

**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:** 23.01.2019

**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 from 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>	CT PBiPS1-Sv4F-1				
<b>Muestra original donada.</b> 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 mononucleadas de sangre periférica  <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>				
<b>Sexo y edad del donante.</b> <i>Sex and age of the donor</i>	Masculino, 7 años		Male, 7 years		
<b>¿El donante tiene alguna patología?</b> <i>Has the donor any pathological condition?</i>	<input type="checkbox"/> <b>NO</b> No		<input checked="" type="checkbox"/> <b>SÍ</b> Yes		(especificar) <i>Cardiotoxicidad a las antraciclinas</i> <i>Cardiac toxicity to anthracyclines</i>
<b>¿La patología es de origen genético?</b> <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	<input type="checkbox"/> <b>NO</b> No		<input checked="" type="checkbox"/> <b>SÍ</b> Yes		(especificar) <i>(specify)</i>

<b>Muestra biológica recibida</b> <i>Biological sample</i>	<b>Fresco</b> <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i>	<b>Crioconservado</b> <input type="checkbox"/> <i>Cryopreserved</i>
<b>Fecha de la donación de la muestra biológica</b> <i>Date of donation of the biological sample</i> 7.06.2018	<b>Fecha del uso o descongelación (si congelado)</b> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 7.06.2018	
<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>	Medio de cultivo/ Culture media: RPMI + 10%FBS + 0,5% Penicilin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation). 37°C- 5%CO2	
<b>Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de las células de origen</b> <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the original cells.</i>	Los marcadores de microsatélites de la muestra inicial coinciden con los de la línea de iPS generada (Anexo 5)  <i>Microsatellite markers of the initial sample are identical to the markers of the iPS line (Annex 5)</i>	
<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>	Generación de las células de pluripotencia inducida (iPSC) a partir de células mononucleadas de sangre periférica de un paciente que presenta cardiotoxicidad a las antraciclinas, 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.  <i>The induced pluripotent stem cells (iPSC) were generated from Peripheral Blood Mononuclear Cells from a patient showing cardiotoxicity to anthracyclines, 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.</i>	
<b>Condiciones de cultivo de la línea de iPSc generada. (si se describen en publicación, indicar referencia)</b> <i>iPSC Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i>	Support: human foreskin fibroblasts (ATCC, American Type Culture Collection, CCL1112Sk). 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)	

<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 aplanas, 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><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>
<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 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.</p> <p><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><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>p12-15</p>
<p><b>¿Ha sido la línea modificada genéticamente?</b>  <i>Has the line been genetically modified?</i></p> <p>Sí Yes <input type="checkbox"/> 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></p> <p>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*

<b>Test de pluripotencia</b> <i>Pluripotency test</i>	<b>Método</b> <i>Method</i>	<b>Nº pase</b> <i>Passage n.</i>	<b>Resultado</b> <i>Results</i>	<b>Comentarios</b> <i>Comments</i>
Anexo 1 <i>Annex 1</i>	<b>Oct 4</b> inmunocitoq.	14	+	
	<b>Nanog</b> inmunocitoq.	14	+	
	<b>Sox 2</b> inmunocitoq.	14	+	
	<b>SSEA3</b> inmunocitoq.	14	+	
	<b>SSEA4</b> inmunocitoq.	14	+	
	<b>TRA-1-60</b> inmunocitoq.	14	+	
	<b>TRA-1-81</b> inmunocitoq.	14	+	
	<b>Fosfatasa. Alk</b> actividad	15	+	
<b>Test de diferenciación in vitro</b> <i>In vitro differentiation test</i>	<b>Comentarios</b> <i>Method</i>	<b>Método</b> <i>Marker</i>	<b>Nº pase</b> <i>Passage n</i>	<b>Resultado</b> <i>Results</i>
	<b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i>	inmunocitoq. Tuj1, GFAP	14	+/+
	<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>	inmunocitoq. ASMA, ASA	14	+/+
	<b>Endoderm</b> <i>Endoderm</i>	inmunocitoq. AFP, FOXA2	14	+/+
<b>Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i></b> <i>(espontánea/inducida)</i>  <i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i>	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).  Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture. Ectoderm: EBs culture in N2/B27medium (see Annex 2).			

<b>Test de diferenciación in vivo</b> <i>In vivo differentiation test</i>	<b>Comentarios</b> <i>Method</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>	<b>Comments</b> <i>Comments</i>
	<b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i>	inmunohist.	NeFi, GFAP	19	+/-	
	<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>	inmunohist.	ASMA, ASA	19	+/-	
	<b>Endodermo</b> <i>Endoderm</i>	inmunohist.	AFP, FOXA2	19	+/-	
<b>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i></b> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i>		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).  <i>4·10 mill of undifferentiated cells were injected into the testis of SCID mice. After 8 weeks, teratomas were analyzed by immunohistochemistry for ectoderm, endoderm and mesoderm (Annex 3).</i>				
<b>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase)</b> <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i>		46, XY; p12, p16				
<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>		Los marcadores de microsatélites de la muestra inicial coinciden con los de la línea de iPS generada (Anexo 5)  <i>Microsatellite markers of the initial sample are identical to the markers of the iPS line (Annex 5)</i>				
<b>Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular)</b> <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>		No procede, debido a que se trata un método no-integrativo  <i>Not applicable, due to non-integrating reprogramming methodology.</i>				

