

# 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: 31/07/2015

### 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>	CBiPS 4F-10
<b>Muestra original donada.</b> <b>Detallar tipo de célula, tejido de origen y localización anatómica de la muestra biológica de la que se obtiene la línea original.</b> <b>Si son células comerciales, detallar nombre, referencia y distribuidor comercial</b> <i>Original sample donated.</i> <i>Detail cell type, tissue of origin and anatomic location of the biological sample from which the original line is obtained.</i> <i>If cells are commercial, detail name, reference and trade distributor.</i>	Células CD133+ de sangre de cordón umbilical  CD133+ cells from umbilical cord blood.
<b>Sexo y edad del donante.</b> <i>Sex and age of the donor</i>	F      0 años  F      0 years
<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) <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 type="checkbox"/> (especificar) <i>No</i> <i>Yes</i> <i>(specify)</i>

<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> 10. 2010	<b>Fecha del uso o descongelación</b> <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 10.2010
<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>	Se pre-estimularon las células de sangre de cordón (CB) CD133+ (0,1x10 M cel/ml) durante 24h en DMEM suplementado con 10%FBS en presencia de SCF +Flt3 +TPO +IL-6.  Cells from cord blood (CB) CD133 + (0,1x10 M cells/ml) were pre-stimulated for 24 h in DMEM supplemented with 10% FBS in the presence of SCF + Flt3 + TPO + IL-6.
<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>	no
<b>Método utilizado en la generación de la línea iPSc. (Integrativa/ No-integrativa)</b> <b>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>	Constructos y producción retroviral Constructs and retroviral production  Se utilizó el vector policistrónico pMXs-OSKMG para la producción de las partículas retrovirales. La línea celular Phoenix Amphotropic fue transfectada con el vector usando Fugene6 según las instrucciones del fabricante.  The polycistronic vector pMXs-OSKMG was used for the production of retroviral particles. Amphphotropic cell line Phoenix was transfected with the vector using Fugene6 according to the manufacturer's instructions.  Transducción de células CD133+ Transduction CD133 +  Se pre-estimularon las células de sangre de cordón (CB) CD133+ (0,1x10 M cel/ml) durante 24h en DMEM suplementado con 10%FBS en presencia de SCF +Flt3 +TPO +IL-6. Placas multipocillos fueron recubiertas con retronectina. Se añadió una mezcla filtrada y obtenida mediante la centrifugación de sobrenadante retroviral para el constructo policistrónico OCT4-SOX2-KLF4-c-MYC GFP a 2500 RPM durante 30 min. Se plaquearon alrededor de 80.000 células CD133+ en presencia de DMEM+ FBS al 10% y el cocktail de citoquinas mencionado previamente. Se realizaron 3 ciclos de infección. A día 3, se recogieron las células y se transfirieron a placas de 6 pocillos que contenían fibroblastos humanos irradiados y medio hES. Las CBiPS fueron cultivadas sobre fibroblastos humanos irradiados y pasadas mecánicamente.  Cells from cord blood (CB) CD133+ (0,1x10 M cells/ml) were pre-stimulated for 24 h in DMEM supplemented with 10% FBS in the presence of SCF + Flt3 + TPO + IL-6. Multiwell plates were coated with retronectina. A mixture obtained by centrifugation of retroviral supernatant of the polycistronic construct OCT4-SOX2-KLF4 c-MYC-GFP at 2500 RPM for 30 min was filtered and added. About 80,000 CD133+ cells were plated in the presence of DMEM + 10% FBS and the cytokine cocktail mentioned above. Three cycles of infection were performed. At day 3, the cells were harvested and transferred to 6-well plates containing irradiated human fibroblasts and hES medium. The CBiPS were cultivated on irradiated human fibroblasts and passed mechanically.

<p><b>Condiciones de cultivo de la línea de iPSc generada.</b> <b>(si se describen en publicación, indicar referencia)</b> <i>iPS Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i></p>	<p>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) and 0,5% Penicillin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation).</p> <p>Vitaloni M, Pulecio J, Bilic J, Kebler B, Laricchia-Robbio L, Izpisua Belmonte JC. (2014) MicroRNAs Contribute to Induced Pluripotent Stem Cell Somatic Donor Memory. J. Biol. Chem. 289: 2084-2098.</p>
<p><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></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>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>
<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 realizó en FBS(90%) + DMSO(10%), mediante un congelador programable (-0.5°C/min.). Los viales se descongelaron a 37°C durante 1-2 minutos</p> <p>The clumps of colonies were cryopreserved in FBS(90%)+ DMSO (10%), by a programmable freezer (0.5°C/min.). Vials were thawed at 37°C for 1-2 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>22</p>
<p><b>¿Ha sido la línea modificada genéticamente?</b> <i>Has the line been genetically modified?</i> Sí Yes <input checked="" type="checkbox"/> No 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> Sí/ Yes <input type="checkbox"/> No <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*

