

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 835**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2010 E 10705853 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2398914**

54 Título: **Procedimiento de identificación de línea celular**

30 Prioridad:

**23.02.2009 GB 0903026**

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

**23.12.2015**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)  
Rue de l'Institut, 89  
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**CASSART, JEAN-POL y  
LIENARD, PATRICIA ANNE-LAURE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 554 835 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de identificación de línea celular

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la identificación de líneas celulares. Más particularmente, se refiere a la identificación de líneas celulares mediante el análisis por técnicas moleculares, y la identificación de variación en intrones o determinando si un gen particular está presente. Este procedimiento es particularmente útil para el control de calidad de las líneas de células utilizadas para la producción de preparaciones farmacéuticas.

### Antecedentes de la invención

10 Los procedimientos actuales realizados en el control de calidad (QC) utilizan la técnica de la isoenzima. Este procedimiento se basa en el análisis de las movilidades electroforéticas de las isoenzimas que difieren entre especies. Los perfiles de movilidad se pueden establecer para cada especie utilizando el análisis combinado de las distancias de migración de las enzimas, tales como: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), aspartato aminotransferasa (AST), lactato deshidrogenasa (LDH) y malato deshidrogenasa (MD). Este procedimiento proporciona un medio para determinar la especie de origen de una línea celular y detectar células con contaminación transversal con células de otra línea celular especie diferente (Stacey and Hockley, 2006). Sin embargo, esta prueba es laboriosa y requiere mucho tiempo. Liu *et al.* (2008) divulgan la identificación y autenticación de cultivo de células animales estrechamente relacionadas mediante amplificación por PCR del gen de la aldolasa.

### Sumario de la invención

20 Los presentes inventores han demostrado que las líneas celulares pueden identificarse por un procedimiento más fiable y más fácilmente que con las metodologías de identificación actuales. El procedimiento de identificación de la presente invención se basa en el análisis del tamaño de las secuencias intrónicas que difieren entre especies. Este procedimiento implica la amplificación de las secuencias intrónicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los presentes inventores han identificado genes que están suficientemente conservados en las secuencias exónicas para permitir la hibridación con los cebadores de amplificación de PCR y suficientemente diferentes en la secuencia de intrón para permitir la discriminación basada en el polimorfismo de la longitud. Por tanto, la discriminación de estas variaciones puede determinarse mediante análisis de estas regiones genómicas.

25 El procedimiento permite la identificación de una serie de tipos de línea celular derivada de vertebrados (por ejemplo, MRC-5, Vero, CHO, FRHL-2, MDCK, fibroblastos de embrión de pollo [CEF]), basado en intrones polimórficos informativos que se encuentran en dos genes, calmodulina y la tirosina quinasa receptora de Axl. Además, el uso de un gen específico de líneas celulares de insectos, el análisis para determinar la presencia o ausencia de un gen de insecto puede ayudar a identificar líneas celulares derivadas de insecto por ejemplo Hi-5.

30 Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento de identificación de línea celular que comprende uno o más de las siguientes etapas:

35 (a) análisis del gen de calmodulina, en el que un fragmento del gen de calmodulina se amplifica por PCR y en el que el fragmento amplificado comprende la secuencia entre el exón 3 y el exón 4 del gen de calmodulina; y

(b) (c) análisis de la tirosina quinasa receptora Axl, en el que un fragmento del gen de la tirosina quinasa receptora Axl se amplifica por PCR, y en el que el fragmento amplificado comprende la secuencia entre el exón 18 y el exón 19 del gen de la tirosina quinasa receptora Axl;

y en el que la línea celular se identifica por el tamaño de un intrón en dichos genes.

### 40 Breve descripción de las figuras

**Figura 1** Análisis de los productos de PCR de CALM3/4

**Figura 2** Análisis de los productos de PCR de AXL 18/19.

**Figura 3** Análisis del producto de PCR de PPATTA.

### Descripción de la invención

45 Los inventores pretenden que los términos “que comprende”, “comprende” y “consiste”, puedan opcionalmente sustituirse con las expresiones que “consiste en”, “consiste en” “constituido por”, respectivamente, en cada caso.

50 Los presentes inventores han identificado regiones conservadas y variables en los genes que codifican la calmodulina y la tirosina quinasa receptora Axl. La variación en los genes permite la discriminación entre las diferentes líneas celulares; estas variaciones pueden detectarse usando cualquier procedimiento que permita el análisis del ácido nucleico. Adicionalmente, las regiones conservadas se pueden utilizar para diseñar cebadores complementarios, ya sea para la amplificación por PCR o para la reacción de secuenciación que se puede utilizar

para analizar líneas celulares de muchas fuentes. Las líneas celulares derivadas de insectos se pueden identificar mediante la detección de secuencias de nucleótidos específicas de insectos.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular como se define en las reivindicaciones.

5 La presente invención puede usarse para identificar muchos tipos de líneas celulares. La expresión "línea celular" como se usa en el presente documento se refiere a cultivos celulares establecidos cultivados *in vitro*. Las líneas celulares pueden derivar de cualquier especie de animales, incluyendo mamíferos, aves e insectos. En una realización particular, el procedimiento de identificación de la presente invención se utiliza para las líneas celulares utilizadas en la industria farmacéutica. En una realización particular, se utilizan los procedimientos de la presente  
10 invención para identificar líneas celulares utilizadas en la producción de virus que se pueden usar en las vacunas.. La expresión "línea celular" abarca cultivos celulares continuos que son cultivos celulares de células morfológicamente uniformes que pueden propagarse *in vitro* durante un tiempo indefinido. De acuerdo con lo anterior, en una realización, los procedimientos de la invención pueden usarse para identificar y / o diferenciar las líneas celulares seleccionadas del grupo: MRC-5, Vero, Hi-5, CHO, FRHL2 y MDCK. Las expresión "línea celular"  
15 también incorpora líneas celulares primarias, es decir, células que se aíslan directamente de un sujeto. De acuerdo con lo anterior, en una realización, los procedimientos de la presente invención se usan para identificar células derivadas de pollo, por ejemplo, CEF (fibroblastos de embrión de pollo).

Los presentes inventores han identificado genes de calmodulina y de tirosina quinasa receptora Axl, que comprenden exones conservados e intrones variables. De acuerdo con lo anterior, en un aspecto de la divulgación,  
20 se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende la etapa de: análisis del gen de la calmodulina. En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende la etapa de: análisis del gen de la tirosina quinasa receptora de Axl.

Un gen específico de insectos también se ha identificado, lo que permite la discriminación entre células derivadas de insectos y células derivadas de otros organismos, por ejemplo células de mamífero o de aves. De acuerdo con lo  
25 anterior, en un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende la etapa de: análisis de un gen de atacina.

El término "análisis" se refiere a cualquier técnica analítica que permitirá a la persona experta diferenciar / discriminar secuencias de ácido nucleico de diferentes líneas celulares. Hay un gran número de técnicas adecuadas para este propósito conocidas por los expertos, estas técnicas incluyen, pero no se limitan a: amplificación por  
30 reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación, hibridación y polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). En un aspecto de la divulgación, se proporciona un procedimiento de identificación de línea celular de la invención en el que el procedimiento de análisis se selecciona del grupo que consiste en amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación, hibridación y polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).

