedores ha aumentado significativamente en los últimos años dada la reciente explosión de la población de roedores, trabajando sobre la premisa de que el aumento del número de roedores significa un mayor riesgo para los seres humanos procedente de este tipo de roedores. Se cree que la explosión de la población de roedores es la culminación de diversos factores tales como el aumento del número de inviernos benignos y húmedos, el aumento de la disponibilidad de basura de alimentos en las ciudades, y el aumento de la incidencia de resistencia de los roedores a los raticidas conocidos.

15 Por tanto nunca ha sido mayor la necesidad de nuevos raticidas y métodos para matar roedores. La presente invención proporciona una nueva clase de raticida.

20 Los raticidas conocidos tienden a ser clasificados como agudos o crónicos basándose en su modo de acción. El tipo crónico, conocido comúnmente como anticoagulantes, domina el mercado del control de plagas, perteneciendo a este grupo aproximadamente el 95% de todos los raticidas utilizados. La warfarina es uno de estos anticoagulantes.

25 La resistencia de los roedores a los anticoagulantes está aumentando. Como resultado de ello, han de ser utilizados otros raticidas para reprimir estas "super-ratas" resistentes. El inconveniente de muchos de estos raticidas alternativos es que tienden a ser potentes no solo en los roedores, sino también en especies que no son diana, tales como las mascotas, el ganado e incluso las personas. Los anticoagulantes de segunda generación más potentes, por ejemplo, sólo pueden usarse solamente dentro de los edificios con el fin de limitar la exposición de los animales no diana. También se dispone de dos raticidas no anticoagulantes pero las instrucciones limitan las aplicaciones repetidas a intervalos de 6 meses. La presente invención proporciona una nueva clase de raticidas que es capaz de matar los roedores y que es particularmente ventajosa ya que es eficaz contra las ratas que son resistentes a los raticidas disponibles en la actualidad. También, los nuevos raticidas de acuerdo con esta invención son no tóxicos para las personas, diversas mascotas y ganado, reduciendo así el riesgo de daño ambiental, así como evitando el daño a los seres humanos en contacto frecuente con el raticida, como es el caso de los trabajadores de la industria del control de plagas.

35 Entre otros intentos de diseñar una nueva generación de raticidas se incluye el documento WO 2006/095128, que enseña un raticida que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo extracelular de una proteína expresada en un roedor. El método descrito es complejo porque el usuario tiene que identificar primero un epítipo candidato antes de que se pueda hacer el anticuerpo que va a formar parte del raticida. Habiéndose hecho el anticuerpo, el anticuerpo tiene entonces que ser probado en relación con su eficacia. Entonces, el usuario tiene que decidir qué fusión ha de unir al anticuerpo, por ejemplo, el anticuerpo se puede fusionar con una toxina o con un anticonceptivo. Por último, se administran las fusiones al roedor, donde es de esperar que la parte de anticuerpo de la fusión pueda dirigir la molécula entera al lugar apropiado en el roedor.

45 La presente invención no requiere la etapa de tener que hacer un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. La presente invención no requiere ni siquiera que el usuario tenga que identificar un epítipo de una proteína expresada en un roedor. Por consiguiente, la presente invención proporciona un método mucho más simple de producir un raticida. La presente invención no se refiere a un epítipo que es expresado en un roedor. En vez de ello, se refiere a una toxina que no se encuentra de forma nativa en un roedor, porque se encuentra en *Yersinia pestis*.

Breve descripción de los dibujos.

Figura 1. Polinucleótido de la toxina murina de *Yersinia*, secuencia de polipéptido y secuencias de cebador.

50 *Figura 2.* Un PhastGel SDS PAGE al 10-15% mostrando la especie CO92 de toxina murina recombinante etiquetada con GST purificada. Las calles (1) y (8) contienen marcadores de bajo peso molecular, las calles (2) - (5) son fracciones a través del flujo de la columna y las calles (6) y (7) contienen proteínas eluidas de la columna GSTrap. La toxina murina recombinante etiquetada con GST (presente en las calles 6 y 7) tiene un peso molecular previsto de ~93,5 kDa.

Figura 3. Una especie KIM de toxina murina recombinante etiquetada con GST purificada con PhastGel SDS PAGE al 10-15%. Las calles (1) y (8) contienen marcadores de bajo peso molecular, las calles (2) - (5) son fracciones a través del flujo de columna y las calles (6) y (7) contienen proteínas eluidas de la columna GSTrap. La toxina murina recombinante etiquetada con GST (presente en las calles 6 y 7) tiene un peso molecular previsto de ~93,5 kDa.

5 *Figura 4.* Un PhastGel SDS PAGE al 10-15% mostrando especies CO92 y KIM de toxina murina recombinante purificadas sin la etiqueta GST. Las calles (1) y (6) contienen marcadores de bajo peso molecular. Las calles (2) y (3) contienen muestras de especie CO92 de toxina murina recombinante. Las calles (4) y (5) contienen muestras escindidas de especie KIM de toxina murina recombinante. Tanto la especie CO92 como la KIM de toxina murina recombinante tienen un peso molecular de ~67,5 kDa. La etiqueta GST eliminada tiene un peso molecular de ~26
10 kDa.

Figura 5. Un PhastGel SDS PAGE al 10-15% mostrando especies CO92 y KIM de toxina murina recombinante purificadas con una etiqueta HIS C-terminal. La calle 1 contiene marcadores de bajo peso molecular. Las calles (2) y (3) contienen muestras de la especie CO92 de toxina murina recombinante. Las calles (4) contienen muestras de especie KIM de toxina murina recombinante. Tanto la especie CO92 como la KIM de toxina murina recombinante tienen un peso molecular de ~67,5 kDa.
15

Descripción detallada de la invención.

El control de plagas es de una importancia fundamental en la mayor parte de las sociedades. Sin embargo, la creciente incidencia de la resistencia de los roedores a los raticidas conocidos hace que el control de las poblaciones de roedores sea cada vez más difícil.

20 La *Yersinia pestis* es el agente causante de la peste. Los roedores juegan un papel en el ciclo de vida de esta bacteria por infectarse a través de un vector de pulgas, muriendo y después convirtiéndose en la fuente de material infeccioso para otros insectos que se alimentan de ellos propagando la enfermedad.

Además de matar a las ratas, también se sabe que la *Yersinia pestis* es letal para las personas y es este último efecto el que ha servido de estímulo para la investigación sobre su biología en la esperanza de que tal investigación
25 podría conducir a una vacuna o cura para la peste. A partir de la década de 1940, el trabajo sobre las toxinas de la peste ha dado aspectos interesantes sobre el patógeno.

Uno de estos aspectos es que la *Yersinia pestis* alberga un plásmido (pMT1) que no está presente en ninguna otra especie de *Yersinia*. La caracterización del plásmido llevó a la conclusión de que la toxina murina de *Yersinia* (*Ymt*: *Yersinia murine toxin*), un factor de virulencia, es codificada por este plásmido.

30 Los factores de virulencia en general son los candidatos principales para nuevas vacunas, ya que es probable que inicien una respuesta inmunológica en el organismo hospedador. También tienden a ser dianas para fármacos terapéuticos. La investigación de fármacos y vacunas implica a veces la experimentación en ratas y ratones con el fin de evaluar la eficacia del candidato a fármaco o vacuna o el animal puede ser requerido como fuente de anticuerpos contra el factor de virulencia.

