

# BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)

*National Bank of Stem Cell Lines*

## IMPRESO DE SOLICITUD DE DEPÓSITO DE UNA LÍNEA

*Application Form to Deposit a Human Cell Line*

Documentos que se acompañan:

*Attached documents:*

- Copia de la autorización de derivación de la línea celular, junto con informe del Comité Ético del centro de procedencia.  
*A copy of the authorization for the derivation of the cell line, with the corresponding ethics committee approval*
- Copia de cualquier publicación científica relacionada con la derivación y/o caracterización de la línea.  
*A copy of any relevant published scientific papers related to the derivation and/or characterization of the cell line*
- C. V. del investigador principal (una página; formato libre).  
*A one page CV for the Principal Investigator*
- Otros (especificar).  
*Others (specify)*

### SECCIÓN 1

*Section 1*

### Información General

*General Information*

**Nombre de la línea:** CBiPS30-4F-3

*Name of the line:* CBiPS30-4F-3

**Investigador principal:** Juan Carlos Izpisúa Belmonte, Anna Veiga Lluch, Alessandra Giorgetti

*Principal Investigator:*

**Origen de la línea celular:**

*Origin of the cell line*

**Embrionario**       **Fetal**       **Adulto**   
*Embryonic*                      *Fetal*                      *Adult*

**¿La línea celular ha sido derivada de un embrión con anomalía genética?**

*Has the cell line been derived from an embryo with genetic anomaly?*

**NO**       **SÍ**  (especificar)  
*No*                      *Yes*                      *(specify)*

**Identificación genética de la línea celular. Método y resultado**

*Genetic identity of the cell line. Method and result*

**SECCIÓN 2**  
*Section 2*

**Datos del Depositante**  
*Applicant Details*

<b>Investigador Principal:</b> <i>Principal Investigator:</i> Juan Carlos Izpisúa Belmonte Anna Veiga Lluch Alessandra Giorgetti	<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal address:</i> Dr Aiguader 88 08003 Barcelona
<b>Centro de Trabajo:</b> <i>Institution:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona	<b>Teléfono (phone):</b> 93 3160360 <b>Fax:</b> 93 3160362 <b>E-mail:</b> blc@cmrb.eu

**SECCIÓN 3**  
*Section 3*

**Datos de la Línea Celular**  
*Details of Cell Line*

<b>Tipo de muestra biológica (especificar estadio embrionario, semanas de gestación,...)</b> <i>Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...)</i> Sangre de cordón umbilical <i>Cord blood</i>	
<b>Muestra biológica</b> <i>Biological sample</i> <p style="text-align: right;"><b>Fresco</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>Crioconservado</b> <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i></p>	
<b>Fecha de la obtención del muestra biológica</b> <i>Date of obtaining the biological sample</i> 12.08.2009	<b>Fecha del uso o descongelación (si congelado)</b> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 12.08.2009
<b>Fecha de la donación del muestra biológica</b> <i>Date of donation of the biological sample</i> 12.08.2009	

<p><b>Descripción general del procesamiento previo del muestra biológica utilizado (cultivo embrionario, procesamiento muestra fetal o de tejido adulto)</b> <i>General description of the processing of the biological sample used (embryonic culture, processing of fetal sample or of adult tissue)</i></p> <p>Se obtuvieron las muestras de sangre de cordón umbilical (CB) del Banc de Sang i Teixits, Barcelona. Se aislaron las células mononucleares (MNC) del CB mediante centrifugación con gradientes de densidad Lympholyte-H (Cederlane, Ontario, CA). Las células CD133+ fueron seleccionadas mediante el sistema de separación inmunomagnética Mini-Macs (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). El sistema de purificación fue verificado mediante tinción con citometría de flujo con el anticuerpo CD133-phycoerythrin (PE; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).</p> <p><i>Umbilical cord blood (CB) samples were obtained from the Banc de Sang i Teixits, Barcelona. Mononuclear cells (MNC) were isolated from CB using Lympholyte-H (Cederlane, Ontario, CA) density gradient centrifugation. CD133+ cells were positively selected using Mini-Macs immunomagnetic separation system (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Purification efficiency was verified by flow cytometric analysis staining with CD133-phycoerythrin (PE; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) antibody.</i></p>
--

*Text items should be filled in both Spanish and English*

**En caso de muestra embrionaria, indicar si se utilizaron blastómeros o células de la masa celular interna y el método de aislamiento utilizado**

*If of embryonic origin, indicate whether blastomeres or internal cell mass were used, as well as the isolation method*

**Origen del soporte celular o acelular utilizado para la derivación, así como de los componentes de los medios de cultivo (si se describen en publicación, indicar además referencia)**

*Origin of the cellular or cellular free support used in derivation in addition to the components of the culture mediums (if they are described in a publication, please indicate the reference).*

Support: human foreskin fibroblasts (ATCC, American Type Culture Collection, CCD1112Sk).  
Culture medium: Knockout Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2 mmol/l GlutaMAX (Gibco, InVitrogen corporation), 0,05mmol/l 2-mercaptoethanol (Gibco, InVitrogen corporation), 8 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Invitrogen), 1% non-essential amino acids (Cambrex), 20% Knockout Serum Replacement (InVitrogen) y 0,5% Penicillin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation).

