

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 of a human iPS cell line

FECHA: 15.11.2018

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>	OCD FiPS 1-EP6F-16
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>	Fibroblastos de dermis procedentes de biopsia de piel. <i>Dermal fibroblasts from skin biopsy.</i>
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Femenino 54 años Female 54 years
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) trastorno obsesivo compulsivo <i>No Yes (specify) obsessive compulsive disorder</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 Yes (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</i> 13.07.2017	Fecha del uso o descongelación (<i>si congelado</i>) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 14.07.2017
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 la muestra inicial de fibroblastos coinciden con los de la línea de iPS generada (Anexo 5) <i>Microsatellite markers of the initial fibroblasts 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>	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)</i> Specify factors and plasmids used for reprogramming	Generación de las células pluripotenciales inducidas (iPSC) a partir de fibroblastos (p3) de un paciente con trastorno obsesivo compulsivo, 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) como control para calcular la eficiencia. <i>The induced pluripotent stem cells (iPSC) were generated from fibroblasts (p2) of a patient showing obsessive compulsive disorder, by nucleofection with Amaxa Human Dermal Fibroblast Nucleofactor kit (Lonza, #VPD-1001) and episomal vectors with ectopic expression of 6 transcription factors (pCXLE-hOct3/4-shp53-F, Addgene #27077; pCXLE-hSK, Addgene # 27078; pCXLE-hUL, Addgene # 27080). In parallel, fibroblasts were nucleofected with a control plasmid carrying EGFP (pCXLE-EGFP, Addgene # 27082) to calculate efficiency of nucleofection.</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: Matrigel (Corning BV) Culture medium: mTeSR Basal Medium Kit (StemCell Technologies)

<p>Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo (forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma; otros)</p> <p><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)</p> <p><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 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%), 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)</p> <p><i>Passage at the time of the banking/registration (Max: Passage 15)</i></p>	<p>Viales congelados a pases 4-8</p> <p><i>Frozen vials at passages 4-8</i></p>
<p>¿Ha sido la línea modificada genéticamente?</p> <p><i>Has the line been genetically modified?</i></p> <p>Sí Yes <input type="checkbox"/> No No <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Comentarios/ Comments:</p>	<p>¿Se llevó a cabo un análisis clonal?</p> <p><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>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>	
Anexo 1 <i>Annex 1</i>	Oct 4 inmunocitoq.	6	+		
	Nanog inmunocitoq.	6	+		
	Sox 2 inmunocitoq.	6	+		
	SSEA3 inmunocitoq.	6	+		
	SSEA4 inmunocitoq.	6	+		
	TRA-1-60 inmunocitoq.	6	+		
	TRA-1-81 inmunocitoq.	6	+		
	Fosfatasa. Alk actividad	4	+		
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 inmunocitoq.	Tuj1	7	+	
	Mesodermo inmunocitoq.	ASMA	7	+	
	Endoderm inmunocitoq.	AFP, FOXA2	7	+/+	
<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>	<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>Tuj1; GFAP Neurof; Map2</td> <td>8</td> <td>+ / + / + / +</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td>inmunohist.</td> <td>ASMA; ASA</td> <td>8</td> <td>+ / +</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td>inmunohist.</td> <td>AFP; FOXA2</td> <td>8</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.	Tuj1; GFAP Neurof; Map2	8	+ / + / + / +		Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunohist.	ASMA; ASA	8	+ / +		Endodermo <i>Endoderm</i>	inmunohist.	AFP; FOXA2	8	+ / +	
	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.	Tuj1; GFAP Neurof; Map2	8	+ / + / + / +																					
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunohist.	ASMA; ASA	8	+ / +																					
Endodermo <i>Endoderm</i>	inmunohist.	AFP; FOXA2	8	+ / +																					
<p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i></p>	<p>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>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, XX p6 (Anexo 4/ Annex 4)</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 5)</p> <p><i>Microsatellite markers of the initial fibroblasts 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>El análisis mediante PCR mostró la ausencia de plásmidos episomales en la línea de iPSC y en fibroblastos control no-nucleofectados; y presencia de plásmidos en fibroblastos control nucleofectados con GFP tras 72h tras nucleofección (Anexo 6).</p> <p><i>The copy number 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 6).</i></p>																								

Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i>	<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 6)</p> <p><i>QRT-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 6).</i></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>No procede</p> <p><i>Not required</i></p>
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	<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

