

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: 31/07/2015

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> | CBiPS 2F-1c | |
| 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 CD133+ de sangre de cordón umbilical CD133+ cells from umbilical cord blood | |
| Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i> | Femenino 0 años Female 0 years | |
| ¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i> | NO <input checked="" type="checkbox"/> No | SÍ <input type="checkbox"/> (especificar) Yes (specify) |
| ¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i> | NO <input type="checkbox"/> No | SÍ <input type="checkbox"/> (especificar) Yes (specify) |

| | | |
|---|--|--|
| 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> 11.2010 | Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 11.2010 | |
| Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i> | Se pre-estimularon las células de sangre de cordón (CB) CD133+ (1x105 cel/ml) durante 24h en DMEM suplementado con 10%FBS en presencia de SCF +Flt3 +TPO +IL-6. Cells from cord blood (CB) CD133 + (1x105 cells / ml) were pre-stimulated for 24h in DMEM supplemented with 10% FBS in the presence of SCF + Flt3 + TPO + IL6. | |
| ¿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 | |
| 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> <i>Specify factors and plasmids used for reprogramming</i> | <p>Constructos y producción retroviral Constructs and retroviral production</p> <p>Para la producción de las partículas retrovirales se utilizaron los vectores retrovirales pMSCV OCT4 y pMSCV_SOX2. La línea celular Phoenix Amphotropic fue transfectada con los dos vectores usando Fugene 6 según las instrucciones del fabricante. The retroviral vectors pMSCV-OCT4 and pMSCV-SOX2 were used for the production of retroviral particles. The Amphotropic Phoenix cell line was transfected with the two vectors using Fugene 6 according to the manufacturer's instructions.</p> <p>Transducción de células CD133+ Transduction CD133 +</p> <p>Se pre-estimularon las células de sangre de cordón (CB) CD133+ (0,1 M cel/ml) durante 24h en DMEM suplementado con 10%FBS en presencia de SCF +Flt3 +TPO +IL-6. Placas multipicillos fueron recubiertas con retronectina. Se añadió una mezcla filtrada y obtenida mediante centrifugación de sobrenadante retroviral para OCT4 y SOX2 (1:1) a 2500 RPM durante 30 min. Se plaquearon alrededor de 80.000 células CD133+ en presencia de DMEM+ FBS al 10% y el cocktail de citoquinas mencionado previamente. Se realizaron 3 ciclos de infección. A día 3, se recogieron las células y se transfirieron a placas de 6 pocillos que contenían fibroblastos humanos irradiados y medio hES. Las CBiPS fueron cultivadas sobre fibroblastos humanos irradiados y pasadas mecánicamente.</p> <p>Cells from cord blood (CB) CD133 + (0,1 x 10 M cells/ml) were pre-stimulated for 24 h in DMEM supplemented with 10% FBS in the presence of SCF + Flt3 + TPO + IL-6. Multiwell plates were coated with retronectin. A mixture obtained by centrifugation of retroviral supernatant for OCT4 and SOX2 (1: 1) at 2500 RPM for 30min was filtered and added. About 80,000 CD133 + cells were plated in the presence of DMEM + 10% FBS and the cytokine cocktail mentioned above. Three cycles of infection were performed. On day 3, the cells were harvested and transferred to 6-well plates containing irradiated human fibroblasts and hES medium. The CBiPS were cultured on irradiated human fibroblasts and passed mechanically.</p> | |

| | |
|---|--|
| 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> | <p>Support: human foreskin fibroblasts (ATCC, American Type Culture Collection, CCD1112Sk).</p> <p>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) and 0,5% Penicillin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation).</p> <p>Vitaloni M, Pulecio J, Bilic J, Kebler B, Laricchia-Robbio L, Izpisúa Belmonte JC. (2014) MicroRNAs Contribute to Induced Pluripotent Stem Cell Somatic Donor Memory. <i>J. Biol. Chem.</i> 289: 2084-2098.</p> |
| 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> | <p>Colonias grandes poligonales, ligeramente aplanasadas, 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>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.</p> |
| Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i> | <p>La congelación de los clumps de colonias se realizó en FBS(90%) + DMSO(10%), mediante congelador programable (-0.5°C/min.). Los viales se descongelaron a 37°C durante 1-2 minutos.</p> <p>The clumps of colonies were cryopreserved in FBS(90%)+ DMSO (10%), by programmable freezer (-0.5°C/min.). Vials were thawed at 37°C for 1-2 minutes.</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> | 22 |
| ¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> | <p>¿Se llevó a cabo un análisis clonal? <i>Has a clonal analysis been carried out?</i></p> <p>Sí Yes <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Resultado / Result</p> |
| Comentarios/ Comments: | |

