

**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:

**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*

<b>Nombre de la línea iPS</b> <i>Name of the iPS line:</i>	ESi064-A CARS-FiPS4F1
<b>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</b> <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>	Dermal fibroblasts (la parte superior de brazo) Human Skin Biopsy(upper arm)
<b>Sexo y edad del donante.</b> <i>Sex and age of the donor</i>	Female          29
<b>¿El donante tiene alguna patología?</b> <i>Has the donor any pathological condition?</i>	<b>NO</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>SÍ</b> <input type="checkbox"/> (especificar) No                                  Yes                                  (specify)
<b>¿La patología es de origen genético?</b> <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	<b>NO</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>SÍ</b> <input type="checkbox"/> (especificar) Locus: 13q12.12 Mutation: heterozygote c.11374C > T (p.R3792X) No                                  Yes                                  (specify)

<b>Muestra biológica recibida</b> <i>Biological sample</i>	<b>Fresco</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>Crioconservado</b> <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>
<b>Fecha de la donación de la muestra biológica</b> <i>Date of donation of the biological sample</i> 5/2015	<b>Fecha del uso o descongelación</b> <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 11/2015
<b>Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario).</b> <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	DMEM (Invitrogen 21969-035), 2mM Glutamax (Invitrogen #35050-038), 1x Penstrep, 20% FBS (Gibco #10270-106)
<b>Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de las células de origen</b> <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the original cells.</i>	Yes (see Annex)/Si (ver Anexo)
<b>¿Hay disponibilidad de viales congelados de las células de origen? ¿En qué pase?</b> <i>Is there availability of frozen vials of original cells? At what passage?</i>	Yes/Sí Pase 0 Pase 1 Pase 2 Pase 3 Pase 12
<b>Método utilizado en la generación de la línea iPSc. (Integrativa/ No-integrativa) Especificar factores y plásmidos de reprogramación utilizados.</b> <i>Method used for the generation of iPSC line (Integrative / Non-integrative) Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	No integrative method. Sendai virus containing four genes: Oct3/4 Sox2 Klf4 cMyc (CytoTune, Thermo Fisher)
<b>Condiciones de cultivo de la línea de iPSc generada. (si se describen en publicación, indicar referencia)</b> <i>iPS Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i>	Culture on human foreskin feeders. Culture medium: KO DMEM, KSR 20%, Glutamax 2mM, non essential aminoacids 0.1mM, $\beta$ -mercaptoethanol 0.23mM, basic FGF 10ng/mL and peniciline/streptomycine. Cells were mechanically passaged every 6-8 days.  The hiPSCs were adapted to feeder-free cell culture on Matrigel coated plates using mTeSR1 medium
<b>Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo (forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma; otros)</b> <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>	Poligonal colonies 1-2mm diameter large. High nucleus/cytoplasm ratio.

<p><b>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación)</b>  <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i></p>	<p>Criopreservados en contenedor de isopropanol a -80°C y posteriormente en nitrógeno líquido. Descongelación rápida a 37°C.</p> <p>Criopreserved in isopropanol container at -80°C, over night, and stored in liquid nitrogen the next day. Rapid thawing at 37°C</p> <p>- Cultivo sobre fibroblastos: Solution A: 50% hESC medium, 50% KSR; Solution B: 80% hESC medium, 20% DMSO (Sol A:Sol B =1:1)</p> <p>- Cultivo libre de fibroblastos: Congelados en FBS + 10% DMSO</p>
<p><b>Pase de la línea celular en el momento del banqueo/registro. (Máximo: Pase 15)</b>  <i>Passage at the time of the banking/registration (Max: Passage 15)</i></p>	<p>p10(8) feeder free</p>
<p><b>¿Ha sido la línea modificada genéticamente?</b>  <i>Has the line been genetically modified?</i>  <b>Sí Yes</b> <input type="checkbox"/> <b>No No</b> <input checked="" type="checkbox"/></p> <p><b>Comentarios/ Comments:</b></p>	<p><b>¿Se llevó a cabo un análisis clonal?</b>  <i>Has a clonal analysis been carried out?</i>  <b>Sí Yes</b> <input type="checkbox"/> <b>No</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>Resultado / Result</b></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

