

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

Nombre de la línea iPS <i>Name of the iPS line:</i>	B-cell-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).
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>	Células B (CD19+CD20+) obtenidas de cordón umbilical tras Ficoll y separación magnética a alta pureza por CD19 y re-enriquecimiento por FACS para CD20.
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	sangre de cordón umbilical Mujer
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input checked="" type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> (especificar) No Yes (specify)
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO <input checked="" type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> (especificar) No Yes (specify)

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco <input checked="" type="checkbox"/> Crioconservado <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>
Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> Enero 2016	Fecha del uso o descongelación (<i>si congelado</i>) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> se usó fresco
Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	Son células primarias que se obtienen por FICOLL de sangre de cordón umbilical y separación magnética de la fracción CD19. Dada la dificultad de reprogramar células B, se han re-sortado para generar una población 100% pura CD19+CD20. Este segundo enriquecimiento se ha hecho por FACS (VER ANEXO 1).
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>	Las células CD19+CD20+ proceden de un pool de varios cordones umbilicales 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 una célula 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 2).
¿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>	SI. PASE <10.
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> 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
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 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
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>	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 3)

<p>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <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>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></p>	<p>La línea tiene unos 15-18 pases desde su origen.</p>
<p>¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> Sí Yes <input type="checkbox"/> No No <input checked="" type="checkbox"/> Comentarios/ Comments:</p>	<p>¿Se llevó a cabo un análisis clonal? <i>Has a clonal analysis been carried out?</i> Sí/ Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Resultado / Result</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>Test de pluripotencia <i>Pluripotency test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="435 405 587 472"></th> <th data-bbox="587 405 879 472">Método <i>Method</i></th> <th data-bbox="879 405 1054 472">Nº pase <i>Passage n.</i></th> <th data-bbox="1054 405 1214 472">Resultado <i>Results</i></th> <th data-bbox="1214 405 1444 472">Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="435 528 587 573">Oct 4</td> <td data-bbox="587 528 879 573">Inmuno</td> <td data-bbox="879 528 1054 573">12</td> <td data-bbox="1054 528 1214 573">++</td> <td data-bbox="1214 528 1444 573">(VER ANEXO 4)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 595 587 640">Nanog</td> <td data-bbox="587 595 879 640">q-RT-PCR</td> <td data-bbox="879 595 1054 640">12</td> <td data-bbox="1054 595 1214 640">++</td> <td data-bbox="1214 595 1444 640"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 663 587 707">Sox 2</td> <td data-bbox="587 663 879 707">Inmuno</td> <td data-bbox="879 663 1054 707">12</td> <td data-bbox="1054 663 1214 707">++</td> <td data-bbox="1214 663 1444 707"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 730 587 775">SSEA3</td> <td data-bbox="587 730 879 775">FACS</td> <td data-bbox="879 730 1054 775">12</td> <td data-bbox="1054 730 1214 775">++</td> <td data-bbox="1214 730 1444 775"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 797 587 842">SSEA4</td> <td data-bbox="587 797 879 842">FACS</td> <td data-bbox="879 797 1054 842">12</td> <td data-bbox="1054 797 1214 842">++</td> <td data-bbox="1214 797 1444 842"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 864 587 909">TRA-1-60</td> <td data-bbox="587 864 879 909">FACS</td> <td data-bbox="879 864 1054 909">12</td> <td data-bbox="1054 864 1214 909">++</td> <td data-bbox="1214 864 1444 909"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 931 587 976">TRA-1-81</td> <td data-bbox="587 931 879 976">FACS</td> <td data-bbox="879 931 1054 976">12</td> <td data-bbox="1054 931 1214 976">++</td> <td data-bbox="1214 931 1444 976"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 999 587 1043">Fosfatasa. Alk</td> <td data-bbox="587 999 879 1043">Inmuno</td> <td data-bbox="879 999 1054 1043">12</td> <td data-bbox="1054 999 1214 1043">++</td> <td data-bbox="1214 999 1444 1043"></td> </tr> </tbody> </table>		Método <i>Method</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>	Oct 4	Inmuno	12	++	(VER ANEXO 4)	Nanog	q-RT-PCR	12	++		Sox 2	Inmuno	12	++		SSEA3	FACS	12	++		SSEA4	FACS	12	++		TRA-1-60	FACS	12	++		TRA-1-81	FACS	12	++		Fosfatasa. Alk	Inmuno	12	++	
	Método <i>Method</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>																																										
Oct 4	Inmuno	12	++	(VER ANEXO 4)																																										
Nanog	q-RT-PCR	12	++																																											
Sox 2	Inmuno	12	++																																											
SSEA3	FACS	12	++																																											
SSEA4	FACS	12	++																																											
TRA-1-60	FACS	12	++																																											
TRA-1-81	FACS	12	++																																											
Fosfatasa. Alk	Inmuno	12	++																																											
<p>Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="435 1077 587 1167">Comentarios</th> <th data-bbox="587 1077 746 1167">Método <i>Method</i></th> <th data-bbox="746 1077 879 1167">Marcador <i>Marker</i></th> <th data-bbox="879 1077 1054 1167">Nº pase <i>Passage n</i></th> <th data-bbox="1054 1077 1214 1167">Resultado <i>Results</i></th> <th data-bbox="1214 1077 1444 1167">Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="435 1234 587 1301">Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td data-bbox="587 1234 746 1301">Se hace in vivo</td> <td data-bbox="746 1234 879 1301"></td> <td data-bbox="879 1234 1054 1301"></td> <td data-bbox="1054 1234 1214 1301"></td> <td data-bbox="1214 1234 1444 1301"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 1335 587 1447">Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td data-bbox="587 1335 746 1447">Diferenciación a sangre;células CD45+</td> <td data-bbox="746 1335 879 1447">(Chadwick et al.Blood 2003)</td> <td data-bbox="879 1335 1054 1447">(ANEXO 5).</td> <td data-bbox="1054 1335 1214 1447"></td> <td data-bbox="1214 1335 1444 1447"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 1480 587 1547">Endoderm <i>Endoderm</i></td> <td data-bbox="587 1480 746 1547">Se hace in vivo</td> <td data-bbox="746 1480 879 1547"></td> <td data-bbox="879 1480 1054 1547"></td> <td data-bbox="1054 1480 1214 1547"></td> <td data-bbox="1214 1480 1444 1547"></td> </tr> </tbody> </table>	Comentarios	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>	Se hace in vivo					Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Diferenciación a sangre;células CD45+	(Chadwick et al.Blood 2003)	(ANEXO 5).			Endoderm <i>Endoderm</i>	Se hace in vivo																									
Comentarios	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>	Se hace in vivo																																													
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Diferenciación a sangre;células CD45+	(Chadwick et al.Blood 2003)	(ANEXO 5).																																											
Endoderm <i>Endoderm</i>	Se hace in vivo																																													
<p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> <i>(espontánea/inducida)</i></p> <p><i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i></p>	<p>La diferenciación dirigida a sangre como Chadwick K et al Blood 2003 y Giorgetti A et al Exp Hematol 2017 mediante la formación de EBs en presencia de citocinas hematopoiéticas (BMP4, SCF, IL3, IL6, G-CSF)</p>																																													

