

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: 31/07/2015

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>	CBiPS 2F-1c
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 CD133+ de sangre de cordón umbilical CD133+ cells from umbilical cord blood
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Femenino 0 años Female 0 years
¿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> 11.2010	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 11.2010
Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	Se pre-estimularon las células de sangre de cordón (CB) CD133+ (1x10 ⁵ cel/ml) durante 24h en DMEM suplementado con 10%FBS en presencia de SCF +Flt3 +TPO +IL-6. Cells from cord blood (CB) CD133 + (1x10 ⁵ cells / ml) were pre-stimulated for 24h in DMEM supplemented with 10% FBS in the presence of SCF + Flt3 + TPO + IL6.
¿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)</i> <i>Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	Constructos y producción retroviral Constructs and retroviral production Para la producción de las partículas retrovirales se utilizaron los vectores retrovirales pMSCVOCT4 y pMSCV_SOX2. La línea celular Phoenix Amphotropic fue transfectada con los dos vectores usando Fugene 6 según las instrucciones del fabricante. The retroviral vectors pMSCV-OCT4 and pMSCV-SOX2 were used for the production of retroviral particles. The Amphotropic Phoenix cell line was transfected with the two vectors using Fugene 6 according to the manufacturer's instructions. Transducción de células CD133+ Transduction CD133 + Se pre-estimularon las células de sangre de cordón (CB) CD133+ (0,1 M cel/ml) durante 24h en DMEM suplementado con 10%FBS en presencia de SCF +Flt3 +TPO +IL-6. Placas multipocillos fueron recubiertas con retronectina. Se añadió una mezcla filtrada y obtenida mediante centrifugación de sobrenadante retroviral para OCT4 y SOX2 (1:1) a 2500 RPM durante 30 min. Se plaquearon alrededor de 80.000 células CD133+ en presencia de DMEM+ FBS al 10% y el cocktail de citoquinas mencionado previamente. Se realizaron 3 ciclos de infección. A 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. Cells from cord blood (CB) CD133 + (0,1 x 10 M cells/ml) were pre-stimulated for 24 h in DMEM supplemented with 10% FBS in the presence of SCF + Flt3 + TPO + IL-6. Multiwell plates were coated with retronectin. A mixture obtained by centrifugation of retroviral supernatant for OCT4 and SOX2 (1: 1) at 2500 RPM for 30min was filtered and added. About 80,000 CD133 + cells were plated in the presence of DMEM + 10% FBS and the cytokine cocktail mentioned above. Three cycles of infection were performed. On day 3, the cells were harvested and transferred to 6-well plates containing irradiated human fibroblasts and hES medium. The CBiPS were cultured on irradiated human fibroblasts and passed mechanically.