35 El término "gen de la calmodulina" es bien conocido por el experto en la técnica y como se utiliza en el presente documento se entiende que significa un gen que codifica un polipéptido que comprende al menos un motivo de EF-mano que es capaz de la unión al calcio. La calmodulina desempeña un papel importante en la transmisión de las señales de  $Ca^{2+}$  intracelular a una amplia variedad de sistemas efectores (Rhyner et al., (1994) Euro J Biochem 225: 71-81). En mamíferos, 3 genes (CALM1, CALM2 y CALM3) codifican la proteína individual altamente conservada,  
40 calmodulina (CaM) (Berchtold et al., (1993) Genomics 16: 461-465). En realizaciones particulares de la invención, la expresión gen de la calmodulina es una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de SEC ID N° 7 o codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con la SEC ID N° 7.

Las expresión "gen de atacina" como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de ácido nucleico que codifican péptidos antibacterianos de insectos conocidos como atacinas y proteínas similares a la atacina  
45 incluyendo atacinas básicas y ácidas (véase, por ejemplo, Boman et al., (1991) Eur J. Biochem 201: 21-31). El término abarca secuencias genómicas que codifican atacinas, proatacinas y pre-proatacinas; estos términos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las atacinas son polipéptidos que son específicos de los insectos y, por lo tanto, no se encuentran en mamíferos ni en aves. En aspectos concretos de la divulgación, la expresión gen de  
50 la atacina es una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de SEC ID N° 9 o polipéptidos con secuencias de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con la SEC ID N° 9.

La expresión "tirosina quinasa receptora de Axl" es bien conocida por el experto en la técnica y se usa en el presente documento para significar proteínas transmembrana que participan en la señalización intracelular que se  
55 desencadena a través de la activación del dominio de tirosina quinasa y la posterior fosforilación de diversos sustratos y que es una parte del receptor de tirosina quinasa de la familia Axl. Las tirosina quinasa receptoras de Axl se expresan de forma ubicua en una serie de líneas celulares, incluyendo las de origen epitelial, mesenquimatoso y hematopoyético, así como células no transformadas (Hafizi y Dahlbäck, 2006 [Cytokine & Growth Factor Reviews 17: 295-304]).

- La actividad transformadora de la tirosina quinasa receptora Axl demuestra que el receptor puede conducir a la proliferación celular. Aunque la función de la tirosina quinasa receptora Axl en células y tejidos no transformados se desconocía, Varnum et al. (1995, Nature, 373: 623-626) sospecharon que puede implicar la estimulación de proliferación celular en respuesta a una señal adecuada, es decir un ligando que activa el receptor. Varnum et al. (1995) purificaron el factor estimulador de la tirosina quinasa receptora de Axl e identificaron como el producto del gen 6 específico del cese del crecimiento (GAS6). El gen de la tirosina quinasa Axl codifica un receptor tirosina quinasa que regula el crecimiento y diferenciación celular (O'Bryan et al., (1991) Mol Cell Biol 11: 5016-31). La organización genómica del locus del gen de la tirosina quinasa Axl humana la describió Schulz et al., (1993 Oncogene 8: 509-13). El gen de la tirosina quinasa Axl humana contiene 20 exones que se distribuyen sobre una región de 44 kb.
- 5 En realizaciones particulares de la invención, la expresión gen de la tirosina quinasa receptora Axl significa una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de SEC ID N° 8 o polipéptidos con secuencias de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con la SEC ID N° 8.
- 10 En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende las siguientes etapas: (a) análisis del gen de la calmodulina; y (b) análisis del gen de la tirosina quinasa receptora Axl.
- 15 En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende las siguientes etapas: (a) análisis del gen de la calmodulina; y (b) análisis de un gen de atacina.
- En un aspecto, se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende las siguientes etapas: (a) análisis de un gen de atacina; y (b) análisis del gen de la tirosina quinasa receptora Axl.
- 20 En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende las siguientes etapas: (a) análisis del gen de la calmodulina; (b) análisis del gen de la tirosina quinasa receptora Axl; y (c) análisis de un gen de atacina.
- Se prevé que el experto puede desear utilizar diversas técnicas moleculares para identificar una o más líneas celulares. Por ejemplo, en ciertos aspectos de la divulgación el experto puede utilizar uno o más, o cualquier combinación de las siguientes técnicas: PCR, secuenciación, hibridación y RFLP. De acuerdo con lo anterior, los procedimientos de la divulgación pueden llevarse a cabo utilizando una o más de las técnicas moleculares seleccionadas de la lista que comprende PCR, secuenciación, hibridación y RFLP, o cualquier combinación de las mismas.
- 25 En un aspecto particular de la divulgación, se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende las etapas que comprenden una o más de las siguientes etapas: (a) amplificación por PCR de un gen de la calmodulina o fragmento del mismo; (b) amplificación por PCR de un gen de la tirosina quinasa receptora Axl o fragmento del mismo; o (c) amplificación por PCR de un gen de atacina o fragmento del mismo; o cualquier combinación de los mismos.
- 30 El término "fragmento" como se describe en el presente documento se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico de un gen, que no es toda la secuencia del gen, que comprende al menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 400, 600, 800, 1.000, 1.200, 1.400, 1.600 o más nucleótidos.
- 35 En un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende una o más de las etapas siguientes: (a) hibridación de una sonda al gen de la calmodulina o fragmento del mismo; (b) hibridación de una sonda a un gen de la tirosina quinasa receptora Axl o fragmento del mismo; o (c) hibridación de una sonda a un gen de atacina o fragmento del mismo; o cualquier combinación de los mismos.
- 40 En un aspecto de la divulgación, se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende una o más de las etapas siguientes: (a) secuenciación del gen de la calmodulina o fragmento del mismo; (b) secuenciación de un gen de la tirosina quinasa receptora Axl o fragmento del mismo; o (c) secuenciación de un gen de atacina o fragmento del mismo; o cualquier combinación de los mismos.
- 45 Los genes que codifican la calmodulina comprenden intrones de tamaño variable entre las diferentes líneas celulares.
- De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la línea celular se identifica por el tamaño (número de nucleótidos) del amplicón (producto amplificado tras la PCR). Los inventores han determinado que los intrones dentro de los genes de la tirosina quinasa receptora Axl y de calmodulina varían en cuanto al tamaño entre las diferentes especies y / o cepas. De acuerdo con lo anterior, en un aspecto particular de la divulgación las líneas celulares se pueden diferenciar y / o determinado por el tamaño de un intrón en particular entre dos exones. En un aspecto particular, las líneas celulares se determinan por el tamaño del amplicón derivado del gen de la calmodulina y / o del gen de la tirosina quinasa receptora Axl. En un aspecto, se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende la etapa: amplificación por PCR del gen de la calmodulina o fragmento del mismo.
- 50 La amplificación por PCR de un fragmento del gen de la calmodulina permite la identificación y / o la diferenciación de líneas celulares ya que los mismos genes de diferentes líneas celulares difieren en la longitud de los intrones. Por
- 55

lo tanto se pueden usar conjuntos de cebadores que se diseñan para amplificar uno o más de los intrones que se encuentran en el gen de la calmodulina para identificar y / o diferenciar líneas celulares. De acuerdo con lo anterior, en un aspecto de la divulgación, se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende la etapa de: amplificación por PCR de uno o más de los intrones de calmodulina o un fragmento de los mismos. En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende la etapa de: amplificación por PCR del intrón entre los exones 3 y 4 del gen de la calmodulina.

