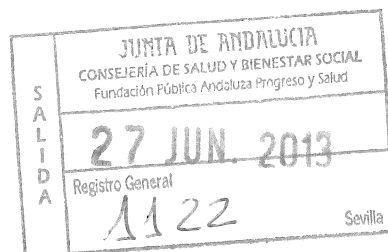




Fundación Progreso y Salud
CONSEJERÍA DE SALUD Y BIENESTAR SOCIAL



Fecha: 24.06.2013

Ref.: JJB/MRA/Jmm

D. Javier Arias Díaz
Subdirección General de Investigación en
Terapia Celular y Medicina Regenerativa
INSTITUTO DE SALUD CARLOS III
C/ Monforte de Lemos, 3
28029 - Madrid

Asunto: Deposito de Líneas BNLC

Estimado Sr. Arias:

Se adjuntan impresos de solicitud para formalizar el depósito en el Banco Nacional de Líneas Celulares de dos líneas celulares humanas de origen embrionario derivadas en el Centro Pfizer-Universidad de Granada- Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO):

- AND-1 WASKO C1.1
- AND-1 WASKO C1.2

Sin otro particular, reciba un cordial saludo



Juan Jesús Bandera González
Director Gerente

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)
National Bank of Stem Cell Lines
IMPRESO DE SOLICITUD DE DEPÓSITO DE UNA LÍNEA EMBRIONARIA-FETAL
Application Form to Deposit a Human Cell Line

Documentos que se acompañan:

Attached documents:

- X 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
- X C. V. del investigador principal (una página; formato libre).
A one page CV for the Principal Investigator
- X Otros (especificar).
Others (specify)

SECCIÓN 1

Section 1

Información General

General Information

Nombre de la línea: AND-1 WASKO C1.1

Name of the line: AND-1 WASKO C1.1

Investigador principal: Francisco Martin Molina

Principal Investigator:

Origen de la línea celular: AND1

Origin of the cell line

Embrionario X
Embryonic

Fetal ☐
Fetal

¿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 X
No

SÍ ☐ (especificar)
Yes (specify)

Identificación genética de la línea celular. Método y resultado

Genetic identity of the cell line. Method and result

No se ha realizado

Cariotipo / Karyotype

46, XY, -7, +i(7)p(20)



SECCIÓN 2
Section 2

Datos del Depositante
Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Francisco Martin Molina	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Avda de la Ilustración
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Fundación Publica Progreso y Salud- GENYO	Teléfono (phone): 958637103 Fax: 958637071 E-mail: francisco.martin@genyo.es

SECCIÓN 3
Section 3

Datos de la Línea Celular
Details of Cell Line

Tipo de muestra biológica (especificar estadio embrionario, semanas de gestación,...) <i>Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...)</i> Modificación genética de la línea AND1, desarrollada previamente por el BACM en Granada	
Muestra biológica <i>Biological sample</i> Fresco ☐ Crioconservado ☒ <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>	
Fecha de la obtención del muestra biológica <i>Date of obtaining the biological sample</i> Marzo 2011 <i>March 2011</i>	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> Marzo 2011 <i>March 2011</i>
Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i>	

Descripción general del procesamiento previo de la muestra biológica utilizada (cultivo embrionario, procesamiento muestra fetal, ...) <i>General description of the processing of the biological sample used (embryonic culture, processing of fetal sample, ...)</i> La línea AND1 fue obtenida del BNLC tras la aprobación del comité pertinente para la ejecución del proyecto "Terapia génica del Síndrome de Wiskott-Aldrich: Desarrollo de un modelo celular humano para estudios preclínicos". Las células fueron cultivadas tal y como se describe en la bibliografía <i>The AND1 line was obtained in the BNLC after the approval of the ethic committee for the execution of the project: "Gene Therapy for Wiskott-Aldrich: Development of a human cellular model for preclinical studies". The cells were cultured as described in the bibliography.</i>

Text items should be filled 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

Se utilizó la línea **AND1** generada previamente por el BACM como se describe en (Cortes JL, Sánchez L, Catalina P, Cobo F, Bueno C, Martínez-Ramírez A, Barroso A, Cabrera C, Ligeró G, Montes R, Rubio R, Nieto A, Menéndez P. *Stem Cells Dev.* 2008 Apr;17(2):255-67. doi: 10.1089/scd.2007.0157)

The **AND1** line was generated by the BACM as described (Cortes JL, Sánchez L, Catalina P, Cobo F, Bueno C, Martínez-Ramírez A, Barroso A, Cabrera C, Ligeró G, Montes R, Rubio R, Nieto A, Menéndez P. *Stem Cells Dev.* 2008 Apr;17(2):255-67. doi: 10.1089/scd.2007.0157)

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).

