

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)

National Bank of Stem Cell Lines

IMPRESO DE SOLICITUD DE DEPÓSITO DE UNA LÍNEA

Application Form to Deposit a Human Cell Line

Documentos que se acompañan:

Attached documents:

- ☒ 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
- ☒ C. V. del investigador principal y C.V. del Co-IP (una página; formato libre).
A one page CV for the Principal Investigator
- ☒ Otros (especificar):
Others (specify)
 - Declaración del Representante Legal
 - Consentimiento informado de los embriones y su trazabilidad
 - Copia de autorización de derivación
 - CVs resumido de los investigadores que las han derivado

SECCIÓN 1

Section 1

Información General

General Information

Nombre de la línea: HVR-1

Name of the line: HVR-1

Investigador principal: Guillermo Antiñolo Gil

Principal Investigator:

Co-Investigador principal: Abdelkrim Hmadcha

Co-principal Investigator:

Origen de la línea celular:

Origin of the cell line

R E C E P C I O N	JUNTA DE ANDALUCÍA CONSEJERÍA DE SALUD Fundación Progreso y Salud	
	20/03/09	
	Registro General	Nota
	0680	Sevilla

Embrionario ☒
Embryonic

Fetal ☐
Fetal

Adulto ☐
Adult

¿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 ☒
No

SÍ ☐ (especificar)
Yes (specify)

Identificación genética de la línea celular. Método y resultado

Genetic identity of the cell line. Method and result

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)

National Bank of Stem Cell Lines

IMPRESO DE SOLICITUD DE DEPÓSITO DE UNA LÍNEA

Application Form to Deposit a Human Cell Line

Documentos que se acompañan:

Attached documents:

- ☒ 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
- ☒ C. V. del investigador principal y C.V. del Co-IP (una página; formato libre).
A one page CV for the Principal Investigator
- ☒ Otros (especificar):
Others (specify)
 - Declaración del Representante Legal
 - Consentimiento informado de los embriones y su trazabilidad
 - Copia de autorización de derivación
 - CVs resumido de los investigadores que las han derivado

SECCIÓN 1

Section 1

Información General

General Information

Nombre de la línea: HVR-1

Name of the line: HVR-1

Investigador principal: Guillermo Antiñolo Gil

Principal Investigator:

Co-Investigador principal: Abdelkrim Hmadcha

Co-principal Investigator:

Origen de la línea celular:

Origin of the cell line

Embrionario ☒
Embryonic

Fetal ☐
Fetal

Adulto ☐
Adult

¿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 ☒
No

SÍ ☐ (especificar)
Yes (specify)

Identificación genética de la línea celular. Método y resultado

Genetic identity of the cell line. Method and result

SECCIÓN 2
Section 2

Datos del Depositante
Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Guillermo Antiñolo Gil	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Avda Manuel Siurot s/n 41013- SEVILLA
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Hospital Universitario Virgen del Rocío Unidad de Gestión Clínica de Genética Reproducción y Medicina Fetal	Teléfono (phone): (+34) 955 012 725 Fax: (+34) 955 013 292 E-mail: guillermo.antinolo.sspa@juntadeandalucia.es
Co-Investigador Principal: <i>Co-Principal Investigator:</i> Abdelkrim Hmadcha	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Avda, Americo Vespucio s/n Isla de la cartuja - 41092 Sevilla
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> CABIMER - Departamento de Terapia Celular y Medicina Regenerativa	Teléfono (phone): (+34) 954 468 004 Fax: (+34) 954 461 664 E-mail: karim.hmadcha@cabimer.es

SECCIÓN 3
Section 3

Datos de la Línea Celular
Details of Cell Line

Tipo de muestra biológica (especificar estadio embrionario, semanas de gestación,...)

Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...)

Preembrión procedente del programa de Fecundación in vitro, Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal de los HH. UU. Virgen del Rocío: Preembrión humano congelado en día +3 de desarrollo mediante protocolo estándar de congelación lenta.

