

**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:** 12-Mayo-2017

**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*

<b>Nombre de la línea iPS</b> <i>Name of the iPS line:</i>	iCas9-FL-BCL-iPSC (el nombre difiere de lo sugerido en la web del BNLC pero es el que figura en la publicación científica que ya esta en el dominio público).
<b>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</b> <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 progenitoras B (BCP) CD19+ VDJH+ obtenidas de pooles de hígados fetales a las 22 semanas de desarrollo
<b>Sexo y edad del donante.</b> <i>Sex and age of the donor</i>	pol de fetos de 22 semanas                      Mujer
<b>¿El donante tiene alguna patología?</b> <i>Has the donor any pathological condition?</i>	<b>NO</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>SÍ</b> <input type="checkbox"/> (especificar) No    Yes                      (specify)
<b>¿La patología es de origen genético?</b> <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	<b>NO</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>SÍ</b> <input type="checkbox"/> (especificar) No    Yes                      (specify)

<b>Muestra biológica recibida</b> <i>Biological sample</i>	<b>Fresco</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>Crioconservado</b> <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>
<b>Fecha de la donación de la muestra biológica</b> <i>Date of donation of the biological sample</i> Febrero 2016	<b>Fecha del uso o descongelación</b> ( <i>si congelado</i> ) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> se usó fresco
<b>Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario).</b> <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	Son células primarias que se obtienen por FICOLL y separación magnética de la fracción CD34. Estas células se separan por FACS para CD19+ y los progenitores B CD34+CD19+ se mantienen en Stem Span con FLT3L, IL3 e IL7 durante 2 días, antes de proceder a la generación de las iPSC.
<b>Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de las células de origen</b> <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the original cells.</i>	Las células CD34+CD19+ proceden de un pool de varios fetos fetales y por tanto no se puede conocer el origen con exactitud. Sin embargo, lo importante en estas iPSC no es el origen genético sino más sino el origen celular, demostrando que las iPSC proceden de un precursor B que tiene reordenamiento BCR por PCR para los reordenamientos de las Ig-VDJH. Esto se ha realizado por PCR y/o por secuenciación. (VER ANEXO 1)
<b>¿Hay disponibilidad de viales congelados de las células de origen? ¿En qué pase?</b> <i>Is there availability of frozen vials of original cells? At what passage?</i>	SI. PASE <15.
<b>Método utilizado en la generación de la línea iPSc. (Integrativa/ No-integrativa) Especificar factores y plásmidos de reprogramación utilizados.</b> <i>Method used for the generation of iPSC line (Integrative / Non-integrative)</i> Specify factors and plasmids used for reprogramming	Se ha usado método no integrativo con un vector de Sendai no integrativo. Es un vector policistrónico con los factores OKSM (Bueno et al Leukemia 2016, Muñoz-Lopez Stem Cells 2016, Stem Cell Rep 2016 & Romero-Moya Stem Cells 2017)  El vector se llama SdV-OKSM-mir302
<b>Condiciones de cultivo de la línea de iPSc generada. (si se describen en publicación, indicar referencia)</b> <i>iPS Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i>	Las iPSC se han generado en MEFs de la cepa CF1, irradiados. Se han mantenido en MEFs. Luego se han pasado y adaptado a MSC (células mesenquimales). Siempre se han crecido con medio de ESC convencional (medio condicionado por MEFs; Menendez et al Mol Ther 2004) que contiene KO-DMEM+KO-SR+L-Glu+8ng de bFGF. La línea se mantiene en MEFs y en MSCs. Se mantiene con medio de ESC convencional que contiene KO-DMEM+KO-SR+L-Glu+8ng de bFGF
<b>Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo (forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma; otros)</b> <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>	Las colonias son típicas de iPSC o hESC. Tienen una alta relación núcleo:citoplasma. Hay colonias de tamaños diferentes pero todas tienen fenotipo epitelial excepto las de los bordes donde hay alguna célula haciendo EMT hacia diferenciación. (VER ANEXO 2)

