

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 a human iPS cell line

FECHA: 13.07.2017

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> | [IDDM1] FiPS 1.13-Ep6F-9 |
| 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 procedentes de biopsia de piel <i>Fibroblasts from skin biopsy</i> |
| Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i> | Masculino, 38 años Male, 38 years |
| ¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i> | NO <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) diabetes tipo1 No Yes (specify) type1 diabetes |
| ¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i> | NO <input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> (especificar) No Yes (specify) |

| | |
|---|---|
| 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> 3.7.2013 | Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 26.10.2015 |
| 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 + 1% 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> | p4 x 3 |
| 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> | Generación de las células pluripotenciales inducidas (iPSC) a partir de fibroblastos (p6) de un paciente con Diabetes tipo 1, mediante la nucleofección con Amaxa Human Dermal Fibroblast Nucleofactor kit (Lonza, #VPD-1001) y vectores episomales con expresión ectópica de 6 factores de transcripción (pCXLE-hOct3/4-shp53-F, Addgene #27077; pCXLE-hSK, Addgene #27078; pCXLE-hUL, Addgene #27080). En paralelo se nucleofectaron fibroblastos con el plásmido pCXLE-EGFP (Addgene # 27082) y las células se recogieron tras 72h para calcular la eficiencia de nucleoinfección y como control positivo para las PCRs. <i>The induced pluripotent stem cells (iPSC) were generated from fibroblasts (p6) of a Type 1 Diabetes, by nucleofection with Amaxa Human Dermal Fibroblast Nucleofactor kit (Lonza, #VPD-1001) and episomal vectors with ectopic expression of 6 transcription factors transcripción (pCXLE-hOct3/4-shp53-F, Addgene #27077; pCXLE-hSK, Addgene #27078; pCXLE-hUL, Addgene #27080). In parallel fibroblasts were nucleofected with a plasmid carrying EGFP (pCXLE-EGFP, Addgene # 27082) and cells were collected after 72h to calculate efficiency of nucleofection and as a positive control for PCRs.</i> |
| 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, CCD1112Sk). 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). |

| | |
|---|--|
| <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> | <p>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> <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>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><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>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>p17-22</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 Comments</i> | |
|---|---|---------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----|
| Anexo Annex 1 | Comentarios | | | | |
| | Oct 4 | inmunocitoq | 14 | | + |
| | Nanog | inmunocitoq | 14 | | + |
| | Sox 2 | inmunocitoq | 14 | | + |
| | SSEA3 | inmunocitoq | 14 | | + |
| | SSEA4 | inmunocitoq | 14 | | + |
| | TRA-1-60 | inmunocitoq | 14 | | + |
| | TRA-1-81 | inmunocitoq | 14 | | + |
| | Fosfatasa. Alk | actividad | 13 | | + |
| Test de diferenciación <i>In vitro differentiation test</i> | Método <i>Method</i> | Marcador <i>Marker</i> | Nº pase <i>Passage n</i> | Resultado <i>Results Comments</i> | |
| | Comentarios | | | | |
| | Ectodermo <i>Ectoderm</i> | inmunocitoq. Tuj1 /GFAP | 15 | | +/+ |
| | Mesodermo <i>Mesoderm</i> | inmunocitoq. ASMA/ASA | 15 | | +/+ |
| | Endodermo <i>Endoderm</i> | inmunocitoq. AFP/ FOXA2 | 15 | | +/+ |
| Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> (espontánea/inducida) <i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i> | <p>Mesodermo: cultivo de cuerpos embrioides (EBs) en medio de cultivo de EBs suplementado con ácido ascórbico.</p> <p>Endodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio de EBs</p> <p>Ectodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio N2/B27 (ver Anexo 2).</p> <p><i>Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in EB medium supplemented with ascorbic acid.</i></p> <p><i>Endoderm: EBs culture in EB medium</i></p> <p><i>Ectoderm: EBs culture in N2/B27 medium (see Annex 2).</i></p> | | | | |

