

Fecha de recepción (Date received): vv

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 an human iPS cell line

FECHA: 7-12-2020

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 for the Principal Investigator
- ☒ **Número de registro del proyecto** PI18/00151

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>	MAMcA2-BiPS4F7 o McA2.7
Nº de registro en el Human Pluripotent Stem Cell Registry (1)	IISHDOI007-A
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>	Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Mujer 70 Female 70
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO ☐ disease No SÍ ☒ (especificar) Enfermedad de McArdle. McArdle Yes (specify)
¿La patología es de origen genético?	NO ☐ SÍ ☒ (especificar)

<i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	Es causada por una mutación en el gen PYGM: NM_005609: c.2392T>C; p.Trp798Arg. The disease is caused by a mutation in the gene PYGM: NM_005609: c.2392T>C; p.Trp798Arg No Yes (specify)
Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco ☒ Crioconservado ☐ <i>Fresh Cryopreserved</i>
Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 24/10/2019	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 24/10/2019
Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	Las PBMCs se aislaron de sangre periférica total mediante un método de centrifugación en gradiente usando Lymphoprep y se cultivaron después en medio StemSpam™ SFEM II (StemCell) suplementado con SCF (C-Kit ligand) (StemCell), Flt-3 Ligand (StemCell), IL-3 (StemCell) e IL-6 (Thermofisher). PBMCs were isolated from the whole blood by a density gradient centrifugation method using Lymphoprep and were cultured for in StemSpam™ SFEM II medium (StemCell supplemented with SCF (C-Kit ligand) (StemCell), Flt-3 Ligand (StemCell), IL-3 (StemCell) and IL-6 (Thermofisher).
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>	Se ha llevado a cabo análisis de la huella genética por análisis de microsatélites/STR: D13S317, D7S820, VWA, D8S1179, D21S11, D19S433, D2S1338 and amelogenin (ver anexo I (tabla 1) y anexo 2). To confirm the cell identity a DNA fingerprinting assay has been carried out using the microsatellites/STRs: D13S317, D7S820, VWA, D8S1179, D21S11, D19S433, D2S1338 and amelogenin microsatellites/STRs (see annex I (table 1) and annex 2).
¿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, se procesaron todas las PBMCs No, all the obtained PBMCs were used
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>	Metodología no integrativa que implica el uso de virus Sendai (Cyto Tune iPS 2.0 Sendai reprogramming kit). Se han utilizado los factores de reprogramación Oct3/4, Sox2, Klf4 y cMyc. Non integrative methodology that involves the use of Sendai virus (Cyto Tunes-iPS 2.0 Sendai reprogramming kit, Invitrogen) Oct3/4, Sox2, Klf4 y cMyc have been used as reprogramming factors.
Condiciones de cultivo de la línea de iPSc generada. (si se describen en publicación, indicar referencia) <i>iPSC Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i>	Las iPSCs se mantienen y expanden usando el medio mTeSR Plus (StemCell) en un incubador de CO2 5% a 37°C. Las células se subcultivan cuando se alcance una confluencia entorno al 80% con ReLeSR (StemCell). iPSCs were maintained and expanded using mTeSR Plus medium (StemCell) in a 5% CO2 incubator at 37 °C. Cells were passaged at a confluence of 80% employing ReLeSR (StemCell).

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>	Las iPSC generadas presentan características morfológicas típicas de células ES (elevada relación núcleo/citoplasma (ver anexo) The generated iPSCs present a typical ES cell colony morphology (high ratio nucleus/cytoplasm (see Annex).
Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i>	Se ha seguido el protocolo descrito en el "Cyto Tune-iPS 2.0 Sendai reprogramming kit" For cryopreserving the iPSC cells the protocol described in the manual of the "Cyto Tune-iPS Sendai reprogramming kit" has been followed.
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>	Pase 12 Passage 12
¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> Sí Yes ☐ No No ☒ Comentarios/ Comments:	¿Se llevó a cabo un análisis clonal? <i>Has a clonal analysis been carried out?</i> Sí/ Yes ☐ No ☒ Resultado / Result