<p><b>Test de pluripotencia</b> <i>Pluripotency test</i></p> <p>Anexo 1 Annex 1</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th><b>Método</b> <i>Method</i></th> <th><b>Marcador</b> <i>Marker</i></th> <th><b>Nº pase</b> <i>Passage n.</i></th> <th><b>Resultado</b> <i>Results</i></th> <th><b>Comentarios</b> <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>Oct 4</b></td> <td>Inmunocitoquímica</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>Nanog</b></td> <td>Inmunocitoquímica</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>Sox 2</b></td> <td>Inmunocitoquímica</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>SSEA3</b></td> <td>Inmunocitoquímica</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>SSEA4</b></td> <td>Inmunocitoquímica</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>TRA-1-60</b></td> <td>Inmunocitoquímica</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>TRA-1-81</b></td> <td>Inmunocitoquímica</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>Fosfatasa. Alk</b></td> <td>Actividad</td> <td></td> <td>6</td> <td>+</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		<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>	<b>Comentarios</b> <i>Comments</i>	<b>Oct 4</b>	Inmunocitoquímica		6	+		<b>Nanog</b>	Inmunocitoquímica		6	+		<b>Sox 2</b>	Inmunocitoquímica		6	+		<b>SSEA3</b>	Inmunocitoquímica		6	+		<b>SSEA4</b>	Inmunocitoquímica		6	+		<b>TRA-1-60</b>	Inmunocitoquímica		6	+		<b>TRA-1-81</b>	Inmunocitoquímica		6	+		<b>Fosfatasa. Alk</b>	Actividad		6	+	
	<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>	<b>Comentarios</b> <i>Comments</i>																																																		
<b>Oct 4</b>	Inmunocitoquímica		6	+																																																			
<b>Nanog</b>	Inmunocitoquímica		6	+																																																			
<b>Sox 2</b>	Inmunocitoquímica		6	+																																																			
<b>SSEA3</b>	Inmunocitoquímica		6	+																																																			
<b>SSEA4</b>	Inmunocitoquímica		6	+																																																			
<b>TRA-1-60</b>	Inmunocitoquímica		6	+																																																			
<b>TRA-1-81</b>	Inmunocitoquímica		6	+																																																			
<b>Fosfatasa. Alk</b>	Actividad		6	+																																																			
<p><b>Test de diferenciación in vitro</b> <i>In vitro differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th><b>Método</b> <i>Method</i></th> <th><b>Marcador</b> <i>Marker</i></th> <th><b>Nº pase</b> <i>Passage n</i></th> <th><b>Resultado</b> <i>Results</i></th> <th><b>Comentarios</b> <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i></td> <td>inmunocitoq.</td> <td>Tuj1/ GFAP</td> <td>12</td> <td>+/+</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i></td> <td>inmunocitoq.</td> <td>ASMA</td> <td>12</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>Endoderm</b> <i>Endoderm</i></td> <td>inmunocitoq.</td> <td>AFP/FOXA2</td> <td>12</td> <td>+/+</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		<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>	<b>Comentarios</b> <i>Comments</i>	<b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i>	inmunocitoq.	Tuj1/ GFAP	12	+/+		<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>	inmunocitoq.	ASMA	12	+		<b>Endoderm</b> <i>Endoderm</i>	inmunocitoq.	AFP/FOXA2	12	+/+																															
	<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>	<b>Comentarios</b> <i>Comments</i>																																																		
<b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i>	inmunocitoq.	Tuj1/ GFAP	12	+/+																																																			
<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>	inmunocitoq.	ASMA	12	+																																																			
<b>Endoderm</b> <i>Endoderm</i>	inmunocitoq.	AFP/FOXA2	12	+/+																																																			
<p><b>Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i></b> <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 EBs. Ectodermo: cultivo de EBs en medio con 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 with 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></th> <th>Método</th> <th>Marcador</th> <th>Nº pase</th> <th>Resultado</th> <th></th> </tr> <tr> <th>Comentarios</th> <th>Method</th> <th>Marker</th> <th>Passage n</th> <th>Results</th> <th>Comments</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i></td> <td>inmunohistoq.</td> <td>Tuj1/ GFAP</td> <td></td> <td>+/+</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i></td> <td>inmunohistoq.</td> <td>ASMA/ ASA</td> <td></td> <td>+/+</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>Endodermo</b> <i>Endoderm</i></td> <td>inmunohistoq.</td> <td>AFP / FOXA2</td> <td></td> <td>+/+</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Método	Marcador	Nº pase	Resultado		Comentarios	Method	Marker	Passage n	Results	Comments	<b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i>	inmunohistoq.	Tuj1/ GFAP		+/+		<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>	inmunohistoq.	ASMA/ ASA		+/+		<b>Endodermo</b> <i>Endoderm</i>	inmunohistoq.	AFP / FOXA2		+/+	
	Método	Marcador	Nº pase	Resultado																											
Comentarios	Method	Marker	Passage n	Results	Comments																										
<b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i>	inmunohistoq.	Tuj1/ GFAP		+/+																											
<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>	inmunohistoq.	ASMA/ ASA		+/+																											
<b>Endodermo</b> <i>Endoderm</i>	inmunohistoq.	AFP / FOXA2		+/+																											
<p><b>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i></b> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i></p>	<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>4-10 mill of undifferentiated cells were injected into the testis of SCID mice. Around 8 weeks later, teratomas were analyzed by immunohistochemistry for ectoderm, endoderm and mesoderm (Annex 3).</p>																														
<p><b>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase)</b> <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i></p>	<p>46 XX p9 Anexo 4 Annex 4</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 se muestran en el Anexo 5.</p> <p>Mycrosatelites markers are shown in Annex 5.</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, Klf4, c-Myc (Anexo 6)</p> <p>The integration of the 4 genes; Oct-4, Sox-2, Klf4, c-Myc was shown. (Annex 6)</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 and c-Myc mediante Q-RT-PCR. (Anexo 6)</p> <p>Silencing of reprogramming genes Oct-4, Sox-2, Klf-4 and c-Myc has been shown by Q-RT-PCR (Annex 6)</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>no procede</p> <p>not applicable</p>
<p><b>Test de micoplasma</b>  <b><i>Mycoplasma Test</i></b></p>	<p>negativo  negative  Anexo 7  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. Dr.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

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.*

<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: 31/07/2015	<b>Firma del Investigador Principal</b> Signature of the Principal Investigator  Fecha /Date 31/07/2015
<b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b> Name and Position of the Person Representing the Centre: Margarita Sala Azón 	
<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