

**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:** 23/06/2015

**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*

<b>Nombre de la línea iPS</b> <i>Name of the iPS line:</i>	[PD]FiPS006-4F-11
<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>	Fibroblastos procedentes del Hôpital de la Pitié-Salpêtrière (CRicm UPMC INSERM UMR-S975) (38785 3895 FPD SAL PAL 125 006), procedentes de un paciente con Enfermedad de Parkinson.  Fibroblasts from Hôpital de la Pitié-Salpêtrière (CRicm UPMC INSERM UMR-S975) (38785 3895 FPD SAL PAL 125 006), from a patient with Parkinson's disease.
<b>Sexo y edad del donante.</b> <i>Sex and age of the donor</i>	Femenino /female                      53
<b>¿El donante tiene alguna patología?</b> <i>Has the donor any pathological condition?</i>	<b>NO</b> <input type="checkbox"/> <b>SÍ</b> <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Parkinson's disease (PD) <i>No</i> <i>Yes</i> <i>(specify)</i>
<b>¿La patología es de origen genético?</b> <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	<b>NO</b> <input type="checkbox"/> <b>SÍ</b> <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) PINK1 Q456Xhom <i>No</i> <i>Yes</i> <i>(specify)</i>

<b>Muestra biológica recibida</b> <i>Biological sample</i>	<b>Fresco</b> <input type="checkbox"/> <b>Crioconservado</b> <input checked="" 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> 05.04.2011	<b>Fecha del uso o descongelación</b> <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 29.04.2011
<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>	Medio de cultivo/ Culture media: IMDM + 10%FBS + 0,5% Penicilin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation).  37°C- 5%CO2
<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>	si, p4-p6  yes, p4-p6
<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)</i> <i>Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	Generación de una línea de células de pluripotencia inducida (iPS) a partir de fibroblastos procedentes de un paciente con PD (PINK1 Q456Xhom) usando una infección retroviral con los siguientes factores de transcripción: Oct-4, Sox2, Klf-4 y c-Myc. Vectores utilizados: pMSCV-FLAG-hOCT4, pMSCV-FLAG-hKLF4, pMSCV-FLAG-hcMyc, pMSCV-FLAG-hSOX2.  Generation of a induced pluripotent stem cell line (iPS) with the fibroblasts from a patient with PD (PINK1 Q456Xhom) using a retroviral infection with the selected transcription factors: Oct-4, Sox2, Klf-4 and c-Myc. Vectors used: pMSCV-FLAG-hOCT4, pMSCV-FLAG-hKLF4, pMSCV-FLAG-hcMyc, pMSCV-FLAG-hSOX2.
<b>Condiciones de cultivo de la línea de iPSc generada. (si se describen en publicación, indicar referencia)</b> <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, 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)
<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>	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.  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.

<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>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 durante unos minutos  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 at 37°C for some minutes.</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>p6-p22</p>
<p><b>¿Ha sido la línea modificada genéticamente?</b>  <i>Has the line been genetically modified?</i>  <b>Sí</b> Yes <input checked="" type="checkbox"/>    <b>No</b> No <input type="checkbox"/>  <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*

<b>Test de pluripotencia</b> <i>Pluripotency test</i>	<b>Método</b> <b>Comentarios</b>	<b>Marcador</b> <i>Marker</i>	<b>Nº pase</b> <i>Passage n.</i>	<b>Resultado</b> <i>Results</i>	<i>Comments</i>
Anexo 1 Annex 1	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n.</i>	<i>Results</i>	<i>Comments</i>
	<b>Oct 4</b>	Inmunocitoq.		+	
	<b>Nanog</b>	Inmunocitoq.		+	
	<b>Sox 2</b>	Inmunocitoq.		+	
	<b>SSEA3</b>	Inmunocitoq.		+	
	<b>SSEA4</b>	Inmunocitoq.		+	
	<b>TRA-1-60</b>	Inmunocitoq.		+	
	<b>TRA-1-81</b>	Inmunocitoq.		+	
	<b>Fosfatasa. Alk</b>	Actividad		+	
<b>Test de diferenciación in vitro</b> <i>In vitro differentiation test</i>	<b>Método</b> <b>Comentarios</b>	<b>Marcador</b> <i>Marker</i>	<b>Nº pase</b> <i>Passage n</i>	<b>Resultado</b> <i>Results</i>	<i>Comments</i>
<i>In vitro differentiation test</i>	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>	<i>Results</i>	<i>Comments</i>
	<b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i>	Inmunocitoq.	Tuj1	+	
	<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>	Inmunocitoq.	GATA4 / AAS	+/+	
	<b>Endoderm</b> <i>Endoderm</i>	Inmunocitoq.	AFP / FOXA2	+/+	
<b>Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> (espontánea/inducida)</b>  <i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i>	<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 (Anexo 2).</p> <p>Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture. Ectoderm: EBs culture in N2/B27on PA6 cells (Annex 2).</p>				

