

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 to Deposit a human iPS cell line

FECHA: 25.02.2020

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 from 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> | CT PBiPS2-Sv4F-1 |
| 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. Detail cell type, tissue of origin and anatomic location of the biological sample from which the original line is obtained. If cells are commercial, detail name, reference and trade distributor.</i> | Células mononucleadas de sangre periférica <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> |
| Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i> | Masculino, 14 años Male, 14 years |
| ¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i> | NO <input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Cardiotoxicidad <i>No</i> <i>Yes</i> <i>(specify)</i> <i>Cardiac toxicity</i> |
| ¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i> | NO <input checked="" type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> (especificar) <i>No</i> <i>Yes</i> <i>(specify)</i> |
| 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 6.03.2019</i> | Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 7.03.2019 |
| 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 |
| Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de las células de origen <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the original cells.</i> | Los marcadores de microsatélites de las células de la muestra inicial coinciden con los de la línea de iPS generada (Anexo 5) <i>Microsatellite markers of the initial sample are identical to the markers of the iPS line (Annex 5)</i> |
| ¿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 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) Specify factors and plasmids used for reprogramming</i> | Generación de las células de pluripotencia inducida (iPSC) a partir de células mononucleadas de sangre periférica de un paciente que presenta cardiotoxicidad a las antraciclinas, con el kit de reprogramación CytoTune®-iPS 2.0 Sendai, un sistema no integrativo que utiliza vectores del virus Sendai. Este kit incluye tres vectores: policistrónico Klf4-hOct3/4-Sox2, cMyc y Klf4. <i>The induced pluripotent stem cells (iPSC) were generated from Peripheral Blood Mononuclear Cells from a patient showing cardiotoxicity to anthracyclines, with the CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, a non-integrating system that uses Sendai virus vectors. This kit includes three vector preparations: polycistronic Klf4-Oct3/4-Sox2, cMyc, and Klf4.</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, 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</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. <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><i>culture (form and size of the colonies; form and size of the cells; nucleus/cytoplasm ratio; others)</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 a 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 in isopropanol containers 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>Viales congelados a pases 5-13</p> <p>Frozen vials at passages 5-13</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> 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

