

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: 5 abril 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
- ☒ **Número de registro del proyecto** PR-04-2015

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>	AMDdh05-MiPS4F16
Nº de registro en el Human Pluripotent Stem Cell Registry (1)	CABi003-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. 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>	Monocitos (PBMCs) de sangre periférica obtenida por venopunción. Peripheral blood monocytes (PBMCs) obtained by venopuncture.
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Mujer (female) 81
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO ☐ <i>No</i> SÍ ☒ (especificar) <i>Yes (specify)</i> Degeneración macular asociada a la edad. Age-related macular degeneration
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO ☐ <i>No</i> SÍ ☒ (especificar) <i>Yes (specify)</i> risk variant CFH/p.Y402H

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco ☒ <i>Fresh</i> Crioconservado ☐ <i>Cryopreserved</i>
Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 8 febrero 2017	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 8 febrero 2017 February 8th 2017
Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	Los monocitos purificados de la muestra de sangre se matuvieron durante una semana en cultivo en suspensión en medio EM en un incubador estándar. Purified PBMCs were cultured for a week in a standard incubator in suspension in EM medium) EM: QBSF-60 Stem Cell (Quality Biological) with 50 µg/ml of ascorbic acid (Sigma-Aldrich); 50 ng/ml of SCF (Stemcell Technologies); 10 ng/ml IL-3 (Stemcell Technologies); 2 U/mL of EPO (Stemcell Technologies); 40 ng/ml IGF-1 (Stemcell Technologies); 1 µM Dexamethasone (Sigma-Aldrich) and 1% Pen/strep (Gibco)
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>	Se realizó el análisis de huella genética por STR (10 marcadores), hallándose identidad entre la muestra de ADN genómico procedente de las células primarias y la obtenida a partir de las células iPS. Dato en Anexo 3. Identity between primary cells and derives iPS was checked by STR analysis of genomic DNA using 10 loci. Data in Anexo 3
¿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>	Transducción de factores de Yamanaka (hOCT3/4, hSOX2, hc-MYC, and hKLF4), mediante virus no integrativo (Sendai virus). The reprogramming factors hOCT3/4, hSOX2, hc-MYC, and hKLF4 were transduced into the primary PBMCs via the non-integrative Sendai virus.
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>	Las células iPS se mantuvieron inicialmente en cultivo sobre feeders (fibroblastos humanos irradiados ref. ATCC CRL2429) en medio hESC completo y en un incubador estándar con pase manual una vez por semana a un ratio 1:3. Posteriormente, las células iPS se adaptaron a cultivo sobre matrigel sin feeders, en medio mTeSR™1 (STEMCELL) con pase mediante dispasa una vez por semana en ratio 1:10. Esta es la condición de las células congeladas para banco. The iPS cells were maintained on feeders (human fetal foreskin fibroblasts (ATCC CRL2429) inactivated by 45Gy irradiation), with mechanical passage once a week and 1:3 split ratio. Later, cells were adapted to grow without feeders, on matrigel and mTeSR1 medium with weekly passage at 1:10 split ratio. Frozen vials for biobank were cells grown on this conditions. hESC medium: Knock Out DMEM-F12 (Gibco); 20% Knock Out serum (Gibco); 1% glutamine (Gibco); 1% nonessential amino acids (Gibco); 0.23 mM β-mercaptoethanol (Gibco); 1% pen-strep (Gibco) and 10 ng/ul bFGF (PeproTech)