Se utilizó la Línea AND1 generada previamente por el BACM

It was used the AND1 line generated previously by the BACM

Mantenimiento de la línea: Line maintenance

Medio de cultivo:

1-Cuando están creciendo sobre hMSCs como estroma: Knock-out DMEM, 20% Knockout remplaceante del suero, 1% aminoácidos no esenciales, 1% L-glutamina, 0,1mM 2-mercaptoetanol, 4 ng/ml bFGF humano.

-When growing onto hMSCs: Knock-out DMEM, 20% serum replacement, 1% non-essential aminoacids, 1% L-glutamine, 0,1mM 2-mercaptoethanol, 4 ng/ml human bFGF.

2-Cuando se están cultivando sobre matrigel: mismo medio pero condicionado por hMSCs + 4ng/ml bFGF

-When growing onto matrigel: same media but conditioned by hMSCs +4ng/ml bFGF

Ratio de pase: 1:2-1:3 cada 7-9 días; 1:2-1:3 every 7-9 days

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

Xenobióticos

no

Xenobiotics

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.

Rounded colonies and vertically elongated. High nucleus/cytoplasm ratio.

Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)

Microbiological controls carried out (indicate in detail)

Micoplasma negativo

Mycoplasma negative



Marcadores:*Markers*

	Método (ARN/proteínas)	nº pase	resultado	comentarios
	<i>Method</i> <i>(RNA/proteins)</i>	<i>Passage n.</i>	<i>results</i>	<i>comments</i>
Oct 4	CITOMETRIA	35	+	
Nanog				
Rex 1 (opcional/optional)				
Sox 2				
SSEA3	CITOMETRIA	35	+	
SSEA4	CITOMETRIA	35	+	
TRA-1-60	CITOMETRIA	35	+	
TRA-1-81	CITOMETRIA	35	+	
Telomerasa/Telomerase (opcional/optional)				
Cariotipo / Karyotype		35	46, XY, -7, +i(7)p(20)	
Fosfatasa Alk. /Alkaline phosphatase				
Otros / Others				

Capacidad de diferenciación*Differentiation capacity*

Ectodermo/ Ectoderm			Endodermo/Endoderm			Mesodermo/ Mesoderm		
marcador	pase	resultado	marcador	pase	resultado	marcador	pase	resultado
<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>
In Vitro	xxxxxx		xxxxxxx			CD34	35	+
						CD45	35	+
						CD31	35	+
						CD41	35	+
						CD33	35	+
In vitro								
In vivo/ in vivo								
	Método:			Resultado:				
	<i>Method:</i>			<i>Result:</i>				



Descripción de las características de diferenciación *in vitro*

Description of the differentiation characteristics in vitro

Diferenciación hematopoyética mediante formación de cuerpos embrionarios (EBs)

Haematopoietic differentiation through Embryoid bodies (EBs).

Para lograr la diferenciación hematopoyética, los cultivos de hESCs cercanos a confluencia (día 0) son tratados con collagenasa IV durante 1 minuto, levantados del matrigel, transferidos a placas de cultivo de baja adhesión e incubados O/N en EB media (KO-Dulbecco's modified Eagle's medium suplementado con 20% FBS, 1 mM glutamina, 0.1 mM amino acids no esenciales y 0.1 mM β -mercaptoetanol). Al día siguiente los EBs son centrifugados y se añade nuevo medio EB suplementado con BMP-4 (25ng/ml), Flt-3L (300ng/ml), SCF (300ng/ml), IL-3 (10ng/ml), IL-6 (10ng/ml) and G-CSF (50ng/ml) (Chadwick, Wang et al. 2003). Esta operación se realiza cada 4 días hasta el final del análisis (día 22). La diferenciación mesodérmica/hematopoyética se analiza a diferentes días mediante la disociación de los EBs con collagenasa B (2 horas a 37°C) y con medio de disociación de Gibco (10 minutos a 37°C). Tras la disociación las células son analizadas para la expresión de marcadores de superficie mesodérmico y/o hematopoyéticos CD45, CD34, CD31, CD33. Los progenitores mesodérmicos (CD34+CD45-CD31+) comienzan a aparecer a día 12-13, los progenitores hematopoyéticos (CD34+CD45+CD31+) a día 14-15 y las células hematopoyéticas maduras (CD34-CD45+) alrededor del día 15-16.