<b>Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular)</b> <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i>	El análisis mediante RT-PCR mostró la ausencia de mRNA derivado de virus Sendai en la línea de iPSC y la presencia de mRNA derivado de virus Sendai en células control tras 1 semana de transducción (Anexo 6).  <i>The RT-PCR showed absence of Sendai virus derived mRNAs in iPSCs and presence of Sendai virus derived mRNAs in virus transduced control cells 1 week after transduction (Annex 6).</i>
<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>	No procede  <i>Not applicable</i>
<b>Test de micoplasma</b> <b>Mycoplasma Test</b>	Negativo por PCR (Anexo 8)  <i>Negative by PCR (Annex 8)</i>

### SECCIÓN 3

*Section 3*

### DATOS DEL DEPOSITANTE

*Applicant Details*

<b>Investigador Principal:</b> <i>Principal Investigator:</i> Pilar Sepúlveda	<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal address:</i>
<b>Centro de Trabajo:</b> <i>Institution:</i>	<b>Teléfono (phone):</b>  <b>Fax:</b>  <b>E-mail:</b>

<b>Investigador Principal:</b> <i>Principal Investigator:</i> Anna Veiga Lluch	<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal address:</i> Hospital Duran i Reynals. Gran Via de l'Hospitalet 199. 08908. Hospitalet de Llobregat. Barcelona
<b>Centro de Trabajo:</b> <i>Institution:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB)	<b>Teléfono (phone):</b> 93 3160360  <b>Fax:</b>  <b>E-mail:</b> blc@cmrb.eu

**SECCIÓN 4**  
*Section 4*

**INFORMACIÓN ADICIONAL (OPCIONAL)**  
*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):

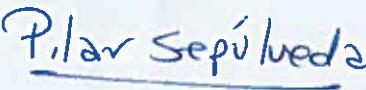
**Otras observaciones o información relevantes** (a llenar por el BNLC):  
Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

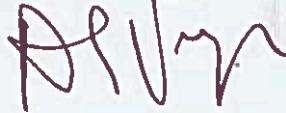
**Seguimiento de la línea** (a llenar por el BNLC):  
Follow up of the line (to be completed by BNLC)

## 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>  Fecha/ Date:	<b>Firma del Investigador Principal</b> <i>Signature of the Principal Investigator</i>   28.01.2019 Fecha /Date
<b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b> <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Javier Burgos Muñoz. Director gerente.	
<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal Address:</i> Avenida Fernando Abril Martorell, 106, Torre A, 7 <sup>a</sup> planta, 46026, Valencia. España	<b>Teléfono /Telephone:</b> 96 124 66 02 <b>Fax:</b> <b>E-mail:</b>  javier.burgos@listade.es

<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>   Fecha/ Date: 20/02/2019	<b>Firma del Investigador Principal</b> <i>Signature of the Principal Investigator</i>   Fecha /Date 19 II .19
<b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b> <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Angel Raya. Director	
<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal Address:</i> Hospital Duran i Reynals. Gran Via de l' Hospitalet 199. 08908. Hospitalet de Llobregat. Barcelona	<b>Teléfono /Telephone:</b> 93 3160320 <b>Fax:</b> <b>E-mail:</b> gerencia@cmrb.eu



Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona  
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona  
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

## **ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR CT PBiPS1-Sv4F-1 EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES**