35 Desgraciadamente, a veces un roedor puede morir como resultado de habersele administrado el fármaco o, si lo que se está probando es una vacuna y esa vacuna no es efectiva, entonces el roedor podría morir de la enfermedad contra la que está pensado que proteja la vacuna. En el caso de *Ymt*, se ha administrado a ratones y ratas esta toxina con el fin de observar el papel de esta toxina en la infección por la peste y también para ver si había algún efecto inmunizante.

40 Matar la rata o el ratón, sin embargo, nunca ha sido la intención de los experimentos en sí, sino que la muerte del animal era un desafortunado resultado de la realización del experimento. No hay ninguna sugerencia en las publicaciones de esta investigación de que la muerte del ratón o la rata sea un resultado útil, es decir, que sería práctico utilizar *Ymt* como raticida. Esto es particularmente así dado que el método de administración de *Ymt* a las ratas o ratones en estas publicaciones es por inyección, no un método particularmente práctico para un raticida ya
45 que cualquier método de este tipo tendría que implicar atrapar primeramente al roedor y luego inyectar a mano a cada roedor.

Los inventores han encontrado que la *Ymt* puede ser empleada en una forma que puede ser administrada sin inyección y desplegada para matar selectivamente a los roedores. En un primer aspecto de la invención, por tanto, se proporciona un método para matar roedores que comprende administrar a dichos roedores una dosis letal de
50 polipéptido *Ymt* aislado o un análogo antigénico aislado del mismo, por administración oral.

Los métodos de administración distintos de la inyección directa incluyen, pero sin limitarse a ellos, la administración oral, rectal, transmucosal, transnasal, pulmonar, y transdérmica/tópica. Tales métodos de administración son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Jain et al, *Methods in Molecular Biology*, vol. 437, páginas 1 - 50; DeJong et al, *International Journal of Nanomedicine* 2008: 3 (2) 133 - 149.

- En la presente invención el método de administración es la administración oral. Preferiblemente la *Ymt* o su análogo antigénico se suministran con el pienso (por ejemplo, mezclada con cereales tales como avena). El pienso puede comprender adicionalmente inhibidores de la proteasa para evitar la degradación de la *Ymt* o su análogo antigénico una vez que llega al estómago del roedor y/o al tracto gastro-intestinal. Además, también puede ser incluido un portador en un pienso en el que el vehículo es una sustancia que ayuda al suministro de *Ymt* o su análogo antigénico a través del intestino o la pared del estómago del roedor en el torrente sanguíneo.
- Alternativamente, la *Ymt* o su análogo antigénico se pueden administrar por vía oral sin el pienso, pero todavía pueden incluir un inhibidor de proteasa y/o un portador.
- Por "roedor" se entiende cualquier mamífero placentario pequeño que pertenece al orden *Rodentia*, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, ratas y ratones.
- Preferiblemente, el roedor que se mata es una rata. Más preferiblemente, el roedor que se mata es de las especies *Rattus rattus* o *Rattus norvegicus*.
- Por "*Ymt* aislado" se entiende que la *Ymt* no está presente en forma de un organismo *Yersinia pestis* de origen natural. Por "*Ymt*" se entiende un polipéptido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2.
- "Análogo antigénico" tal como se usa con respecto a un polipéptido, describe cualquier polipéptido que es capaz de matar a un roedor con una dependencia con la dosis similar a la del polipéptido *Ymt* aislado y comparte más del 60% de identidad o similitud con la SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, la secuencia del análogo antigénico comparte más del 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad o similitud con la SEQ ID NO: 2.
- Aunque el grado de actividad dependiente de la dosis no precisa ser idéntico al de la *Ymt* que comprende la SEQ ID NO: 2, preferiblemente el "análogo antigénico" mostrará una dependencia de la dosis similar en un ensayo de actividad dado en comparación con la *Ymt* que comprende la SEQ ID NO: 2. "Dependencia de la dosis similar" significa que los resultados del ensayo no son significativamente diferentes, como se mide por al menos una prueba estadística que sea apropiada para el ensayo, por ejemplo la prueba t de Student.
- El "análogo antigénico" puede ser un polipéptido que es homólogo o análogo a la secuencia de SEQ ID NO: 2. Los dos términos "homólogo" y "análogo", como se usan en el presente texto, se utilizan indistintamente. Se dice que dos polipéptidos son "homólogos" o "análogos", si la secuencia de uno de los polipéptidos tiene un grado suficientemente alto de identidad o similitud con la secuencia del otro polipéptido, es decir, comparten más de 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95%. "Identidad", cuando se refiere a un polipéptido, indica que en cualquier posición particular en las secuencias alineadas el resto de aminoácido es idéntico entre las secuencias. "Similitud", cuando se refiere a un polipéptido, indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el resto de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, los restos de aminoácidos se pueden agrupar por sus cadenas laterales. La glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina tienen todos ellos cadenas laterales alifáticas y los aminoácidos de este grupo pueden considerarse similares. La prolina, aunque es un aminoácido cíclico, comparte muchas propiedades con los aminoácidos alifáticos y también puede ser considerado agrupado con los otros aminoácidos alifáticos. Otro grupo es los aminoácidos de cadena lateral que contienen hidroxilo o azufre. Estos son serina, cisteína, treonina y metionina.
- La fenilalanina, la tirosina y el triptófano se agrupan juntos como aminoácidos aromáticos. La histidina, la lisina y la arginina son los aminoácidos básicos. El ácido aspártico y el ácido glutámico son los aminoácidos ácidos y la asparagina y la glutamina son sus correspondientes amidas. También se incluyen en estos grupos aminoácidos modificados (es decir, aminoácidos de origen no natural) que tienen cadenas laterales que comparten propiedades similares con los aminoácidos de origen natural. Los miembros de un grupo en particular pueden ser considerados como "similares". El trueque de un aminoácido de un grupo con otro aminoácido del mismo grupo se denomina con frecuencia sustitución conservadora.
- La definición de un polipéptido "homólogo" o "análogo" también puede incluir un polipéptido en el que han sido eliminados o insertados uno o más aminoácidos en la secuencia, siempre y cuando la identidad global o similitud sea más del 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95%. Los aminoácidos que son insertados o sustituidos pueden ser cambios de aminoácidos no conservadores, siempre y cuando la identidad o similitud global caiga dentro de los porcentajes dados. Los polipéptidos homólogos o análogos pueden incluir variantes biológicas naturales.
- Los grados de identidad y similitud se pueden calcular fácilmente usando programas informáticos conocidos (véase Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991). Por ejemplo, se pueden hacer comparaciones de secuencias simples en sitios web tales como el sitio web de NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (versión 2.2.11). Como se usa en el presente texto, los porcentajes de identidad o similitudes entre las secuencias se miden de acuerdo con los parámetros BLAST por defecto, versión 2.2.11. Para los polipéptidos, blastp se utiliza con los siguientes ajustes:

blasting avanzado, baja complejidad, espera 10, tamaño de palabra 3, matriz blosun 62, existencia: 11, extensión: costos 1 gap, umbral de inclusión 0,005 y vista de alineamiento: *hit table*. Para *blasting* de nucleótidos se usa blastn, con baja complejidad, espera 10, tamaño de palabra 11, vista de alineamiento: *hitable*, semi-automático y autoformato.

