

# BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)

*National Bank of Stem Cell Lines*

## IMPRESO DE SOLICITUD DE DEPÓSITO DE UNA LÍNEA iPS

*Application Form to Deposit an iPS cell line of human origin*

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:**

*Name of the line:*

[GD] FiPS-4F-21c

**Investigador principal:** Juan Carlos Izpisúa Belmonte

*Principal Investigator:*

**Tipo de célula de la que se obtiene la línea:**

*Cell type origin of the cell line*

Fibroblastos de dermis humanos

*Human dermal fibroblasts*

**¿El sujeto fuente tiene alguna patología?**

*Has the donor any pathological condition?*

**NO**

*No*

**SÍ**

(especificar) Enfermedad de Gaucher

*Yes*

(specify)

*Gaucher Disease*

**¿La patología es de origen genético?**

*Is the pathological condition of genetic origin?*

**NO**

*No*

**SÍ**

(especificar) Es un heterocigoto compuesto en el gen GBA1. En un alelo presenta la mutación 721 G→A y en el otro la mutación 1448 T→C.

*Yes*

(specify)

*Es un heterocigoto compuesto en el gen GBA1. En un alelo presenta la mutación 721 G→A y en el otro la mutación 1448 T→C.*

*Yes, it is a compound heterozygote mutation in the GBA1 gene. In one allele there is the 721 G→A mutation and in the other the 1448 T→C.*

*Mutation confirmed by sequencing (see annex 6)*

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

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

Se realiza análisis de marcadores STR en [GD] FiPS-4F-21c y fibroblastos de origen

Analysis of STR markers in [GD]FiPS-4F-21c and original fibroblast

### Cariotipo/Karyotype

**Euploide/Euploid**  **Anormal/Atypical**  (especificar/specify) **46,XX (inv,12)**

(Ver anexo 3)

(See annex 3)

## SECCIÓN 2

### Section 2

## Datos del Depositante

### Applicant Details

<b>Investigador Principal:</b> <i>Principal Investigator:</i> Juan Carlos Izpisúa Belmonte	<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal address:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona Dr Aiguader 88 08003 Barcelona
<b>Centro de Trabajo:</b> <i>Institution:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona	<b>Teléfono (phone):</b> 933160300 <b>Fax:</b> 933160301 <b>E-mail:</b> osr@cmrb.eu

## SECCIÓN 3

### Section 3

## Datos de la Línea Celular

### Details of Cell Line

<b>Tejido de origen y localización anatómica de la muestra biológica</b> <i>Tissue of origin and anatomic location of the biological sample</i> Fibroblastos de dermis humanos / Human <i>Dermal fibroblasts</i>	
<b>Muestra biológica</b> <i>Biological sample</i> <b>Fresco</b> <input type="checkbox"/> <b>Crioconservado</b> <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>	
<b>Fecha de la donación de la muestra biológica</b> <i>Date of donation of the biological sample</i> 14/11/2008	<b>Fecha del uso o descongelación (si congelado)</b> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 06/02/2009

**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).*

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), 8 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).

**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)*

(Anexo 1)

**Bacteriología Negativo**

*(Bacteriology) Negative*

**Micología Negativo**

*(Mycology) Negative*

**Micoplasma: PCR Negativo**

*(Mycoplasma: by PCR) Negative*

<b>Marcadores:</b> <i>Markers</i> (Anexo2)				
	<b>Método</b> <b>(ARN/proteínas)</b> <i>Method</i> <i>(RNA/proteins)</i>	<b>nº pase</b> <i>Passage n.</i>	<b>resultado</b> <i>results</i>	<b>comentarios</b> <i>comments</i>
<b>Oct 4</b>	inmunofluorescencia	21	+	
<b>Nanog</b>	inmunofluorescencia	21	+	
<b>Rex 1 (opcional/optional)</b>				
<b>Sox 2</b>	inmunofluorescencia	21	+	
<b>SSEA3</b>				
<b>SSEA4</b>	inmunofluorescencia	21	+	
<b>TRA-1-60</b>	inmunofluorescencia	21	+	
<b>TRA-1-81</b>	inmunofluorescencia	21	+	
<b>Telomerasa/Telomerase (opcional/optional)</b>				
<b>Fosfatasa Alc. /Alkaline phosphatase</b>		21	+	
<b>Otros / Others</b>				

<b>Capacidad de diferenciación</b> <i>Differentiation capacity</i>									
	<b>Ectodermo/ Ectoderm</b>			<b>Endodermo/Endoderm</b>			<b>Mesodermo/ Mesoderm</b>		
	<b>marcador</b> <i>marker</i>	<b>pase</b> <i>passage</i>	<b>resultado</b> <i>result</i>	<b>marcador</b> <i>marker</i>	<b>pase</b> <i>passage</i>	<b>resultado</b> <i>result</i>	<b>marcador</b> <i>marker</i>	<b>pase</b> <i>passage</i>	<b>resultado</b> <i>result</i>
<b>In Vitro</b> <i>In vitro</i> (Anexo 4)	Tuj-1 GFAP	p14	+	AFP Foxa2	p14	+	Gata-4 AAS	14	+
<b>In vivo/ in vivo</b> <b>pase/passage:</b> (Anexo 5)	p14			<b>Método: Formación de teratomas en ratones SCID</b> <i>Method: Teratoma formation in SCID mice</i>			<b>Resultado: +</b> <i>Result: +</i>		

<b>OPCIONAL/OPTIONAL:</b>
<b>Reprogramación del perfil de expresión génica</b> <i>Reprogramming of gene expression profile</i>
<b>Reprogramación del perfil de metilación del ADN</b> <i>Reprogramming of DNA methylation profile</i>
<b>Longitud telomérica</b> <i>Telomere length</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 en medio de cultivo. Ectodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio N2/B27 sobre células PA6 (ver Anexo 4).

