

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco <input checked="" type="checkbox"/> Crioconservado <input 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> 30.04.2014	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 22.01.2015
Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	Medio de cultivo/ Culture media: IMDM + 10%FBS + 0,5% Penicilin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation). 37°C- 5%CO2
¿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>	Si, p2 Yes, p2
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>	Generación de las células pluripotenciales inducidas (iPSC) a partir de fibroblastos (p3) de un donante sano, mediante la infección con virus sendai (CytoTune –iPS 2.0 Sendai reprogramming kit, A16517 life technologies) con expresión ectópica de 4 factores de transcripción (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc). The induced pluripotent stem cells (iPSC) were generated from fibroblasts (p3) of a healthy control, by sendai viral infection (CytoTune –iPS 2.0 Sendai reprogramming kit, A16517 life technologies) with ectopic expression of 4 transcription factors (Oct4, Sox2, Klf4 y 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>	Support: human foreskin fibroblasts (ATCC, American Type Culture Collection, CCD112Sk). 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)
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</i>	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.

<p><i>(form and size of the colonies; form and size of the cells; nucleus/cytoplasm ratio; others)</i></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>
<p>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <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 37°C mediante descongelación rápida.</p> <p>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.</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>p33-35</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></p> <p>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>	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>
Anexo Annex 1	Oct 4	inmunocitoq	24	+	
	Nanog	inmunocitoq	24	+	
	Sox 2	inmunocitoq	24	+	
	SSEA3	inmunocitoq	24	+	
	SSEA4	inmunocitoq	24	+	
	TRA-1-60	inmunocitoq	24	+	
	TRA-1-81	inmunocitoq	24	+	
	Fosfatasa. Alk	actividad	6	+	
Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i>	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>
	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	inmunocitoq.	Tuj1 /GFAP	26	+ / +
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunocitoq.	ASMA	26	+
	Endodermo <i>Endoderm</i>	inmunocitoq.	AFP/ FOXA2	26	+ / +
Descripción de las características de diferenciación in vitro <i>(espontánea/inducida)</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vitro</i> <i>(spontaneous/induced)</i>	<p>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 sobre células PA6 (ver Anexo 2).</p> <p>Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture Ectoderm: EBs culture in N2/B27 on PA6 cells (see Annex 2).</p>				

Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="758 226 863 286"> Método <i>Method</i> </th> <th data-bbox="892 226 1007 286"> Marcador <i>Marker</i> </th> <th data-bbox="1035 226 1161 286"> Nº pase <i>Passage n</i> </th> <th data-bbox="1190 226 1294 286"> Resultado <i>Results</i> </th> <th data-bbox="1323 226 1490 286"> Comentarios <i>Comments</i> </th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="582 315 724 376"> Ectodermo <i>Ectoderm</i> </td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="582 409 735 470"> Mesodermo <i>Mesoderm</i> </td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="582 504 735 564"> Endodermo <i>Endoderm</i> </td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>	Ectodermo <i>Ectoderm</i>					Mesodermo <i>Mesoderm</i>					Endodermo <i>Endoderm</i>				
Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>																	
Ectodermo <i>Ectoderm</i>																					
Mesodermo <i>Mesoderm</i>																					
Endodermo <i>Endoderm</i>																					
Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i>																					
Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i>	46,XY p31, p36 (Anexo 3) (Annex 3)																				
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>Los marcadores de microsatélites de la muestra inicial de fibroblastos coinciden con los de la línea de iPS generada. (Anexo 4)</p> <p>Microsatellite markers of the initial fibroblasts sample are identical than the markers of the iPS line (Annex 4)</p>																				
Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>	<p>No procede</p> <p>Not required</p>																				

Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i>	qPCR para detectar la ausencia del SeV y de los transgenes. (Annex 5) qPCR to detect the absence of SeV genome and transgenes (Annex 5)
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 required
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	Negativo por PCR (Anexo 6) Negative by PCR (Annex 6)

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3 Applicant Details

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

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.

