

# BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)

*National Bank of Stem Cell Lines*

## IMPRESO DE SOLICITUD DE DEPÓSITO DE UNA LÍNEA

*Application Form to Deposit a Human Cell Line*

Documentos que se acompañan:

*Attached documents:*

- Copia de la autorización de derivación de la línea celular, junto con informe del Comité Ético del centro de procedencia.  
*A copy of the authorization for the derivation of the cell line, with the corresponding ethics committee approval*
- Copia de cualquier publicación científica relacionada con la derivación y/o caracterización de la línea.  
*A copy of any relevant published scientific papers related to the derivation and/or characterization of the cell line*
- C. V. del investigador principal (una página; formato libre).  
*A one page CV for the Principal Investigator*
- Otros (especificar).  
*Others (specify)*

### SECCIÓN 1

*Section 1*

### Información General

*General Information*

**Nombre de la línea: XF-iPSF44-3F-2**

*Name of the line: XF-iPSF44-3F-2 (iPSXFII+III-2 fue el nombre de esta línea)*

*XF-iPSF44-3F-2 (iPSXFII+III-2 was the initial name of this line)*

**Investigador principal: Juan Carlos Izpisúa Belmonte, Anna Veiga Lluch, Ignacio Rodríguez Pizá**

*Principal Investigator:*

**Origen de la línea celular:**

*Origin of the cell line*

**Embrionario**       **Fetal**       **Adulto**   
*Embryonic*                      *Fetal*                      *Adult*

**¿La línea celular ha sido derivada de un embrión con anomalía genética?**

*Has the cell line been derived from an embryo with genetic anomaly?*

**NO**       **SÍ**  (especificar)  
*No*                      *Yes*                      *(specify)*

**Identificación genética de la línea celular. Método y resultado**

*Genetic identity of the cell line. Method and result*

**Análisis de HLA y microsatélites**

Se realizó estudio de HLA en solamente una de las líneas obtenidas a partir de la misma muestra, ya que el HLA no varía y es el mismo para todos los clones. En este caso se realizó estudio de HLA de la línea XF-iPSF44-3F-1.

***HLA analysis and fingerprinting***

*HLA analysis was done only for one of the lines obtained from the same sample because it is the same in all the clones. In this case, HLA was done for XF-iPSF44-3F-1 line.*

## SECCIÓN 2

Section 2

## Datos del Depositante

Applicant Details

|  |   |
|--|---|
| <b>Investigador Principal:</b><br><i>Principal Investigator:</i><br>Juan Carlos Izpisua Belmonte<br>Anna Veiga Lluch<br>Ignacio Rodríguez Pizá | <b>Dirección Postal:</b><br><i>Postal address:</i><br>Dr Aiguader 88 08003 Barcelona        |
| <b>Centro de Trabajo:</b><br><i>Institution:</i><br>Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona   | <b>Teléfono (phone):</b> 93 3160360<br><b>Fax:</b> 93 3160362<br><b>E-mail:</b> blc@cmrb.eu |

## SECCIÓN 3

Section 3

## Datos de la Línea Celular

Details of Cell Line

|  |   |
|--|---|
| <b>Tipo de muestra biológica (especificar estadio embrionario, semanas de gestación,...)</b><br><i>Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...)</i> |   |
| <b>Biopsia de prepucio humano.</b><br><i>Human foreskin biopsy.</i>  |   |
| <b>Muestra biológica</b><br><i>Biological sample</i>   |   |
| Fresco <input checked="" type="checkbox"/> Fresh      Crioconservado <input type="checkbox"/> Cryopreserved  |   |
| <b>Fecha de la obtención del muestra biológica</b><br><i>Date of obtaining the biological sample</i><br>9.02.2009  | <b>Fecha del uso o descongelación (si congelado)</b><br><i>Date used or thawed (if frozen)</i><br>9.02.2009 |
| <b>Fecha de la donación del muestra biológica</b><br><i>Date of donation of the biological sample</i><br>9.02.2009   |   |

