

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)

National Bank of Stem Cell Lines

IMPRESO DE SOLICITUD DE DEPÓSITO DE UNA LÍNEA IPS

Application Form to Deposit an iPS cell line of human origin

Recibido 16.11.2015

Documentos que se acompañan:

- 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 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

SECCIÓN 1 *Section 1*

Información General *General Information*

Nombre de la línea:

Myeloid iPSC

Investigador principal:

Principal Investigator:

Pablo Menendez (Instituto Josep Carreras-Barcelona) y Clara Bueno (Instituto Josep Carreras-Barcelona)

Tipo de célula de la que se obtiene la línea:

Cell type origin of the cell line

Leucocitos (células mieloides CD33+CD3-CD19-CD34-) de unidades de cordón umbilical.

¿El sujeto fuente tiene alguna patología?

Has the donor any pathological condition?

NO SÍ (especificar)

¿La patología es de origen genético?

Is the pathological condition of genetic origin?

NO SÍ (especificar)
No Yes (specify)

Identificación genética de la línea celular. Método y resultado

Genetic identity of the cell line. Method and result

La línea mieloide es negativa para TCR y BCR. No hay reordenamientos. (VER ANEXO 1)

Cariotipo/Karyotype

Euploide/Euploid **Anormal/Atypical** (especificar/specify)

Se ha realizado bandeo G en 20 metafases tras 20 pases en cultivo y las células son euploides.
(VER ANEXO 1)

SECCIÓN 2

Section 2

Datos del Depositante

Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Pablo Menendez Clara Bueno	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Pablo Menéndez PhD ICREA Research Professor Josep Carreras Leukaemia Research Institute Carrer Casanova 143. 08036. Barcelona. Spain
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Josep Carreras Leukaemia Research Institute	Teléfono (phone): 935572809 Fax: 933231751 E-mail: pmenendez@carrerasresearch.org

SECCIÓN 3

Section 3

Datos de la Línea Celular

Details of Cell Line

Tejido de origen y localización anatómica de la muestra biológica <i>Tissue of origin and anatomic location of the biological sample</i> La muestra procede de unidades de cordón umbilical procedentes de banco de cordón umbilical de Málaga	
Muestra biológica <i>Biological sample</i> Fresco <input checked="" type="checkbox"/> Crioconservado <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>	
Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 2013	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> La muestra se procesó y se utilizó el mismo día que fue recibida

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).

Las iPSC se han generado en MEFs de la cepa CF1, irradiados. Se han mantenido en MEFS. Luego se han pasado y adaptado a MSC (células mesenquimales). Siempre se han crecido con medio de ESC convencional (medio condicionado por MEFs; Menendez et al Mol Ther 2004) que contiene KO-DMEM+KO-SR+L-Glu+8ng de bFGF. (Ver ANEXO-1)

Las iPSC se han generado con virus de sendai monocistronicos (SeV-OKSM).

Mantenimiento de la línea: Line maintenance

En MEFs y en MSCs. Se mantiene con medio de ESC convencional que contiene KO-DMEM+KO-SR+L-Glu+8ng de bFGF. (Ver ANEXO-1)

Ratio de pase: Passage ratio

Se ha estado pasando 1:2, 1:3, 1:4 y 1:10 sin cambios en su estatus pluripotente.

Método de pase: Passage method

Se pasan con colagenasa/dispasa.

Xenobióticos **si**

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)

Las colonias son típicas de iPSC o hESC. Tienen una alta relación núcleo:citoplasma. Hay colonias de tamaños diferentes pero todas tienen fenotipo epitelial excepto las de los bordes donde hay alguna célula haciendo EMT hacia diferenciación. (VER ANEXO 1)

Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)

Microbiological controls carried out (indicate in detail)

Bacteriología

(Bacteriology)

No se ha testado.

Micoplasma: PCR

(Mycoplasma: by PCR)

Las células se han testado cada 4-5 semanas para micoplasma y son negativas por PCR. (VER ANEXO 1)

Marcadores: (VER ANEXO 1)

Markers

	Método (ARN/proteínas)	nº pase	resultado	comentarios
Oct 4	ARN	p20	+	
Nanog	ARN	p20	+	
Rex 1 (opcional/optional)	ARN	p20	+	
Sox 2	ARN	p20	+	
SSEA3	proteína	p20	+	
SSEA4	proteína	p20	+	
TRA-1-60	proteína	p20	+	
TRA-1-81	proteína	p20	+	
Fosfatasa Alc.	proteína	p20	+	

Capacidad de diferenciación (VER ANEXO 1 (in vitro) y ANEXO 1 (in vivo))*Differentiation capacity*

Ectodermo/ Ectoderm
marcador pase resultado
marker passage result

Endodermo/Endoderm
marcador pase resultado
marker passage result

Mesodermo/ Mesoderm
marcador pase resultado
marker passage result

In Vitro**In vivo/ in vivo****Método:**
*Method:***teratomas s.c****Resultado: positivo (3 germ layers)**
*Result:***Reprogramación del perfil de metilación del ADN***Reprogramming of DNA methylation profile*

Los promotores de NANOG y OCT4 se demetilan en las iPSC (VER ANEXO 1)

Descripción de las características de diferenciación *in vitro**Description of the differentiation characteristics in vitro*

Las células se han diferenciado con éxito a fibroblastos, y células hematopoyéticas CD45. (VER ANEXO 1)

Datos de la determinación de pluripotencialidad *in vivo* o formación de teratomas*Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation*

1 T25 al 70% de confluencia se ha inyectado vía subcutánea en ratones NSG. Tras 6 semanas han aparecido teratomas que han sido fijados y analizados por hematoxilina eosina mostrando tejidos de las 3 capas germinales. No, pero mostramos que los virus de Sendai se apagan (VER ANEXO 1)

Datos de la tipificación HLA*HLA typification data***Integración de los transgenes de reprogramación: gPCR para integración de provirus***Integration of reprogramming transgenes: gPCR for provirus integration*

Los genes no se integran porque los SeV son no integrativos.

Silenciamiento de los transgenes de reprogramación: RT-PCR o Q-RT-PCR*Silencing of reprogramming transgenes: RT-PCR o Q-RT-PCR*

Mostramos por qPCR que los virus de Sendai se apagan (VER ANEXO 1)

Mantenimiento a largo plazo en cultivo: > 20 pases*Long-term maintenance in culture: >20 passages*

Las iPSC se han mantenido por más de 30 pases y mantienen su pluripotencia y cariotipo normal. Son micoplasma negativas y sobreviven perfectamente a la congelación y descongelación.

Pase en el momento del registro*Passage at the time of the recording*

Hay iPSc congeladas en distintos tiempos

<p>¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i></p> <p>Sí Yes <input type="checkbox"/> No No <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Comentarios/ Comments:</p>	<p>¿Se llevó a cabo un análisis clonal? <i>Has a clonal analysis been carried out?</i></p> <p>Sí/ Yes <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Resultado / Result clonal</p>
---	--

Otras observaciones o información relevantes (a juicio del Investigador Principal):
Other observations or relevant information (to the discretion of the Principal Investigator):

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>  Fecha /Date: November 10 2015	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i>  Fecha /Date: November 10th, 2015
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Carles Esquerre i Victori	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Carles Esquerre i Victori Gerente Instituto Josep Carreras contra la leucemia Muntaner 383, 3rd 2n 08021 Barcelona	Teléfono /Telephone: 935543050 Fax: 934651472 E-mail: cesquerre@ carrerasresearch.org