- 5 Los "análogos antigénicos" también incluyen un fragmento o fragmentos de polipéptido *Ymt* que comprende la SEQ ID NO: 2 siempre y cuando el fragmento o fragmentos mate al roedor al que se administra y comparta al menos un determinante antigénico con la SEQ ID NO: 2. Dos polipéptidos comparten el mismo determinante antigénico si se unen a un anticuerpo particular con afinidades de unión similares o si son reconocidos por los mismos antígenos mayores de histocompatibilidad de clase I o clase II. Los ensayos para el reconocimiento por las células T incluyen ensayos de liberación de cromo, ensayos ELISPOT y ensayos de proliferación y son bien conocidos en la técnica. Las técnicas para medir las afinidades de unión de proteínas con proteínas son bien conocidas en este campo y pueden incluir estudios de unión de filtro, ELISAs (véase el ejemplo 5) o cromatografía. Las afinidades de unión son consideradas como similares cuando son estadísticamente significativas usando la prueba de la t o la prueba de la t de Student.
- 10
- 15 Tales fragmentos pueden formar parte de un polipéptido mayor, siempre y cuando el fragmento forme una región continua única. Varios fragmentos pueden estar comprendidos dentro de un polipéptido mayor único.

Un "análogo antigénico" puede incluir combinaciones de las variaciones antes mencionadas, es decir, el polipéptido análogo antigénico puede comprender cualquier combinación de una delección, o una adición de un fragmento, una sustitución y/o una inserción, siempre y cuando tenga afinidades de unión similares en comparación con un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 y mate a los roedores a los que se administra. Tales delecciones, adiciones, sustituciones e inserciones pueden ser de origen natural o diseñadas deliberadamente.

20

Los métodos para preparar polipéptidos sintéticos antigénicamente equivalentes son bien conocidos en este campo e incluyen técnicas tales como mutagénesis dirigida al sitio (véase Deng, W. P. y Nickoloff, T. A., Anal. Biochem. 200, 81 - 88 (1982)), reacción en cadena de la polimerasa, síntesis química de genes y síntesis química de polipéptidos.

25

Preferiblemente, la *Ymt* aislada es *Ymt* recombinante. "*Ymt* recombinante" se define como *Ymt* que se expresa como un gen heterólogo. Más preferiblemente, la *Ymt* aislada se expresa en *Escherichia coli*.

"Dosis letal" puede significar una administración única que se prueba como letal o también puede significar más de una administración, si esto conduce a la muerte del roedor, es decir, el envenenamiento por *Ymt* puede ser acumulativo.

30

La *Ymt* es particularmente adecuada en su uso para matar los roedores o reprimir las poblaciones de roedores por varias razones. En primer lugar, se ha encontrado que la *Ymt* muestra especificidad en su toxicidad; los conejos, los perros y los chimpancés son menos susceptibles a esta toxina en comparación con las ratas y los ratones. Tal especificidad es útil en un raticida ya que evita el envenenamiento no intencionado de las personas, en particular las personas que trabajan en la industria de control de plagas. Las mascotas no roedores y el ganado estarán también a salvo de una dosificación no intencionada, así como cualquier vida salvaje de no roedores.

35

En segundo lugar, a diferencia de la warfarina (otro raticida específico de los roedores), no hay problemas importantes con la resistencia contra la *Ymt* en las poblaciones de roedores silvestres hasta ahora. Además, como la *Ymt* es una molécula biológica con actividad demostrada de agente de bloqueo de fosfolipasa y β -adrenérgica, será más difícil que un roedor desarrolle resistencia ya que es probable que el modo de acción en un roedor sea más complejo que el de los productos químicos sintetizados utilizados en los raticidas actuales. También, la *Ymt* se ha perfeccionado por evolución para matar ratas, ya que es ventajoso para la *Yersinia pestis* matar al roedor que ha infectado con el fin de liberar una fuente de material infeccioso que ayuda a la posterior propagación de la enfermedad. Esto sugiere de nuevo que va a ser difícil que una rata cree resistencia contra la *Ymt*.

40

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un raticida que comprende polipéptido *Ymt* aislado o un análogo antigénico aislado del mismo, en donde el raticida está en forma de pienso.

45

"*Ymt*" y "polipéptido *Ymt*" se usan indistintamente en esta solicitud excepto cuando hay mención del gen de *Ymt* o cualquier polinucleótido que codifica el polipéptido *Ymt*. También, cuando la *Ymt*, el polipéptido *Ymt* o sus análogos antigénicos son mencionados en esta solicitud, preferiblemente, no se fusionan con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

50

Por "raticida" se entiende cualquier composición que es letal para un roedor cuando se administra en cantidad suficiente. Preferiblemente el raticida es letal para las ratas. Más preferiblemente, el raticida es letal para las ratas de las especies *Rattus rattus* o *Rattus norvegicus*.

El polipéptido *Ymt* aislado o análogo antigénico aislado del mismo, es un polipéptido *Ymt* recombinante o un análogo antigénico recombinante del mismo. Se han llevado a cabo estudios previos en ratones y ratas con *Ymt* purificada a partir del organismo *Yersinia pestis* real. El uso de un patógeno tan peligroso como *Yersinia pestis* en el laboratorio

55

requiere un alto nivel de contención y hay muchas restricciones acerca de cómo han de llevarse a cabo tales estudios. La *Ymt* de *Yersinia pestis* recombinante, sin embargo, anularía la necesidad de altos niveles de contención ya que los organismos *Yersinia pestis* viables ya no estarían presentes dado que la *Ymt* se estaría produciendo en un organismo más seguro tal como *Escherichia coli*. Esto es particularmente importante para la producción a gran escala de la *Ymt* necesaria para la fabricación del raticida.

Se proporciona un plásmido de expresión que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido *Ymt*, o un análogo antigénico del mismo. Un ejemplo de secuencia de polinucleótido que codifica el polipéptido *Ymt* se da en la SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, la secuencia de polinucleótido está optimizada en los codones para una mejor expresión en el organismo de expresión, p. ej. el polinucleótido será optimizado en los codones para la expresión de *Ymt* en un organismo hospedador *Escherichia coli*. En una realización, el plásmido de expresión codifica además una etiqueta que está unida al polipéptido *Ymt* o análogo antigénico del mismo. Dichas etiquetas puede estabilizar el polipéptido y/o ayudar a la purificación. Preferiblemente la etiqueta es una etiqueta GST o de histidina (HIS). Más preferiblemente, la etiqueta es una etiqueta de HIS. En otro aspecto de la invención, se proporciona una bacteria que expresa el polipéptido *Ymt* o un análogo antigénico del mismo, en donde la bacteria no es *Yersinia pestis*. Preferiblemente, la bacteria es *Escherichia coli*.

Se proporciona un polipéptido aislado *Ymt* o un análogo antigénico aislado del mismo, adecuado para ser usado en la represión de poblaciones de roedores. Preferiblemente, el polipéptido aislado *Ymt* o análogo antigénico aislado del mismo es un polipéptido *Ymt* recombinante o análogo antigénico recombinante del mismo.

En un tercer aspecto de la invención, se proporciona el uso de polipéptido *Ymt* o su análogo antigénico como raticida. Preferiblemente, el polipéptido *Ymt* o su análogo antigénico es un polipéptido recombinante o un análogo antigénico recombinante del mismo. Tener un polipéptido recombinante en vez de tener que purificar la toxina del organismo original es ventajoso por las razones ya expuestas anteriormente, a saber, que se elimina la necesidad de contención de alto nivel en el proceso de producción. Más preferiblemente, el polipéptido recombinante o un análogo antigénico recombinante es producido en un organismo más seguro tal como *Escherichia coli*.

