

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)
National Bank of Stem Cell Lines
IMPRESO DE SOLICITUD DE REGISTRO Y DEPÓSITO DE UNA LÍNEA iPS HUMANA
Application Form to Register and Deposit of an human iPS cell line

FECHA: 06/06/2019

DOCUMENTOS QUE DEBEN ACOMPAÑAR LA SOLICITUD:

Attached documents:

- Copia de la autorización del proyecto en el cual se genera la línea celular, junto con informe favorable del Comité Ético del centro de procedencia.**
A copy of the project authorization in which the cell line is obtained along with a favourable report of the Clinical Research Ethics Committee
- Copia de cualquier publicación científica relacionada con la línea iPS generada.**
A copy of any relevant published scientific papers related to the iPS cell line generated
- C. V. del investigador principal (una página; formato libre).**
A one page CV for the Principal Investigator

SECCIÓN 1-INFORMACIÓN DE LA MUESTRA ORIGINAL Y DE LA iPS GENERADA.

Section 1-Information of the original cell line and the generated iPS

Nombre de la línea iPS <i>Name of the iPS line:</i>	GRX-MCiPS4F-A2
Muestra original donada. Detallar tipo de célula, tejido de origen y localización anatómica de la muestra biológica de la que se obtiene la línea original. Si son células comerciales, detallar nombre, referencia y distribuidor comercial <i>Original sample donated. Detail cell type, tissue of origin and anatomic location of the biological sample from which the original line is obtained. If cells are commercial, detail name, reference and trade distributor.</i>	Células mononucleares de sangre periférica (CMSPs). Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs).
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Hombre/man 48
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input checked="" type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> (especificar) No Yes (specify)
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> (especificar) No Yes (specify)

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco <input checked="" type="checkbox"/> Crioconservado <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>
Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i>	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 08/05/2014
Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	Medio StemSpan suplementado con la concentración apropiada de citoquinas: hSCF(100 ng/mL), hFLT3L(100 ng/mL), hTPO (20 ng/mL), G-CSF (10 ng/mL), hIL3 (2ng/mL). StemSpan medium supplemented with the appropriate concentration of the cytokines: hSCF(100 ng/mL), hFLT3L(100 ng/mL), hTPO (20 ng/mL), G-CSF (10 ng/mL), hIL3 (2ng/mL).
Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de las células de origen <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the original cells.</i>	La identificación celular de la iPSc se realizó mediante STR (Short Tandem Repeats) (Anexo 7). Este mismo análisis se realizó sobre la muestra celular de partida (CMNSPs) confirmando el origen de ambas muestras. Cell identity was achieved by STR (Short Tandem Repeats) (Annex 7). Similar analysis was achieved in the original sample (PBMCs) validating the same origin of both samples.
¿Hay disponibilidad de viales congelados de las células de origen? ¿En qué pase? <i>Is there availability of frozen vials of original cells? At what passage?</i>	No.
Método utilizado en la generación de la línea iPSc. (Integrativa/ No-integrativa) Especificar factores y plásmidos de reprogramación utilizados. <i>Method used for the generation of iPSC line (Integrative / Non-integrative) Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	Las iPSc fueron generadas con el kit de reprogramación CytoTune®-iPS 2.0 Sendai, es un sistema no integrativo que utiliza vectores del virus Sendai. Este kit incluye tres vectores: policistrónico Klf4-hOct3/4-Sox2, cMyc y Klf4. The iPSC were generated with the CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, is a non-integrating system that uses Sendai virus vectors. This kit includes three vector preparations: polycistronic Klf4-Oct3/4-Sox2, cMyc, and Klf4. Soporte: Fibroblastos humanos irradiados (HFFi). Medio Cultivo: KO-DMEM suplementado con 20% KO Serum Replacement, 1% aminoácidos no esenciales, 1 mM L-glutamina, 0.1 mM β-mercaptoetanol y 8 ng/ml bFGF. Las iPSc fueron mantenidas en HFFi hasta su estabilización y caracterización. Las iPSCs también han sido adaptadas a matrigel (Corning BV) con medio Pluristem Human ES/iPS (Merck Chemicals). The iPSC were generated with the CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, is a non-integrating system that uses Sendai virus vectors. This kit includes three vector preparations: polycistronic Klf4-Oct3/4-Sox2, cMyc, and Klf4. Support: irradiated human embryonic fibroblasts (HFFi). Culture medium: KO-DMEM supplemented with 20% KO Serum Replacement, 1% non-essential amino acids, 1 mM L-glutamine, 0.1 mM β-mercaptoethanol and 8 ng/ml of bFGF. The iPSC have remained in HFFi until stabilization and characterization. iPSCs have been also adapted to feeder-free cultures on matrigel (Corning BV) with Pluristem Human ES/iPS medium (Merck Chemicals).
Condiciones de cultivo de la línea de iPSc generada. (si se describen en publicación, indicar referencia) <i>iPSC Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i>	Las condiciones de cultivo están referenciadas en la publicación Stem Cell Res. 2015 Sep;15(2):337-40. Culture conditions are described in the publication Stem Cell Res. 2015 Sep;15(2):337-40.