En un aspecto, se proporciona un procedimiento en el que un fragmento del gen de la calmodulina se amplifica por PCR y en un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento en el que el fragmento amplificado comprende la secuencia entre el exón 3 y el exón 4 del gen de la calmodulina.

En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento en el que un fragmento del gen de la calmodulina se amplifica usando al menos uno de los cebadores seleccionados de la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2 o un derivado funcional de los mismos.

El gen de la tirosina quinasa receptora Axl ha conservado exones e intrones que varían entre las diferentes líneas celulares. De acuerdo con lo anterior, en un aspecto se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende la etapa: amplificación por PCR de un gen de la tirosina quinasa receptora Axl o fragmento del mismo. La amplificación por PCR de un fragmento del gen de la tirosina quinasa receptora Axi permite la diferenciación entre líneas celulares, ya que las diferentes líneas celulares difieren en la longitud de los intrones. Por lo tanto, los conjuntos de cebadores que se diseñan para amplificar uno o más de los intrones que se encuentran en los genes de tirosina quinasa receptora Axl se pueden utilizar para diferenciar entre diferentes líneas celulares; de este modo la amplificación de un intrón que varía en cuanto a longitud entre las diferentes líneas celulares se puede usar en los procedimientos de la divulgación. De acuerdo con lo anterior, en un aspecto se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende la etapa: amplificación por PCR de uno o más intrones del gen de la tirosina quinasa receptora Axl o fragmento del mismo. En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende la etapa de: amplificación por PCR del intrón entre los exones 18 y 19 del gen de la tirosina quinasa receptora Axl. En un aspecto, se proporciona un procedimiento por el cual se amplifica un fragmento del gen de la tirosina quinasa receptora Axl por PCR. En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento en el que el fragmento amplificado comprende la secuencia entre el exón 18 y el exón 19 del gen de la tirosina quinasa receptora Axl. Adecuadamente, el procedimiento en el que un fragmento del gen de la tirosina quinasa receptora Axl se amplifica utiliza al menos uno de los cebadores seleccionados de las SEC ID N° 3 y la SEC ID N° 4 o un derivado funcional de los mismos.

El tipo de célula puede determinarse por la presencia o ausencia del gen es decir, la línea celular particular puede diferenciarse de otra a través de la presencia o ausencia de un gen particular o fragmento del mismo.

Por "presencia" de un gen se quiere decir que la totalidad o parte del gen especificado es detectable por procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, una línea celular de insecto puede diferenciarse de una línea celular de mamífero a través de la detección de un gen solo presente en células de insecto.

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende la etapa en la que el tipo de línea celular se determina por la presencia y / o ausencia de un gen de atacina o fragmento del mismo.

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende la etapa: amplificación por PCR del gen de pre-proatacina (PPATT) o fragmento del mismo. En un aspecto, se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende la etapa: amplificación por PCR del gen de pre-proatacina A (PPATTA) o fragmento del mismo. En un aspecto, se proporciona un procedimiento en el que un fragmento del gen de atacina se amplifica por PCR. De acuerdo con lo anterior, un procedimiento en el que un fragmento del gen PPATT se amplifica usando al menos uno de los cebadores que comprenden las secuencias seleccionadas de la SEC ID N° 5 y la SEC ID N° 6 o un derivado funcional de los mismos.

Sin embargo, está claro para la persona experta en la técnica que la presencia y o ausencia de un gen pueden determinarse por una serie de técnicas, que incluyen amplificación por PCR del gen o parte del mismo. Otras técnicas mediante las cuales la presencia de genes puede evaluarse incluyen, pero no se limitan a, hibridación de ADN, en particular en hibridación de ADN *in situ*. Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "hibridación" o "hibridación específica" significa que el cebador o sonda forma un dúplex (secuencia de nucleótidos de doble cadena) con parte de una diana o con toda la región en las condiciones experimentales utilizadas, y que en dichas condiciones, el cebador o sonda no forma un dúplex con otras regiones de la secuencia de nucleótidos presente en la muestra a analizar. Se debe entender que los cebadores y sondas de la presente divulgación se diseñan para la hibridación específica a genes específicos y, por lo tanto, pueden estar completamente dentro de dicha región o pueden, en gran medida, superponerse con dicha región (es decir, forman un dúplex con nucleótidos en el exterior, así como dentro de dicha región). De acuerdo con lo anterior se proporciona un procedimiento en el

que los cebadores como se describe en el presente documento se pueden utilizar durante una reacción PCR o hibridación de ADN..

La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede realizar a partir del ácido nucleico genómico aislado y/o purificado partir de un cultivo celular. Abarcadas en la divulgación hay reacciones de PCR llevadas a cabo en una suspensión de células, preparación genómica bruta, aislada o purificada, utilizando técnicas de preparación de ADN genómico bien conocidas por los expertos en la técnica. Las preparaciones genómicas abarcadas por la presente divulgación pueden aislarse o purificarse sustancialmente. Por "aislada" o "sustancialmente purificada" se pretende que las moléculas de ácido nucleico estén sustancialmente o esencialmente libres de componentes que normalmente se encuentran en asociación con el ácido nucleico en su estado natural. Tales componentes incluyen otros materiales celulares y medios de cultivo, por ejemplo.

Los procedimientos para diseñar cebadores de PCR son generalmente conocidos en la técnica y se describen en Sambrook and Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Harbour Laboratory Press). Los procedimientos conocidos de PCR incluyen, pero no se limitan a, procedimientos utilizando cebadores apareados, cebadores anidados, cebadores específicos individuales, cebadores degenerados, cebadores específicos de genes, cebadores específicos del vector, cebadores parcialmente coincidentes, y similares.

Con la PCR, es posible amplificar una única copia de una secuencia diana específica en el ADN genómico hasta un nivel detectable mediante varias metodologías diferentes (por ejemplo, sin limitaciones, hibridación con una sonda marcada; incorporación de cebadores biotinilados; seguido de detección del conjugado de avidina-enzima; incorporación de los desoxinucleótidos trifosfato marcados con <sup>32</sup>P, tales como dCTP o dATP, en el segmento amplificado, incorporación de un fluorocromo tal como bromuro de etidio u otros compuestos comerciales). Además del ADN genómico, se puede amplificar cualquier secuencia de nucleótidos con el conjunto adecuado de moléculas cebadoras. En concreto, los segmentos amplificados creados mediante el propio procedimiento de PCR son, ellos mismos, moldes eficientes para las posteriores amplificaciones por PCR.

La amplificación por PCR requiere "reactivos de PCR" o "materiales de PCR", que en el presente documento se definen como todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación, excepto la polimerasa, los cebadores y el molde. Los reactivos de PCR normalmente incluyen precursores de ácido nucleico (dCTP, dTTP, etc.), y tampón.