*Mesoderm: Embryoids bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture in culture medium. Ectoderm: EBs culture in N2/B27 on PA6 cells (see Annex 4).*

**Datos de la determinación de pluripotencialidad *in vivo* o formación de teratomas**

*Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation*

Inyección intratesticular en ratones SCID de clumps de células indiferenciadas y tras aproximadamente 8 semanas, análisis de los teratomas producidos mediante técnicas de inmunohistoquímica para ectodermo, mesodermo y endodermo. (ver Anexo 5).

*Clumps 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 (see Annex 5).*

**Datos de la tipificación HLA** No realizado

*HLA typification data Not carried out*

**Integración de los transgenes de reprogramación: gPCR para integración de provirus**

*Integration of reprogramming transgenes: gPCR for provirus integration*

Una única inserción en el genoma (no mapeada) que después se escindió con la expresión de la recombinasa CRE. Comprobado por southern-blot. CRE se introdujo con un sistema lentiviral no integrativo y no se ha comprobado la integración de la recombinada CRE en el genoma.

*There was only one insertion in the genome (not mapped) that was removed by CRE recombinase expression. It was checked by Southern-blot. CRE was delivered by a non integrative Lentiviral system so the integration of the provirus hasn't been checked.*

**Silenciamiento de los transgenes de reprogramación: RT-PCR o Q-RT-PCR**

*Silencing of reprogramming transgenes: RT-PCR o Q-RT-PCR*

Por qRT-PCR. Transgenes silenciados

*By qRT-PCR. Transgenes are silenced*

**Mantenimiento a largo plazo en cultivo: > 20 pases**

*Long-term maintenance in culture: >20 passages*

La línea se ha mantenido en cultivo durante 32 pases.

*The line has been culture during 32 passages*

**Pase en el momento del registro**

*Passage at the time of the recording*

Pase 30

*Passage 30*

**¿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):

La línea celular fue generada mediante núcleo infección con un DNA lineal que contiene un cassette de reprogramación compuesto de un promotor CAG expresando un policistron de 5 genes: Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (murinos) y GFP. Los 5 genes están conectados por '2A-self leaving peptides'. El cassette de reprogramación está flanqueado por sitios loxP, otorgando la posibilidad de eliminar el cassette de reprogramación utilizando recombinasa CRE.

La línea sufrió una única inserción del transgen (demostrado por southern). Los sitios de inserción NO han sido mapeados.

La línea se cultivó hasta pase 10. Se infectó con un lentivirus no integrativo expresando CRE recombinasa. Se aisló el subclon 21c y se confirmó la eliminación del cassette de reprogramación (confirmado por southern). El subclon fue pasado 12 pases más.

Nota: si bien se utilizó un lentivirus no integrativo para expresar CRE recombinasa, existe la posibilidad de que haya integraciones del provirus en el genoma de las líneas. Esto no se ha chequeado.

*The cell line was generated by nucleoinfection with a linear DNA containing a reprogramming cassette composed of a CAG promoter by expressing a policistron 5 genes: Oct4, SOX2, Klf4 and c-myc (all murine) and GFP. The 5 genes are connected by '2A-self leaving peptides'. The reprogramming cassette is flanked by loxP sites, giving the possibility of eliminating the cassette using CRE recombinase.*

*The line suffered a single insertion of the transgene (demonstrated by southern). No insertion sites were mapped.*

*The line was cultured up to passage 10. It was infected with a not integrative lentivirus expressing CRE recombinase. The subclon 21c was isolated and confirmed the elimination of the reprogramming cassette (confirmed by southern). The subclon was culture 12 more passages.*

*Note: Although using a not integrative lentivirus to express CRE recombinase, could be a possibility of integrations of the provirus in the genome of the lines. This has not been checked.*

**Nota: Esta línea celular se adaptó también a matrigel.**

**Note: This cell line is growing not only in feeders but also in matrigel-based feeders-free cultured system**

**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

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.*

<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: 03/06/2013	<b>Firma del Investigador Principal</b> <i>Signature of the Principal Investigator</i>  Fecha /Date 03/06/2013
<b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b> <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Miguel Gómez Clares - Gerente	
<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal Address:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona Dr. Aiguader, 88. 08003. Barcelona	<b>Teléfono /Telephone:</b> 933160303 <b>Fax:</b> 933160301 <b>E-mail:</b> gerencia@cmrb.eu

# ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR [GD]FiPS-4F-21c EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES.



