



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 307 395**

② Número de solicitud: 200602309

⑤ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)
C12R 1/245 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫ Fecha de presentación: **04.09.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2008**

Fecha de la concesión: **04.06.2009**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **09.07.2009**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
09.07.2009

⑰ Titular/es: **Universidad de Oviedo
Plaza de Riego, 4 - Edificio Histórico
33003 Oviedo, Asturias, ES**

⑱ Inventor/es: **Suárez Fernández, Juan Evaristo y
Soberón Maltos, Nora Elsa**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Método rápido de detección y evaluación de agentes genotóxicos.**

㉒ Resumen:

Método rápido de detección y evaluación de agentes genotóxicos por RT-PCR basado en la inducción del ciclo lítico de bacteriófagos que detecta y cuantifica la capacidad que tienen ciertas condiciones físicas y compuestos químicos para inducir alteraciones en el material genético. La técnica se fundamenta en la detección de la liberación de profagos de bacterias lisogénicas mediante PCR o RT-PCR, usando como cebadores oligonucleótidos que flanquean la región *attP* del fago. El método utiliza bacterias Gram positivas o Gram negativas para aumentar el rango de agentes a probar. Esta metodología es aplicable a la detección de genotoxicidad ambiental y a la de nuevos compuestos terapéuticos.

ES 2 307 395 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método rápido de detección y evaluación de agentes genotóxicos.

5 La presente invención se refiere al desarrollo de un método de detección y evaluación de agentes genotóxicos por PCR o RT-PCR basado en la inducción del ciclo lítico de bacteriófagos. Esta metodología detecta y cuantifica la capacidad que tienen ciertas condiciones físicas y compuestos químicos para inducir alteraciones en el material genético. La técnica se fundamenta en la detección de la liberación de profagos de bacterias lisogénicas mediante PCR o RT-PCR, usando como cebadores oligonucleótidos que flanquean la región *attP* del fago.

10 Estado de la técnica anterior

15 Se denomina actividad genotóxica a la capacidad que tienen diversos compuestos químicos y agentes físicos para inducir, directa o indirectamente, alteraciones en el material genético que conducen al bloqueo de su replicación o a la aparición de mutaciones, las cuales pueden alterar las características de los organismos y/o inducir la aparición de una patología asociada.

20 En los últimos años, se ha generalizado el uso de metodologías de química combinatoria para generar familias de moléculas derivadas de un “compuesto líder”, que posee actividad antibiótica y/o antitumoral (compuestotecas). Uno de los problemas asociados a esta práctica es el ensayo de la posible actividad biológica de las múltiples variantes sintetizadas.

25 Por otro lado, la contaminación del agua y el suelo por diversos compuestos resultantes de la actividad industrial, es una fuente de preocupación sanitaria importante, entre otras causas, porque dichos compuestos con potencial efecto mutagénico y xenobiótico pueden acceder a la cadena alimentaria a través del consumo de plantas, que los absorben, o de los animales herbívoros, que los acumulan en su organismo.

30 En la actualidad, para la medida de la genotoxicidad de sustancias biológicamente activas y/o potencialmente nocivas para el medio ambiente se utilizan cultivos de microorganismos o de células animales. Estas últimas crecen muy despacio y precisan de instalaciones y procedimientos sofisticados, por lo que la obtención de resultados es lenta y costosa. Así pues, las ventajas principales de los tests basados en la actividad microbiana son la sencillez de manejo y la rapidez en la obtención de resultados, lo que los hace, comparativamente, baratos.

35 Los ensayos microbianos de genotoxicidad se basan en dos principios:

- Detectan mutantes inducidos por el agente genotóxico capaces de desarrollarse en medios en los que el organismo parental no lo hace.
- Detectan la respuesta SOS, que se induce como consecuencia de situaciones de estrés, especialmente las derivadas del daño al material genético bacteriano.

40 Dentro de los primeros se engloban el test de Ames (Maron y Ames, “Revised methods for the *Salmonella mutagenicity test*”. *Mutat Res.* 1983 May; 113(3-4):173-215) y el de resistencia a la arabinosa (Dorado y Pueyo, “L-arabinose resistance test with *Salmonella typhimurium* as a primary tool for carcinogen screening”. *Cancer Res.* 1988 Feb 15; 48(4):907-12). En ambos se utilizan cepas de *Salmonella typhimurium* con mutaciones puntuales que les impiden, respectivamente, sintetizar histidina o crecer en presencia del monosacárido. Lo que se mide es la capacidad del agente genotóxico de revertir dichas mutaciones, dando lugar a bacterias que crecen en medios sin el aminoácido o en presencia de arabinosa. Estos tests presentan tres inconvenientes: a) se necesita una media de tres días para completarlos y requieren bastante material; b) si el compuesto que se analiza es tóxico, la bacteria morirá durante el tratamiento, por lo que no se podrá valorar la frecuencia de reversión de la mutación y c) se utilizan bacterias Gram negativas exclusivamente. Las bacterias de este grupo presentan una pared celular con una capa externa impermeable para multitud de compuestos, lo que restringe el universo de sustancias a probar. Este problema ha sido solventado, en parte, con el uso de mutantes que presentan alteraciones en su pared para hacerla más permeable, aunque esto provoca un menor vigor de las cepas y dificulta su utilización.

55 La respuesta SOS es un mecanismo de emergencia que las bacterias activan especialmente cuando sufren alteraciones en su material genético que afectan a su replicación o a la fidelidad de la transcripción del mensaje. Consiste en la activación de una serie de genes cuyos productos están destinados a reparar el daño que actuó como inductor de la respuesta.

60 Las metodologías que detectan la respuesta SOS se agrupan en dos categorías:

- a) Tests basados en la detección de la actividad de un promotor inducible por SOS.
- b) Tests que miden la inducción de profagos residentes en el genoma de la bacteria.

65 En el primer grupo, el promotor activable por SOS provoca la expresión de un gen cuyo producto da lugar a un cambio en el cultivo que es mensurable. Los genes utilizados como reporteros son básicamente dos:

lacZ, que codifica para una β -galactosidasa (cromotest) (Quillardet *et al.* "SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity". Proc Natl Acad Sci USA. 1982 Oct; 79(19):5971-5) y el complejo de la luciferasa (WO94113831, "A highly sensitive method for detecting environmental insults", 1994). En el primer caso, las células, una vez tratadas con el compuesto a probar, se rompen para liberar el enzima y el extracto se añade a un sustrato para dar lugar a un producto coloreado. En el segundo, se genera luz cuya intensidad puede ser medida. Una ventaja de estos métodos respecto a los anteriores es que se acorta el tiempo necesario para observar los resultados. La detección de la actividad β -galactosidasa presenta algunos inconvenientes respecto a la observación de la luminiscencia, como la necesidad de lisar las células y el gasto asociado a la detección de la actividad enzimática. Los inconvenientes de ambos procedimientos son que en ellos se utilizan organismos Gram negativos recombinantes, que aparte de poder presentar el problema de impermeabilidad indicado anteriormente, pueden plantear reservas respecto a su inocuidad medio ambiental. Por otro lado, se miden reacciones enzimáticas, de manera que si el agente a probar inhibe la producción del enzima se pueden obtener resultados negativos falsos.

Los tests que miden la inducción de profagos se basan en la capacidad que tienen algunos virus bacterianos de integrar su ADN en puntos concretos del genoma de la célula que han infectado. Los virus que presentan esta propiedad se denominan atemperados y las células que los albergan se dice que son lisogénicas. La inducción de la respuesta SOS va a provocar la liberación del genoma viral y, en último término, la generación de una progenie viral y la lisis de la célula hospedadora (Walter G. C. "The SOS response of *Escherichia coli*". En: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology* (Ingraham, J. L., Low K. B., Magasanik, B., Schaechter M. and Umberger, H. E., Eds.) 1987. pp. 1346-1357. A. S. M. Press. Washington D. C.; Janion "Some aspects of the SOS response system: a critical survey". Acta Biochim Pol. 2001 48(3):599-610). Así pues, en estos métodos, denominados de microescrutinio, se cuentan las placas de lisis que se originan en una cepa susceptible como consecuencia de la acción de un agente genotóxico sobre un cultivo lisogénico y, complementariamente, se mide la pérdida de turbidez de dicho cultivo. En la práctica se usan células lisogénicas de *Escherichia coli* que albergan al profago lambda (Rossman T.G., Molina M., and Meyer L.W. "The genetic toxicology of metal compounds: I. Induction of lambda prophage in *E. coli* WP2s (lambda). Environ Mutagen. 1984 6(1):59-69.; DeMarini, D.M., Brooks, H.G. and Parkes, D.G. Jr. "Induction of prophage lambda by chlorophenols". 1990 Environ. Mol. Mutagen. 15: 1-9). Estos métodos son baratos, no hacen uso de organismos modificados genéticamente y el propio fago lisa a las células, por lo que no es necesario forzar la rotura de las mismas.

Sin embargo, estos métodos de microescrutinio tienen inconvenientes asociados a: a) el excesivo tiempo empleado para la obtención de resultados, dos días aproximadamente, b) la necesidad de trabajar con dos cepas, una lisogénica para el fago y la otra susceptible, c) lo laborioso de los métodos, d) la producción de nuevos virus es un proceso complejo con muchos estadios intermedios (replicación, síntesis de proteínas, ensamblaje, etc.) cada uno de los cuales puede ser inhibido por compuestos concretos, lo que podría impedir la generación de una progenie, dando lugar a un resultado negativo falso. Además, el empleo exclusivo de bacterias Gram negativa en estos ensayos puede producir resultados negativos falsos debido a que la pared de estas bacterias es impermeable al paso de ciertos agentes genotóxicos.

Definiciones

Fago A2: Es un bacteriófago atemperado capaz de infectar a las especies *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei*. El virión presenta cabezas isométricas y colas no contráctiles. Su genoma consiste en una doble hebra de ADN de unas 43.4 Kb. El fago presenta extremos cohesivos 3' sobresalientes que permiten la circularización del genoma cuando se introduce en una bacteria. Se espera que diferentes cadenas nucleotídicas aisladas de diferentes cepas del fago y correspondientes a una misma región tengan una homología de al menos el 90% debido a que dichas secuencias se encuentran conservadas por la evolución. Del mismo modo, también podrán encontrarse secuencias cuya homología sea superior al 95% o al 98%.

Fago Lambda: es un virus atemperado cuyo genoma reside en una molécula de ADN en doble cadena de aproximadamente 48.5 Kb. con extremos cohesivos 5' sobresalientes. Infecta a diversas cepas de la especie *E. coli*. Se espera que diferentes cadenas polinucleotídicas aisladas de diferentes cepas del fago y correspondientes a una misma región tengan una homología de al menos el 90% debido a que dichas secuencias se encuentran conservadas por la evolución. Del mismo modo, también podrán encontrarse secuencias cuya homología sea superior al 95% o al 98%.

Región o punto *attP*: El sitio *attP* es la región del genoma viral en el que ocurre una recombinación que conducirá a la integración/escisión de dicho genoma en el cromosoma bacteriano (Alvarez M.A., Herrero M., and Suárez J.E. "The site-specific recombination system of the *Lactobacillus* species bacteriophage A2 integrates in gram positive and gram negative bacteria" 1998 Virology. Oct 10; 250(1):185-93. (Campbell 2003. "Prophage insertion sites". Res. Microbiol. 154: 277-282).

Fragmentos polinucleotídicos: por este término se entenderán secuencias de polinucleótidos continuos de al menos 10 nucleótidos, preferentemente de al menos 20 nucleótidos y más preferentemente de al menos 25 nucleótidos que deriven de otros polinucleótidos mayores.

PCR a tiempo real: esta técnica, también conocida como PCR cuantitativa, posibilita la detección inmediata de la amplificación de secuencias de ADN o ARN de interés y proporciona un dato cuantitativo que es función de la concentración inicial de la molécula usada como molde. La medida se hace por fluorescencia, existiendo dos estrategias de

detección: 1) uso de fluorocromos que sólo emiten fluorescencia cuando están intercalados con ADN en cadena doble (dsADN). De esta manera, cuanto más dsADN se genera, más fluorescencia se detecta. 2) utilización de cebadores con fluorescencia enmascarada. En este caso, la ADN polimerasa desplaza el agente que reprime la fluorescencia y así, la emisión de luz será proporcional a la concentración de ADN amplificado.