<p>Condiciones de cultivo de la línea de iPSc generada. (si se describen en publicación, indicar referencia) <i>iPS Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i></p>	<p>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), 10 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Invitrogen), 1% non-essential amino acids (Cambrex), 20% Knockout Serum Replacement (InVitrogen) and 0,5% Penicillin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation).</p> <p>Vitaloni M, Pulecio J, Bilic J, Kebler B, Laricchia-Robbio L, Izpisua Belmonte JC. (2014) MicroRNAs Contribute to Induced Pluripotent Stem Cell Somatic Donor Memory. J. Biol. Chem. 289: 2084-2098.</p>
<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>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.</p> <p>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.</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>La congelación de los clumps de colonias se realizó en FBS(90%) + DMSO(10%), mediante congelador programable (-0.5°C/min.). Los viales se descongelaron a 37°C durante 1-2 minutos.</p> <p>The clumps of colonies were cryopreserved in FBS(90%)+ DMSO (10%), by programmable freezer (-0.5°C/min.). Vials were thawed at 37°C for 1-2 minutes.</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>22</p>
<p>¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> Sí Yes <input checked="" type="checkbox"/> No No <input type="checkbox"/> 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> <p>Anexo 1 Annex 1</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <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>Oct 4</td> <td>Inmunocitoquímica</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Nanog</td> <td>Inmunocitoquímica</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sox 2</td> <td>Inmunocitoquímica</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>SSEA3</td> <td>Inmunocitoquímica</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>SSEA4</td> <td>Inmunocitoquímica</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>TRA-1-60</td> <td>Inmunocitoquímica</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>TRA-1-81</td> <td>Inmunocitoquímica</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Fosfatasa. Alk</td> <td>Actividad</td> <td></td> <td>6</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>	Oct 4	Inmunocitoquímica		6	+		Nanog	Inmunocitoquímica		6	+		Sox 2	Inmunocitoquímica		6	+		SSEA3	Inmunocitoquímica		6	+		SSEA4	Inmunocitoquímica		6	+		TRA-1-60	Inmunocitoquímica		6	+		TRA-1-81	Inmunocitoquímica		6	+		Fosfatasa. Alk	Actividad		6	+	
	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>																																																		
Oct 4	Inmunocitoquímica		6	+																																																			
Nanog	Inmunocitoquímica		6	+																																																			
Sox 2	Inmunocitoquímica		6	+																																																			
SSEA3	Inmunocitoquímica		6	+																																																			
SSEA4	Inmunocitoquímica		6	+																																																			
TRA-1-60	Inmunocitoquímica		6	+																																																			
TRA-1-81	Inmunocitoquímica		6	+																																																			
Fosfatasa. Alk	Actividad		6	+																																																			
<p>Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <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>inmunocitoq.</td> <td>Tuj1/ GFAP</td> <td>14</td> <td>+/+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td>inmunocitoq.</td> <td>ASMA</td> <td>14</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Endoderm <i>Endoderm</i></td> <td>inmunocitoq.</td> <td>AFP/FOXA2</td> <td>14</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>	inmunocitoq.	Tuj1/ GFAP	14	+/+		Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunocitoq.	ASMA	14	+		Endoderm <i>Endoderm</i>	inmunocitoq.	AFP/FOXA2	14	+																															
	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>	inmunocitoq.	Tuj1/ GFAP	14	+/+																																																			
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunocitoq.	ASMA	14	+																																																			
Endoderm <i>Endoderm</i>	inmunocitoq.	AFP/FOXA2	14	+																																																			
<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>Mesodermo: cultivo de cuerpos embrioides (EBs) en medio de cultivo suplementado con ácido ascórbico. Endodermo: cultivo de EBs. Ectodermo: cultivo de EBs en medio con N2/B27 sobre células PA6 (Anexo 2).</p> <p>Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture. Ectoderm: EBs culture with N2/B27 on PA6 cells (Annex 2).</p>																																																						

<p>Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <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>inmunohistoq.</td> <td>Tuj1/ GFAP</td> <td>13</td> <td>+/+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td>inmunohistoq.</td> <td>ASMA/ ASA</td> <td>13</td> <td>+/+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td>inmunohistoq.</td> <td>AFP / FOXA2</td> <td>13</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>	inmunohistoq.	Tuj1/ GFAP	13	+/+		Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunohistoq.	ASMA/ ASA	13	+/+		Endodermo <i>Endoderm</i>	inmunohistoq.	AFP / FOXA2	13	+/+	
	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>	inmunohistoq.	Tuj1/ GFAP	13	+/+																					
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunohistoq.	ASMA/ ASA	13	+/+																					
Endodermo <i>Endoderm</i>	inmunohistoq.	AFP / FOXA2	13	+/+																					
<p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i></p>	<p>Inyección intratesticular en ratones SCID de 4•10 M de células indiferenciadas y tras 8 semanas, análisis de los teratomas producidos mediante técnicas de inmunohistoquímica para ectodermo, mesodermo y endodermo. (Anexo 3).</p> <p>4·10 M 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 (Annex 3).</p>																								
<p>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i></p>	<p>46XX p23 (Anexo 4 (Annex 4)</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>Los marcadores de microsatélites se muestran en el Anexo 5.</p> <p>Microsatellites markers are shown in Annex 5.</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>La qPCR evidenció la integración de los 2 genes; Oct-4, Sox-2 (Anexo 6)</p> <p>The 2 genes integration; Oct-4, Sox-2, was shown by qPCR (Annex 6)</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>Se evidenció el silenciamiento de los 2 genes de reprogramación Oct-4 y Sox-2 (Anexo 6)</p> <p>Silencing of reprogramming genes Oct-4 and Sox-2 was shown (Annex 6)</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 procede</p> <p>not applicable</p>
<p>Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i></p>	<p>Negativo por PCR (Ver Anexo 7) Negative by PCR (See Annex 7)</p>

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE
Section 3 Applicant Details

<p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Anna Veiga Lluch</p>	<p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> CMRB. Dr Aiguader 88, 08003 Barcelona</p>
<p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB)</p>	<p>Teléfono (phone): 933160360</p> <p>Fax: 933160301</p> <p>E-mail: blc@cmrb.eu</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

Confirmando 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: 31/07/2015 	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i>  Fecha / Date 31/07/2015
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Margarita Sala Azón 	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona Doctor Aiguader, 88, 7ª planta, 08003, Barcelona	Teléfono / Telephone: 933160303 Fax: 933160301 E-mail: gerencia@cmrb.eu