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

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Raúl Alelú Paz	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Parque Científico de Madrid. C/Faraday 7, 28049, Madrid
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Laboratorio de Neurociencia Elena Pessino Gómez del Campo-Fundación Canis Majoris	Teléfono (phone): 651867310 Fax: E-mail: ralelu@fcmajoris.es

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):

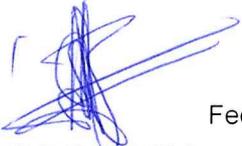
Otras observaciones o información relevantes (a rellenar por el BNLC):
Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

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>Fecha / Date</p>	<p>Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator</p>  <p>Fecha / Date 3.XII.18</p>
---	--

CMR[B]
 Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
 Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
 Center of Regenerative Medicine in Barcelona
 Hospital Duran i Reynals 3ª planta
 Gran Via de l'Hospitalet, 199-203
 L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona)
 NIF G-63687222

Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:
 Name and Position of the Person Representing the Centre:
 Angel Raya. Director

<p>Dirección Postal: Postal Address: Hospital Duran i Reynals. Gran Via de l' Hospitalet 199. 08908. Hospitalet de Llobregat. Barcelona</p>	<p>Teléfono /Telephone: 93 3160320 Fax: 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>Raúl Alelú Paz</p>  <p>Fecha / Date: 21-11-2018</p>	<p>Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator</p> <p>Raúl Alelú Paz</p>  <p>Fecha /Date 21-11-2018</p>
---	---

Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:
 Name and Position of the Person Representing the Centre:
 Raúl Alelú Paz. Director

<p>Dirección Postal: Postal Address: C/Bárbara de Braganza 10. 1º izquierda. 28004 Madrid</p>	<p>Teléfono /Telephone: 910238478 Fax: E-mail: ralelu@fcmajoris.es</p>
--	---

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR OCD FiPS 1-Ep6F-16 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