**Mantenimiento de la línea: Line maintenance**

**Ratio de pase:** *Passage ratio 1:2-1:3 cada 6/7 días; 1:2-1:3 every 6/7 days*

**Método de pase:** *Passage method mecánico; mechanical*

**Xenobióticos**  
*Xenobiotics*

**si X**  
*Yes*

**no**  
*No*

**Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo (forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma; otros)**

*Description of the morphological characteristics of the line in culture (form and size of the colonies; form and size of the cells; nucleus/cytoplasm ratio; others)*

Colonias grandes poligonales, ligeramente aplanadas, de un tamaño entre 1- 3 mm de diámetro de diversas formas con bordes lisos. Células de tamaño uniforme y una elevada relación núcleo/citoplasma.

*Large and flat polygonal colonies, with uniformly sized cells of 1-3 mm of diameter. They have several forms and smooth edges. High nucleus/cytoplasm ratio.*

**Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)**

*Microbiological controls carried out (indicate in detail)*

Micoplasma  
*Mycoplasma*

<b>Marcadores:</b> <i>Markers</i>	Ver Anexo 1			
	<b>Método</b> <b>(ARN/proteínas)</b> <i>Method</i> <i>(RNA/proteins)</i>	<b>nº pase</b> <i>Passage n.</i>	<b>resultado</b> <i>results</i>	<b>comentarios</b> <i>comments</i>
<b>Oct4</b>	inmunofluorescencia	10	+	
<b>Rex 1</b>	-			
<b>Sox 2</b>	inmunofluorescencia	10	+	
<b>SSEA3</b>	inmunofluorescencia	10	+	
<b>SSEA4</b>	inmunofluorescencia	10	+	
<b>TRA-1-60</b>	inmunofluorescencia	10	+	
<b>Fosfatasa Alk.</b>	Actividad	10	+	
<b>Cariotipo</b>		6	46, XY	ver Anexo 2
<b>Otros</b>				

<b>Capacidad de diferenciación</b> <i>Differentiation capacity</i>									
	<b>Ectodermo/ Ectoderm</b>			<b>Endodermo/Endoderm</b>			<b>Mesodermo/ Mesoderm</b>		
	<b>marcador</b>	<b>pase</b>	<b>resultado</b>	<b>marcador</b>	<b>pase</b>	<b>resultado</b>	<b>marcador</b>	<b>pase</b>	<b>resultado</b>
	<i>marker</i>	<i>passage</i>	<i>result</i>	<i>marker</i>	<i>passage</i>	<i>result</i>	<i>marker</i>	<i>passage</i>	<i>result</i>
<b>In Vitro</b>	TUJ1	12	+	AFP	12	+	SMA	12	+
<i>In vitro</i>	GFAP			FOXA2		+			+
(Anexo 3)									
<b>In vivo/ in vivo</b> (ver Anexo 4 )	<b>Método:</b> formación de teratomas en ratones SCID					<b>Resultado:</b> +			
pase/passage 13	<i>Method: teratoma formation in SCID mice</i>					<i>Result: +</i>			

**Descripción de las características de diferenciación *in vitro***

*Description of the differentiation characteristics in vitro*

Mesodermo: cultivo de cuerpos embrioides (EBs) en medio de cultivo suplementado con ácido ascórbico.  
Endodermo: cultivo de cuerpos embrioides. Ectodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio N2/B27 sobre células PA6 (ver Anexo 3).

*Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture. Ectoderm: EBs culture in N2/B27 on PA6 cells (see Annex 3).*

**Datos de la determinación de pluripotencialidad *in vivo* o formación de teratomas**

*Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation*

Inyección intratesticular en ratones SCID de clumps de células indiferenciadas y tras aproximadamente 8 semanas, análisis de los teratomas producidos mediante técnicas de inmunohistoquímica para ectodermo, mesodermo y endodermo. (ver Anexo 4).

*Clumps of undifferentiated cells were injected into the testis of SCID mice. Around 8 weeks later teratomas were analyzed by immunohistochemistry for ectoderm, endoderm and mesoderm (see Annex 4).*

**Datos de la tipificación HLA****Consistencia celular tras 6 pases de congelación y descongelación. Resultados.**

*Cell consistency after 6 passages of freezing and thawing. Results.*

Se observa consistencia celular tras congelación y descongelación con crecimiento adecuado y características de indiferenciación.