<p>Firma en Representación del Centro / <i>Signature in Representation of the Centre</i> (Representante legal del Departamento/Centro) <i>(Legal Representative of the Department/Centre)</i></p>  <p>CMR[B] Fecha/Date: 13/01/2016</p>	<p>Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i></p>  <p>Fecha/Date: 13/01/2016</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Ángel Raya Chamorro, Director</p>	
<p>Dirección Postal: <i>Postal Address:</i></p> <p>Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona Doctor Aiguader, 88, 7ª planta, 08003, Barcelona</p>	<p>Teléfono /Telephone: 933160303</p> <p>Fax: 933160301</p> <p>E-mail: gerencia@cmrb.eu</p>

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR FiPS Ctrl1-SV4F-7 EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES

ANEXOS

Anexo 1: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

Anexo 2: Diferenciación *in vitro*

Anexo 3: Cariotipo

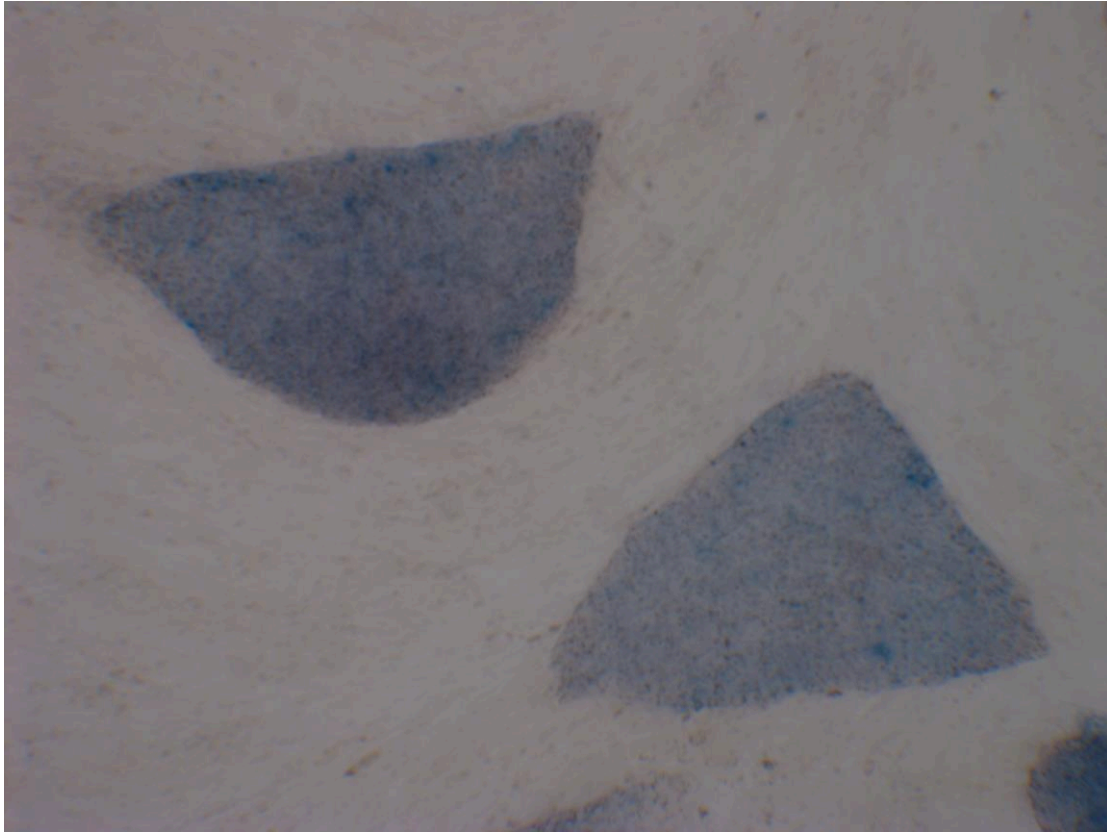
Anexo 4: Estudio microsatélites

Anexo 5: Test de silenciamiento

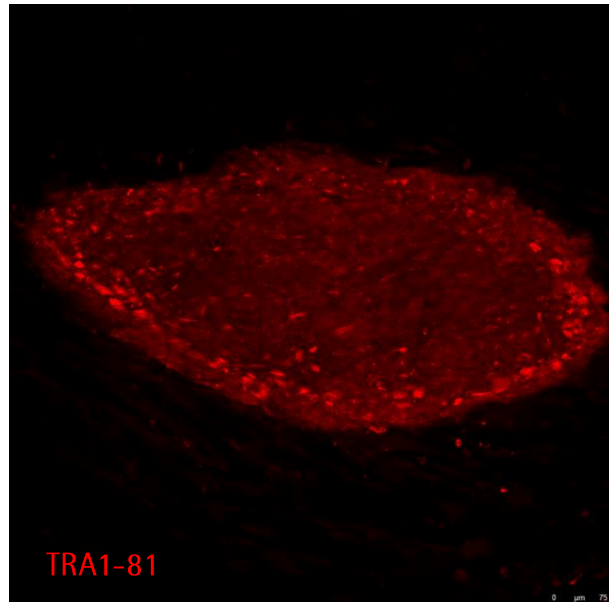
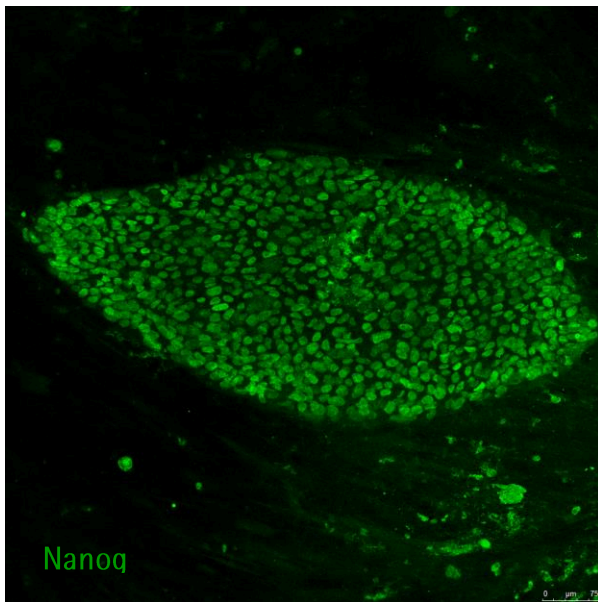
Anexo 6: Test de micoplasma

Anexo 1

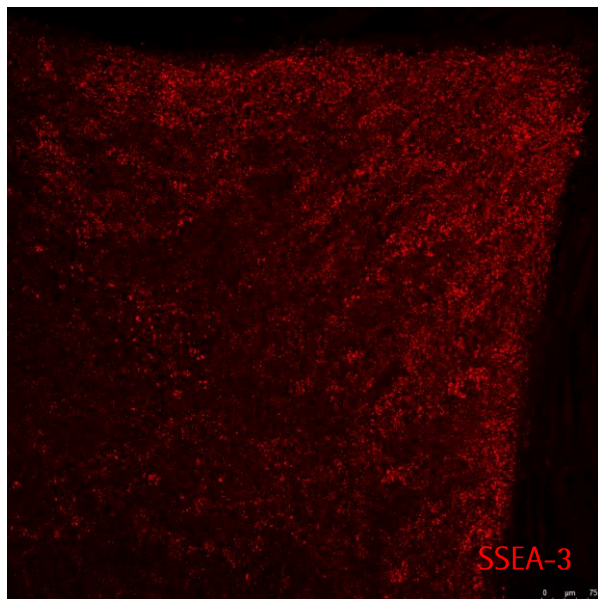
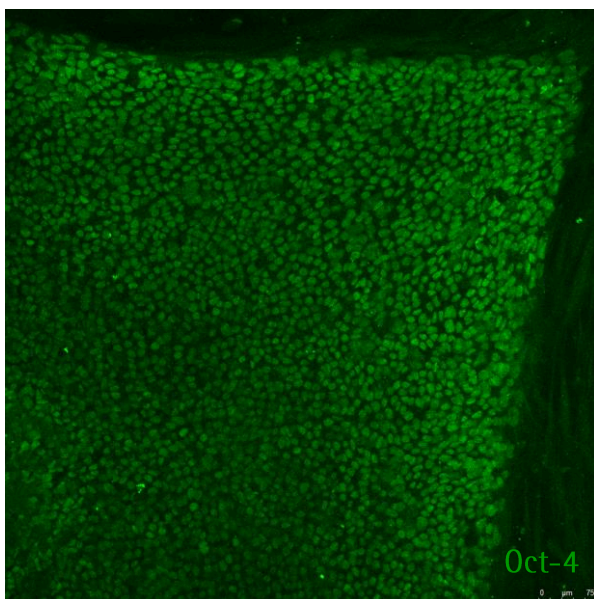
Fenotipo. Marcadores de pluripotencia