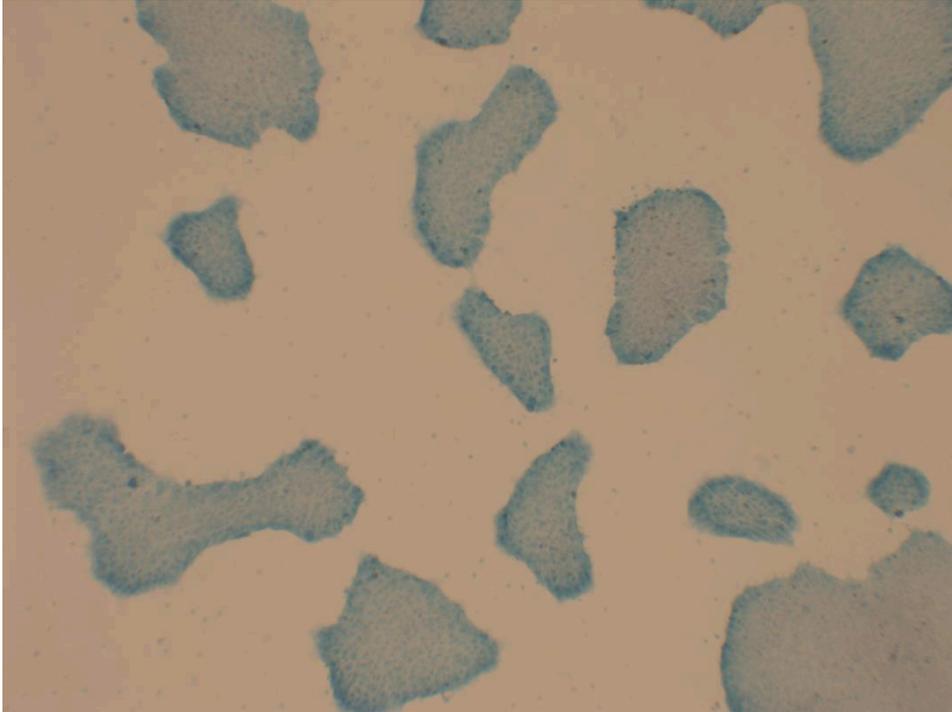
Anexo 5: Resultados microsatélites

Anexo 6: Ausencia de los transgenes de reprogramación

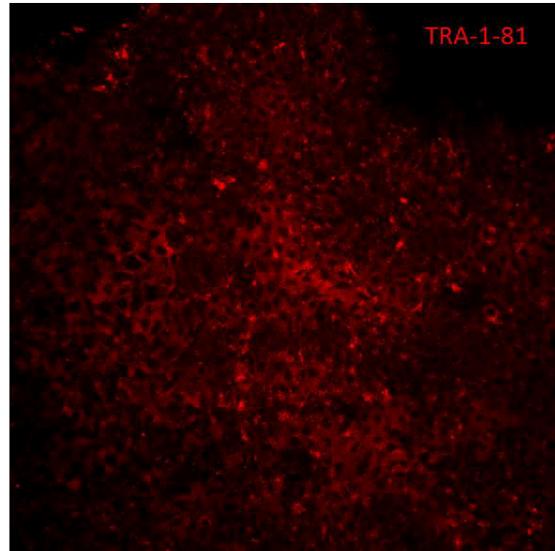
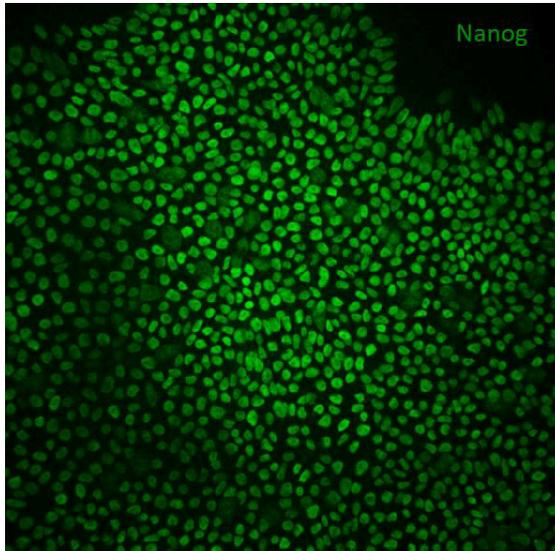
Anexo 7: Resultado test de micoplasma

Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

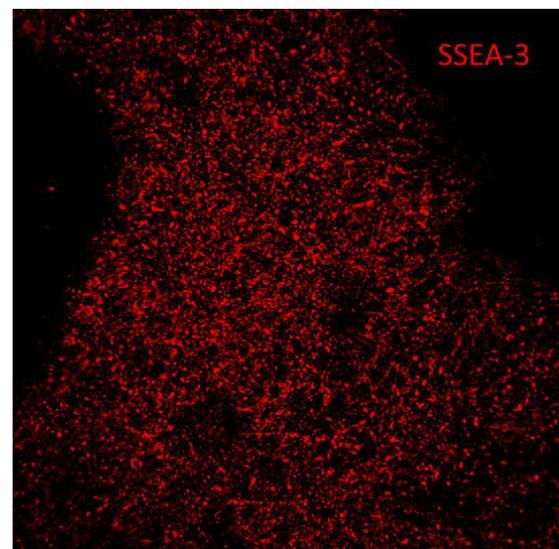
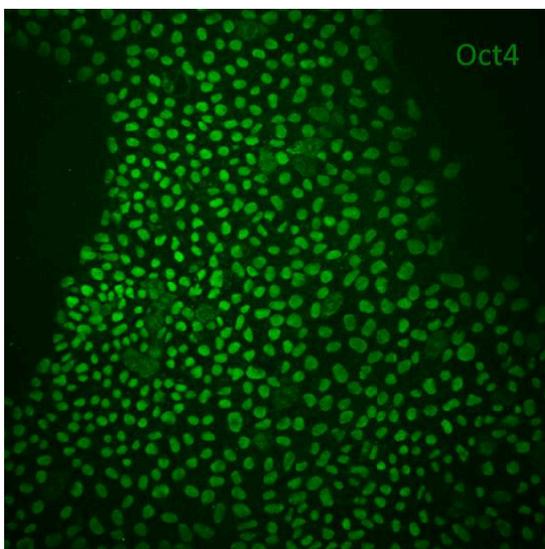