| <p>Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i></p> | <table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="558 226 724 293">Comentarios</th> <th data-bbox="724 226 852 293">Método <i>Method</i></th> <th data-bbox="852 226 1011 293">Marcador <i>Marker</i></th> <th data-bbox="1011 226 1171 293">Nº pase <i>Passage n</i></th> <th data-bbox="1171 226 1477 293">Resultado <i>Results</i></th> <th data-bbox="1477 226 1477 293"><i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="558 349 724 416">Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="558 443 724 510">Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="558 537 724 604">Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> | Comentarios | Método <i>Method</i> | Marcador <i>Marker</i> | Nº pase <i>Passage n</i> | Resultado <i>Results</i> | <i>Comments</i> | Ectodermo <i>Ectoderm</i> | | | | | | Mesodermo <i>Mesoderm</i> | | | | | | Endodermo <i>Endoderm</i> | | | | | |
|---|---|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|------------------------------|--|--|--|--|--|------------------------------|--|--|--|--|--|------------------------------|--|--|--|--|--|
| Comentarios | Método <i>Method</i> | Marcador <i>Marker</i> | Nº pase <i>Passage n</i> | Resultado <i>Results</i> | <i>Comments</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ectodermo <i>Ectoderm</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mesodermo <i>Mesoderm</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Endodermo <i>Endoderm</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i></p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i></p> | <p>46 XY, p12, p22 (Anexo3/Annex3)</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>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> | <p>Los marcadores de microsatélites de la muestra inicial de fibroblastos coinciden con los de la línea de iPS generada. (Anexo 4)</p> <p><i>Microsatellite markers of the initial fibroblasts sample are identical than the markers of the iPS line (Annex 4)</i></p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i></p> | <p>El análisis mediante QRT-PCR mostró la ausencia de plásmidos episomales en la línea de iPSC, en fibroblastos control no-nucleofectados y presencia de plásmidos en fibroblastos control nucleofectados con GFP tras 72h tras nucleofección (Anexo 5).</p> <p><i>The absolute quantitative real time PCR showed absence of episomal plasmids in iPSCs and non-nucleofected fibroblasts and presence of plasmids in GFP nucleofected control fibroblasts 72h after nucleofection (Annex 5).</i></p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | |
|--|--|
| <p>Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i></p> | <p>La QRT_PCR evidenció los niveles de expresión de mRNA de marcadores de pluripotencia endógenos (CDS) y de p53 y EBNA-1 de fibroblastos control nucleofectados con GFP 72h tras nucleofección (pla) (Anexo 5)</p> <p><i>PCR showed mRNA expression levels of endogenous pluripotency markers (CDS) and no expression of transgenes (pla) and as control p53 and EBNA-1 expression of GFP nucleofected control fibroblasts 72h after nucleofection (Annex 5).</i></p> |
| <p>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></p> | <p>No procede</p> <p><i>Not required</i></p> |
| <p>Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i></p> | <p>Negativo por PCR (Anexo 6)</p> <p><i>Negative by PCR (Annex 6)</i></p> |

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE
Section 3 Applicant Details

| | |
|---|--|
| <p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Anna Veiga</p> | <p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Gran Via de l'Hospitalet 199, 08908 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona</p> |
| <p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona</p> | <p>Teléfono (phone): 93 3160360</p> <p>Fax: 93 31603601</p> <p>E-mail: blc@cmrb.eu</p> |

| | |
|---|--|
| <p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Rosa Gasa</p> | <p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> C/Rosselló 149-153 08036 Barcelona</p> |
| <p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)</p> | <p>Teléfono (phone): 93 2275400 ext. 4552</p> <p>Fax:</p> <p>E-mail: rgasa@clinic.cat</p> |

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

Confirmando 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 / Signature in Representation of the Centre (Representante legal del Departamento/Centro) (Legal Representative of the Department/Centre)</p>  <p>Fecha/Date: 25/07/2017</p> | <p>Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator</p>  <p>Fecha/Date: 25/08/17</p> |
| <p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Name and Position of the Person Representing the Centre: Angel Raya. Director</p> | |
| <p>Dirección Postal: Postal Address: Gran Via de l'Hospitalet 199. 08908 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona</p> | <p>Teléfono /Telephone: 93 3160320 Fax: 93 3160301 E-mail: gerencia@cmrb.eu</p> |

| | |
|--|---|
| <p>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre (Representante legal del Departamento/Centro) (Legal Representative of the Department/Centre)</p> <p>Fecha/Date:</p> | <p>Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator</p>  <p>Fecha/Date: 17/7/17</p> |
| <p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Name and Position of the Person Representing the Centre: Elías Campo, Director</p> | |
| <p>Dirección Postal: Postal Address: C/Rosselló 149-153 Barcelona 08036</p> | <p>Teléfono /Telephone: +34 93 3129444 Fax: E-mail: direccio@idibaps.org</p> |