## ANEXOS

Anexo 1: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

Anexo 2: Diferenciación *in vitro*

Anexo 3: Diferenciación *in vivo*

Anexo 4: Cariotipo

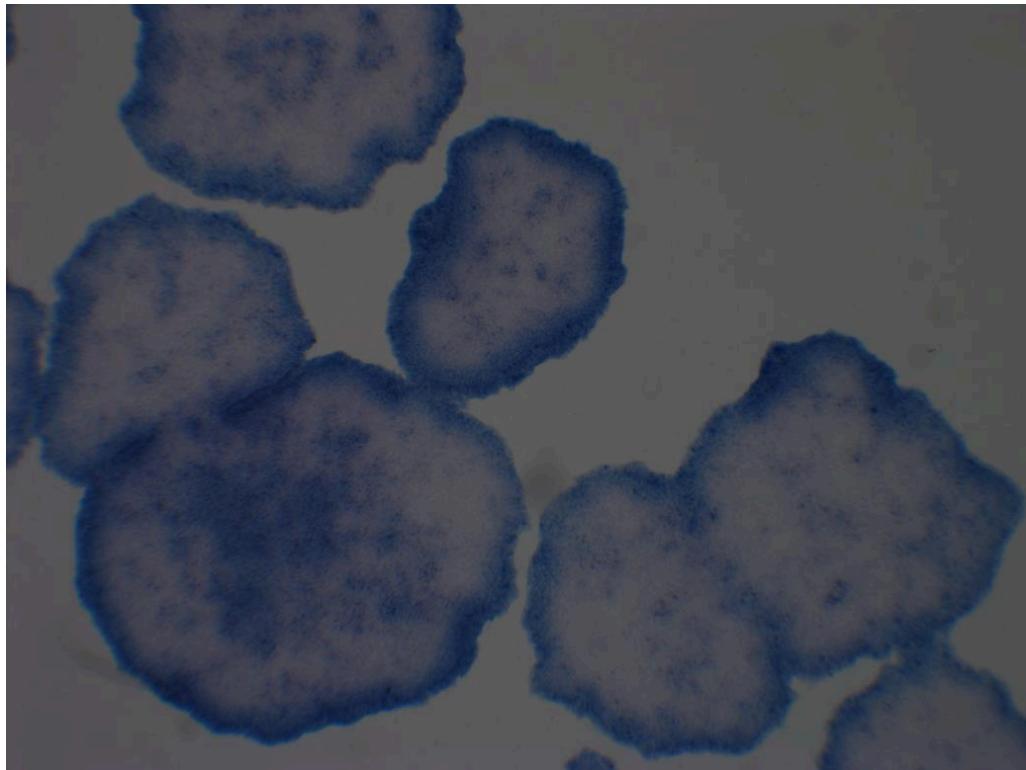
Anexo 5: Resultados microsatélites

Anexo 6: Ausencia de los transgenes de reprogramación

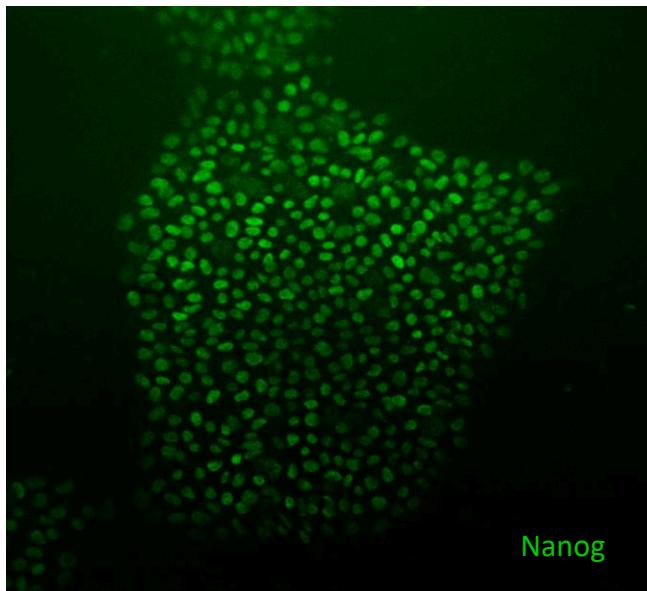
Anexo 7: Resultado Test de micoplasma

## Anexo 1

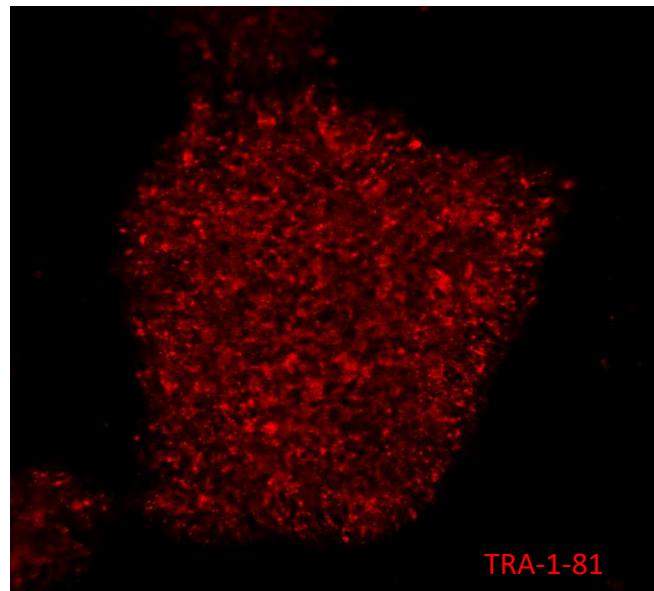
### Fenotipo. Marcadores de pluripotencia



Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



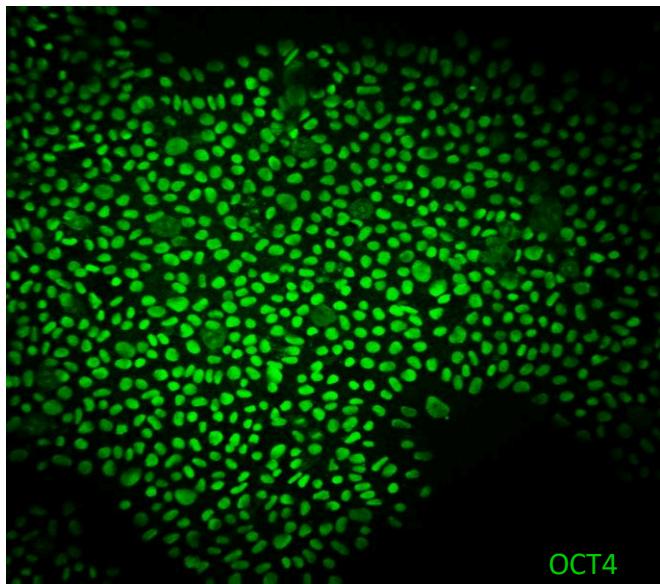
Nanog



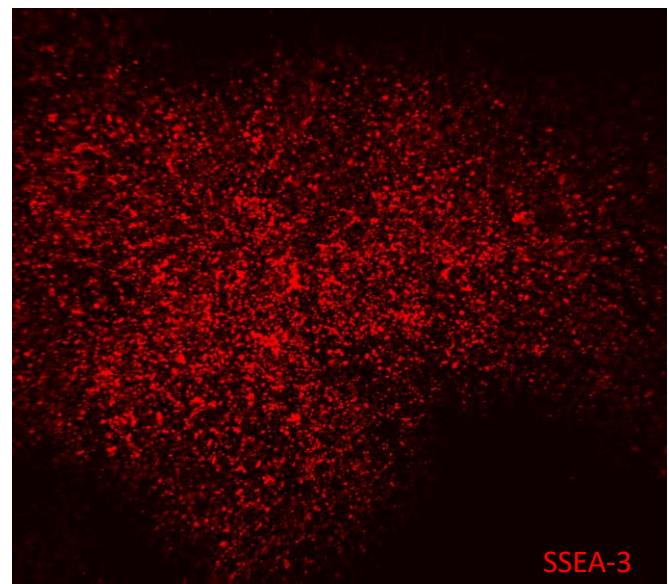
TRA-1-81

Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

**Nanog y TRA1-81**



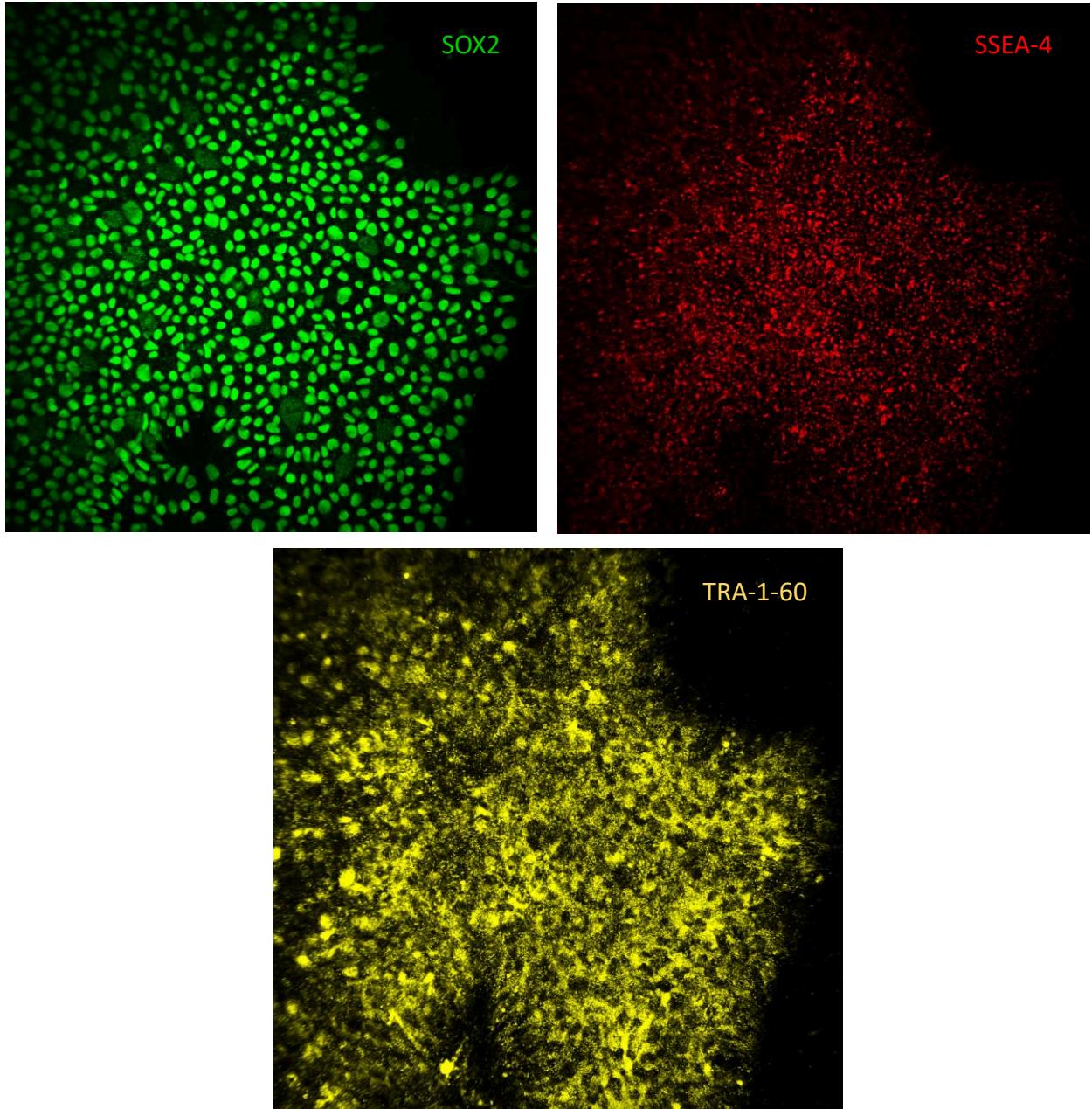
OCT4



SSEA-3

Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