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



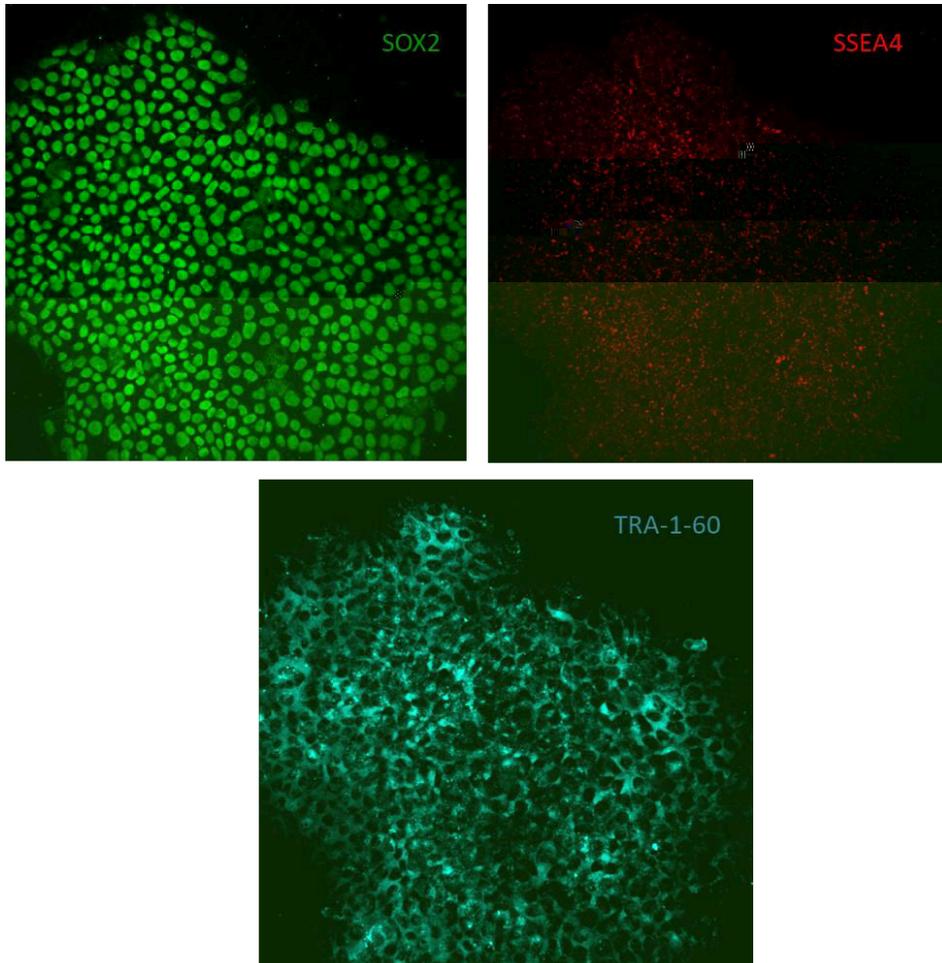
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3

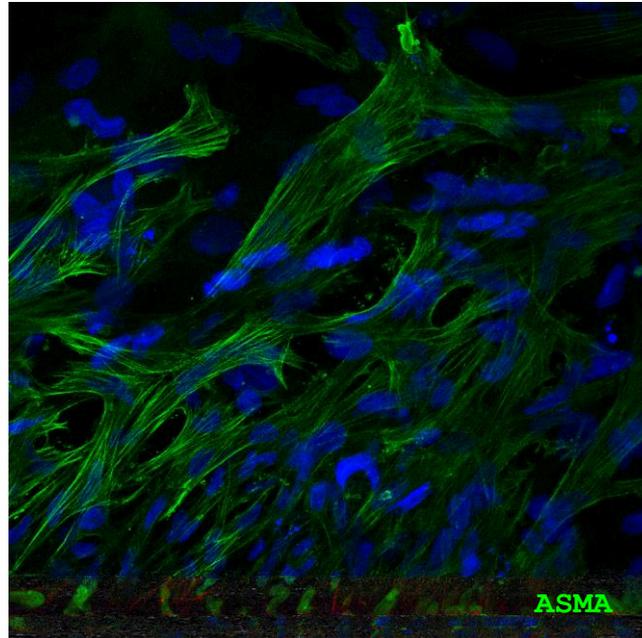


Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

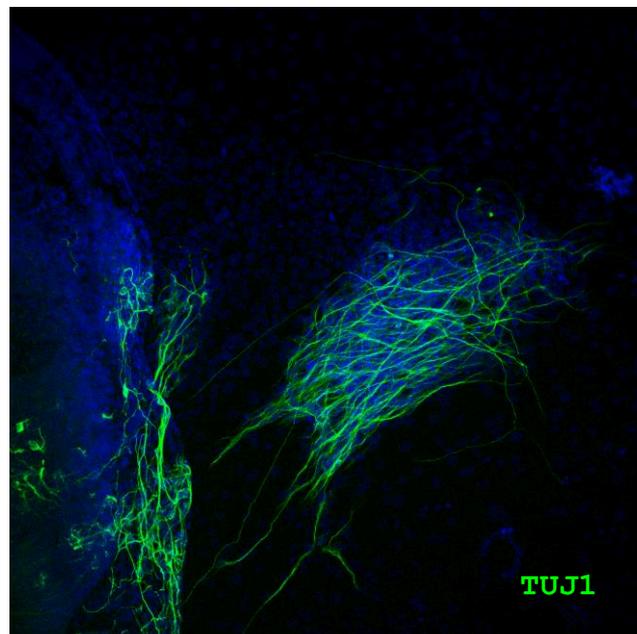
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