<p><b>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación)</b>  <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i></p>	<p>La línea se ha congelado en KO-DMEM+20%SR+10% DMSO. La congelación se ha hecho en equipo de congelación programable que controla el descenso de la temperatura con el tiempo.</p>
<p><b>Pase de la línea celular en el momento del banqueo/registro. (Máximo: Pase 15)</b>  <i>Passage at the time of the banking/registration (Max: Passage 15)</i></p>	<p>La línea tiene unos 10-12 pases desde manipulación genética (CRIPS-Cas9) de la línea parental.</p>
<p><b>¿Ha sido la línea modificada genéticamente?</b>  <i>Has the line been genetically modified?</i>  <b>Sí Yes</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>No No</b> <input type="checkbox"/></p> <p><b>Comentarios/ Comments:</b></p> <p>La línea lleva en el safe harbor AAVS1 una única copia de la proteína Cas9 que se expresa de forma inducible, tras inducción con doxiciclina (VER ANEXO 3).</p>	<p><b>¿Se llevó a cabo un análisis clonal?</b>  <i>Has a clonal analysis been carried out?</i></p> <p><b>Sí/ Yes</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>No</b> <input type="checkbox"/> <b>Resultado / Result</b> positivo para Cas9, 1 copia en locus AAVS1</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><b>Test de pluripotencia</b> <i>Pluripotency test</i></p>	<p><b>Método</b> <i>Method</i></p>		<p><b>Nº pase</b> <i>Passage n.</i></p>	<p><b>Resultado</b> <i>Results</i></p>	<p><b>Comentarios</b> <i>Comments</i></p>
	<b>Oct 4</b>	q-RT-PCR	12	++ (VER ANEXO 4)	
	<b>Nanog</b>	q-RT-PCR	12	++	
	<b>Sox 2</b>	q-RT-PCR	12	++	
	<b>SSEA3</b>	FACS	12	++	
	<b>SSEA4</b>	Inmuno	12	++	
	<b>TRA-1-60</b>	Inmuno	12	++	
	<b>TRA-1-81</b>	Inmuno	12	++	
	<b>Fosfatasa. Alk</b>	Inmuno	12	++	
<p><b>Test de diferenciación in vitro</b> <i>In vitro differentiation test</i></p>	<p><b>Comentarios</b></p>	<p><b>Método</b> <i>Method</i></p>	<p><b>Marcador</b> <i>Marker</i></p>	<p><b>Nº pase</b> <i>Passage n</i></p>	<p><b>Resultado</b> <i>Results</i></p> <p><i>Comments</i></p>
	<b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i>	Se hace in vivo			
	<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>	Se hace in vivo			
	<b>Endoderm</b> <i>Endoderm</i>	Se hace in vivo			
<p><b>Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i></b> <i>(espontánea/inducida)</i></p> <p><i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i></p>	<p>La diferenciación espontánea se hace como se indica en Sanchez L et al Stem Cells 2011. La diferenciación dirigida a sangre como Girogetti A et al Exp Hematol 2017 mediante la formación de EBs en presencia de citocinas hematopoiéticas (BMP4, SCF, IL3, IL6, G-CSF)</p>				

