

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: 31/07/2015

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>	CBiPS 4F-3a
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 CD133+ de sangre de cordón umbilical CD133+ cells from umbilical cord blood.
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	F 0 años F 0 years
¿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 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> 10. 2010	Fecha del uso o descongelación (<i>si congelado</i>) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 10. 2010
Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	Se pre-estimularon las células de sangre de cordón (CB) CD133+ (1x10 ⁵ cel/ml) durante 24h en DMEM suplementado con 10%FBS en presencia de SCF +Flt3 +TPO +IL-6. Cells from cord blood (CB) CD133 + (1x10 ⁵ cells / ml) were pre-stimulated for 24h in DMEM supplemented with 10% FBS in the presence of SCF + Flt3 + TPO + IL6.
¿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>	Constructos y producción retroviral Constructs and retroviral production Se utilizó el vector policistrónico pMXs-OSKMG para la producción de las partículas retrovirales. La línea celular Phoenix Amphotropic fue transfectada con el vector usando Fugene6 según las instrucciones del fabricante. The polycistronic vector pMXs-OSKMG was used for the production of retroviral particles. Amphotropic cell line Phoenix was transfected with the vector using Fugene6 according to the manufacturer's instructions. Transducción de células CD133+ Transduction CD133 + Se pre-estimularon las células de sangre de cordón umbilical (CB) CD133+ (0,1x10 ⁶ cel/ml) durante 24h en DMEM suplementado con 10%FBS en presencia de SCF +Flt3 +TPO +IL-6. Placas multipocillos fueron recubiertas con retronectina. Se añadió una mezcla filtrada y obtenida mediante la centrifugación de sobrenadante retroviral para el constructo policistrónico OCT4-SOX2-KLF4-c-MYC GFP a 2500 RPM durante 30 min. Se plaquearon alrededor de 80.000 células CD133+ en presencia de DMEM+ FBS al 10% y el cocktail de citoquinas mencionado previamente. Se realizaron 3 ciclos de infección. A día 3, se recogieron las células y se transfirieron a placas de 6 pocillos que contenían fibroblastos humanos irradiados y medio hES. Las CBiPS fueron cultivadas sobre fibroblastos humanos irradiados y pasadas mecánicamente. Cells from cord blood (CB) CD133+ (0,1x10 ⁶ cells/ml) were pre-stimulated for 24h in DMEM supplemented with 10% FBS in the presence of SCF + Flt3 + TPO + IL-6. Multiwell plates were coated with retronectina. A mixture obtained by centrifugation of retroviral supernatant of the polycistronic construct OCT4-SOX2-KLF4 c-MYC-GFP at 2500 RPM for 30 min was filtered and added. About 80,000 CD133+ cells were plated in the presence of DMEM + 10% FBS and the cytokine cocktail mentioned above. 3 cycles of infection were performed. At day 3, the cells were harvested and transferred to 6-well plates containing irradiated human fibroblasts and hES medium. The CBiPS were cultivated on irradiated human fibroblasts and passed mechanically.