Anexo 2

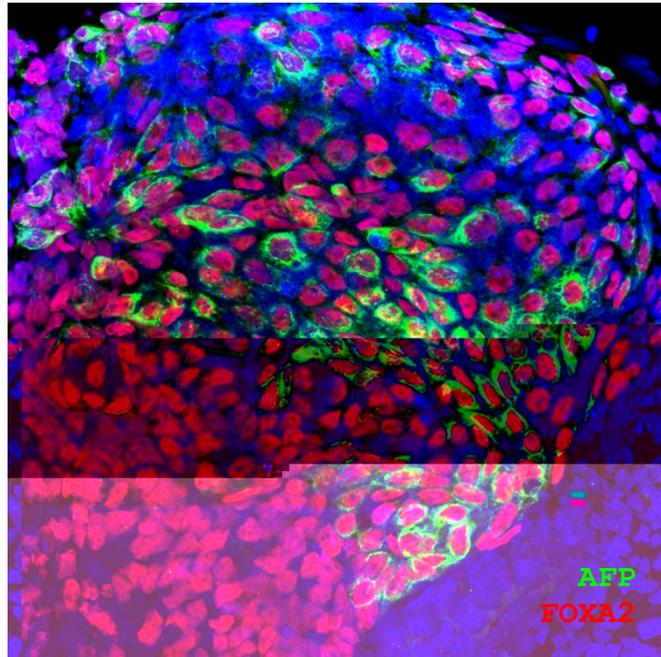
Diferenciación *in vitro*



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



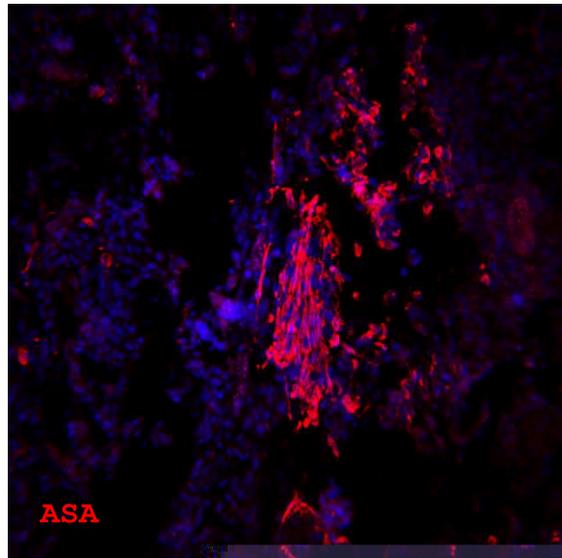
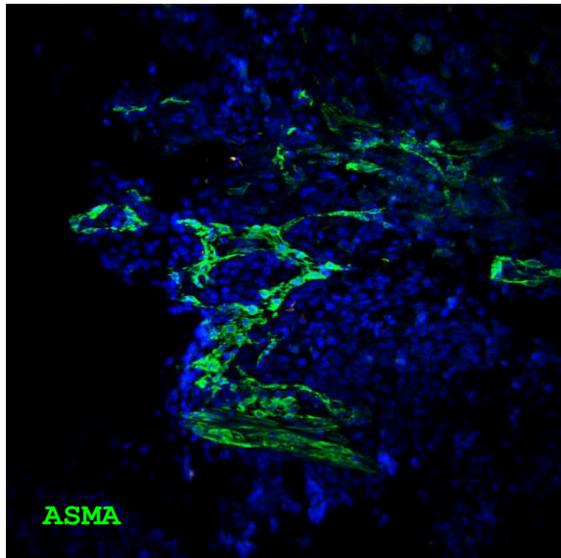
Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para **Tuj1**