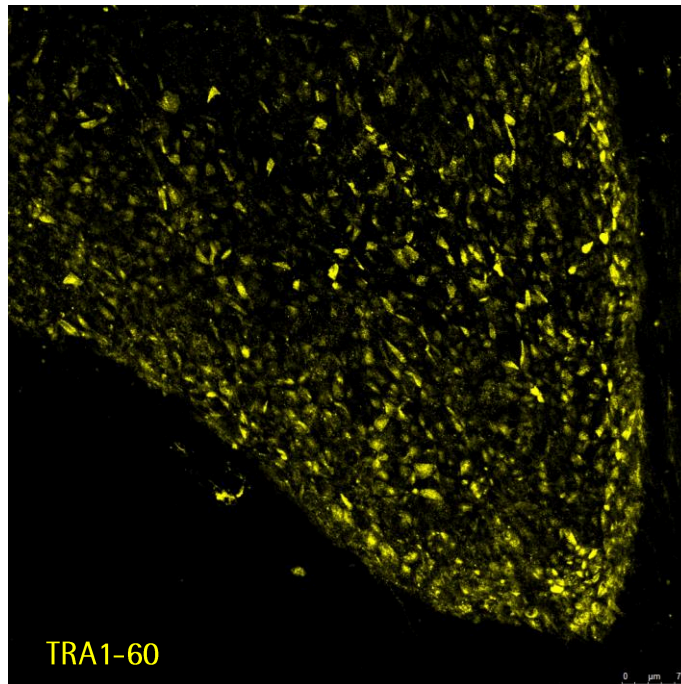
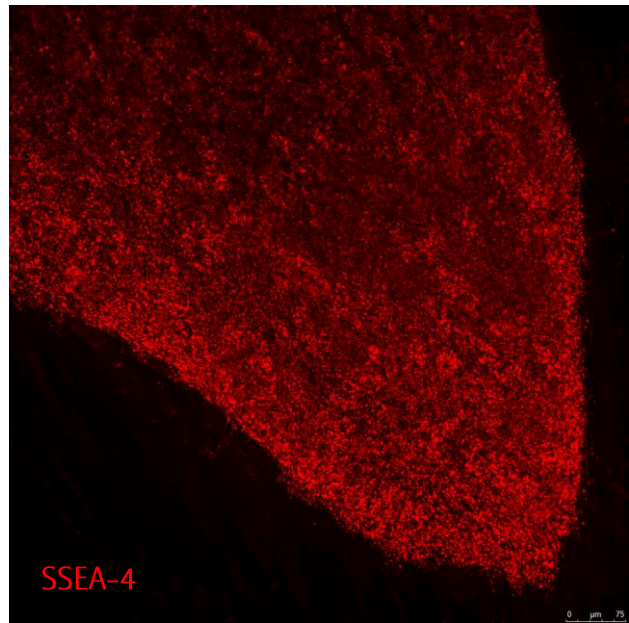
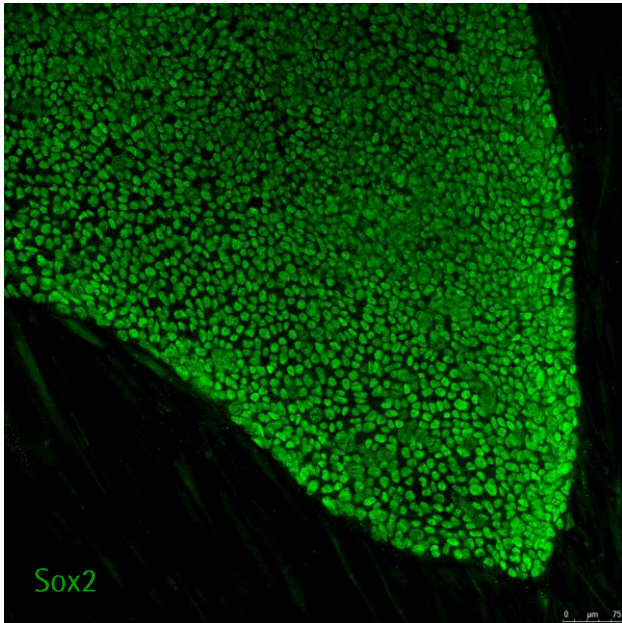
Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células madre pluripotentes



