

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 (una página; formato libre).
A one page CV for the Principal Investigator
- Otros (especificar).
Others (specify)

SECCIÓN 1

Section 1

Información General

General Information

Nombre de la línea: cFA404-KiPS4F1

Name of the line: cFA404-KiPS4F1

Investigador principal: Juan Carlos Izpisúa Belmonte

Principal Investigator:

Origen de la línea celular:

Origin of the cell line

Embrionario **Fetal** **Adulto**
Embryonic *Fetal* *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 **SÍ** (especificar)
No *Yes* *(specify)*

Identificación genética de la línea celular. Método y resultado

Genetic identity of the cell line. Method and result

HLA. Ver Anexo 1

SECCIÓN 2

Section 2

Datos del Depositante

Applicant Details

| | |
|--|---|
| Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Juan Carlos Izpisúa Belmonte | Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Dr. Aiguader 88. 08003 Barcelona |
| Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona | Teléfono (phone): 93 3160300 Fax: 93 3160301 E-mail: com@cmrb.eu |

SECCIÓN 3

Section 3

Datos de la Línea Celular

Details of Cell Line

| | |
|--|--|
| Tipo de muestra biológica (especificar estadio embrionario, semanas de gestación,...) <i>Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...)</i> Queratinocitos de epidermis de un paciente afecto de Anemia de Fanconi. <i>Epidermal keratinocytes from a Fanconi Anemia patient.</i> | |
| Muestra biológica <i>Biological sample</i> <p style="text-align: right;">Fresco <input checked="" type="checkbox"/> Crioconservado <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <input checked="" type="checkbox"/> <i>Cryopreserved</i> <input type="checkbox"/></p> | |
| Fecha de la obtención del muestra biológica <i>Date of obtaining the biological sample</i> Noviembre 2008 | Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> Noviembre 2008 |
| Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> Noviembre 2008 | |

| |
|---|
| Descripción general del procesamiento previo del muestra biológica utilizado (cultivo embrionario, procesamiento muestra fetal o de tejido adulto) <i>General description of the processing of the biological sample used (embryonic culture, processing of fetal sample or of adult tissue)</i> <p>Se derivaron los queratinocitos de epidermis de un paciente afecto de Anemia de Fanconi a partir de una pequeña biopsia en presencia de fibroblastos humanos irradiados en DMEM/Hams-F12 (3:1) suplementados con FBS al 10%, 1 µg ml⁻¹ hidrocortisona, 5 µg ml⁻¹ transferrina, 5 µg ml⁻¹ insulina, 2x10⁻¹¹M liothyronina (todo de Sigma) y 10⁻¹⁰ M toxina de cólera (Quimigen).</p> <p><i>The primary epidermal keratinocytes from a Fanconi Anemia patient were derived from small biopsy explants in the presence of human irradiated fibroblasts in DMEM/Hams-F12 (3:1) supplemented with 10% FBS, 1 µg ml⁻¹ hydrocortisone, 5 µg ml⁻¹ transferrin, 5 µg ml⁻¹ insulin, 2x10⁻¹¹M liothyronine (all from Sigma) and 10⁻¹⁰ M cholera toxin (Quimigen).</i></p> |
|---|

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

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).

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), 8 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Invitrogen), 1% non-essential amino acids (Cambrex), 20% Knockout Serum Replacement (InVitrogen) y 0,5% Penicillin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation).

Mantenimiento de la línea: *Line maintenance*

Ratio de pase: *Passage ratio* 1:2-1:3 cada 6/7 días; 1:2-1:3 every 6/7 days

Método de pase: *Passage method:* mecánico; *mecanichal*

Xenobióticos
Xenobiotics

si
Yes

no
No

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)

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.

Large and flat polygonal colonies, with uniformly sized cells of 1-3 mm of diameter. They have several forms and smooth edges. High nucleus/cytoplasm ratio.

Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)

Microbiological controls carried out (indicate in detail)

Micoplasma negativo
Mycoplasma negative

| Marcadores: <i>Markers</i> | | | | |
|--------------------------------------|---|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| | Método (ARN/proteínas) <i>Method</i> <i>(RNA/proteins)</i> | nº pase <i>Passage n.</i> | resultado <i>results</i> | comentarios <i>comments</i> |
| Oct 4 | inmunofluorescencia | 20 | + | ver Anexo 2 |
| Nanog | inmunofluorescencia | 20 | + | |
| Rex 1 | - | | | |
| Sox 2 | inmunofluorescencia | 20 | + | |
| SSEA3 | inmunofluorescencia | 20 | + | |
| SSEA4 | inmunofluorescencia | 20 | + | |
| TRA-1-60 | inmunofluorescencia | 20 | + | |
| TRA-1-81 | inmunofluorescencia | 20 | + | |
| Telomerasa | | | | |
| Fosfatasa Alk. | Actividad | 20 | + | ver Anexo 2 |
| Cariotipo | | 21 | 46, XY | ver Anexo 3 |
| Otros | | | | |