5 *Amplificación:* se denomina así a cualquier fragmento de ADN que resulta de la polimerización repetida de un ácido nucleico molde (ADN o ARN) limitado por dos oligonucleótidos cebadores.

10 *Cebador:* polinucleótido de pequeño tamaño que se corresponde con una forma polimérica de nucleótidos de una longitud de al menos 10 nucleótidos, preferentemente entre 15 y 30 nucleótidos, compuesto por ribonucleótidos o bien desoxirribonucleótidos, y que se une específicamente a ADN o ARN para su amplificación y actúa como punto de partida para la acción catalítica de una polimerasa.

15 *Kit de análisis:* se entiende por kit cualquier soporte que permita la detección de secuencias polinucleotídicas. Dichas secuencias pueden haber sido amplificadas fuera del kit o dentro de éste mediante cebadores. Adicionalmente, el kit puede contener cualquier reactivo o compuesto necesario para su puesta a punto, además de medios de cultivo que posibiliten el crecimiento de aquellas bacterias de las que proceden las secuencias a analizar.

20 Por otro lado, la detección de las secuencias en el kit puede ser realizada mediante sondas marcadas o no, PCR a tiempo real, u otras técnicas sobradamente conocidas en el estado de la técnica.

Explicación de la invención

25 Existe la necesidad de encontrar métodos que permitan detectar y evaluar de manera fiable la acción de los agentes genotóxicos sin las limitaciones que tienen las técnicas actualmente disponibles. El sistema que propone la presente invención pertenece a la categoría de los ensayos microbianos de genotoxicidad, que detectan la inducción de profagos residentes en genomas bacterianos ante la estimulación de la respuesta SOS.

30 Durante el proceso de integración del profago, tanto el ADN viral como el bacteriano se abren en puntos específicos, denominados respectivamente *attP* y *attB*, a partir de los cuales se produce la soldadura entre ambas moléculas de ADN, quedando el genoma viral integrado en el cromosoma bacteriano (Fig. 1).

35 La liberación del ADN viral, consecuencia de la activación de la respuesta SOS, es el proceso inverso al expuesto en el párrafo anterior y que ocurre en los mismos puntos. De este modo, los segmentos de ADN viral que se encuentran a cada lado de *attP* y que, por lo tanto, están contiguos en el ADN del fago independiente, quedan separados por todo el ADN bacteriano después de la integración, y vuelven a quedar adyacentes una vez que se libera el profago (Fig. 1).

40 Los autores de la presente invención han desarrollado un nuevo procedimiento de análisis y evaluación de compuestos genotóxicos de elevada sensibilidad, amplio espectro de detección e interés potencial en sectores como el farmacéutico y el medioambiental, basado en la amplificación y detección de las regiones que flanquean al sitio *attP* de un fago atemperado de bacterias Gram positivas. Además, dicho procedimiento se combina con la detección de la inducción del ciclo lítico de fagos atemperados de bacterias Gram negativas. Más concretamente, los bacteriófagos y las especies bacterianas empleadas son respectivamente el fago A2/*Lactobacillus casei* (*L. casei*) y el fago lambda/*Escherichia coli* (*E. coli*). Esta combinación aumenta el universo potencial de compuestos que pueden ser evaluados, ya que la diferente estructura de la pared celular de las bacterias Gram positivas y de las Gram negativas facilita el paso a su través de moléculas con propiedades físico-químicas muy distintas, grandes (incluso macromoléculas) e hidrofílicas en el primer caso y pequeñas e hidrofóbicas en el segundo.

50 Así, la eliminación del efecto barrera jugado por la membrana externa de las bacterias Gram negativas podría ser de gran utilidad para la detección de actividades antitumorales, ya que muchos agentes que se unen al ADN y que no son activos frente a éstas bacterias porque no acceden a su citoplasma, si son inhibitorias para las bacterias Gram positivas. Por lo tanto, el análisis del poder genotóxico de determinadas sustancias empleando únicamente bacterias Gram negativas, tales como *E. coli* o de *S. Typhimurium*, puede dar lugar a conclusiones erróneas.

55 Además, el empleo de *L. casei* y *E. coli* supone una ventaja adicional respecto de bacterias tales como *S. Typhimurium* o bacterias modificadas genéticamente, ya que no conlleva riesgos para la salud humana y el medio ambiente y no debe realizarse en laboratorios especialmente acondicionados para la manipulación de este tipo de microorganismos.

60 Por otro lado, el presente método únicamente precisa inocular el medio de cultivo, recoger muestras a tiempos determinados de incubación y preparar la reacción de PCR o RT-PCR. No es necesario sembrar los organismos en medios indicadores como ocurre con los métodos basados en detección de retromutaciones o en el microescrutinio, el cual precisa, además, de dos cepas, la lisogénica y la indicadora sobre la que se forman las placas de lisis. Además, en los métodos de PCR y RT-PCR las células no tienen que romperse como ocurre con el cromotest, ya que el calentamiento a 95°C en el primer paso del PCR las lisa.

65 Así, un primer aspecto de la presente invención se relaciona con un método de detección y evaluación de agentes genotóxicos, mediante amplificación por PCR con cebadores que hibridan con regiones que comprenden al sitio *attP*

ES 2 307 395 B2

del genoma de al menos dos fagos atemperados, capaces de infectar diferencialmente a bacterias Gram positiva y Gram negativa, que comprende:

- 5 a.- Incubar al menos una alícuota de una bacteria Gram positiva lisogénica para un fago y al menos una alícuota de una bacteria Gram negativa lisogénica para un fago.
- b.- Someter al cultivo a la acción de al menos un agente genotóxico.
- 10 c.- Amplificar secuencias que comprendan la región *attP*, sus secuencias complementarias o fragmentos de las mismas.
- d.- Detección de los amplicones obtenidos en el paso c.

15 En una realización preferida de este aspecto de la invención la bacteria Gram positiva es *Lactobacillus casei*, el fago atemperado para dicha bacteria es el fago A2 y la secuencia amplificada tiene al menos un 90%, preferentemente un 95% y más presentemente un 98% de homología con la secuencia SEQ ID 1, la secuencia complementaria o fragmentos de la mismas. En una realización aun más preferida la secuencia amplificada es la SEQ ID 1, la secuencia complementaria o fragmentos de las mismas. Y en una realización todavía mas preferida la región amplificada es el
20 fragmento SEQ ID 2 o su secuencia complementaria.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención la bacteria Gram positiva es *Escherichia coli*, el fago atemperado para dicha bacteria es el fago lambda y la secuencia amplificada tiene al menos un 90%, preferentemente un 95% y más presentemente un 98% de homología con la secuencia SEQ ID 5, la secuencia complementaria o
25 fragmentos de la mismas. En una realización aun más preferida la secuencia amplificada es la SEQ ID 5, la secuencia complementaria o fragmentos de las mismas. Y en una realización todavía más preferida la región amplificada es el fragmento SEQ ID 6 o su secuencia complementaria.

En otra realización preferida de la presente invención los cebadores tienen una longitud de al menos 10, preferen-
30 temente entre 15 y 30 nucleótidos. En una realización aun más preferida, dichos cebadores tienen cualquiera de las SEQ ID 3, 4, 5 y 6.

En otra realización aun más preferida de la presente invención la PCR es una PCR múltiple.

35 Un segundo aspecto de la presente invención se relaciona con kit para la detección y evaluación de agentes genotóxicos que comprende al menos una bacteria Gram positiva, al menos una Gram negativa lisogénicas para fagos inducibles por respuesta SOS o el genoma de dichas bacterias y las secuencias que comprenden a los sitios *attP* de dichos fagos, sus secuencias complementarias o fragmentos de las mismas.

40 En una realización más preferida del presente aspecto de la invención la bacteria Gram positiva es *Lactobacillus casei* y la Gram negativa es *Escherichia coli*.

En otra realización aun mas preferida de este aspecto de la invención las secuencias que comprenden al sitio *attP* pertenecen a los fagos A2 y lambda y tienen al menos 90%, preferentemente un 95% y más preferentemente un 98%
45 de homología con SEQ ID 1, SEQ ID 5, sus secuencias complementarias o fragmentos de las mismas. Y todavía más preferentemente, las secuencias que comprenden al sitio *attP* que tienen la SEQ ID 2, SEQ ID 6 o sus secuencias complementarias.

En una realización preferida, el kit comprende cebadores capaces de amplificar cualquiera de las secuencias men-
50 cionadas en este aspecto de la invención. Mas preferentemente, dichos cebadores tienen cualquiera de las SEQ ID 3, 4, 7 y 8.

Breve descripción de las figuras

55 Figura 1.- Esquema de la disposición del ADN viral (línea gruesa) respecto al bacteriano. Los sitios *attP* y *attB* son los puntos en los que ocurre la recombinación que conducirá a la integración/escisión del ADN viral. Las flechas horizontales representan a los oligonucleótidos cebadores. Obsérvese que los oligonucleótidos, que tienen orientación divergente en el fago integrado, pasan a ser convergentes en el ADN viral autónomo. El rectángulo colocado entre
60 ambos cebadores representa el segmento que resultará amplificado por PCR.

Figura 2.- Influencia de la mitomicina C sobre la escisión del genoma del fago A2 del cromosoma de una cepa lisogénica de *Lactobacillus casei*, medida por RT-PCR (el segmento amplificado está flanqueado por dos cebadores que enmarcan el sitio *attP* del fago). ● Cultivo sin Mitomicina C; ■ 12,5 ng/ml; ▲ 50 ng/ml; ◆ 300 ng/ml; × 1000
65 ng/ml; ○ 3000 ng/ml; □ 5000 ng/ml; Δ 10000 ng/ml. Nótese que en la gráfica los valores de Ct (eje de ordenadas) van de mayor a menor. La razón de este tipo de representación se deriva del hecho de que los valores de Ct son tanto más pequeños cuanto mayor es la concentración del ADN molde, que es el parámetro que nos indica la magnitud del efecto genotóxico de la mitomicina C.

ES 2 307 395 B2

Figura 3.- Influencia de la mitomicina C sobre la producción de nuevos virus por un cultivo de *Lactobacillus casei* lisogénico para el fago A2. Los sobrenadantes de cultivo se incluyeron en medio semisólido sembrado con *L. casei* no lisogénico, utilizando la técnica de la doble capa y se incubaron durante la noche hasta conseguir visualizar las placas de lisis en el césped de la cepa indicadora. ● Cultivo sin Mitomicina C; ■ 12,5 ng/ml; ▲ 50 ng/ml; ◆ 300 ng/ml; × 1000 ng/ml; ○ 3000 ng/ml; □ 5000 ng/ml; Δ 10000 ng/ml.

Figura 4.- Influencia de la mitomicina C sobre la escisión del genoma del fago lambda del cromosoma de una cepa lisogénica de *Escherichia coli*, medida por RT-PCR (el segmento amplificado está flanqueado por dos cebadores que enmarcan el sitio *attP* del fago). ● Sin Mitomicina; ■ 12,5 ng/ml; ▲ 100 ng/ml; ◆ 500 ng/ml; × 1000 ng/ml; ○ 3000 ng/ml; □ 5000 ng/ml; Δ 10000 ng/ml; ◇ 20000 ng/ml.

Figura 5.- Correlación entre la concentración de mitomicina C (escala logarítmica) añadida a cultivos de *L. casei* lisogénico para el fago A2 y los valores de Ct obtenidos a las 3 h (●), 4 h (■) y 5 h (▲) de incubación con el agente genotóxico. Obsérvese: a) que a concentraciones moderadas de mitomicina C (entre 12,5 y 300 ng/ml) los valores de Ct disminuyen al aumentar dicha concentración, b) que a partir de 500 ng/ml la mitomicina resulta tóxica y c) que, para cada concentración, los valores de Ct a las 4 y 5 horas son semejantes.

