

Fecha de recepción (Date received): vv

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: 2/3/2021

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** PI17/01574

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>	PBMC2 -iPS4F8-CBFA2T3-GLIS2
Nº de registro en el Human Pluripotent Stem Cell Registry (1)	GENYOi003-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 <i>Original sample donated.</i> <i>Detail cell type, tissue of origin and anatomic location of the biological sample from which the original line is obtained.</i> <i>If cells are commercial, detail name, reference and trade distributor.</i>	Células mononucleares de sangre periférica (CMSPs). Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs).
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Mujer/woman 45
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO ☒ SÍ ☐ (especificar) No Yes (specify)
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO ☐ SÍ ☐ (especificar) No Yes (specify)

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> 18/05/2015	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 18/05/2015
Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	Medio StemSpan suplementado con la concentración apropiada de citoquinas: hSCF(100 ng/mL), hFLT3L(100 ng/mL), hTPO (20 ng/mL), G-CSF (10 ng/mL), hIL3 (2ng/mL). StemSpan medium supplemented with the appropriate concentration of the cytokines: hSCF(100 ng/mL), hFLT3L(100 ng/mL), hTPO (20 ng/mL), G-CSF (10 ng/mL), hIL3 (2ng/mL).
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>	La identificación celular de la iPS se realizó mediante STR (Short Tandem Repeats). Este mismo análisis se realizó sobre la muestra celular de partida (CMNSPs) confirmando el origen de ambas muestras. Cell identity was achieved by STR (Short Tandem Repeats). Similar analysis was achieved in the original sample (PBMCs) validating the same origin of both samples.
¿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>	Las iPSC fueron generadas con el kit de reprogramación CytoTune®-iPS 2.0 Sendai, es un sistema no integrativo que utiliza vectores del virus Sendai. Este kit incluye tres vectores: policistrónico Klf4-hOct3/4-Sox2, cMyc y Klf4. The iPSC were generated with the CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, is a non-integrating system that uses Sendai virus vectors. This kit includes three vector preparations: polycistronic Klf4-Oct3/4-Sox2, cMyc, and Klf4. Soporte: Fibroblastos humanos irradiados (HFFi). Medio Cultivo: KO-DMEM suplementado con 20% KO Serum Replacement, 1% aminoácidos no esenciales, 1 mM L-glutamina, 0.1 mM β-mercaptoetanol y 8 ng/ml bFGF. Las iPSC fueron mantenidas en HFFi hasta su estabilización y caracterización. Las iPSCs también han sido adaptadas a matrigel (Corning BV) con medio E8. The iPSC were generated with the CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, is a non-integrating system that uses Sendai virus vectors. This kit includes three vector preparations: polycistronic Klf4-Oct3/4-Sox2, cMyc, and Klf4. Support: irradiated human embryonic fibroblasts (HFFi). Culture medium: KO-DMEM supplemented with 20% KO Serum Replacement, 1% non-essential amino acids, 1 mM L-glutamine, 0.1 mM β-mercaptoethanol and 8 ng/ml of bFGF. The iPSC have remained in HFFi until stabilization and characterization. iPSCs have been also adapted to feeder-free cultures on matrigel (Corning BV) with E8 medium.
Condiciones de cultivo de la línea de iPSc generada. (si se describen en publicación, indicar referencia) <i>iPSC Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i>	Se han adaptado a cultivo con medio definido E8, libre de suero, sobre plástico cubierto de Matrigel. Cells are adapted to be cultured in Matrigel-coated plastic using the serum-free, defined media E8.