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>	El cultivo sobre feeders tiene la siguiente morfología: Colonias aplanadas de forma poligonal, bordes bien diferenciados y un ratio elevado núcleo/citoplasma. En cultivo sobre matrigel las células crecen en colonias planas de bordes redondeados bien diferenciados. On feeders, the iPS grow as flat polygonal-shaped colonies with refractive edges and composed of cells with high nuclear/cytoplasmic ratio. Without feeders, cells grow in flat colonies with neat and round borders.
Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i>	Cada criovial contiene a las células de un pocillo de una placa de 6-well de iPS adaptadas a cultivo sin feeders en medio mTeSR1 sobre matrigel. Las células se suspendieron en 1 mL de solución de congelación: 60% mTeSR1, 30% knockout serum (KSR) y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Inmediatamente se congelaron a una velocidad de enfriamiento lenta en un contenedor de isopropanol durante 24h a -80°C y posteriormente se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido. Each criovial contains the cells from a well of a six-well-plate. Cells were previously adapted to grow onto matrigel in mTeSR1 medium. To freeze them, cells were suspended in 1 mL of: 60% mTeSR1, 30% KSR, 10% DMSO and immediately frozen at a slow cooling rate in a 2-propanol container at -80°C along 24h and subsequently stored in a liquid nitrogen tank.
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>	15
¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> SÍ Yes ☐ No No ☒ Comentarios/ Comments:	¿Se llevó a cabo un análisis clonal? <i>Has a clonal analysis been carried out?</i> SÍ/ Yes ☐ No ☒ Resultado / Result

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>	Método <i>Method</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>		
	Oct 4	IF, rt-QPCR	9	+	anexo 5	
	Nanog	IF, rt-QPCR	9	+		
	Sox 2	IF	9	+		
	SSEA3	IF	13	+		
	SSEA4	IF	13	+		
	TRA-1-60					
	TRA-1-81					
	Fosfatasa. Alk	AP assay kit	10	+		
Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i>	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>	IF/rt-PCR	PAX6/MAP2	11	+	anexo 6
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	IF/rt-PCR	SMA/MSX1	11	+	
	Endoderm <i>Endoderm</i>	IF/rt-PCR	AFP/SOX17	11	+	
Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> <i>(espontánea/inducida)</i>	Se generaron cuerpos embrioides mediante el cultivo de colonias iPS en condiciones no adherentes en medio hESC sin bFGF durante 7 días. Posteriormente se pasaron los cuerpos embrioides a condiciones adherentes sobre gelatina con medio de cultivo DMEM/F12 + 2 mM glutamina + 10% de FBS (suero fetal bovino) y se cultivaronn otros siete días. La diferenciación espontánea a los tres linajes se verificó por inmunofluorescencia y rtPCR. Embryoid bodies (EBs) were generated in non-adherent culture conditions, hESC-bFGF for 7 days. EBs were then cultured in adherent conditions on gelatin and 10% FBS supplemented DMEM/F12 + 2 mM glutamine culture media. Spontaneous differentiation to the three lineages was assessed by immunofluorescence and rtPCR.					

Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i>					
	Comentarios	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>
	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	IF	TUBB3, PAX6	13	+
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	IF	SMA	13	+
	Endodermo <i>Endoderm</i>	IF	AFP	13	+
Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i>	Se recogieron trozos de colonias de iPS se mezclaron con un pequeño volumen de Matrigel, y la mezcla se inyectó subcutáneamente en ratones inmunodeprimidos (SCID). Después de aproximadamente 8 semanas se recogieron los teratomas y se prepararon para análisis histológico por inmunofluorescencia para marcadores de las tres capas embrionarias. Clumps of iPS colonies were collected, mixed with a small volume of Matrigel, and the mixture was injected subcutaneously into immunosuppressed mice (SCID). After 8 weeks, the teratomas were prepared for histological analysis by immunofluorescence for the markers of the three embryonic layers.				
Cariotipo (especificar fórmula cariotípica en el pase de banqueo) <i>Karyotype (Specify karyotype formula in the passage in which it is banked)</i>	46, X X See anexo 2				
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>	cAMDdh05-MiPS4F16 (see anexo 3) AMEL X, X CSF1PO 12, 14 D5S818 11, 13 D13S317 8, 8 D21S11 28, 30 D16S539 12, 12 D7S820 10, 11 TH01 8, 9 TPOX 8, 8 vWA 16, 17				
Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>	La reprogramación se realizó por transducción de los factores de Yamanaka en los PBMCs mediante un virus de RNA no integrativo (Sendai virus, Cytotune sendai reprogramming kit, Life Technologies). A non-integrative approach was used for the reprogramming of the cell line. Yamanaka factors were transduced into PBMCs by the non-integrative RNA Sendai virus (Cytotune sendai reprogramming kit, Life technologies).				

Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i>	Se ha comprobado la ausencia de Sendai virus del genoma de las células mediante RT-PCR de los factores exógenos de reprogramación y del gen que codifica para la cápside del virus (SeV). Clearance of sendai virus from the cells was checked by rt-PCR for the reprogramming transgenes and the capsid gene (SeV). See anexo 4
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>	Secuenciación Sanger de la región génica correspondiente a la variante p.Y402H en el gen CFH, asociada a riesgo elevado de degeneración macular asociada a la edad. Anexo 1 Sanger sequencing of the genomic region on the CFH gene corresponding to the p.Y402H variant, associated to elevated risk of age-related macular degeneration. Anexo 1
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	Test de luminiscencia MycoAlert plus (Lonza) con resultado negativo. Negative Mycoplasma detection MycoAlert plus (Lonza). See anexo 8

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3 Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Francisco J. Díaz Corrales	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Americo Vespucio 24, 41092 Sevilla, España
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> CABIMER	Teléfono (phone): 954467425 Fax: E-mail: francisco.diaz@cabimer.es

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):

Esta línea se generó para el estudio de la degeneración macular a sociada a la edad. La reprogramación y caracterización se llevó a cabo en CABIMER por Ana B.García Delgado, Sofia Calado y Berta de la Cerda

This line was generated for the study of age-related macular degeneration. The reprogramming and characterization was carried out in CABIMER by Ana B.García Delgado, Sofia Calado y Berta de la Cerda.

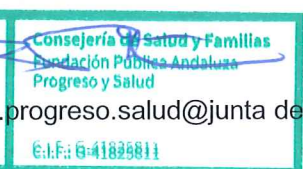
Otras observaciones o información relevantes (a rellenar por el BNLC):
Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

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 (Representante legal del Departamento/Centro) Legal Representative of the Department/Centre	Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator  5/4/21
Fecha/ Date:	Fecha /Date
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Name and Position of the Person Representing the Centre: Gonzalo Balbontín Casillas (Director Gerente)	
Dirección Postal: Postal Address: Fundación Progreso y Salud Avenida Americo Vespucio, 15 41092 Sevilla	Teléfono /Telephone: 955 04 04 50 Fax:  E-mail: fundacion.progreso.salud@junta de andalucia.es  C.I.F.: G-41829811

(1) Instrucciones para la realización del registro de líneas hESC y hiPSC generadas en España en el Human Pluripotent Stem Cell Registry

Entre en la página web: <https://hpscereg.eu/>

Cree su perfil rellenando el formulario on-line Sign up form. Después de hacer click en Sign up, recibirá el mensaje de confirmación de los datos y se le enviará el correo electrónico de confirmación.

Registro de líneas:

- Register Cell Line> Create a standard cell line name> Generator Institution: Assign an existing institution: Introducir: Spanish Stem Cell Bank
- hPSCreg Team <hpscereg-info@charite.de> le confirmará la asignación de Spanish Stem Cell Bank a su perfil por correo electrónico. En este momento su estado en Dashboard (My institutions) de Applicant cambiará a Registrant para esta institución.
- Volver a Generator Institution> seleccionar en el desplegable Spanish Stem Cell Bank.
- El nombre provisional (Provisional name) debe de empezar por ES.
- En Alternative names introduzca el nombre de la línea con el que se deposita en el BNLC, según las indicaciones:
- http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-el-instituto/fd-organizacion/fd-estructura-directiva/fd-subdireccion-general-investigacion-terapia-celular-medicina-regenerativa/fd-centros-unidades/fd-banco-nacional-lineas-celulares/Nomenclatura_iPS_BNLC_2015.pdf