## ANEXOS

Anexo 1: Informe independiente del análisis microbiológico [GD]FiPS-4F-21c

Anexo 2: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia [GD]FiPS-4F-21c

Anexo 3: Cariotipo [GD]FiPS-4F-21c

Anexo 4: Diferenciación *in vitro* [GD]FiPS-4F-21c

Anexo 5: Diferenciación *in vivo* [GD]FiPS-4F-21c

Anexo 6: Genotipación de la línea [GD]FiPS-4F-21c



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

## Anexo 1

# Informe independiente del análisis microbiológico

Peticció : 88930  
NO INDUSTRIA  
MUTUA

H: //GL59184306

C. MEDICINA REGENERATIVA DE BA  
D.N.I. :  
Edat : T.F.: Global  
Data extracció : 06-11-12

[GD] FiPS 4F-21c, p28

[GD] FiPS 4F-21c p28

## MYCOPLASMES/UREAPLASMES UROGENITALS : CULTIU EN MOSTRA

Mostra : MOSTRA

RESULTAT ..... No s'observa creixement

### CULTIU

Tècnica : Cultiu en medis de enriquiment i selectius.

MOSTRA : MOSTRA

RESULTAT ..... No s'observa creixement

### CULTIU MICOLÒGIC

MEDI D'AÏLLAMENT I CULTIU : Agar Sabouraud amb Gentamicina i Cloranfenicol.

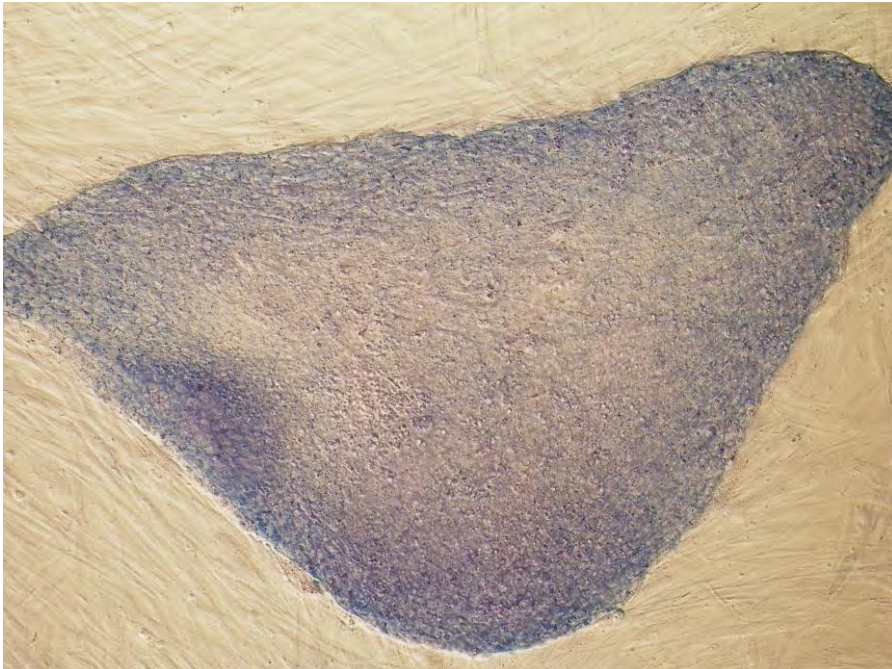
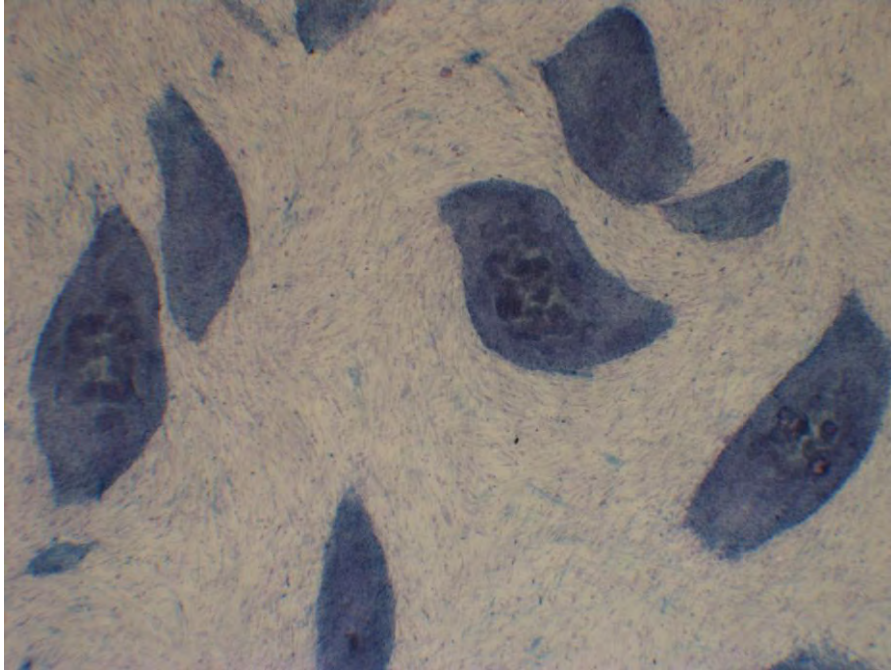
MOSTRA : MOSTRA