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> Anexo 1 Annex 1 | Comentarios <i>Method</i> | Método | Marcador | Nº pase | Resultado | <i>Comments</i> |
|---|---|--|-------------------|----------------|-----------|-----------------|
| | | <i>Marker</i> | <i>Passage n.</i> | <i>Results</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 | Actividad | 6 | + | | |
| Test de diferenciación <i>in vitro</i> <i>In vitro differentiation test</i> | Comentarios <i>Method</i> | Método | Marcador | Nº pase | Resultado | <i>Comments</i> |
| | Ectodermo | inmunocitoq. Tuj1/ GFAP <i>Ectoderm</i> | | 14 | +/+ | |
| | Mesodermo | inmunocitoq. ASMA <i>Mesoderm</i> | | 14 | + | |
| | Endoderm | inmunocitoq. AFP/FOXA2 <i>Endoderm</i> | | 14 | + | |
| Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> (espontánea/inducida) <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 EBs. Ectodermo: cultivo de EBs en medio con N2/B27 sobre células PA6 (Anexo 2). Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture. Ectoderm: EBs culture with N2/B27on PA6 cells (Annex 2). | | | | | |

| Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i> | Comentarios <i>Method</i> | Método <i>Method</i> | Marcador <i>Marker</i> | Nº pase <i>Passage n</i> | Resultado <i>Results</i> | Comments <i>Comments</i> |
|---|-------------------------------------|--|----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | | | | | | |
| | Ectodermo <i>Ectoderm</i> | inmunohistoq. | Tuj1/ GFAP | 13 | +/- | |
| | Mesodermo <i>Mesoderm</i> | inmunohistoq. | ASMA/ ASA | 13 | +/- | |
| | Endodermo <i>Endoderm</i> | inmunohistoq. | AFP / FOXA2 | 13 | +/- | |
| Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i> | | Inyección intratesticular en ratones SCID de 4·10 M de células indiferenciadas y tras 8 semanas, análisis de los teratomas producidos mediante técnicas de inmunohistoquímica para ectodermo, mesodermo y endodermo. (Anexo 3). 4·10 M of undifferentiated cells were injected into the testis of SCID mice. Around 8 weeks later, teratomas were analyzed by immunohistochemistry for ectoderm, endoderm and mesoderm (Annex 3). | | | | |
| Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i> | | 46XX p23 (Anexo 4 (Annex 4) | | | | |
| 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> | | Los marcadores de microsatélites se muestran en el Anexo 5. Microsatellites markers are shown in Annex 5. | | | | |
| Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i> | | La qPCR evidenció la integración de los 2 genes; Oct-4, Sox-2 (Anexo 6) The 2 genes integration; Oct-4, Sox-2, was shown by qPCR (Annex 6) | | | | |

| | |
|---|---|
| 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 2 genes de reprogramación Oct-4 y Sox-2 (Anexo 6) Silencing of reprogramming genes Oct-4 and Sox-2 was shown (Annex 6) |
| 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 not applicable |
| Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i> | Negativo por PCR (Ver Anexo 7) Negative by PCR (See Annex 7) |

SECCIÓN 3

Section 3

DATOS DEL DEPOSITANTE

Applicant Details

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

| | |
|---|--|
| 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>  31/07/2015 Fecha/ Date: CMRB Dr. Aiguader, 88 08003 BARCELONA NIF G-63687222 | Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i>  31/07/2015 Fecha /Date |
| Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Margarita Sala Azón | |
| Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona Doctor Aiguader, 88, 7 ^a planta, 08003, Barcelona | Teléfono /Telephone: 933160303 Fax: 933160301 E-mail: 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 CBiPS-2F-1c 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

