

**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:** 10 Febrero 2017

**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>	PH1-hFib4F-3.23 (PH1-Fib-hiPSC4F1 in the paper)
<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>	Fibroblastos de piel  Skin fibroblasts
<b>Sexo y edad del donante.</b> <i>Sex and age of the donor</i>	Hombre/Male      37 años
<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) Hiperoxaluria primaria de tipo I <i>No</i> <i>Yes</i> <i>(specify)</i> <i>Primary Hyperoxaluria Type I</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) Mutacion I244T en el gen AGXT <i>No</i> <i>Yes</i> <i>(specify)</i> <i>Mutacion I244T en el gen AGXT</i> <i>I244T mutation in AGXT gene</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> 05.10.2015	<b>Fecha del uso o descongelación</b> <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 13.10.2015
<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>	Los fibroblastos se cultivaron en DMEM 10% FBS, 50U/ml de penicilina, 50ug/ml de estreptomycin, 1mM de L-Glutamina y 1% aminoácidos no esenciales  Fibroblasts were cultured in DMEM 10%FBS, 50 U/ml penicillin, 50ug/ml streptomycin, 1mM L-Glutamine and 1% non essential aminoacids.
<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, p5  Yes, p5
<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> Specify factors and plasmids used for reprogramming	Las iPSc fueron generadas con el kit de reprogramación CytoTune®-iPS 2.0 Sendai, un sistema no integrativo que utiliza vectores del virus Sendai. Este kit incluye tres vectores: policistrónico Klf4-hOct3/4-Sox2, cMyc y Klf4.  The iPSC were generated with the CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, a non-integrating system that uses Sendai virus vectors. This kit includes three vector preparations: polycistronic Klf4-Oct3/4-Sox2, cMyc, and Klf4.
<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>	Soporte: Fibroblastos embrionarios de ratón irradiados (iMEFs). Medio Cultivo: KO-DMEM suplementado con 20% KO Serum Replacement, 1% aminoácidos no esenciales, 50U/ml de penicilina, 50ug/ml de estreptomycin, 1 mM L-glutamina, 0.1 mM β-mercaptoetanol y 5 ng/ml bFGF.  Support: Irradiated mouse embryonic fibroblasts (iMEFs). Culture medium: KO-DMEM supplemented with 20% KO Serum Replacement, 1% non-essential amino acids, 50 U/ml penicillin, 50ug/ml streptomycin, 1 mM L-glutamine, 0.1 mM β-mercaptoethanol and 5 ng/ml of bFGF.
<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>	Típicas colonias redondeadas con bordes bien definidos. Células con elevada relación entre núcleo/citoplasma. (Ver anexo 1)  Typical rounded colonies with well defined borders. High nucleus/cytoplasm ratio. (See annex 1)

<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>Congelación: Las colonias de iPSCs son crio-conservadas en medio de congelación (45% FBS, 45% KSR y 10% DMSO). La congelación se realiza gradualmente utilizando Mr Frostie a -80C.  Descongelación: La descongelación se realiza de modo rápido en un baño a 37C. Cuando está casi descongelada, se añade medio de cultivo, se centrifuga y las células se ponen en cultivo con medio correspondiente.</p> <p>Freezing: iPSCs colonies are crio-conserved in freezing media (45% FBS, 45% KSR and 10% DMSO). Freezing process takes place gradually using Mr Frosties to -80C.  Thawing: Thawing process takes place in a fast manner in a bath at 37C. When the solution is almost thawed, pre-warmed medium is added, centrifuged and cells are cultivated in the appropriate medium.</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>Passage 15</p>
<p><b>¿Ha sido la línea modificada genéticamente?</b>  <i>Has the line been genetically modified?</i>  <b>Sí</b> Yes <input type="checkbox"/> <b>No</b> No <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

<b>Test de pluripotencia</b> <i>Pluripotency test</i>	<b>Comentarios</b> <i>Comments</i>	<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>Oct 4</b> <b>Nanog</b> <b>Sox 2</b> <b>SSEA3</b> <b>SSEA4</b> <b>TRA-1-60</b> <b>TRA-1-81</b> <b>Fosfatasa. Alk</b>	qPCR and IF (p10) / Positivo / Anexo qPCR and IF (p10) / Positivo / Anexo qPCR and IF (p10) / Positivo / Anexo citometria (p15) / Positivo / Anexo citometria (p15) / Positivo / Anexo citometria (p15) / Positivo / Anexo IF (p10) / Positivo / Anexo Deteccion actividad enzimatica (p6) / positivo				
<b>Test de diferenciación in vitro</b> <i>In vitro differentiation test</i>	<b>Comentarios</b> <i>Comments</i>	<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>Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i></b> <i>(espontánea/inducida)</i>  <i>Description of the differentiation characteristics in vitro</i> <i>(spontaneous/induced)</i>	N/A					