To achieve hematopoietic differentiation, near confluent, hESCs (day 0) were treated with collagenase IV for 1 min, and scraped off from the matrigel. The hESCs were transferred to low-attachment plates (Corning Life Sciences, Amsterdam, The Netherlands) and incubated overnight in media composed by KO-Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 20% non-heat-inactivated FBS for hESCs (Gibco), 1 mM glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids and 0.1 mM β -mercaptoethanol. The next day the EBs were centrifuged and the media was changed for the same media supplemented with BMP-4 (25ng/ml), Flt-3L (300ng/ml), SCF (300ng/ml), IL-3 (10ng/ml), IL-6 (10ng/ml) and G-CSF (50ng/ml) (Chadwick, Wang et al. 2003), with media changes every 4 days. EBs were dissociated using collagenase B (Roche Diagnostic, Basel, Switzerland) for 2 hours at 37°C followed by 10 minutes incubation at 37°C with Cell Dissociation Buffer (Gibco-Invitrogen) for FACS analysis and Colony Forming Units (CFUs) assays. Surface markers analyzed: CD45, CD34, CD31, CD33. Mesoderm (CD34+CD45-CD31+) progenitors can be detected from day 12-13, hematopoietic progenitors (CD34+CD45+CD31+) appear from day 14-15 and mature hematopoietic cells (CD34-CD45+) can be observed from day 14-15.

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 flank of a NOD/SCID mouse. When the teratoma appears is extracted, fixed and the histologic cuts are staining with hematoxylin/eosin and by immunohistochemistry to identify the different germ line



Datos de la tipificación HLA*HLA typification data***Consistencia celular tras 6 pases de congelación y descongelación. Resultados.***Cell consistency alter 6 passages of freezing and thawing. Results.*

No tenemos datos

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

And-1 WASKO C1.1 20F+25M (20 pases sobre feeders + 25 pases sobre matrigel)

¿Ha sido la línea modificada genéticamente?*Has the line been genetically modified?*Sí Yes ☒No No ☐**Comentarios/ Comments:**

The Wiskott-Aldrich Syndrome gene (WAS) was mutated using zinc finger nucleases (ZFNs) targeting the WAS intron 1. This ZFNs has been published in:

"Use of zinc-finger nucleases to knock out the WAS gene in K562 cells: a human cellular model for Wiskott-Aldrich syndrome". Toscano MG, Anderson P, Muñoz P, Lucena G, Cobo M, Benabdellah K, Gregory PD, Holmes MC, Martin F. *Dis Model Mech*. 2013 Mar;6(2):544-54. doi: 10.1242/dmm.010652. Epub 2013 Jan 11.

¿Se llevó a cabo un análisis clonal?*Has a clonal analysis been carried out?*Sí/ Yes ☒ No ☐

Resultado / Result. The gene modification involves the introduction of neomycin expression cassette in the WAS locus. We analyzed 8 clones resistant to 50 microgrames/ml of G418. Two of the eight clones had the proper insertion of the neo cassette disrupting the expression of the WAS gene.

And-1 WASKO C1.1 is one of those two clones



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

- The WASKO C1.1 cells maintain several of the phenotypic and functional alteration found in hematopoietic cells from WAS patients:
 - o Altered response to SCF of CD34+CD45+ progenitors derived from hESCsWASKO
 - Ca++ responses
 - Actin polimerization
 - o Altered response to ADP/thrombin of megakaryocytes and platelets derived from hESCsWASKO
 - Ca++ responses
 - Actin polimerization
 - Receptor activation (PAC-1 binding)
- The WASKO C1.1 cells have a normal hematopoietic differentiation profile (phenotypically) compared to hESCs WT
- The WASKO C1.1 cells have a normal megakaryocytic differentiation profile (phenotypically) compared to hESCs WT

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 (Representante legal del Departamento Centro)  Fecha/ Date: 25/06/13	Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator  Fecha /Date 17/01/2013
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: JUAN JESÚS BANDERAS GONZÁLEZ Name and Position of the Person Representing the Centre: DIRECTOR GERENTE	
Dirección Postal: Postal Address: AVDA. AMÉRICO VESPUCCI, 5 BLOQUE 2-2ª PLTA. 41092 - SEVILLA	Teléfono /Telephone: 955 040 450 Fax: 955 040 457 E-mail: gestionproyectos.fps@juntadeandalucia.es