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR [IDDM1] FiPS 1.13-Ep6F-9 EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES

ANEXOS

Anexo 1: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

Anexo 2: Diferenciación *in vitro*

Anexo 3: Cariotipo

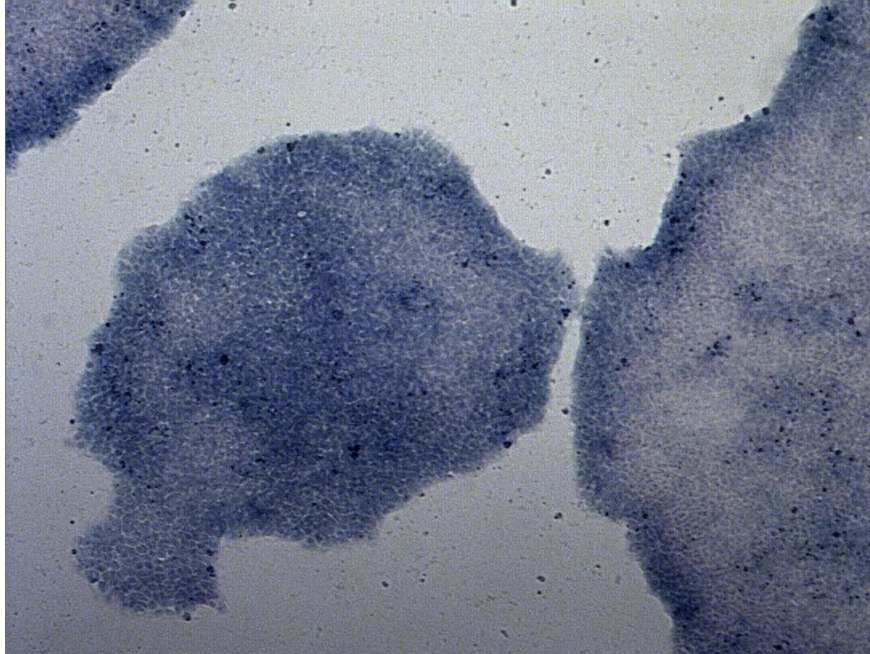
Anexo 4: Resultados microsatélites

Anexo 5: Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

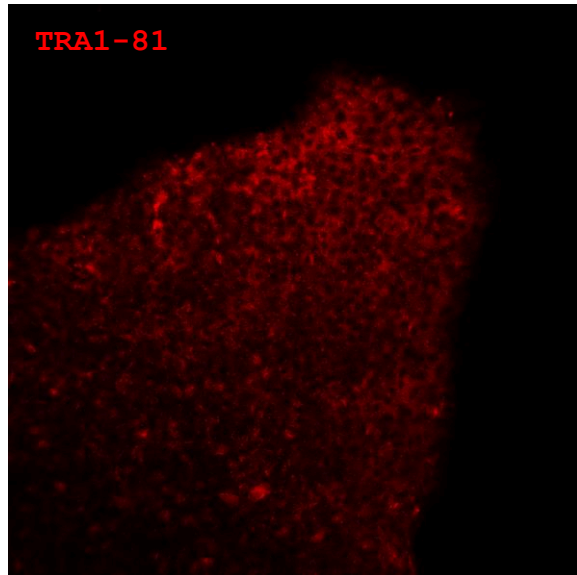
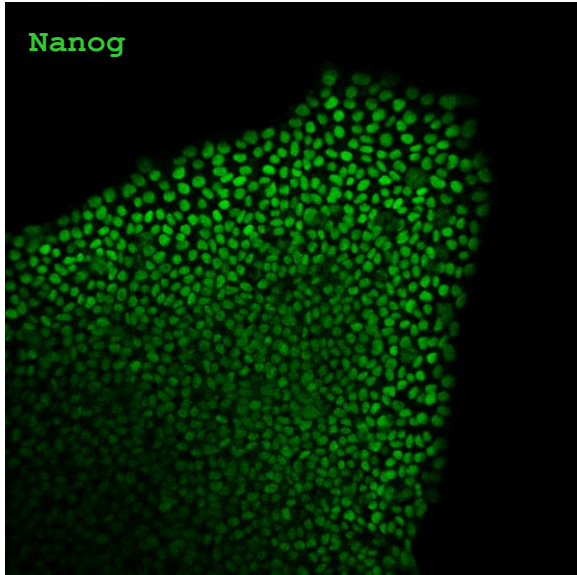
Anexo 6: Resultado test de micoplasma

Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

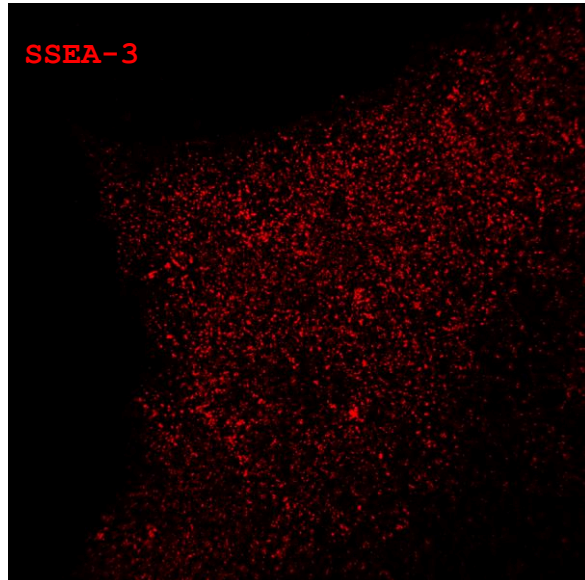
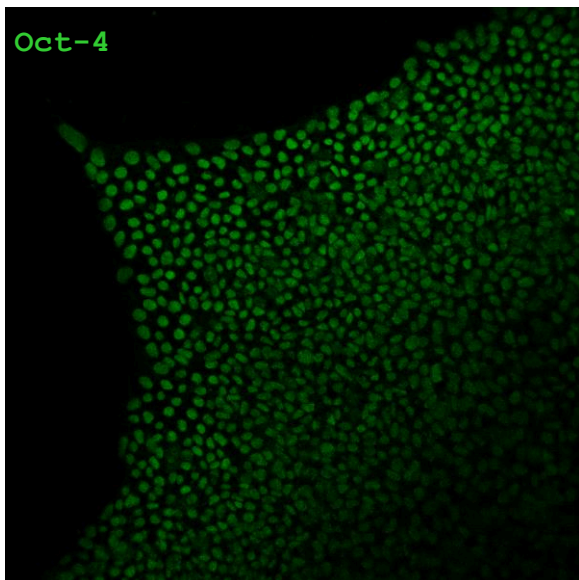


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



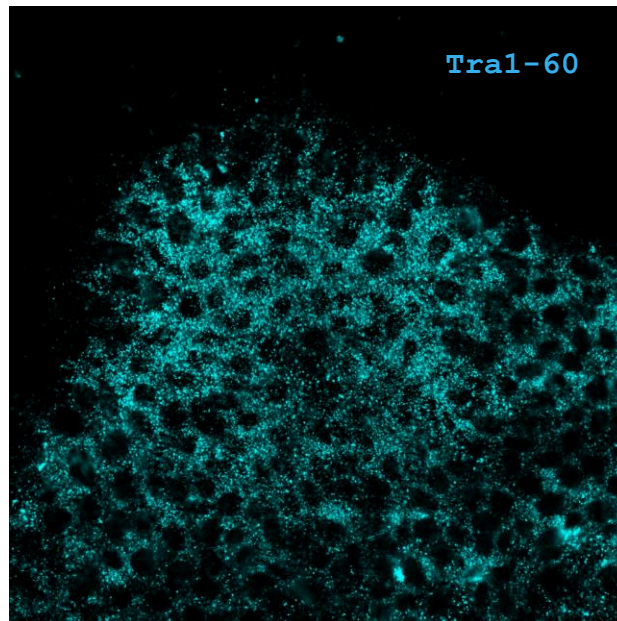
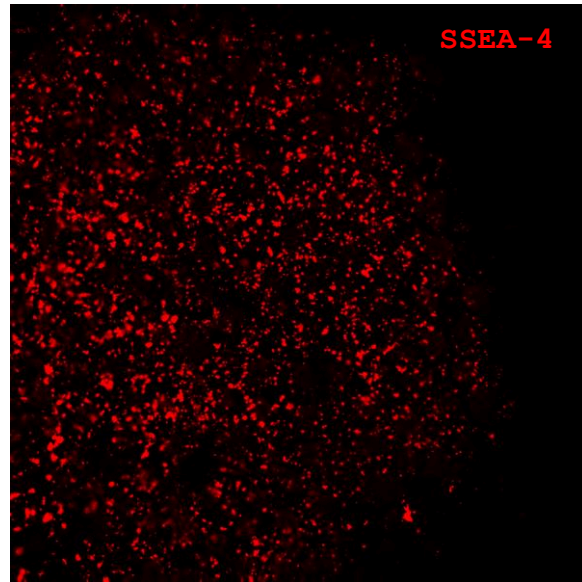
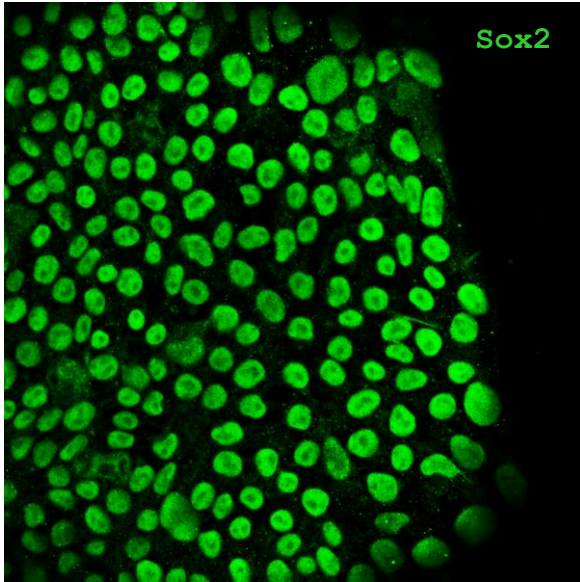
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3