El término "cebador" se usa en el presente documento para referirse a cualquier secuencia de oligonucleótido de cadena sencilla que se puede usar como cebador en, por ejemplo, la tecnología PCR. Por lo tanto, un "cebador" se refiere a una secuencia de oligonucleótido de cadena sencilla que puede actuar como punto de inicio para la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario a la hebra de ácido nucleico que se va a copiar. El diseño (longitud y secuencia específica) del cebador dependerá de la naturaleza de las dianas de ADN y / o ARN y de las condiciones en las que se utiliza el cebador (tales como la temperatura y la fuerza iónica).

Los cebadores que pueden consistir en las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEC ID N° 1 a 6, o pueden ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 o 100 o más bases que comprenden o entran dentro de las secuencias de SEC ID N° 1 a 6, siempre que sean adecuadas para la unión específica de ADN de los loci diana, en condiciones rigurosas. Cuando sea necesario, se pueden llevar a cabo ligeras modificaciones de los cebadores o sondas en cuanto a la longitud o a la secuencia para mantener la especificidad y la sensibilidad requeridas en las circunstancias dadas y, por lo tanto, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más nucleótidos pueden estar sustituidos. Las sondas y / o los cebadores enumerados en el presente documento pueden extenderse en 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos, por ejemplo, en cualquier dirección.

Para evitar dudas, la designación de una letra que no sea A, T, G y C significan lo siguiente:

Código de una sola letra
<b>B</b> = C o G o T
<b>D</b> = A o G o T
<b>H</b> = A o C o T
<b>K</b> = G o T
<b>M</b> = A o C
<b>N</b> = A o C o G o T
<b>R</b> = A o G
<b>S</b> = C o G

<b>V</b> = A o C o G
<b>W</b> = A o T
<b>Y</b> = C o T

La expresión "derivado funcional" se usa en el presente documento para hacer referencia a un cebador que comprende una secuencia que es al menos un 95 % idéntica a un cebador tal como se define en el presente documento sobre la longitud del cebador, adecuadamente mayor que un 95 % idéntica tal como 96 %, 97 %, 98 %, 99 % y, más preferiblemente, tiene una identidad del 100 % sobre su longitud. Los derivados funcionales pueden tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 deleciones de bases en el extremo 5' o 3' o ambos.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "condiciones rigurosas" significa cualquier condición de hibridación que permita que los cebadores se unan a una secuencia de nucleótidos específica, y no a cualquier otro locus en el genoma de la célula. Tales condiciones rigurosas son conocidas por los expertos en la técnica y se pueden encontrar en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación rigurosas es la hibridación a 6X de cloruro sódico / citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,1 x SSC, 0,2% SDS a aproximadamente 68 °C. Un ejemplo alternativo de condiciones de hibridación rigurosas son hibridación en 6 X SSC a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2 X SSC, 0,1% de SDS a un 50-65 °C (es decir, uno o más lavados a 50 °C, 55 °C, 60 °C o 65 °C).

Los procedimientos de la divulgación pueden adaptarse de acuerdo con las líneas celulares que se tienen que diferenciar o determinar. Por ejemplo, algunas líneas celulares pueden diferenciarse mediante amplificación por PCR de un intrón de solo calmodulina. Sin embargo, algunas líneas celulares pueden dar lugar a un amplicón que es del mismo tamaño o como otra línea celular y, por lo tanto, se requieren medidas adicionales para la identificación de la línea celular.

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende las etapas: amplificación por PCR del gen de la calmodulina o fragmento del mismo.

En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende las etapas de: amplificación por PCR del gen de la atacina o fragmento del mismo.

En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende las etapas de: amplificación por PCR del gen de la tirosina quinasa receptora Axl o fragmento del mismo.

En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende las etapas siguientes: (a) amplificación por PCR del gen de la calmodulina o fragmento del mismo; y (b) amplificación por PCR de un gen de atacina o fragmento del mismo.

En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende las etapas siguientes: (a) amplificación por PCR del gen de la calmodulina o fragmento del mismo; y (b) amplificación por PCR del gen de la tirosina quinasa receptora Axl o fragmento del mismo.

En una realización adicional, se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende las etapas siguientes: (a) amplificación por PCR de un gen de atacina o fragmento del mismo; y (b) amplificación por PCR de un gen de la tirosina quinasa receptora Axl o fragmento del mismo.

En un aspecto se proporciona un procedimiento de identificación de la línea celular que comprende las etapas siguientes: (a) amplificación por PCR del gen de la calmodulina o fragmento del mismo; (b) amplificación por PCR de un gen de la atacina o fragmento del mismo; y (c) amplificación por PCR del gen de la tirosina quinasa receptora Axl o fragmento del mismo.

En un aspecto particular, las reacciones de PCR pueden llevarse a cabo en una sola reacción de PCR. De acuerdo con lo anterior, un aspecto proporciona un procedimiento en el que se multiplexan las reacciones de amplificación de PCR. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "multiplexado" significa que cualquier número de reacciones de PCR se realiza en un único tubo de reacción, es decir, el contenido de un único tubo de reacción comprende más de 1 conjunto de cebadores. Los cebadores de la divulgación están diseñados de forma que se pueda realizar una sola reacción de PCR usando las condiciones de reacción especificadas que permiten amplificaciones de cada gen o fragmento del mismo utilizado en el procedimiento de la identificación celular (calmodulina, tirosina quinasa receptora Axl y atacina) sin perjuicio de la amplificación de otro gen. La multiplexación permite un procedimiento más rápido y más fácil de identificación molecular de la línea celular como se describe en el presente documento.

Los procedimientos de la divulgación son adecuadas para la identificación de varias líneas celulares que comprenden un gen de calmodulina, tirosina quinasa receptora Axl o atacina. En un aspecto, se proporciona un

procedimiento para la identificación de líneas celulares utilizadas en la industria farmacéutica, particularmente en la producción de vacunas. En un aspecto, se proporciona un procedimiento para la identificación de las líneas celulares MRC-5, Vero, Hi-5, CHO, FRHL2, CEF y MDCK. Estas líneas de células-son bien conocidas para los expertos en la técnica, sin embargo, para resumir:

5

Línea celular	Organismo
CHO	<i>Cricetulus griseus</i> Hámster chino
MRC-5	<i>Homo sapiens ser humano</i>
MDCK	<i>Canis familiaris</i> Perro
Vero	<i>Cercopithecus aethiops</i> Mono verde africano
FRHL2	<i>Macaca mulatta</i> macaco Rhesus
Pollo	<i>Gallus gallus</i>
Hi-5	<i>Trichoplusia ni</i> Insectos lepidópteros

10 En un aspecto adicional se proporciona un kit para la identificación de línea celular que comprende cebadores complementarios a uno cualquiera de: el gen de la calmodulina; un gen de la tirosina quinasa receptora Axl; o un gen de atacina; o cualquier combinación de los mismos. En un aspecto adicional, el kit comprende al menos un cebador que comprende o que consiste en las siguientes secuencias o derivados funcionales de las mismas: SEC ID N° 1, la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 3, la SEC ID N° 4, la SEC ID N° 5 o SEC ID N° 6 o un derivado funcional de los mismos.