<p><b>Test de diferenciación in vivo</b> <i>In vivo differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th><b>Método</b> <i>Method</i></th> <th><b>Marcador</b> <i>Marker</i></th> <th><b>Nº pase</b> <i>Passage n</i></th> <th><b>Resultado</b> <i>Results</i></th> <th><i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>Comentarios</b></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i></td> <td>teratoma</td> <td>neural rosettes</td> <td>p15</td> <td>+</td> <td>(VER ANEXO 5)</td> </tr> <tr> <td><b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i></td> <td>teratoma</td> <td>estructura mesenquimal y muscular</td> <td>p15</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>Endodermo</b> <i>Endoderm</i></td> <td>teratoma</td> <td>cystic glandular epithelium</td> <td>p15</td> <td>+</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		<b>Método</b> <i>Method</i>	<b>Marcador</b> <i>Marker</i>	<b>Nº pase</b> <i>Passage n</i>	<b>Resultado</b> <i>Results</i>	<i>Comments</i>	<b>Comentarios</b>						<b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i>	teratoma	neural rosettes	p15	+	(VER ANEXO 5)	<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>	teratoma	estructura mesenquimal y muscular	p15	+		<b>Endodermo</b> <i>Endoderm</i>	teratoma	cystic glandular epithelium	p15	+	
	<b>Método</b> <i>Method</i>	<b>Marcador</b> <i>Marker</i>	<b>Nº pase</b> <i>Passage n</i>	<b>Resultado</b> <i>Results</i>	<i>Comments</i>																										
<b>Comentarios</b>																															
<b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i>	teratoma	neural rosettes	p15	+	(VER ANEXO 5)																										
<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>	teratoma	estructura mesenquimal y muscular	p15	+																											
<b>Endodermo</b> <i>Endoderm</i>	teratoma	cystic glandular epithelium	p15	+																											
<p><b>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i></b> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i></p>	<p>Los ensayos de pluripotencia in vivo se han hecho de acuerdo a Gutierrez-Aranda et al Stem Cells 2010.. Se han inyectado 1 millón de iPSC s.c y se han analizado por hematoxilina-eosina los tumores resultantes tras 8 semanas, encontrando estructuras representativas de mesodermo (músculo-fibroblastoide), ectodermo (rosetas neurales) y endodermo (estructuras glandulares císticas) (VER ANEXO 5).</p> <p>Se ha seguido el Atlas de teratomas publicado en 2017 por el ISCBi dirigido por el Dr. Peter Andrews y publicado en Int J Dev Biol.</p>																														
<p><b>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase)</b> <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i></p>	<p>46 XX +20 (15/20) (VER ANEXO 6)</p>																														
<p><b>Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de la línea celular</b> <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the cell line</i></p>	<p>Las células CD34+CD19+ proceden de un pool de varios fetos fetales y por tanto no se puede conocer el origen con exactitud. Sin embargo, lo importante en estas iPSC no es el origen genético sino más sino el origen celular, demostrando que las iPSC proceden de un precursor B que tiene reordenamiento BCR por PCR para los reordenamientos de las Ig-VDJH. Esto se ha realizado por PCR y/o por secuenciación. (VER ANEXO 1)</p>																														
<p><b>Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular)</b> <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i></p>	<p>La línea parental a la hora de la corrección genética ya era OKSM free. El SeV se diluyó tras 6-8 pases y OKSM no se expresa por PCR (VER ANEXO 7)</p>																														

<p><b>Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular)</b>  <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i></p>	<p>Se ha estudiado la demetilación e OCT4 y NANOG por pirosecuenciación como se describe en Bueno C et al Leukemia 2016 y Roero-Mota D Stem Cells 2017 (VER ANEXO 8)</p>
<p><b>Confirmación del diagnóstico genotípico en las iPSC generadas a partir de muestras con mutación genética</b>  <i>Confirmation of genotypic diagnosis of the cell line generated from samples with genetic mutation</i></p>	<p>No aplica</p>
<p><b>Test de micoplasma</b>  <b><i>Mycoplasma Test</i></b></p>	<p>Negativo (VER ANEXO 9)</p>

**SECCIÓN 3      DATOS DEL DEPOSITANTE**  
*Section 3      Applicant Details*

<p><b>Investigador Principal:</b>  <i>Principal Investigator:</i>  Pablo Menendez / Julio Castaño</p>	<p><b>Dirección Postal:</b>  <i>Postal address:</i>  Casanova 143, Facultat medicina, 08008, Barcelona</p>
<p><b>Centro de Trabajo:</b>  <i>Institution:</i>  IJC, Barcelona</p>	<p><b>Teléfono (phone):</b> 935572810  <b>Fax:</b>  <b>E-mail:</b> pmenendez@carrerasresearch.org</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

**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.*

<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>  Carles Esquerre  Fecha/ Date: 12-5-17	<b>Firma del Investigador Principal</b> <i>Signature of the Principal Investigator</i>  Pablo Menendez  Fecha /Date 12-5-17
<b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b> <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Carles Esquerre Vitori, Manager Director	
<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal Address:</i> IJC. Cami de les Escoles s/n. Campus can Ruti, badalona	<b>Teléfono /Telephone:</b> 935543050 <b>Fax:</b> <b>E-mail:</b> cesquerre@carrerasresearch.org