| <p>Test de pluripotencia <i>Pluripotency test</i></p> <p>Anexo 1 <i>Annex 1</i></p> | <table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="456 405 592 472"></th> <th data-bbox="592 405 895 472">Método <i>Method</i></th> <th data-bbox="895 405 1070 472">Nº pase <i>Passage n.</i></th> <th data-bbox="1070 405 1230 472">Resultado <i>Results</i></th> <th data-bbox="1230 405 1437 472">Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="456 528 592 562">Oct 4</td> <td data-bbox="592 528 895 562">inmunocitoq.</td> <td data-bbox="895 528 1070 562">12</td> <td data-bbox="1070 528 1230 562">+</td> <td data-bbox="1230 528 1437 562"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="456 595 592 629">Nanog</td> <td data-bbox="592 595 895 629">inmunocitoq.</td> <td data-bbox="895 595 1070 629">12</td> <td data-bbox="1070 595 1230 629">+</td> <td data-bbox="1230 595 1437 629"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="456 663 592 696">Sox 2</td> <td data-bbox="592 663 895 696">inmunocitoq.</td> <td data-bbox="895 663 1070 696">12</td> <td data-bbox="1070 663 1230 696">+</td> <td data-bbox="1230 663 1437 696"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="456 730 592 763">SSEA3</td> <td data-bbox="592 730 895 763">inmunocitoq.</td> <td data-bbox="895 730 1070 763">12</td> <td data-bbox="1070 730 1230 763">+</td> <td data-bbox="1230 730 1437 763"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="456 797 592 831">SSEA4</td> <td data-bbox="592 797 895 831">inmunocitoq.</td> <td data-bbox="895 797 1070 831">12</td> <td data-bbox="1070 797 1230 831">+</td> <td data-bbox="1230 797 1437 831"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="456 864 592 898">TRA-1-60</td> <td data-bbox="592 864 895 898">inmunocitoq.</td> <td data-bbox="895 864 1070 898">12</td> <td data-bbox="1070 864 1230 898">+</td> <td data-bbox="1230 864 1437 898"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="456 931 592 965">TRA-1-81</td> <td data-bbox="592 931 895 965">inmunocitoq.</td> <td data-bbox="895 931 1070 965">12</td> <td data-bbox="1070 931 1230 965">+</td> <td data-bbox="1230 931 1437 965"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="456 999 592 1032">Fosfatasa. Alk</td> <td data-bbox="592 999 895 1032">actividad</td> <td data-bbox="895 999 1070 1032">12</td> <td data-bbox="1070 999 1230 1032">+</td> <td data-bbox="1230 999 1437 1032"></td> </tr> </tbody> </table> | | Método <i>Method</i> | Nº pase <i>Passage n.</i> | Resultado <i>Results</i> | Comentarios <i>Comments</i> | Oct 4 | inmunocitoq. | 12 | + | | Nanog | inmunocitoq. | 12 | + | | Sox 2 | inmunocitoq. | 12 | + | | SSEA3 | inmunocitoq. | 12 | + | | SSEA4 | inmunocitoq. | 12 | + | | TRA-1-60 | inmunocitoq. | 12 | + | | TRA-1-81 | inmunocitoq. | 12 | + | | Fosfatasa. Alk | actividad | 12 | + | |
|--|--|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------|------------|----|--------------|--------------|-------------------------------------|--------------|-----------|--------------|--------------|----|-------------------------------------|--------------|--------------|--------------|-----|---|--|--------------|--------------|----|---|--|-----------------|--------------|----|---|--|-----------------|--------------|----|---|--|-----------------------|-----------|----|---|--|
| | Método <i>Method</i> | Nº pase <i>Passage n.</i> | Resultado <i>Results</i> | Comentarios <i>Comments</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Oct 4 | inmunocitoq. | 12 | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Nanog | inmunocitoq. | 12 | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sox 2 | inmunocitoq. | 12 | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SSEA3 | inmunocitoq. | 12 | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SSEA4 | inmunocitoq. | 12 | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TRA-1-60 | inmunocitoq. | 12 | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TRA-1-81 | inmunocitoq. | 12 | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fosfatasa. Alk | actividad | 12 | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i></p> <p>Anexo 2 <i>Annex 2</i></p> | <table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="456 1104 592 1171">Comentarios</th> <th data-bbox="592 1104 767 1171">Método <i>Method</i></th> <th data-bbox="767 1104 895 1171">Marcador <i>Marker</i></th> <th data-bbox="895 1104 1070 1171">Nº pase <i>Passage n</i></th> <th data-bbox="1070 1104 1230 1171">Resultado <i>Results</i></th> <th data-bbox="1230 1104 1437 1171">Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="456 1238 592 1305">Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td data-bbox="592 1238 767 1305">inmunocitoq.</td> <td data-bbox="767 1238 895 1305">Tuj1, GFAP</td> <td data-bbox="895 1238 1070 1305">13</td> <td data-bbox="1070 1238 1230 1305">+/-</td> <td data-bbox="1230 1238 1437 1305"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="456 1350 592 1417">Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td data-bbox="592 1350 767 1417">inmunocitoq.</td> <td data-bbox="767 1350 895 1417">ASMA, ASA</td> <td data-bbox="895 1350 1070 1417">13</td> <td data-bbox="1070 1350 1230 1417">+/-</td> <td data-bbox="1230 1350 1437 1417"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="456 1462 592 1529">Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td data-bbox="592 1462 767 1529">inmunocitoq.</td> <td data-bbox="767 1462 895 1529">AFP, FOXA2</td> <td data-bbox="895 1462 1070 1529">13</td> <td data-bbox="1070 1462 1230 1529">+/-</td> <td data-bbox="1230 1462 1437 1529"></td> </tr> </tbody> </table> | Comentarios | 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 | 13 | +/- | | Mesodermo <i>Mesoderm</i> | inmunocitoq. | ASMA, ASA | 13 | +/- | | Endodermo <i>Endoderm</i> | inmunocitoq. | AFP, FOXA2 | 13 | +/- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Comentarios | 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 | 13 | +/- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mesodermo <i>Mesoderm</i> | inmunocitoq. | ASMA, ASA | 13 | +/- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Endodermo <i>Endoderm</i> | inmunocitoq. | AFP, FOXA2 | 13 | +/- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <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 (ver Anexo 2).</p> <p><i>Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture. Ectoderm: EBs culture in N2/B27 (see Annex 2).</i></p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| <p>Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i></p> <p>Anexo 3 <i>Annex 3</i></p> | <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Método <i>Method</i></th> <th>Marcador <i>Marker</i></th> <th>Nº pase <i>Passage n</i></th> <th>Resultado <i>Results</i></th> <th>Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td>inmunohist.</td> <td>NeFi</td> <td>19</td> <td>+/+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td>inmunohist.</td> <td>ASMA, ASA</td> <td>19</td> <td>+/+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td>inmunohist.</td> <td>AFP, FOXA2</td> <td>19</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> | inmunohist. | NeFi | 19 | +/+ | | Mesodermo <i>Mesoderm</i> | inmunohist. | ASMA, ASA | 19 | +/+ | | Endodermo <i>Endoderm</i> | inmunohist. | AFP, FOXA2 | 19 | +/+ | |
|---|--|----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|-------------|------|----|-----|--|-------------------------------------|-------------|-----------|----|-----|--|-------------------------------------|-------------|------------|----|-----|--|
| | 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> | inmunohist. | NeFi | 19 | +/+ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mesodermo <i>Mesoderm</i> | inmunohist. | ASMA, ASA | 19 | +/+ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Endodermo <i>Endoderm</i> | inmunohist. | AFP, FOXA2 | 19 | +/+ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i></p> | <p>Formación de teratomas mediante inyección intratesticular en ratones SCID de 4·10 mill de células indiferenciadas y tras 8 semanas, análisis de los teratomas producidos mediante técnicas de inmunohistoquímica para ectodermo, mesodermo y endodermo (Anexo 3).</p> <p><i>Teratoma formation: 4·10 mill of undifferentiated cells were injected into the testis of SCID mice. After 8 weeks, teratomas were analyzed by immunohistochemistry for ectoderm, endoderm and mesoderm (Annex 3).</i></p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i></p> | <p>46,XY,inv(12)(p11.2q13.3); p12 (Anexo 4/ <i>Annex 4</i>)</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 las células de la muestra inicial coinciden con los de la línea de iPS generada (Anexo 5)</p> <p><i>Microsatellite markers of the initial sample are identical to the markers of the iPS line (Annex 5)</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>No procede, debido a que se trata un método no-integrativo</p> <p><i>Not applicable, due to non-integrating reprogramming methodology</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>El análisis mediante RT-PCR mostró la ausencia de mRNA derivado de virus Sendai en la línea de iPSC y la presencia de mRNA derivado de virus Sendai en células control tras 1 semana de transducción (Anexo 6).</p> <p><i>The RT-PCR showed absence of Sendai virus derived mRNAs in iPSCs and presence of Sendai virus derived mRNAs in virus transduced control cells 1 week after transduction (Annex 6).</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 7)</p> <p><i>Negative by PCR (Annex 7)</i></p> |