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>	Células pequeñas y apretados con una alta relación núcleo/citoplasma y un nucléolo prominente, que crecen en colonias circulares con bordes definidos. Small, tightly packed cells with a high nucleus/cytoplasm ratio and prominent nucleoli that grow in circular colonies with defined edges.
Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i>	Las colonias de iPSCs se disgregan usando PBS/0.5mM EDTA, se recogen usando medio E8 y se centrifugan a 1000rpm, 3 minutos. El pellet resultante se resuspende en medio de congelación (Medio E8+10% DMSO), y los viales se congelan lentamente a -80°C usando un "Mr Frosty". Tras un mínimo de 24 horas a -80°C los viales se transfieren a nitrógeno líquido. Para la descongelación, los viales se sumergen en un baño a 37°C, y cuando queda una "perla" de líquido congelado se transfiere rápidamente a un tubo con medio de cultivo E8, se centrifuga a 1000 rpm, 3 minutos. El pellet resultante se resuspende con medio E8 suplementado con 10mM Y-27632 para mejorar la supervivencia celular, y se traspara a un frasco de cultivo con Matrigel. iPSCs colonies are disaggregated using PBS/0.5mM EDTA, harvested with E8 medium and centrifuged at 1000 rpm, 3 minutes. The cellular pellet is then resuspended in freezing medium (E8 medium+10% DMSO), and vials are frozen gradually using a "Mr Frosty" freezing container. After a minimum of 24 hours at -80°C, vials are then transferred to liquid nitrogen. For thawing, vials are submerged in a 37°C water bath and when there is a bead of frozen liquid left, the cells are transferred to a tube with E8 medium and centrifuged at 100rpm, 3 minutes. The pellet is then resuspended in E8 medium supplemented with 10mM Y-27632 to improve cell survival, and transferred to a Matrigel-coated culture flask.
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>	P24+5* (*5 PASES TRAS LA INFECCIÓN CON LOS LENTIVIRUS) P24+5* (*5 PASSAGES AFTER LENTIVIRAL INFECTION)
¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> SÍ Yes ☒ No ☐ Comentarios/ Comments: La línea se ha generado mediante la infección con lentivirus que expresan el oncogen CBFA2T3-GLIS2 (ETO2-GLIS2). The cell line has been generated by infection with lentivirus expressing the CBFA2T3-GLIS2 (ETO2-GLIS2) oncogene.	¿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>	
Se informará de al menos 5 de los siguientes marcadores <i>At least 5 of the following test will be reported</i>	Oct 4	RT-PCR/citometría de flujo	Pase p24+6	Positivo		
	Nanog	RT-PCR	Pase p24+6	Positivo		
	Sox 2	RT-PCR	Pase p24+6	Positivo		
	SSEA3	No realizado				
	SSEA4	Citometría de flujo	Pase p24+6	Positivo		
	TRA-1-60	Citometría de flujo	Pase p24+6	Positivo		
	TRA-1-81	Citometría de flujo	Pase p24+6	Positivo		
	Fosfatasa. Alk Detección actividad enzimática, Pase 24+7, Positivo					
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>	EBs / RT-PCR / PAX6		p24+8	Positivo		
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	EBs / RT-PCR / KDR y Brachury		p24+8	Positivo		
Endodermo <i>Endoderm</i>	EBs / RT-PCR / HNF3alpha		p24+8	Positivo		
Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> <i>(espontánea/inducida)</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i>	Diferenciación expontánea in vitro mediante formación de cuerpos embrionarios (EBs) durante 21 días en medio de cultivo sin bFGF. (p24+8) Spontaneous differentiation in vitro by embryoid bodies (EBs) formation cultured for 21 days in culture medium without bFGF. (p24+8)					

Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i>	<table><tr><th>Comentarios</th><th>Método</th><th>Marcador</th><th>Nº pase</th><th>Resultado</th><th></th></tr><tr><td></td><td><i>Method</i></td><td><i>Marker</i></td><td><i>Passage n</i></td><td><i>Results</i></td><td><i>Comments</i></td></tr><tr><td>Ectodermo <i>Ectoderm</i></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Endodermo <i>Endoderm</i></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	Comentarios	Método	Marcador	Nº pase	Resultado			<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>	<i>Results</i>	<i>Comments</i>	Ectodermo <i>Ectoderm</i>						Mesodermo <i>Mesoderm</i>						Endodermo <i>Endoderm</i>					
Comentarios	Método	Marcador	Nº pase	Resultado																											
	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>	<i>Results</i>	<i>Comments</i>																										
Ectodermo <i>Ectoderm</i>																															
Mesodermo <i>Mesoderm</i>																															
Endodermo <i>Endoderm</i>																															
Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i>	No se ha realizado la generación de teratomas en ratones inmunodeficientes.																														
Cariotipo (especificar fórmula cariotípica en el pase de banqueo) <i>Karyotype (Specify karyotype formula in the passage in which it is banked)</i>	46, XX p15																														
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>	La identificación celular de la iPS transgénica se realizó mediante STR (Short Tandem Repeats), confirmando el mismo origen que la línea de origen. Cell identity was achieved by STR (Short Tandem Repeats) validating the same origin of transgenic iPSC and original iPSC line.																														
Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>	El tipo de reprogramación celular utilizado (CytoTune®-iPS 2.0 Sendai kit) es un método no integrativo. Cell reprogramming used (CytoTune®-iPS 2.0 Sendai kit) is a non-integrating method.																														

Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i>	El test de silenciamiento se realizó mediante RT-PCR según indicaciones del kit CytoTune®-iPS 2.0 Sendai. Este test se realizó durante el proceso de generación y caracterización de la línea iPSC PBMC2-iPS4F8, depositada en BNLC. PBMC2-iPS4F8-CBFA2T3-GLIS2 es una línea transgénica proveniente de PBMC2-iPS4F8. Silencing test was performed by RT-PCR following CytoTune®-iPS 2.0 Sendai kit manufacturer's instructions. Silencing test was performed during PBMC2-iPS4F8 characterization, deposited in BNLC. PBMC2 -iPS4F8-CBFA2T3-GLIS2 is generated from PBMC2 -iPS4F8.
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>	No aplicable
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	Si, negativo Yes, negative

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3 Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Verónica Ramos Mejía, Rosa M ^a Montes Lorenzo	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Avda. de la Ilustración 114, 18016 Granada
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centro Pfizer - Universidad de Granada - Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO)	Teléfono (phone): 958715500 Fax: 958637071 E-mail: veronica.ramos@genyo.es, rosa.montes@genyo.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):

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> Jose Antonio Lorente Fecha/ Date: 2/3/21	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i> Verónica Ramos Mejía Rosa M ^a Montes Lorenzo Fecha /Date 2/3/21
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Director Científico/Scientific Director	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Centro Pfizer - Universidad de Granada - Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO) Avda. de la Ilustración 114, 18016 Granada	Teléfono /Telephone: 958715500 Fax: 958637071 E-mail: veronica.ramos@genyo.es, rosa.montes@genyo.es

(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/>

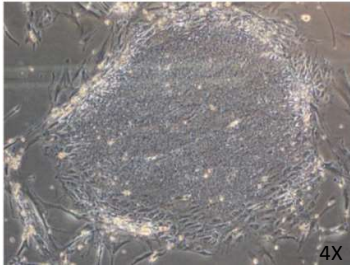
Cree su perfil rellenando el formulario on-line Sign up form. Después de hacer click en Sign up, recibirá el mensaje de confirmación de los datos y se le enviará el correo electrónico de confirmación.

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

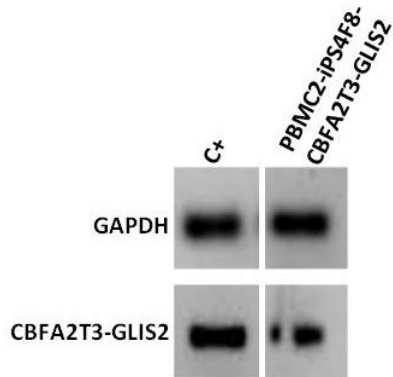
**ANEXO A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR PBMC2-iPS4F8-CBFA2T3-GLIS2
EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES.**

I. MORFOLOGÍA.



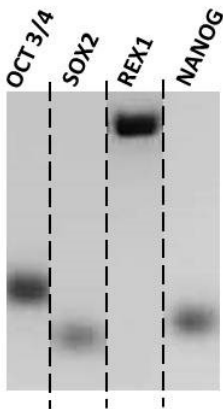
II. EXPRESIÓN CBFA2T3-GLIS2.

A) RT-PCR

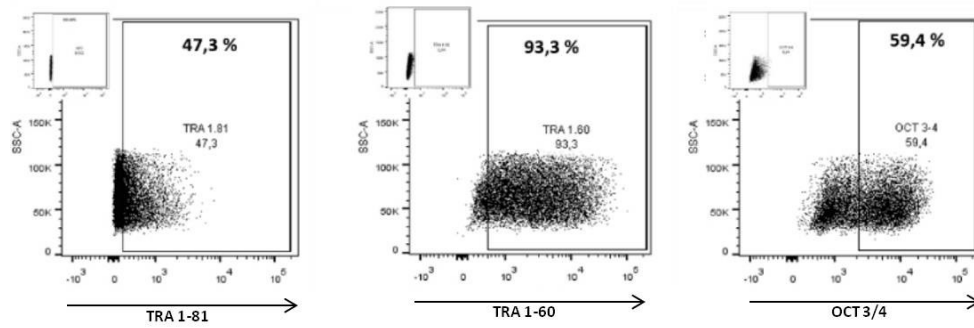


III. TEST DE PLURIPOTENCIA.

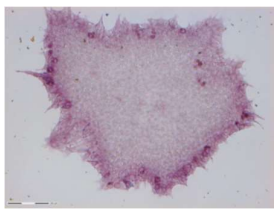
A) RT-PCR



B) CITOMETRÍA DE FLUJO.



C) DETECCIÓN ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE FOSFATASA ALCALINA.