Figura 6.- Correlación entre la concentración de mitomicina C (escala logarítmica) añadida a cultivos de *E. coli* lisogénica para el fago lambda y los valores de Ct obtenidos a 1 h (●) y 1:30 h (■) de incubación con el agente genotóxico. Obsérvese que a 1:30 h los valores de Ct son semejantes en un amplio rango de concentraciones de mitomicina C.

Figura 7.- Influencia de la mitomicina C sobre la producción de nuevos virus por un cultivo de *Escherichia coli* lisogénica para el fago lambda. ● Sin Mitomicina; ■ 12,5 ng/ml; ▲ 100 ng/ml; ◆ 500 ng/ml; × 1000 ng/ml; ○ 3000 ng/ml; □ 5000 ng/ml; Δ 10000 ng/ml; ◇ 20000 ng/ml. Los sobrenadantes de cultivo se incluyeron en medio semisólido sembrado con *E. coli* no lisogénica utilizando la técnica de la doble capa y se incubaron durante la noche hasta conseguir visualizar las placas de lisis en el césped de la cepa indicadora.

Figura 8.- Influencia de la radiación ultravioleta sobre la escisión del genoma del fago A2 del cromosoma de una cepa lisogénica de *Lactobacillus casei*, medida por RT-PCR (el segmento amplificado está flanqueado por dos cebadores que enmarcan el sitio *attP* del fago). ● 0 J/m²; ■ 1 J/m²; ▲ 5 J/m²; ◆ 10 J/m²; × 30 J/m²; ○ 50 J/m²; □ control positivo con Mitomicina C.

Figura 9.- Influencia de la radiación ultravioleta sobre la escisión del genoma del fago lambda del cromosoma de una cepa lisogénica de *Escherichia coli*, medida por RT-PCR (el segmento amplificado está flanqueado por dos cebadores que enmarcan el sitio *attP* del fago). ● 0 J/m²; ■ 1 J/m²; ▲ 5 J/m²; ◆ 10 J/m²; × 30 J/m²; ○ 50 J/m²; □ control positivo con Mitomicina C.

Figura 10.- Influencia de la radiación ultravioleta sobre la producción de nuevos virus por un cultivo de *Lactobacillus casei* lisogénico para el fago A2. ● 0 J/m²; ■ 1 J/m²; ▲ 5 J/m²; ◆ 10 J/m²; × 30 J/m²; ○ 50 J/m²; □ control positivo con Mitomicina C.

Figura 11.- Influencia de la radiación ultravioleta sobre la producción de nuevos virus por un cultivo de *Escherichia coli* lisogénica para el fago lambda. ● 0 J/m²; ■ 1 J/m²; ▲ 5 J/m²; ◆ 10 J/m²; × 30 J/m²; ○ 50 J/m²; □ control positivo con Mitomicina C.

Figura 12. Influencia de la ciprofloxacina sobre la escisión del genoma viral medida por RT-PCR. Los símbolos llenos representan a la combinación lambda - *E. coli*; los vacíos a A2 - *L. casei*. ○ Cultivo de *E. coli* sin antibiótico; ■ 10 nM; ▲ 50 nM; ◆ 500 nM. También se ensayaron las concentraciones 1 nM, 30 nM, 1500 nM, y 5000 nM cuyos datos no se muestran pero que corroboran las conclusiones indicadas en el texto.

Figura 13. Efecto de la ciprofloxacina sobre la producción de nuevos virus por cultivos de *E. coli* y *L. casei* lisogénicas para los fagos lambda y A2 respectivamente. ○ Sin Inducir; ■ 10 nM; ▲ 50 nM; ◆ 500 nM. La concentración de fagos en los sobrenadantes se determinó por la técnica de la doble capa.

Figura 14. Influencia del Etopósido sobre la escisión del genoma viral medida por RT-PCR. Los símbolos llenos representan a la combinación lambda - *E. coli*; los vacíos a A2 - *L. casei*. ○ Cultivo de *L. casei* sin antibiótico; ■ 50 nM; ▲ 1500 nM; ◆ 5000 nM. También se ensayaron concentraciones intermedias. Los datos obtenidos corroboran las conclusiones indicadas en el texto.

Figura 15. Efecto del Etopósido sobre la producción de nuevos virus por cultivos de *E. coli* y *L. casei* lisogénicas para los fagos lambda y A2 respectivamente. ○ Sin Inducir; ■ 50 nM; ▲ 1500 nM; ◆ 5000 nM. La concentración de fagos en los sobrenadantes se determinó por la técnica de la doble capa.

65 Exposición detallada de la invención

El sistema que proponemos pertenece a la categoría de los ensayos microbianos de genotoxicidad que detectan el estímulo de la respuesta SOS mediante la observación de la inducción de profagos residentes en el genoma de bacterias

ES 2 307 395 B2

lisogénicas. La originalidad en este caso estriba en que se cuantifica un paso muy temprano de dicha inducción como es la separación del ADN viral y el bacteriano, en vez de observar la culminación del proceso, es decir la generación de la progenie viral, que es lo que hacen los métodos descritos en el estado de la técnica.

5 El protocolo se basa en las siguientes premisas: durante el proceso de integración tanto el ADN viral como el bacteriano se abren en puntos específicos denominados *attP* y *attB* respectivamente y se produce una soldadura entre ambas moléculas de ADN. La liberación del ADN viral, consecuencia de la activación de la respuesta SOS, es el proceso inverso al anterior y ocurre en los mismos puntos. De este modo, los segmentos de ADN viral que se encuentran a cada lado de *attP* y que, por lo tanto, están contiguos en el ADN del fago independiente, quedan separados por todo el ADN bacteriano después de la integración y vuelven a quedar adyacentes una vez que se libera el profago (Fig. 1).

15 Basándonos en esos principios, se han diseñado parejas de oligonucleótidos cuyas secuencias se corresponden con segmentos de ADN viral que se encuentran a ambos lados de *attP* y están orientados hacia él, es decir, son convergentes. Dichos oligonucleótidos deberán inducir la amplificación del segmento intermedio en un PCR cuyo molde sea el ADN viral independiente, pero no cuando el molde es dicho ADN integrado en el genoma celular, ya que, en ese caso, su orientación sería divergente (Fig. 1). En otras palabras, el ADN obtenido a partir de células lisogénicas no será amplificable, pero si lo será una vez que la respuesta SOS induzca la liberación del ADN viral.

20 En la aplicación de la PCR a tiempo real (RT-PCR) en lugar de una PCR normal podrá obtenerse un valor cuantitativo de la reacción de liberación del profago. En los experimentos de RT-PCR se obtiene un dato numérico, denominado Ct, que se corresponde con el umbral a partir del que se detecta el segmento de ADN amplificado. Cuanto menor sea ese valor la detección es más precoz, lo que es indicativo de una mayor concentración de moléculas molde en la mezcla de reacción. En este caso, los moldes se generan como consecuencia de la acción inductora de la respuesta SOS, que a su vez responde a la alteración del ADN por diferentes condiciones físicas (radiaciones) o compuestos químicos (genotóxicos). Por ello, el método puede revelar la potencia de dichos agentes en relación a otro usado como control o medir la intensidad/concentración de uno de estos agentes respecto a una curva patrón obtenida, con concentraciones conocidas del mismo.

30 Para demostrar la aplicabilidad del principio, el sistema se puso a punto con dos asociaciones bacteria lisogénica - bacteriofago muy diferentes: *Escherichia coli* - fago lambda y *Lactobacillus casei* - fago A2. En el primer caso se usó la asociación habitual en métodos previos para facilitar la comparación con ellos. Complementariamente, así se podrá aprovechar la enorme diversidad de cepas de *E. coli* con diferentes características y utilidades específicas que se han ido desarrollando a lo largo del tiempo.

35 La asociación *L. casei* - fago A2, además del propósito ya enunciado de demostrar la aplicabilidad general del principio desarrollado, tenía otras dos metas; por un lado, trabajar con una bacteria Gram positiva y, por otro, con un organismo inocuo para la salud. Las bacterias Gram positivas presentan una pared de naturaleza esencialmente polisacáridica y muy porosa que no supone una barrera efectiva a la difusión de compuestos hidrofílicos hasta la membrana plasmática. Así se facilitará el acceso al citoplasma (y por ende al ADN) de determinados compuestos cuya actividad genotóxica se quiere evaluar (como se indicó anteriormente, la membrana externa de las bacterias Gram negativas, de naturaleza lipídica, puede suponer una barrera muy efectiva para este tipo de sustancias).

45 Por otro lado, *L. casei* es una bacteria láctica que pertenece al grupo de organismos GRAS (Generally Regarded As Safe), que es consumida habitualmente en grandes cantidades como parte de los productos lácteos y que, por lo tanto, no presenta ningún riesgo para la salud de los manipuladores de la técnica. De las bacterias usadas previamente en la detección de genotoxicidad, *Salmonella typhimurium* es un patógeno primario, mientras que *E. coli*, aunque es un organismo habitualmente inocuo, se asocia frecuentemente a infección urinaria, pudiendo producir cuadros graves, incluso septicemias, en individuos inmunocomprometidos.

50 A continuación se ilustrará la invención mediante los ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la especificidad y efectividad del método.

Cepas bacterianas, bacteriófagos y condiciones de cultivo

55 Las bacterias utilizadas fueron:

a) *Lactobacillus casei* ATCC393 y su derivado lisogénico, que alberga el ADN genómico del bacteriofago A2 insertado al final del gen bacteriano que codifica para el RNA de transferencia específico para leucina cuyo anticodon es CAA.

b) *Escherichia coli* W3110 y una variante de la misma conteniendo el ADN del fago lambda insertado en su sitio primario de lisogenización, entre los genes *ybhB* e *ybhC*.

65 *L. casei* se propagó en medio MRS líquido (Oxoid) suplementado con CaCl₂ (10 mM) y SO₄Mg (10 mM) a 30°C sin agitación. *E. coli* se incubó en medio LB (Sambrook, J., E., Fritsch, F. and Maniatis, T. "Molecular Cloning: A laboratory manual". 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989) a 37°C con agitación.

ES 2 307 395 B2

La determinación de la concentración de fagos presentes en los cultivos se llevó a cabo por el método de la doble capa, usando los mismos medios indicados anteriormente, a los que se añadió agar-agar a concentraciones del 1,5% (capa inferior) y del 0,7% (capa superior).

5 *Condiciones del PCR a tiempo real*

Para la amplificación de un segmento de ADN que incluye el sitio *attP* del fago A2 se utilizaron como cebadores la pareja de oligonucleótidos: SEQ ID 3 y SEQ ID 4, que lo flanquean y originan un fragmento de 226 pares de bases (pb). En el caso de lambda, los cebadores fueron SEQ ID 7 y SEQ ID 8, que limitan un segmento de 186 pb.

La mezcla de reacción tenía los siguientes ingredientes: cultivo 1,25 μ l, cebadores 0,6 μ M (concentración final), mezcla PCR Q SYBR Green (Bio-Rad) 7,5 μ l y agua hasta 15 μ l.

15 Las condiciones para la amplificación del ADN del fago A2 fueron las siguientes: estadio 1: 95°C (3 min); estadio 2: 30 ciclos a 95°C (45 s), 67°C (45 s) y 72°C (45 s); estadio 3: 72°C (10 min). En el caso de lambda las condiciones de los estadios 1 y 3 fueron idénticas a las usadas con A2, pero en el estadio 2 se usaron los siguientes parámetros: 95°C (35 s), 57°C (35 s) y 72°C (35 s).