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia **Nanog** y **TRA1-81**



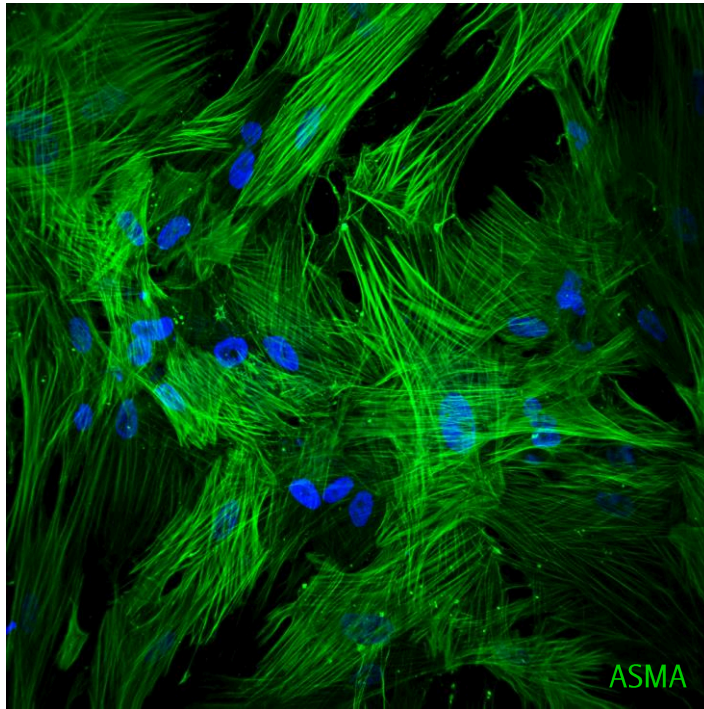
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia **Oct-4** y **SSEA-3**



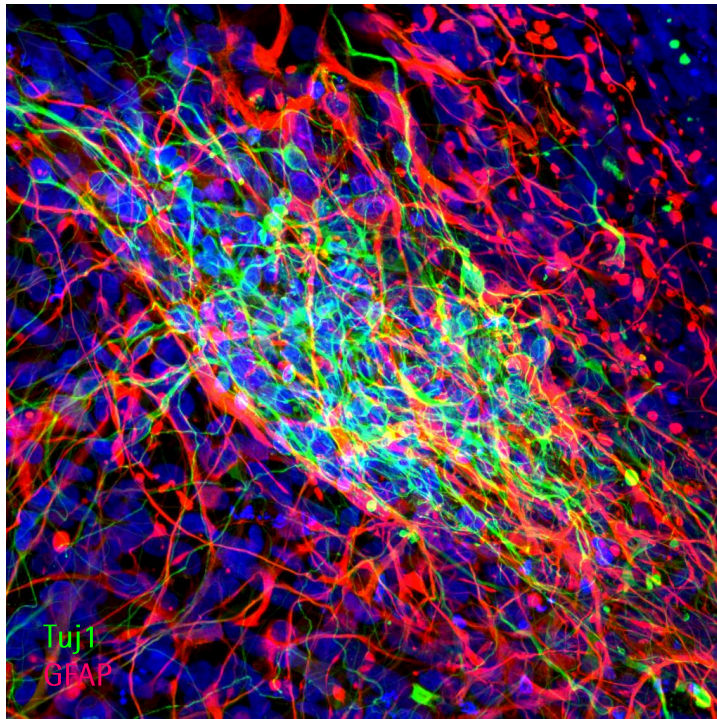
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia **Sox-2, SSEA-4** y **TRA1-60**