<p>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></p>	<p>Support: human foreskin fibroblasts (ATCC, American Type Culture Collection, CCD1112Sk). Culture medium: Knockout Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2 mmol/l GlutaMAX (Gibco, InVitrogen corporation), 0,05mmol/l 2-mercaptoethanol (Gibco, InVitrogen corporation), 10 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Invitrogen), 1% non-essential amino acids (Cambrex), 20% Knockout Serum Replacement (InVitrogen) and 0,5% Penicillin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation).</p> <p>Vitaloni M, Pulecio J, Bilic J, Kebler B, Laricchia-Robbio L, Izpisua Belmonte JC. (2014) MicroRNAs Contribute to Induced Pluripotent Stem Cell Somatic Donor Memory. J. Biol. Chem. 289: 2084-2098.</p>
<p>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></p>	<p>Colonias grandes poligonales, ligeramente aplanadas, de un tamaño entre 1-3mm de diámetro de diversas formas con bordes lisos. Células de tamaño uniforme y una elevada relación núcleo/citoplasma.</p> <p>Large and flat polygonal colonies, with uniformly sized cells of 1-3mm of diameter. They have several forms and smooth edges. High nucleus/cytoplasm ratio.</p>
<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 congelación de los clumps de colonias se realizó en FBS(90%) + DMSO(10%), mediante un congelador programable (-0.5°C/min.) Los viales se descongelaron a 37°C durante 1-2 minutos</p> <p>The clumps of colonies were cryopreserved in FBS(90%)+ DMSO (10%), by a programmable freezer (-0.5°C/min.) Vials were thawed at 37°C for 1-2 minutes.</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>22</p>
<p>¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> Sí Yes <input checked="" type="checkbox"/> No No <input 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> <p>Anexo 1 Annex 1</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>Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Oct 4</td> <td>Inmunocitoquímica</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Nanog</td> <td>Inmunocitoquímica</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sox 2</td> <td>Inmunocitoquímica</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>SSEA3</td> <td>Inmunocitoquímica</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>SSEA4</td> <td>Inmunocitoquímica</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>TRA-1-60</td> <td>Inmunocitoquímica</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>TRA-1-81</td> <td>Inmunocitoquímica</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Fosfatasa. Alk</td> <td>Actividad</td> <td></td> <td>6</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>	Comentarios <i>Comments</i>	Oct 4	Inmunocitoquímica		6	+		Nanog	Inmunocitoquímica		6	+		Sox 2	Inmunocitoquímica		6	+		SSEA3	Inmunocitoquímica		6	+		SSEA4	Inmunocitoquímica		6	+		TRA-1-60	Inmunocitoquímica		6	+		TRA-1-81	Inmunocitoquímica		6	+		Fosfatasa. Alk	Actividad		6	+	
	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>																																																		
Oct 4	Inmunocitoquímica		6	+																																																			
Nanog	Inmunocitoquímica		6	+																																																			
Sox 2	Inmunocitoquímica		6	+																																																			
SSEA3	Inmunocitoquímica		6	+																																																			
SSEA4	Inmunocitoquímica		6	+																																																			
TRA-1-60	Inmunocitoquímica		6	+																																																			
TRA-1-81	Inmunocitoquímica		6	+																																																			
Fosfatasa. Alk	Actividad		6	+																																																			
<p>Test de diferenciación in vitro <i>In vitro 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>Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td>inmunocitoq.</td> <td>Tuj1/ GFAP</td> <td>12</td> <td>+/+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td>inmunocitoq.</td> <td>ASMA</td> <td>12</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Endoderm <i>Endoderm</i></td> <td>inmunocitoq.</td> <td>AFP/FOXA2</td> <td>12</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>	Comentarios <i>Comments</i>	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	inmunocitoq.	Tuj1/ GFAP	12	+/+		Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunocitoq.	ASMA	12	+		Endoderm <i>Endoderm</i>	inmunocitoq.	AFP/FOXA2	12	+/+																															
	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>	inmunocitoq.	Tuj1/ GFAP	12	+/+																																																			
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunocitoq.	ASMA	12	+																																																			
Endoderm <i>Endoderm</i>	inmunocitoq.	AFP/FOXA2	12	+/+																																																			
<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>Mesodermo: cultivo de cuerpos embrioides (EBs) en medio de cultivo suplementado con ácido ascórbico. Endodermo: cultivo de EBs. Ectodermo: cultivo de EBs en medio con N2/B27 sobre células PA6 (Anexo 2).</p> <p>Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture. Ectoderm: EBs culture with N2/B27 on PA6 cells (Annex 2).</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>Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td>inmunocitoq.</td> <td>Tuj1/ GFAP</td> <td></td> <td>+/+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td>inmunocitoq.</td> <td>ASMA/ ASA</td> <td></td> <td>+/+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td>inmunocitoq.</td> <td>AFP / FOXA2</td> <td></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>	Comentarios <i>Comments</i>	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	inmunocitoq.	Tuj1/ GFAP		+/+		Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunocitoq.	ASMA/ ASA		+/+		Endodermo <i>Endoderm</i>	inmunocitoq.	AFP / FOXA2		+/+	
	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>	inmunocitoq.	Tuj1/ GFAP		+/+																					
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunocitoq.	ASMA/ ASA		+/+																					
Endodermo <i>Endoderm</i>	inmunocitoq.	AFP / FOXA2		+/+																					
<p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i></p>	<p>Inyección intratesticular en ratones SCID de 4•10 M de células indiferenciadas y tras 8 semanas, análisis de los teratomas producidos mediante técnicas de inmunohistoquímica para ectodermo, mesodermo y endodermo. (Anexo 3).</p> <p>4·10 M of undifferentiated cells were injected into the testis of SCID mice. Around 8 weeks later, teratomas were analyzed by immunohistochemistry for ectoderm, endoderm and mesoderm (Annex 3).</p>																								
<p>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i></p>	<p>46 XX p24 (Anexo 4) (Anexo 4)</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>Los marcadores de microsatélites se muestran en el Anexo 5.</p> <p>Microsatellites markers are shown in Annex 5.</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 qPCR evidenció la integración de los 4 genes; Oct-4, Sox-2, Klf4, c-Myc (Anexo 6)</p> <p>The integration of the 4 genes; Oct-4, Sox-2, Klf4, c-Myc was shown by qPCR (Annex 6)</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 evidenció el silenciamiento de los 4 genes de reprogramación Oct-4, Sox-2, Klf-4 and c-Myc mediante Q-RT-PCR (Anexo 6)</p> <p>Silencing of reprogramming genes Oct-4, Sox-2, Klf-4 and c-Nyc has been shown by Q-RT-PCR (Annex 6)</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 procede</p> <p>not applicable</p>
<p>Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i></p>	<p>negativo negative Anexo 7 Annex 7</p>

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3 Applicant Details

<p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Anna Veiga Lluch</p>	<p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> CMRB. Dr.Aiguader 88. 08003 Barcelona</p>
<p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB)</p>	<p>Teléfono (phone): 933160360</p> <p>Fax: 933160301</p> <p>E-mail: blc@cmrb.eu</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

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>  Fecha /Date: 31/07/2015 	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i>  Fecha /Date: 31/07/2015
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Margarita Sala Azón  Dr. Aiguader, 88 08003 BARCELONA NIF G-63687222	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona Doctor Aiguader, 88, 7ª planta, 08003, Barcelona	Teléfono /Telephone: 933160303 Fax: 933160301 E-mail: gerencia@cmrb.eu