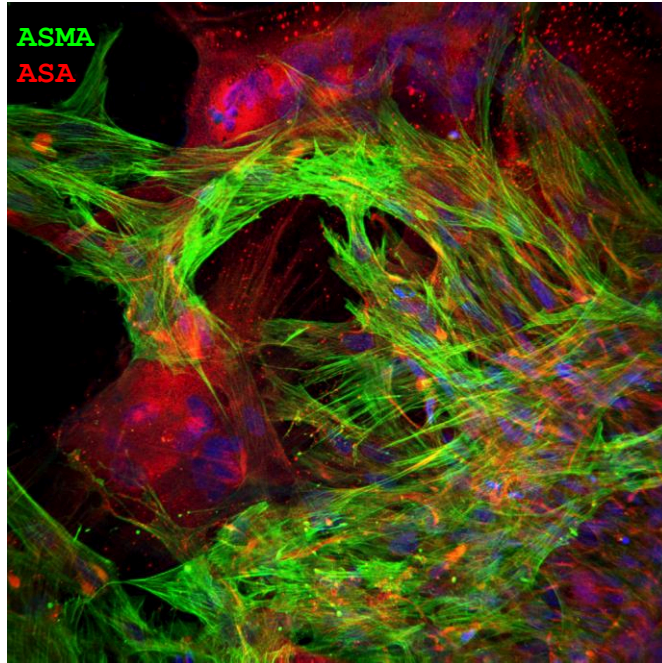


Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

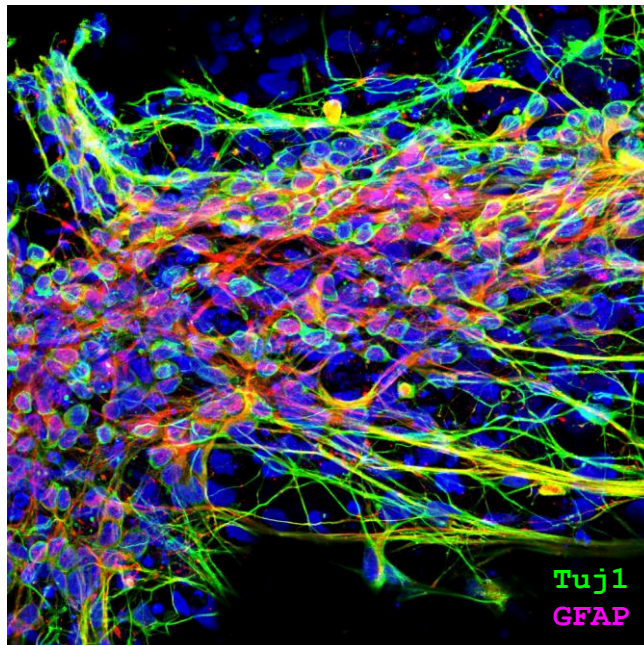
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