<p>Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Método <i>Method</i></th> <th>Marcador <i>Marker</i></th> <th>Nº pase <i>Passage n</i></th> <th>Resultado <i>Results</i></th> <th><i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Comentarios <i>Ectoderm</i></td> <td>teratoma</td> <td>beta-III-tubulina</td> <td>p15</td> <td>+</td> <td>(VER ANEXO 6)</td> </tr> <tr> <td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td>teratoma</td> <td>a-sm actina</td> <td>p15</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td>teratoma</td> <td>FOXA2</td> <td>p15</td> <td>+</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	<i>Comments</i>	Comentarios <i>Ectoderm</i>	teratoma	beta-III-tubulina	p15	+	(VER ANEXO 6)	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	teratoma	a-sm actina	p15	+		Endodermo <i>Endoderm</i>	teratoma	FOXA2	p15	+	
	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	<i>Comments</i>																				
Comentarios <i>Ectoderm</i>	teratoma	beta-III-tubulina	p15	+	(VER ANEXO 6)																				
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	teratoma	a-sm actina	p15	+																					
Endodermo <i>Endoderm</i>	teratoma	FOXA2	p15	+																					
<p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <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 (smooth muscle actin), ectodermo (beta-III-tubulina) y endodermo (FOXA2) (VER ANEXO 6).</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>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i></p>	<p>46 XX (VER ANEXO 7)</p>																								
<p>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></p>	<p>Las células CD19+ proceden de un pool de cordones umbilicales 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 2)</p>																								
<p>Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <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 8)</p>																								

<p>Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <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 9)</p>
<p>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></p>	<p>No aplica</p>
<p>Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i></p>	<p>Negativo (VER ANEXO 10)</p>

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE
Section 3 Applicant Details

<p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Pablo Menendez / Clara Bueno</p>	<p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Casanova 143, Facultat medicina, 08008, Barcelona</p>
<p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> IJC, Barcelona</p>	<p>Teléfono (phone): 935572810 Fax: E-mail: 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):

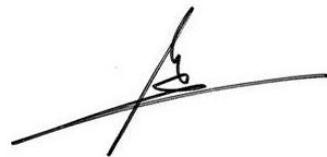
Otras observaciones o información relevantes (a rellenar por el BNLC):
Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

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.

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