

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

Nombre de la línea iPS <i>Name of the iPS line:</i>	PH1-hPBMC4F-2.4 (PH1-PBMCs-hiPSC4F1 in the paper)
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 mononucleares de sangre periférica (CMSPs) Peropheral blood mononuclear cells (PBMCs)
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Hombre/Male 37 años
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <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>
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <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>

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco <input type="checkbox"/> Crioconservado <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>
Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 01.09.2015	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 21.09.2015
Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	Las células mononucleares se descongelaron en DMEM 2% FBS, 50U/ml de penicilina, 50ug/ml de estreptomycin, 1mM de L-Glutamina Mononuclear cells were thawed in DMEM 2%FBS, 50 U/ml penicillin, 50ug/ml streptomycin, 1mM L-Glutamine
¿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>	No No
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)</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.
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>	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.
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>	Típicas colonias redondeadas con bordes bien definidos. Células con elevada relación entre núcleo/citoplasma. (Ver anexo) Typical rounded colonies with well defined borders. High nucleus/cytoplasm ratio. (See annex)

<p>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <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>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>passage 15</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> 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>	Comentarios <i>Comments</i>	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	<i>Comments</i>
	Oct 4 Nanog Sox 2 SSEA3 SSEA4 TRA-1-60 TRA-1-81 Fosfatasa. Alk	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				
Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i>	Comentarios <i>Comments</i>	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	<i>Comments</i>
Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> <i>(espontánea/inducida)</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vitro</i> <i>(spontaneous/induced)</i>	N/A					

Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="435 152 603 246"></th> <th data-bbox="603 152 762 246">Método</th> <th data-bbox="762 152 922 246">Marcador</th> <th data-bbox="922 152 1082 246">Nº pase</th> <th data-bbox="1082 152 1444 246">Resultado</th> </tr> <tr> <th data-bbox="435 246 603 291">Comentarios</th> <th data-bbox="603 246 762 291"><i>Method</i></th> <th data-bbox="762 246 922 291"><i>Marker</i></th> <th data-bbox="922 246 1082 291"><i>Passage n</i></th> <th data-bbox="1082 246 1444 291"><i>Results</i></th> </tr> <tr> <th data-bbox="435 291 603 336"></th> <th data-bbox="603 291 762 336"></th> <th data-bbox="762 291 922 336"></th> <th data-bbox="922 291 1082 336"></th> <th data-bbox="1082 291 1444 336"><i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="435 336 603 403">Ectodermo</td> <td data-bbox="603 336 762 403">H&E staining in teratoma</td> <td data-bbox="762 336 922 403"></td> <td data-bbox="922 336 1082 403"></td> <td data-bbox="1082 336 1444 403"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 403 603 448"><i>Ectoderm</i></td> <td data-bbox="603 403 762 448"></td> <td data-bbox="762 403 922 448"></td> <td data-bbox="922 403 1082 448"></td> <td data-bbox="1082 403 1444 448"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 448 603 515">Mesodermo</td> <td data-bbox="603 448 762 515">H&E staining in teratoma</td> <td data-bbox="762 448 922 515"></td> <td data-bbox="922 448 1082 515"></td> <td data-bbox="1082 448 1444 515"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 515 603 582"><i>Mesoderm</i></td> <td data-bbox="603 515 762 582"></td> <td data-bbox="762 515 922 582"></td> <td data-bbox="922 515 1082 582"></td> <td data-bbox="1082 515 1444 582"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 582 603 649">Endodermo</td> <td data-bbox="603 582 762 649">H&E staining in teratoma</td> <td data-bbox="762 582 922 649"></td> <td data-bbox="922 582 1082 649"></td> <td data-bbox="1082 582 1444 649"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 649 603 716"><i>Endoderm</i></td> <td data-bbox="603 649 762 716"></td> <td data-bbox="762 649 922 716"></td> <td data-bbox="922 649 1082 716"></td> <td data-bbox="1082 649 1444 716"></td> </tr> </tbody> </table>		Método	Marcador	Nº pase	Resultado	Comentarios	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>	<i>Results</i>					<i>Comments</i>	Ectodermo	H&E staining in teratoma				<i>Ectoderm</i>					Mesodermo	H&E staining in teratoma				<i>Mesoderm</i>					Endodermo	H&E staining in teratoma				<i>Endoderm</i>				
	Método	Marcador	Nº pase	Resultado																																										
Comentarios	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>	<i>Results</i>																																										
				<i>Comments</i>																																										
Ectodermo	H&E staining in teratoma																																													
<i>Ectoderm</i>																																														
Mesodermo	H&E staining in teratoma																																													
<i>Mesoderm</i>																																														
Endodermo	H&E staining in teratoma																																													
<i>Endoderm</i>																																														
Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <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 realice 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>																																													
Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i>	<p>46XY, normal</p>																																													
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>Ralizado, Anexo</p> <p>Performed, Annex</p>																																													
Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>	<p>No aplicable</p> <p>Not applicable</p>																																													

<p>Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <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>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></p>	<p>Genotipado mediante secuenciación de la mutación</p> <p>Genotyping by mutation sequencing</p>
<p>Test de micoplasma <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>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Felipe Prosper Cardoso / Juan R. Rodriguez Madoz</p>	<p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Edificio CIMA. PIO XII 55, 31008, Pamplona, Navarra</p>
<p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centro de Investigación Médica Aplicada Center for Applied Medical Research</p>	<p>Teléfono (phone): +34948194700</p> <p>Fax: +34948194714</p> <p>E-mail: 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

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.

Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i> <i>Legal Representative of the Department/Centre</i> D. Javier Mata Rodríguez  Fecha/ Date: 10.02.2017	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i> Dr. Felipe Prósper Cardoso  Fecha /Date 10.02.2017
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> D. Javier Mata Rodríguez. Gerente. Centro de Investigación Médica Aplicada	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Edificio CIMA. PIO XII 55. 31008. Pamplona, Navarra	Teléfono /Telephone: +34948194700 Fax: +34948194714 E-mail: jmata@unav.es