

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 527**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2015 PCT/DE2015/000352**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2016 WO16023530**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2015 E 15760363 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 3180615**

54 Título: **Procedimiento de detección utilizando células vivas recombinantes para la detección de sustancias xenobióticas, así como disposición para llevar a cabo el procedimiento de detección**

30 Prioridad:

**13.08.2014 DE 102014012130**

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

**01.08.2019**

73 Titular/es:

**ALFRED-WEGENER-INSTITUT HELMHOLTZ-  
ZENTRUM FÜR POLAR- UND  
MEERESFORSCHUNG (100.0%)  
Am Handelshafen 12  
27570 Bremerhaven, DE**

72 Inventor/es:

**BICKMEYER, ULF-GEORG**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 721 527 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de detección utilizando células vivas recombinantes para la detección de sustancias xenobióticas, así como disposición para llevar a cabo el procedimiento de detección

### Designación

5 La invención se refiere a un procedimiento de detección utilizando células vivas recombinantes para la detección de sustancias xenobióticas. En este caso se emplean células recombinantes con al menos un segmento de secuencia  
 10 génica  $a_i$  de modo que el segmento de secuencia génica se ha modificado de manera recombinante por fusión con al menos un gen de proteína marcadora  $m_i$ . Los efectos de la sustancia xenobiótica sobre el producto de fusión del gen  $a_i$ - $m_i$  expresado se detectan a través del gen de la proteína marcadora obtenida. Además, la invención se refiere a una disposición para llevar a cabo el procedimiento de detección.

15 Las sustancias xenobióticas (sustancias extrañas) son compuestos químicos que son extraños en el ciclo biológico de sustancias de un organismo. Estas contienen en parte elementos estructurales, que en esta forma no aparecen o solo de forma extremadamente rara en las sustancias naturales. En la naturaleza, los xenobióticos son  
 20 frecuentemente de origen antropogénico, por ejemplo, pesticidas sintéticos, hidrocarburos halogenados o materiales sintéticos. Muchas de estas sustancias solo son difícilmente biodegradables o no lo son en absoluto. Los xenobióticos pueden actuar de forma positiva, no actuar de ningún modo o también actuar de forma perjudicial sobre el medio ambiente y los organismos. Un efecto tóxico depende junto a su absorción también de su capacidad de  
 25 degradación biológica, así como de su acumulación en determinados organismos o partes de organismos.

30 Las sustancias xenobióticas se pueden presentar en forma líquida, sólida o gaseosa en sistemas igualmente en los tres estados de agregación. Especialmente en sistemas acuáticos, por ejemplo, ríos, lagos o mares aparecen frecuentemente sustancias xenobióticas antropogénicas, cuya exacta naturaleza química se desconoce y/o cuya  
 35 concentración es tan baja que no poseen relevancia toxicológica alguna. A pesar de ello, su conocimiento es frecuentemente de gran utilidad, incluso forzosamente necesario. La conocida analítica química con sus ensayos toxicológicos con organismos y células modelo y, en sentido más amplio, los conocidos ensayos ecológicos  
 40 funcionan por lo regular solo en el caso de concentraciones más elevadas y también solo proporcionan unos pocos indicios sobre la clase de sustancias químicas. Por lo tanto, especialmente en sistemas acuáticos surge el problema particular de cómo poder detectar estas sustancias de forma rápida y fiable.

### Estado de la técnica

45 El estado de la técnica más próximo de la invención se conoce del documento DE 698 24 763 T2. Se describe un procedimiento de detección que posibilita la identificación de una sustancia tóxica que directa o indirectamente influye sobre la translocación de un polipéptido biológicamente activo. En este caso, el polipéptido biológicamente  
 50 activo es un polipéptido que influye sobre procesos intracelulares después de haber sido activada una vía intracelular de transducción de señales. La vía intracelular de transducción de señales comprende una reacción enzimática y es un proceso intracelular coordinado, en el cual una célula viva transforma una señal externa o interna en respuestas celulares. Se cultivan una o varias células que muestran una expresión estable de un ácido nucleico  
 55 que codifica para un polipéptido híbrido. En este caso el polipéptido híbrido comprende un fluoróforo, especialmente una proteína con fluorescencia verde GFP, la cual es codificada por un ácido nucleico que está unido con el polipéptido biológicamente activo o con una parte de éste. Las células se incuban con una sustancia tóxica para ver en pantalla la función biológica o el efecto biológico. Se detecta la luz emitida por el fluoróforo en las células incubadas, con objeto de detectar modificaciones. En este caso se trata de modificaciones locales, es decir que mediante las marcaciones fluorescentes se detectan modificaciones locales del polipéptido híbrido en la célula resueltas localmente. Tales modificaciones locales detectadas muestran una modificación de la translocación del polipéptido biológicamente activo en las células incubadas y, con ello, su interacción con sustancias tóxicas especiales. El conocido procedimiento de detección examina sistemas celulares en los que, por influencia de una  
 60 sustancia tóxica, tiene lugar una translocación intracelular de un polipéptido biológicamente activo, y proporciona una cuantificación rápida y reproducible de las respuestas de la translocación. Por ello es posible extraer conclusiones razonables entre las influencias sobre los sistemas celulares y sus respuestas de translocación. Sin embargo, para ello es absolutamente necesaria una expresión estable de los híbridos para poder detectar una translocación de este tipo con el conocido procedimiento de detección. Visto en resumen, el procedimiento de detección conforme al documento DE 698 24 763 T2 se puede aplicar por lo tanto solo a sustancias translocantes, que desencadenan una respuesta intracelular, y lleva a cabo una detección localmente resuelta de proteínas marcadoras, que se basa en una expresión estable de las proteínas de fusión empleadas.

65 Algo parecido se conoce del documento DE 696 35 355 T2. También aquí se crean polipéptidos híbridos marcados con GFP para caracterizar la actividad de una muestra. Sin embargo, no tiene lugar una localización de la fluorescencia, sino una medición de su intensidad y una equiparación con valores normales.