Anexo 2

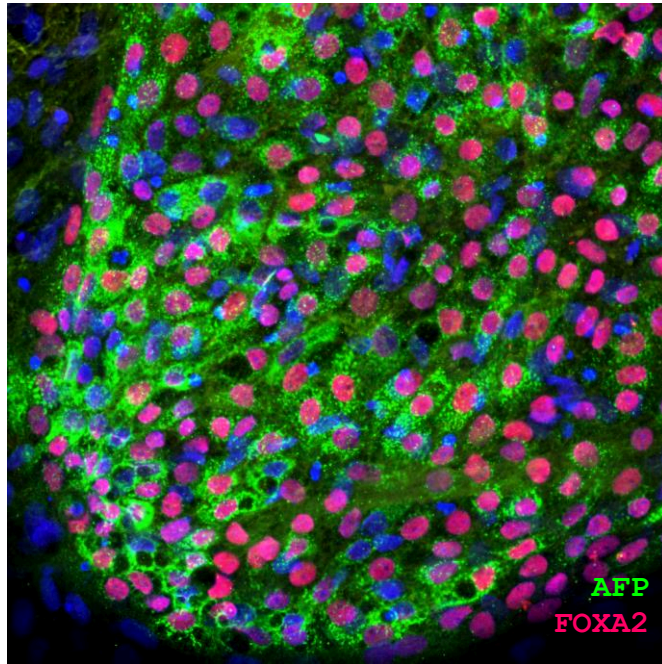
Diferenciación *in vitro*



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



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

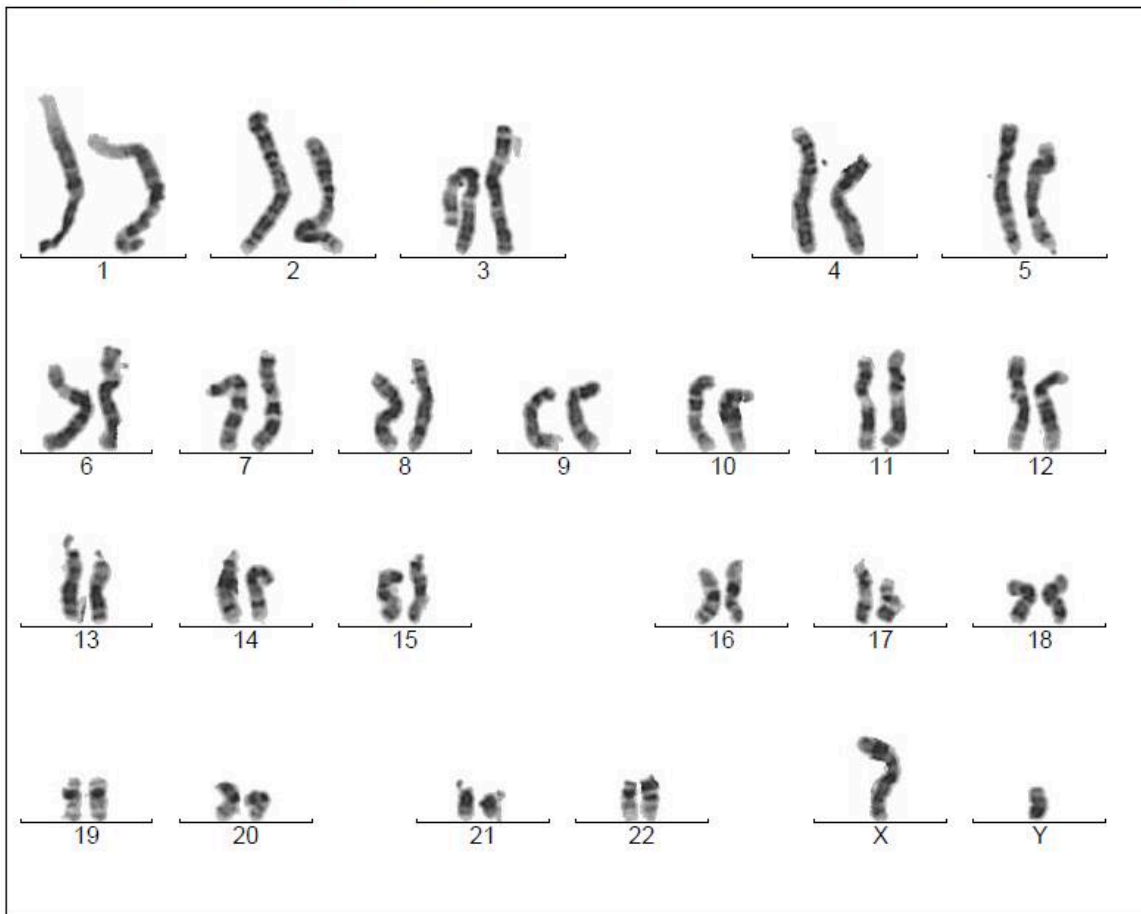


Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **AFP y FOXA2**

Anexo 3

Cariotipo

Cytogenetic analysis



Case name: A179623

Patient name: IDDM-1 FiPS1.13-Ep6F-9 p22

Specimen type: stem cells

Result: 46,XY

Anexo 5

Resultado microsatélites

Servicio de autenticación de líneas celulares

Detalles de la solicitud

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

Detalles de la muestra

Identificador externo: IDDM1 FiPS1-13-Ep6F#9 p14 (1)
Identificador interno: qG16020438
Descripción: 1 epp DNA cell line.

Informe de resultados

Resultados

Calidad de la muestra: Correcta

| Muestra | TH01 | D21S11 | D5S818 | D13S317 | D7S820 | D16S539 | CSF1PO | AMEL | vWA | TPOX |
|-------------------------------|-------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|------|-------|------|
| IDDM1 FiPS1-13-Ep6F#9 p14 (1) | 6-9.3 | 30-32.2 | 12-13 | 8-14 | 8-9 | 11-13 | 9-10 | XY | 16-20 | 10 |

Coincidencia con línea celular conocida: No Cual:

Contaminación con otra línea celular humana: No detectable

Observaciones: El patrón alélico de la muestra analizada concuerda con el patrón de la muestra D1.13 p9 en 19 de los 20 alelos (ausencia del alelo 12 del marcador TPOX)

Firmado:
Manel Garcia

Fecha: 18/07/2016

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). Este método no permite distinguir la estructura genética subyacente a los resultados observados. Por ejemplo, no permite determinar si una muestra homocigota lo es realmente (tiene dos alelos iguales), o si se trata de un alelo combinado con una delección en el otro alelo.

Informe de resultados

Resultados

Calidad de la muestra: Correcta

| Muestra | TH01 | D21S11 | D5S818 | D13S317 | D7S820 | D16S539 | CSF1PO | AMEL | vWA | TPOX |
|-------------------|-------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|------|-------|-------|
| Diabetis D1.13 p8 | 6-9.3 | 30-32.2 | 12-13 | 8-14 | 8-9 | 11-13 | 9-10 | XY | 16-20 | 10-12 |

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 IDDM-1 D1-13 FiPS 4F-11 (qG15013237).