El polipéptido *Ymt* o su análogo antigénico se fija a una etiqueta de polipéptido. Preferiblemente, la etiqueta de polipéptido permite una purificación más fácil. Más preferiblemente la etiqueta de polipéptido es una etiqueta GST o una etiqueta HIS. Lo más preferiblemente, la etiqueta de polipéptido es una etiqueta HIS porque se ha encontrado que la presencia de una etiqueta HIS no interfiere las propiedades tóxicas del polipéptido *Ymt* cuando el polipéptido se usa como raticida. La ausencia de un requisito de eliminar la etiqueta antes de que el polipéptido *Ymt* o su análogo antigénico sea utilizado como raticida ahorra tiempo y esfuerzos en la producción del raticida. La etiqueta His puede fusionarse ya sea al extremo N-terminal o al C-terminal del polipéptido *Ymt* o su análogo antigénico. En una realización, la etiqueta His se fusiona al extremo C-terminal del polipéptido *Ymt* o su análogo antigénico.

Las ratas no pueden vomitar para librarse de sustancias tóxicas. Esto es potencialmente un problema fatal para la rata si la comida es venenosa. Por ello las ratas han adaptado su comportamiento para minimizar el riesgo de ser envenenadas por lo que, cuando una rata encuentra un nuevo alimento, sólo comerá un poco y esperará para ver si cae enferma. Si cae enferma, evitará este alimento para el resto de su vida. Esto se denomina a menudo como "evitación del cebo" o "cautela del cebo".

Un aspecto de la presente invención permite desviar la evitación del cebo microencapsulando la *Ymt* o el análogo antigénico de la misma en una microcápsula que retrasa la liberación del polipéptido o libera el polipéptido a una velocidad suficientemente baja (al menos inicialmente) como para no desencadenar el mecanismo de evitación del cebo en la rata.

En un cuarto aspecto de la invención, por consiguiente, se proporciona una microcápsula que comprende polipéptido *Ymt* o un análogo antigénico del mismo, y material de microencapsulación.

En una realización del cuarto aspecto de la invención, el polipéptido *Ymt* o análogo antigénico del mismo está encerrado en la microcápsula. En otra realización, el polipéptido *Ymt* o análogo antigénico del mismo está embutido en la membrana o matriz de la microcápsula, o parcialmente embutido en la membrana o matriz. En una realización más, hay una mezcla de localizaciones del polipéptido *Ymt* o análogo antigénico del mismo en una única microcápsula de forma que algo del polipéptido *Ymt* o análogo antigénico del mismo está encerrado en el interior de la microcápsula mientras que otro polipéptido *Ymt* o partículas de análogo antigénico están embutidas o parcialmente embutidas en la membrana o matriz de la microcápsula. Por "parcialmente embutido" se entiende que el polipéptido *Ymt* o análogo antigénico del mismo está en contacto con la membrana o matriz de la microcápsula de alguna manera que la restringe de flotar libremente apartándola de la membrana o matriz.

Se conocen en la técnica métodos de encapsulación adecuados para esta invención (véase, por ejemplo, Elvin et al., 2006, Vaccine, 24, 4433 - 4439 incluyendo, pero sin limitarse a ella, la formación de liposomas. Tales métodos pueden incluir el método expuesto en el ejemplo 1. La formulación se puede ajustar para adaptarse mejor al suministro de polipéptido *Ymt* o análogos antigénicos del mismo. Tal ajuste fino se puede llevar a cabo mediante experimentación de rutina usando métodos que incluyen, pero sin limitarse a ellos, los expuestos en los documentos WO 00/56282, WO 00/56361, WO 00/56362 y JP3145405.

En una realización del cuarto aspecto de la invención, el material de microencapsulación es biodegradable. Por "biodegradable" se entiende que el material es degradable por el metabolismo de un roedor, por ejemplo mediante enzimas que se encuentran en el roedor. La degradación del material de microencapsulación permite que el polipéptido *Ymt* o análogos antigénicos del mismo quede disponible en el cuerpo del roedor y exhiba así su efecto sobre el roedor. Un ejemplo de material de microencapsulación biodegradable es poli (L-lactida) o PLA o poli (ácido láctico/glicólico) PGLA.

Preferiblemente, el material de microencapsulación del cuarto aspecto de la invención permite la liberación lenta o retardada del polipéptido *Ymt* o análogo antigénico del mismo en el cuerpo de un roedor. Tales materiales de encapsulación (por ejemplo, la gelatina) son bien conocidos en la técnica de la salud-alimentación, por ejemplo vitaminas, suplementos, etc., y podrían ser fácilmente adaptados por una persona experta para la presente invención.

En un quinto aspecto de la invención, se proporciona un alimento comestible para un roedor que comprende una o más microcápsulas del cuarto aspecto. Las expresiones "alimento comestible para el roedor" y "pienso" se utilizan indistintamente en esta solicitud.

La microcápsula ayudará también a proteger el polipéptido *Ymt* o análogo antigénico del mismo de la degradación en el estómago del roedor y a facilitar la absorción en el intestino, aumentando así las probabilidades de éxito en el suministro de polipéptido *Ymt* completo o análogo antigénico del mismo en el sistema del roedor en vez de ser destruido por las enzimas del estómago y excretado.

Preferiblemente, el alimento comestible para el roedor es alimento comestible para ratas.

Como alternativa a la adición de microcápsulas al alimento comestible para el roedor, la microcápsula del cuarto aspecto de la invención puede estar en un pulverizador en aerosol que el roedor inhalará. Esto desviaría las enzimas degradadoras del estómago y aumentaría por tanto la probabilidad de que el polipéptido *Ymt* intacto o análogo antigénico del mismo sea suministrado al sistema del roedor.

Se proporciona un recipiente de aerosol que comprende las microcápsulas del cuarto aspecto o el raticida del segundo aspecto de la invención. Los recipientes de aerosol adecuados para dispensar microcápsulas de la presente invención son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento FR2685857).

En un sexto aspecto de la invención, se proporciona un recipiente de alojamiento adecuado para atrapar un roedor o roedores, en donde el raticida del segundo aspecto, la microcápsula del cuarto aspecto de la invención, el alimento comestible para el roedor del quinto aspecto de la invención o el recipiente de aerosol se encuentra en el mismo.

Los ejemplos de trampas para ratas que pueden ser modificadas para adaptarse a la presente invención incluyen trampas vivas humanas que tienen puertas de cierre automático que pueden ser activadas cuando entra el animal (véase, por ejemplo, las trampas descritas en www.pestproducts.com/chipmunk_trap.htm). En una realización preferida en donde el recipiente de alojamiento comprende un recipiente de aerosol, el recipiente de alojamiento adecuado para atrapar el roedor o roedores es relativamente estanco al aire con el fin de que el aerosol no se disperse en la atmósfera que circunda la trampa. Esto disminuiría la cantidad global de aerosol que se necesita dispensar para matar al roedor.

Cuando el recipiente de alojamiento alberga un recipiente de aerosol, el recipiente de alojamiento comprende también un mecanismo que libera una dosis letal de pulverización en aerosol en el recipiente de alojamiento que se dispara al entrar el roedor en el recipiente de alojamiento (p. ej. por la presión ejercida por el peso del roedor). Tal mecanismo puede ser una modificación del mecanismo que cierra las puertas a la entrada del roedor de forma que el mecanismo modificado hace ambas cosas, cerrar la puerta de la trampa y liberar la pulverización de aerosol en el disparo.