En el documento WO 95/07463 A1 se describen también una célula capaz de expresar GFP y un procedimiento para detectar una proteína de interés en una célula, el cual se basa en la introducción de un gen en una célula, el cual presenta un segmento de secuencia génica que liga la proteína de interés con un segmento de secuencia génica

que codifica una GFP, de modo que la proteína producida por el gen fusiona la proteína de interés y presenta la GFP. Después del cultivo de las células, se localiza entonces la fluorescencia en la célula, por lo que también se localiza la proteína de interés en la célula. También en este caso, se localizan de nuevo procesos intracelulares por detección de la fluorescencia. El documento WO 95/07463 A1 describe, además, células que se emplean en una sonda biológica para la detección de moléculas, tales como hormonas, o metales pesados. En este caso, organismos vivos pueden presentar estas células. El elemento regulador del gen, que es influenciado por la molécula de interés, está ligado operativamente con una GFP. En el caso del elemento regulador se puede tratar de un promotor que pertenece a un gen que es responsable de la viabilidad de las células. Por la presencia de las moléculas se influye sobre el elemento regulador, el cual influye a su vez sobre la expresión de la GFP. De esta manera, el gen que codifica GFP se utiliza como gen indicador en una célula diseñada para supervisar la presencia de una identidad molecular específica. Así, por ejemplo, con este conocido procedimiento por una fluorescencia más fuerte se pueden poner de manifiesto efectos de estrés sobre el organismo vivo.

Del mencionado documento DE 698 24 763 T2 se conoce implícitamente que las proteínas de fusión fusionadas con una proteína marcadora en la proteína de fusión no resultan perjudicadas en su función y que se pueden expresar no modificadas. Lo análogo se conoce también de la publicación "Structural requirements for the apical sorting of multidrug resistance protein 2 (ABCC2)" de A.T.Nies et al. (in Eur. J. Bio chem. 269, 1866-1876 (2002)). Aquí se muestra que principalmente los acoplamientos de GFP a proteínas de transporte MRP funcionan y que las funciones de transporte no se perturban. Las proteínas de transporte trabajan también impecablemente con la marcación. Pero el objeto de esta publicación es también detectar la localización de los transportadores y determinar la proporción de transportadores que es responsable de la localización en determinados lugares. Para un acoplamiento de GFPs a proteínas MDR humanas se conoce algo similar de la publicación "Sensitive and Specific Fluorescent Probes for Functional Analysis of the Three Major Types of Mammalian ABC Transporters" de I.V. Lebedeva et al. (en PLoS ONE Julio 2011, vol. 6, Issue7, e22429, págs. 1 a 12). Aquí se utilizan las GFPs como indicadores de MDGs en células vivas en una medición citométrica de flujo.

Los transportadores ABC forman una gran familia de proteínas de membrana, los cuales como elemento estructural común poseen una casete de unión al ATP (adenosintrifosfato) (ABC acrónimo de casete de unión a ATP) y transportan activamente sustratos químicos a través de una membrana celular. Las sustancias químicas, aún cuando se presentan en concentraciones toxicológicamente irrelevantes, pueden provocar una reacción en los organismos vivos y en sus células, activando o regulando hacia arriba el primer sistema de defensa celular al que pertenecen los transportadores ABC. De este modo, los organismos vivos pueden activar un mecanismo de defensa, el cual en caso necesario, bajo consumo de energía, puede extraer sustancias extrañas del interior de las células y entonces también de tejidos completos. En el transporte participan sobre todo "Multiple Drug Resistance Proteine" (MDR) y "Multidrug Resistance-Related Proteine" (MRP). Con estas designaciones se describe el fenómeno de que las células tienen o desarrollan una resistencia frente a sustancias especiales.

Sobre las proteínas transportadoras MDR y MRP en el gusano platelminto *Macrostomum lignano* en relación con una incubación con el colorante fluorescente Ageladine A, se informa explícitamente en la publicación "Reporter Dyes Demonstrate Functional Expression of Multidrug Resistance Proteins in the Marine Flatworm *Macrostomum lignano*: The Sponge-Derived Dye Ageladine A is Not a Substrate of these Transporters" de K. Tietje et al. (in Mar. Drugs 2013, 11, 3951-3969).

La proteína de fluorescencia verde (abreviatura GFP; en inglés green fluorescent protein) es una proteína, descrita por primera vez en 1961 por Osamu Shimomura, de la medusa *Aequorea victoria*, la cual por excitación con luz azul o ultravioleta fluoresce de color verde. Variantes modificadas de la GFP presentan espectros de otros colores. Su incalculable significado en biología, especialmente en la biología celular, radica en la posibilidad de fusionar GFP con otras proteínas arbitrarias de forma específica del gen. Por la fluorescencia de la GFP se puede observar directamente la distribución local y temporal de la otra proteína en células, tejidos u organismos vivos. En la publicación "Nobel lecture: constructing and exploiting the fluorescent protein toolbox" de R.T. Tsien (en Integr. Biol. 2010, 2, 77-93) se informa explícitamente sobre las GFPs y su naturaleza. Variantes más nuevas de la GFP se describen, por ejemplo, en el documento DE 696 04 298 T2.

Además, en la publicación "Functional toxicology: a new approach to detect biologically active xenobiotics" de J.A. McLachlan (Environmental Health Perspectives, tomo 101, nº 5, 1. Octubre 1992, páginas 386-387, DOI: 10.1289/ehp.931001386) se da a conocer la detección de xenobióticos biológicamente activos con ayuda de la toxicología funcional. Se transfieren células con construcciones moleculares que contienen un receptor específico y un gen informador de este receptor. Así es posible "screenear" agentes químicos de biología o toxicología desconocida y determinar su función. No tiene lugar una medición integral.

El documento US 2004/241832 A1 da a conocer un aparato para la observación de un cultivo celular que contiene un recipiente de hábitat con determinadas condiciones de cultivo, un sistema de fotografiado y una sección de análisis. Se mide la luminiscencia. La autofluorescencia también se puede medir. Pero no se menciona ningún recipiente que, por ejemplo, sea permeable a los líquidos.

La publicación "A survey of all 11 ABC transporters in fission yeast: two novel ABC transporters are required for red pigment accumulation in a *Schizosaccharomyces pombe* adenini biosynthetic mutant" de Iwaki Tomoko et al.

(Microbiology (Reading, England) agosto 2006, tomo 152, nº Pt8, agosto 2006, páginas 2309-2321 (ISSN: 1350-0872)) describe la localización de proteínas de transporte ABC ligadas a GFP en células de levaduras de fisión. No se menciona un "kit". No tiene lugar una medición integral.

### Planteamiento de tareas

5 Partiendo del procedimiento de detección conocido como estado de la técnica más próximo, conforme al documento DE 698 24 763 T2 explicado con más detalle anteriormente, el objeto de la presente invención se ha de ver en indicar un perfeccionamiento con el cual se pueda detectar a ser posible muchas sustancias xenobióticas de forma fiable, sencilla y rápida. Esto también debe ser posible aun cuando se desconozca la naturaleza química exacta de las sustancias o cuando las sustancias se presenten en concentraciones que no tienen ninguna relevancia toxicológica. Además, se debe indicar una disposición para llevar a cabo el procedimiento de detección, que posibilite su traslado a la práctica real de modo particularmente sencillo y fiable y, además, autárquico. En este caso se debe utilizar un "kit" de ensayo que se complemente idealmente con la disposición del procedimiento de detección y que por la disponibilidad de diferentes células recombinantes sea particularmente polifacética la capacidad de aplicación del procedimiento de detección. Estas tareas se solucionan mediante la reivindicación del procedimiento y las dos reivindicaciones del producto. Modificaciones ventajosas de las soluciones se indican en las respectivas reivindicaciones dependientes y se explicarán más adelante con más detalle en relación a la invención.