Human pre-embryo obtained from the IVF program of the Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal (UGC) de los HH. UU. Virgen del Rocío and collected after being donated by patients through an informed consent process: pre-embryo frozen at day +3 following the UGC standard protocol.

Muestra biológica

Biological sample

Blastocisto

Blastocyst

Fresco ☐

Fresh

Crioconservado ☒

Cryopreserved

Fecha de la obtención del muestra biológica

Date of obtaining the biological sample

16/05/06

Fecha del uso o descongelación (si congelado)

Date used or thawed (if frozen)

11/01/2008

Fecha de la donación del muestra biológica

Date of donation of the biological sample

23/01/07

Descripción general del procesamiento previo del muestra biológica utilizado (cultivo embrionario, procesamiento muestra fetal o de tejido adulto)

General description of the processing of the biological sample used (embryonic culture, processing of fetal sample or of adult tissue).

Con fecha 16/05/2006 a la pareja progenitora del preembrión del que se ha obtenido esta línea celular se le realizó un ciclo de Fecundación In Vitro (FIV) dentro del programa de FIV de la Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal de Hospitales Virgen del Rocío de Sevilla. Se obtuvieron 14 preembriones, de los cuales 9 fueron criopreservados mediante congelación lenta según el protocolo de congelación Freeze kit 1TM de Vitrolife® (Kungsbacka, Suecia). El 23/01/2007 la pareja dona sus preembriones criopreservados al proyecto de investigación "Derivación de Líneas de células Troncales Embrionarias Humanas de Preembriones Afectos de Enfermedades Genéticas Obtenidos Tras Diagnóstico Genético Preimplantatorio", firmando los Consentimientos necesarios. El preembrión del cual se ha obtenido esta línea celular fue descongelado según el protocolo comercial de descongelación Thaw Kit 1TM de Vitrolife®. El preembrión que se encontraba en día 3 de desarrollo (estadio de células) se cultivó en medio G2 de la serie GIII de Vitrolife® (Kungsbacka, Suecia), según descrito para cultivo de preembriones en dicho estadio, hasta llegar a estadio de blastocisto, en su día 5 de desarrollo.

La inclusión de preembriones procedentes del programa de Fecundación in vitro en el proyecto TCRM 0021/2006, tiene como objetivo establecer líneas de CTEhs cuyo método de obtención sea idéntico al de las líneas CTEhs a partir de preembriones afectados de enfermedades monogénicas, eliminando los errores de variabilidad que tendríamos si como línea CTEhs control usáramos alguna de las que han sido ya derivadas y se ofertan para su utilización, generadas con una metodología diferente a la nuestra o bien desconocida.

Preembryos were obtained as donation from an infertile couple undergoing in vitro fertilization (IVF) treatment at Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal (UGC) de los HH. UU. Virgen del Rocío in Seville. They signed an informed consent form. Fourteen preembryos were obtained, and nine of them were donated. The nine preembryos were frozen at the cleavage state using slow freezing method Freeze kit 1TM, Vitrolife® (Kungsbacka, Suecia). All of them were thawed using Thaw Kit 1TM, Vitrolife® and cultured to blastocyst stage using G2 medium (GIII series, Vitrolife®).

With the inclusion of preembryos from our IVF program in the TCMR 0021/2006 research project is expected to obtain CTEh lines as controls. Using identical conditions in the derivation method for control lines and for CTEh lines derived from preembryos affected of monogenic disorders, we can reduce bias and carry out a prospective comparison.