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3 Applicant Details

| | |
|---|--|
| <p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Anna Veiga Lluch</p> | <p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Hospital Duran i Reynals. Gran Via de l'Hospitalet 199. 08908. Hospitalet de Llobregat. Barcelona</p> |
| <p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Programa de Medicina Regenerativa. IDIBELL</p> | <p>Teléfono (phone): 93 3160360</p> <p>Fax:</p> <p>E-mail: aveiga@idibell.cat</p> |

| | |
|---|--|
| <p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Pilar Sepúlveda Sanchis</p> | <p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Instituto de Investigación Sanitaria La Fe Torre A, 5º planta, Lab 5.03 Avda. Fernando Abril Martorell 106 46026 Valencia</p> |
| <p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Instituto de Investigación Sanitaria La Fe</p> | <p>Teléfono (phone): +34 669995632</p> <p>Fax:</p> <p>E-mail: pilar.sepulveda.sanchis@gmail.com</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

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 / Signature in Representation of the Centre (Representante legal del Departamento/Centro) Legal Representative of the Department/Centre)</p> <p>CAPELLA MUNAR GABRIEL MARIA - 46114965B</p> <p>Firmado digitalmente por CAPELLA MUNAR GABRIEL MARIA - 46114965B Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, serialNumber=IDCES-46114965B, givenName=GABRIEL MARIA, sn=CAPELLA MUNAR GABRIEL MARIA - 46114965B Fecha: 2020.06.25 09:52:44 +02'00'</p> <p>Fecha/Date:</p> | <p>Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i></p> <p>ANA MARIA VEIGA LLUCH - DNI 46109740F</p> <p>Firmado digitalmente por ANA MARIA VEIGA LLUCH - DNI 46109740F Fecha: 2020.06.22 09:41:11 +02'00'</p> <p>Fecha /Date</p> |
| <p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i></p> <p>Gabriel Capellá. Director</p> | |
| <p>Dirección Postal: <i>Postal Address:</i></p> <p>Hospital Duran i Reynals. Gran Via de l' Hospitalet 199. 08908. Hospitalet de Llobregat. Barcelona</p> | <p>Teléfono / Telephone: 93 2607291</p> <p>Fax:</p> <p>E-mail: gcapella@idibell.cat</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>Máximo Vento Torres</p> <p>MAXIMO VENTO TORRES</p> <p>Firmado digitalmente por MAXIMO VENTO TORRES Fecha: 2020.06.19 09:15:50 +02'00'</p> <p>Fecha/ Date:</p> | <p>Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i></p> <p>Pilar Sepúlveda Sanchis</p> <p>SEPULVEDA SANCHIS PILAR - 29166924A</p> <p>Firmado digitalmente por SEPULVEDA SANCHIS PILAR - 29166924A Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, serialNumber=IDCES-29166924A, givenName=PILAR, sn=SEPULVEDA SANCHIS, cn=SEPULVEDA SANCHIS PILAR - 29166924A Fecha: 2020.06.18 13:03:29 +02'00'</p> <p>Fecha /Date</p> |
| <p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i></p> <p>Máximo Vento Torres</p> | |
| <p>Dirección Postal: <i>Postal Address:</i></p> <p>Instituto de Investigación Sanitaria La Fe Torre A, 7º planta Avda. Fernando Abril Martorell 106 46026 Valencia</p> | <p>Teléfono / Telephone: 961246601</p> <p>Fax:</p> <p>E-mail: máximo_vento@iislafe.es</p> |



ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA
LÍNEA CELULAR **CT PBiPS2-Sv4F-1** 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: Ausencia de los transgenes de reprogramación

