

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: 11 de Enero 2021

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>	FDP/AML-PBMC-iPSC4F73 (GENYOi005-A)
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.</i> <i>Detail cell type, tissue of origin and anatomic location of the biological sample from which the original line is obtained.</i> <i>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>	MUJER / WOMAN 54
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Trastorno Plaquetario Familiar con Neoplasia Mieloide Asociada (TPF/LMA). Familial Platelet Disorder with Associated Myeloid Malignancy (FPDMM) No Yes (specify)
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Variante p.Thr196Ala en el gen RUNX1 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> 05/04/2018
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 cytokines: hSCF(100 ng/mL), hFLT3L(100 ng/mL), hTPO (20 ng/mL), G-CSF (10 ng/mL), hIL3 (2ng/mL).
¿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>	La línea iPS fueron generadas con el kit de reprogramación CytoTune®-iPS 2.0 Sendai, un sistema no integrativo que utiliza vectores del virus Sendai. Este kit incluye tres vectores: policistrónico Klf4-hOct3/4-Sox2, cMyc y Klf4. The iPS cell line was generated with the CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, a non-integrating system that uses Sendai virus vectors. This kit includes three vector preparations: polycistronic Klf4-Oct3/4-Sox2, cMyc, and Klf4.
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>	Soporte: Células stem mesenquimales humanas irradiadas (ihMSCs). 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 iPSCs fueron mantenidas en ihMSCs hasta su estabilización y caracterización. Las iPSCs también han sido adaptadas a cultivo libre de feeders en matrigel (Corning BD) con medio de composición definida Essential 8 (E8). Support: Irradiated human mesenchymal stem cells (ihMSCs). 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 had cultured in ihMSCs until stabilization and characterization. iPSCs had been also adapted to feeder-free cultures on matrigel (Corning BD) with Essential 8 medium (E8).
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>	Células pequeñas y apretadas con una alta relación núcleo/citoplasma y un nucléolo prominente, que crecen en colonias circulares con bordes definidos. Small, tightly packed cells with a high nucleus/cytoplasm ratio and prominent nucleoli that grow in circular colonies with defined edges.

<p>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i></p>	<p>Método de congelación: Las colonias de iPSCs son levantadas, peleteadas y resuspendidas en medio E8 pre-enfriado suplementado con 10%DMSO. La congelación se realiza de manera gradual utilizando Mr Frostie a -80°C. Tras 24 horas, los viales congelados se almacenan en N2 líquido. Método de descongelación: La descongelación se realiza de modo rápido introduciendo vial congelado en baño a 37°C. Cuando está casi descongelada, se pasa la solución a medio de cultivo atemperado, se centrifuga (1200rpm, 3 min.) y el pellet se pone en cultivo con medio correspondiente.</p> <p>Freezing method: iPSCs colonies are splited, pelleted and resuspended in pre-chilled E8 medium with 10%DMSO. Freezing process takes place in a gradual manner using Mr Frosties to -80°C. After 24 hours, frozen vials were stored in liquid nitrogen. Thawing method: Thawing process takes place in a fast manner, putting the criovial in a bath with 37°C. When the solution is almost thawed, put it with pre-warmed medium, centrifuge (1200rpm, 3 min.) and cultivate the pellet in the appropriate medium.</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>P 10 crecidas en E8. p10 grown with E8.</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 checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Resultado / Result Varios clones independientes de la misma reprogramación celular fueron analizados y caracterizados.</p> <p>Several indepent clones from the same reprogramming process were analyzed and characterized.</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