Conforme a la invención se reivindica un procedimiento de detección utilizando células vivas recombinantes para la detección de aquellas sustancias xenobióticas que al entrar en contacto con las células vivas a través de al menos un promotor activo en la células vivas, provoca una activación o una alta regulación de la expresión de al menos un segmento de secuencia génica  $a_i$ , el cual codifica al menos para una proteína funcional  $A_i$  con función conocida, en donde el segmento de secuencia génica  $a_i$  se modifica de forma recombinante por fusión con al menos un gen de proteína marcadora  $m_i$ , la cual codifica al menos para una proteína marcadora  $M_i$  que no influye en la codificación de la proteína funcional  $A_i$  con propiedades marcadoras conocidas, y la construcción de fusión génica  $a_i$ - $m_i$  codifica para una proteína de fusión  $A_i$ - $M_i$  a partir de la al menos una proteína de fusión  $A_i$  y la al menos una proteína marcadora  $M_i$ , y donde se detecta una mayor presencia de la al menos una proteína marcadora  $M_i$ , como reacción celular por una detección de sus propiedades marcadoras de forma integral sobre la superficie. En este caso,  $i$  designa el índice de ejecución con  $i=1$  a  $n$  para diferentes segmentos de secuencia génica  $a_i$ , proteínas funcionales  $A_i$ , genes de proteínas marcadoras  $m_i$  y proteínas marcadoras  $M_i$ .

El procedimiento conforme a la invención se puede utilizar como una forma de proceder muy eficiente para ensayar o descubrir la influencia de una sustancia xenobiótica sobre un proceso fisiológico, especialmente en combinación con el ensayo de las sustancias en cuanto a su toxicidad. Se diferencia de los procedimientos de detección conocidos sobre todo también porque el fundamento de la medición genera una expresión dinámicamente modificable de la proteína de fusión  $A_i$ - $M_i$ . Se detecta integralmente una generación incrementada de la proteína marcadora  $M_i$  sobre una superficie y de forma fiable pone de manifiesto que también la proteína funcional  $A_i$  se genera de manera incrementada. En este caso, por las sustancias extrañas en las células vivas se provoca con mucha más frecuencia una expresión más fuerte de proteínas funcionales individuales que una translocación de proteínas, en la cual se trata de un proceso celular mucho más complejo. El foco de la invención se encuentra por lo tanto en la expresión dinámica como señal sensorial, mientras que la expresión en el procedimiento de detección conocido se supone como constante y representa una premisa esencial. La influencia de la expresión de diferentes proteínas en células vivas en el sentido de una modificación debida a sustancias xenobióticas es la base de la invención como principio de acción fundamental. La expresión dinámica se considera en la invención como una señal de sustancia extraña, que es la respuesta celular a una contaminación. En la invención, se emplean como sensores las células transgénicas vivas, utilizándose los procesos celulares y su traducción en una respuesta celular en el sentido de una elaboración y transmisión de noticias en el procedimiento de detección. En el caso de la invención se trata de un procedimiento de detección aplicando la técnica de sensores sobre la base de células vivas, lo que completa el paso decisivo desde el laboratorio de investigación teórico a la realidad acuática práctica.

El procedimiento de detección conforme a la invención ofrece un análisis integral sobre la superficie y no – como en el estado de la técnica – un análisis localmente solucionado de las respuestas celulares, pudiendo llevarse a cabo la detección integral de forma rápida, sencilla y fiable. Se prescinde de largos tiempos de incubación, de modo que el procedimiento de detección conforme a la invención es muy adecuado también para rápidas mediciones de flujo. También es mucho más fácil llevar a cabo una detección integral que una detección de resolución local, que siempre requiere que las células transgénicas puedan ser observadas individualmente. Para ello serían necesarios procesos de separación que consumen mucho tiempo. En el caso de la detección integral en el procedimiento de detección conforme a la invención, la respuesta celular de las células se puede observar simplemente en asociación y evaluar cuantitativamente. Por lo tanto, también es realizable sin problemas una automatización del procedimiento de detección en un sistema de medición autárquico.

En el caso de las vías de señales empleadas para el procedimiento de detección conforme a la invención entre la sustancia extraña y la célula transgénica, la sustancia a detectar actúa sobre los correspondientes promotores en la célula viva recombinante y activa o regula su expresión génica, la cual describe la expansión o el estado de actividad de uno o varios genes. En genética, como promotor se designa una secuencia de nucleótidos en el ADN, la cual posibilita la expresión regulada de un gen. El promotor es un componente esencial de un gen. Está situado en el

extremo 5' del gen (cabecera) y por lo tanto delante de la zona que codifica para el ARN. La propiedad más importante de un promotor es la interacción específica con determinadas proteínas que ligan ADN, las cuales promueven el inicio de la transcripción del gen por la ARN-polimerasa (factores de transcripción).

5 Con el procedimiento de detección conforme a la invención se pueden detectar fundamentalmente todas las sustancias xenobióticas que al entrar en contacto con células vivas no recombinantes a través de al menos un promotor activo en las células vivas provocan una activación o alta regulación de la expresión de al menos un segmento de secuencia génica. La aplicación del procedimiento de detección conforme a la invención puede proporcionar resultados que tengan un carácter puramente informal, por ejemplo puede ser interesante el lugar en el cual, en diferentes sistemas, se acumulan determinadas sustancias extrañas, especialmente antropogénicas. 10 También puede ser interesante controlar si en un sistema natural o técnico se presentan siquiera sustancias xenobióticas, aun cuando éstas sean en principio de naturaleza desconocida. Otra utilidad del procedimiento de detección según la invención consiste en advertir a la persona de la presencia de sustancias nocivas para él o incluso tóxicas. Por lo tanto, se prefiere y es ventajoso que con el procedimiento de detección según la invención se ha previsto que sean detectables las sustancias xenobióticas que son tóxicas y/o de naturaleza desconocida y/o que se presenten en concentraciones sin relevancia toxicológica. Particularmente ventajoso y preferido es que con el procedimiento de detección según la invención se puedan detectar sustancias xenobióticas en el entorno de instalaciones industriales. El procedimiento de detección según la invención es particularmente bien adecuado para el funcionamiento de sistemas de alera en la proximidad de tales instalaciones industriales. El funcionamiento en la proximidad de refinerías, plantas químicas y centrales eléctricas es particularmente razonable para poder detectar 15 sustancias tóxicas tales como, por ejemplo, metales pesados o hidrocarburos halogenados, de forma rápida y fiable. Según la clase de sustancias xenobióticas se activan en este caso diferentes proteínas en las células vivas recombinantes y se pueden detectar por su marcación génica técnica.