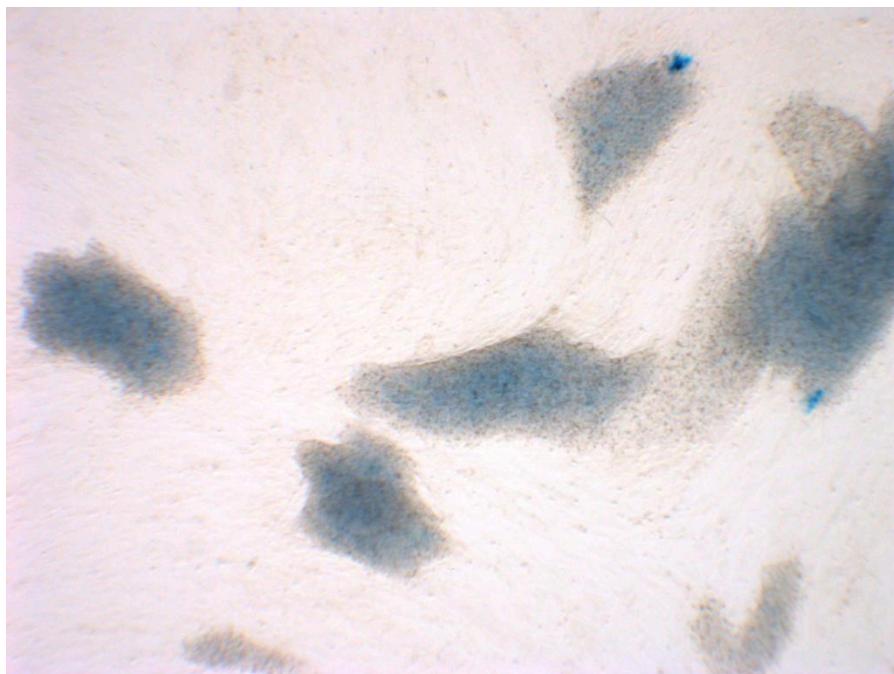
Anexo 5: Resultados microsatélites

Anexo 6: Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

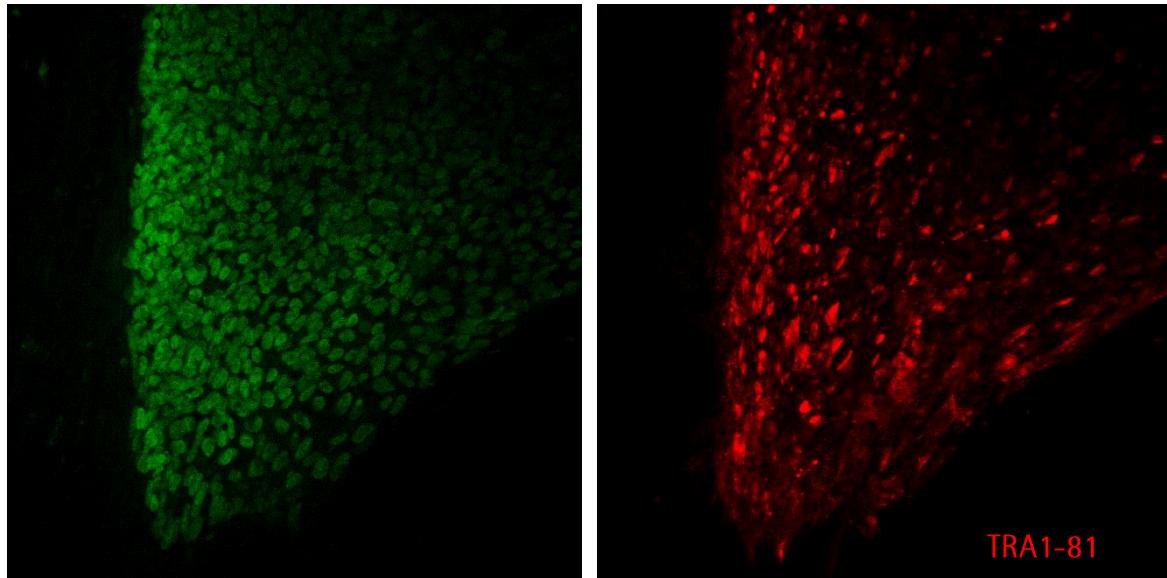
Anexo 7: Resultado Test de micoplasma (PCR)

Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia



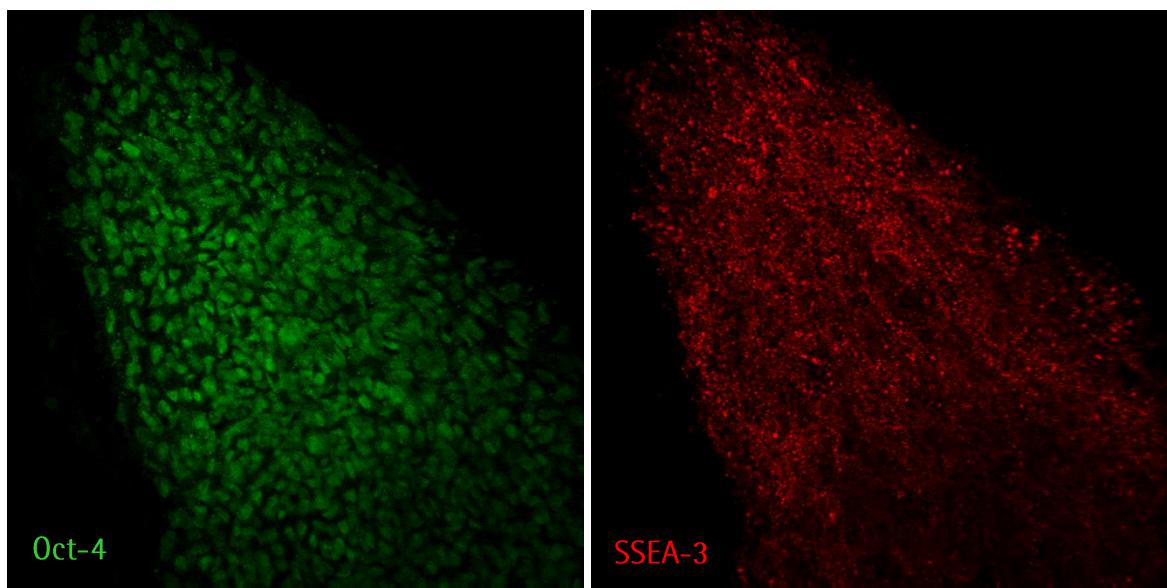
Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