*Cellular consistency after freezing and thawing, with adequate growth and undifferentiation characteristics.*

**Pase en el momento del registro**

*Passage at the time of the recording*

20

**¿Ha sido la línea modificada genéticamente?**

*Has the line been genetically modified?*

Sí Yes

No No

**Comentarios/ Comments:**

**¿Se llevó a cabo un análisis clonal?**

*Has a clonal analysis been carried out?*

Sí/ Yes  No

**Resultado / Result**

**Otras observaciones o información relevantes (a juicio del Investigador Principal):**

Other observations or relevant information (to the discretion of the Principal Investigator):

**Constructos y producción retroviral**

Se amplificaron los cDNA de OCT4 y SOX2 a partir de RNA total mediante RT-PCR. Se amplificó KLF4 humano de IMAGE clone 5111134 y el c-MYCT58A humano fue amplificado del "DNA template" proporcionado por Luciano Di Croce. Los cDNAs amplificados fueron clonados en un vector pMSCV modificado que permite la expresión de proteínas FLAG\_tagged N-terminal. Los retrovirus para los cuatro factores fueron producidos independientemente después de transfectar la línea celular Phoenix Amphotropic usando Fugene 6 según las instrucciones del fabricante. Tras 24h, se cambió el medio, las células se incubaron a 32°C y se recogió el sobrenadante viral cada 12h.

**Transducción de células CD133+**

Las células de sangre de cordón (CB) CD133+ ( $1 \times 10^5$  cel/ml) fueron pre-estimuladas durante 24h. en DMEM suplementado con FBS al 10% en presencia de SCF +Flt3 +TPO +IL-6. Se cubrieron con retronectina placas multipocillos no tratadas para cultivo celular y llenadas mediante la centrifugación de las placas con una mezcla filtrada de sobrenadante retroviral para OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC (1:1:1:1) a 2500 RPM durante 30 min. Se platearon alrededor de 80.000 células CD133+ en presencia de DMEM+ FBS al 10% y el cocktail de citoquinas mencionado previamente. Cada 12h se cambió la mitad del medio con sobrenadante retroviral fresco que contenía las citoquinas incubado a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>. Se realizaron 3 ciclos de infección. En día 3, se recogieron las células y se transfirieron a placas de 6 pocillos que contenían fibroblastos humanos irradiados y medio hES. Las CBiPS fueron cultivadas sobre fibroblastos humanos irradiados y pasadas mecánicamente.

**Constructs and retroviral production**

*OCT4 and SOX2 human cDNAs were amplified from ES[4] total RNA by RT-PCR; human KLF4 was amplified from IMAGE clone 5111134 and the mutant human c-MYCT58A was amplified from a DNA template kindly provided by Luciano Di Croce. The amplified cDNAs were cloned into a modified pMSCVpuro vector that allows the expression of N-terminal FLAG-tagged proteins. Retroviruses for the four factors were independently produced after transfecting the cell line Phoenix Amphotropic using Fugene 6 according to manufacturer's directions. After 24 hours, the medium was replaced, cells were incubated at 32°C, and viral supernatant was harvested every 12 hours.*

**Transduction of CD133+ cells**

*CB CD133+ cells ( $1 \times 10^5$  cells per ml) were pre-stimulated for 24h in DMEM supplemented with 10% of FBS in the presence of SCF +Flt3 +TPO +IL-6. Multi-well non-tissue culture-treated plates were coated with retronectin (Takara, Otsu, Japan, [www.takara-bio.com](http://www.takara-bio.com)), and preloaded by centrifuging the plates with a filtered 1:1:1:1 mix of retroviral supernatant for OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC factors at the 2,500 RPM for 30 minutes. About 80,000 CD133+ cells were plated in the presence of DMEM+10% FBS and the cytokine cocktail mentioned above. Every 12h, half of the medium was replaced with fresh viral supernatant containing the cytokine cocktail and incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>; three infection cycles were performed. At day 3, the cells were harvested and transferred into 6 well-plates containing irradiated human fibroblasts and hES medium. CBiPS cells were cultured on irradiated human fibroblasts and picked mechanically.*

**Otras observaciones o información relevantes** (a rellenar por el BNLC):  
Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

**Seguimiento de la línea** (a rellenar por el BNLC):  
Follow up of the line (to be completed by BNLC)

## SECCIÓN 4

## Declaración

Confirmo que la información contenida en estos impresos es cierta y asumo total responsabilidad sobre la misma.

*I confirm that the information contained in this form is true and I assume total responsibility for it.*

<b>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre</b> (Representante legal del Departamento/Centro) (Legal Representative of the Department/Centre)  Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona Center of Regenerative Medicine in Barcelona Dr. Aiguader 08003 BARCELONA NIE: B-6389747 Fecha/ Date: 21/05/2010	<b>Firma del Investigador Principal</b> Signature of the Principal Investigator  Fecha/ Date: 21/05/2010
<b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b> Name and Position of the Person Representing the Centre: Miguel Gómez Clares. Presidente de la Junta de Gobierno	
<b>Dirección Postal:</b> Postal Address: Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona Dr. Aiguader, 88, 7ª planta 08003. Barcelona.	<b>Teléfono / Telephone:</b> +34 93 316 03 00 <b>Fax:</b> +34 93 316 03 00 <b>E-mail:</b> com@cmrb.eu