El requisito previo para la aplicabilidad del procedimiento de detección según la invención es la incitación de al menos un promotor en las células vivas por la sustancia xenobiótica a detectar, por lo que el promotor incitado, como reacción, activa o regula entonces un segmento de secuencia génica especial. Por la puesta en contacto con la sustancia xenobiótica se activa una reacción celular. Como cabe imaginar, en un o en el mismo instante se presentan diferentes sustancias xenobióticas que incitan como reacción diferentes promotores en las células, de manera que se activan o regulan entonces diferentes segmentos de secuencia génica. Por lo tanto, es ventajoso y se prefiere que diferentes segmentos de secuencia génica  $a_i$ , que codifican para diferentes proteínas funcionales  $A_i$ , estén modificadas de forma recombinante con genes de proteína marcadora  $m_i$  que codifican para proteínas marcadoras  $M_i$  con diferentes propiedades marcadoras, y que las construcciones de fusión génica  $a_i-m_i$  codifiquen para diferentes proteínas de fusión  $A_i-M_i$ , por lo que a través de la detección de las diferentes propiedades de marcación se deduce el incremento de codificación de las correspondientes proteínas de fusión  $A_i$ . A través del respectivo incremento de las proteínas de fusión  $A_i$  generadas, se pueden deducir después la clase y el carácter de las diferentes sustancias xenobióticas. En este caso, las sustancias xenobióticas contaminantes pueden desencadenar diferentes reacciones celulares en función de sus propiedades químicas. 25

Una reacción celular particularmente importante y que se presenta frecuentemente es la activación del sistema de defensa propio de la célula. Particularmente ventajoso y preferido es por lo tanto que el al menos un segmento de secuencia génica  $a_i$  activado por sustancias xenobióticas o altamente regulado en cuanto a su expresión sea el que codifica los mecanismos de defensa y desintoxicación de las células vivas, siendo la proteína de fusión  $A_i$  codificada en las proteínas de fusión  $A_i-M_i$  un miembro de la familia de las proteínas transportadoras ABC, cuya función es el transporte de sustancias extrañas a la membrana. Las sustancias xenobióticas a detectar incitan por lo tanto el primer sistema de defensa celular de las células recombinantes y conducen a las reacciones celulares detectables. Puesto que este sistema de defensa celular propio de las células es muy amplio, con el sistema de detección según la invención se pueden detectar muchas sustancias xenobióticas. Especialmente se pueden detectar de forma segura y fiable muchas sustancias tóxicas – también en concentraciones muy bajas – porque el sistema de defensa propio de las células – sin grandes diferencias entre los diferentes organismos donantes – está concebido consiguientemente para la defensa de exactamente tales sustancias. 30

Especialmente se prefiere y es ventajoso, si el segmento de secuencia génica  $a_i$  codifica para una proteína de fusión  $A_i$  en las proteínas de fusión  $A_i-M_i$  en forma de un Multidrug Resistance Proteins (proteína de transporte MDR) y/o de un Multidrug resistance-Associated Proteins (proteína de transporte MRP) de la familia de las proteínas de transporte ABC. En este caso se trata de las proteínas transportadoras de la gran familia de los transportadores ABC que se presentan con mayor frecuencia y que participan del modo más intenso en el sistema de la defensa celular. Ya se ha expuesto anteriormente que en el procedimiento de detección según la invención diferentes segmentos de secuencia génica  $a_i$  que codifican para diferentes proteínas de fusión  $A_i$ , pueden estar fusionadas con diferentes genes de proteínas marcadoras  $m_i$ , los cuales codifican para diferentes proteínas marcadoras  $M_i$  con diferentes propiedades de marcación (véase también más abajo). Por lo tanto, con el procedimiento de detección según la invención se puede detectar de forma fiable una expresión incrementada de proteínas de transporte MDR y proteínas de transporte MPR. Por lo tanto es posible en el procedimiento de detección según la invención, en el caso de una mayor incidencia de proteínas de transporte MDR como reacción celular, sacar conclusiones sobre una sustancia xenobiótica con moléculas no cargadas, con longitudes de cadena del mismo orden de medida, y en el caso de mayor incidencia de proteínas de transporte MPR como reacción celular, sobre una sustancia xenobiótica con moléculas cargadas, con longitudes de cadena entre 100 Da (unidad dalton) y 8 kDa, preferentemente entre 1 y 35

3 kDa, de modo particularmente preferido entre 1,5 y 2,5 kDa, por ejemplo, hasta 2 kDa. Por tal atribución se puede delimitar ya el origen de la sustancia xenobiótica, especialmente cuando se trata de una sustancia tóxica desconocida.

5 Las proteínas marcadoras pueden presentar las más dispares propiedades marcadoras de naturaleza química y física, que son respectivamente detectables. Por ejemplo, las proteínas marcadoras pueden modificar de forma medible el valor del pH del entorno. Pero más sencilla es la detección óptica de las proteínas marcadoras, por ejemplo, la detección del tamaño. Sin embargo, la detección más sencilla es el reconocimiento del color, especialmente cuando la proteína marcadora es autónoma o emite fluorescencia por incitación. Por consiguiente, en el procedimiento de detección según la invención es ventajoso y se prefiere que se utilicen proteínas marcadoras Mi con fluorescencia como propiedad marcadora, por lo que al menos se detectan la longitud de onda de la fluorescencia y/o la intensidad de fluorescencia. En este caso, se pueden utilizar preferente y ventajosamente proteínas marcadoras Mi de la familia de las Green Fluorescent Proteine (GFP) o sus homólogos fluorescentes o derivados o mutantes de estas GFPs. Las GFPs están bien estudiadas y son manipulables y se disponen en muchas variantes de color.

15 El procedimiento de detección modificado según la invención puede comprender, por lo tanto, un código de color basado en la GFP y en su marcación de color por diferentes transportadores ABC en células transgénicas recombinantes, para obtener en función de su grado de expresión dinámico una prueba de la existencia de sustancias extrañas biogénicas y antropogénicas en el agua. La proteína GFP fluorescente y sus variaciones, procedente de las medusas del género *Aequoria*, se introduce en el genoma de las células vivas y las proteínas con los transportadores ABC se expresan conjuntamente. Cuando los transportadores ABC se expresan con más fuerza, también se expresa con más fuerza la GFP, incrementándose así la fluorescencia. Se crean células u organismos recombinantes (véase más abajo) que reaccionan con expresión incrementada de MDR/MPR frente a las variaciones del entorno, aumentando por ello la fluorescencia en la región seleccionada de la GFP.