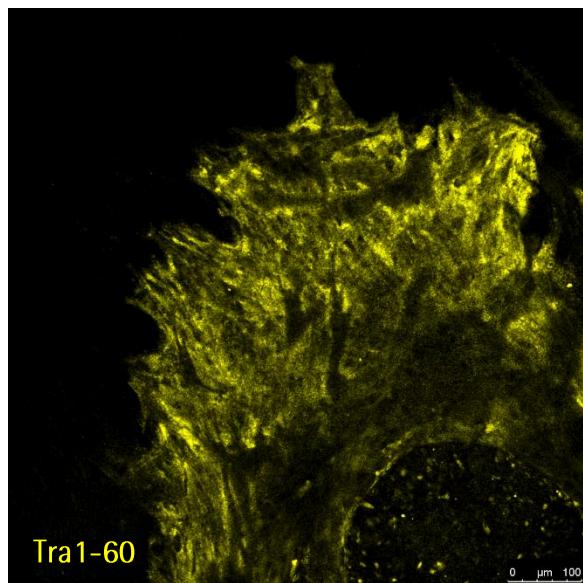
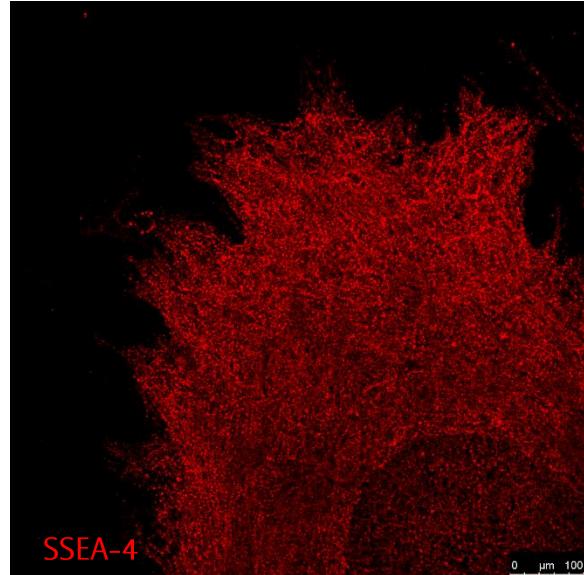
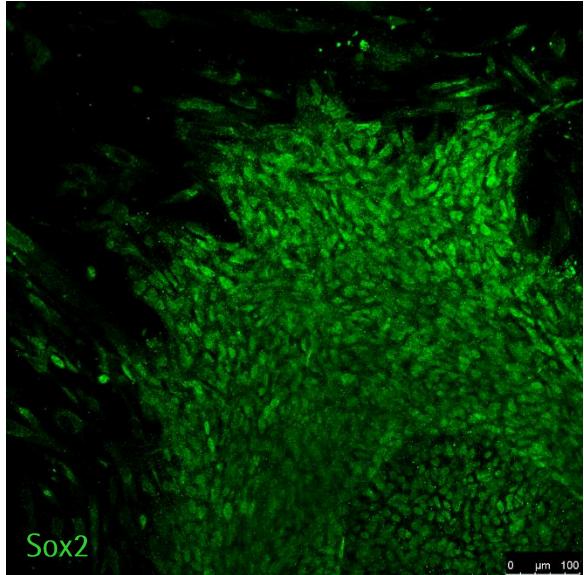
Nanog y TRA1-81