| Capacidad de diferenciación <i>Differentiation capacity</i> | | | | | | | | | |
|---|---|-------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---|-------------------------------|-----------------------------------|
| | Ectodermo/ Ectoderm | | | Endodermo/Endoderm | | | Mesodermo/ Mesoderm | | |
| | marcador <i>marker</i> | pase <i>passage</i> | resultado <i>result</i> | marcador <i>marker</i> | pase <i>passage</i> | resultado <i>result</i> | marcador <i>marker</i> | pase <i>passage</i> | resultado <i>result</i> |
| In Vitro | Tuj1 | 20 | + | α-feto proteína | 20 | + | α-actinina | 20 | + |
| <i>In vitro</i> | TH | 20 | + | FoxA2 | 20 | + | | | |
| In vivo/ in vivo (<i>ver Anexo 5</i>) | Método: formación de teratomas en ratones SCID <i>Method: teratoma formation in SCID mice</i> | | | | | | Resultado: + <i>Result: +</i> | | |
| | pase/passage 21 | | | | | | | | |

Descripción de las características de diferenciación *in vitro*

Description of the differentiation characteristics in vitro

Mesodermo: cultivo de cuerpos embrioides (EBs) en medio de cultivo suplementado con ácido ascórbico. Endodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio de cultivo. Ectodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio N2/B27.

Mesoderm: Embryoids bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture in culture medium. Ectoderm: EBs culture in N2/B27.

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

Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation

Inyección intratesticular en ratones SCID de clumps de células indiferenciadas. Se realizaron tinciones histológicas estándar con hematoxilina/eosina y a continuación fueron identificados tejidos procedentes de las tres capas germinales. También se realizaron pruebas de inmunohistoquímica para evidenciar la presencia de marcadores de las 3 líneas germinales: ectodermo, endodermo y mesodermo.

Clumps of undifferentiated cells were injected into the testis of SCID mice. Standard histological staining was done with hemotoxilin/eosin and tissues derived from all three germ layer were identified. Immunohistochemistry staining also was performed to show the presence of markers of the three germ lines: ectoderm, endoderm y mesoderm.

Datos de la tipificación HLA

HLA typification data

Ver Anexo 1

See Annex 1

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

Cell consistency after 6 passages of freezing and thawing. Results.

Se observa consistencia celular tras congelación y descongelación con crecimiento adecuado y características de indiferenciación.

Cellular consistency after freezing and thawing, with adequate growth and undifferentiation characteristics.

Pase en el momento del registro

Passage at the time of the recording

43

| | |
|--|--|
| <p>¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i></p> <p>Sí Yes <input checked="" type="checkbox"/> No No <input type="checkbox"/></p> <p>Comentarios/ Comments:</p> <p>Los queratinocitos fueron transducidos con un lentivirus portador del constructo SFFV-FANCA-IRES-EGFP humano. Se ha producido esta línea de iPS usando una infección retroviral para introducir en las células los siguientes factores de transcripción: Oct-4, Sox2, Klf-4 y c-Myc</p> <p>The keratinocytes were transduced using a lentivirus carrying the human SFFV-FANCA-IRES-EGFP cassette. We have produced this iPS cell line using a retroviral infection to deliver into the cells the selected four transcription factors: Oct-4, Sox2, Klf-4 and c-Myc</p> | <p>¿Se llevó a cabo un análisis clonal? <i>Has a clonal analysis been carried out?</i></p> <p>Sí/ Yes <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Resultado / Result +</p> |
|--|--|

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 4

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.

| | |
|---|--|
| <p>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre (Representante legal del Departamento/Centro) (Legal Representative of the Department/Centre)</p> <p>CMR B</p> <p><small>Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona Center of Regenerative Medicine in Barcelona</small></p> <p>Fecha / Date: 03/12/2009</p> | <p>Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i></p> <p></p> <p>Fecha / Date 03/12/2009</p> |
| <p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Miguel Gómez Clares. Presidente de la Junta de Gobierno</p> | |
| <p>Dirección Postal: <i>Postal Address:</i></p> <p>Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona Dr. Aiguader, 88 08003. Barcelona</p> | <p>Teléfono / Telephone: +34 93 316 03 00</p> <p>Fax: +34 93 316 03 01</p> <p>E-mail: com@cmrb.eu</p> |