Anexo 7: Resultado Test de micoplasma

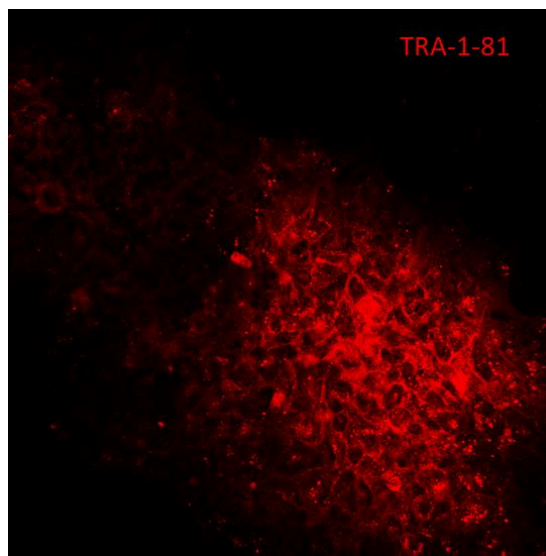
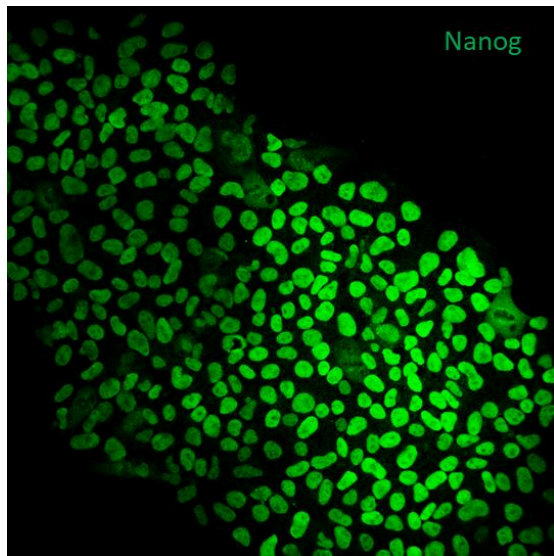


Anexo 1

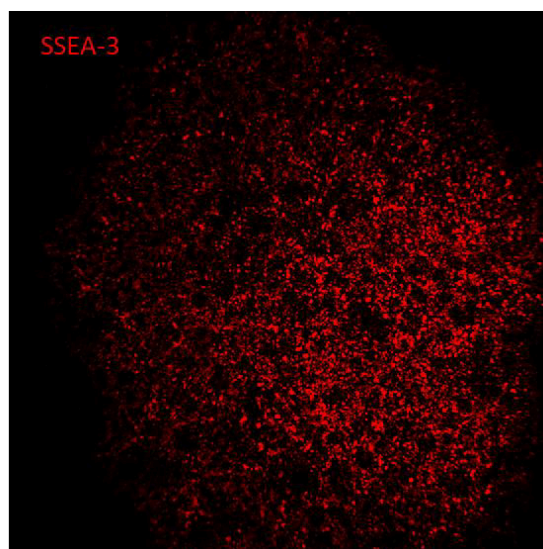
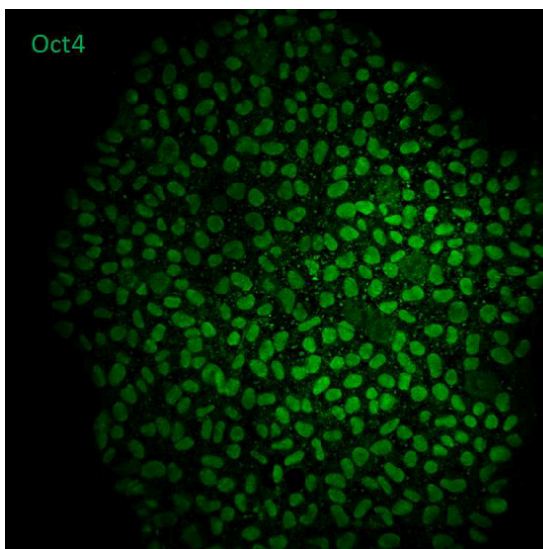
Fenotipo. Marcadores de pluripotencia



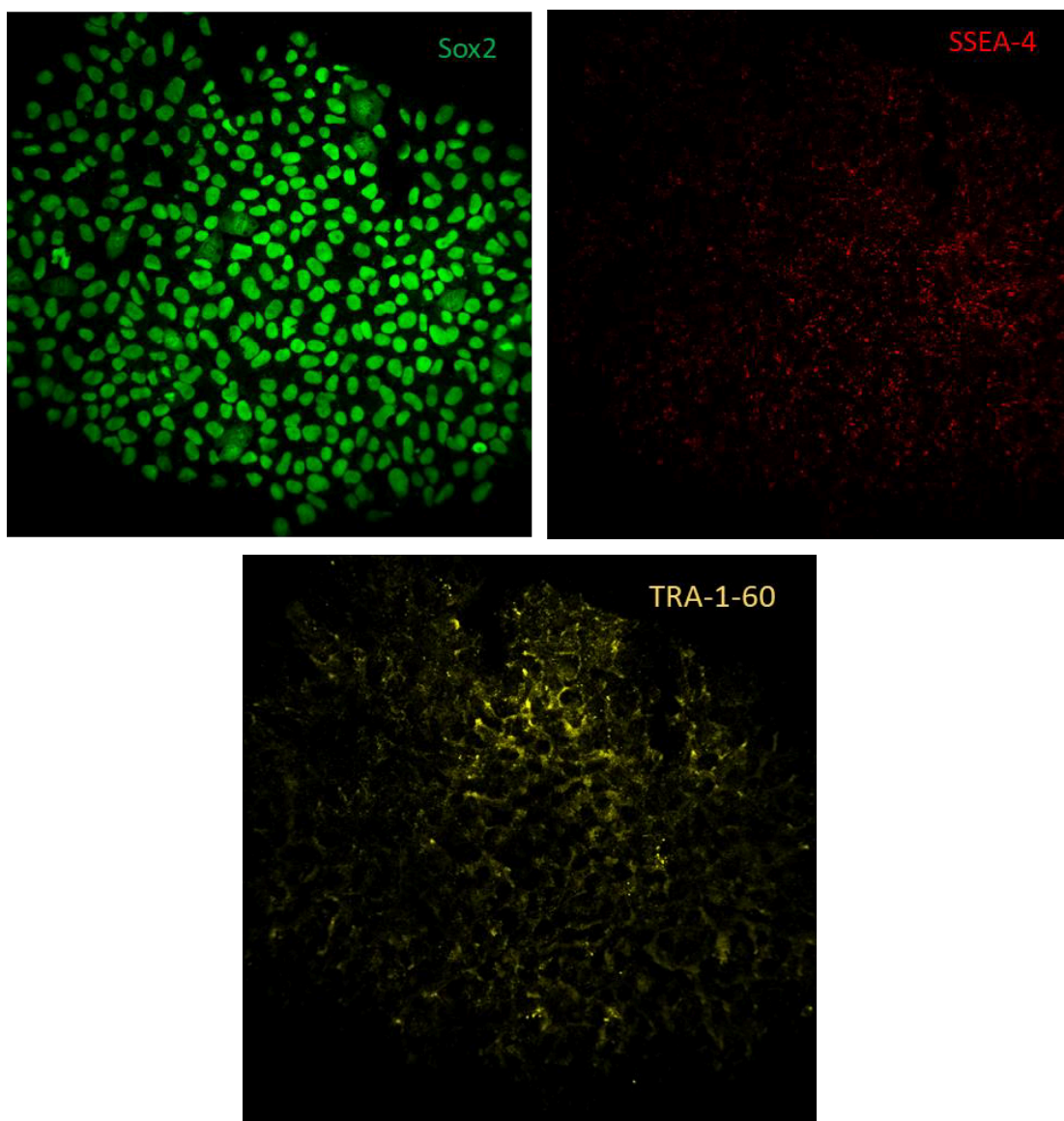
Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