Nanog



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

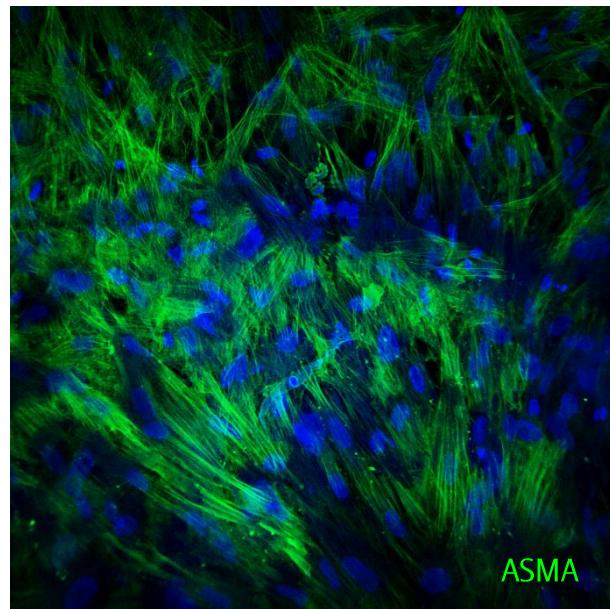
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60



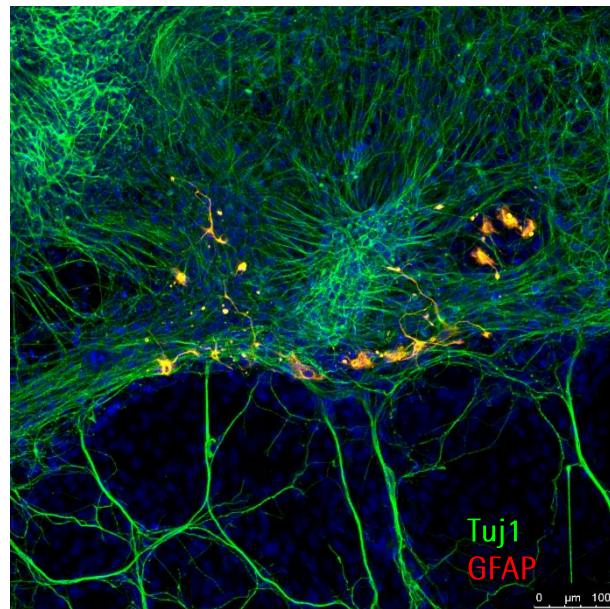
Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

Anexo 2

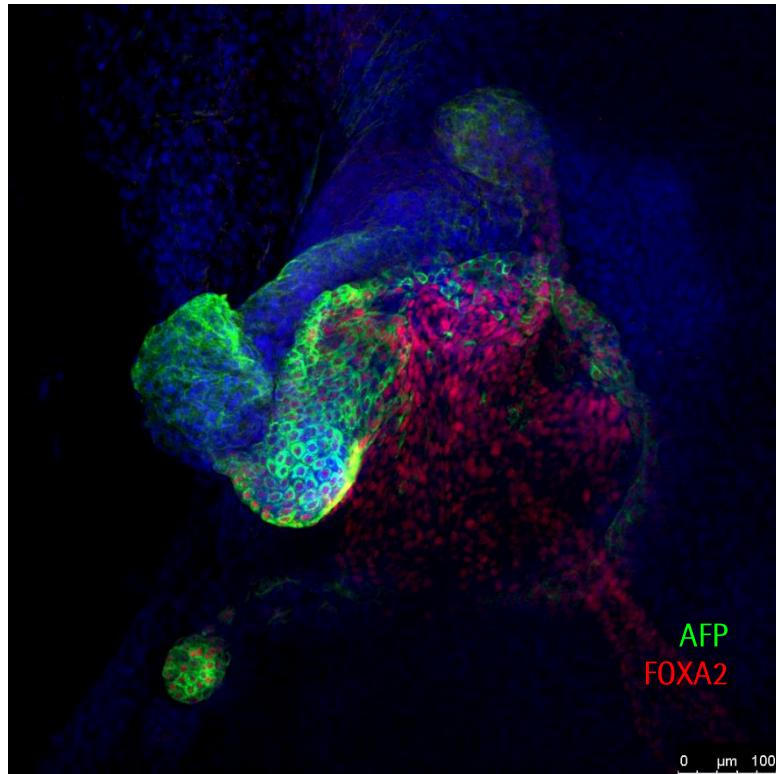
Diferenciación *in vitro*



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



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



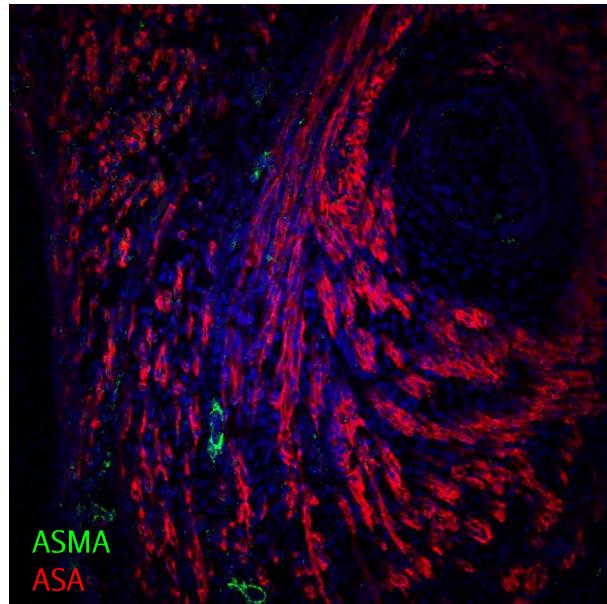
Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **AFP** y **FOXA2**