RESULTAT ..... No s'observa creixement

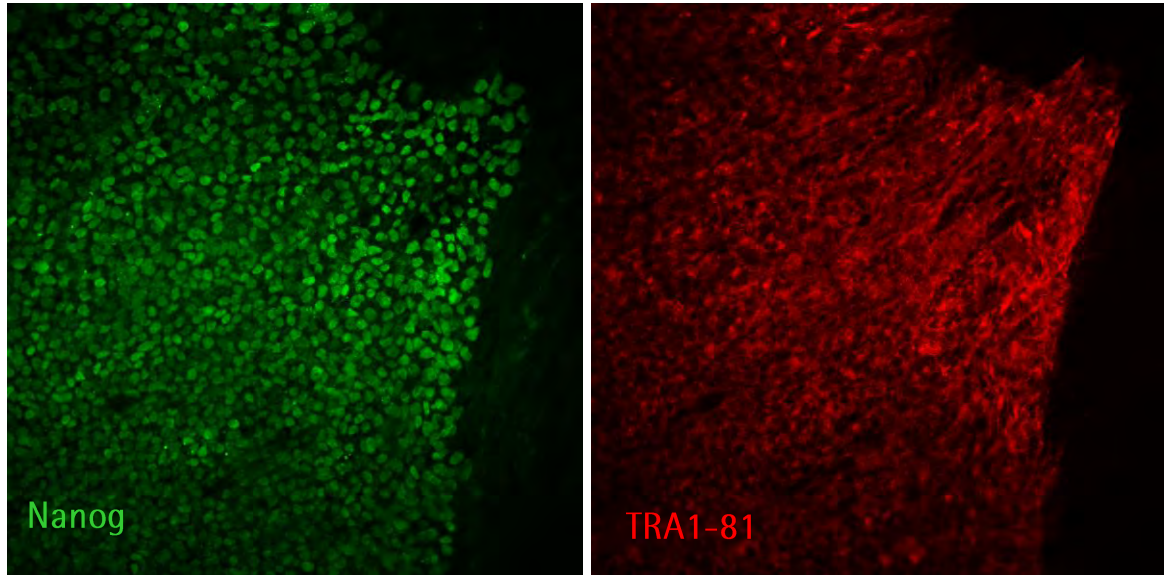
Responsables de Validació : AUTO, NMB.  
Director : Dr. J.I. HORNOS I VILA  
Barcelona, 28 de novembre de 2012

## Anexo 2

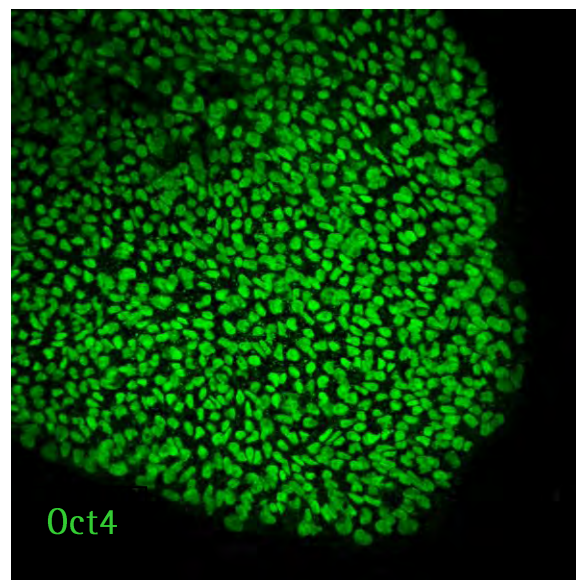
### Fenotipo. Marcadores de pluripotencia [GD]FiPS-4F-21c