25 El procedimiento de detección según la invención se basa en las reacciones de células vivas recombinantes frente a su contaminación con sustancias xenobióticas. Fundamentalmente, la contaminación de las células puede tener lugar con una sustancia xenobióticas en todos los tres estados de agregación. Junto a la contaminación de las células vivas con una sustancia extraña sólida o gaseosa, la sustancia extraña a detectar puede estar también distribuida o disuelta especialmente en una solución acuosa, de manera que se presenta una contaminación de las células vivas en fase acuosa. Junto a una contaminación en agua cabe pensar aquí también en casos de aplicación en el ámbito medicinal, por ejemplo, en relación con la sangre. En el caso de la contaminación acuosa, se pueden mantener fundamentalmente células vivas o cultivos celulares completos en las correspondientes soluciones nutrientes. Es ventajoso y preferido en este caso que las células vivas procedan de organismos acuáticos que ya presentan células vivas, o de un organismo madre acuático no recombinante, en cuyo caso se trata preferentemente de un crustáceo, un cnidario, una anémona marina, un animal espinoso, una esponja o un gusano redondo o plano, particularmente preferido del platelminto *Macrostomum lignano*. En el segundo caso, las células vivas se extraen del organismo madre y se modifican por técnicas genéticas en el sentido de la invención.

35 Si se utiliza un organismo acuático vivo que ya contiene las células recombinantes, es ventajoso y preferido emplear al menos un organismo acuático vivo completo, que contenga las células vivas. En este caso, en el organismo modificado por técnicas genéticas se puede tratar, preferentemente de nuevo de un crustáceo, un cnidario, una anémona marina, un animal espinoso, una esponja o un gusano redondo o plano, particularmente preferido del platelminto *Macrostomum lignano*. El mantenimiento de estos sencillos organismos acuáticos es relativamente fácil. En este caso, es ventajoso que los organismos acuáticos empleados se hayan descifrado ya genéticamente al menos en parte (lo que es el caso en el platelminto *Macrostomum lignano*, aquí se conocen ya muchos EST – Expresse Sequence Tags) de modo que la modificación recombinante de los especiales segmentos de secuencia génica  $a_i$  con los genes de la proteína marcadora  $m_i$  se pueda emprender rutinariamente por los expertos en la materia. Las células vivas con la construcción de fusión génica  $a_i$ - $m_i$  se pueden acantonar y multiplicar en todas las partes en el organismo contaminado, especialmente también en la superficie o piel de los organismos. Allí, se puede detectar simplemente la aparición de fluorescencias marcadoras bajo contaminación en cuanto a color e intensidad. Pero para poder detectar con fiabilidad las marcas de fluorescencia en todo el organismo, es particularmente ventajoso y preferido si al menos se emplea un organismo que sea parcialmente transparente. El organismo acuático en forma del platelminto *Macrostomum lignano* es ampliamente transparente, de modo que también se pueden detectar bien en su interior las marcas de fluorescencia. En el caso de una contaminación de las células recombinantes con sustancias extrañas sólidas o gaseosas se pueden emplear también organismos completos, los cuales también muestran después reacciones respectivamente detectables, por ejemplo, sobre la piel u otras zonas externas o en el pulmón u otros órganos internos.

50 En la detección de emisiones en referencia a sus colores e intensidades es naturalmente preferida y ventajosa una detección que se lleve a cabo como detección óptica de forma automatizada. En el caso de otras propiedades marcadoras a detectar, se aplican otros principios de detección. Por ejemplo, las variaciones de los valores del pH se pueden detectar muy bien con el colorante fluorescente Ageladine A, también especialmente en organismos transparentes. Las detecciones que se basan en magnitudes eléctricas tales como corriente y tensión se pueden aplicar igualmente si las propiedades de marcación tienen influencia sobre la corriente y la tensión. Pero una

detección óptica está libre de contactos y como simple observación también se puede llevar a cabo particularmente bien de forma automatizada.

Disposiciones para llevar a cabo el procedimiento de detección según la invención se orientan según la clase de contaminación, especialmente según su estado de agregación. En el caso de una contaminación sólida o gaseosa se puede mantener en el aire todo un organismo, los cultivos celulares se mantienen en soluciones acuosas. A continuación se indica una disposición reivindicada en el caso de una contaminación líquida, especialmente acuosa. La disposición reivindicada conforme a la invención para llevar a cabo el procedimiento de detección según la invención utilizando células vivas de organismos acuáticos se caracteriza por un recipiente del hábitat para mantener vivo al menos un cultivo celular o al menos un organismo acuático vivo completo en un sistema acuoso, con un tabique permeable al agua, el cual permite un intercambio del agua con el agua del sistema acuático circundante y que presenta una abertura para introducir y extraer el cultivo celular vivo o el organismo acuático vivo, por un sistema de alimentación para la alimentación automática del cultivo celular vivo o del organismo acuático vivo, y por un sistema de detección automático con un detector para la supervisión de las propiedades marcadoras de las proteínas marcadoras fusionadas en las células del cultivo celular vivo o del organismo acuático vivo, así como por un terminal de datos al menos para el almacenamiento de los datos detectados y una estación transmisora para la transmisión de los datos detectados a un terminal externo. En el caso de una detección óptica se emplea preferente y ventajosamente un correspondiente sistema de detección óptica, especialmente para la detección de la fluorescencia en el caso de propiedades marcadoras fluorescentes. Las células empleadas, modificadas por técnica genética o los organismos acuáticos enteros no se liberan en ningún momento sino que viven en los recipientes cerrados, los cuales sin embargo en cualquier momento posibilitan el intercambio de agua.

De manera preferida y ventajosa se puede haber previsto todavía adicionalmente un dispositivo de señalización que en función de los datos detectados se dispara automáticamente y es visible en el caso de una alarma en el lugar del recipiente del hábitat, y/o una instalación de vigilancia en el recipiente del hábitat para vigilar el estado vital de los organismos acuáticos empleados. Estos sistemas son particularmente buenos para su instalación como sistemas autárquicos de alarma temprana en la proximidad de instalaciones industriales a la espera de una expulsión de sustancias xenobióticas, para poder alertar simplemente a las personas que allí se encuentran. Estos sistemas trabajan de por sí biológicamente de forma totalmente inocua y respetuosa con el medio ambiente.