En una realización alternativa, en vez de un recipiente de alojamiento que alberga un recipiente de aerosol, el recipiente de alojamiento puede ser modificado para otras formas de suministro de toxina. Por ejemplo, el recipiente de alojamiento podría contener un aparato adecuado para suministro sin aguja tal como un fieltro o alfombrilla que comprende microestructuras que se asocian más típicamente con el suministro transdérmico (p. ej. el sistema transdérmico microestructurado sólido). El suministro de la *Ymt* o su análogo antigénico se produciría entonces por el contacto del roedor con la alfombrilla con sus patas o su vientre. También es posible que el recipiente de alojamiento pueda tener la *Ymt* o su análogo antigénico en forma sólida dispersada en el suelo del recipiente. El roedor entraría entonces en contacto con la toxina o su análogo antigénico al entrar en el recipiente. La toxina o su análogo antigénico sería ingerida cuando el roedor lame sus patas.

Los inventores también contemplan *kits* de raticidas. Así, en un séptimo aspecto de la invención, se proporciona un *kit* que comprende polipéptido *Ymt* o un análogo antigénico del mismo y un recipiente de alojamiento adecuado para capturar un roedor o roedores. Preferiblemente, el *kit* comprende el polipéptido *Ymt* o análogo antigénico del mismo en forma de aerosol. Más preferiblemente, el polipéptido *Ymt* o análogo antigénico del mismo está en forma de microcápsulas del cuarto aspecto de la invención. Aún más preferiblemente, el recipiente de alojamiento comprende un mecanismo que puede liberar una dosis letal de pulverización en aerosol en el recipiente de alojamiento y se dispara al entrar un roedor en el recipiente de alojamiento.

Alternativamente, el kit comprende el polipéptido *Ymt* o un análogo antigénico del mismo en una forma adecuada para aplicar a superficies con un aplicador, por ejemplo una forma líquida o en emulsión. El aplicador puede ser en forma de pincel. Aplicando el polipéptido *Ymt* o análogo antigénico del mismo a superficies tales como fundas de alambre, cables, tuberías o piezas de construcción, esto podría proteger dichas superficies del constante mordisqueo continuo por los roedores.

Se proporciona un método para preparar *Ymt* recombinante o su análogo antigénico que comprende las etapas de:

- a) poner un polinucleótido que codifica la *Ymt* o su análogo antigénico en un plásmido de expresión;
- b) transformar el plásmido de expresión en un organismo hospedador de expresión;
- c) expresar la *Ymt* o su análogo antigénico en el organismo hospedador de la expresión;
- d) purificar la *Ymt* o su análogo antigénico.

Preferiblemente, el organismo hospedador de la expresión es una bacteria. Más preferiblemente, el organismo hospedador de la expresión es *Escherichia coli*.

Preferiblemente, el plásmido de expresión codifica adicionalmente una etiqueta de polipéptido que se fija unida a la *Ymt* o su análogo antigénico. Más preferiblemente, esa etiqueta de polipéptido permite una purificación más fácil. Son ejemplos de etiquetas de polipéptido adecuadas una etiqueta GST o una etiqueta HIS. Cuando la etiqueta polipéptido es una etiqueta HIS, la etiqueta se fija preferiblemente en el extremo C-terminal de la *Ymt* o su análogo antigénico.

En una realización particular, el método comprende adicionalmente la etapa de segmentar la etiqueta después de haber tenido lugar la purificación. Más preferiblemente, la etapa de segmentación usa Factor XATM, trombina y PrecisionTM, donde la etiqueta es una etiqueta GST.

Se ha encontrado que la presencia de una etiqueta de HIS no afecta a las propiedades raticidas de la *Ymt* hasta el punto de que deje de funcionar. Como tal, se prefiere usar una etiqueta HIS ya que no se requiere segmentación para eliminar la etiqueta de HIS antes de la administración al roedor. En una realización, cuando se utiliza la etiqueta His, el método no incluye segmentar la etiqueta después haber tenido lugar la purificación.

Ejemplos.

Ejemplo 1. Clonación de *Ymt* con una etiqueta GST en un sistema de expresión en *Escherichia coli*.

El gen que codifica *Ymt* se amplificó a partir de ADN molde que había sido extraído de la cepa CO92 o KIM D27 de *Yersinia pestis*. Se utilizó Taq polimerasa (Roche Ltd) para amplificar el ADN de interés usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El cebador directo (*forward*) utilizado consistió en la secuencia mostrada en SEQ ID No: 3 y el cebador inverso utilizado consistió en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4.

El producto de la PCR fue clonado en un vector plasmídico de la serie pGEX (pGEX-5X-1, GE Healthcare) a través de los sitios de clonación *Bam*HI y *Xho*I. La construcción pGEX-*Ymt* se transformó después en la cepa de *Escherichia coli* JM 109 (Promega). Los genes de *Ymt* tanto de la cepa CO92 como de la cepa KIM D27 de *Y. pestis* fueron clonados utilizando este procedimiento.

Ejemplo 2 Clonación del gen *Ymt* con una etiqueta HIS.

Se utilizó Taq polimerasa (Roche Ltd) para amplificar el ADN de interés usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR). El cebador directo usado consistía en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 y el cebador inverso utilizado consistía en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 6.

El producto de la PCR fue clonado después en un vector de plásmido de la serie pET (pET22b, Novagen) a través de los sitios de clonación *Nde*I y *Bam*HI. La construcción pET-*Ymt* fue después transformada en la cepa de *E. coli* Rosetta-Gami (DE3) pLysS (Promega). El gen de *Ymt* tanto de la cepa CO92 como de la cepa D27 de *Y. pestis* fueron clonados utilizando este procedimiento.

Ejemplo 3. Producción de toxina recombinante.

Se usó una colonia individual para sembrar 100 ml de caldo L que contiene ampicilina (seleccionando en relación con la resistencia a la Amp en el vector de plásmido) y se incubó a 37 °C con agitación a 180 rpm. Los cultivos de la noche se utilizaron para sembrar mayores volúmenes de caldo L precalentado que contiene ampicilina y se cultivaron a 37 °C durante 2 - 4 horas alcanzando una densidad óptica (DO 600nm) de aproximadamente 0,4. Los cultivos se enfriaron después a 20 °C y la expresión de la toxina murina recombinante fue inducida mediante la adición de IPTG (hasta 1 mM). Los cultivos inducidos se incubaron después durante la noche, a 20 °C con agitación a 180 rpm. Se creó un sedimento de bacterias por medio de la centrifugación (10000 g durante 15 minutos a 4 °C) de los cultivos inducidos y se almacenó a -20 °C.

El sedimento bacteriano fue descongelado y resuspendido en 20 - 40ml de solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2. La resuspensión se sometió después a ultrasonidos durante tres periodos de tiempo de treinta segundos (con intervalos de tiempo de treinta segundos en hielo). El extracto de proteína fue entonces centrifugado a 10000 g durante 15 minutos y filtrado (0,2 µm).

5 Para los extractos de proteína que contienen *Ymt* etiquetada con GST, el extracto filtrado fue entonces cargado en una columna de afinidad GSTrap FF (GE Healthcare) que purifica las proteínas recombinantes con una etiqueta de glutatión S transferasa. La toxina murina recombinante etiquetada con GST (especies tanto CO92 como KIM) fue purificada con éxito según las instrucciones del fabricante (Figuras 2 y 3). Tratando las proteínas recombinantes etiquetadas a temperatura ambiente con una proteasa (Factor Xa™ (suministrado por GE Healthcare)) que segmenta la etiqueta GST, fue posible producir una versión no etiquetada de la toxina murina (Figura 4).

