

# 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)*

*Anexo para un esquema del vector lentiviral insertado en el genoma de la línea iPS SCU CD34+ #1*

## SECCIÓN 1

*Section 1*

## Información General

*General Information*

**Nombre de la línea: iPS SCU CD34+ #1**

*Name of the line:*

**Investigador principal: Pablo Menéndez y Verónica Ramos-Mejía.**

*Principal Investigator:*

**Origen de la línea celular:**

*Origin of the cell line*

**Embrionario**

*Embryonic*

**Fetal**

*Fetal*

**Adulto**

*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**

*No*

**SÍ**  (especificar)

*Yes (specify)*

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

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

**HLA y Microsatélites (Ver Anexo)**

**HLA and Microsatellite (See Annex )**

Documento de Solicitud de Depósito de Línea Celular. Versión 3

Los apartados que requieran entrada de texto, deben rellenarse tanto en Castellano como en Inglés

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

**SECCIÓN 2**  
Section 2

**Datos del Depositante**  
Applicant Details

<b>Investigador Principal:</b> Principal Investigator: Pablo Menéndez Buján	<b>Dirección Postal:</b> Postal address: Av. del Conocimiento s/n 18100, Armilla (Granada)
<b>Centro de Trabajo:</b> Institution: Banco Andaluz de Células Madre Andalusian Stem Cell Bank	<b>Teléfono (phone):</b> 958 894 672  <b>Fax:</b> 958 894 652  <b>E-mail:</b> <a href="mailto:pablo.menendez@juntadeandalucia.es">pablo.menendez@juntadeandalucia.es</a>

**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> Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...) Célula progenitoras hematopoyéticas CD34+ de sangre de cordón umbilical CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells derived from umbilical cord blood	
<b>Muestra biológica</b> Biological sample  <div style="text-align: right;"> <b>Fresco</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>Crioconservado</b> <input type="checkbox"/>  <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i> </div>	
<b>Fecha de la obtención del muestra biológica</b> Date of obtaining the biological sample Noviembre 2009 November 2009	<b>Fecha del uso o descongelación (si congelado)</b> Date used or thawed (if frozen) Enero 2010 January 2010
<b>Fecha de la donación del muestra biológica</b> Date of donation of the biological sample 10 Noviembre 2009 November 10th 2009	Las bolsas de sangre de cordón umbilical se obtuvieron del Banco de Cordón Umbilical de Málaga tras consentimiento informado. Sólo se han usado unidades de cordón umbilical que dicho Banco iba a destruir por no alcanzar unos criterios mínimos para su uso clínico (celularidad y % de células CD34+)  Cord Blood Units were obtained upon informed consent from the Málaga Cord Blood Bank. Only CB units discarded due to low % of CD34 or low cellularity were sent for reserach.

<b>Descripción general del procesamiento previo del muestra biológica utilizado (cultivo embrionario, procesamiento muestra fetal o de tejido adulto)</b> General description of the processing of the biological sample used (embryonic culture, processing of fetal sample or of adult tissue) Different fresh Cord Blood (CB) units from healthy newborns were obtained from Málaga Cord Blood Bank upon approval by our local Ethics and Biozahard Board Committee. Mononuclear cells were isolated using Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Stockholm, Sweden). After lysing the red blood cells (Lysis solution, StemCell Technologies, Vancouver, Canada), CD34+ cells were purified by magnetic bead separation using the human CD34 MicroBead kit (Miltenyi, Munich, Germany) and the AutoMACS Pro separator (Miltenyi) as per manufacturer's instructions. After washing in phosphate-buffered saline (PBS), equal numbers of CD34+ cells were plated in liquid culture: Stem Spam (Stem Cell Technologies) supplemented with SCF (100ng/mL), FLT3L (100ng/mL) and IL-3 (10ng/mL) (Peprotech, London, UK). CB-derived CD34+ cells were used fresh.
--

*Text items should be filed 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*

**No aplicable**

**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).*

Soporte: Fibroblastos humanos irradiados.

Medio Cultivo: KO-DMEM suplementado con 20% KO Serum Replacement, 1% aminoácidos no esenciales, 1 mM L-glutamina, 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 8 ng/ml bFGF.

*Support: irradiated human embryonic fibroblasts*

*Culture medium: KO-DMEM supplemented with 20% KO Serum Replacement, 1% non-essential amino acids, 1 mM L-glutamine, 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and 8 ng/ml of bFGF.*

**Mantenimiento de la línea: Line maintenance**

**Ratio de pase:** *Passage ratio 1:2-1:3 cada 5-7 días; 1:2-1:3 every 5-7 days*

**Método de pase:** *Passage method enzimático y mecánico; enzymatic and mechanical*

**Xenobióticos**  
*Xenobiotics*

**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 redondeadas y alargadas en la vertical. Células con elevada relación núcleo/citoplasma. (Ver Anexo)

*Rounded colonies and vertically elongated. High nucleus/cytoplasm ratio. (See Anex)*

**Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)**

*Microbiological controls carried out (indicate in detail)*

Análisis de hongos y micoplasma negativos (Ver Anexo)