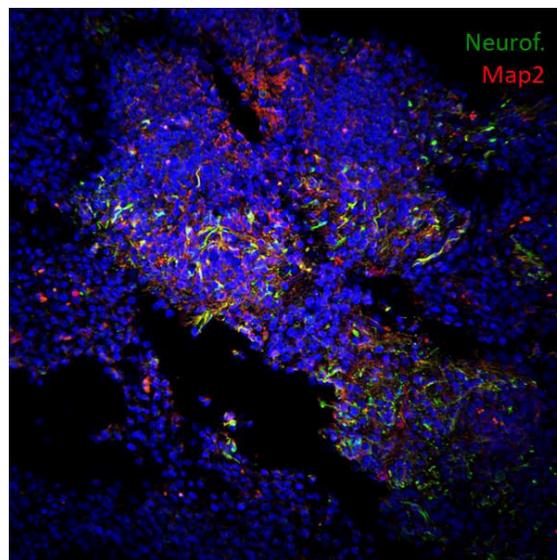
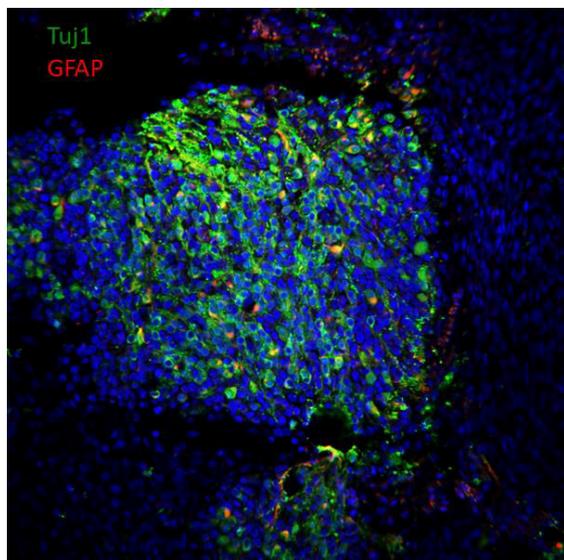
Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **AFP** y **FOXA2**

Anexo 3

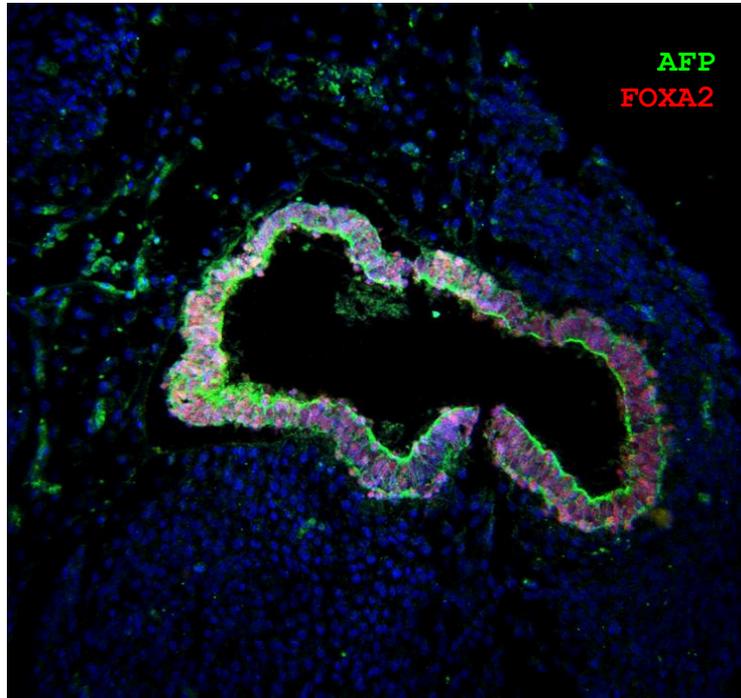
Diferenciación *in vivo*



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



Diferenciación *in vivo* a ectodermo: Células positivas para **TUJ1, GFAP, Neurofilamento y Map2.**



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

Anexo 4

Cariotipo

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⁾ (bases)	Repeat Numbers of Allelic Ladder Components
TH01	FL	156–195	4–9, 9.1, 10–11, 11.1
D21S11	FL	285–259	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	FOB	109–155	7–16
D18S517	FOB	176–208	7–15
D7S820	FOB	215–247	6–14 ²⁾
D16S539	FOB	284–304	5, 8–15
CSF1PO	FOB	321–357	6–15
Amelogenin	TMR	108, 112	X, Y
vWA	TMR	125–171	10–22
TPOX	TMR	282–290	6–13

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

²⁾When 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.

³⁾HeLa cells have a non-representative allele 13.2 at the D18S517 locus. This will appear as an off-ladder allele. (see www.csi.com/gen/white/var_D18S517.html).

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:

A continuación se indica el código de Biobanco para la muestra analizada y el código origen del ADN procesado de la línea celular:

Código Biobanco	Código origen de ADN
32180103002	OCD FiPS 1-Ep6F-16 p7

En la tabla siguiente se muestran los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR.