<p><b>Test de diferenciación in vivo</b> <i>In vivo differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="440 152 608 241"><b>Comentarios</b></th> <th data-bbox="608 152 751 241"><b>Método</b> <i>Method</i></th> <th data-bbox="751 152 895 241"><b>Marcador</b> <i>Marker</i></th> <th data-bbox="895 152 1070 241"><b>Nº pase</b> <i>Passage n</i></th> <th data-bbox="1070 152 1442 241"><b>Resultado</b> <i>Results</i></th> <th data-bbox="1442 152 1442 241"><i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="440 241 608 405"><b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="440 405 608 495"><b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="440 495 608 600"><b>Endodermo</b> <i>Endoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	<b>Comentarios</b>	<b>Método</b> <i>Method</i>	<b>Marcador</b> <i>Marker</i>	<b>Nº pase</b> <i>Passage n</i>	<b>Resultado</b> <i>Results</i>	<i>Comments</i>	<b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i>						<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>						<b>Endodermo</b> <i>Endoderm</i>					
<b>Comentarios</b>	<b>Método</b> <i>Method</i>	<b>Marcador</b> <i>Marker</i>	<b>Nº pase</b> <i>Passage n</i>	<b>Resultado</b> <i>Results</i>	<i>Comments</i>																				
<b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i>																									
<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>																									
<b>Endodermo</b> <i>Endoderm</i>																									
<p><b>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i></b> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i></p>																									
<p><b>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase)</b> <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i></p>	<p>46 XX Anexo 3 Annex 3</p>																								
<p><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></p>	<p>Los marcadores de microsatélites de la muestra inicial de fibroblastos coinciden con los de la línea de iPS generada. (Anexo 4)</p> <p>Microsatelites markers of the initial fibroblasts sample are identical than the markers of the iPS line (Annex 4)</p>																								
<p><b>Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular)</b> <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, Klf-4, c-myc. (Anexo 5)</p> <p>Integration of the 4 genes; Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-myc was shown by qPCR (Annex 5)</p>																								

<p><b>Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular)</b>  <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. (Anexo 5)</p> <p>Silencing of reprogramming genes Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc has been shown (Annex 5)</p>
<p><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></p>	<p>La línea de iPSC generada presenta la mutación Q456Xham en el gen PINK1, que también presentan los fibroblastos de los que procede (Anexo 6)</p> <p>The iPSC line shows the Q456Xham mutation in PINK1 as the fibroblasts from origin (Annex 6)</p>
<p><b>Test de micoplasma Mycoplasma Test</b></p>	<p>Negativo por PCR (Anexo 7)</p> <p>Negative by PCR (Annex 7)</p>

### SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

*Section 3 Applicant Details*

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

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> (Representante legal del Departamento/Centro) Legal Representative of the Department/Centre  Fecha / Date: 23/06/2015	<b>Firma del Investigador Principal</b> Signature of the Principal Investigator  Fecha /Date 23/06/2015
<b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b> Name and Position of the Person Representing the Centre: Margarita Sala Azón, Gerente 	
<b>Dirección Postal:</b> Postal Address: Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona Doctor Aiguader, 88, 7ª planta, 08003, Barcelona	<b>Teléfono /Telephone:</b> 933160303 <b>Fax:</b> 933160301 <b>E-mail:</b> gerencia@cmrb.eu