**Oct-4 y SSEA-3**



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

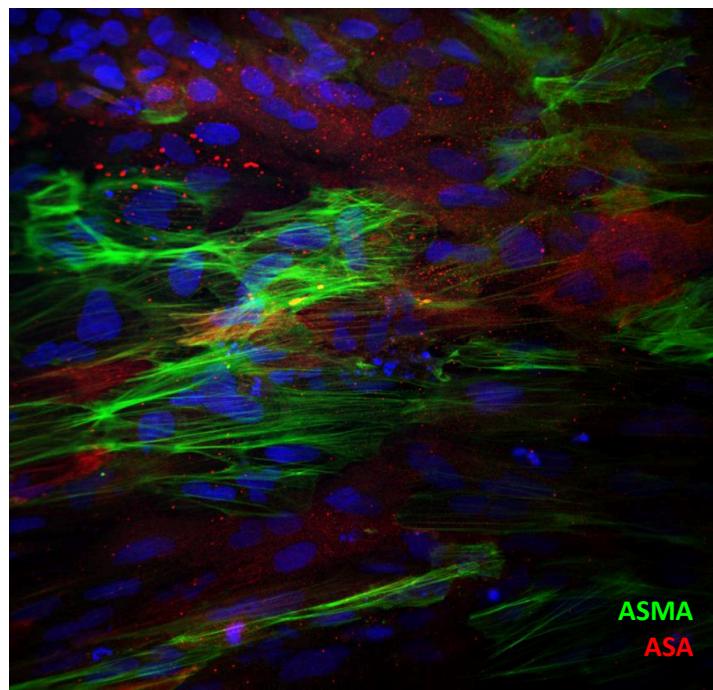
**Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60**



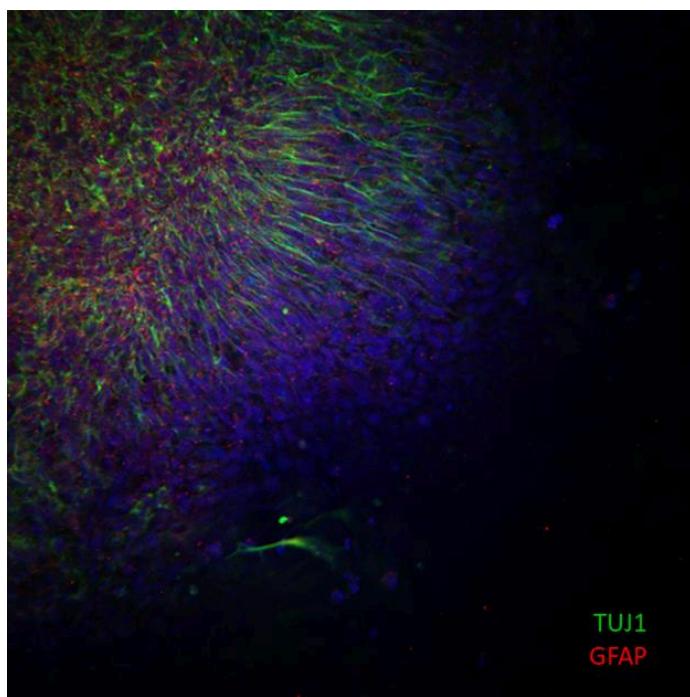
Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona  
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona  
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