10 Para el extracto de proteína que contiene *Ymt* etiquetada con His, el extracto filtrado fue cargado después en una columna de afinidad HIS Trap FF (GE Healthcare) que purifica proteínas recombinantes con una etiqueta de histidina. La toxina murina recombinante etiquetada con HIS (tanto especie CO92 como KIM) se purificó con éxito según las instrucciones del fabricante (Figura 5). El material purificado se dializó durante la noche en PBS pH 7,2 para el posterior almacenamiento a -20 °C.

Ejemplo 4 Preparación de polipéptido Ymt encapsulado con PLLA.

Las microesferas se prepararán utilizando un proceso de evaporación de disolvente modificado. Se resuspende *Ymt* recombinante (*rYmt*) liofilizada (2 mg) en 100 µl de agua destilada antes de la adición de 100 µl de poli(alcohol vinílico) (PVA) al 5% (p/v) para formar una fase interna al 2,5% de PVA. La fase interna se añade después a 2 ml de una solución al 5% de polímero (100 mg de poli-L-lactida (PLLA) en 2 ml de diclorometano) y se trató con ultrasonidos en hielo (60 W durante 2 min) para formar una emulsión primaria de agua en aceite. Esto se añade después a 30 ml de PVA al 5% y se homogeneiza (Silverson) en hielo (16.000 rpm durante 8 min) para formar una doble emulsión de agua en aceite en agua. Las microesferas se agitan durante la noche a temperatura ambiente para eliminar el disolvente mediante el proceso de evaporación. El PVA residual y el disolvente se eliminan después mediante el lavado de las microesferas. Brevemente, las microesferas se centrifugan a 10.000 rpm (4 °C) durante 20 min para formar un sedimento. El sobrenadante se retira y el sedimento se resuspende en agua. Esta etapa de lavado se lleva a cabo dos veces. El sedimento final se resuspende en 2 ml de agua y se liofiliza durante 48 horas a -20 °C, seguido de 2 horas, condensador -80 °C 0,007 µBarr usando el liofilizador VITIS Advantage E1.

Ejemplo 5 Toxicidad de la Ymt recombinante.

El estudio de la toxicidad puede consistir en un periodo de inanición previo a la prueba de hasta 12 horas (esto es opcional, los ratones no son sometidos inanición); la administración de una sustancia; y un período de observación de hasta 21 días. Las dosis se administran a grupos de animales de forma que se obtiene una curva de mortalidad con la dosis, que van desde la dosis más alta que tendrá efecto al 0% a la dosis más baja que tendrá efecto al 100% de mortalidad. La dosis que efectúa el 0% de mortalidad actúa como testigo para el estudio. Para los estudios comparativos, por ejemplo, estatus resistente de confirmación, solamente se utilizarán "dosis punto". Los resultados de estas "dosis punto" se comparan con una curva de dosis-mortalidad estándar establecida.

40 Grupos de hasta 5 animales se pesan y, si es posible, se marcan en la cola de forma exclusiva. Antes de la administración las soluciones de dosificación se comprueban visualmente para confirmar la homogeneidad y la adecuación para la administración oral. Si la homogeneidad o la adecuación son sospechosas, la solución será devuelta al preparador para su inmediata sustitución. Se prueban no más de dos grupos de animales cada vez en un momento dado. El estudio inicial se ha de completar y los resultados se han de evaluar antes de adoptar un enfoque por pasos para "dosis" posteriores.

45 En el tiempo 0, las sustancias se administran por vía oral mediante sonda forzada, o por vía intraperitoneal, como una dosis única. La solución de dosificación se debe administrar a la tasa preferida de 1,0 ml por kg de peso corporal para las ratas (la tasa máxima permitida es de 5,0 ml por kg de peso corporal). La tasa de dosis máxima permisible para los ratones es de 10,0 ml por kg de peso corporal. Después de la administración oral de los animales, se les niega el alimento y el agua durante otras 0,5 horas.

50 Después de la administración, los animales se mantienen durante otro período más de observación de hasta 21 días, con la dieta estándar de laboratorio y agua disponible a voluntad. Los animales se observan y se registran los síntomas al menos una vez al día. Cualquier animal que muestre síntomas de una gravedad que cabe esperar que acabe en la muerte, es sacrificado bien sea por CO₂ o bien por dislocación cervical, y se registra su peso corporal. Los animales así sacrificados se registran como muertos en ese día, o en uno de los próximos dos días, dependiendo de la gravedad de los síntomas.

55 Al final del período de observación cualquier superviviente se sacrifica por CO₂ o dislocación cervical, y se registra su peso corporal.

La toxicidad activa (LD50) se deriva de la regresión log-probabilidad de la cantidad de ingrediente activo administrado frente a la mortalidad.

- 5 Se ensayó la toxina murina recombinante purificada en relación con su toxicidad in vivo hacia ratones y ratas a través del método señalado anteriormente. La toxina murina recombinante fue letal para los ratones a través de la vía intraperitoneal (Tabla 1). La toxina se ensayó también en relación con su toxicidad hacia ratones y ratas después de la administración por vía oral. Se encontró que la toxina murina recombinante era letal para ratones y ratas después de la administración oral (Tabla 2).

Método de suministro (método de producción: GST o HIS)	Especie del animal	Dosis (µg/kg)	Número de animales	Mortalidad
IP (GST)	Ratón	20,0	2	0/2
IP (GST)	Ratón	40,0	2	2/2
IP (HIS)	Ratón	20,0	2	1/2
IP (HIS)	Ratón	40,0	2	2/2

- 10 *Tabla 1. Visión de conjunto de la toxicidad de la toxina murina recombinante después de la administración a ratones por vía intraperitoneal. La toxina murina recombinante producida con una etiqueta GST fue tratada enzimáticamente para segmentar la etiqueta de la toxina antes de la administración a los animales. En la toxina recombinante producida con una etiqueta HIS no se retiró esta etiqueta antes de la administración a los animales.*

Material	Método de suministro	Especie del animal	Dosis (µg/kg)	Número de animales	Mortalidad
Toxina murina	Oral	Ratón	2500	2	1/2
Toxina murina	Oral	Ratón	5000	2	1/2
Toxina murina	Oral	Ratón	10000	2	2/2
Toxina murina	Oral	Rata	9900	2	1/2
Etiqueta His*	Oral	Ratón	6000	2	0/2

- 15 *Tabla 2. Visión de conjunto de la toxicidad de la toxina murina recombinante después de la administración a ratones por vía intraperitoneal. La toxina murina recombinante usada en estos estudios fue producida con una etiqueta HIS que no se retiró antes de la administración a los animales. *El testigo de la etiqueta HIS fue un péptido de seis restos de histidina que se sintetizó por vía química y es idéntico a la toxina murina fijada a la etiqueta.*

Ejemplo 6 Prueba de análogos antigénicos comparando las actividades dependientes de la dosis usando ELISA.

- 20 Cada pocillo de una placa de microtítulo de fondo plano de 96 pocillos se recubre mediante la aplicación de 50 µl de polipéptido *Ymt* a 3 - 5 µg/ml en tampón para recubrimiento de carbonato/bicarbonato (Sigma). La capacidad de unión en exceso se adsorbe mediante incubación durante la noche a 4 °C con solución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con 2% (p/v) de polvo de leche sin grasa. Antes de cada etapa adicional las placas se lavan 3x con PBS suplementado con 0,05% (v/v) de tween-20 (PBS-T). Los pocillos se sondan con un anticuerpo apropiado
25 en una dilución en serie seguido por la aplicación de un anticuerpo de segundo paso conjugado con biotina apropiado, seguido por un conjugado de estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano picante) y finalmente se visualizaron con reactivo ABTS (Sigma) disuelto en tampón de fosfato/citrato (Sigma) suplementado a 50 µl/100 ml con H₂O₂ al 30%.