En un aspecto, se proporciona el uso de un gen de calmodulina, un gen de tirosina quinasa y / o el gen de atacina o cualquier combinación de los mismos en la identificación de la línea celular.

### Ejemplos

#### 15 1.1 Extracción de ADN genómico y amplificación por PCR

El ADN genómico se extrajo de células CHO, MRC-5, MDCK, VERO, FRHL2, Hi-5 y *Gallus* [CFO] usando el kit High Pure PCR template Preparation Kit (Roche). A continuación, la PCR se realizó en las siguientes condiciones de reacción utilizando los cebadores Calm ex 3F (SEC ID N° 1 Calm ex 4R (SEC ID N° 2), Axl ex 18F (SEC ID N° 3), Axl 19R (SEC ID N° 4), ppatta F (SEC ID N° 5) y ppatta R (SEC ID N° 6)

Mezcla		Ciclos		
Volumen (µl)	Ingredientes	Temperatura	Tiempo	Ciclos
hasta 25	H <sub>2</sub> O <sub>PCR</sub>	95 °C	4 min	X35
2,5	Tp PCR10x(+MgC1 <sub>2</sub> )	95 °C	30 s	
1	dNTP 10 mM	60 °C	30 s	
0,2	Cebador Axl exl 8F	72 °C	1 min	
0,2	Cebador Axl exl 9R	72 °C	7 min	



0,1	Cebador Calm ex 3F	
0,1	Cebador Calm ex 4R	
0,05	Cebador ppatta F	
0,05	Cebador ppatta R	
<b>0,3</b>	<b>Ex Taq Takara</b>	
<b>1</b>	<b>ADN (100 ng)</b>	

### 2.1 Determinación del tamaño de los productos de PCR mediante electroforesis capilar

El siguiente ejemplo demuestra que la diferencia en el tamaño del intrón entre los exones 3 y 4 de la calmodulina y 18 y 19 de Axl, puede, inequívocamente, identificar las 7 líneas celulares diferentes de las que se extrajo el ADN genómico (véase 1.1).

A fin de permitir la detección de los productos de ADN después de electroforesis capilar, los cebadores inversos usados durante la amplificación por PCR se marcaron con colorantes fluorescentes distintos; el cebador inverso para PPTTA se marcó con NED, el cebador inverso para la calmodulina se marcó con Hex y el cebador inverso para Axl se marcó con 6-FAM. Los fragmentos de ADN marcado resultante se hicieron correr en paralelo con un marcador de tamaño, lo que permite el análisis del producto de PCR con una resolución de tamaño de aproximadamente 1 pb para los fragmentos de menos de 500 pb.

El ADN genómico se amplificó utilizando cebadores inversos fluorescentes a una temperatura de hibridación de 60 °C (de acuerdo con las condiciones de PCR descritas anteriormente). La electroforesis capilar se realizó con el instrumento Genetic Analyzer (ABI3730) utilizando capilares de 50 cm (ROX-1200 de escalera, ABI).

Los tamaños de los productos amplificados se compararon con los tamaños esperados en la **Tabla 1**. Los perfiles de electroforesis capilar se presentan en las **Figuras 1 a 3**.

**Tabla 1:** Comparación de los tamaños de los productos de PCR determinados por electroforesis capilar (observada a partir de las células) con los tamaños deducidos a partir de las secuencias publicadas (esperadas a partir del organismo).

Células	PPATTA		CALM3/4		AXL18/19	
	Células observadas	Organismo esperado	Células observadas	Organismo esperado	Células observadas	Organismo esperado
MRC-5	NA	NA	316	320	1001	1010
VERO	NA	NA	273	ND	1027+1031	ND
CHO	NA	NA	274	ND	654	ND
FRHL2	NA	NA	274	278	1007	1021
MDCK	NA	NA	277+279	283	355+577	583
Pollo	NA	NA	267	270	1350	1489
Hi-5	244	235	NA	NA	NA	NA
NA: No aplicable						
ND: No descrito						

#### Productos de PCR CALM3/4 (amplificación del gen de la calmodulina entre los exones 3 y 4)

El tamaño de los productos de PCR amplificados a partir de las células MRC-5, FRHL-2, MDCK y de pollo fue muy cercano a los tamaños previstos. Se observaron dos picos a partir de las células MDCK (277 y 279 pb).

Un fragmento 274bp se amplificó a partir de células CHO y FHRL-2, cerca del fragmento de 273 pb amplificado a partir de células VERO. Otros fragmentos fueron diferentes en al menos 3 pares de bases. Los tamaños de los fragmentos VERO y CHO no se conocían antes de realizar el experimento.

#### Productos de PCR AXL18/19 (amplificación del gen de la calmodulina entre los exones 18 y 19)

La PCR de AXL 18/19 permitió la discriminación de los ADN de 6 vertebrados. El tamaño de los productos amplificados a partir de células VERO (1.027 y 1.031 pb) y CHO (654 pb) fue claramente diferente.

**Productos de PCR de PPATTA (atacina)**

5 El tamaño del fragmento de ADN amplificado a partir del ADN de *T. ni* usando los cebadores de PPATTA se estimó en 244 pb. Este tamaño coincidió con los 235 pb esperados.

**Conclusiones**

El análisis combinado de los productos de la PCR de CALM3 / 4 y AXL18 / 19 produjo patrones de tamaño que permiten la identificación inequívoca de las 6 líneas celulares de vertebrados.

**3.1 Capacidad para detectar una especie menor es decir, la contaminación**

10 El objetivo del siguiente ejemplo era evaluar la capacidad del ensayo de PCR anterior para detectar una mezcla de 2 tipos diferentes de células en la que las principales especies representan el 90 %, y las especies menores representan el 10 % de la mezcla.

Las mezclas de 90/10% de diferentes tipos de células se realizaron a nivel del ADN genómico considerando el número de copias del genoma (véase la **Tabla 2**).

15 El número de copias del genoma se calculó a partir de la cantidad de DNA (medida por el sistema Threshold) y de los tamaños del genoma (<http://www.genomesize.com>).

**Tabla 2:** Determinación del número de copias del genoma

Línea celular	Tamaño del genoma haploide (qg)	Concentración de ADN (ng/μl)	Volumen en 100 μl para obtener 9.000 copias / μl	Volumen en 100 μl para obtener 1000 copias / μl
MRC-5	3,5	83	37,8	4,2
Vero	3,5	58	54	6
Hi-5	0,5	96	5	0,5
CHO	3,5	69	45	5
FRHL2	3,5	126	25,2	2,8
MDCK	3,2	34	85,5	9,5
Pollo	1,25	38	29,7	3,3

Aproximadamente 27.000 copias de las principales especies y 3.000 copias de las especies menores se mezclaron y se amplificaron en las condiciones de PCR descritas anteriormente (véase 1.1)

20 **Resultados**

Los resultados de la detección de las diferentes mezclas se resumen en la **Tabla 3**.