## Anexo 2

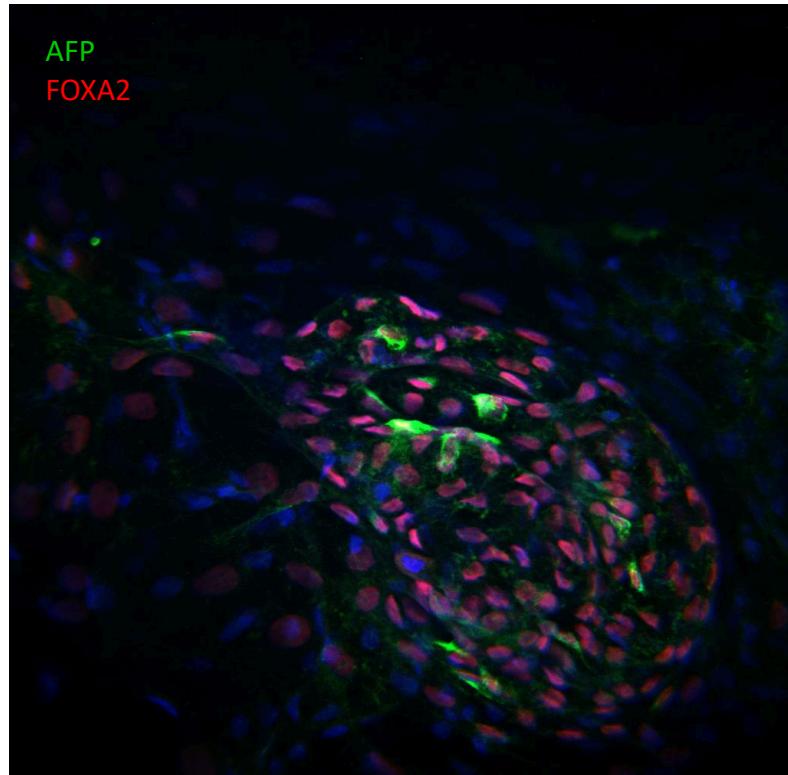
### Diferenciación *in vitro*



Diferenciación *in vitro* a mesodermo: Células positivas para **ASMA y ASA**



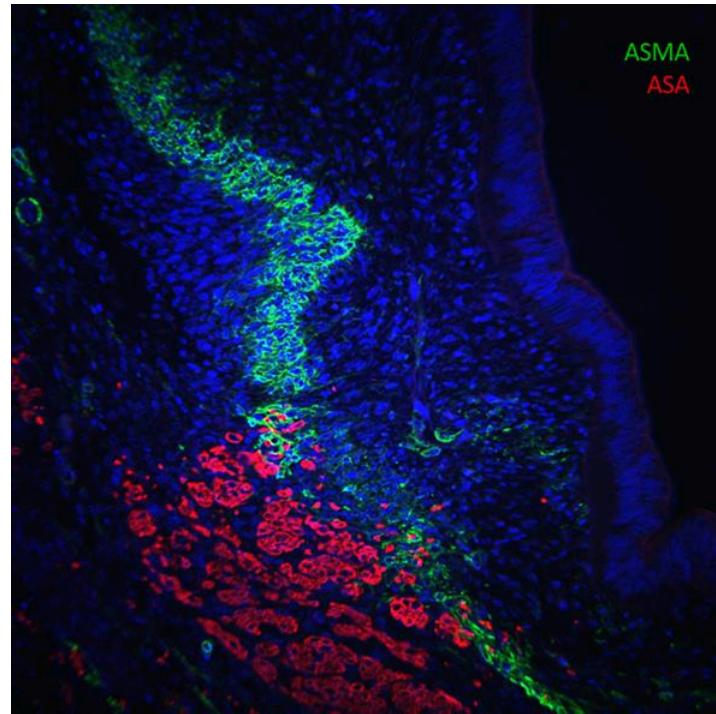
Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para **Tuj1 Y GFAP**



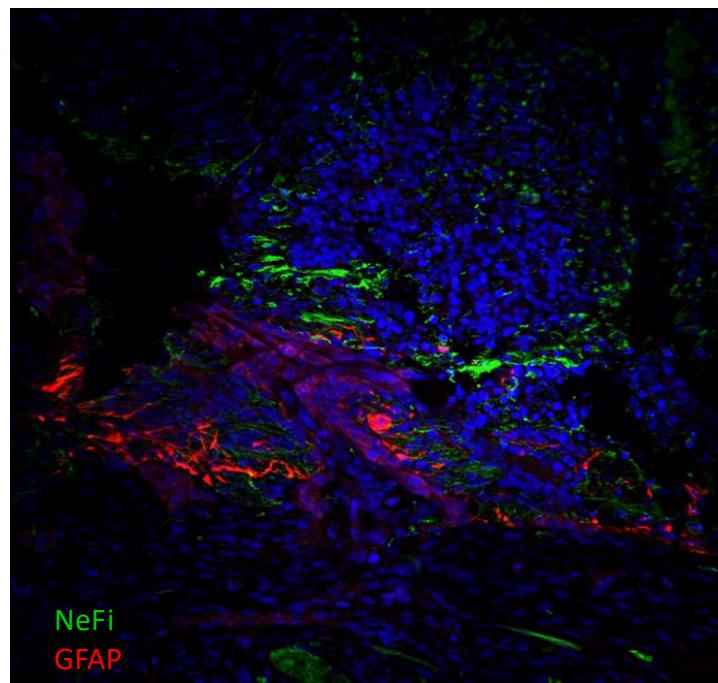
Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **AFP** y **FOXA2**

## Anexo 3

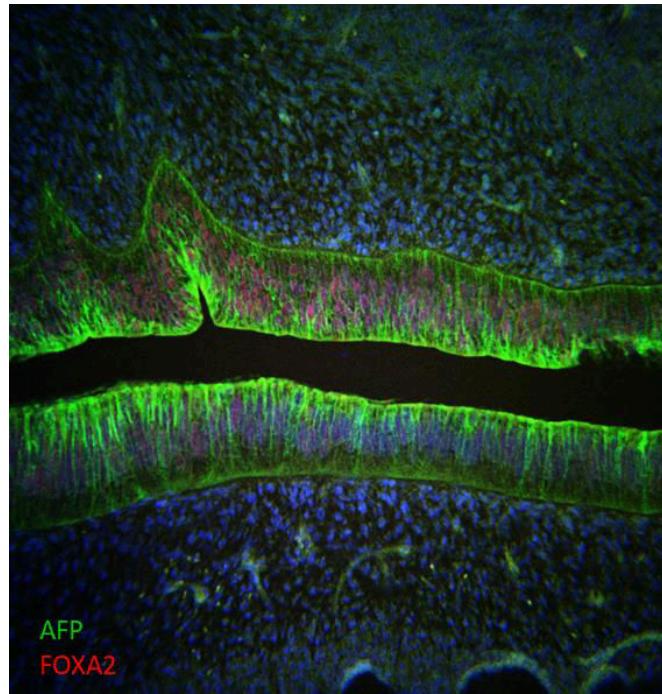
### Diferenciación *in vivo*



Diferenciación *in vivo* a mesodermo: Células positivas para **ASMA** y **ASA**



Diferenciación *in vivo* a ectodermo: Células positivas para **NeFi** y **GFAP**.