|  |
|--|
| <b>Descripción general del procesamiento previo del muestra biológica utilizado (cultivo embrionario, procesamiento muestra fetal o de tejido adulto)</b><br><i>General description of the processing of the biological sample used (embryonic culture, processing of fetal sample or of adult tissue)</i>   |
| <p>Se utilizó una biopsia de prepucio de un paciente de 3 años tras la obtención del consentimiento informado firmado por los padres. La muestra fue recogida en solución salina, dividida en pequeños trozos y cultivada en IMDM (Invitrogen) suplementado con suero humano al 10% (HS) (Sigma) y penicilina/streptomycin (0.5%). Tras 10 días en cultivo se disociaron y pasaron los fibroblastos (XF-HFFs) mediante TrypLE Select (Invitrogen). Para la reprogramación se usaron XF-HFFs en pases 2-3. Para la generación de feeders, los XF-HFFs se expandieron hasta pase 5 y fueron irradiados y congelados en 90%HS y 10%DMSO.</p> <p><i>A foreskin biopsy from a 3-years old individual was used after obtaining his parents' written informed consent. The sample was collected in sterile saline solution, divided into small pieces and cultured in IMDM (Invitrogen) supplemented with 10% human serum (HS)(Sigma) and penicillin/streptomycin (0.5X). After 10 days of culture, fibroblasts (XF_HFFs) outgrowths were dissociated and split using TrypLE Select (Invitrogen). XF-HFFs were used for reprogramming at passages 2-3. For the generation of feeder layers, XF-HFFs were expanded five passages and then irradiated and cryopreserved in 90% HS and 10% DMSO.</i></p> |

**En caso de muestra embrionaria, indicar si se utilizaron blastómeros o células de la masa celular interna y el método de aislamiento utilizado**

*If of embryonic origin, indicate whether blastomeres or internal cell mass were used, as well as the isolation method*

**Origen del soporte celular o acelular utilizado para la derivación, así como de los componentes de los medios de cultivo (si se describen en publicación, indicar además referencia)**

*Origin of the cellular or cellular free support used in derivation in addition to the components of the culture mediums (if they are described in a publication, please indicate the reference).*

Soporte: fibroblastos de prepucio humanos procedentes de la misma muestra cultivados en condiciones libres de xenobióticos.

*Support: human foreskin fibroblasts from the same sample cultured in xenofree conditions.*

Culture medium (F44m): Knockout Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2 mmol/l, GlutaMAX (Gibco, Invitrogen corporation), 0,05mmol/l 2-mercaptoethanol (Gibco, Invitrogen corporation), 8 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Invitrogen), 1% non-essential amino acids (Cambrex), 10% F44 (Grifols), 1% Xeno-free KO-SR Growth Factor Cocktail (Invitrogen) y 0,5% Penicillin-Streptomycin (Gibco).

*Reprogramming of human fibroblasts to induce pluripotent stem cells under xeno-free conditions. Rodriguez-Pizà et al. Stem Cells 2009, 28: 36-44.*

**Mantenimiento de la línea: Line maintenance**

**Ratio de pase:** *Passage ratio 1:2-1:3 cada 6/7 días; 1:2-1:3 every 6/7 days*

**Método de pase:** *Passage method mecánico; mechanical*

**Xenobióticos**  
*Xenobiotics*

**si**  
*Yes*

**no**  
*No*

**Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo (forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma; otros)**

*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)*

Colonias grandes poligonales, ligeramente aplanadas, 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.

*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.*

**Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)**

*Microbiological controls carried out (indicate in detail)*

micoplasma

*mycoplasm*

**Marcadores:** ver Anexo 1

*Markers*

|                       | <b>Método</b><br><b>(ARN/proteínas)</b> | <b>nº pase</b>    | <b>resultado</b> | <b>comentarios</b> |
|-----------------------|---|-------------------|------------------|--------------------|
|                       | <i>Method</i><br><i>(RNA/proteins)</i>  | <i>Passage n.</i> | <i>results</i>   | <i>comments</i>    |
| <b>Oct4</b>           | inmunofluorescencia                     | 5                 | +                |                    |
| <b>Nanog</b>          | inmunofluorescencia                     | 5                 | +                |                    |
| <b>Rex 1</b>          | -                                       |                   |                  |                    |
| <b>Sox 2</b>          | inmunofluorescencia                     | 5                 | +                |                    |
| <b>SSEA3</b>          | inmunofluorescencia                     | 5                 | +                |                    |
| <b>SSEA4</b>          | inmunofluorescencia                     | 5                 | +                |                    |
| <b>TRA-1-60</b>       | inmunofluorescencia                     | 5                 | +                |                    |
| <b>TRA-1-81</b>       | inmunofluorescencia                     | 5                 | +                |                    |
| <b>Telomerasa</b>     |   |                   |                  |                    |
| <b>Fosfatasa Alk.</b> | Actividad                               | 5                 | +                |                    |
| <b>Cariotipo</b>      |   | 10                | 46, XY           | ver Anexo 2        |
| <b>Otros</b>          |   |                   |                  |                    |