<p>Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo (forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma; otros) <i>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)</i></p>	<p>Células pequeñas y apretados con una alta relación núcleo/citoplasma y un nucléolo prominente, que crecen en colonias circulares con bordes definidos.</p> <p>Small, tightly packed cells with a high nucleus/cytoplasm ratio and prominent nucleoli that grow in circular colonies with defined edges.</p>
<p>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i></p>	<p>Medio de congelación para iPSC: medio de congelación A (50% Fetal Bovine Serum + 50% KnockOut™ Serum Replacement) y medio de congelación B (80% Freezing medium A + 20% DMSO). Congelar iPSC en un criovial con 0,5 ml de medio de congelación A y 0,5 ml de medio de congelación B.</p> <p>iPSC freezing medium: freezing medium A (50% Fetal Bovine Serum + 50% KnockOut™ Serum Replacement) and freezing medium B (80% Freezing medium A + 20% DMSO). Freezing iPSC in criovial with 0,5 ml of freezing media A and 0,5 ml of freezing media B.</p>
<p>Pase de la línea celular en el momento del banqueo/registro. (Máximo: Pase 15) <i>Passage at the time of the banking/registration (Max: Passage 15)</i></p>	<p>Pase 24 Passage 24</p>
<p>¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> 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> Sí/ Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Resultado / Result</p>

SECCIÓN 2 RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA iPS.

Adjuntar resultados (imágenes o gráficos) como anexo

Section 2 iPS Cell Line characterization results. Attach results (images and graphics) as an annex