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 aisló la masa celular interna (ICM) mediante microcirugía de forma manual bajo estereomicroscopio en un pocillo con medio K-SR, cuando el preembrión se encontraba en estadio de blastocisto "hatching". Para ello, se utilizaron dos agujas de insulina estériles (25G). Con una se sujetó el preembrión por el trofoectodermo presionando sobre el fondo de la placa y con la otra se separó la ICM del trofoectodermo. La ICM se pasó varias veces por una pipeta pasteur estirada a la llama de diámetro similar, para eliminar los restos de trofoectodermo y se sembró y co-cultivó sobre una capa de fibroblastos inactivados con mitomicina C, en medio de cultivo de las células troncales embrionarias humanas (CTEh): ver la composición del medio en el siguiente apartado.

Inner Cell Mass (ICM) was mechanically isolated under estereomicroscope using 2 insulin syringe (25G) at "hatching blastocyst" stage. After several pipetting using a Pasteur pipette, the ICM-containing part was plated onto mitomycin-C inactivated fibroblasts dishes. Media formulation is detailed below.

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).

Soporte celular utilizado fue fibroblastos fetales humanos (American Type Cultura Collection: CRL-2429).

Medio de cultivo: Knockout Dubelcco's modified Eagle's medium supplemented with 2 mM Glutamine (Gibco, Invitrogen corporation), 0.1mM 2-mercaptoethanol (Gibco, Invitrogen corporation), 8 ng/ml basic fibroblasto growth factor (bFGF) (R&D Systems), 1% non-essential amino acids (Gibco, Invitrogen corporation), 20% Knockout Serum Replacement (Gibco, Invitrogen corporation) and 50U/ml-50mg/ml Penicillin-Streptomycin (Gibco, Invitrogen corporation).

Human foreskin from the American Type Cultura Collection: CRL-2429 were used as feeders.

Cell culture Medium used: Knockout Dubelcco's modified Eagle's medium supplemented with 2 mM Glutamine (Gibco, Invitrogen corporation), 0.1mM 2-mercaptoethanol (Gibco, Invitrogen corporation), 8 ng/ml basic fibroblasto growth factor (bFGF) (R&D Systems), 1% non-essential amino acids (Gibco, Invitrogen corporation), 20% Knockout Serum Replacement (Gibco, Invitrogen corporation) and 50U/ml-50mg/ml Penicillin-Streptomycin (Gibco, Invitrogen corporation).

**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)

Las células crecen en colonias y presentan un núcleo predominante (80%) característico de las células troncales embrionarias.

Colony growth and cells with predominant nucleus (80%), characteristics of hESC.

Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)

Microbiological controls carried out (indicate in detail)

El control microbiológico, es una práctica rutinaria que se realiza en la unidad de cultivo de las CTE de CABIMER. Durante los 3 años que llevamos trabajando en esta unidad, nunca se han dado incidencias de contaminación. En cuanto a los controles realizados durante distintas fases del cultivo celular, los ensayos realizados son:

1.- Control de esterilidad: El ensayo de esterilidad se realiza en condiciones asépticas, pero las precauciones tomadas para evitar la contaminación no deben afectar a los microorganismos cuya presencia deba ponerse de manifiesto en el ensayo. Los medios de cultivo para el ensayo son medios comerciales a los que previamente se les ha realizado un control de esterilidad por lote recibido. Los medios utilizados en el ensayo de esterilidad son el caldo de tioglicolato, para la detección de bacterias anaerobias, aunque también permite detectar bacterias aerobias, y el caldo de peptona de caseína y de soja para el cultivo de bacterias aerobias, pero también apropiado para hongos. Las muestras son inoculadas e incubadas durante 14 días a las temperaturas apropiadas para cada medio, se observa el cultivo varias veces durante el periodo de incubación.

2.- Detección de micoplasma: Se ha testado la presencia de micoplasmas en los cultivos de la línea CTEh como de los fibroblastos (HEFs) siguiendo dos protocolos de diferentes casas comerciales.

Por un lado, se utilizó MycoAlert Micoplasma Detection Kit (LONZA), basado en un método bioquímico que detecta la actividad de ciertos enzimas micoplasmáticos mediante luminometría con muestras celulares tras nueve días en cultivo. El resultado fue negativo para ambas muestras.