Test de pluripotencia <i>Pluripotency test</i>	Método <i>Method</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>	
	<b>Oct 4</b> Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry;	RT-PCR, pase/passage 8,+ (ver anexo)			
	<b>Nanog</b> Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry;	RT-PCR, pase/passage 8,+ (ver anexo)			
	<b>Sox 2</b> Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry;	RT-PCR, pase/passage 8,+ (ver anexo)			
	<b>SSEA3</b>				
	<b>SSEA4</b> Inmunocitoquímica/ Immunocytochemistry;	Flow cytometry, pase/passage 8,+ (ver anexo)			
Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i>	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>
	<b>Ectodermo</b> Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry	TUJ-1	pase/passage 8,+ (ver anexo)		<i>Ectoderm</i>
	<b>Mesodermo</b> Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry	SMA/ alphaFP,	pase/passage 8,+ (ver anexo)		<i>Mesoderm</i>
	<b>Endoderm</b> Inmunocitoquímica/Immunocytochemistry	FOXA2			<i>Endoderm</i>
Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> (espontánea/inducida)  <i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i>	<p>In vitro differentiation was performed by EB formation, namely the iPSC colonies were lifted manually and cultured in non-adherent conditions in mTeSR1 medium for 48h. Thereafter, the EBs were seeded on glass coverslips treated with 0,1% gelatin for 2 h/RT and cultured during 2 weeks in EB culture medium:</p> <p>KO DMEM (Invitrogen 10829-018); KO SERUM (final concentration 10%) ; Glutamax final (concentration 1% 2mM); NNEE aminoacids (final concentration 1%, 0,1mM); 2-Mercaptoetanol (final concentration 2,23 mM) Penicilin/Estreptomycin (final concentration 1x)</p> <p>The coverslips were fixed 4% PFA for 15 minutes and analyzed by immunofluorescence. Confocal images were taken by Leica SP8.</p>				

<b>Test de diferenciación in vivo</b> <i>In vivo differentiation test</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="432 136 608 264">Comentarios</th> <th data-bbox="608 136 751 264">Método <i>Method</i></th> <th data-bbox="751 136 895 264">Marcador <i>Marker</i></th> <th data-bbox="895 136 1070 264">Nº pase <i>Passage n</i></th> <th data-bbox="1070 136 1230 264">Resultado <i>Results</i></th> <th data-bbox="1230 136 1449 264">Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="432 264 608 376">Ectodermo / <i>Ectoderm</i></td> <td data-bbox="608 264 751 376"></td> <td data-bbox="751 264 895 376"></td> <td data-bbox="895 264 1070 376"></td> <td data-bbox="1070 264 1230 376"></td> <td data-bbox="1230 264 1449 376"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="432 376 608 488">Mesodermo / <i>Mesoderm</i></td> <td data-bbox="608 376 751 488"></td> <td data-bbox="751 376 895 488"></td> <td data-bbox="895 376 1070 488"></td> <td data-bbox="1070 376 1230 488"></td> <td data-bbox="1230 376 1449 488"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="432 488 608 584">Endodermo / <i>Endoderm</i></td> <td data-bbox="608 488 751 584"></td> <td data-bbox="751 488 895 584"></td> <td data-bbox="895 488 1070 584"></td> <td data-bbox="1070 488 1230 584"></td> <td data-bbox="1230 488 1449 584"></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>						Mesodermo / <i>Mesoderm</i>						Endodermo / <i>Endoderm</i>					
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>																									
Mesodermo / <i>Mesoderm</i>																									
Endodermo / <i>Endoderm</i>																									
<b>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i></b>  <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i>	/																								
<b>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase)</b> <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i>	Cariotipo normal femenino (ver Anexo) p.9 Normal female karyotype (see Annex) p.9  Pase 9																								
<b>Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de la línea celular</b> <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the cell line</i>	Si (ver Anexo) Yes (see Annex)																								
<b>Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular)</b> <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>	Metodo no integrativo Non-integrative method  Sendai Virus																								

<b>Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular)</b> <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i>	RT-PCR (Anexo) RT-PCR (Annex)
<b>Confirmación del diagnóstico genotípico en las iPSC generadas a partir de muestras con mutación genética</b> <i>Confirmation of genotypic diagnosis of the cell line generated from samples with genetic mutation</i>	La presencia de la mutación en la línea de iPSC generada confirmada por secuenciación Sanger (ver Anexo)  The presence of mutation was confirmed by Sanger sequencing (see Annex)
<b>Test de micoplasma</b> <b><i>Mycoplasma Test</i></b>	Negativo (ver Anexo) Negative (see Annex)

### SECCIÓN 3      DATOS DEL DEPOSITANTE

*Section 3      Applicant Details*

<b>Investigador Principal:</b> <i>Principal Investigator:</i> Slaven Erceg Vukicevic	<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal address:</i> Eduardo Primo Yufera 3, Valencia
<b>Centro de Trabajo:</b> <i>Institution:</i> Centro de Investigacion Principe Felipe	<b>Teléfono (phone):</b>  <b>Fax:</b>  <b>E-mail:</b> serceg@cipf.es

**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.*

<b>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre</b> <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i> <i>Legal Representative of the Department/Centre</i>  Fecha / Date:	<b>Firma del Investigador Principal</b> <i>Signature of the Principal Investigator</i> Slaven Erceg Vukicevic  13/2/2019 Fecha /Date
<b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b> <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i>	
<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal Address:</i>	<b>Teléfono /Telephone:</b> <b>Fax:</b> <b>E-mail:</b>