*Micology and mycoplasma negative (See Annex)*

<b>Marcadores:</b> <i>Markers</i>				
	<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>
Oct 4	RT-PCR/citometría	11	+	Ver Anexo
Nanog	RT-PCR	11	+	Ver Anexo
Rex 1	RT-PCR	11	+	Ver Anexo
Sox 2	RT-PCR	11	+	Ver Anexo
SSEA3	citometría de flujo	11	+	Ver Anexo
SSEA4	citometría de flujo	11	+	Ver Anexo
TRA-1-60	citometría de flujo	11	+	Ver Anexo
TRA-1-81	citometría de flujo	11	+	Ver Anexo
<b>Fosfatasa Alk. /Alkaline phosphatase</b> <b>Cariotipo / Karyotype</b>		10	46XY	Ver Anexo

<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>	<b>PGFA</b>	<b>5</b>	<b>+</b>	<b>Ckpan</b>	<b>5</b>	<b>+</b>	<b>α-Actina</b>	<b>5</b>	<b>+</b>
<i>In vitro</i>	<i>GFAP</i>	<i>5</i>	<i>+</i>	<i>PanCk</i>	<i>5</i>	<i>+</i>	<i>α-Actin</i>	<i>5</i>	<i>+</i>
<b>(Ver Anexo)</b>									
<b>In vivo/ in vivo (Ver Anexo)</b>	<b>Método: Formación de teratomas en ratones NOD/SCID</b> <i>Method: Teratoma formation in NOD/SCID mice</i>						<b>Resultado: +</b> <i>Result: +</i>		

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

Cultivo de cuerpos embrionarios (EBs) durante 21 días en medio de cultivo sin bFGF

*Embryoid bodies (EBs) cultured for 21 days in culture medium without bFGF***Datos de la determinación de pluripotencialidad *in vivo* o formación de teratomas***Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation*

Se inyectan colonias en la cápsula testicular o subcutáneamente en el flanco de un ratón NOD/SCID. Una vez crecido el teratoma se extrae, se fija y se obtienen cortes histológicos que se tiñeron con hematoxilina/eosina y mediante inmunohistoquímica para identificar las diferentes capas embrionarias

*Colonies are injected into testicular capsule or subcutaneously into a NOD/SCID mouse. When the teratoma appears, it is extracted, fixed, and the histological cuts are staining with hematoxilin/eosin and by immunohistochemistry to identify the different germ line***Datos de la tipificación HLA***HLA typification data***Ver Anexo***See Annex***Consistencia celular tras 6 pases de congelación y descongelación. Resultados.***Cell consistency alter 6 passages of freezing and thawing. Results.*

Las células fueron congeladas y descongeladas satisfactoriamente. Tras su descongelación, producen cultivos de iPS pluripotentes.

*Cells were frozen and thawed successfully. Upon thawing, fully pluripotent cultures of iPS were obtained.***Pase en el momento del registro***Passage at the time of the recording*

Pase 12

*Passage 12***¿Ha sido la línea modificada genéticamente?***Has the line been genetically modified?*Sí Yes No No **Comentarios/ Comments:**Ver Anexo para un esquema del vector lentiviral insertado en el genoma de la línea iPS CB CD34+ #1  
*See Annex 7 for an scheme of the lentiviral vector inserted in the genome of the iPS CB CD34+ #1 line***¿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):

Esta línea de células iPS se ha generado mediante la introducción en células stem/progenitoras hematopoyéticas humanas CD34+ de los factores de transcripción Oct-3/4, Sox-2, Klf-4 y Myc mediante un vector lentiviral (ver Anexo). Además, estudios de expresión del transgén en la línea iPS CB CD34+ #1 generada indican que los genes expresados ectópicamente se han silenciado correctamente (Ver Anexo).

*This iPS cell line has been generated by introduction of the transcription factors Oct-3/4, Sox-2, Klf4 and Myc in CD34+ HSPCs derived from cord blood using a lentiviral vector (see Annex). Furthermore, expression assays showed that the transgenes ectopically overexpressed have been successfully silenced.*

**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.*

<p><b>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre</b>  <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i>  <i>(Legal Representative of the Department/Centre)</i></p> <p><b>D. Juan Jesús Bandera González</b></p>  <p>Fecha/ Date: <b>22/04/2010</b></p>	<p><b>Firma del Investigador Principal</b>  <i>Signature of the Principal Investigator</i></p> <p><b>Dr. Pablo Menéndez Buján</b></p>  <p>Fecha/ Date: <b>22/04/2010</b></p>
<p><b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b>  <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i></p> <p><b>D. Juan Jesús Bandera González</b>  <b>Director Gerente</b>  <b>Fundación Progreso y Salud</b></p>	
<p><b>Dirección Postal:</b>  <i>Postal Address:</i></p> <p><b>Avda. Américo Vespucio 5, Bloque 2, 2ª Planta</b>  <b>Parque Científico y Tecnológico Cartuja 93 - 41092</b>  <b>Sevilla</b></p>	<p><b>Teléfono /Telephone: 955040450</b></p> <p><b>Fax: 955040457</b></p> <p><b>E-mail: gestionproyectos.fps@juntadeandalucia.es</b></p>