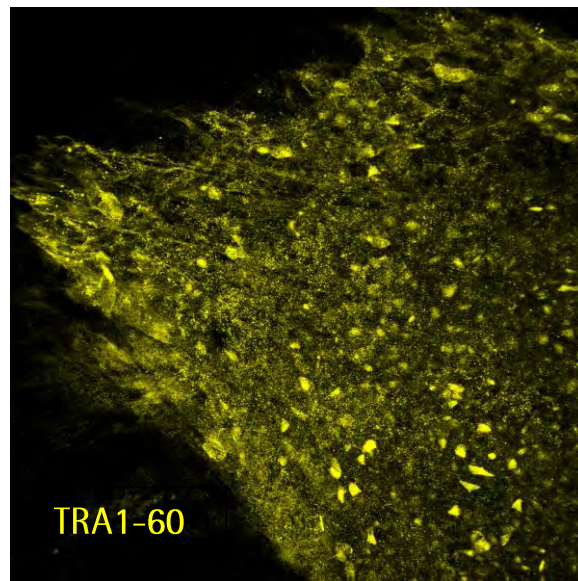
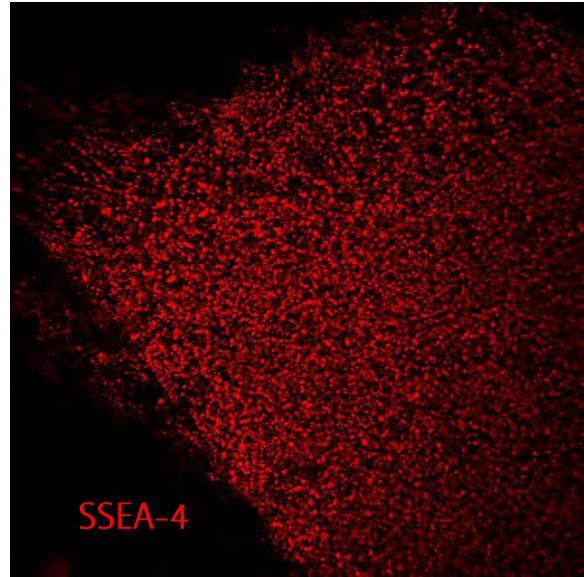
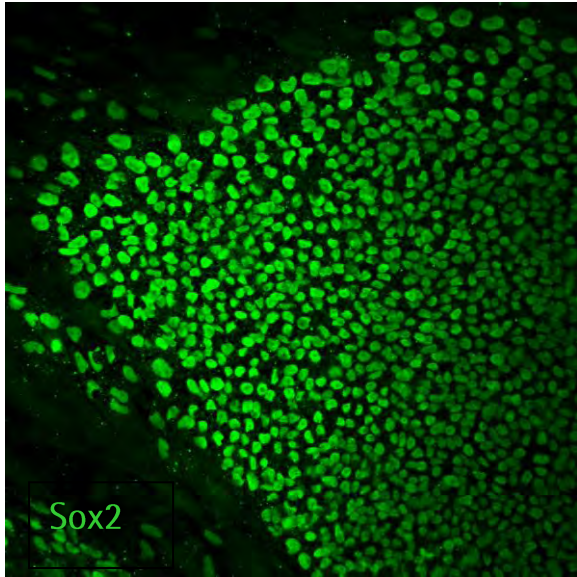
Actividad fosfatasa alcalina de la línea de células pluripotentes [GD]FiPS-4F-21c



Inmuno-reactividad de la línea de células madre pluripotentes [GD]FiPS-4F-21c para Nanog y TRA1-81



Inmuno-reactividad de la línea de células madre pluripotentes [GD]FiPS-4F-21c para Oct-4



Inmuno-reactividad de la línea de células madre pluripotentes [GD]FiPS-4F-21c para Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

## Anexo 3

### Cariotipo [GD]FiPS-4F-21c



Nombre muestra: [GD]FiPS-4F-21c

Fecha: Barcelona, 02/05/2013

**ESTUDIO CITOGENÉTICO**

El resultado obtenido en el estudio citogenético realizado en la muestra [GD]FiPS-4F-21c es:

**-Resultado citogenético: 46, XX, inv(12)**

Se han estudiado un total de **20 metafases** procedentes de cultivos celulares de la muestra.

Comentario:

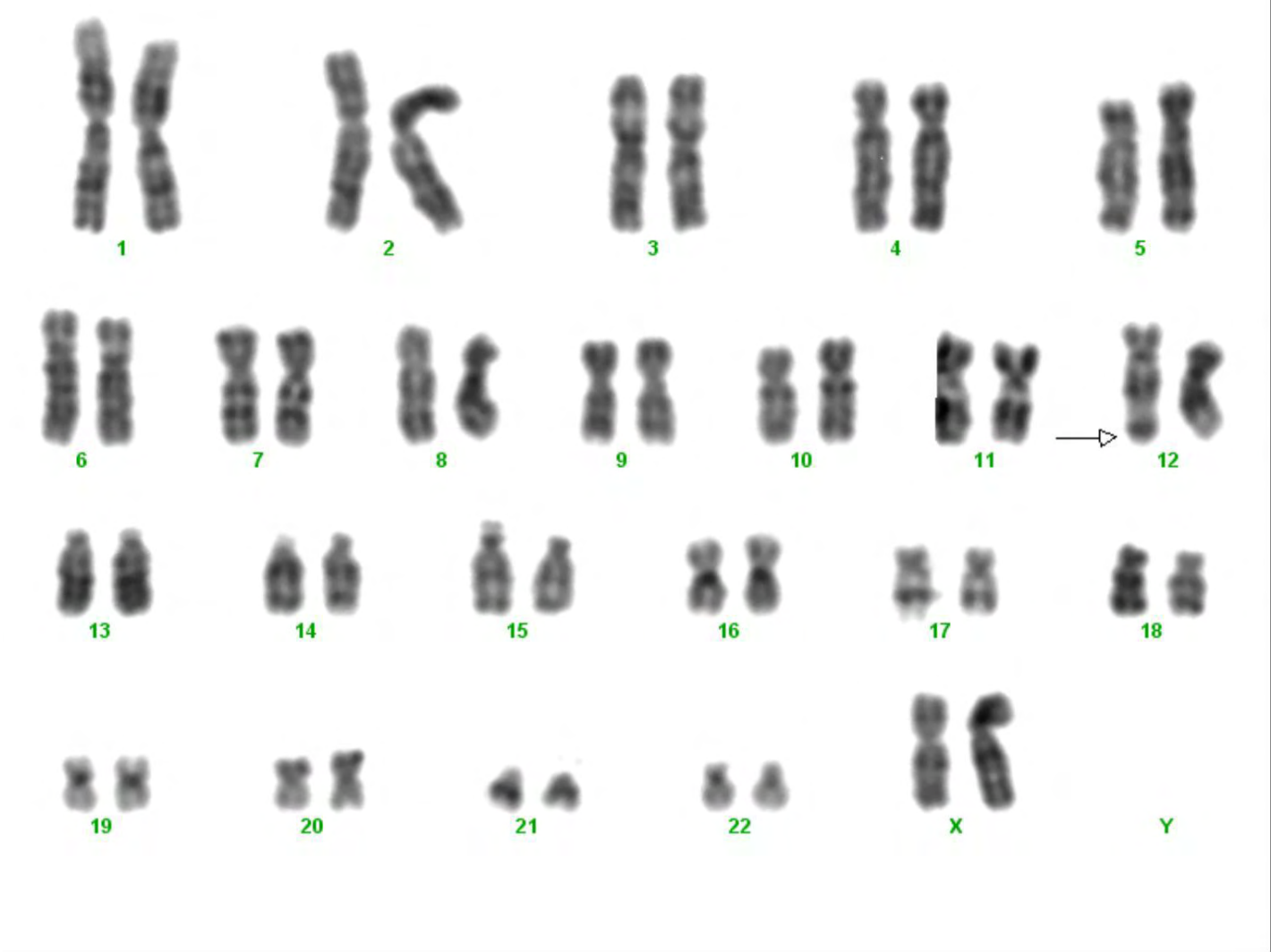
En el estudio citogenético realizado mediante la técnica de bandas G con 150bjh se ha observado una inversión del cromosoma 12 en el 100% de las metafases analizadas.