20 *Procedimiento*

Los cultivos de *L. casei* o de *E. coli*, lisogénicos para los fagos A2 o lambda respectivamente, se incubaron hasta alcanzar una absorbancia (a 600 nm) de 0,1. En ese punto se repartieron en varios tubos (volumen final de 25 ml). A cada uno de ellos se le añadió el agente cuya actividad genotóxica se quería conocer, a concentraciones comprendidas habitualmente entre 50 y 5000 nM (dado que muchos de estos compuestos no eran solubles en agua, se comprobó que el solvente utilizado no ejerciera ningún efecto sobre la viabilidad de los cultivos ni sobre la inducibilidad de los profagos). Cada 15 min (*E. coli*) o cada 30 min (*L. casei*) se tomaban dos alícuotas de 50 μ l. Una de ellas se congelaba inmediatamente y se mantenía en esas condiciones hasta su uso en la PCR. La otra se centrifugaba a 4°C y el sobrenadante se diluía para cuantificar los fagos presentes en el mismo.

Para evaluar si el procedimiento detectaba el poder genotóxico de la radiación, los cultivos, a una absorbancia de 0,1, se centrifugaban y las células se suspendían en 1/10 del volumen inicial de CINA al 0,85%. A continuación se sometían a radiación UV (1 jul/m²) durante diferentes periodos de tiempo. Posteriormente, se añadía medio de cultivo precalentado a las suspensiones celulares hasta alcanzar el volumen inicial y se proseguía la incubación. La toma de muestras y su procesamiento posterior se llevaba a cabo tal como se ha indicado en el párrafo anterior.

40 **Ejemplos de realización**

Como ejemplo de los resultados que puede proporcionar la metodología desarrollada por la presente invención, a continuación se exponen los datos obtenidos del análisis de la actividad genotóxica de un compuesto químico, la mitomicina C, y de un agente físico, la radiación ultravioleta. El efecto genotóxico de la primera, y por tanto la inducción de la respuesta SOS, ocurre porque la mitomicina C se une al ADN e impide la separación de las cadenas, bloqueando así la replicación. Este modo de actuación ha promovido su uso como quimioterápico anticanceroso en determinados países. La radiación UV se usa como agente microbicida e induce fundamentalmente la formación de dímeros de pirimidina en el ADN. Complementariamente, se presentan los resultados obtenidos con la ciprofloxacina y el etopósido. La primera es una quinolona fluorada que inhibe la acción de la ADN - girasa bacteriana. El etopósido es un compuesto antitumoral que inhibe el estadio G2 del ciclo de desarrollo de las células de mamífero. El propósito es ilustrar la utilidad que tiene el procedimiento combinado de detección de la respuesta SOS que presentamos, dado que cada uno de los dos compuestos la induce en uno de los sistemas fago - bacteria pero no en el otro. Se incluye, asimismo, una tabla con los resultados de inducción obtenidos con otros compuestos genotóxicos.

55 **Ejemplo 1**

Detección y análisis del efecto genotóxico de la mitomicina C sobre la inducción del ciclo lítico del profago A2

Efecto de la mitomicina C sobre la inducción del ciclo lítico del profago A2. La escisión del genoma del fago A2 residente en el cromosoma de *L. casei*, es detectable a concentraciones muy bajas del compuesto genotóxico, del orden de 12,5 ng/ml de medio de cultivo (Fig. 2). Incrementos sucesivos de la concentración de mitomicina C resultan en un aumento correlativo de la respuesta detectada, hasta llegar a valores 24 veces superiores (300 ng/ml) al que originaba la respuesta inicial. Incrementos posteriores de la concentración de mitomicina C se traducen en una inhibición gradual de la respuesta, hasta que a 10 000 ng/ml ya no se aprecian diferencias respecto al control al que no se le había añadido el agente genotóxico.

65 Adicionalmente, se determinó la producción de fagos que resultaba de la inducción de los cultivos con mitomicina C (Fig. 3), para comparar la sensibilidad del RT-PCR con la del microescrutinio. Los datos obtenidos son semejantes a los correspondientes a la detección de la liberación de los profagos con algunas excepciones. Así, la concentración

mínima de mitomicina C que induce una respuesta es la misma en ambos casos y hay un incremento de dicha respuesta según se va aumentando la concentración de agente genotóxico. Sin embargo, mientras por RT-PCR las muestras recogidas a las dos horas de incubación ya mostraban incrementos significativos respecto a los controles, únicamente empezaba a aparecer fago en las muestras recogidas a las tres horas de inducción. Debe tenerse en cuenta, además, que el procesamiento de la muestra por RT-PCR hasta que se obtienen los datos es de unas dos horas, mientras que la observación de las placas de lisis, en la que se basan los métodos de microescrutinio, solo puede hacerse al día siguiente. Por otra parte, el microescrutinio parece ser más susceptible al efecto tóxico de la mitomicina C. Así, por ejemplo, a una concentración de 5000 ng/ml ya no se detecta incremento en la generación de nuevos fagos, pero aún existe una amplificación del segmento de ADN viral evidente. Esta última diferencia está motivada, probablemente, por el hecho de que la liberación de los genomas virales no requiere de la síntesis de ADN, que es precisamente el proceso que inhibe la mitomicina C, mientras que la producción de nuevos fagos si depende de que haya replicación del material genético viral.

Ejemplo 2

Efecto de la mitomicina C sobre la inducción del ciclo Rico del bacteriófago lambda

La concentración mínima del genotóxico que induce la escisión es la misma que para A2 y, al igual que ocurría en este caso, al aumentar su concentración se incrementaban las tasas de liberación, hasta que la toxicidad inherente de la mitomicina C provocaba la disminución de la respuesta, lo que ocurría, en el caso de la asociación lambda - *E. coli*, a concentraciones de 15.000-20.000 ng/ml (Fig. 4).

Sin embargo, el perfil de las curvas de variación de la Ct con el tiempo es diferente. En el caso de A2 se alcanza rápidamente una meseta, independientemente de la concentración de mitomicina C utilizada (Fig. 2). En el de lambda, por el contrario, a concentraciones bajas del quimioterápico, existe una variación continua en los valores de Ct, de manera que todas las curvas alcanzan valores de Ct similares, si se incuban los cultivos con la mitomicina C el tiempo suficiente (Fig. 4). La diferencia de comportamiento de ambos sistemas la interpretamos como un reflejo de la mayor permeabilidad de las células de *L. casei* con respecto a las de *E. coli*.

En el primer caso, la mitomicina C penetra rápidamente en las células y en aquellas en las que se alcanza un nivel crítico de concentración se inicia la respuesta SOS. Al aumentar la concentración de genotóxico que se añade a los cultivos, el número de células en las que se alcanza el umbral a partir del que se dispara la respuesta SOS y, con ella, la liberación del profago, aumentará correlativamente. Como consecuencia, la meseta aparecerá a valores de Ct progresivamente decrecientes (recuérdese que cuanto menor es Ct mayor es el número de moléculas molde para la RT-PCR).

En el caso de *E. coli*, la mitomicina C tendría más dificultades para entrar. A pesar de ello, a concentraciones elevadas se alcanzarían los valores umbral relativamente pronto en todo el cultivo, pero cuando la concentración del genotóxico fuera limitante se establecería un gradiente continuo de células que irían alcanzando los niveles que disparan la respuesta SOS, lo que se apreciaría como una variación continua de los valores de Ct. De aquí se deduciría que, en realidad, la respuesta SOS de *E. coli* es mucho más sensible a la mitomicina C que la de *L. casei*, porque, por ejemplo, a la concentración mínima representada, 12,5 ng/ml, la liberación de profagos llega a ser prácticamente completa, mientras que en *L. casei* los valores de escisión de A2 se quedan muy por debajo de los que se obtienen a concentraciones mayores del antibiótico (Figs. 2 y 4).

Paradójicamente, la liberación de los profagos de A2 se inhibe a concentraciones de mitomicina C menores que las necesarias para obtener el mismo efecto con lambda [a partir de 5.000 ng/ml la inhibición es evidente en el primer caso, mientras en el segundo, a 20.000 ng/ml aún se produce una escisión prácticamente general (Figs. 2 y 4)]. Nuevamente, la dificultad de entrada del genotóxico puede explicar este comportamiento. En *L. casei* se alcanzan rápidamente concentraciones intracelulares tóxicas, mientras que en *E. coli*, la penetración más lenta hace que no se alcancen dichos niveles al menos hasta después de que se produzca la inducción del profago.

En términos prácticos, los resultados expuestos tienen dos consecuencias:

1) Los datos representados en la Fig. 2 permiten simplificar la metodología a aplicar en la cuantificación del efecto genotóxico, cuando ésta se hace con cultivos de *L. casei* lisogénico. Sería suficiente con tomar una única muestra del cultivo tratado, siempre que se hiciera después de las tres horas de incubación, ya que los valores de Ct permanecen esencialmente constantes a partir de ese momento y reflejan el efecto de cada concentración del agente sobre la escisión del profago A2 (Fig. 5). En el caso de lambda, sin embargo, únicamente a la hora de incubación los valores de Ct varían con la concentración del agente genotóxico (Fig. 6).

2) El tandem *E. coli* - lambda, sería el más útil a concentraciones muy altas del agente, ya que se detecta el efecto genotóxico cuando la respuesta de *L. casei* - A2 esta ya completamente bloqueada.

El experimento complementario de microescrutinio (producción de viriones del fago lambda como consecuencia de la inducción de su ciclo lítico) refleja los datos ya comentados para la liberación del ADN aunque, a bajas concentraciones de mitomicina C, el ritmo de aparición de nuevos virus fue muy lento (Fig. 7).

ES 2 307 395 B2

Ejemplo 3

Detección y análisis del efecto genotóxico de la radiación ultravioleta sobre el ciclo lítico de los fagos A2 y lambda

5 La luz U.V. ejerció un efecto inductor de la respuesta SOS, determinada como liberación de los profagos, muy notable tanto en *L. casei* como en *E. coli*, incluso a intensidades tan bajas como 1 J/m² (Figs. 8 y 9, respectivamente). Dicha respuesta se mantuvo en valores máximos independientemente de la intensidad de la radiación aplicada (hasta, al menos, 50 J/m²). La evaluación de la producción de nuevos fagos dio resultados semejantes (Figs. 10 y 11).

10 Ejemplo 4

Detección y análisis del efecto genotóxico de la ciprofloxacina y el etopósido sobre el ciclo lítico de los fagos A2 y lambda

15 La ciprofloxacina provoca la inducción del fago lambda pero no la de A2 (Fig. 12, y 13) debido a que la cepa de *L. casei* lisogénica es resistente al antibiótico, presumiblemente porque presenta una ADN - girasa a la que no se puede unir. La liberación del profago parece ser más sensible que la generación de nuevos viriones (compárense las curvas obtenidas a la concentración 10 nM de ciprofloxacina).

20 El etopósido indujo el ciclo lítico del fago A2 pero no el de lambda, porque *E. coli* es impermeable al quimioterápico (Figs 14 y 15).

Estos últimos ejemplos ilustran la capacidad de la utilización combinada de las dos asociaciones fago - bacteria para aumentar el rango de compuestos genotóxicos evaluables.