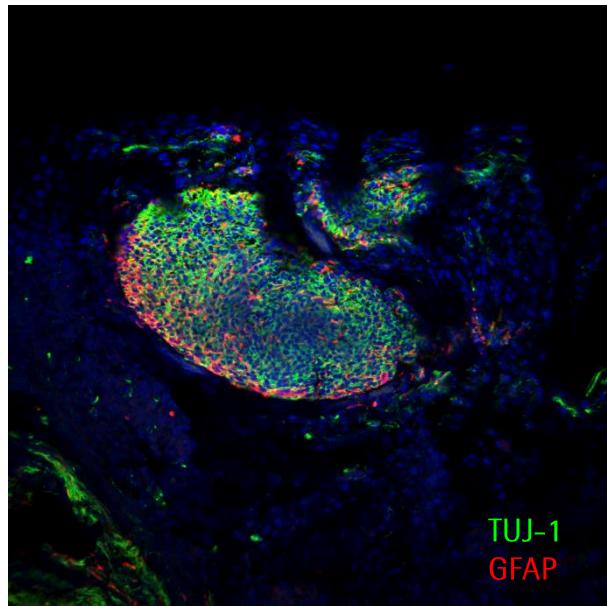
Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

Anexo 3

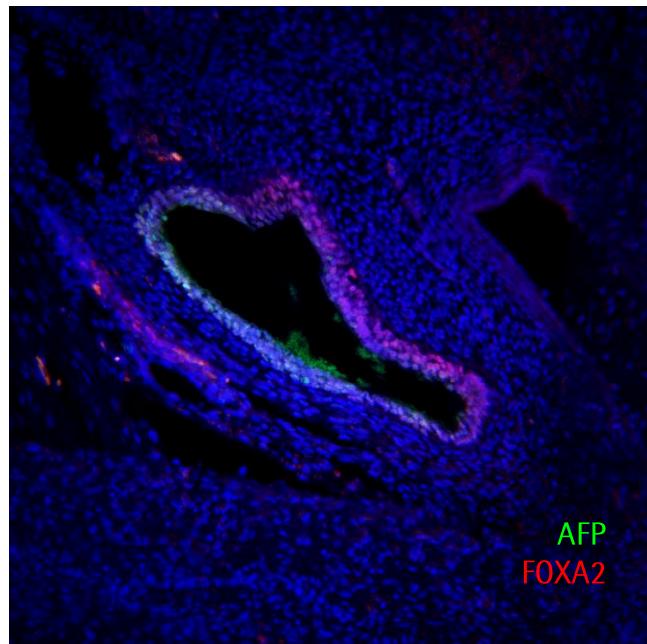
Diferenciación *in vivo*



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



Diferenciación *in vivo* a ectodermo: Células positivas para **TUJ1** y **GFAP**.