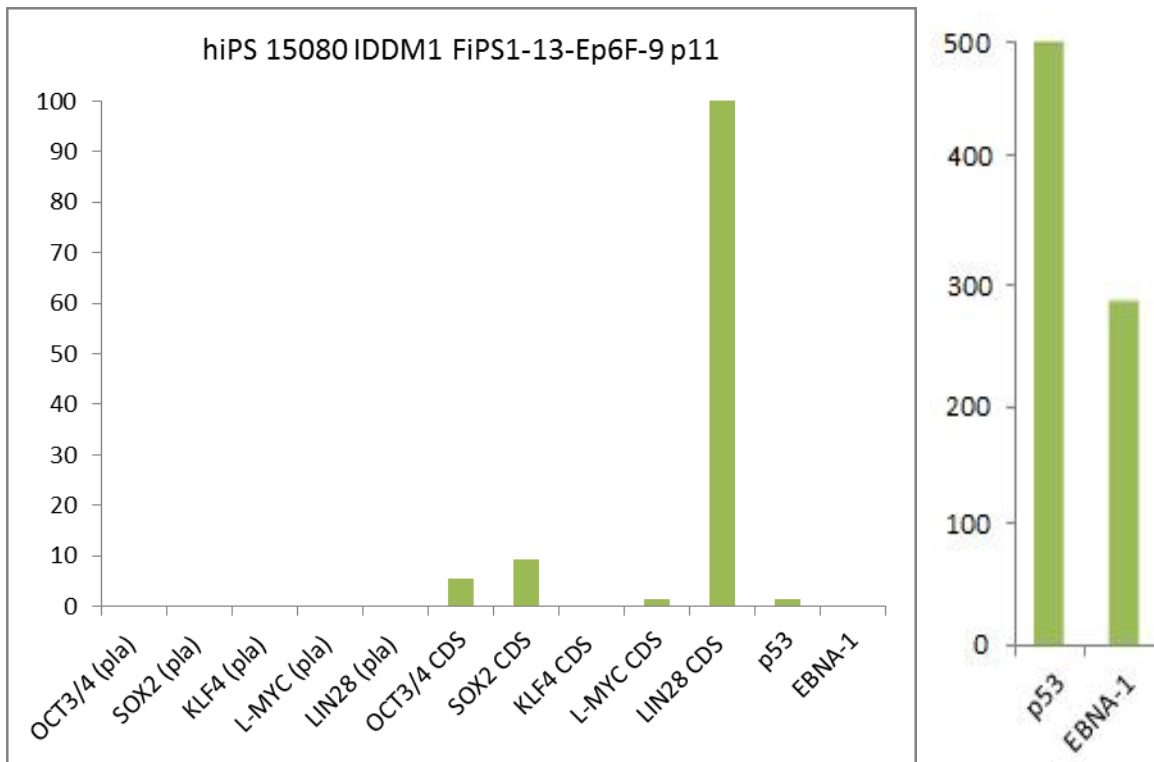
Firmado:
Manel Garcia

Fecha: 02/06/2015

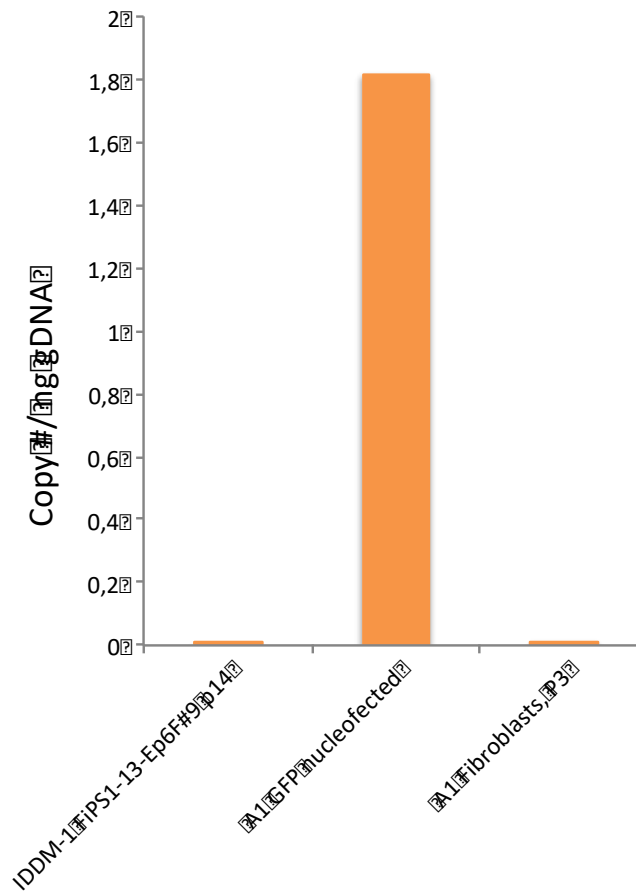
Análisis de microsatélites en la línea de células madre pluripotentes [IDDM1] FiPS 1.13-Ep6F-9 y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.

Anexo 5

Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación



Niveles de expresión de mRNA de transgenes (pla) y marcadores de pluripotencia endógenos (CDS).



QRT-PCR donde se muestra la ausencia de plásmidos episomales en la línea de iPSC y en fibroblastos control no-nucleofectados y la presencia de plásmidos en fibroblastos control GFP-nucleofectados 72h después de la nucleofección.

Anexo 6

Resultado test de micoplasma

MYCOPLASMA TEST

09-11-2016

1

2

3



1. IDDM1 FiPS1.13 Ep6F-9 p21

2. CT -

3. CT +