**Tabla 3:** Detección de una especie menor presentes en el 10 % en la mezcla de líneas celulares

Línea celular			MRC-5 10 %	VERO 10 %	Hi-5 10 %	CHO 10 %	FRHL-2 10 %	MDCK 10 %	Pollo 10 %
MRC-5	90 %	Gen		OK	NA	OK	OK	OK	OK
		Axl		OK	NA	OK	OK	OK	OK
		PPATTA		NA	OK	NA	NA	NA	NA
VERO	90 %	Calm	OK		NA	278/277	278/277	OK	OK
		Axl	NO		NA	OK	OK	OK	OK

		PPATTA	NA		OK	NA	NA	NA	NA
Hi-5	90 %	Calm	OK	OK		OK	OK	OK	OK

		Axl	OK	OK		OK	OK	OK	OK
		PPATTA	NA	NA		NA	NA	NA	NA
<b>CHO</b>	<b>90 %</b>	Calm	OK	277/278	NA		278/278	OK	OK
		Axl	OK	OK	NA		OK	OK	OK
		PPATTA	NA	NA	OK		NA	NA	NA
<b>FRHL-2</b>	<b>90 %</b>	Calm	OK	277/278	NA	278/278		NO	OK
		Axl	NO	OK	NA	OK		OK	OK
		PPATTA	NA	NA	OK	NA		NA	NA
<b>MDCK</b>	<b>90 %</b>	Calm	OK	OK	NA	OK	OK		OK
		Axl	OK	OK	NA	OK	OK		OK
		PPATTA	NA	NA	OK	NA	NA		NA
<b>Pollo</b>	<b>90 %</b>	Calm	OK	OK	NA	OK	OK	OK	
		Axl	OK	OK	NA	OK	OK	OK	
		PPATTA	NA	NA	OK	NA	NA	NA	

**OK:** El 10 % de las especies menores se detectó utilizando la PCR mencionada

Cuando no se puede distinguir la especie porque el tamaño del fragmento es idéntico, o muy cercano, el tamaño de ambos productos se indica en la tabla

5 **NO:** El 10 % de las especies menores no se detectó utilizando la PCR mencionada

**NA:** No aplicable

Para algunas mezclas, una sola amplificación por PCR no permitió detectar las especies menores:

- Las mezclas de CHO/VERO/FRHL2 no se pudieron detectar usando la PCR de CALM3 / debido a que los productos mostraron tamaños idénticos o similares
- 10
- 10 % de MDCK en FRHL-2 no se pudo detectar con el ensayo de CALM3/4
  - El 10 % de MRC5 in FRHL-2 y en VERO no se pudo detectar con el ensayo de AXL18/19

Por lo tanto, puede verse que el análisis combinado de los productos de PCR de CALM3/4, AXL18/19 y PPATTA permitió la detección de una contaminación de 10 % de ADN entre las 7 líneas celulares diferentes y que, en algunos casos, se requirió sólo análisis de 1 o 2 genes para detectar la contaminación.

15 **Listado de secuencias**

<110> Cassart, Jean-Pol Lienard, Patricia

<120> Nuevo procedimiento

<130> VB63206P

<160> 9

20 <170> FastSEQ para la versión 4.0 de Windows

<210> 1

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 1

caaagaagcy ttttctat ttagaca 27

<210> 2

30 <211> 26

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 5 <400> 2  
 tcattttct tgccatcatt gtcaga 26  
 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 3  
 ggrgactact accgycaggg 20  
 15 <210> 4  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> oligonucleótido  
 <400> 4  
 caatctcca catbgcacc cc 22  
 <210> 5  
 <211> 25  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 5  
 30 ctattgtcga ccatacctct accgt 25  
 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 6

ES 2 554 835 T3

cgtgccggtt gctggataag 20

<210> 7

<211> 149

<212> PRT

5 <213> H. sapiens

<400> 7

Met Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala  
 1 5 10 15  
 Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu  
 20 25 30  
 Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu  
 35 40 45  
 Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile  
 50 55 60  
 Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr  
 65 70 75 80  
 Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp  
 85 90 95  
 Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn  
 100 105 110  
 Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu  
 115 120 125  
 Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln  
 130 135 140  
 Met Met Thr Ala Lys  
 145

<210> 8

<211> 894

10 <212> PRT

<213> H. sapien

<400> 8

Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys  
 1 5 10 15  
 Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala  
 20 25 30  
 Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg

ES 2 554 835 T3

		35				40				45					
Gly	Leu	Thr	Gly	Thr	Leu	Arg	Cys	Gln	Leu	Gln	Val	Gln	Gly	Glu	Pro
	50					55					60				
Pro	Glu	Val	His	Trp	Leu	Arg	Asp	Gly	Gln	Ile	Leu	Glu	Leu	Ala	Asp
65					70					75					80
Ser	Thr	Gln	Thr	Gln	Val	Pro	Leu	Gly	Glu	Asp	Glu	Gln	Asp	Asp	Trp
				85					90					95	
Ile	Val	Val	Ser	Gln	Leu	Arg	Ile	Thr	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Asp	Thr
			100					105						110	
Gly	Gln	Tyr	Gln	Cys	Leu	Val	Phe	Leu	Gly	His	Gln	Thr	Phe	Val	Ser
		115					120								
Gln	Pro	Gly	Tyr	Val	Gly	Leu	Glu	Gly	Leu	Pro	Tyr	Phe	Leu	Glu	Glu
	130					135					140				
Pro	Glu	Asp	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Asn	Thr	Pro	Phe	Asn	Leu	Ser	Cys
145					150						155				160
Gln	Ala	Gln	Gly	Pro	Pro	Glu	Pro	Val	Asp	Leu	Leu	Trp	Leu	Gln	Asp
				165					170					175	
Ala	Val	Pro	Leu	Ala	Thr	Ala	Pro	Gly	His	Gly	Pro	Gln	Arg	Ser	Leu
			180					185						190	
His	Val	Pro	Gly	Leu	Asn	Lys	Thr	Ser	Ser	Phe	Ser	Cys	Glu	Ala	His
		195					200					205			
Asn	Ala	Lys	Gly	Val	Thr	Thr	Ser	Arg	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Val	Leu
	210					215						220			
Pro	Gln	Gln	Pro	Arg	Asn	Leu	His	Leu	Val	Ser	Arg	Gln	Pro	Thr	Glu
225					230						235				240
Leu	Glu	Val	Ala	Trp	Thr	Pro	Gly	Leu	Ser	Gly	Ile	Tyr	Pro	Leu	Thr
				245						250					255
His	Cys	Thr	Leu	Gln	Ala	Val	Leu	Ser	Asp	Asp	Gly	Met	Gly	Ile	Gln
			260					265					270		
Ala	Gly	Glu	Pro	Asp	Pro	Pro	Glu	Pro	Leu	Thr	Ser	Gln	Ala	Ser	
		275					280					285			
Val	Pro	Pro	His	Gln	Leu	Arg	Leu	Gly	Ser	Leu	His	Pro	His	Thr	Pro
	290					295						300			
Tyr	His	Ile	Arg	Val	Ala	Cys	Thr	Ser	Ser	Gln	Gly	Pro	Ser	Ser	Trp
305					310					315					320
Thr	His	Trp	Leu	Pro	Val	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Pro
				325					330					335	
Pro	Glu	Asn	Ile	Ser	Ala	Thr	Arg	Asn	Gly	Ser	Gln	Ala	Phe	Val	His
		340						345						350	
Trp	Gln	Glu	Pro	Arg	Ala	Pro	Leu	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Gly	Tyr	Arg
		355					360							365	
Leu	Ala	Tyr	Gln	Gly	Gln	Asp	Thr	Pro	Glu	Val	Leu	Met	Asp	Ile	Gly
	370					375					380				
Leu	Arg	Gln	Glu	Val	Thr	Leu	Glu	Leu	Gln	Gly	Asp	Gly	Ser	Val	Ser
385					390						395				400
Asn	Leu	Thr	Val	Cys	Val	Ala	Ala	Tyr	Thr	Ala	Ala	Gly	Asp	Gly	Pro
				405					410					415	
Trp	Ser	Leu	Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Ala	Trp	Arg	Pro	Gly	Gln	Ala	Gln
			420					425						430	
Pro	Val	His	Gln	Leu	Val	Lys	Glu	Pro	Ser	Thr	Pro	Ala	Phe	Ser	Trp
		435					440							445	
Pro	Trp	Trp	Tyr	Val	Leu	Leu	Gly	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Cys	Val
	450					455						460			
Leu	Ile	Leu	Ala	Leu	Phe	Leu	Val	His	Arg	Arg	Lys	Lys	Glu	Thr	Arg
465					470						475				480
Tyr	Gly	Glu	Val	Phe	Glu	Pro	Thr	Val	Glu	Arg	Gly	Glu	Leu	Val	Val
				485					490						495
Arg	Tyr	Arg	Val	Arg	Lys	Ser	Tyr	Ser	Arg	Arg	Thr	Thr	Glu	Ala	Thr
			500					505						510	
Leu	Asn	Ser	Leu	Gly	Ile	Ser	Glu	Glu	Leu	Lys	Glu	Lys	Leu	Arg	Asp