Además, se puede disponer de un "kit" de ensayo con un medio a base de células vivas recombinantes para llevar a cabo el procedimiento de detección, en donde el medio muestra un diseño en forma de células vivas con al menos una construcción de fusión génica  $a_i-m_i$  procedente de un segmento de secuencia génica  $a_i$  que codifica para al menos una proteína de fusión  $A_i$  de la familia de las proteínas transportadoras ABC, y un gen de proteína marcadora  $m_i$  que codifica para al menos una proteína marcadora  $M_i$  de la familia de las Green Fluorescent Proteins, la cual no influye sobre la codificación de la proteína  $A_i$ , codificando para la construcción de fusión génica  $a_i-m_i$ ; una proteína de fusión  $A_i-M_i$  a partir de la proteína de fusión  $A_i$  y la proteína marcadora  $M_i$ . Las proteínas transportadoras del sistema de defensa de una célula viva, las cuales se han modificado de forma recombinante y marcado con una proteína marcadora fluorescente GFP, no se emplearon hasta ahora como sensores para la detección de sustancias nocivas. En este caso, las células vivas empleadas se pueden generar por una derivación recombinante de un organismo madre acuático no recombinante, preferentemente de un crustáceo, una medusa, una anémona marina, un animal espinoso, una esponja o un gusano redondo o platelminto, de modo particularmente preferido del gusano platelminto *Macrostonum lignano*. Además, las células vivas se pueden preparar a partir de cultivos celulares no recombinantes o de líneas celulares inmortalizadas de forma no recombinante.

Tales cultivos celulares o líneas celulares pueden haber sido depositadas en una colección de microorganismos y cultivos celulares, públicamente accesible. Lo mismo es válido también para cultivos celulares y líneas celulares con células recombinantes. Otros detalles relacionados con la invención se pueden deducir del siguiente ejemplo de ejecución.

### Ejemplo de ejecución

El procedimiento de detección y la disposición para llevar a cabo el procedimiento de detección según la invención y sus modificaciones ventajosas se ilustran más detalladamente en un ejemplo de realización con ayuda de la Figura 1 esquemática y no a escala, para mejor entendimiento de la invención. En este caso, el ejemplo de ejecución se podría designar "codificación por colores de estructuras químicas xenobióticas por organismos marinos fluorescentes" (en inglés "color codina of xenobiotic chemical structures by fluorescent marine organisms").

En la Figura 1 se representa un sistema acuático 01, en el ejemplo expuesto una bahía marina. En el borde de la bahía se encuentra una instalación industrial 02, en el ejemplo representado una industria química. Desde la planta química 02 se hacen llegar sustancias xenobióticas 03 (símbolo, signo de exclamación) al sistema acuático 01. En la bahía se bañan personas. Una alerta temprana de sustancias nocivas tiene por lo tanto máximo sentido.

En primer plano se representa una instalación 04 para llevar a cabo el procedimiento de detección según la invención. Se muestra un recipiente de hábitat 05 para mantener vivas una pluralidad de organismos acuáticos 06 (en el segmento recortada), en el ejemplo que se muestra se trata de gusanos platelmintos del género *Macrostonum lignano* dispuestos en el sistema acuático 01. Estos gusanos son ampliamente transparentes y

5 permiten sin problemas una detección de marcas fluorescentes en su interior. El recipiente de habitáculo 05 presenta un tabique 07 permeable al agua. Éste permite sin perturbaciones un intercambio de agua con el agua del sistema acuático circundante 01. En el tabique 07 se encuentra una abertura 08 cerrable para la introducción y extracción de los organismos acuáticos 06 y un sistema de alimentación 09 para la alimentación automática de los organismos acuáticos 06. En el recipiente de habitáculo 05 se encuentra, además, un sistema de detección 10 automático con una fuente de luz 11 para iluminar los organismos acuáticos 06 y un detector 12, en el ejemplo de ejecución mostrado un detector óptico, para la vigilancia de los organismos acuáticos 06 en el sentido de una detección de su emisión fluorescente. Además, se ha previsto un terminal de datos 13 que presenta una alimentación externa de corriente apoyada por una batería, al menos para el almacenamiento de los datos detectados, y una estación transmisora 14 para transmitir los datos detectados a una estación receptora 15 externa. Además, junto al recipiente del habitáculo 05 se ha dispuesto todavía una instalación de señales 16 ópticas, que en función de los datos detectados se dispara automáticamente y en caso de un disparo en el lugar del depósito del hábitat 05 se visibiliza como aviso de una contaminación por la aparición de sustancias xenobióticas, especialmente tóxicas. Finalmente, se ha previsto, además, un dispositivo de vigilancia 17 en el depósito del hábitat 05 para vigilar el estado vital de los organismos acuáticos 06 empleados. En este caso se puede tratar, por ejemplo, de una videocámara.

20 La modificación genética de las células vivas de los organismos acuáticos 06 para poderlos emplear en el procedimiento de detección según la invención, se ha representado en el recorte inferior, aumentado, de la Figura 1. En una célula viva recombinante 19 se muestra un plásmido 18 con un segmento de secuencia génica  $a_i$ , que codifica para una proteína de fusión  $A_i$ , en el ejemplo de ejecución elegido una proteína transportadora MDR, y con un segmento de secuencia génica  $a_2$  que codifica para una proteína de fusión  $A_2$ , en el ejemplo de ejecución elegido una proteína transportadora MRP. Las dos proteínas transportadoras proceden de la familia de las proteínas transportadoras ABC. El segmento de secuencia génica  $a_1$  se activa o regula por un promotor  $P_1$  y el segmento de secuencia génica  $a_2$  se activa o regula por un promotor  $P_2$ . El segmento de secuencia génica  $a_1$  se ha modificado de forma recombinante con una secuencia de gen marcador  $m_1$  y el segmento de secuencia génica  $a_2$  se ha modificado de forma recombinante con una secuencia de gen marcador  $m_2$ . La secuencia génica  $m_1$  codifica en el ejemplo de ejecución elegido para una proteína marcadora  $M_1$  fluorescente y la secuencia génica  $m_2$  codifica en el ejemplo de ejecución elegido para una proteína marcadora  $M_2$  fluorescente. Las dos proteínas marcadoras proceden de la familia de las GFP. La construcción de fusión génica del segmento de secuencia génica  $a_1$  y la secuencia del gen marcador  $m_1$  se designa con  $a_1-m_1$ . Codifica para la proteína de fusión  $A_1-M_1$ . La construcción de fusión génica del segmento de secuencia génica  $a_2$  y la secuencia del gen marcador  $m_2$  se designa  $a_2-m_2$ . Codifica para la proteína de fusión  $A_2-M_2$ . Las designaciones con el índice  $i$  indican que se pueden haber modificado de forma recombinante otros segmentos de secuencia génica  $a_i$  por otros marcadores  $m_i$ , los cuales después codifican para otras proteínas de fusión  $A_i$  y otras proteínas marcadoras  $M_i$  con otras propiedades marcadoras en otras construcciones de fusión  $A_i-M_i$ .