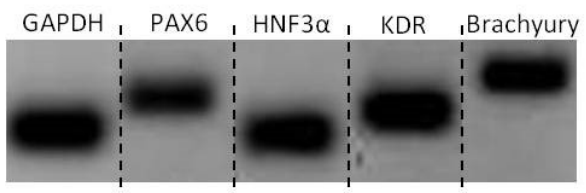


IV. TEST DE DIFERENCIACIÓN IN VITRO:

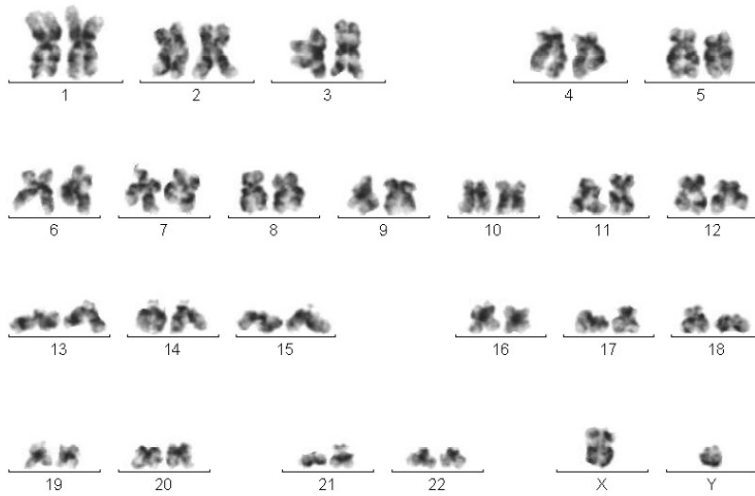
DIFERENCIACIÓN EXPONTÁNEA IN VITRO MEDIANTE FORMACIÓN DE EBs. .



EXPRESIÓN DE GENES DE LAS TRES CAPAS GERMINALES (RT-PCR)



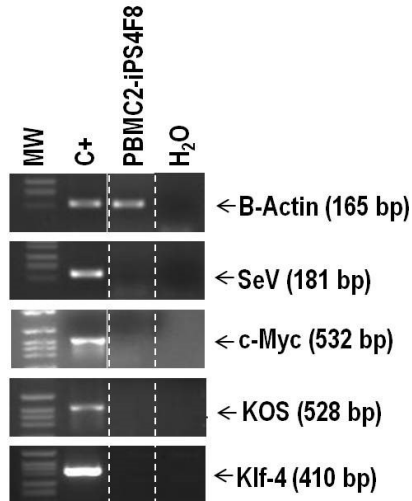
V. CARIOTIPO



VI. RESULTADOS STR.

Marcador	PBMCs de origen	PBMC2-iPS4F8	PBMC2-iPS4F8 CBFA2T3-GLIS2
D21S11	28, 29	28, 29	28, 29
D7S820	8, 12	8, 12	8,12
CSF1PO	10, 11	10.2,11	10,11
THO1	7, 8	7, 8	7,8
D13S317	9, 11	9, 11	9,11
D16S539	11, 13	11, 13	11,13
vWA	17, 18	17, 18	17,18
TPOX	8,8	8, 8	8,8
AMEL	X,X	X, X	X,X
D5S818	9, 11	9, 11	9,11

VII. RESULTADOS TEST DE SILENCIAMIENTO. RT-PCR mostrando el silenciamiento tanto de los genes de reprogramación exógenos como del vector SeV de la línea PBMC2-iPS4F8 (línea origen de la iPS transgénica PBMC2-iPS4F8-CBFA2T3-GLIS2).



VIII. TEST DE MICOPLASMA.



RESULTADO TEST DE MYCOPLASMA

MUESTRAS RECOGIDAS EL 09/11/2020

LÍNEA CELULAR	RESULTADO
PBMC2-iPS4F8-CBFA2T3-GLIS2	NEGATIVO

La detección de contaminación por Mycoplasma se ha realizado mediante qPCR en GENyO mediante el kit comercial Venor GeM-qEP, el cual cumple lo establecido en la monografía de la Farmacopea Europea EP 2.6.7.

La especificidad de detección de este kit se refleja en la siguiente tabla:

Positively tested Mollicutes	Negatively tested		
	EP listed bacteria	Other bacteria	Mammals
<i>Mycoplasma arthritidis</i>	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Varo-B4
<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	Par C6
<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	RK13
<i>Mycoplasma penetrans</i>		<i>Candida albicans</i>	CHO-K1
<i>Mycoplasma salivarium</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	Murine genomic DNA
<i>Ureaplasma urealyticum</i>		<i>Enterobacter aerogenes</i>	Calf thymus DNA
		<i>Escherichia coli</i>	Foetal bovine serum
		<i>Proteus mirabilis</i>	Horse serum
		<i>Burkholderia cepacia</i>	Goat serum

Granada, 10 de noviembre de 2020

CENTRO PÍDEZ-UNIVERSIDAD DE GRANADA-JUNTA DE ANDALUCÍA
DE GENÓMICA E INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA

Unidad de Cultivos Celulares

Responsable técnico, María Muñoz de Escalona Jiménez