25 En la tabla 1 se presenta el efecto inductor de una serie de compuestos en relación con la mitomicina C.

TABLA 1

30 *Capacidad inductora de la respuesta SOS de diversos agentes genotóxicos, medida por la liberación de los profagos A2 y lambda de cultivos lisogénicos de L. casei y E. coli respectivamente*

Compuestos Químicos	<i>L.casei</i> (A2)	<i>E.coli</i> (lambda)
Ciprofloxacina	-	+++
Dacarbazina	++	-
Etopósido	+	-
Epiclorohidrina	++	++
Hidrazina	++	-
K ₂ Cr ₂ O ₇	+	-
Mitomicina C	+++	+++
Ácido nalidíxico	-	++
Norfloxacina	+	+++
Fenantreno	-	++
Estreptozotocina	-	+++
Agentes Físicos		
UV-rays	+++	+++

ES 2 307 395 B2

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de detección y evaluación de agentes genotóxicos, mediante amplificación por PCR con cebadores que hibridan con regiones que comprenden al sitio *attP* del genoma de al menos dos fagos atemperados, donde dichos fagos son capaces de infectar diferencialmente a bacterias Gram positiva y Gram negativa **caracterizado** porque comprende:
- 10 a.- Incubar al menos una alícuota de una bacteria Gram positiva lisogénica para un fago y al menos una alícuota de una bacteria Gram negativa lisogénica para un fago.
- 15 b.- Someter al cultivo a la acción de al menos un agente genotóxico.
- c.- Amplificar secuencias que comprendan la región *attP*, sus secuencias complementarias o fragmentos de las mismas.
- d.- Detección de los amplicones obtenidos en el paso c.
- 20 2. Método según la reivindicación anterior donde la bacteria Gram positiva es *Lactobacillus casei*, el fago atemperado para dicha bacteria es el fago A2 y la secuencia amplificada tiene al menos un 90% de homología con la secuencia SEQ ID 1, la secuencia complementaria o fragmentos de las mismas.
3. Método según la reivindicación anterior donde la secuencia amplificada tiene al menos un 95% de homología con la SEQ ID 1, la secuencia complementaria o fragmentos de las mismas.
- 25 4. Método según la reivindicación anterior donde la secuencia amplificada tiene al menos un 98% de homología con la SEQ ID 1, la secuencia complementaria o fragmentos de las mismas.
5. Método según de la reivindicación anterior donde la secuencia amplificada es la SEQ ID 1, la secuencia complementaria o fragmentos de las mismas.
- 30 6. Método según la reivindicación anterior donde la región amplificada es el fragmento SEQ ID 2 o su secuencia complementaria.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2-6 donde los cebadores tienen cualquiera de las SEQ ID 3, 4.
- 35 8. Método según la reivindicación 1 donde la bacteria Gram negativa es *Escherichia coli*, el fago atemperado para dicha bacteria es el fago lambda y la secuencia amplificada tiene al menos un 90% de homología con la secuencia SEQ ID 5, la secuencia complementaria o fragmentos de la mismas.
- 40 9. Método según la reivindicación anterior donde la secuencia amplificada tiene al menos un 95% de homología con la SEQ ID 5, la secuencia complementaria o fragmentos de las mismas.
10. Método según la reivindicación anterior donde la secuencia amplificada tiene al menos un 98% de homología con la SEQ ID 5, la secuencia complementaria o fragmentos de las mismas.
- 45 11. Método según de la reivindicación anterior donde la secuencia amplificada es la SEQ ID 5, la secuencia complementaria o fragmentos de las mismas.
12. Método según la reivindicación anterior donde la región amplificada comprende al fragmento SEQ ID 6 o su secuencia complementaria.
- 50 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8-12 donde los cebadores tienen cualquiera de las SEQ ID 7 y 8.
- 55 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la PCR es una PCR a tiempo real.
15. kit para la detección y evaluación de agentes genotóxicos que comprende al menos una bacteria Gram positiva y una Gram negativa lisogénicas para fagos inducibles por respuesta SOS o el genoma de dichas bacterias y las secuencias que comprenden a los sitios *attP* de dichos fagos, sus secuencias complementarias o fragmentos de las mismas.
- 60 16. Kit según la reivindicación anterior donde la bacteria Gram positiva es *Lactobacillus casei* y la Gram negativa es *Escherichia coli*.
- 65 17. Kit según la reivindicación anterior donde las secuencias que comprenden al sitio *attP* pertenecen a los fagos A2 y lambda y tienen respectivamente al menos 90% de homología con SEQ ID 1 y SEQ ID 5, sus secuencias complementarias o fragmentos de las mismas.

ES 2 307 395 B2

18. Kit según la reivindicación anterior donde las secuencias que comprenden al sitio *attP* tienen al menos 95% de homología con SEQ ID 1 y SEQ ID 5, sus secuencias complementarias o fragmentos de las mismas.

5 19. Kit según la reivindicación anterior donde las secuencias que comprenden al sitio *attP* tienen al menos 98% de homología con SEQ ID 1, y SEQ ID 5, sus secuencias complementarias o fragmentos de las mismas.

20. Kit según la reivindicación anterior donde las secuencias que comprenden al sitio *attP* tienen la secuencia SEQ ID 1 y SEQ ID 5, sus secuencias complementarias o fragmentos de las mismas.

10 21. Kit según la reivindicación anterior donde las secuencias que comprenden al sitio *attP* tienen la secuencia SEQ ID 2, SEQ ID 6 o sus secuencias complementarias.

22. kit según cualquiera de las reivindicaciones 16-23 comprende cebadores cuya secuencia es elegida del grupo:

15 - SEQ ID 3

- SEQ ID 4

20 - SEQ ID 7

- SEQ ID 8.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURAS

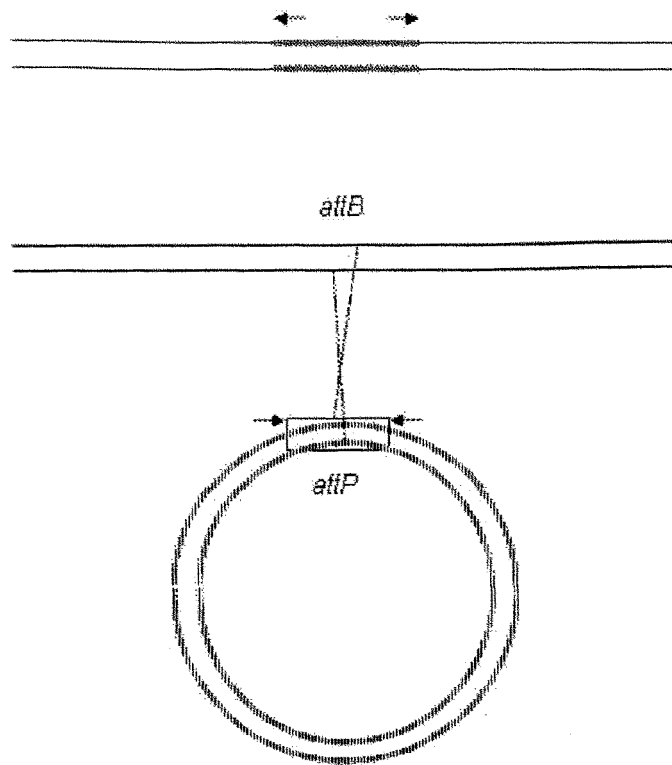


FIG. 1

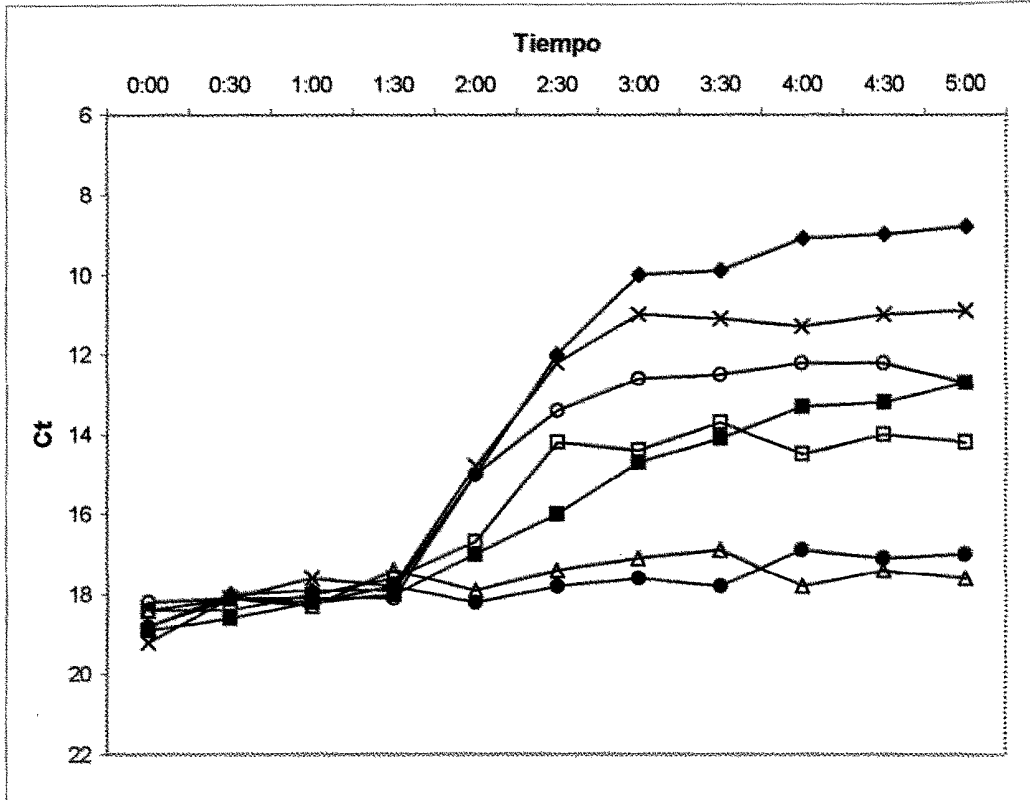


FIG. 2

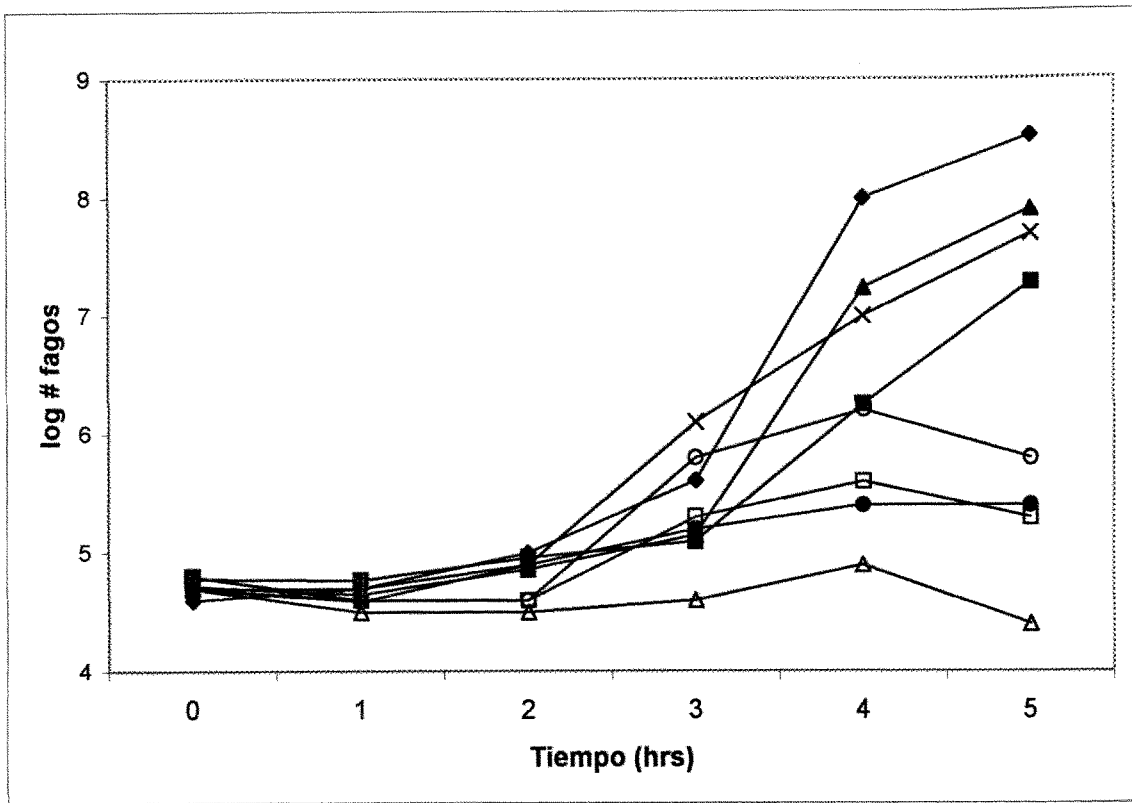


FIG. 3

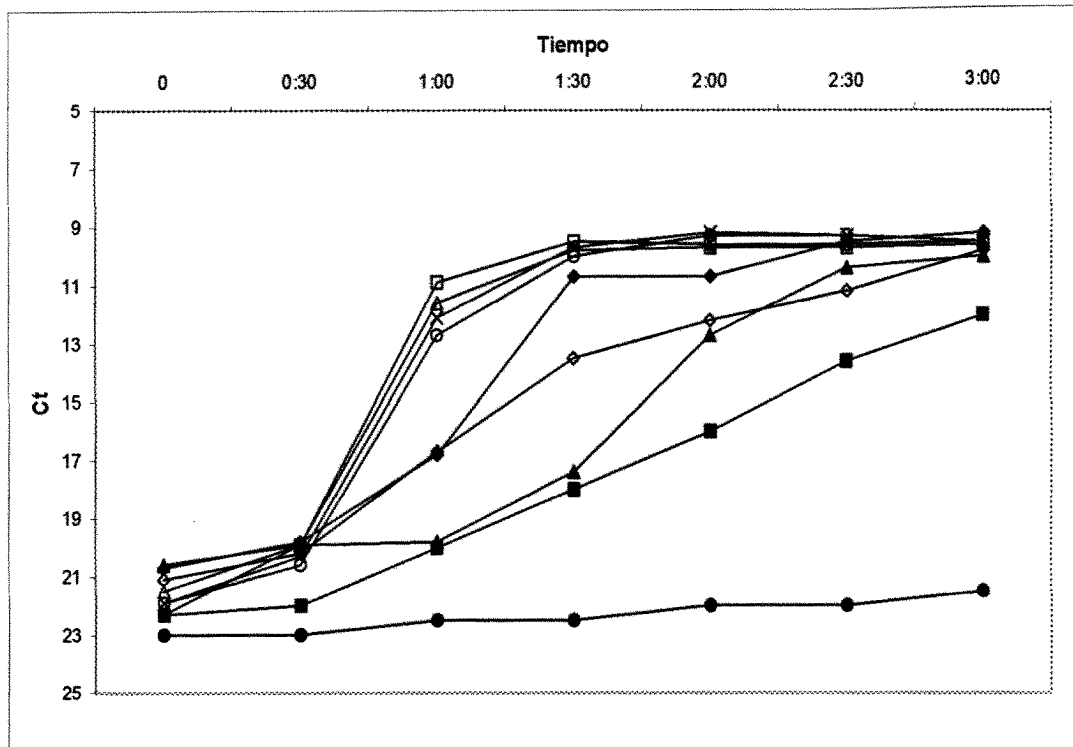


FIG. 4

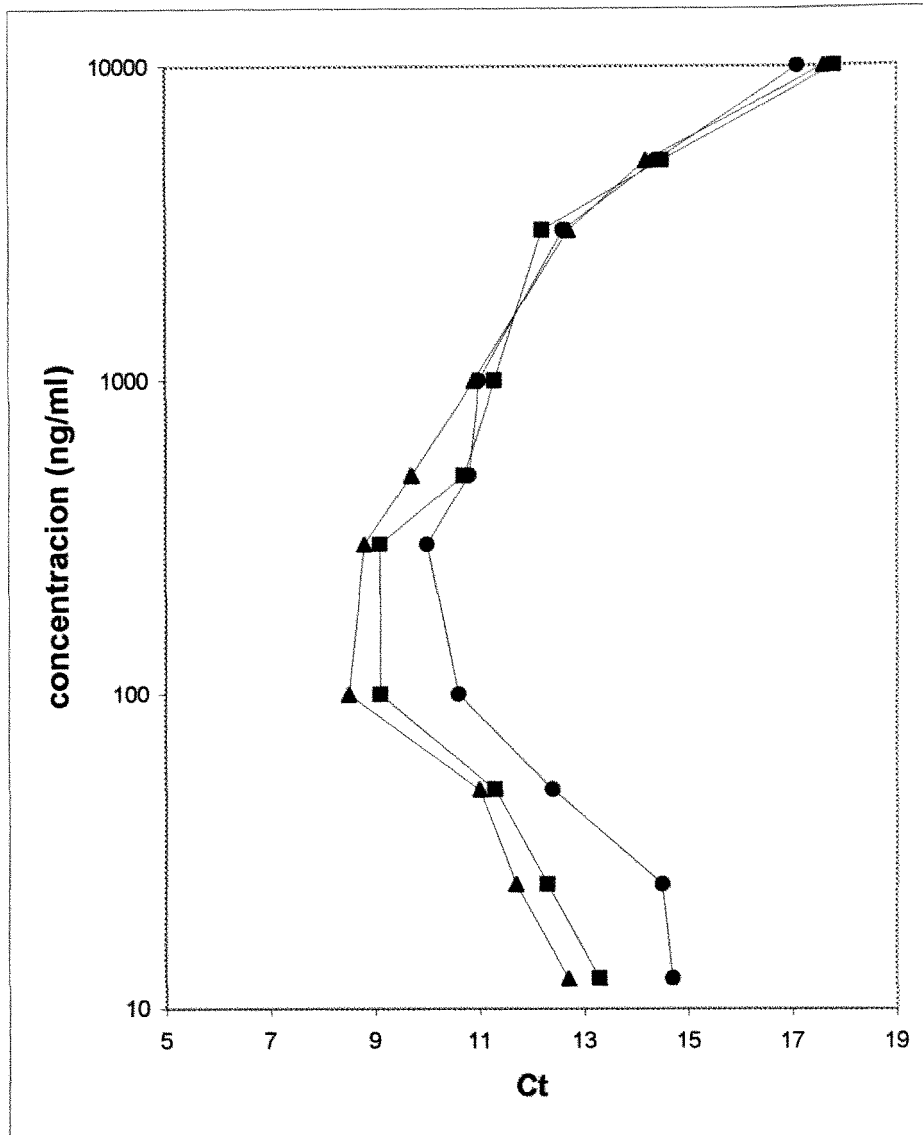


FIG. 5

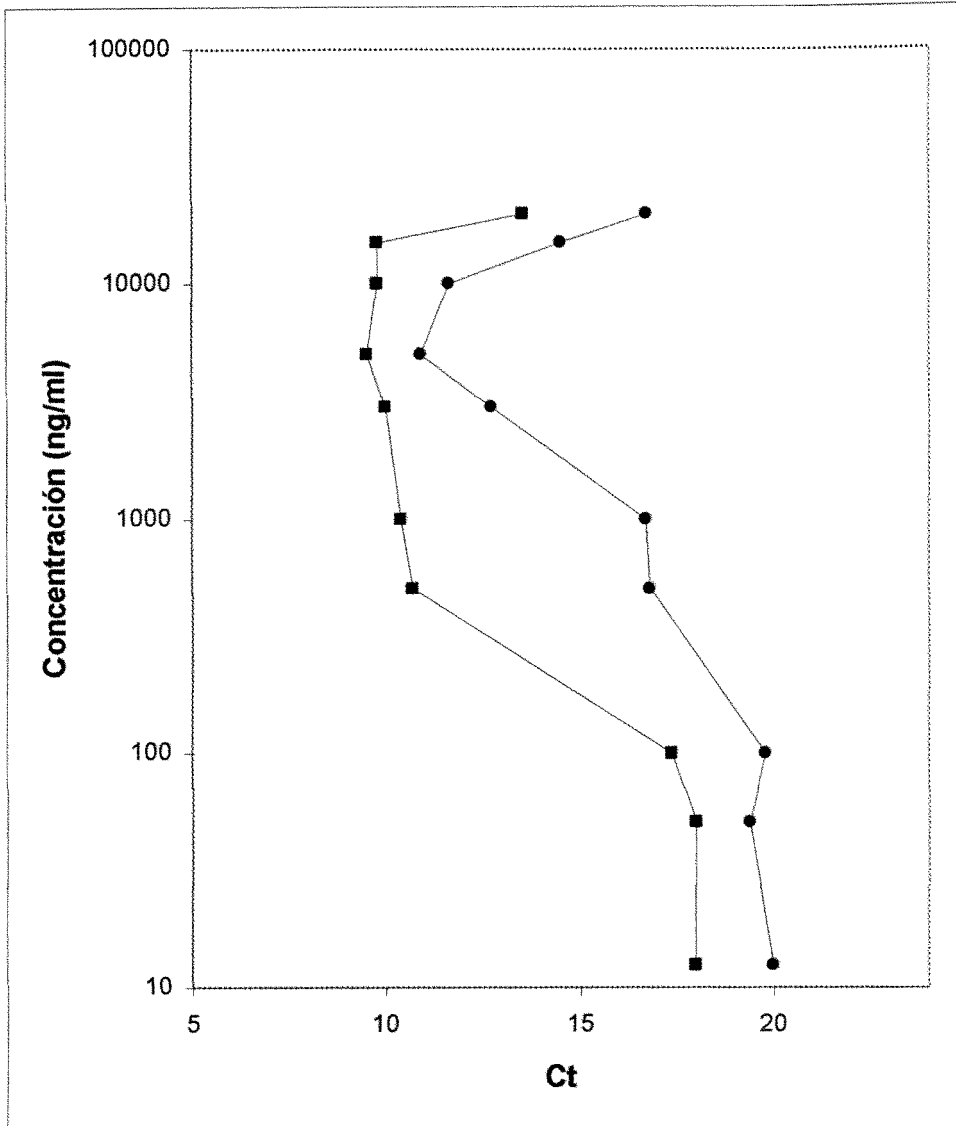


FIG. 6

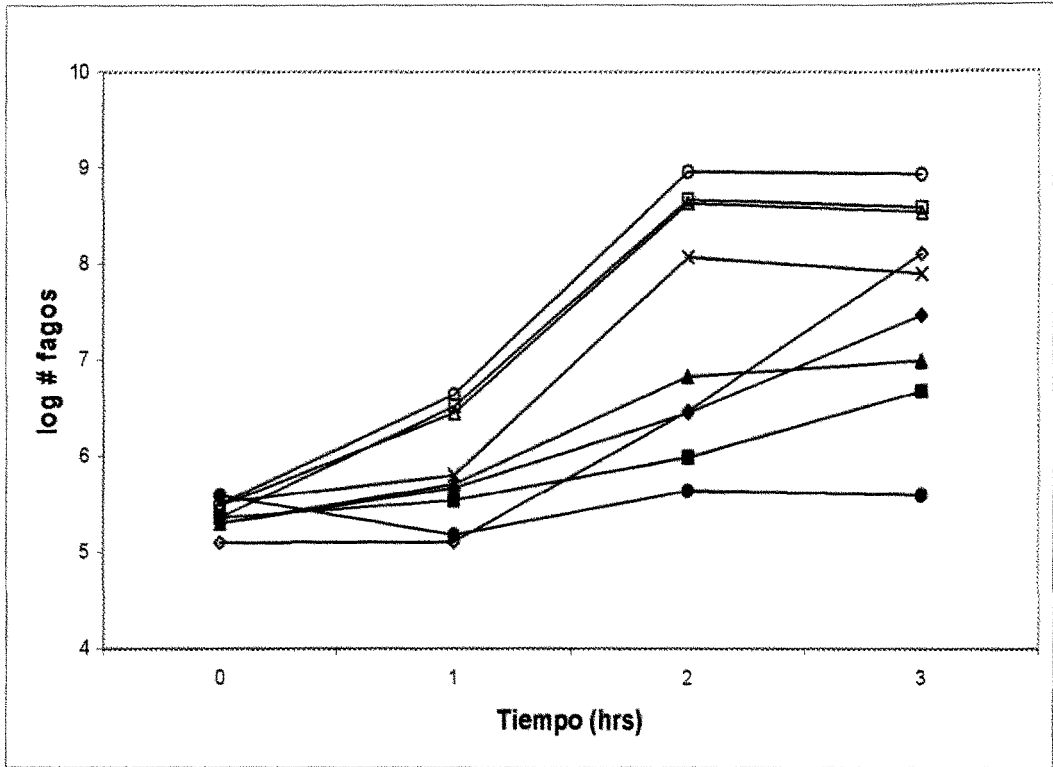


FIG. 7

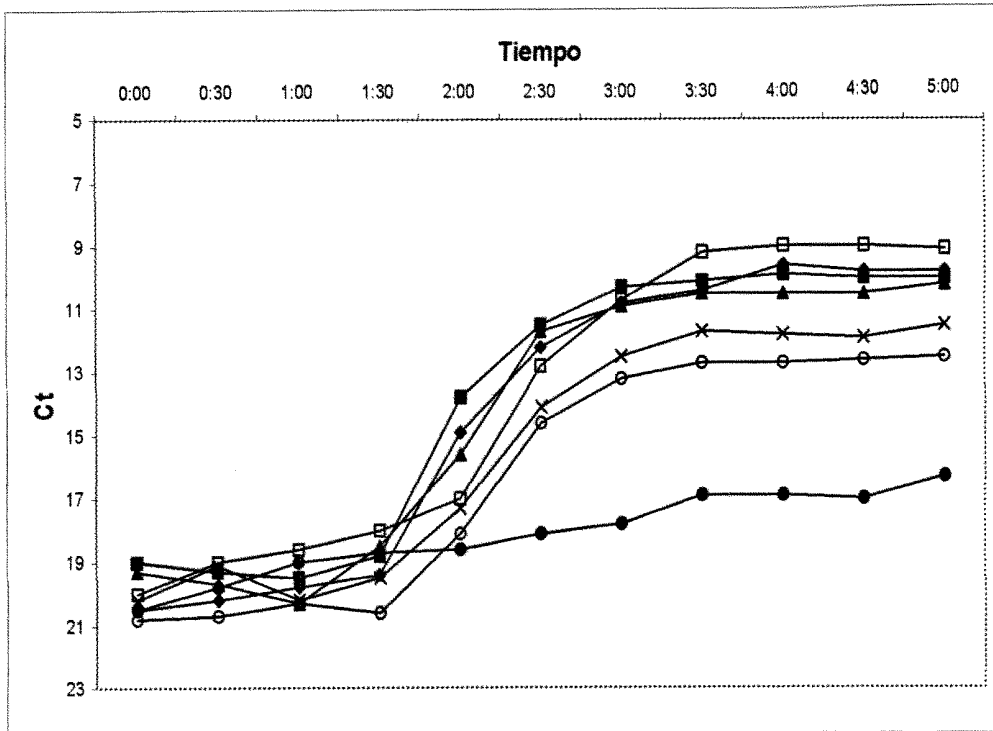


FIG. 8

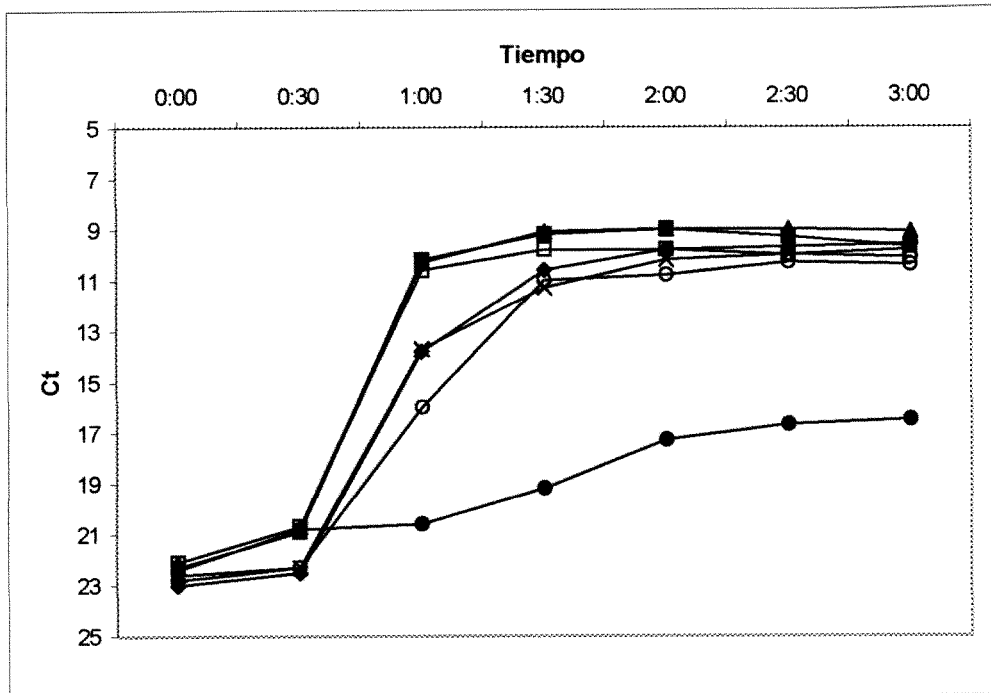


FIG. 9

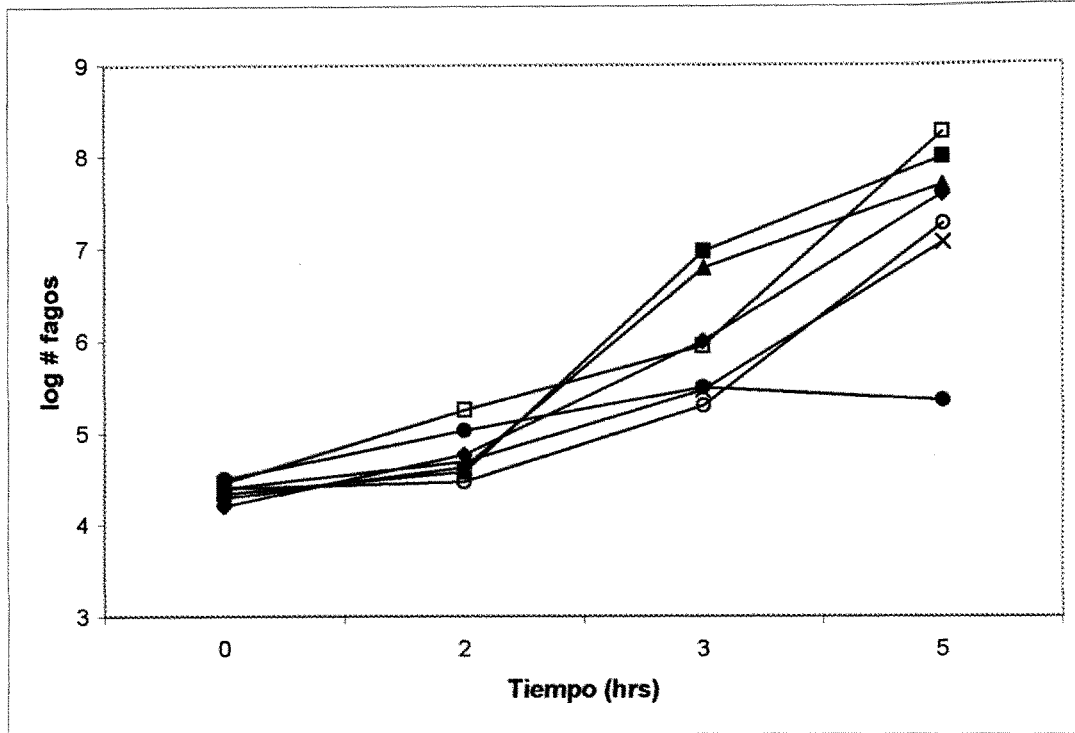


FIG. 10

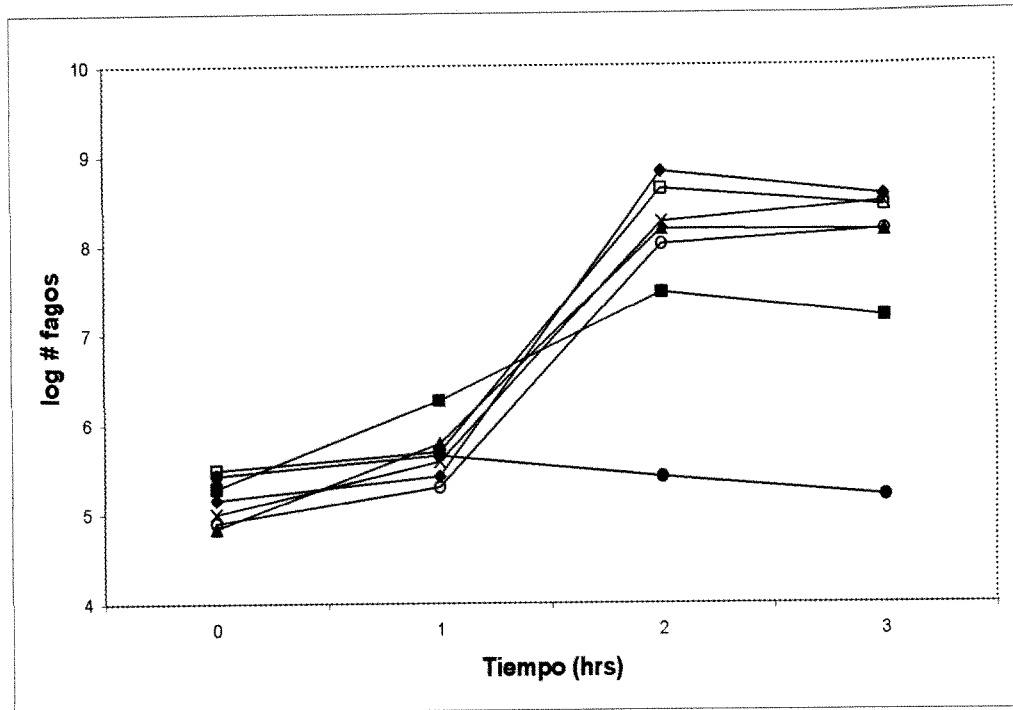


FIG. 11

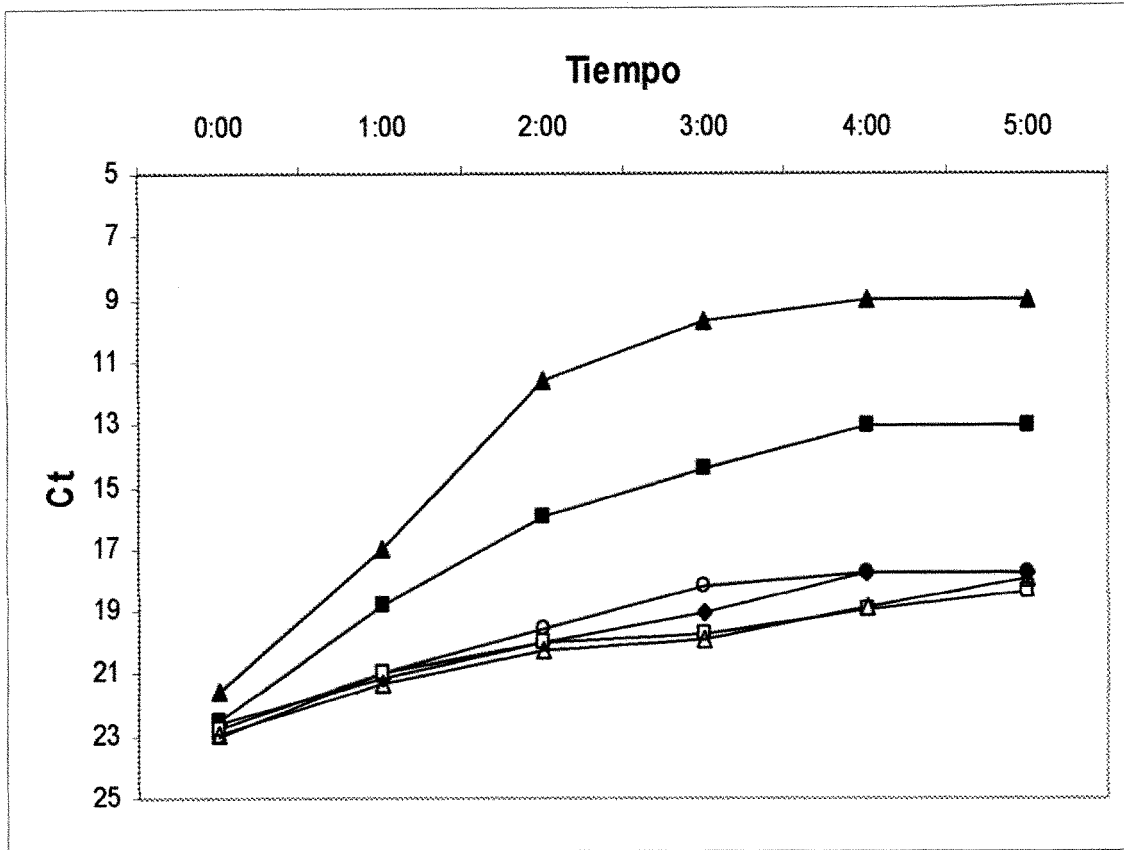


FIG. 12

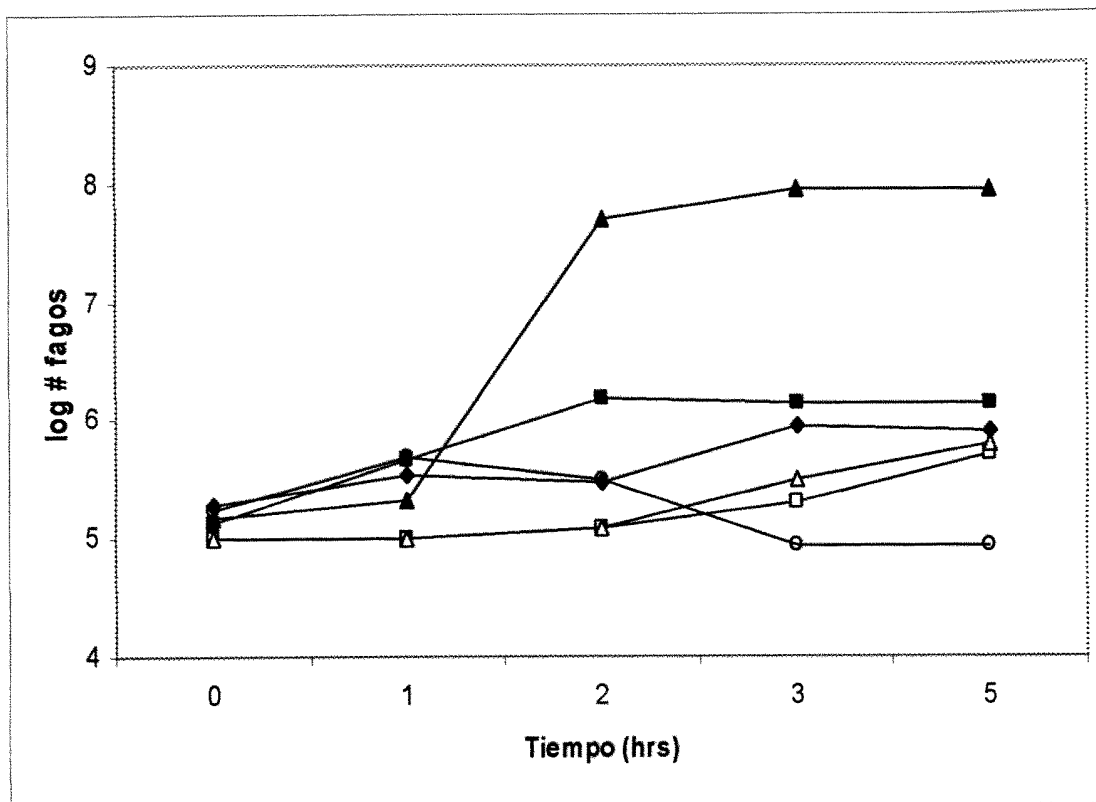


FIG. 13

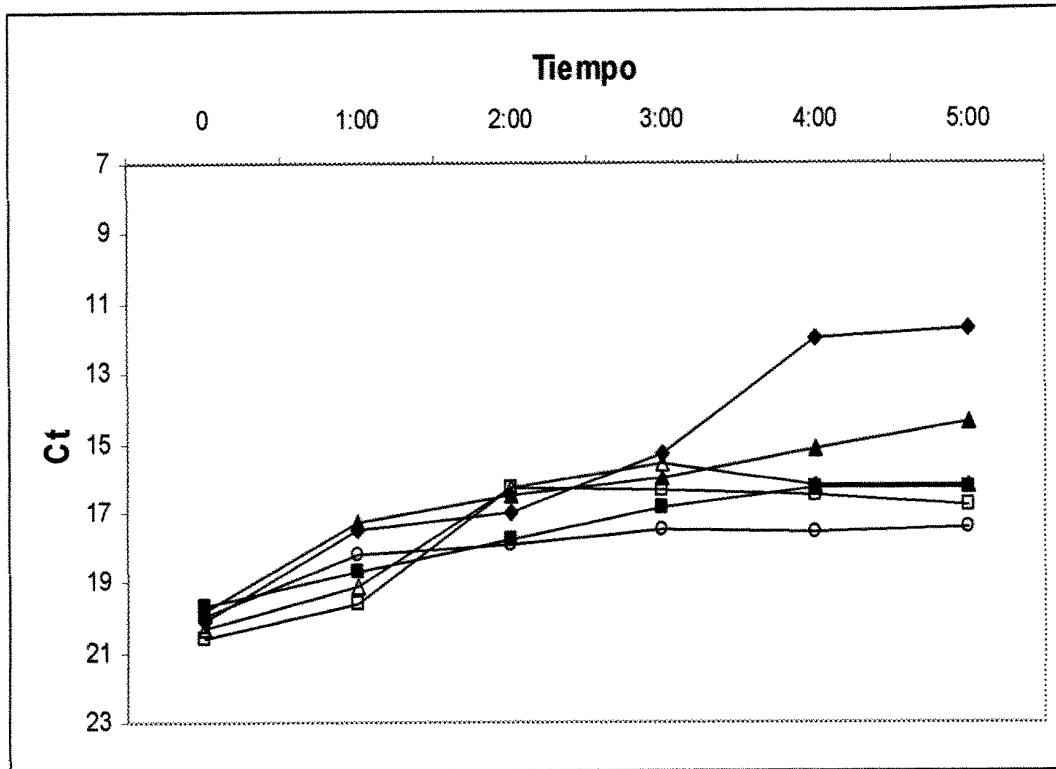


FIG. 14

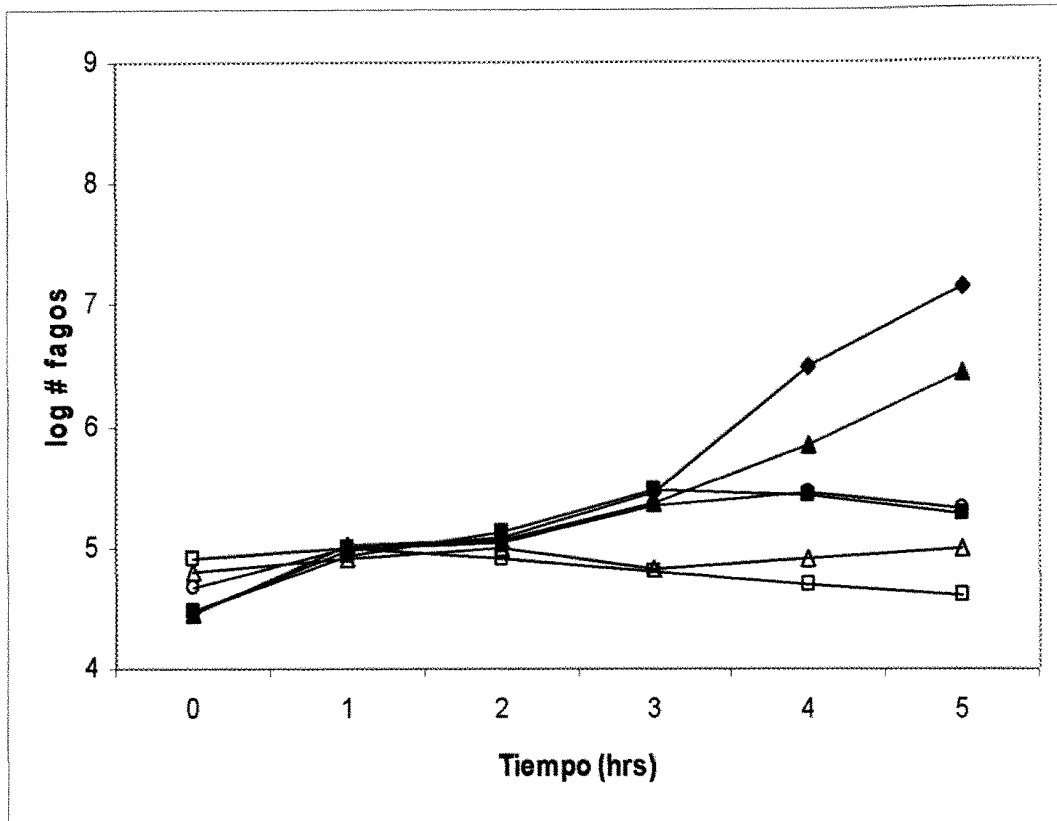


Fig. 15

ES 2 307 395 B2

LISTA DE SECUENCIAS

<110> universidad de Oviedo

5 <120> Método rápido de detección y evaluación de agentes genotóxicos

<130> ES1624.1

10 <160> 8

<170> PatentIn version 3.3

15 <210> 1
<211> 226
<212> DNA
<213> Fago A2

20 <400> 1