- 30 Los valores cuantitativos se determinan por espectrofotometría a 405 nm. El procedimiento se repite después, pero reemplazando el polipéptido de la invención con un análogo antigénico putativo. Si las actividades dependientes de la dosis se consideran similares por al menos una prueba estadística que sea apropiada, entonces se considera que el análogo antigénico putativo es un análogo antigénico de la invención. Este método puede variarse para adaptarse a las circunstancias particulares del ensayo. Por ejemplo, puede ser más conveniente recubrir los pocillos con el

anticuerpo y después sonarlos con el análogo antigénico putativo. Las variaciones serán bien conocidas para un experto en la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Un método para matar un roedor que comprende administrar a dicho roedor mediante administración oral una dosis letal de polipéptido de toxina murina de *Yersinia* aislado o un análogo antigénico aislado del mismo.
- 5 2. El método según la reivindicación 1 en donde el polipéptido de toxina murina de *Yersinia* o análogo antigénico aislado está en un pienso.
3. El método según la reivindicación 1ª o la reivindicación 2 en donde el polipéptido de la toxina murina de *Yersinia* o el análogo antigénico aislado se administra en presencia de uno o más inhibidores de proteasa y/o un portador.
- 10 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que polipéptido de la toxina murina de *Yersinia* o análogo antigénico de la misma aislado comprende adicionalmente una etiqueta de purificación.
5. Un raticida que comprende polipéptido de toxina murina de *Yersinia* aislado o un análogo antigénico del mismo aislado, en donde el raticida está en forma de un pienso.
6. El raticida según la reivindicación 5, en donde el polipéptido *Ymt* aislado o el análogo antigénico del mismo aislado es un polipéptido recombinante o análogo antigénico recombinante del mismo.
- 15 7. El raticida según la reivindicación 5ª o la reivindicación 6, en donde el raticida comprende adicionalmente uno o más inhibidores de la proteasa y/o un portador.
8. El uso de un polipéptido de toxina murina de *Yersinia* aislado o un análogo antigénico aislado del mismo como raticida.
- 20 9. El uso de un polipéptido de toxina murina recombinante de *Yersinia* o un análogo antigénico recombinante del mismo como raticida.
10. Una microcápsula que comprende polipéptido de toxina murina de *Yersinia* o un análogo antigénico del mismo, y material de microencapsulación.
11. La microcápsula según la reivindicación 10, en la que el material de microencapsulación es biodegradable.
- 25 12. La microcápsula según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en la que el material de microencapsulación permite la liberación lenta o retardada del polipéptido de toxina murina de *Yersinia* en el cuerpo de un roedor.
13. Alimento comestible para roedores que comprende una o más microcápsulas según las reivindicaciones 10 a 12.
- 30 14. Un recipiente de alojamiento adecuado para capturar un roedor o roedores, en donde el raticida según las reivindicaciones 5 a 7, la microcápsula según las reivindicaciones 10 a 12, o el alimento comestible para roedores según la reivindicación 13ª, están albergados en el mismo.
15. Un *kit* que comprende polipéptido de toxina murina de *Yersinia* o un análogo antigénico del mismo y un recipiente de alojamiento adecuado para atrapar un roedor o roedores.

Fig. 1

SEQ ID No: 1 (Secuencia de polinucleótido de la toxina murina de *Yersinia* a partir de la cepa KIM 027)

ATGCTTCAAATAGATAATGTCATTAATAATATTGGAAACTACTTTCATCAT
 CTAAGTAACATTAATTATATACGACTTCTGGATACCCCCATGCTTGGGGA
 GCCCCATTTGGTAAAGAAATCATGCAGCAATCTTACTTACGGCAAGAGGA
 GTTTGCAGGGGCAATGACTGAAGTACTGCGGAATTCGCGTTATCGCTGTG
 ATATATCATCACTTAATAGCCCCGATGCAGAGTGGCGAAAAGTGATTTTT
 AAGGCCATTGATGAATCCTTATCGAAAAAATGGGGCGAACTCAGCCAAC
 TCAGTATAGGTTTCTTTTCGGCCAATCTCCAACAGTATTTATGAATGGGTT
 ATCTGCTGCAACAAATGGCTCCCCTGACTTTGTTGCTTTTAAATCAGAGTT
 AATTCAGCTAATTAAGGAGCGAGGACAATATTGGGAAAAAATGCCTGAA
 ATTTGGCTAGGCCGTTTCTTTAGAATAGAAGAAGGGTTGGCTACATCATTT
 ATGAGAAACGTGTATCCTGATTTCCACCAATCAACGATACAAGAATGAC
 ATGGAATCACACAAAATAATGGCCTCAGATGGTACTGAAGCTCTTGTTG
 GTGGACATAACATGAACATGGATCTATTTAGAAATTATCCACCTGTTTCATG
 ATGTATCAATTATCACTCATGGTTCTTCTGCTTATGGCTCCCAGCTATATCT
 TAACGAACTATGGTCATGTAATTCAGATTTACTAAAAAAGAATATTTTG
 ATTATGAAAGCATGATGTGGGCGGTTCGGAACAAAGTTCTATGATAAGCCT
 GAAGATCCGCTTAAAAGCTCAGTTGCTATGAATTATATGAAGCAACGGCA
 AGAGGACCTACTCAACTTGCATGAAAACTTTAAATCAGAAGGTAGCGACTC
 GTATTAGTGAATACGAAAACATGGAAGAGTATAAAAAAGCAGACAGAGT
 TTTATCAGTAGGTAAATATTGGACAGGACCTAATATGGAGCATGACTACC
 AAAGAGGGTCTGAAATAATGAAAGAGCAACTGATAAAAAATGCTAAGCG
 CATAATTAGAATTTACAGCAAGATCTCGTGAGTGCTTGGAAAAAAAAT
 GGAAAGACCACTTTACGTGTAATTGGATTATTGAGGCTTTGTTAGAAAAT
 AAAGATCTTCATATTCATGTTGTAGTCTCTGCTCTAGATGCAGCAGCTGGA
 GCTGCTGGTGATCAGTACTCATTGGTTCTGGAGCAGAACGGACCTATGA
 ATTATTTAAGTATTACCTAACCCATGATATTGATACCGATGAAGTATTAGA
 CGATCCTGATGGTAGCCGTGCTGATGCCTTAAAAAGAATATTGATTGCAC
 CATTCTTCTTACAGATAAAGTACCTGATGAAAATACAATTGAAGGCGAA
 ACCTACAAGTGGCCTGATTTAGAACAAAGCGCTTATACTGCAACACTTAA
 GCAAAAACCACTTTCGGAAAAACCCCGCATCAAGGTATTATTGGTAGTG
 CACTAATGTCAGCAATTAAGGTAGTGGACTTTTCTATCCTAAAGTCCCTG
 TTGCACCTGGTAATCACGCCAAATTAATGATTATTGACGATGAGTTGTACG
 TTGTTGGATCAGATAATCTTTATCCCGTTATCTGTCAGAGTTTACTATTT
 AGTCGAAGGAAAAGATGCAGTTAATGAATTAATGAAATCTTACTGGGAAC
 CATTGTGGAAATATTCTAGCCACATGCATTTCCAAAATTAAGCCCAAATT
 AA

Fig.1 (Continuación).