40 En el ejemplo de ejecución mostrado, al entrar en contacto el plásmido 18 del organismo acuático 06 con la sustancia xenobiótica 03 se activa el sistema de defensa propio de la célula a través del promotor  $P_1$ . Por ello, se generan proteínas MDR  $A_1$  de forma múltiple y, con ello también, proteínas marcadoras  $M_1$ , las cuales por excitación emiten fluorescencia verde. Mediante el sistema de detección 10 automático se reconoce la emisión fluorescente verde incipiente o reforzada. Los datos se transmiten a la estación receptora 15 y se evalúan. Al mismo tiempo se dispara la instalación de señalización óptica 16 advirtiendo de forma fiable y temprana a las personas que se encuentran en las proximidades del sistema acuático 01.

45 Con el procedimiento de detección según la invención a base de secuencias génicas recombinantes en el genoma de una célula modificada por técnica genética, la cual al entrar en contacto con una sustancia xenobiótica genera una respuesta en forma de expresión génica dinámica, se puede construir por lo tanto un sistema de alarma para el ser humano, relativamente sencillo y fiable. Se pueden detectar también especialmente aquellas contaminaciones en las que a causa de sus bajas concentraciones otros procedimientos de detección fracasan. Junto con la disposición y el "kit" de ensayo para llevar a cabo el procedimiento de detección según la invención, el cual se basa especialmente en el mantenimiento de organismos acuáticos enteros, vivos, modificados por técnicas genéticas, en un sistema acuático, se puede ofrecer para la práctica un sistema complejo, preferido, que detecta de forma fiable diferentes sustancias xenobióticas en las más variadas situaciones, y advierte de ellas.

#### Lista de referencias

- 01 sistema acuático
- 02 instalación técnica
- 55 03 sustancia xenobiótica
- 04 disposición para llevar a cabo el procedimiento de detección
- 05 recipiente del hábitat
- 06 presenta un organismo acuático vivo entero (modificado por tecnología genética) de células vivas 19

	07	tabique permeable al agua
	08	abertura cerrable
	09	sistema de alimentación
	10	sistema de detección automático
5	11	fuentes de luz
	12	detector
	13	terminal de datos
	14	estación emisora
	15	estación receptora externa
10	16	dispositivo de señalización óptica
	17	dispositivo de vigilancia
	18	plásmido
	19	célula viva recombinante
	$a_i$	segmento de secuencia génica, $i=1\dots n$
15	$m_i$	secuencia de gen marcador
	$a_i-m_i$	construcción de fusión génica
	$A_i$	proteína funcional
	$M_i$	proteína marcadora
	$A_i-M_i$	proteína de fusión
20	$P_i$	Promotor

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección con la utilización de células vivas recombinantes (19) para la detección de aquellas sustancias xenobióticas (03) que al entrar en contacto con las células vivas (19) a través de al menos un promotor activo  $P_i$  en las células vivas (19) provocan una activación o alta regulación de la expresión de al menos un segmento de secuencia génica  $a_i$ , el cual codifica para al menos una proteína funcional  $A_i$  con función conocida, en donde el segmento de secuencia génica  $a_i$  se ha modificado de forma recombinante por fusión con al menos un gen de proteína marcadora  $m_i$  que codifica para al menos una proteína marcadora  $M_i$  con propiedades de marcación conocidas, la cual no influye sobre la codificación de la proteína de fusión  $A_i$ , y la construcción de fusión génica  $a_i-m_i$  codifica para una proteína de fusión  $A_i-M_i$  a partir de la al menos una proteína funcional  $A_i$  y la al menos una proteína marcadora  $M_i$ , detectándose una mayor incidencia de la al menos una proteína marcadora  $M_i$  como reacción celular a través de una detección integral de sus propiedades marcadoras.
2. Procedimiento de detección según la reivindicación 1, caracterizado por que se pueden detectar sustancias xenobióticas (03) que son tóxicas y/o de naturaleza desconocida y/o que se presentan en concentraciones sin relevancia toxicológica.
3. Procedimiento de detección según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que se pueden detectar sustancias xenobióticas (03) en el entorno de instalaciones industriales (02) y/o en sistemas acuáticos (01).
4. Procedimiento de detección según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que diferentes segmentos de secuencia génica  $a_i$ , que codifican para diferentes proteínas funcionales  $A_i$ , están modificadas de forma recombinante con genes de proteínas marcadoras  $m_i$ , que codifican para proteínas marcadoras  $M_i$  con diferentes propiedades marcadoras, y las construcciones de fusión génica  $a_i-m_i$  codifican para diferentes proteínas de fusión  $A_i-M_i$ , deduciéndose a través de la detección de las diferentes propiedades de marcación el aumento de codificación para las correspondientes proteínas de fusión  $A_i$ .
5. Procedimiento de detección según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el al menos un segmento de secuencia génica  $a_i$ , activado o altamente regulado en su expresión por una sustancia xenobiótica (03) es uno que codifica para los mecanismos de defensa y desintoxicación de las células vivas (19), siendo la proteína funcional  $A_i$  en las proteínas de fusión  $A_i-M_i$  un miembro de la familia de las proteínas transportadoras ABC, cuya función es el transporte a la membrana de la sustancia extraña.
6. Procedimiento de detección según la reivindicación 5, caracterizado por que el segmento de secuencia génica  $a_i$  codifica para una proteína de fusión  $A_i$  en las proteínas de fusión  $A_i-M_i$  en forma de una Multidrug Resistance Proteins (proteína transportadora MDR) y/o de una Multidrug Resistance-Associated Proteins (proteína transportadora MRP) de la familia de las proteínas transportadoras ABC.
7. Procedimiento de detección según la reivindicación 6, caracterizado por que en el caso de una mayor incidencia de proteínas de transporte MPR como reacción celular se deduce una sustancia xenobiótica (03) con moléculas no cargadas, con longitudes de cadena del mismo orden de magnitud, y en el caso de una mayor incidencia de proteínas de transporte MRP como reacción celular se deduce una sustancia xenobiótica con moléculas cargadas, con longitudes de cadena entre 100 Da y 8 kDa, preferentemente entre 1 y 3 kDa, de modo particularmente preferido entre 1,5 y 2,5 kDa.
8. Procedimiento de detección según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que se emplean proteínas marcadoras  $M_i$  con fluorescencia como propiedad marcadora, detectándose al menos la longitud de onda de la fluorescencia y/o la intensidad de fluorescencia.
9. Procedimiento de detección según la reivindicación 8, caracterizado por que se emplean proteínas marcadoras  $M_i$  de la familia de las Green Fluorescent Proteins (GFP) o de sus homólogos fluorescentes o de derivados o mutantes de estas GFPs.
10. Procedimiento de detección según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que las células vivas (19) proceden de un organismo acuático (06), que presenta ya células vivas (19), o de un organismo acuático madre no recombinante, pudiéndose tratar en este caso preferentemente de un crustáceo, una medusa, una anémona marina, un animal espinoso, una esponja o un gusano redondo o platelminto, de modo particularmente preferido del gusano platelminto *Macrostomum lignano*.
11. Procedimiento de detección según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que se emplea al menos un organismo acuático vivo (06) completo que presenta las células vivas (19), pudiéndose tratar en este caso preferentemente de un crustáceo, una medusa, una anémona marina, un animal espinoso, una esponja o un gusano redondo o platelminto, de modo particularmente preferido del gusano platelminto *Macrostomum lignano*.
12. Procedimiento de detección según la reivindicación 10 u 11, caracterizado por que el organismo acuático (06) empleado es al menos parcialmente transparente.