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

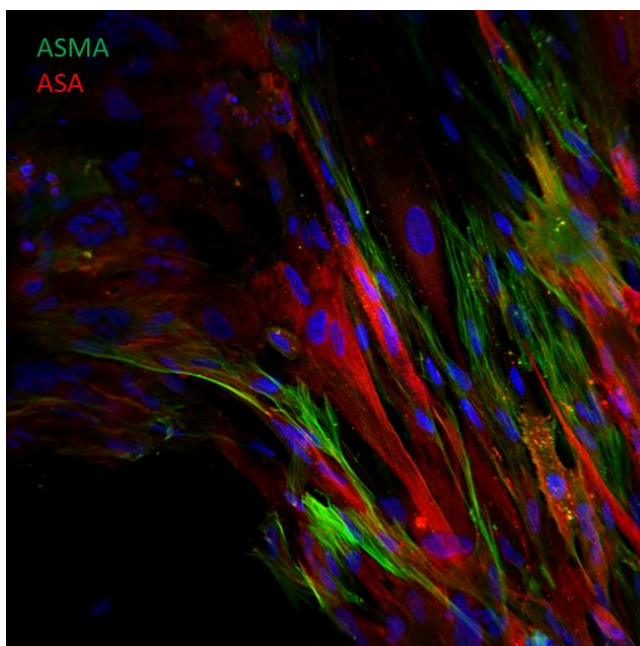


Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

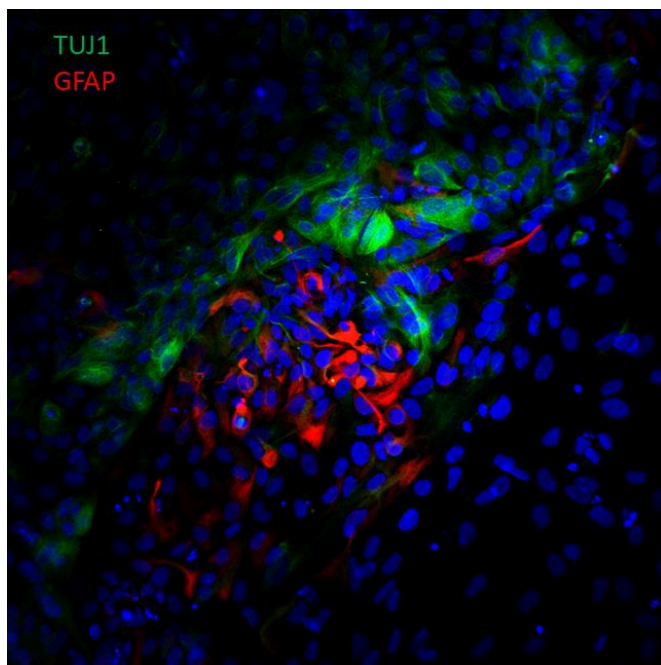


Anexo 2

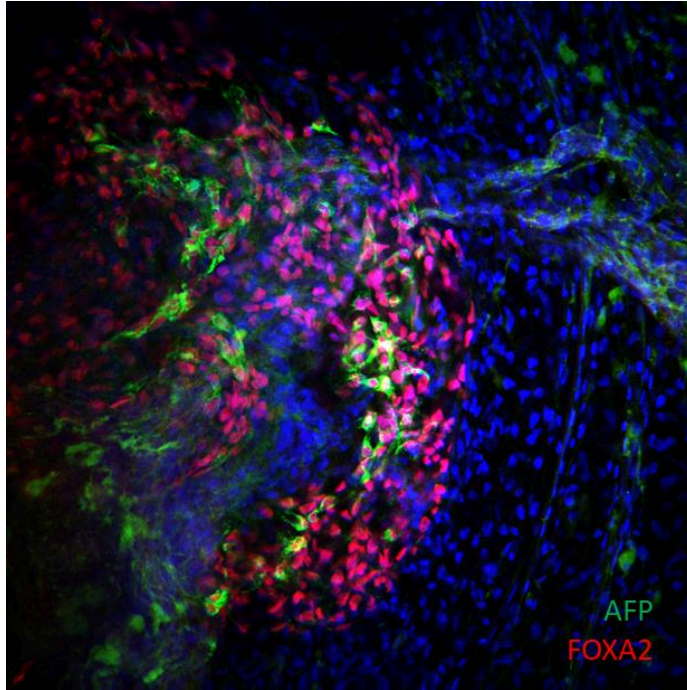
Diferenciación *in vitro*



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



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