<p>Test de pluripotencia <i>Pluripotency test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Método <i>Method</i></th> <th>Nº pase <i>Passage n.</i></th> <th>Resultado <i>Results</i></th> <th>Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Oct 4</td> <td>RT-PCR/Inmunofluorescencia/Citometria de flujo. Pases p10, p21, p30. +. Anexos 1 y 3.</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Nanog</td> <td>RT-PCR/Inmunofluorescencia. Pase: p10. Resultado +. Anexos 1 y 3.</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sox 2</td> <td>RT-PCR/Inmunofluorescencia. Pase: p10. Resultado +. Anexos 1 y 3.</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>SSEA3</td> <td>Citometría de flujo. Pase p27. Resultado +. Anexo 3.</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>SSEA4</td> <td>Inmunofluorescencia/Citometria de flujo. Pases: p21, p30. Anexo 3.</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>TRA-1-60</td> <td>Citometría de flujo. Pase p30. Resultado +. Anexo 3.</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>TRA-1-81</td> <td>Citometria de flujo. Pase p30. Resultado +. Anexo 3.</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Fosfatasa. Alk</td> <td>Detección actividad kit Merck Millipore, p31, resultado +. Anexo 2</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Método <i>Method</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>	Oct 4	RT-PCR/Inmunofluorescencia/Citometria de flujo. Pases p10, p21, p30. +. Anexos 1 y 3.			Nanog	RT-PCR/Inmunofluorescencia. Pase: p10. Resultado +. Anexos 1 y 3.			Sox 2	RT-PCR/Inmunofluorescencia. Pase: p10. Resultado +. Anexos 1 y 3.			SSEA3	Citometría de flujo. Pase p27. Resultado +. Anexo 3.			SSEA4	Inmunofluorescencia/Citometria de flujo. Pases: p21, p30. Anexo 3.			TRA-1-60	Citometría de flujo. Pase p30. Resultado +. Anexo 3.			TRA-1-81	Citometria de flujo. Pase p30. Resultado +. Anexo 3.			Fosfatasa. Alk	Detección actividad kit Merck Millipore, p31, resultado +. Anexo 2		
Método <i>Method</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>																																		
Oct 4	RT-PCR/Inmunofluorescencia/Citometria de flujo. Pases p10, p21, p30. +. Anexos 1 y 3.																																				
Nanog	RT-PCR/Inmunofluorescencia. Pase: p10. Resultado +. Anexos 1 y 3.																																				
Sox 2	RT-PCR/Inmunofluorescencia. Pase: p10. Resultado +. Anexos 1 y 3.																																				
SSEA3	Citometría de flujo. Pase p27. Resultado +. Anexo 3.																																				
SSEA4	Inmunofluorescencia/Citometria de flujo. Pases: p21, p30. Anexo 3.																																				
TRA-1-60	Citometría de flujo. Pase p30. Resultado +. Anexo 3.																																				
TRA-1-81	Citometria de flujo. Pase p30. Resultado +. Anexo 3.																																				
Fosfatasa. Alk	Detección actividad kit Merck Millipore, p31, resultado +. Anexo 2																																				
<p>Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Método <i>Method</i></th> <th>Marcador <i>Marker</i></th> <th>Nº pase <i>Passage n</i></th> <th>Resultado <i>Results</i></th> <th>Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td>EBs / Inmunohistoquímica / b-III-tubulina / p25 / Positivo / Anexo 4</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td>EBs / Inmunohistoquímica / Vimentina / p25 / Positivo / Anexo 4</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Endoderm <i>Endoderm</i></td> <td>EBs / Inmunohistoquímica / CK-1 / p25 / Positivo / Anexo 4</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	EBs / Inmunohistoquímica / b-III-tubulina / p25 / Positivo / Anexo 4				Mesodermo <i>Mesoderm</i>	EBs / Inmunohistoquímica / Vimentina / p25 / Positivo / Anexo 4				Endoderm <i>Endoderm</i>	EBs / Inmunohistoquímica / CK-1 / p25 / Positivo / Anexo 4																			
Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>																																	
Ectodermo <i>Ectoderm</i>	EBs / Inmunohistoquímica / b-III-tubulina / p25 / Positivo / Anexo 4																																				
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	EBs / Inmunohistoquímica / Vimentina / p25 / Positivo / Anexo 4																																				
Endoderm <i>Endoderm</i>	EBs / Inmunohistoquímica / CK-1 / p25 / Positivo / Anexo 4																																				
<p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> <i>(espontánea/inducida)</i></p> <p><i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i></p>	<p>Diferenciación espontánea in vitro mediante formación de cuerpos embrionarios (EBs) durante 21 días en medio de cultivo sin bFGF. (p25)</p> <p>Expontaneus differentiation in vitro by embryoid bodies (EBs) formation cultured for 21 days in culture medium without bFGF. (p25)</p>																																				