25 **gcaagaatgc cggtttaaag ccatttctga gcactaaaaa agaccctcta gggggctttg 60**
ataccggtga tcgggggtatc acggaatgta tacgtactga tatgattgca tttatgacaa 120
aaagtggttc gatgtggttc gatgcttcaa acgacagcga ccaacaacac atctctatat 180
30 **aataggtaga aatagctttt aagagttcag aaatatgggc acacaa 226**

<210> 2

35 <211> 19
<212> DNA
<213> Fago A2

40 <220>
<221> mi sc_feature
<222> (0)..(8)

45 <223> Región *attP*

<400> 2

50 **tgataccggt gatcggggt 19**

<210> 3
<211> 25
<212> DNA

55 <213> secuencia artificial

<220>
<221> cebador
<222> (1)..(25)

<400> 3

65 **ttgtgtgccc atattctga actct 25**

ES 2 307 395 B2

<210> 8
<211> 18
<212> DNA
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> cebador
10 <222> (1)..(18)

<400> 8
15 ctgatagtga cctgttcg

18

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 307 395

② N° de solicitud: 200602309

③ Fecha de presentación de la solicitud: **04.09.2006**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 9401584 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 20.01.1994, todo el documento.	1-22
A	WO 9741251 A1 (VLAAMSE INSTELLING VOOR TECHNOLOGISCH ONDERZOEK) 06.11.1997, todo el documento.	1-22
A	QUILLARDET P., et al. "The SOS Chromotest: Direct assay of the expression of gene <i>sfIA</i> as a measure of genotoxicity of chemicals" <i>BIOCHIMIE</i> , 1982. Vol. 64, páginas 797-801. Todo el documento. ISSN: 0300-9084.	1-22
A	MAMBER S.W., et al. "The Escherichia coli K-12 SOS chromotest agar spot test for simple, rapid detection of genotoxic agents" <i>MUTATION RESEARCH</i> , 1986. Vol. 171, páginas 83-90. Todo el documento. ISSN: 0027-5107.	1-22
A	WALKER G.C., "The SOS response of Escherichia coli" en: "Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology" (Ingraham J.L., Editor) <i>AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY</i> , 1987. Páginas 1346-1357. Todo el documento.	1-22
A	ALVAREZ M.A. et al., "The Site-Specific Recombination System of the Lactobacillus Species Bacteriophage A2 Integrates in Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria" <i>VIROLOGY</i> , OCTUBRE 1998. Vol. 250, Issue 1, páginas 185-193. Todo el documento. ISSN: 0042-6822	1-22

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

24.10.2008

Examinador

A. García Coca

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q 1/68 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)
C12R 1/245 (2006.01)