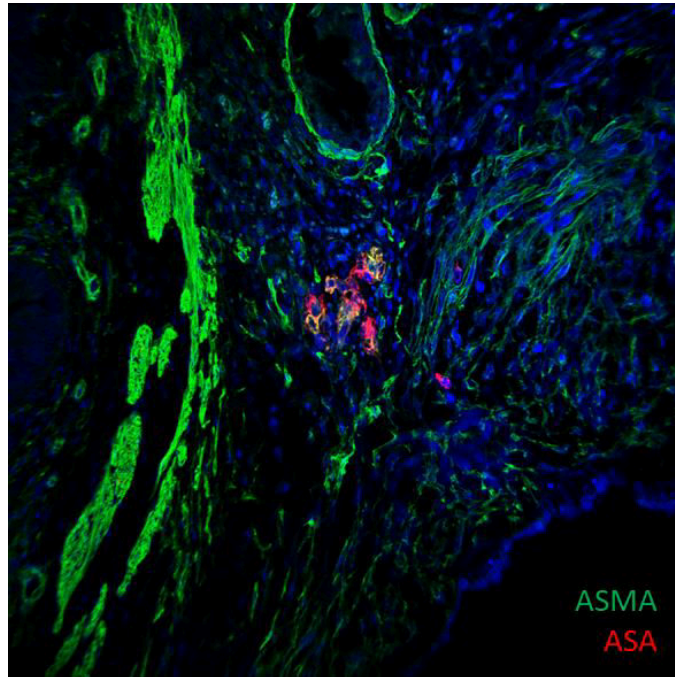


Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **AFP y FOXA2**

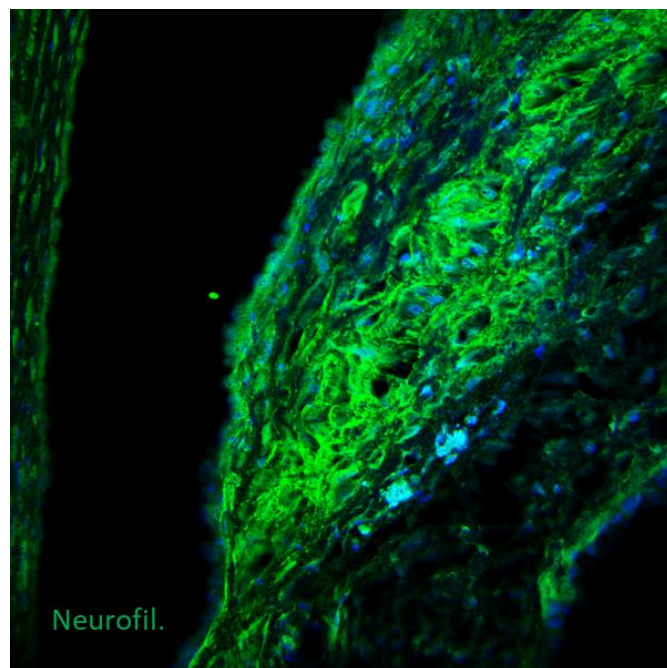


Anexo 3

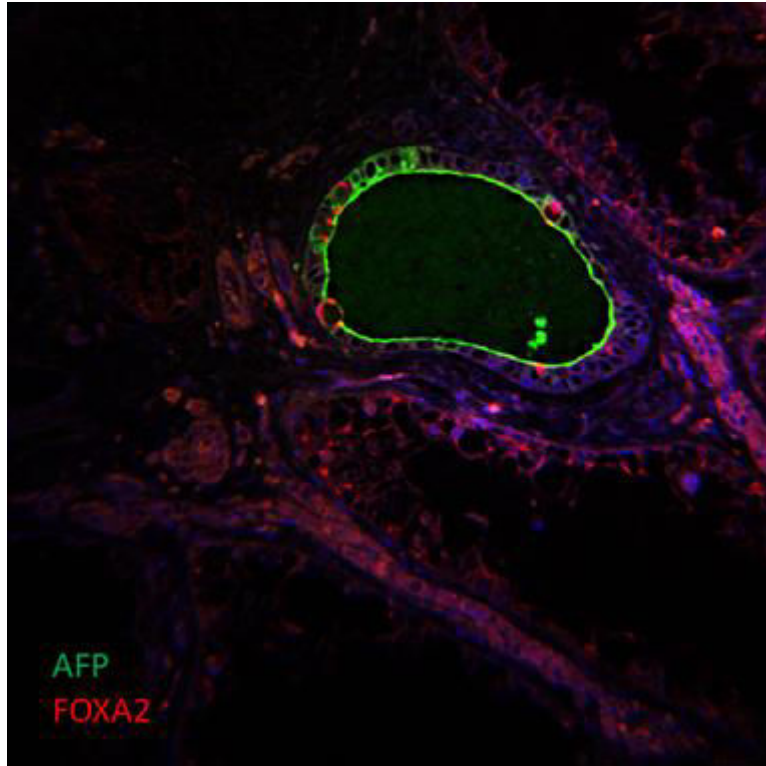
Diferenciación *in vivo*



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



Diferenciación *in vivo* a ectodermo: Células positivas para **Neurofilamento**.