Observaciones:

El resultado citogenético no excluye la presencia de anomalías no detectables debido a limitaciones propias de la técnica, como pueden ser: mosaicos de baja frecuencia y alteraciones estructurales de medida pequeña (microdeleciones y microduplicaciones). Los estudios citogenéticos tienen una fiabilidad superior al 99%.

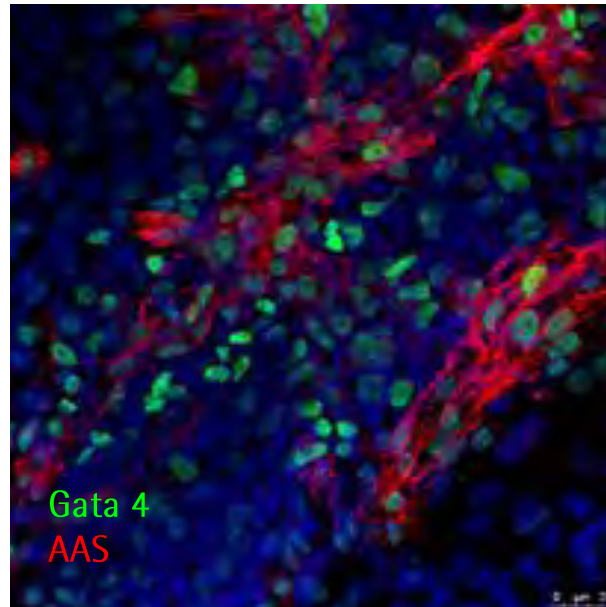


Dra. Cristina Gómez Santos

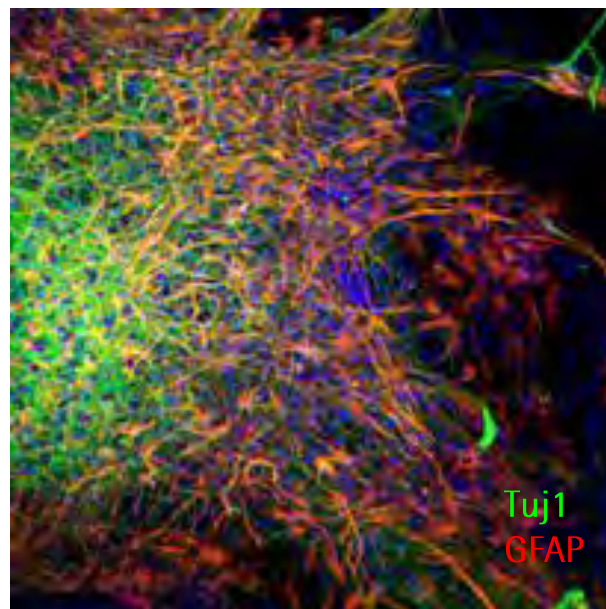


## Anexo 4

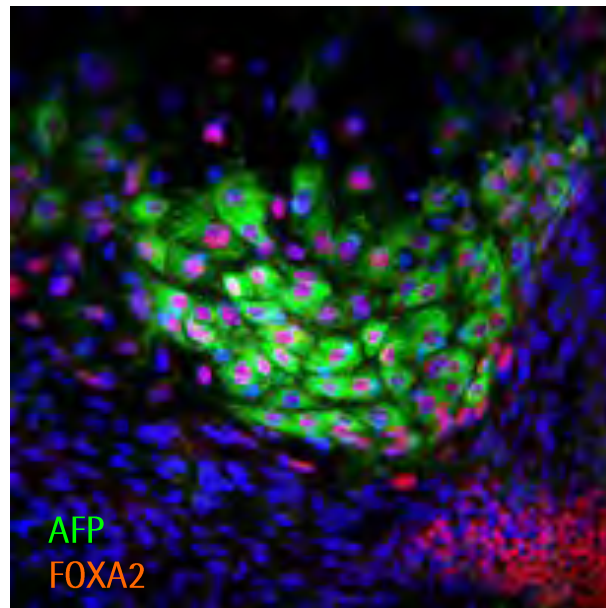
### Diferenciación *in vitro* [GD]FiPS-4F-21c