ES 2 554 835 T3

		515					520					525			
Val	Met	Val	Asp	Arg	His	Lys	Val	Ala	Leu	Gly	Lys	Thr	Leu	Gly	Glu
	530					535					540				
Gly	Glu	Phe	Gly	Ala	Val	Met	Glu	Gly	Gln	Leu	Asn	Gln	Asp	Asp	Ser
545					550					555					560
Ile	Leu	Lys	Val	Ala	Val	Lys	Thr	Met	Lys	Ile	Ala	Ile	Cys	Thr	Arg
				565					570					575	
Ser	Glu	Leu	Glu	Asp	Phe	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Cys	Met	Lys	Glu	Phe
			580					585					590		
Asp	His	Pro	Asn	Val	Met	Arg	Leu	Ile	Gly	Val	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser
		595					600					605			
Glu	Arg	Glu	Ser	Phe	Pro	Ala	Pro	Val	Val	Ile	Leu	Pro	Phe	Met	Lys
610						615					620				
His	Gly	Asp	Leu	His	Ser	Phe	Leu	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Gly	Asp	Gln
625					630					635					640
Pro	Val	Tyr	Leu	Pro	Thr	Gln	Met	Leu	Val	Lys	Phe	Met	Ala	Asp	Ile
				645					650					655	
Ala	Ser	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu	Ser	Thr	Lys	Arg	Phe	Ile	His	Arg	Asp
			660					665					670		
Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Cys	Met	Leu	Asn	Glu	Asn	Met	Ser	Val	Cys	Val
		675					680					685			
Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ser	Lys	Lys	Ile	Tyr	Asn	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Arg
690						695					700				
Gln	Gly	Arg	Ile	Ala	Lys	Met	Pro	Val	Lys	Trp	Ile	Ala	Ile	Glu	Ser
705					710					715					720
Leu	Ala	Asp	Arg	Val	Tyr	Thr	Ser	Lys	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly
				725					730					735	
Val	Thr	Met	Trp	Glu	Ile	Ala	Thr	Arg	Gly	Gln	Thr	Pro	Tyr	Pro	Gly
		740						745					750		
Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Ile	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Arg	Gln	Gly	Asn	Arg	Leu
		755					760					765			
Lys	Gln	Pro	Ala	Asp	Cys	Leu	Asp	Gly	Leu	Tyr	Ala	Leu	Met	Ser	Arg
770						775					780				
Cys	Trp	Glu	Leu	Asn	Pro	Gln	Asp	Arg	Pro	Ser	Phe	Thr	Glu	Leu	Arg
785				790						795					800
Glu	Asp	Leu	Glu	Asn	Thr	Leu	Lys	Ala	Leu	Pro	Pro	Ala	Gln	Glu	Pro
				805				810						815	
Asp	Glu	Ile	Leu	Tyr	Val	Asn	Met	Asp	Glu	Gly	Gly	Gly	Tyr	Pro	Glu
			820					825					830		
Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Asp	Pro	Pro	Thr	Gln	Pro	Asp	Pro
		835					840					845			
Lys	Asp	Ser	Cys	Ser	Cys	Leu	Thr	Ala	Ala	Glu	Val	His	Pro	Ala	Gly
850						855					860				
Arg	Tyr	Val	Leu	Cys	Pro	Ser	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro	Ala	Gln	Pro	Ala
865					870					875					880
Asp	Arg	Gly	Ser	Pro	Ala	Ala	Pro	Gly	Gln	Glu	Asp	Gly	Ala		
				885					890						

<210> 9

<211> 192

<212> PRT

5 <213> Trichoplusia

<400> 9

ES 2 554 835 T3

Gln	Ala	Gln	Gly	Ser	Val	Thr	Leu	Asn	Ser	Asp	Gly	Ser	Met	Gly	Leu
1				5					10					15	
Gly	Ala	Lys	Val	Pro	Ile	Val	Gly	Asn	Glu	Lys	Asn	Val	Leu	Ser	Ala
			20					25					30		
Leu	Gly	Ser	Val	Asp	Leu	Asn	Asp	Gln	Leu	Lys	Pro	Ala	Ser	Arg	Gly
			35					40						45	
Met	Gly	Leu	Ala	Leu	Asp	Asn	Val	Asn	Gly	His	Gly	Leu	Ser	Val	Met
	50					55					60				
Lys	Glu	Thr	Val	Pro	Gly	Phe	Gly	Asp	Arg	Leu	Thr	Gly	Ala	Gly	Arg
65					70					75					80
Val	Asn	Val	Phe	His	Asn	Asp	Asn	His	Asp	Ile	Ser	Ala	Lys	Ala	Phe
				85					90					95	
Val	Thr	Lys	Asn	Met	Pro	Asp	Phe	Pro	Asn	Val	Pro	Asn	Phe	Asn	Thr
			100					105					110		
Val	Gly	Gly	Gly	Val	Asp	Tyr	Met	Tyr	Lys	Asn	Lys	Val	Gly	Ala	Ser
		115					120					125			
Leu	Gly	Met	Ala	Asn	Thr	Pro	Phe	Leu	Asp	Arg	Lys	Asp	Tyr	Ser	Ala
	130					135					140				
Met	Gly	Asn	Leu	Asn	Val	Phe	Arg	Ser	Pro	Thr	Thr	Ser	Val	Asp	Phe
145					150					155					160
Asn	Ala	Gly	Phe	Lys	Lys	Phe	Asp	Thr	Pro	Val	Phe	Lys	Ser	Asn	Trp
				165					170					175	
Glu	Pro	Asn	Phe	Gly	Leu	Thr	Phe	Ser	Arg	Ser	Phe	Gly	Asn	Lys	Trp
			180						185				190		