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



Anexo 4

Cariotipo

ESTUDI CITOGENETIC

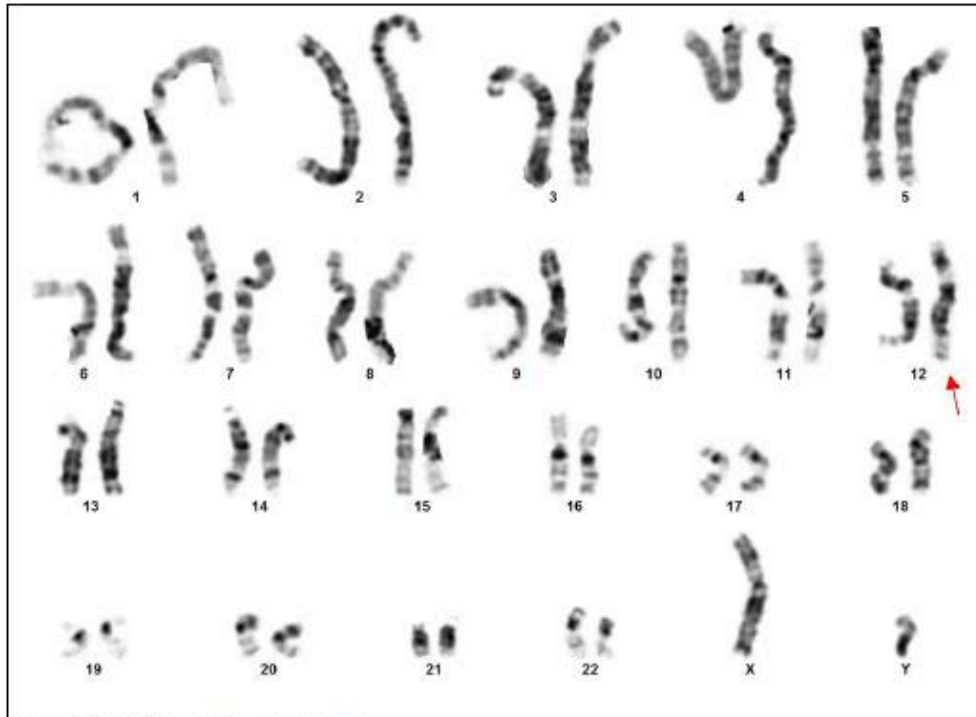
Case name: 91640718

NHC: CT0097

Nombre y Apellidos: CT PBIPS 2-Sv4F-2 p12

Tipo de muestra: CM

Servicio: CMRB



Case: 91640718 Slide: 1 Cell: 2

Resultado: 46,XY,inv(12)(p11.2q13.3)



Anexo 5

Resultado microsatélites

Los resultados obtenidos son estudiados mediante el programa informático GeneMapper[®] 3.2. De acuerdo con la información suministrada por Promega[®] sobre su kit de amplificación GenePrint[®] 10 System, estos son los datos correspondientes de los alelos existentes para cada uno de los diferentes loci STR (figura1):



Table 5. The GenePrint[®] 10 System Allelic Ladder Information.

| STR Locus | Label | Size Range of Allelic Ladder Components ^{1,2} (bases) | Repeat Numbers of Allelic Ladder Components |
|------------|-------|--|--|
| TH01 | FL | 156–195 | 4–9, 9.3, 10–11, 13.3 |
| D21S11 | FL | 263–259 | 24, 24.2, 25, 25.2, 26–28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36–38 |
| D5S818 | JOE | 119–155 | 7–16 |
| D13S317 | JOE | 176–208 | 7–15 |
| D7S820 | JOE | 215–247 | 6–14 ³ |
| D16S539 | JOE | 264–304 | 5, 8–15 |
| CSP1PO | JOE | 321–357 | 6–15 |
| Amelogenin | TMR | 106, 112 | X, Y |
| vWA | TMR | 123–171 | 10–22 |
| TPOX | TMR | 262–280 | 6–13 |

¹The length of each allele in the allelic ladder has been confirmed by sequence analysis.

²When using an internal lane standard, such as the Internal Lane Standard 600, the calculated sizes of allelic ladder components may differ from those listed. This occurs because different sequences in allelic ladder and ILS components may cause differences in migration. The dye label also affects migration of alleles.

³HeLa cells have a microvariant allele 13.3 at the D13S317 locus. This will appear as an off-ladder allele (see www.ncbi.nlm.nih.gov/ncbiwebc/ncbiwebc/var_D13S317.html Tri).