Anexo 2

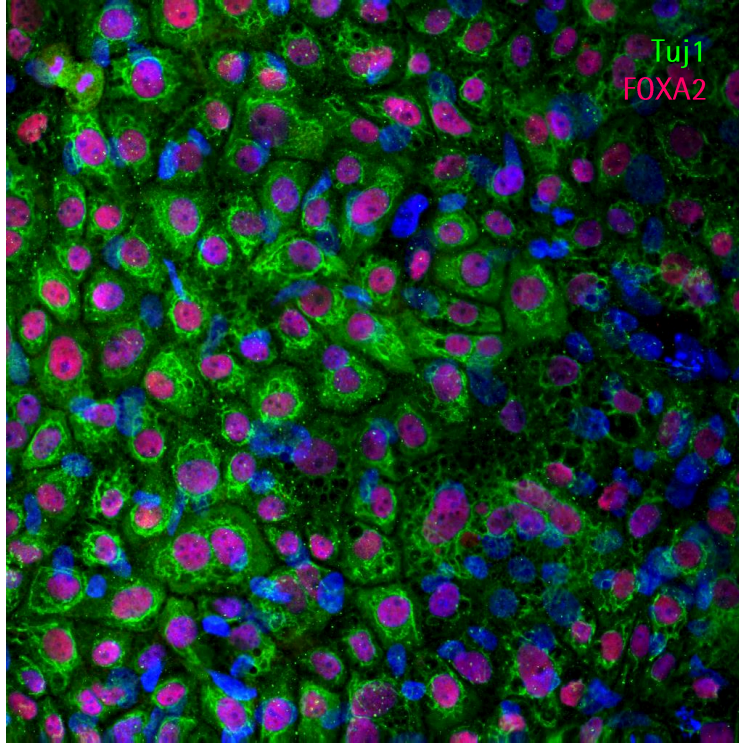
Diferenciación *in vitro*



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**

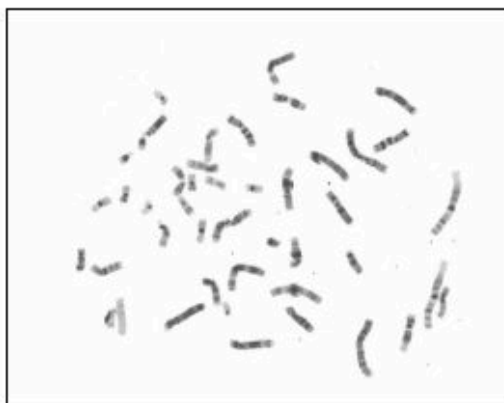
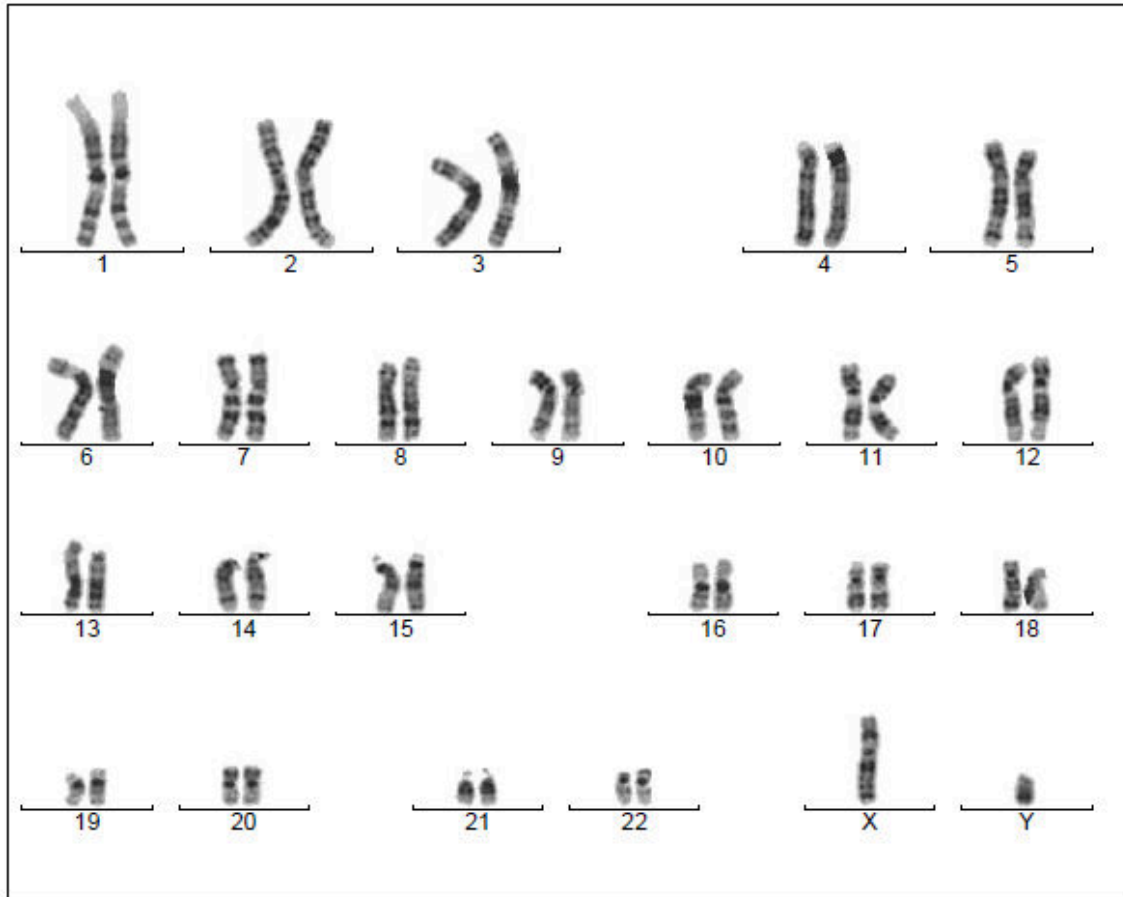


Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

Anexo 3

Cariotipo

Cytogenetic analysis



Case name: A163525

Patient name: FiPS Ctrl1 SV4F-7 p31

Specimen type: stem cells

Result: 46,XY

Anexo 4

Estudio microsatélites



En la tabla siguiente se muestran los resultados correspondientes a los alelos encontrados para cada uno de los marcadores microsatélites analizados.

línea celular	Loci STR analizados									
	AMEL	CSF1PO	D13S317	D16S539	D21S11	D5S818	D7S820	TH01	TPOX	vWA
FiPS Ctrl1 SV4F-7 p25	X,Y	11, 12	12, 13	10, 11	29, 31.2	12, 13	10, 11	6	8, 10, 12	18

línea celular	Loci STR analizados									
	AMEL	CSF1PO	D13S317	D16S539	D21S11	D5S818	D7S820	TH01	TPOX	vWA
Ctrl1F-ABB p2	X,Y	11, 12	12, 13	10, 11	29, 31.2	12, 13	10, 11	6	8, 10, 12	18