<p>Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Método</th> <th>Marcador</th> <th>Nº pase</th> <th>Resultado</th> <th></th> </tr> <tr> <th>Comentarios</th> <th><i>Method</i></th> <th><i>Marker</i></th> <th><i>Passage n</i></th> <th><i>Results</i></th> <th><i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ectodermo</td> <td>Teratoma / Inmunohistoquímica / Nestina / p23 / Positivo / Anexo 5.</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mesodermo</td> <td>Teratoma / Inmunohistoquímica / Actina músculo liso / p23 / Positivo / Anexo 5.</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Endodermo</td> <td>Teratoma / Inmunohistoquímica / CDX2 / p23 / Positivo / Anexo 5.</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Método	Marcador	Nº pase	Resultado		Comentarios	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>	<i>Results</i>	<i>Comments</i>	Ectodermo	Teratoma / Inmunohistoquímica / Nestina / p23 / Positivo / Anexo 5.					Mesodermo	Teratoma / Inmunohistoquímica / Actina músculo liso / p23 / Positivo / Anexo 5.					Endodermo	Teratoma / Inmunohistoquímica / CDX2 / p23 / Positivo / Anexo 5.				
	Método	Marcador	Nº pase	Resultado																											
Comentarios	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>	<i>Results</i>	<i>Comments</i>																										
Ectodermo	Teratoma / Inmunohistoquímica / Nestina / p23 / Positivo / Anexo 5.																														
Mesodermo	Teratoma / Inmunohistoquímica / Actina músculo liso / p23 / Positivo / Anexo 5.																														
Endodermo	Teratoma / Inmunohistoquímica / CDX2 / p23 / Positivo / Anexo 5.																														
<p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i></p>	<p>Grupos de células iPS humanas indiferenciadas se inyectaron por vía subcutánea en los flancos dorsales de ratones SCID (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl / SZJ). Alrededor de 8 semanas después de la inyección los teratomas fueron fijados, incluidos en parafina y las secciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina. El examen histológico mostró diferenciación hacia las tres capas germinales. (Anexo 5). Clumps of undifferentiated human iPS cells were injected subcutaneously into dorsal flanks of SCID mice (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ). Around 8 weeks after injection teratomas were fixed, embedded in paraffin and sections were stained with hematoxylin and eosin. Histological examination showed</p>																														
<p>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i></p>	<p>46XY (p24) (Anexo 6)</p>																														
<p>Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de la línea celular <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the cell line</i></p>	<p>La identificación celular de la iPS se realizó mediante STR (Short Tandem Repeats) (Anexo 7). Este mismo análisis se realizó sobre la muestra celular de partida (CMNSPs) confirmando el origen de ambas muestras.</p> <p>Cell identity was achieved by STR (Short Tandem Repeats) (Annex 7). Similar analysis was achieved in the original sample (PBMCs) validating the same origin of both samples.</p>																														
<p>Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i></p>	<p>El tipo de reprogramación celular utilizado (CytoTune®-iPS 2.0 Sendai kit) es un método no integrativo.</p> <p>Cell reprogramming used (CytoTune®-iPS 2.0 Sendai kit) is a non-integrating method.</p>																														

<p>Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i></p>	<p>El test de silenciamiento de los transgenes de SeV utilizados para la reprogramación se realizó según indicaciones del kit de reprogramación CytoTune®-iPS 2.0 Sendai mediante RT-PCR (Anexo 1). SeV transgenes silencing test was made following CytoTune®-iPS 2.0 Sendai reprogramming kit instructions by RT-PCR (Annex 1).</p>
<p>Confirmación del diagnóstico genotípico en las iPSC generadas a partir de muestras con mutación genética <i>Confirmation of genotypic diagnosis of the cell line generated from samples with genetic mutation</i></p>	<p>No aplicable</p>
<p>Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i></p>	<p>Test de Mycoplasma negativo determinado por PCR. Mycoplasma negative as determined by PCR. (Anexo 8)</p>

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE
Section 3 Applicant Details

<p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Jose Antonio Lopez Escamez</p>	<p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Avda. de la Ilustración 114 • 18016 Granada</p>
<p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA</p>	<p>Teléfono (phone): 958 715 500 Ext.160 Fax: E-mail: antonio.lopezescamez@genyo.es</p>

SECCIÓN 4 **INFORMACIÓN ADICIONAL (OPCIONAL)**
Section 4 *Additional information (optional)*

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 5 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> Raquel Soriano Martínez  Fecha/ Date: 29/10/2019	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i> Jose Antonio Lopez Escamez  Fecha /Date 29/10/2019
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Raquel Soriano Martínez. Directora Gerente ibs. GRANADA.	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> ibs.GRANADA Avda. de Madrid, 15. Pabellón de Consultas Externas 2, 2ª Planta (Antigua Área de Dirección) 18012 Granada	Teléfono /Telephone: +34 958 715 500 Fax: +34 958 637 071 E-mail: antonio.lopezescamez@genyo.es