<b>Test de diferenciación in vivo</b> <i>In vivo differentiation test</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="442 152 603 241"></th> <th data-bbox="603 152 762 241">Método</th> <th data-bbox="762 152 922 241">Marcador</th> <th data-bbox="922 152 1082 241">Nº pase</th> <th data-bbox="1082 152 1444 241">Resultado</th> </tr> <tr> <th data-bbox="442 241 603 309"><b>Comentarios</b></th> <th data-bbox="603 241 762 309"><i>Method</i></th> <th data-bbox="762 241 922 309"><i>Marker</i></th> <th data-bbox="922 241 1082 309"><i>Passage n</i></th> <th data-bbox="1082 241 1444 309"><i>Results</i></th> </tr> <tr> <th data-bbox="442 309 603 376"></th> <th data-bbox="603 309 762 376"></th> <th data-bbox="762 309 922 376"></th> <th data-bbox="922 309 1082 376"></th> <th data-bbox="1082 309 1444 376"><i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="442 376 603 510"><b>Ectodermo</b></td> <td data-bbox="603 376 762 510">H&amp;E staining in teratoma</td> <td data-bbox="762 376 922 510"></td> <td data-bbox="922 376 1082 510"></td> <td data-bbox="1082 376 1444 510"><i>Ectoderm</i></td> </tr> <tr> <td data-bbox="442 510 603 600"><b>Mesodermo</b></td> <td data-bbox="603 510 762 600">H&amp;E staining in teratoma</td> <td data-bbox="762 510 922 600"></td> <td data-bbox="922 510 1082 600"></td> <td data-bbox="1082 510 1444 600"><i>Mesoderm</i></td> </tr> <tr> <td data-bbox="442 600 603 689"><b>Endodermo</b></td> <td data-bbox="603 600 762 689">H&amp;E staining in teratoma</td> <td data-bbox="762 600 922 689"></td> <td data-bbox="922 600 1082 689"></td> <td data-bbox="1082 600 1444 689"><i>Endoderm</i></td> </tr> </tbody> </table>		Método	Marcador	Nº pase	Resultado	<b>Comentarios</b>	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>	<i>Results</i>					<i>Comments</i>	<b>Ectodermo</b>	H&E staining in teratoma			<i>Ectoderm</i>	<b>Mesodermo</b>	H&E staining in teratoma			<i>Mesoderm</i>	<b>Endodermo</b>	H&E staining in teratoma			<i>Endoderm</i>
	Método	Marcador	Nº pase	Resultado																											
<b>Comentarios</b>	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>	<i>Results</i>																											
				<i>Comments</i>																											
<b>Ectodermo</b>	H&E staining in teratoma			<i>Ectoderm</i>																											
<b>Mesodermo</b>	H&E staining in teratoma			<i>Mesoderm</i>																											
<b>Endodermo</b>	H&E staining in teratoma			<i>Endoderm</i>																											
<b>Descripción de las características de diferenciación <u>in vivo</u></b> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i>	<p>Las colonias de iPS fueron inyectadas cubcutaneamente en ratones Rag2-/-gc-/- . Una vez formado el teratoma se extrajo, fijó, y se realize un análisis histológico. Se observe una diferenciación espontánea hacia las tres capas embrionarias.</p> <p>iPS colonies were subcutaneously injected into Rag2-/-gc-/- mice. When teratoma appeared, it was extracted, fixed and the histological analysis performed. Spontaneous differentiation to the three germ layers. Was observed.</p>																														
<b>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase)</b> <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i>	<p>46XY, normal</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>Ralizado, Anexo</p> <p>Performed, Annex</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>No aplicable</p> <p>Not applicable</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>El test de silenciamiento de los transgenes de SeV utilizados para la reprogramación se realizó según indicaciones del kit de reprogramación CytoTune®-iPS 2.0 Sendai mediante RT-PCR (Anexo).</p> <p>SeV transgenes silencing test was made following CytoTune®-iPS 2.0 Sendai reprogramming kit instructions by RT-PCR (Annex).</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>Genotipado mediante secuenciación de la mutación</p> <p>Genotyping by mutation sequencing</p>
<p><b>Test de micoplasma</b> <i>Mycoplasma Test</i></p>	<p>Test de Mycoplasma negativo determinado por PCR.</p> <p>Mycoplasma test negative as determined by PCR.</p>

### SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

*Section 3 Applicant Details*

<p><b>Investigador Principal:</b> <i>Principal Investigator:</i></p> <p>Felipe Prosper Cardoso / Juan R. Rodriguez Madoz</p>	<p><b>Dirección Postal:</b> <i>Postal address:</i></p> <p>Edificio CIMA. PIO XII 55, 31008, Pamplona, Navarra</p>
<p><b>Centro de Trabajo:</b> <i>Institution:</i></p> <p>Centro de Investigación Médica Aplicada Center for Applied Medical Research</p>	<p><b>Teléfono (phone):</b> +34948194700</p> <p><b>Fax:</b> +34948194714</p> <p><b>E-mail:</b> fprosper@unav.es / jrrodriguez@unav.es</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> <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i> <i>Legal Representative of the Department/Centre)</i> D. Javier Mata Rodríguez  Fecha/ Date: 10.02.2017	<b>Firma del Investigador Principal</b> <i>Signature of the Principal Investigator</i> Dr. Felipe Prosper Cardoso  Fecha /Date 10.02.2017
<b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b> <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> D. Javier Mata Rodríguez. Gerente. Centro de Investigación Médica Aplicada	
<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal Address:</i> Edificio CIMA. PIO XII 55. 31008. Pamplona, Navarra	<b>Teléfono /Telephone:</b> +34948194700 <b>Fax:</b> +34948194714 <b>E-mail:</b> jmata@unav.es