Diferenciación in vivo a endodermo: Células positivas para **AFP** y **FOXA2**

## Anexo 4

### Cariotipo

## ESTUDIO CITOGENETICO

Case name: 82880652  
Nombre y Apellidos: CT PBiPS1-Sv4F-1 p16

NHC: CT0042  
Servicio: CMRB



Resultado: 46,XY

## Anexo 5

### Resultado microsatélites



## Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía CONSEJERÍA DE SALUD

v.04

**Los resultados obtenidos son estudiados mediante el programa informático GeneMapper® 3.2. De acuerdo con la información suministrada por Promega® sobre su kit de amplificación GenePrint® 10 System, estos son los datos correspondientes de los alelos existentes para cada uno de los diferentes loci STR (figura1):**

**Promega**

Table 3. The GenePrint® 10 System: Allele Ladder Information.

STR Locus	Label	Size Range of Allele Ladder Components (Base)	Report Numbers of Allele Ladder Components
TH01	SL	156-195	4, 9, 13, 10, 11, 135
D21S11	SL	208-250	24, 24-2, 25, 25-2, 26, 26-2, 28-2, 29, 29-2, 30, 30-2, 31, 31-2, 32, 32-2, 33, 33-2, 34, 34-2, 35, 35-2, 36-2, 38
H2R013	JDC	119-155	7-7, 6
H13SF1	JDC	116-149	7-7, 5
D7S820	JDC	216-237	6-10
D16S539	JDC	29-301	5-8, 15
CSP1PO	JDC	121-157	6-7, 5
Amelogenin	TMR	116, 112	X, Y
vWA	TMR	125-171	10-22
TPOX	TMR	202-290	6-25

\*The length of each allele in the allele ladder has been confirmed by sequencing analysis.  
 \*\*When using an internal size marker, such as the Internal Size Standard (IS), the calculated size of the ladder components may differ from those listed. This occurs because different gel sizes have different internal size markers. To calculate the true size of the ladder, subtract the size of the IS from the size of the ladder component.  
 \*\*\*The length of each marker in the D21S11 and D16S539 ladders. These values are relevant only to the www.promega.com website (see URL).

**Figura 1. Información de la casa comercial Promega sobre la relación entre cada uno de los loci STR amplificados y las repeticiones (en rangos de tamaño y número) que pueden estar presentes en dichos productos de PCR.**

### RESULTADOS:

En la siguiente tabla se indican los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR en la muestra analizada.

Loci STRs analizados											
Código biobanco	Código origen del ADN de la línea celular	TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSP1PO	AMEL	vWA	TPOX
32180369027	CT PBiPS1-Sv4F-1	9, 9.3	31, 31.2	12, 13	11, 12	10, 12	13	12	X, Y	14, 17	8

Granada, a 31 de Octubre de 2018

Laboratorio de Biología Molecular  
 Biobanco del SSPA



## RESULTADOS:

En la siguiente tabla se indican los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR en la muestra analizada.

Loci STRs analizados											
Código biobanco	Código origen del ADN de la línea celular	TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSP1PO	AMEL	vWA	TPOX
32180369032	CT1	9, 9.3	31, 31.2	12, 13	11, 12	10, 12	13	12	X, Y	14, 17	8

Granada, a 31 de Octubre de 2018

Laboratorio de Biología Molecular  
Biobanco del SSPA

Análisis de microsatélites en la línea de células madre pluripotentes CT PBiPS1-Sv4F-1 y en las células sanguíneas de las que proceden.