Figura 1. Información de la casa comercial Promega sobre la relación entre cada uno de los loci STR amplificados y las repeticiones (en rangos de tamaño y número) que pueden estar presentes en dichos productos de PCR.

RESULTADOS:

En la siguiente tabla se indican los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR en la muestra analizada.

| Código biobanco | Código origen del ADN de la línea celular | Loci STRs analizados | | | | | | | | | |
|----------------------|---|----------------------|------------|--------|---------|--------|---------|--------|------|--------|-------|
| | | TH01 | D21S11 | D5S818 | D13S317 | D7S820 | D16S539 | CSP1PO | AMEL | vWA | TPOX |
| INVN02519A524ADNA002 | CT PBiPS2 Sv4F-1, P14 | 7, 9.3 | 30.2, 33.2 | 12, 13 | 10, 12 | 8, 10 | 11 | 10 | X, Y | 16, 17 | 8, 11 |

Granada, a 15 de Octubre de 2019

Laboratorio de Biología Molecular
Biobanco del SSPA

RESULTADOS:

En la siguiente tabla se indican los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR en la muestra analizada.

| Código biobanco | Código origen del ADN de la línea celular | Loci STRs analizados | | | | | | | | | |
|----------------------|---|----------------------|------------|--------|---------|--------|---------|--------|------|--------|-------|
| | | TH01 | D21S11 | D5S818 | D13S317 | D7S820 | D16S539 | CSP1PO | AMEL | vWA | TPOX |
| INVN02519A526ADNA002 | Cardiotoxicity2, 23CCARE | 7, 9.3 | 32.2, 33.2 | 12, 13 | 10, 12 | 8, 10 | 11 | 10 | X, Y | 16, 17 | 8, 11 |

Granada, a 15 de Octubre de 2019

Laboratorio de Biología Molecular
Biobanco del SSPA

Análisis de microsatélites en la línea de hiPSC y en las células mononucleadas de las que procede.



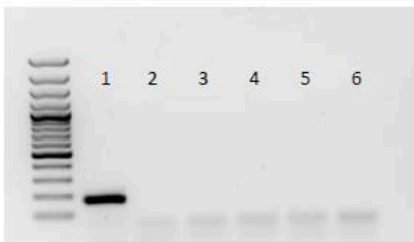
Anexo 6

Ausencia de los transgenes de reprogramación

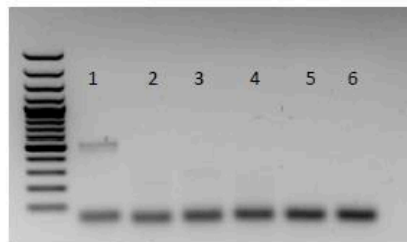
RT-PCR SENDAI 31/05/2019

1. Sendai infected CT2-PBMCs, 0,15M, 08.03.19 (positive control)
2. CT PBiPS2 Sv4F-1, P10, 24.05.19
3. CT PBiPS2 Sv4F-2, P10, 23.05.19
4. CT PBiPS2 Sv4F-6, P8, 24.05.19
5. Sample 3 without RT
6. H2O

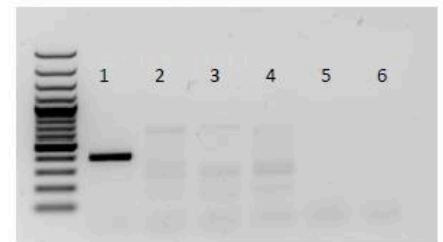
SeV (181pb)



KOS (528 pb)



Klf4 (410 pb)



C-Myc (532 pb)



GAPDH



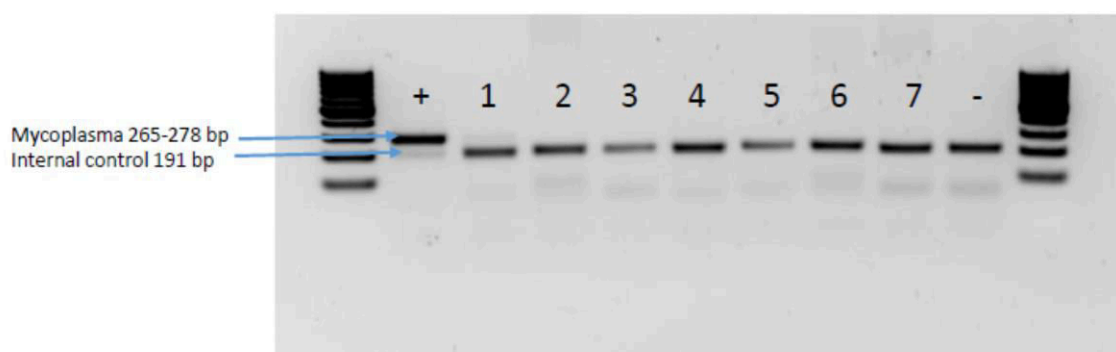
Ausencia de los transgenes de reprogramación. Análisis por RT-PCR de los niveles de expresión de los transgenes indicados. Se muestra expresión relativa a GAPDH



Anexo 7

Resultado test de micoplasma

Mycoplasma test (VenorGeM Classic kit) 03/05/2019



1 -CT PBiPS2-Sv4F-1 p5
2 -CT PBiPS2-Sv4F-2 p5
3 -CT PBiPS2-Sv4F-6 p3