

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 a human iPS cell line

FECHA: 7/11/2016

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>	[UCiPS] Ctri5-R4F-25
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.</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 procedentes de orina. Urine cells.
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Femenino, 58 años Female, 58 years
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> (especificar) No Yes (specify)
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> (especificar) No Yes (specify)

Documento de Solicitud de registro y depósito de una línea iPS humana. Versión Enero 2015

Página 1 de 8

Los apartados que requieran entrada de texto, deben rellenarse tanto en castellano como en inglés
Text items should be filled in both Spanish and English

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i>	Crioconservado <input type="checkbox"/> <i>Cryopreserved</i>
Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 24.02.2016	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 17.03.2016	
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 Urine cell medium: REB medium (Lonza CC3191) supplemented with REGM (Lonza CC4127)	
¿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>	7 viales x p2 9 viales x p3 7 vials x p2 9 vials x p3	
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 células procedentes de orina de un donante, 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 urine cells from a donor, by the retroviral strategy with ectopic expression of 4 transcription factors (Oct4, Sox2, Klf4 and 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, CCD1122Sk). 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)	
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>	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. <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>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. <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>P12</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></p> <p>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

Test de pluripotencia <i>Pluripotency test</i>	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>
Anexo Annex 1	Oct 4	inmunocitoq.	10	+	
	Nanog	inmunocitoq.	10	+	
	Sox 2	inmunocitoq.	10	+	
	SSEA3	inmunocitoq.	10	+	
	SSEA4	inmunocitoq.	10	+	
	TRA-1-60	inmunocitoq.	10	+	
	TRA-1-81	inmunocitoq.	10	+	
	Fosfatasa. Alk actividad		3	+	
Test de diferenciación <i>in vitro</i> <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>
Ectodermo <i>Ectoderm</i>	inmunohist.	TUJ1	10	+	
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunohist.	AAS/ASMA	10	+/+	
Endodermo <i>Endoderm</i>	inmunohist.	AFP/FOXA2	10	+/+	
Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> (espontánea/inducida) <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 (ver Anexo 2).</p> <p>Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture Ectoderm: EBs culture in N2/B27 (see Annex 2).</p>				

Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="746 208 847 271">Método <i>Method</i></th> <th data-bbox="874 208 1002 271">Marcador <i>Marker</i></th> <th data-bbox="1029 208 1157 271">Nº pase <i>Passage n</i></th> <th data-bbox="1168 208 1295 271">Resultado <i>Results</i></th> <th data-bbox="1307 208 1476 271">Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="587 300 730 362">Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="587 392 742 454">Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="587 483 738 546">Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td></td> <td></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>					Mesodermo <i>Mesoderm</i>					Endodermo <i>Endoderm</i>				
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>																					
Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i>																					
Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i>	46,XX p7, p15 (Anexo 3/ Annex 3)																				
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 las células de orina de la muestra inicial coinciden con los de la línea de iPS generada. (Anexo 4)</p> <p>Microsatellite markers of the initial urine cells are identical than the markers of the iPS line (Annex 4)</p>																				
Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>	<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>																				

Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i>	Se evidenció el silenciamiento de los 4 genes de reprogramación: Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc mediante qRT-PCR (Anexo 5) Silencing of reprogramming genes Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc has been shown by qRT-PCR (Annex 5)
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>	No procede <i>Not required</i>
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	Negativo por PCR (Anexo 6) <i>Negative by PCR (Annex 6)</i>

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE
Section 3 Applicant Details

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

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.

Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre (Representante legal del Departamento/Centro) (Legal Representative of the Department/Centre)  Fecha/Date: 7/11/2016	Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator  Fecha/Date: 7/11/2016
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Name and Position of the Person Representing the Centre: Ángel Raya Chamorro, Director Dr. Aiguader, 88 08003 BARCELONA NIF G-63687222	
Dirección Postal: Postal Address: Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona Doctor Aiguader, 88, 7ª planta, 08003, Barcelona	Teléfono /Telephone: 933160303 Fax: 933160301 E-mail: gerencia@cmrb.eu