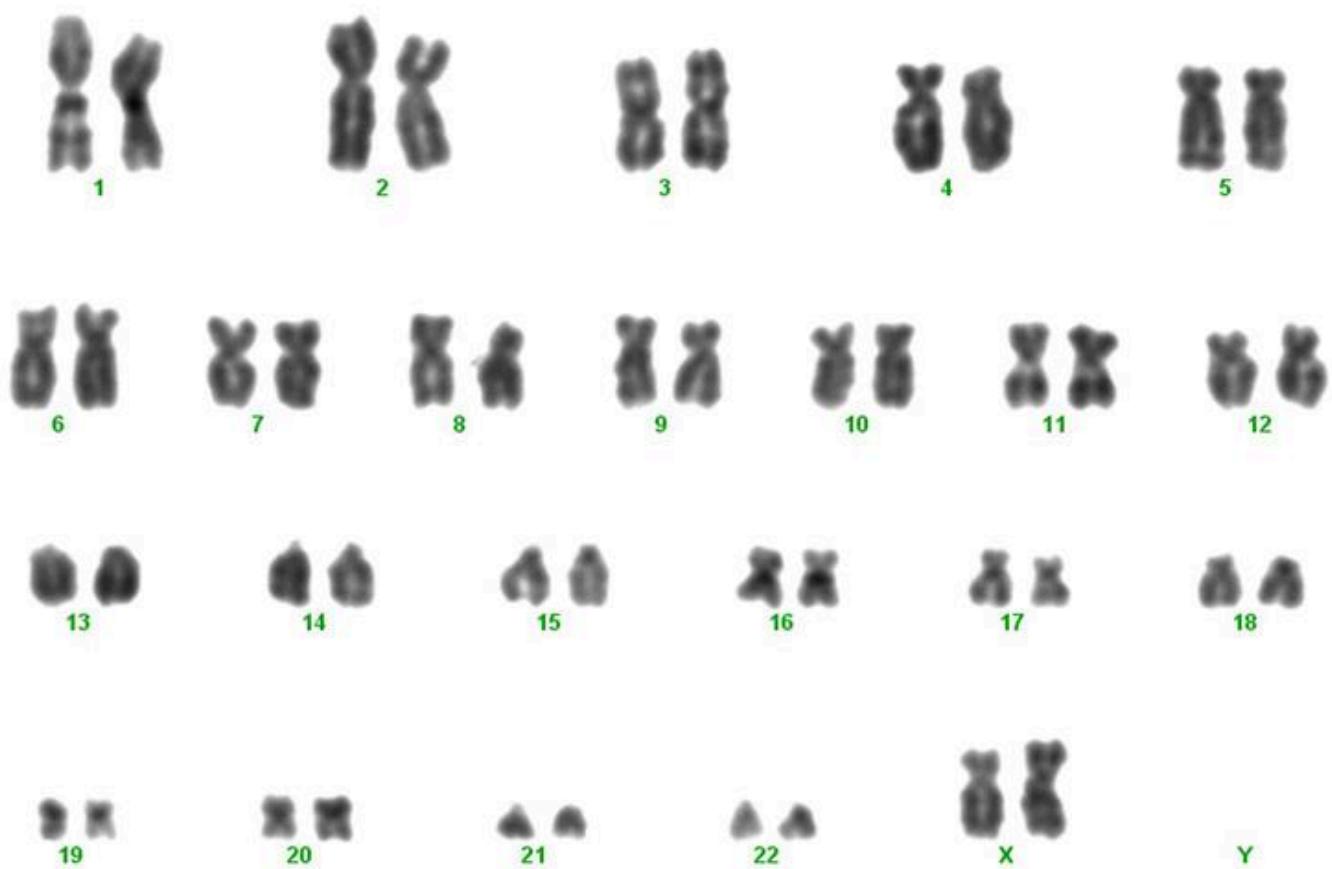
Diferenciación in vivo a endodermo: Células positivas para **AFP** y **FOXA2**



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

Anexo 4

Cariotipo



Anexo 5

Resultado microsatélites

Servicio de autentificación de líneas celulares

Detalles de la solicitud

Solicitante: Cristina Gómez Santos
Centro: Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Departamento:

Detalles de la muestra

Identificador externo: CBiPS 2F-1
Identificador interno: qG15013834
Descripción: 1 epp amb pellet

Informe de resultados

Resultados

Calidad de la muestra: Correcta

| Muestra | TH01 | D21S11 | D5S818 | D13S317 | D7S820 | D16S539 | CSF1PO | AMEL | vWA | TPOX |
|------------|-------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|------|-------|------|
| CBiPS 2F-1 | 7-9.3 | 28-32.2 | 11-12 | 8-12 | 11-12 | 12-13 | 10-11 | XX | 15-16 | 8-8 |

Coincidencia con línea celular conocida: No **Cual:**

Contaminación con otra línea celular humana: No detectable

Observaciones: El patrón de marcadores STR coincide en un 100 % con la línea celular CBiPS 4F-1b (qG15013833)

