

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: 10/3/2017

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> | [SWB]FiPS5-R4F-1 |
| 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> | Fibroblastos de dermis procedentes de biopsia de piel. <i>Dermal fibroblasts from skin biopsy.</i> |
| Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i> | Femenino/ Female 15 años/ 15 years |
| ¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i> | NO <input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Williams-Beuren's syndrome <i>No</i> <i>Yes</i> <i>(specify)</i> |
| ¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i> | NO <input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) 7q.11.23 deletion <i>No</i> <i>Yes</i> <i>(specify)</i> |

| | |
|---|---|
| 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> 26.10.2012 | Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 29.10.2014 |
| 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 de cultivo/ Culture media: IMDM + 10%FBS + 0,5% Penicilin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation). 37°C- 5%CO2 |
| 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> | Los marcadores de microsatélites de la muestra inicial de fibroblastos coinciden con los de la línea de iPS generada (Anexo 5) <i>Microsatellite markers of the initial fibroblasts sample are identical than the markers of the iPS line (Annex 5)</i> |
| ¿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, 14 viales en p2. Yes, 14 vials at p2. |
| 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) Specify factors and plasmids used for reprogramming</i> | Generación de las células pluripotenciales inducidas (iPSC) a partir de los fibroblastos de un paciente que presentaba la delección 7q.11.23 mediante la estrategia retroviral con expresión ectópica de 4 factores de transcripción (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc). Mediante el uso de un plásmido retroviral (pMXs OCT4 VP16 SOX2-mOrange) y un constructo tricistrónico (pMXsKLF4 MYCGFP) <i>The induced pluripotent stem cells (iPSC) were generated from fibroblasts of a patient showing 7q.11.23 deletion, by the retroviral strategy with ectopic expression of 4 transcription factors (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc), using the retroviral plasmid (pMXs OCT4 VP16 SOX2-mOrange) and a tricistronic constructor (pMXsKLF4 MYCGFP).</i> |
| 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> | 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) y 0,5% Penicillin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation). Support: Matrigel (Corning BV) Culture medium: mTeSR Basal Medium Kit (StemCell Technologies) |

| | |
|---|--|
| <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- 3 mm de diámetro de diversas formas con bordes lisos. Células de tamaño uniforme y una elevada relación núcleo/citoplasma.</p> <p><i>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.</i></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 ha realizado en FBS(90%) + DMSO(10%), mediante congelador programable (0.5°C/min.) o mediante contenedor de isopropanol a -80°C (-1°C/min.). Los viales se han descongelado a 37°C mediante descongelación rápida.</p> <p><i>The clumps of colonies were cryopreserved in FBS(90%)+ DMSO (10%), by programmable freezer (-0.5°C/min.) or by isopropanol container at -80°C (-1°C/min). Vials were thawed quickly at 37°C.</i></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>p24</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"/></p> <p>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 <i>Annex 1</i></p> | <p>Método <i>Method</i></p> | | <p>Nº pase <i>Passage n.</i></p> | <p>Resultado <i>Results</i></p> | <p>Comentarios <i>Comments</i></p> |
| | <p>Oct 4 inmunocitoq.</p> | | | + | |
| | <p>Nanog inmunocitoq.</p> | | | + | |
| | <p>Sox 2 inmunocitoq.</p> | | | + | |
| | <p>SSEA3 inmunocitoq.</p> | | | + | |
| | <p>SSEA4 inmunocitoq.</p> | | | + | |
| | <p>TRA-1-60 inmunocitoq.</p> | | | + | |
| | <p>TRA-1-81 inmunocitoq.</p> | | | + | |
| | <p>Fosfatasa. Alk inmunocitoq.</p> | | | + | |
| <p>Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i></p> | <p>Método <i>Method</i></p> | <p>Marcador <i>Marker</i></p> | <p>Nº pase <i>Passage n</i></p> | <p>Resultado <i>Results</i></p> | <p>Comentarios <i>Comments</i></p> |
| | <p>Ectodermo <i>Ectoderm</i></p> | <p>inmunocitoq. Tuj1</p> | <p>p24</p> | + | |
| | <p>Mesodermo <i>Mesoderm</i></p> | <p>inmunocitoq. ASMA/ASA</p> | <p>p24</p> | + / + | |
| | <p>Endoderm <i>Endoderm</i></p> | <p>inmunocitoq. AFP/ FOXA2</p> | <p>p24</p> | + / + | |
| <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 cuerpos embrioides. Ectodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio N2/B27 sobre células PA6 (ver Anexo 2).</p> <p><i>Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture. Ectoderm: EBs culture in N2/B27on PA6 cells (see Annex 2).</i></p> | | | | |

| Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i> | <table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="432 152 592 264">Método <i>Method</i></th> <th data-bbox="592 152 751 264">Marcador <i>Marker</i></th> <th data-bbox="751 152 911 264">Nº pase <i>Passage n</i></th> <th data-bbox="911 152 1070 264">Resultado <i>Results</i></th> <th data-bbox="1070 152 1436 264">Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="432 264 592 376">Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td data-bbox="592 264 751 376">inmunohistoq. Tuj1/GFAP</td> <td data-bbox="751 264 911 376">p22</td> <td data-bbox="911 264 1070 376">+/-</td> <td data-bbox="1070 264 1436 376"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="432 376 592 488">Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td data-bbox="592 376 751 488">inmunohistoq. ASMA/ASA</td> <td data-bbox="751 376 911 488">p22</td> <td data-bbox="911 376 1070 488">+/-</td> <td data-bbox="1070 376 1436 488"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="432 488 592 600">Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td data-bbox="592 488 751 600">inmunohistoq. AFP/ FOXA2</td> <td data-bbox="751 488 911 600">p22</td> <td data-bbox="911 488 1070 600">+/-</td> <td data-bbox="1070 488 1436 600"></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> | inmunohistoq. Tuj1/GFAP | p22 | +/- | | Mesodermo <i>Mesoderm</i> | inmunohistoq. ASMA/ASA | p22 | +/- | | Endodermo <i>Endoderm</i> | inmunohistoq. AFP/ FOXA2 | p22 | +/- | |
|---|---|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-----|-----|--|-------------------------------------|------------------------|-----|-----|--|-------------------------------------|--------------------------|-----|-----|--|
| 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> | inmunohistoq. Tuj1/GFAP | p22 | +/- | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mesodermo <i>Mesoderm</i> | inmunohistoq. ASMA/ASA | p22 | +/- | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Endodermo <i>Endoderm</i> | inmunohistoq. AFP/ FOXA2 | p22 | +/- | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i> | <p>Inyección intratesticular en ratones SCID de 4•10 mill 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><i>4•10 mill of undifferentiated cells were injected into the testis of SCID mice. After 8 weeks, teratomas were analyzed by immunohistochemistry for ectoderm, endoderm and mesoderm (Annex 3).</i></p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i> | <p>46 XX, p25 (Anexo4) (Annex 4)</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>Los marcadores de microsatélites de la muestra inicial de fibroblastos coinciden con los de la línea de iPS generada (Anexo 5)</p> <p><i>Microsatellite markers of the initial fibroblasts sample are identical than the markers of the iPS line (Annex 5)</i></p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i> | <p>La PCR evidenció la integración de los 4 genes; Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc. (Anexo 6)</p> <p><i>Integration of the 4 genes; Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc was shown by PCR (Annex 6)</i></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, c-Myc mediante qRT-PCR (Anexo 6)</p> <p><i>Silencing of reprogramming genes Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc has been shown by qRT-PCR (Annex 6)</i></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>Se presenta el detalle de la delección intersticial identificada en la banda 7q11.23 que coincide con la microdelección que se ha descrito en la literatura como causante del Síndrome de Williams-Beuren (Anexo 7).</p> <p><i>Deletion in the band 7q11.23 has shown. This deletion has been described in literature as the cause of William-Beuren Syndrome (Annex 7).</i></p> |
| <p>Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i></p> | <p>Negativo por PCR (Anexo 8)</p> <p><i>Negative by PCR (Annex 8)</i></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 Doctor 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> |

| | |
|--|--|
| <p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Ivón Cuscó Martí</p> | <p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Universitat Pompeu Fabra Doctor Aiguader 88 08003 Barcelona</p> |
| <p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Universitat Pompeu Fabra</p> | <p>Teléfono (phone): 933160855</p> <p>Fax: 933160901</p> <p>E-mail: ivon.cusco@upf.edu</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)