Por otro lado, se utilizó Venor@GeM (Minerva biolabs), basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), método de elección por su alta sensibilidad en la detección de contaminación por Micoplasma y Acholeplasma en cultivos celulares, con las muestras las mismas muestras tras cinco días en cultivo. De nuevo, el resultado fue negativo para ambas muestras.

The microbiological controls were carried out following the GLP procedures established in the cell culture unit, two tests were performed:

1- Microorganism detection control.

2- Micoplasma detection.

The results were negative

Mantenimiento de la línea: Se realiza un cambio diario de medio
Line maintenance: Cell culture medium was changed every single day

Ratio de pase: El periodo entre pases es 6-7 días
Passage ratio: Passage was carried out each 6-7 days

Método de pase: Los pases se realizan de forma mecánica
Passage method: Passage was carried out each 6-7 days

Xenobióticos **si** **no** ☒
Xenobiotics Yes No

Marcadores: La caracterización de la línea se llevo a cabo a distintos pases (P6-P10 y P40-P50)
Markers: The in Vitro characterization was carried out at different passages (P6-P10 y P40-P50)

	Método (ARN/proteínas)	nº pase	resultado	comentarios
	<i>Method</i>	<i>Passage n.</i>	<i>results</i>	<i>comments</i>
	<i>(RNA/proteins)</i>			
Oct 4	RT-PCR/ Inmunofluorescencia		+	
Nanog	RT-PCR		+	
Rex 1				No realizado
Sox 2	RT-PCR		+	
SSEA3				
SSEA4	Inmunofluorescencia / citometría de flujo		+	
TRA-1-60	Inmunofluorescencia		+	
TRA-1-81	Inmunofluorescencia		+	
Telomerasa	RT-PCR		+	
Fosfatasa Alk.	Kit Tinción – SIGMA ALDRICH®		+	
Cariotipo	Bandas G	P46	46, XY	
Otros / Others	(HLAs RT-PCR)		+	

Capacidad de diferenciación

Differentiation capacity

	Ectodermo/ <i>Ectoderm</i>			Endodermo/ <i>Endoderm</i>			Mesodermo/ <i>Mesoderm</i>		
	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	Isl-1	(P46)	+	α -fetoproteína	(P46)	+	BMP4	(P46)	+
<i>In vitro</i>				Sox17	(P46)	+			

In vivo/ *in vivo*

Método: Inyección intratesticular de CTEh en ratones inmunodeprimidos NOD-SCID Beige

Resultado: teratomas en los que se objetivan los distintos componentes tisulares derivados de las distintas hojas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo.

Se reconoce epitelio plano poliestratificado inmaduro semejante a la epidermis fetal.

Se observa componente neural inmaduro, cartílago, músculo liso y glándulas inmaduras que se asemejan al intestino primitivo.

Method: *injection of undifferentiated hESC into SCID-beige, to generate teratomas.*

Results: *derivatives from the three germ layers were detected.*

Descripción de las características de diferenciación *in Vitro*

Description of the differentiation characteristics in vitro

Para la diferenciación *in vitro* se recurre a la formación de cuerpos embrionarios. La obtención de los cuerpos embrionario humanos se realiza en gota pendiente durante dos días seguida de un cultivo masivo en placas tratadas con gelatina, después de 14 días de cultivo en medio sin FGF se extrae el ARN para detectar la expresión de los marcadores de las 3 capas germinales: (i) ectodermo (ii) mesodermo y (iii) endodermo.

For the in vitro differentiation study, embryoid bodies (EB) were cultured in hanging drop for 2 days in suspension and then transferred onto gelatin-coated dishes and cultured for an additional 10–14 days. Total RNA was extracted for RT-PCR, to assess the expression of markers associated with differentiation of the 3 germ layers.