Diferenciación *in vitro* a mesodermo: Células positivas para Gata4 y AAS



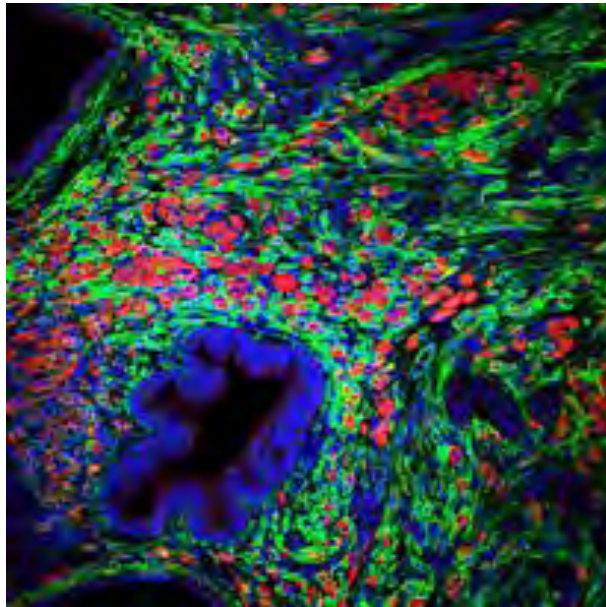
Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para Tuj1 y GFAP



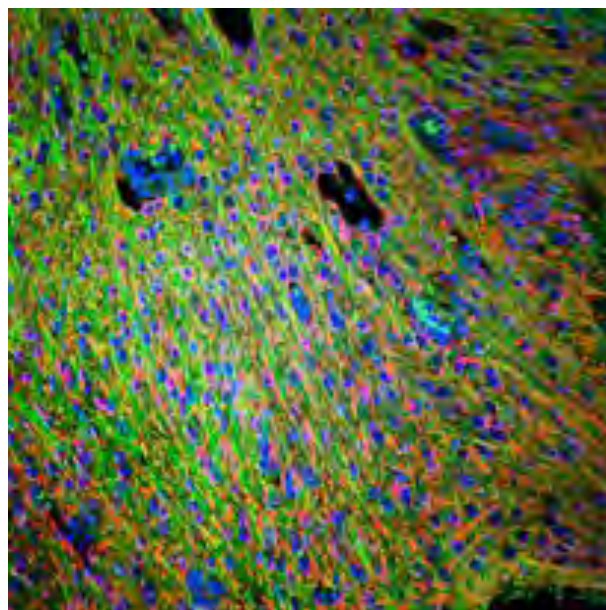
Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para AFP y FOXA2

## Anexo 5

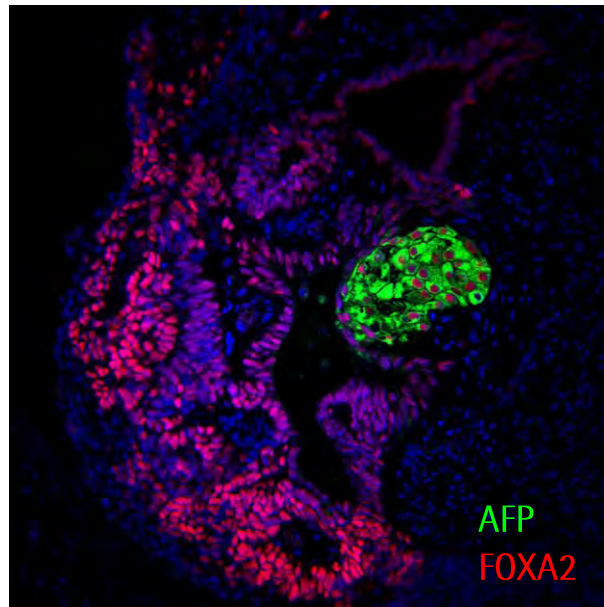
### Diferenciación *in vivo* [GD]FiPS-4F-21c



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



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



Diferenciación *in vivo* a endodermo: Células positivas para  $\alpha$ -fetoproteína y FOXA2