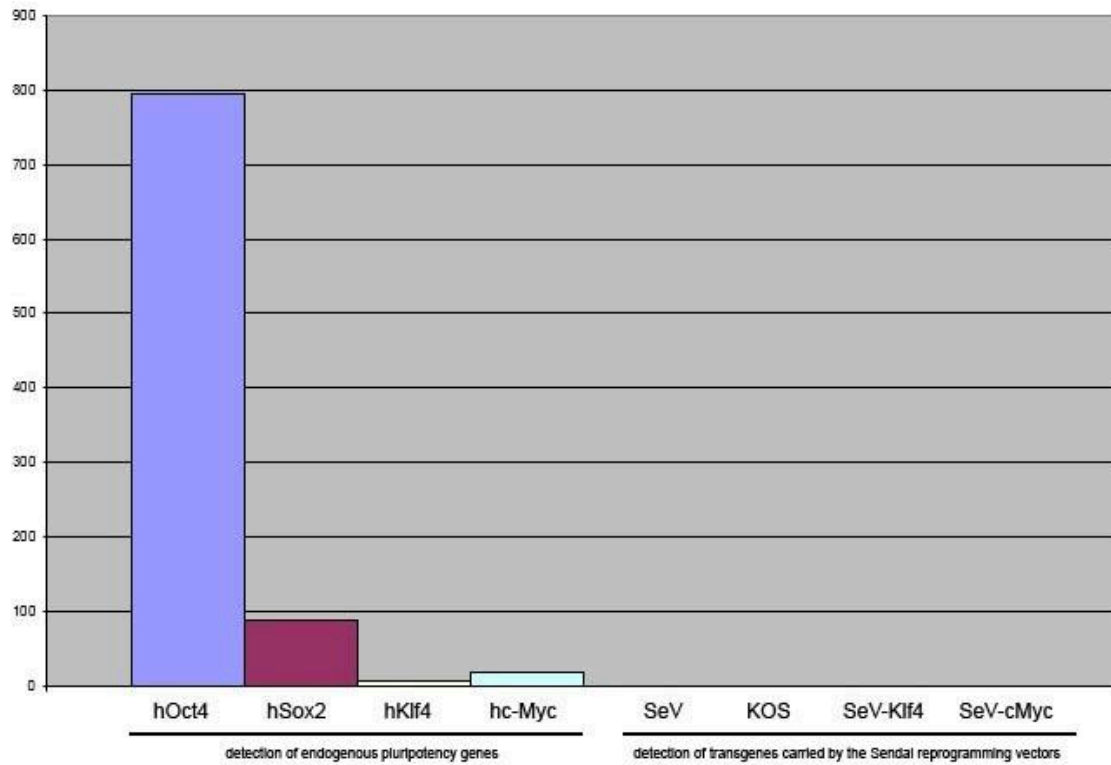
Análisis de microsatélites en la línea de células madre pluripotentes **FiPS Ctrl1-SV4F-7** y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.



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

Anexo 5

Estudio de integración



Análisis de qPCR mostrando la ausencia del SeV y de los transgenes .

Anexo 6

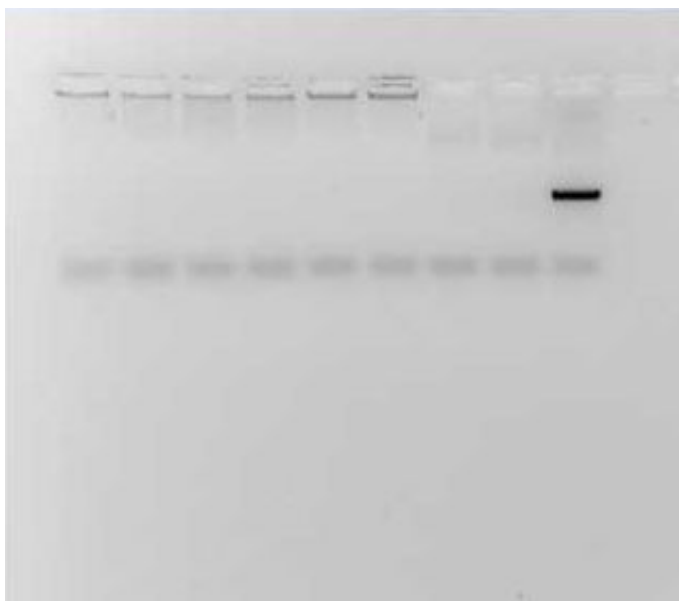
Test de micoplasma

MYCOPLASMA TEST

12-11-2015

1

2 3



1. FiPS Ctrl1 SV4F-7 p35

2. CT -

3. CT +