Test de pluripotencia <i>Pluripotency test</i>	Comentarios	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i> <i>Comments</i>
	Oct 4	RT-PCR (p4) y Citometría de flujo (p7)			Positivo / Anexo 1/2
	Nanog	RT-PCR (p4)			Positivo / Anexo 1
	Sox 2	RT-PCR (p4)			Positivo / Anexo 1
	SSEA3	Citometría de flujo (p4)			Positivo / Anexo 2
	SSEA4	Citometría de flujo (p4)			Positivo / Anexo 2
	TRA-1-60	Citometría de flujo (p4)			Positivo / Anexo 2
	TRA-1-81	Citometría de flujo (p4)			Positivo / Anexo 2
	Fosfatasa. Alk	Detección actividad enzimática (kit Merck Millipore) (p14)			Positivo / Anexo 3
Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i>	Comentarios	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i> <i>Comments</i>
	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	Inmunohistoquímica	B-III-tubulina	p14	Positivo / Anexo 4
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Inmunohistoquímica	Vimentina	p14	Positivo / Anexo 4
	Endoderm <i>Endoderm</i>	Inmunohistoquímica	CKAE1AE3	p14	Positivo / Anexo 4
Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> (espontánea/inducida) <i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i>	<p>Se realizó diferenciación espontánea in vitro, mediante la formación de cuerpos embrionarios (EBs), que fueron cultivados durante 16 días en medio de cultivo sin bFGF. Tras su cultivo, los EBs fueron peletados, fijados, incluidos en parafina y secciones de los mismos se tiñeron para valoración inmunohistoquímica de expresión de marcadores de pluripotencia (anexo 4).</p> <p>In vitro spontaneous differentiation was achieved by embryoid bodies (EBs) formation, cultured for 16 days in culture medium without bFGF. After culture, EBs were pelleted, fixed, embedded in paraffin and sections were stained to confirm three germ layers differentiation (annex 4).</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 <i>Ectoderm</i></td> <td>Imunohistoquímica</td> <td>B-III-tubulina</td> <td>p16</td> <td>Positivo</td> <td>Anexo 5</td> </tr> <tr> <td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td>Imunohistoquímica</td> <td>Vimentina</td> <td>p16</td> <td>Positivo</td> <td>Anexo 5</td> </tr> <tr> <td>Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td>Imunohistoquímica</td> <td>CKAE1AE3</td> <td>p16</td> <td>Positivo</td> <td>Anexo 5</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 <i>Ectoderm</i>	Imunohistoquímica	B-III-tubulina	p16	Positivo	Anexo 5	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Imunohistoquímica	Vimentina	p16	Positivo	Anexo 5	Endodermo <i>Endoderm</i>	Imunohistoquímica	CKAE1AE3	p16	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 <i>Ectoderm</i>	Imunohistoquímica	B-III-tubulina	p16	Positivo	Anexo 5																										
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Imunohistoquímica	Vimentina	p16	Positivo	Anexo 5																										
Endodermo <i>Endoderm</i>	Imunohistoquímica	CKAE1AE3	p16	Positivo	Anexo 5																										
<p>Descripción de las características de diferenciación in vivo <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i></p>	<p>Células iPS se inyectaron por vía subcutánea en flancos dorsales de ratones NOD-SCID. 10 semanas post-inyección, los teratomas fueron fijados e incluidos en parafina. El examen histológico de las preparaciones de hematoxilina-eosina mostró diferenciación hacia las tres capas germinales (Anexo 5).</p> <p>iPS cells were injected subcutaneously into dorsal flanks of NOD-SCID mice. 10 weeks post-injection teratomas were fixed and embedded in paraffin. Histological examination of hematoxylin-eosin preparations showed differentiation towards the three germ layers (Annex 5).</p>																														
<p>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i></p>	<p>46XX (p13) (Anexo 6 / Annex 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 8).</p> <p>SeV transgenes silencing test was made following CytoTune®-iPS 2.0 Sendai reprogramming kit instructions by RT-PCR (Annex 8).</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>Confirmación del diagnóstico genotípico determinado por secuenciación Sanger (Anexo 9).</p> <p>Confirmation of genotypic diagnosis determined by Sanger sequencing (Annex 9).</p>
<p>Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i></p>	<p>Test de Mycoplasma negativo determinado por PCR (Anexo 10).</p> <p>Mycoplasma test negative as determined by PCR (Annex 10).</p>

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3 Applicant Details

<p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Pedro José Real Luna</p>	<p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Avda. Ilustración 114 PTS Granada CP18016</p>
<p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> GENYO: Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica</p>	<p>Teléfono (phone): 958 71 55 00 Fax: 958 637 071 E-mail: pedro.real@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

Confirмо 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>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre (Representante legal del Departamento/Centro) <i>Legal Representative of the Department/Centre</i></p> <p>José Antonio Lorente Acosta</p> <p style="text-align: right;">Fecha/ Date: 11/01/21</p>	<p>Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i></p> <p>Pedro José Real Luna</p> <p style="text-align: right;">Fecha /Date 11/01/21</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> José Antonio Lorente Acosta. Director de GENyO: Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica</p>	
<p>Dirección Postal: <i>Postal Address:</i></p> <p>Avda. Ilustracion 114 PTS Granada, CP 18016 Granada</p>	<p>Teléfono /Telephone: 958 71 55 00</p> <p>Fax: 958 637 071</p> <p>E-mail: pedro.real@genyo.es</p>