

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: 12.06.2018

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 FiPS 344-R4F-2
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>	Masculino, 7 Male, 7
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Síndrome de Williams-Beuren <i>No</i> <i>Yes (specify) Williams-Beuren Syndrome</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) Deleción 7q11.23 <i>No</i> <i>Yes (specify) Deletion 7q11.23</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> 10.06.2015	Fecha del uso o descongelación (<i>si congelado</i>) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 11.06.2015
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 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 iPSc generada (Anexo 5) <i>Microsatellite markers of the initial fibroblasts sample are identical than the markers of the iPSc 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, 17 viales en p2 <i>Yes, 17 vials at p2</i>
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 células de pluripotencia inducida (iPSC) a partir de los fibroblastos de un paciente (p3) que presentaba la delección 7q11.23 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 (p3) of a patient showing the 7q11.23 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>iPSc Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i>	Support: human foreskin fibroblasts (ATCC, American Type Culture Collection, CCD112Sk). 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>19 viales congelados entre pases 3-9</p> <p>19 frozen vials at passages 3-9</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</p>	<p>inmunocitoq.</p>	<p>8</p>	<p>+</p>	
	<p>Nanog</p>	<p>inmunocitoq. .</p>	<p>8</p>	<p>+</p>	
	<p>Sox 2</p>	<p>inmunocitoq. .</p>	<p>8</p>	<p>+</p>	
	<p>SSEA3</p>	<p>inmunocitoq. .</p>	<p>8</p>	<p>+</p>	
	<p>SSEA4</p>	<p>inmunocitoq. .</p>	<p>8</p>	<p>+</p>	
	<p>TRA-1-60</p>	<p>inmunocitoq.</p>	<p>8</p>	<p>+</p>	
	<p>TRA-1-81</p>	<p>inmunocitoq. .</p>	<p>8</p>	<p>+</p>	
	<p>Fosfatasa. Alk</p>	<p>actividad.</p>	<p>9</p>	<p>+</p>	
<p>Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i></p>	<p>Comentarios</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>Ectodermo <i>Ectoderm</i></p>	<p>inmunocitoq.</p>	<p>Tuji1</p>	<p>12</p>	<p>+</p>
	<p>Mesodermo <i>Mesoderm</i></p>	<p>inmunocitoq.</p>	<p>ASMA</p>	<p>12</p>	<p>+</p>
	<p>Endoderm <i>Endoderm</i></p>	<p>inmunocitoq.</p>	<p>FOXA2</p>	<p>12</p>	<p>+</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 (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/ (see Annex 2).</i></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>inmunohist.</td> <td>Tuj1-GFAP</td> <td>12</td> <td>+/+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td>inmunohist.</td> <td>ASMA-ASA</td> <td>12</td> <td>+/+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td>inmunohist.</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>	inmunohist.	Tuj1-GFAP	12	+/+		Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunohist.	ASMA-ASA	12	+/+		Endodermo <i>Endoderm</i>	inmunohist.	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>	inmunohist.	Tuj1-GFAP	12	+/+																					
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunohist.	ASMA-ASA	12	+/+																					
Endodermo <i>Endoderm</i>	inmunohist.	AFP-FOXA2	12	+/+																					
	<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>																								
<p>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i></p>	<p>46, XY p9; p15</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 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>																								
<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 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 deleción intersticial identificada en la banda 7q11.23 que coincide con la microdeleción que presenta el paciente y 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 is identical to the one present in the patient and has been described in literature as the cause of William-Beuren Syndrome (Annex 7).</i></p>
<p>Test de micoplasma Mycoplasma Test</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</p>	<p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Gran Via de l'Hospitalet 199. 08908 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona</p>
<p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona</p>	<p>Teléfono (phone): 93 3160360</p> <p>Fax: 93 31603601</p> <p>E-mail: blc@cmrb.eu</p>

<p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Roser Corominas</p>	<p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> C/ Dr.Aiguader 88, lab 720, 08003 Barcelona</p>
<p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Universitat Pompeu Fabra</p>	<p>Teléfono (phone): +34 933 160 821</p> <p>Fax: +34 933 160 901</p> <p>E-mail: rosercorominas@gmail.com</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):


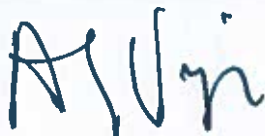
Otras observaciones o información relevantes (a rellenar por el BNLC):
Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

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.

<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>Fecha/Date: 16/05/2018</p>	<p>Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i></p>  <p>Fecha/Date: 16. V. 18</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Angel Raya. Director</p>	
<p>Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Gran Via de l'Hospitalet 199. 08908 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona</p>	<p>Teléfono /Telephone: 93 3160320 Fax: 93 3160301 E-mail: gerencia@cmrb.eu</p>

<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>Fecha/Date:</p>	<p>Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i></p>  <p>18/04/2018 Fecha /Date</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Enric Vallduví Botet. Vicerector. Direcció de projectes en l'àmbit de la Recerca, Universitat Pompeu Fabra</p>	
<p>Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Plaça de la Mercè, 10-12 08002 Barcelona</p>	<p>Teléfono /Telephone: 933160899 Fax: E-mail: vr.recerca@upf.edu</p>