Código origen del ADN de la línea celular	Loci STR analizados									
	AMEL	CSF1PO	D18S517	D16S539	D21S11	D5S818	D7S820	TH01	TPOX	vWA
OCD FiPS 1-Ep6F-16 p7	X	12, 13	11, 12	11	29, 31	11, 12	11, 12	6, 7	8, 10, 12, 5	18

Granada, a 26 de Marzo de 2018

Laboratorio de Biología Molecular
 Biobanco del SSPA

RESULTADOS:

A continuación se indica el código de Biobanco para la muestra analizada y el código origen del ADN procesado de la línea celular:

Código Biobanco	Código origen de ADN
32180072002	OCD1F

En la tabla siguiente se muestran los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR.

Código origen del ADN de la línea celular	Loci STR analizados									
	AMEL	CSF1PO	D13S317	D16S539	D21S11	D5S818	D7S820	TH01	TPOX	vWA
OCD1F	X	12, 13	11, 12	11	29, 31	11, 12	11, 12	6, 7	8, 10	18

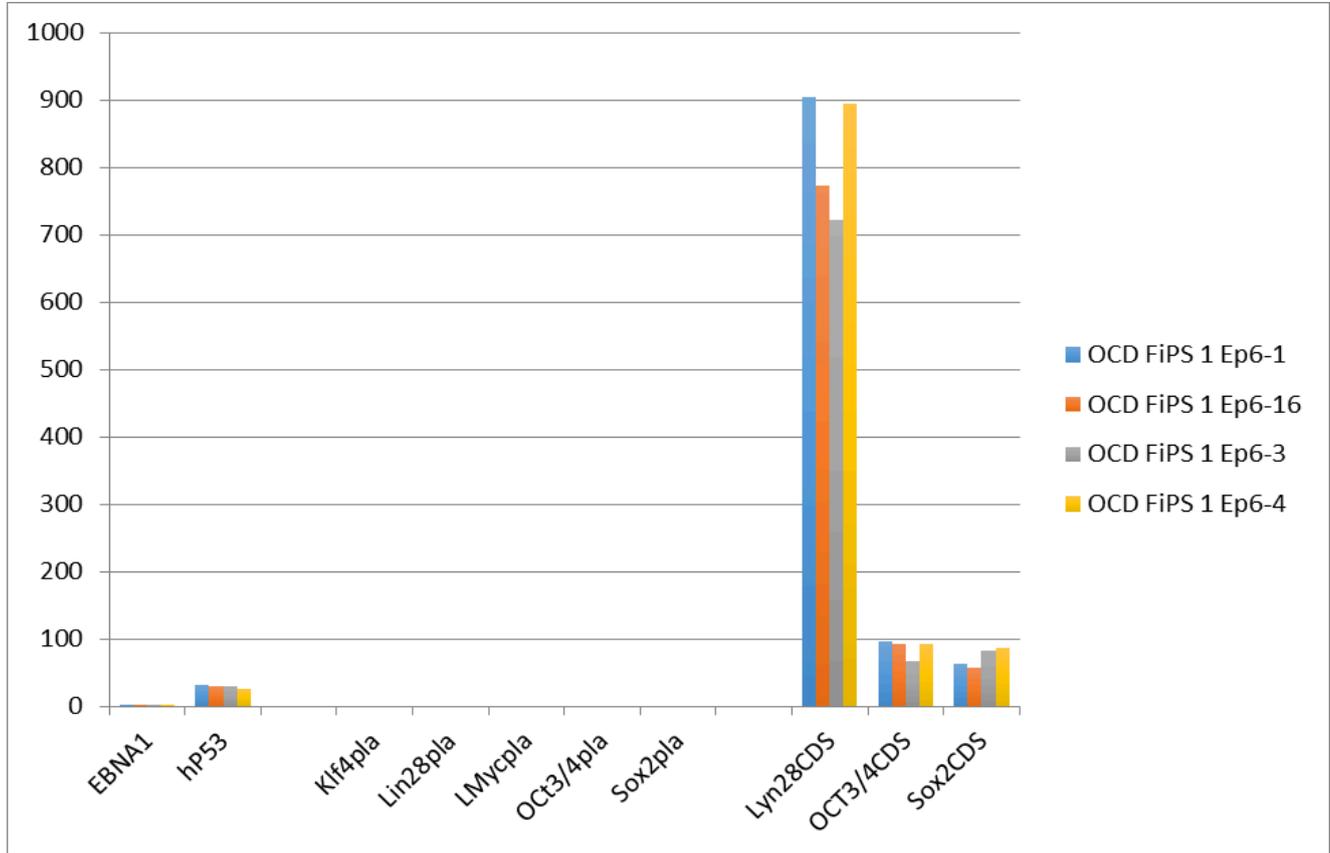
Granada, a 19 de Febrero de 2018

Laboratorio de Biología Molecular