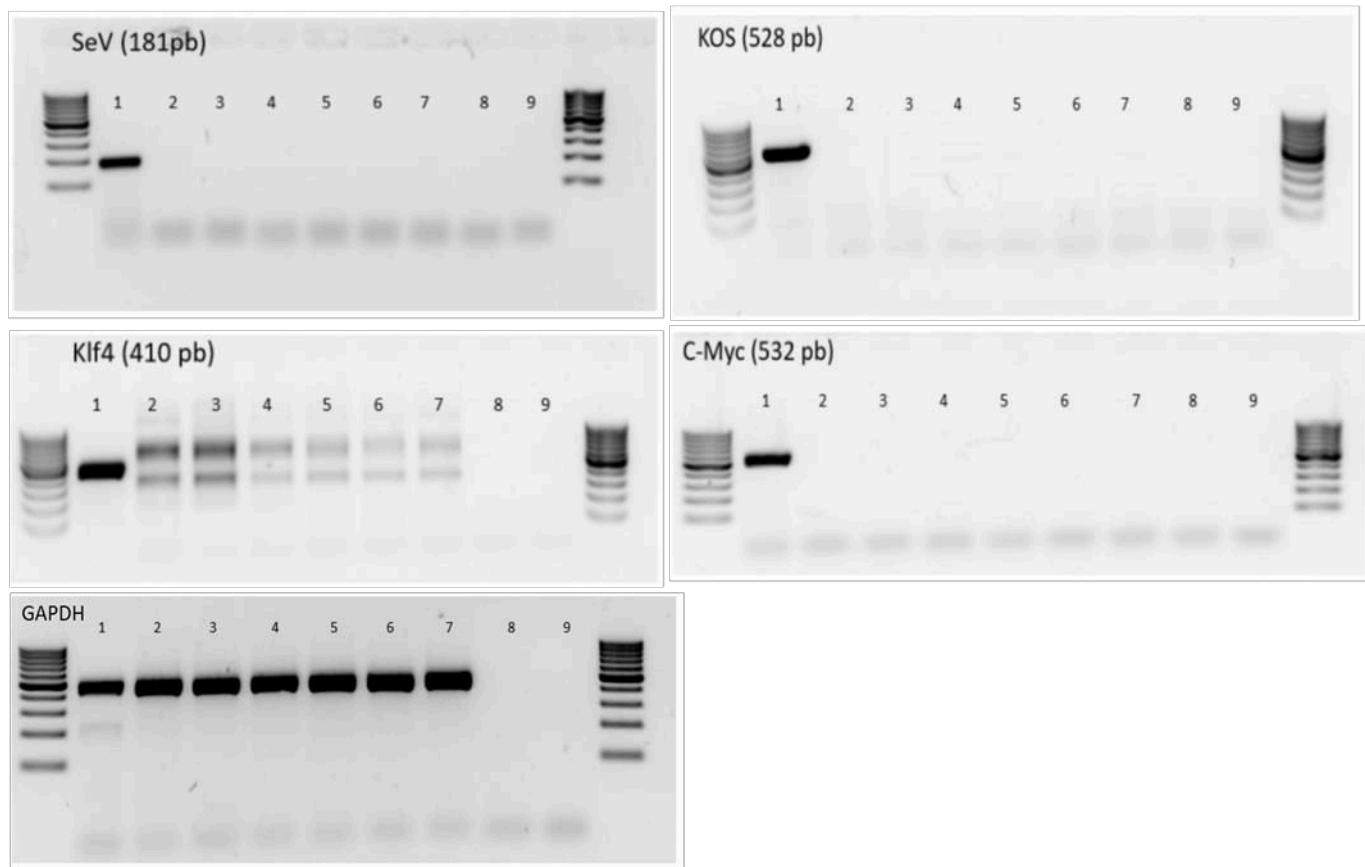


Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona  
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona  
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

## Anexo 6

### Ausencia de los transgenes de reprogramación

## RT-PCR SENDAI 8.8.18



1. Sendai transduced NF ST25 cells, 0,1M, 13.01.18 (positive control)

2. CT PBiPS1 Sv4F-1, P6, 31.07.18

8. Sample 3 (without RT)

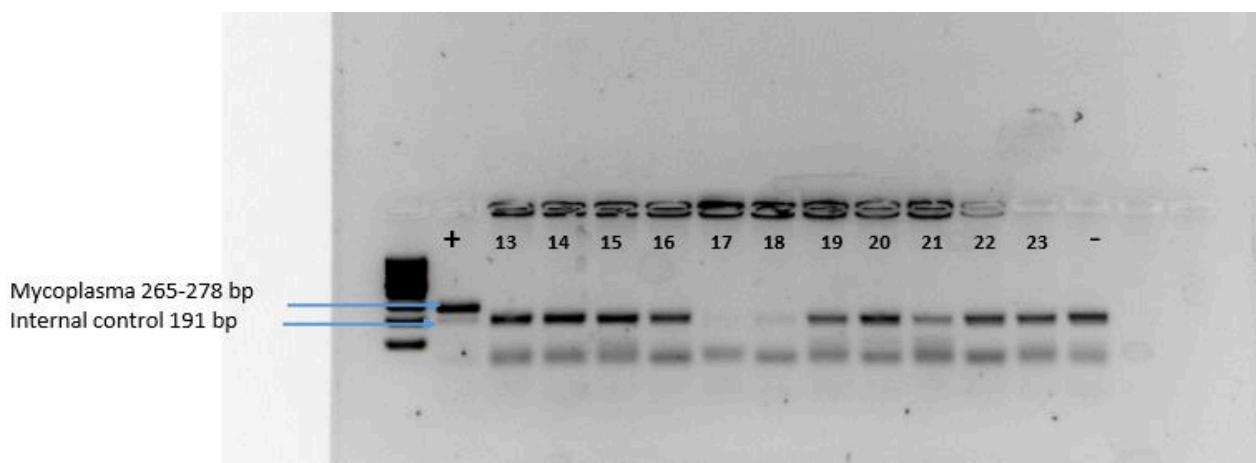
9. H<sub>2</sub>O

Ausencia de los transgenes de reprogramación. Análisis por RT-PCR de los niveles de expresión de los transgenes indicados. Se muestra expresión relativa a GAPDH

## Anexo 7

### Resultado Test de micoplasma

## Mycoplasma test (VenorGeM Classic kit) 31/10/2018



22:CT PBiPS1-Sv4F-1 p19

CT PBiPS1-Sv4F-1