**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de identificación de línea celular que comprende las siguientes etapas:

5 (a) análisis del gen de calmodulina, en el que un fragmento del gen de calmodulina es amplificado por PCR y en el que el fragmento amplificado comprende la secuencia entre el exón 3 y el exón 4 del gen de calmodulina; y

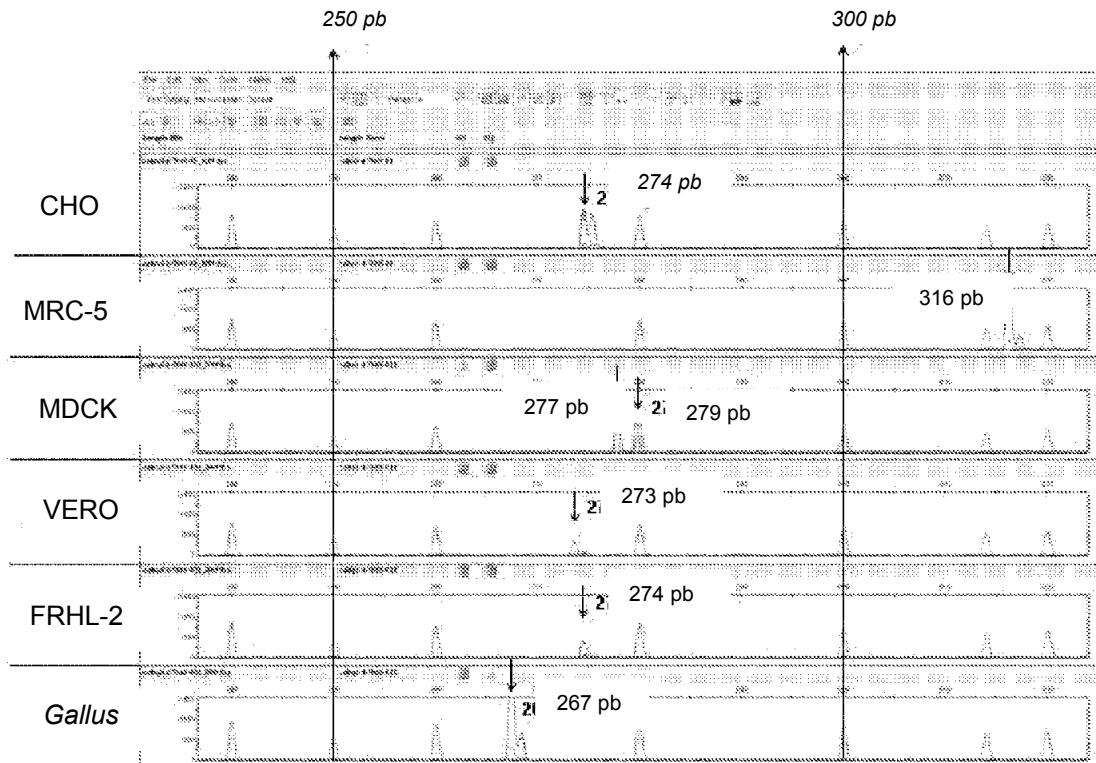
(b) análisis del gen de tirosina quinasa receptora Axl, en el que un fragmento del gen de la tirosina quinasa receptora Axl es amplificado por PCR, y en el que el fragmento amplificado comprende la secuencia entre el exón 18 y el exón 19 del gen de la tirosina quinasa receptora Axl;

y en el que la línea celular es identificada por el tamaño de un intrón en dichos genes.

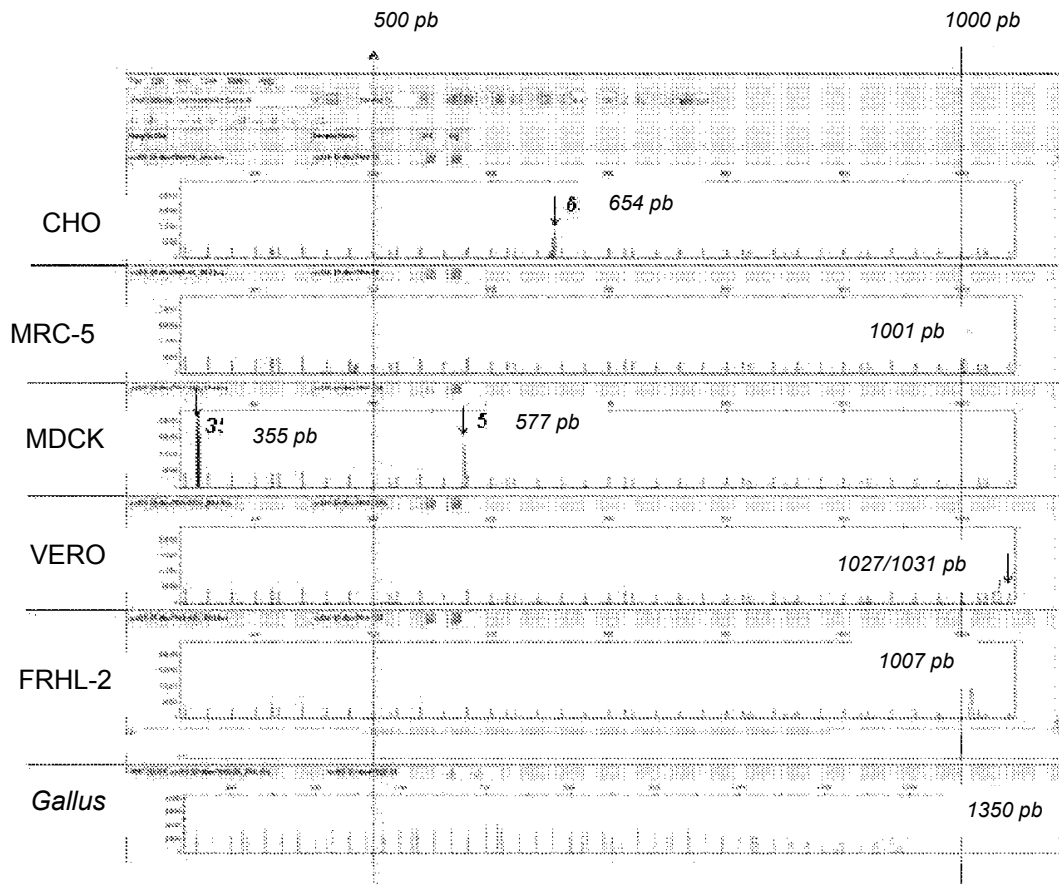
10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el gen de la calmodulina es una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de SEC ID N° 7 o codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con la SEC ID N° 7.

15 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el gen de la tirosina quinasa receptora Axl es una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de SEC ID N° 8 o polipéptidos con secuencias de aminoácidos que tienen una identidad de secuencia del 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con la SEC ID N° 8.

**Figura 1** Análisis de los productos de PCR de CALM3/4



**Figura 2** Análisis de los productos de PCR de AXL  
18/19



**Figura 3** Análisis de los productos de PCR de PPATTA