Firmado:
Manel Garcia

Fecha: 20/07/2015

Breve descripción del método

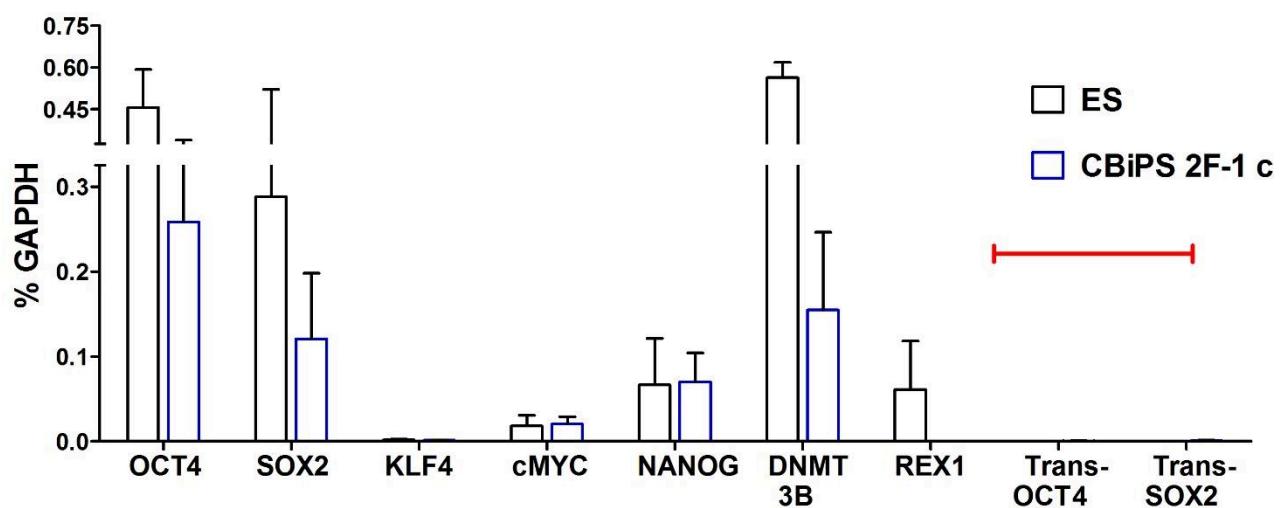
El estudio se ha realizado mediante el genotipado de marcadores STR (también conocidos como microsatélites: *TH01*, *D21S11*, *D5S828*, *D13S317*, *D7S820*, *D16S539*, *CSF1PO*, *vWA* y *TPOX*). La combinación de los nueve marcadores utilizados produce un perfil de alelos con una probabilidad de coincidencia por azar de 1 en $2,9 \times 10^9$. Se usa además un marcador para identificar el sexo de la muestra (AMEL).

Anexo 6

Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación



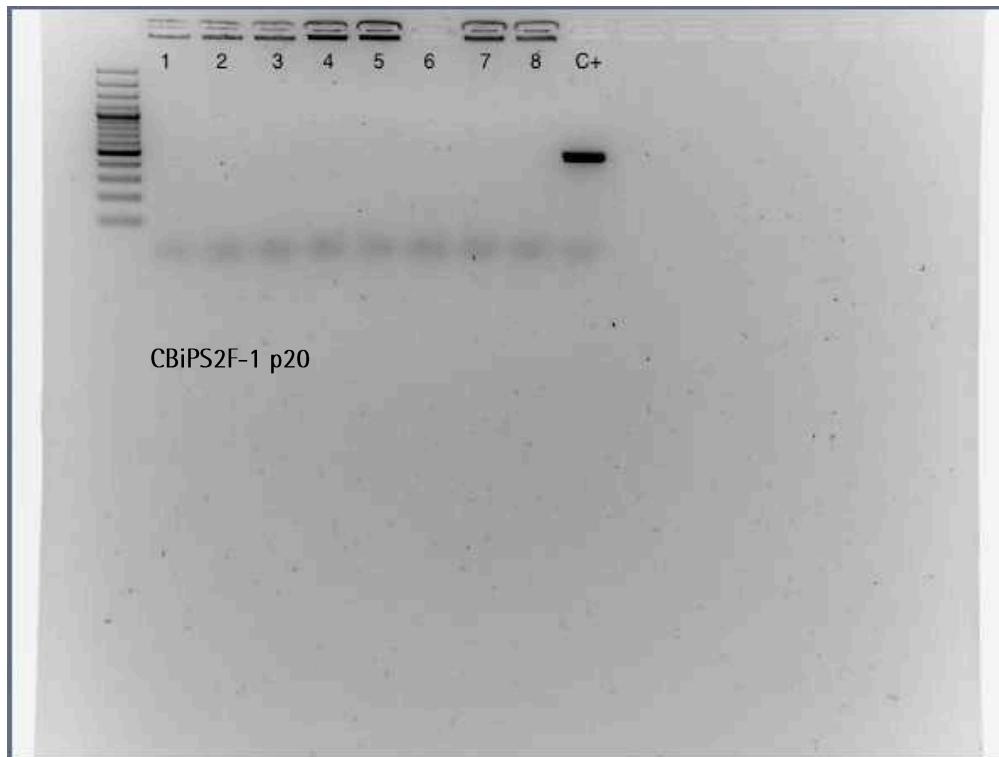
Análisis gPCR mostrando las integraciones genómicas de los 2 genes utilizados Oct-4 y Sox-2 para generar la línea CBiPS-2F-1c



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

Anexo 7

Resultado Test de micoplasma (PCR)



Resultado test micoplasma **CBiPS-2F-1c pase 20** (Carril 8)