Biobanco del SSPA

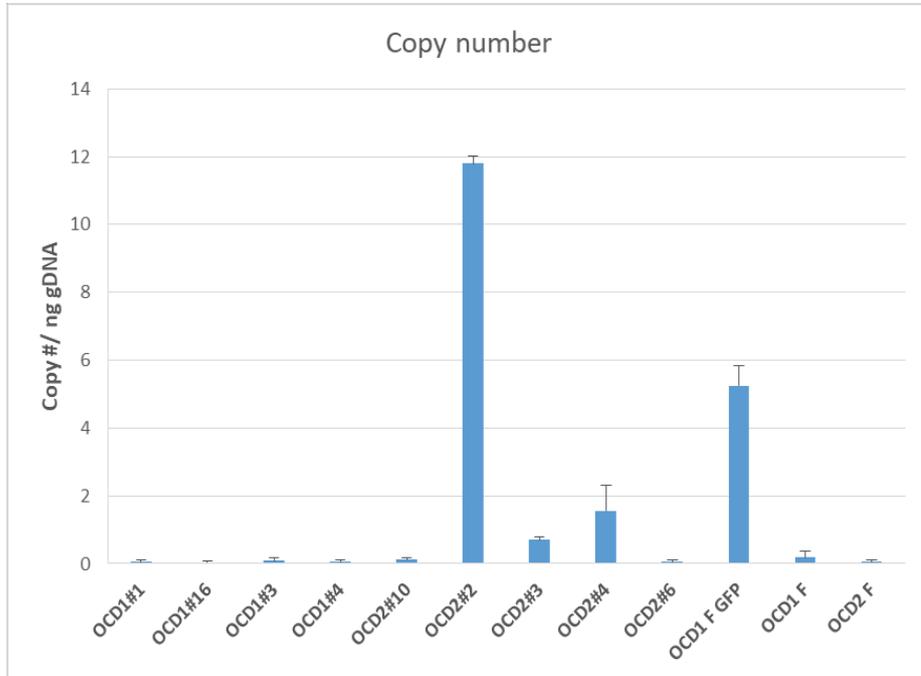
Análisis de microsatélites en la línea de hiPSC y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.

Anexo 6

Ausencia de los transgenes de reprogramación



Niveles de expresión de mRNA de transgenes (pla) y marcadores de pluripotencia endógenos (CDS) en la línea **OCD FiPS 1 –EP6F-16** y otros clones procedentes del mismo paciente.

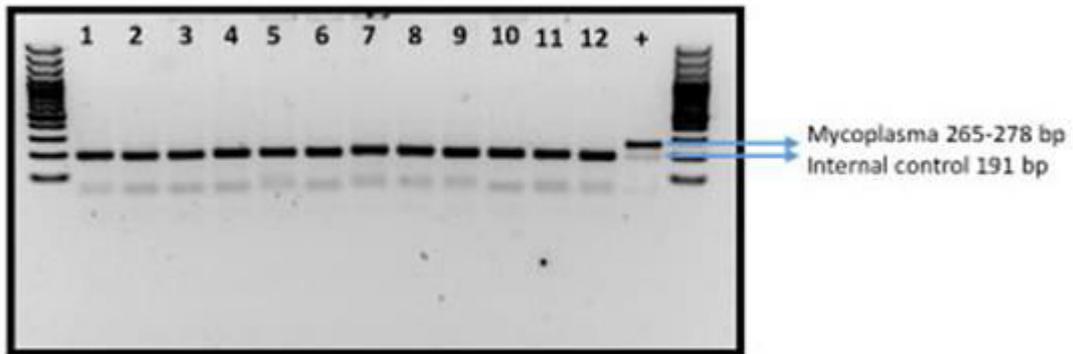


PCR donde se muestra la ausencia de plásmidos episomales en la línea de iPSC (**OCD1#16** corresponde a la abreviación de **OCD FiPS 1-Ep6F-16**) y en fibroblastos control no-nucleofectados (**OCD1F**) y la presencia de plásmidos en fibroblastos control GFP-nucleofectados 72h después de la nucleofección (**OCD1 F GFP**)

Anexo 7

Resultado test de micoplasma

Mycoplasma test (VenorGeM Classic kit) 26/10/17



3. OCD FiPS1 Ep6F-16