13. Procedimiento de detección según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la detección se lleva a cabo como detección óptica de forma automatizada.
- 5 14. Disposición (04) para llevar a cabo el procedimiento de detección según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por un recipiente de hábitat (05) para mantener vivo al menos un cultivo celular con las células vivas (19) o al menos un organismo acuático (06) completo que presenta las células vivas (19) en un sistema acuático (01) con un tabique (07) permeable al agua, que permite un intercambio con el agua del sistema acuático (01) circundante, y que presenta una abertura (08) cerrable para introducir y extraer el cultivo celular o el organismo acuático (06), por un sistema de alimentación (09) para la alimentación automática del cultivo celular o del organismo acuático (06) y por un sistema de detección automático (10) con un detector (12),  
10 especialmente un detector óptico para la supervisión de las propiedades marcadoras de las proteínas marcadoras fusionadas en las células del cultivo celular o del organismo acuático (06), así como un terminal de datos (13) al menos para el almacenamiento de los datos detectados y una estación emisora (14) para transmitir los datos detectados a un terminal externo (15).
- 15 15. Disposición (04) según la reivindicación 14, caracterizada por una instalación de señalización óptica (16), que se puede disparar automáticamente en función de los datos detectados y que en caso de un disparo sea visible en el lugar del recipiente del hábitat (05), y/o por un dispositivo de vigilancia (17) en el recipiente del habitáculo (05) para vigilar el estado vital del cultivo celular empleado o del organismo acuático (06).

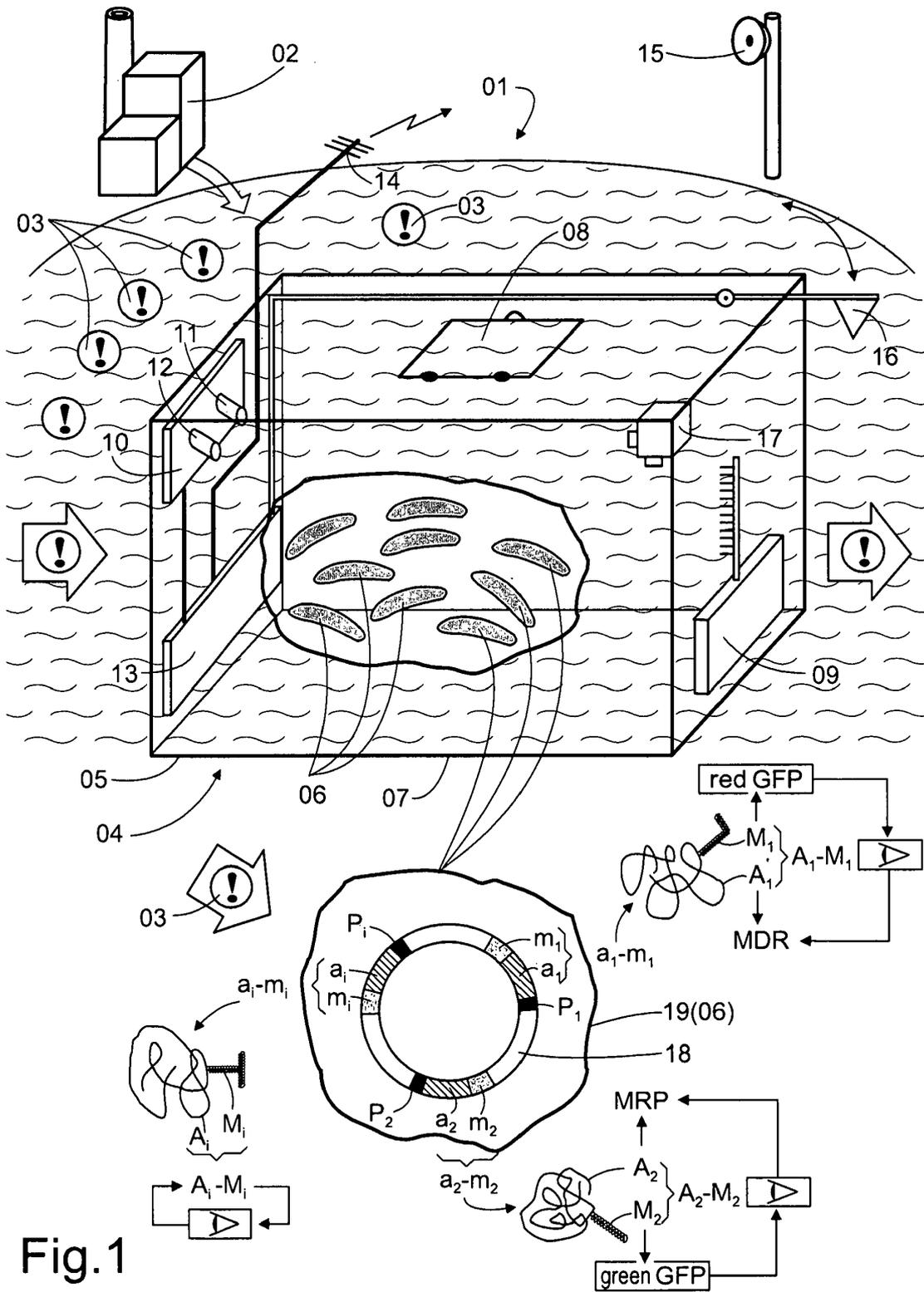


Fig.1