Datos de la determinación de pluripotencialidad *in vivo* o formación de teratomas

Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation

A las 6-8 semanas de inocular las CTEh indiferenciadas en ratones inmunodeprimidos NOD-SCID Beige, se formaron teratomas. En los teratomas se objetivan los distintos componentes titulares derivados de las distintas hojas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo. Se reconoce epitelio plano poliestratificado inmaduro semejante a la epidermis fetal, componente neural inmaduro, cartílago, músculo liso y glándulas inmaduras que se asemejan al intestino primitivo.

In vivo differentiation studies were carried out by the generation of teratomas via injection of undifferentiated hESC into SCID-beige. 6 to 8 weeks later, the teratomas were processed and the three germ layers (Endoderm, Mesoderm and Ectoderm) derivatives were detected.

Datos de la tipificación HLA

HLA typification data

La línea expresa: HLA-A; HLA-B y HLA-C a nivel de mensajero (RT-PCR)

HLA-A; HLA-B and HLA-C were detect by RT-PCR

Consistencia celular tras 6 pases de congelación y descongelación. Resultados.

Cell consistency after 6 passages of freezing and thawing.

La línea preserva todas sus características de CTEh, tras varios ciclos de congelación/descongelación (> 6 pases).

Cryopreservation of hESC colonies was successfully performed, The thawing and freezing protocol was carried out over 6 passages.

Pase en el momento del registro

Passage at the time of the recording

La línea se encuentra actualmente en el pase P-53.

This human ESC, have reach passage P-53.

¿Ha sido la línea modificada genéticamente?

Has the line been genetically modified?

Sí Yes ☐

No No ☒

Comentarios/ Comments:

¿Se llevó a cabo un análisis clonal?

Has a clonal analysis been carried out?

Sí/ Yes ☐ No ☒

Resultado / Result

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

Listado del personal investigador que ha participado en el proceso:

- 1- Criopreservación y Descongelación de los preembriones y Aislamiento de la ICM:
 - M^a Dolores Lozano Arana (HUVR)
 - Cristina Moya de Alarcón (HUVR)
- 2- Mantenimiento y Caracterización:
 - Yolanda Aguilera García (CABIMER)
 - Nuria mellado Damas (CABIMER)
- 3- Cariotipo
 - Javier Sánchez García (HUVR)
- 4- Diferenciación "in-vivo"
 - Luís Sánchez Palazón (CABIMER)
 - Yolanda Aguilera (CABIMER)
- 5- Análisis histológico
 - José Palacios Calvo (HUVR)

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

N/A.

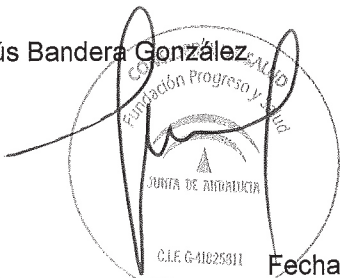
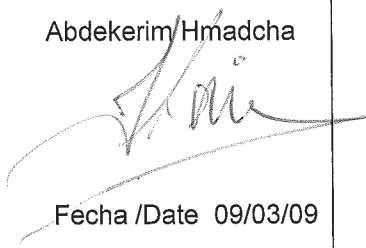
Seguimiento de la línea (a rellenar por el BNLC):
Follow up of the line (to be completed by BNLC)

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) Juan Jesús Bandera González  Fecha/ Date: 09/03/09	Firma del Investigador Principal/ Co- Investigador Principal/ Signature of the Principal Investigator/ Co-investigador Guillermo Antiñolo  Abdekerim Hmadcha  Fecha /Date 09/03/09
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Juan Jesús Bandera González, Director Gerente, Fundación Progreso y Salud	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Avda. Américo Vespucio, nº5 bloque 2º-2º Isla de la Cartuja 41092 Sevilla	Teléfono /Telephone: 955040450 Fax: 955040457 E-mail: juanjesus.bandera@juntadeandalucia.es