### Capacidad de diferenciación

*Differentiation capacity*

|                            | <b>Ectodermo/ Ectoderm</b>  |                               |                                   | <b>Endodermo/Endoderm</b>        |                               |                                   | <b>Mesodermo/ Mesoderm</b>          |                               |                                   |
|----------------------------|---|-------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
|                            | <b>marcador</b><br><i>marker</i>  | <b>pase</b><br><i>passage</i> | <b>resultado</b><br><i>result</i> | <b>marcador</b><br><i>marker</i> | <b>pase</b><br><i>passage</i> | <b>resultado</b><br><i>result</i> | <b>marcador</b><br><i>marker</i>    | <b>pase</b><br><i>passage</i> | <b>resultado</b><br><i>result</i> |
| <b>In Vitro</b><br>Anexo 3 | TUJ1  | 8                             | +                                 | $\alpha$ -feto proteina<br>FOXA2 | 8                             | +                                 | ASA, SMA<br>GATA4                   | 8                             | +                                 |
| <b>In vitro</b><br>Annex 3 | TUJ1  | 8                             | +                                 | $\alpha$ -feto protein<br>FOXA2  | 8                             | +                                 | ASA, SMA<br>GATA4                   | 8                             | +                                 |
| <b>In vivo/ in vivo</b>    | <b>Método:</b> formación de teratomas en ratones SCID<br><i>Method: teratoma formation in SCID mice</i> |                               |                                   |                                  |                               |                                   | <b>Resultado:</b><br><i>Result:</i> |                               |                                   |

**Descripción de las características de diferenciación *in vitro****Description of the differentiation characteristics in vitro*

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 3)

*Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture. Ectoderm: EBs culture in N2/B27 (see Annex 3)*

**Datos de la determinación de pluripotencialidad *in vivo* o formación de teratomas***Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation***Datos de la tipificación HLA***HLA typification data*

Se realizó estudio de HLA en solamente una de las líneas obtenidas de la misma muestra, ya que el HLA no varía y es el mismo para todos los clones. En este caso se realizó estudio de HLA de la línea XF-iPSF44-3F-1.

**HLA analysis and fingerprinting**

*HLA analysis was done only for one of the lines obtained because it is the same in all the clones. In this case, HLA was done for XF-iPSF44-3F-1 line.*

**Consistencia celular tras 6 pases de congelación y descongelación. Resultados.***Cell consistency alter 6 passages of freezing and thawing. Results.*

Se observa consistencia celular tras congelación y descongelación con crecimiento adecuado y características de indiferenciación.

*Cellular consistency after freezing and thawing, with adequate growth and undifferentiation characteristics.*

**Pase en el momento del registro***Passage at the time of the recording*

19

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

**Otras observaciones o información relevantes** (a juicio del Investigador Principal):

Other observations or relevant information (to the discretion of the Principal Investigator):

Esta línea se ha obtenido, expandido y criopreservado en condiciones totalmente libres de xenobióticos

Para la reprogramación se infectaron los fibroblastos con el sobrenadante retroviral del policistrón OSKG (OCT4, SOX2, Klf4 y GFP). Se realizan 2 rondas de infección en días consecutivos. Al día siguiente los fibroblastos fueron disociados y sembrados en placas con monocapas de XF-HFF en medio F44 que se cambió diariamente. Tras 25-35 días, se eligieron las colonias según su morfología y se pasaron a nuevas placas con iXF-HFF. Las líneas xenofree iPS obtenidas se mantuvieron en estas condiciones y se pasaron mediante disociación mecánica.

*This line was obtained, expanded and cryopreserved in totally xeno-free conditions.*

*For reprogramming fibroblasts were infected with retroviral supernatant encoding the OKSG polycistron (OCT4, SOX2, Klf4 and GFP). Two rounds of infection were performed on consecutive days. The following day, fibroblasts were dissociated and seeded onto iXF-HFF in F44m. the medium was replaced daily. Colonies were picked based on morphology 25-35 days after and replated onto fresh iXF-HFF. Xeno.free iPS lines were maintained in this conditions and passed by mechanical dissociation of colonies*

**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 4

## 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><br><i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i><br><i>(Legal Representative of the Department/Centre)</i><br><br>Fecha/ Date: 21/05/2010 | <b>Firma del Investigador Principal</b><br><i>Signature of the Principal Investigator</i><br><br><br>Fecha /Date 21/05/2010 |
| <b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b><br><i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i><br>Miguel Gómez Clares  |  |
| <b>Dirección Postal:</b><br><i>Postal Address:</i><br>Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona<br>Dr. Aiguader, 88, 7ª planta<br>08003. Barcelona.   | <b>Teléfono /Telephone:</b> +34 93 316 03 00<br><b>Fax:</b> +34 93 316 03 00<br><b>E-mail:</b> com@cmrb.eu   |