## Anexo 6

### Genotipación [GD]FiPS-4F-21c

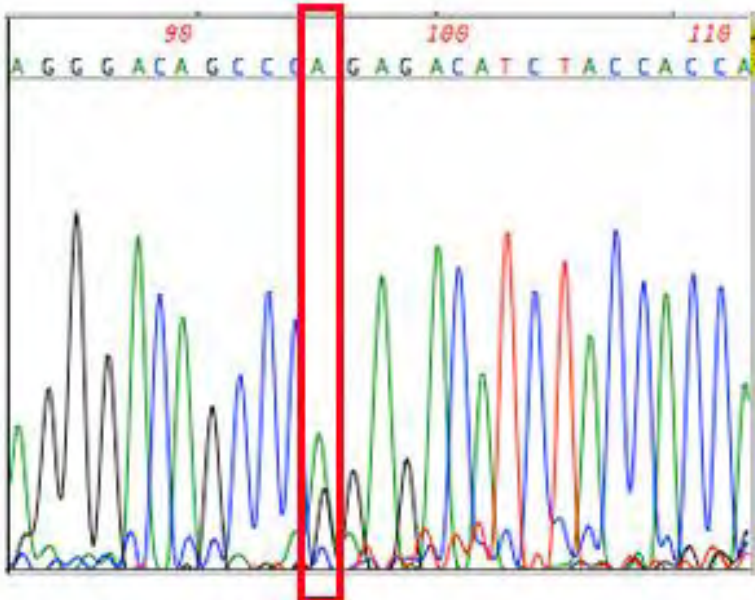
## GENOTYPING GD-FiPS-4F-21c

### SEQUENCING RESULT:

Sequence of PCR product on exon 7 of human GBA1

Forward primer

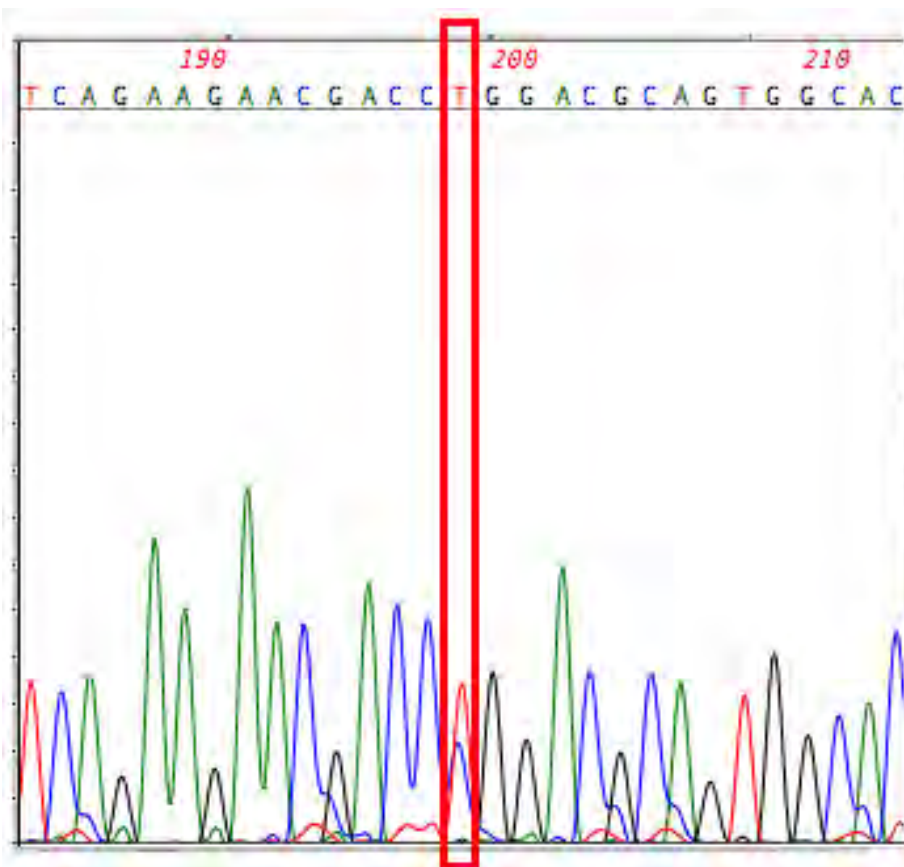
**ATCACCGAGCCCTGCAGTT**GGCCCAGCGTCCCGTTTCACTCCTTGCCAGCCCCTGGACA  
TCACCCACTTGGCTCAAGACCAATGGAGCGGTGAATGGGAAGGGGTCACTCAAGGGACA  
GCCC**(G/A)**GAGACATCTACCACCAGACCTGGGCCAGATACTTTGTGAA



Sequence of PCR product on exon 11 of human GBA1

Forward primer

**CGATGCAGAAAAGCAGGGT**AGTGCCAGCAGCATGGCTCCAGGCCTAGAGAGCCAGGG  
CAGAGCCTCTGCAGGAGTTATGGGGTGGGTCCGTGGGTGGGTGACTTCTTAGATGAGGG  
TTTCATGGGAGGTACCCCGAGGGACTCTGACCATCTGTTCCACATTCAGCAAGTTCATTC  
CTGAGGGCTCCCAGAGAGTGGGGCTGGTTGCCAGTCAGAAGAACGACC(**T/C**)GGACGCA  
GTGGCACTGATGCATCCCGATGGCTCTGCTGTTGTGGTTCGTGCTAAACCGGTGAGGGCAA  
TGGTGAGGTCTGGGAAGTGGGCTGAAGACAGCGTTGGGGGCCTTGGCAGGATCACACTC  
TCAGCT



Result:

Point mutations **are heterozygotically** observed on GD-FiPS 21c (red Square).

Primers used for sequencing are marked in yellow.