SEQ ID No:2 (Secuencia de polinucleótido de la toxina murina de *Yersinia* a partir de la cepa KIM 027)

MLQIDNVINNIGNYFHHLNSNINYIRLLDTPHAWGAPFGKEIMQQSYLRQEEFA
GAMTEVLRNSRYRCDISSLNSPDAEWRKVIFKAIDESLSKKMGRTQPTQYRFL
FGQSPTVFMNGLSAATNGSPDFVAFKSELIQLIKERGQYWEKMPEIWLGRFFR
IEEGLATSFMRNVYPDFPPINDTRMTWNHTKIMASDGTEALVGGHNMNMDL
FRNYPPVHDVSIITHGSSAYGSQLYLNELWSCNSDLLKKEYFDYESMMWAVG
TKFYDKPEDPLKSSVAMNYMKQRQEDLLNLHENFNQKVATRISEYENMEEY
KKADRVLVSGKYWTGPNMEHDYQRGSEIMKEQLIKNAKRIIRISQQDLVSAW
KKKWKDHFTCNWIEALLENKDLHIHV VVSALDAAAGAAGDQYSFGSGAER
TYELFKYYLTHDIDTDEVLDLDDPDGSRADALKRILIAFFFFTDKVPDENTIEGET
YKWPDLQSAYTATLKQKPLSEKPPHQIIGSALMSAIKSGLFYPKVPVAPG
NHAKLMIIDDELYVVGSDNLYPGYLSEFDYLVEGKDAVNELMKSWEPLWK
YSSPHAFPKLSPN

SEQ ID No: 3 (cebador directo)

CGGGATCCTAATGCTTCAAATAGATAA

SEQ ID No: 4 (cebador inverso)

GTCCTCGAGTTAATTTGGGCTTAATTTTGG

SEQ ID No: 5. (cebador directo)

GTCATGCATATGCTTCAAATAGATAATCTCA

SEQ ID No: 6 (cebador inverso)

GTCGGATCCTTAATTTGGGCTTAATTTTGG

SEQ ID No: 7 (cebador directo 2)

GACGTCGACTTAGTGATGGTGATGGTGATGATTTGGGCTTAATTTTGGAA

Fig.2.

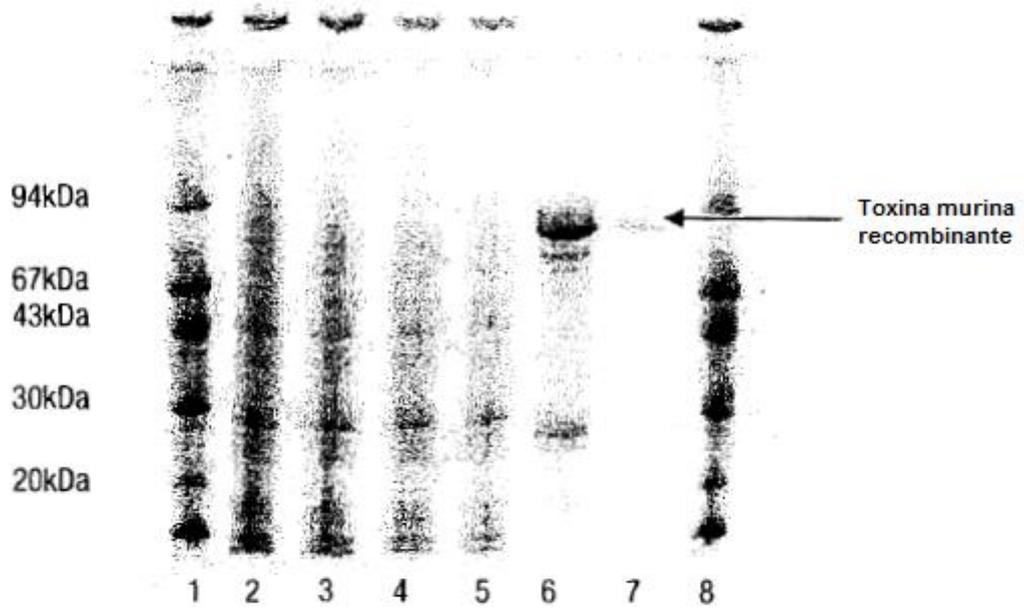


Fig.3.

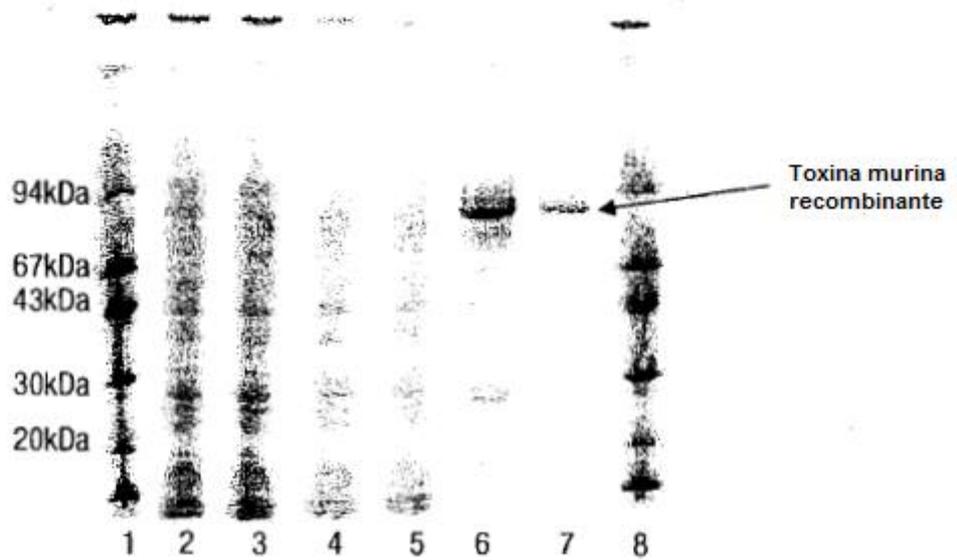


Fig.4.

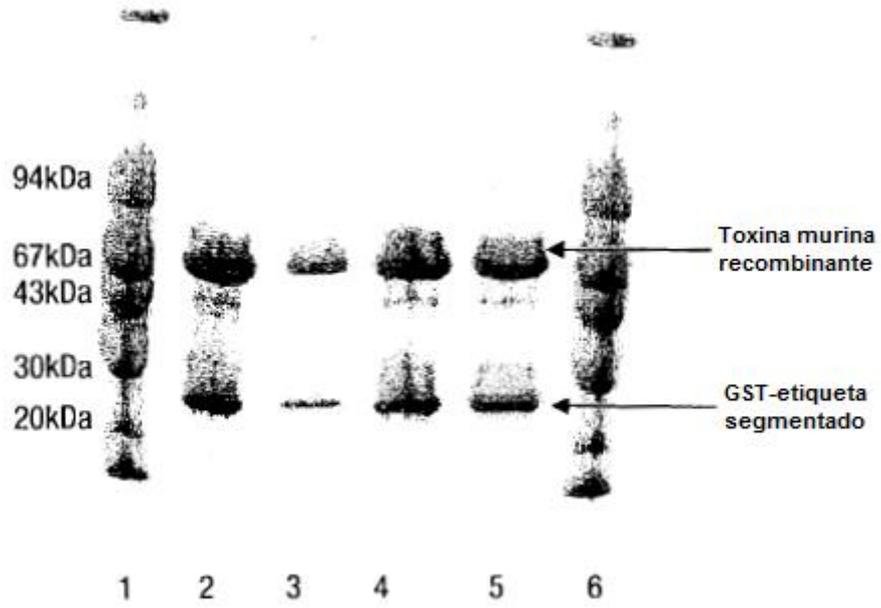


Fig.5.

