

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: 14 de marzo de 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>	RP1-FiPS4F1	
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>	Fibroblastos derivados de la biopsia de piel. Fibroblasts derived from skin biopsy.	
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Hombre 45 años	Male 45 years
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO ☐ SÍ ☒ (especificar) Retinosis pigmentaria / Retinitis pigmentosa No Yes (specify)	
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO ☐ SÍ ☒ (especificar) Homocigosis / Homozygous MERTK c.992_993delCA (p.Ser331Cysfs*5) No Yes (specify)	

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco ☒ <i>Fresh</i> Crioconservado ☐ <i>Cryopreserved</i>
Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i>	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 2 de junio 2011/ June 2, 2011
Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	DMEM (Invitrogen 21969-035), 2mM Glutamax (Invitrogen #35050-038), 1x Penstrep (Invitrogen #15140-163), 20% FBS (Gibco #10270-106).
¿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) Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	Cytotune iPS reprogramming kit (metodo no integrativo/ non-integrative method) SeV virus: Klf4, Oct4, Sox2, c-Myc.
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>	Cultivo sobre fibroblastos humanos del prepucio. Medio de cultivo KO DMEM, KSR 20%, Glutamax 2mM, aminoácidos no esenciales 0.1mM, β-mercaptoethanol 0.23mM, basic FGF 10ng/mL, and peniciline/streptomycine. Pase manual cada 6-8 días. Lukovic et al., Sci Rep. 2015, Aug 11;5:12910. Culture on human foreskin feeders. Culture medium: KO DMEM, KSR 20%, Glutamax 2mM, non essential aminoacids 0.1mM, β-mercaptoethanol 0.23mM, basic FGF 10ng/mL and peniciline/streptomycine. Cells were mechanically passaged every 6-8 days. Lukovic et al., Sci Rep. 2015 Aug 11;5:12910.
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 poligonales 1-2mm en diámetro, alto ratio núcleo/citoplasma. Polygonal colonies 1-2mm diameter large, high nucleus/cytoplasm ratio.
Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i>	Solution A: 50% hESC + 50% KSR; Solution B: 80% hESC 20% KSR + 20% DMSO (Sol A:Sol B =1:1). Criopreservados en contenedor de isopropanol a -80°C y posteriormente en nitrógeno líquido. Descongelación rápida a 37°C. Cryopreserved in isopropanol container at -80°C, over night, and stored in liquid nitrogen the next day. Rapid thawing at 37°C.

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>	15
¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> Sí Yes ☐ No No ☒ Comentarios/ Comments:	¿Se llevó a cabo un análisis clonal? <i>Has a clonal analysis been carried out?</i> Sí/ Yes ☐ No ☒ Resultado / Result

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> Ver Anexo/ See Annex	Método	Marcador	Nº pase	Resultado	
	Comentarios <i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n.</i>	<i>Results</i>	<i>Comments</i>
	Oct 4	Inmunocitoquímica	+	6	
	Nanog	Inmunocitoquímica	+	6	
	Sox 2	Inmunocitoquímica	+	6	
	SSEA3	Inmunocitoquímica	+	6	
	SSEA4	Inmunocitoquímica	+	6	
	TRA-1-60	Inmunocitoquímica	+	6	
	TRA-1-81	Inmunocitoquímica	+	6	
	Fosfatasa. Alk AP	ensayo de actividad	+	6	
Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i>	Método	Marcador	Nº pase	Resultado	
	Comentarios <i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>	<i>Results</i>	<i>Comments</i>
	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	EBs, inmunocitoquímica	EPR , 8	+ (See Annex)	
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>				
	Endodermo <i>Endoderm</i>				
Descripción de las características de diferenciación <u>in vitro</u> <i>(espontánea/inducida)</i> Description of the differentiation characteristics in vitro <i>(spontaneous/induced)</i>	Ensayo de formación de cuerpos embrionarios (EBs), mediante la privación de bFGF en condiciones no adherentes, excisión de zonas pigmentadas y enriquecimiento, posterior cultivo en condiciones adherentes.				
	EB formation assay by withdrawal of bFGF and culture in nonadherent conditions, excision of pigmented areas and enrichment, posterior culture in adherent conditions				

Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i>	<table><tr><th></th><th>Método</th><th>Marcador</th><th>Nº pase</th><th>Resultado</th></tr><tr><th>Comentarios</th><th>Method</th><th>Marker</th><th>Passage n</th><th>Results</th><th>Comments</th></tr><tr><td>Ectodermo <i>Ectoderm</i></td><td colspan="4">Análisis histológico: neuroepitelio, retina p.7-12 + (Anexo)</td></tr><tr><td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td><td colspan="4">Análisis histológico, cartilago, hueso, musculo, tejido adiposo +</td></tr><tr><td>Endodermo <i>Endoderm</i></td><td colspan="4">Análisis histológico: epitelio de intestino p.7-12 + (Anexo)</td></tr></table>		Método	Marcador	Nº pase	Resultado	Comentarios	Method	Marker	Passage n	Results	Comments	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	Análisis histológico: neuroepitelio, retina p.7-12 + (Anexo)				Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Análisis histológico, cartilago, hueso, musculo, tejido adiposo +				Endodermo <i>Endoderm</i>	Análisis histológico: epitelio de intestino p.7-12 + (Anexo)			
	Método	Marcador	Nº pase	Resultado																							
Comentarios	Method	Marker	Passage n	Results	Comments																						
Ectodermo <i>Ectoderm</i>	Análisis histológico: neuroepitelio, retina p.7-12 + (Anexo)																										
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Análisis histológico, cartilago, hueso, musculo, tejido adiposo +																										
Endodermo <i>Endoderm</i>	Análisis histológico: epitelio de intestino p.7-12 + (Anexo)																										
Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i>	Colonias iPS resuspendidas en medio de cultivo se inyectan subcutáneamente en la espalda de ratón SCID. Tras 8 semanas se forman teratomas de 1cm de diametro, que se analizan mediante los cortes histologicos teñidos con hematoxilina y eosina. IPS colonies resuspended in culture medium are injected subcutaneously in SCID mice. After 8 weeks teratomas are formed of 1cm of diameter, excised, fixed and stained by HE.																										
Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i>	Banda G 46, XY pase 6 / G band 46 XY, pasage 6 Ver Anexo. See Annex.																										
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>	Si/Yes . Ver Anexo/ See Annex. STR Markers: D19S572,D2S2159, D17S1533, D14S972, D8S601,D9S1853,D8S1179, D18S51, D2S1338,TH01,D16S539,D19S433,vWA,D21S11																										
Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>	No aplica/ Does not apply																										

Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i>	Detección de los transgenes introducidos por SeV en el genoma celular Detection of transgenes introduced by SeV in reprogrammed cells' genome RT-PCR (Ver anexo) / RT-PCR (See Annex)
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>	Sí, secuenciación dirigida (Anexo) / Yes, directed sequencing (Annex)
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	Negativo (Ensayo de actividad enzimática de Mycoplasma) / negative (Mycoplasma enzymes activity assay)

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3 Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Dr. Slaven Erceg Vukicevic	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> c/ Eduardo Primo Yúfera 3, Valencia 46012
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> FCV Centro de Investigación Príncipe Felipe	Teléfono (phone): ++963289680 Fax: E-mail: serceg@cipf.es

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):

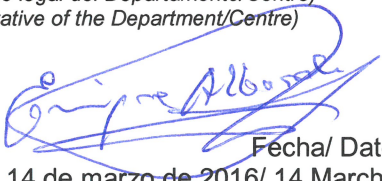
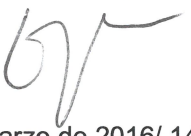
Otras observaciones o información relevantes (a rellenar por el BNLC):
Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

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: 14 de marzo de 2016/ 14 March, 2016	Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator Dr. Slaven Erceg Vukicevic  Fecha /Date 14 marzo de 2016/ 14 March, 2016
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Name and Position of the Person Representing the Centre: Prof. Don. Enrique Alborch Domínguez 	
Dirección Postal: Postal Address: FCV Centro de Investigación Príncipe Felipe C/ D' Eduardo Primo Yúfera, 3 46012 Valencia	Teléfono /Telephone: +34963289680 Fax: E-mail: serceg@cipf.es