

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-5

Name of the line: CBiPS30-4F-5

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

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

SECCIÓN 3
Section 3

Datos de la Línea Celular
Details of Cell Line

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

<p>Descripción general del procesamiento previo del muestra biológica utilizado (cultivo embrionario, procesamiento muestra fetal o de tejido adulto) <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

Marcadores: <i>Markers</i>	Ver Anexo 1			
	Método (ARN/proteínas) <i>Method</i> <i>(RNA/proteins)</i>	nº pase <i>Passage n.</i>	resultado <i>results</i>	comentarios <i>comments</i>
Oct4	inmunofluorescencia	10	+	
Nanog	inmunofluorescencia	10	+	
Rex 1	-			
Sox 2	inmunofluorescencia	10	+	
SSEA3	inmunofluorescencia	10	+	
SSEA4	inmunofluorescencia	10	+	
TRA-1-60	inmunofluorescencia	10	+	
TRA-1-81	inmunofluorescencia	10	+	
Telomerasa				
Fosfatasa Alk.	Actividad	11	+	
Cariotipo		4	46, XY	ver Anexo 2
Otros				

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

17

¿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+ (1×10^5 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%CO₂. 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 (1×10^5 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), 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% CO₂; 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.

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