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>	
Se informará de al menos 5 de los siguientes marcadores <i>At least 5 of the following test will be reported</i>	Oct 4	qPCR/ICC (immunocitoquímica/ immunocytochemistry) 20 +			
	Nanog	qPCR/ICC	20	+	
	Sox 2	qPCR/ICC	20	+	
	SSEA3	Not analysed			
	SSEA4	ICC	20	+	
	TRA-1-60	ICC	20	+	
	TRA-1-81	ICC	20	+	
	Fosfatasa. Alk	Ensayo actividad/ activity assay	20	+	
Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i>	Comentarios <i>Method</i>	Método <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>
Ectodermo <i>Ectoderm</i>	ICC	TUJ1	20	+	
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	ICC	SMA	20	+	
Endoderm <i>Endoderm</i>	ICC	AFP	20	+	
Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> (espontánea/inducida) <i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i>	Espontánea a las tres capas embrionarias, (ver anexo I) Spontaneous differentiation into the three germ layers, (see annex I).				

Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i>	<table><tr><th>Método</th><th>Marcador</th><th>Nº pase</th><th>Resultado</th></tr><tr><th>Comentarios</th><th></th><th></th><th></th></tr><tr><td><i>Method</i></td><td><i>Marker</i></td><td><i>Passage n</i></td><td><i>Results</i></td></tr><tr><td colspan="4"><i>Comments</i></td></tr></table> Ectodermo <i>Ectoderm</i> Mesodermo <i>Mesoderm</i> Endodermo <i>Endoderm</i>	Método	Marcador	Nº pase	Resultado	Comentarios				<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>	<i>Results</i>	<i>Comments</i>			
Método	Marcador	Nº pase	Resultado														
Comentarios																	
<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>	<i>Results</i>														
<i>Comments</i>																	
Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i>	No se ha llevado a cabo por considerarse un ensayo que ya no es necesario para demostrar la pluripotencialidad de las células. This assay has not been carried out. At this moment it is considered that this assay is not essential to demonstrate the pluripotency of the cells.																
Cariotipo (especificar fórmula cariotípica en el pase de banqueo) <i>Karyotype (Specify karyotype formula in the passage in which it is banked)</i>	Pase 15, cariotipo 46, XX (Ver Anexo I) Passage 15, Karyotype 46, XX (see annex I)																
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>	Se ha llevado a cabo análisis de la huella genética por análisis de microsatélites/STR: D13S317, D7S820, VWA, D8S1179, D21S11, D19S433, D2S1338 and amelogenin (ver anexo I (Tabla 1) y anexo 2). To confirm the cell identity a DNA fingerprinting assay has been carried out using D13S317, D7S820, VWA, D8S1179, D21S11, D19S433, D2S1338 and amelogenin (see annex I (Tabla 1) and annex 2).																
Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>	Los genes no se integran porque se ha utilizado una metodología no integrativa (virus Sendai). Genes do not integrate. A non-integrative methodology that involves the use of Sendai virus has been used.																

Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i>	Mostramos por RT-PCR la eliminación de los vectores y factores de reprogramación exógenos (ver anexo I). We confirmed the clearance of the vectors and the exogenous reprogramming factor genes by RT-PCR (see annex I).
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>	Se ha confirmado la presencia de las mutaciones en la línea de iPSC generada por secuenciación Sanger [ver anexo 1 (figura 1)]. The presence of the mutations in the iPSC line was evaluated and confirmed by Sanger sequencing [see annex 1 (figure 1)].
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	Las células son micoplasma negativas por PCR (ver figura suplementaria I in annex I). iPSC cells have been confirmed mycoplasma-free by PCR (see supplementary figure 1 in annex I).

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3 Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> MARÍA ESTHER GALLARDO PÉREZ	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Avda. de Córdoba s/n; 28041-Madrid
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre, i+12	Teléfono (phone): 91-779-27-13 Fax: E-mail: egallardo.imas12@h12o.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.

Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre (Representante legal del Departamento/Centro) Legal Representative of the Department/Centre  Joaquín Arenas Barbero Fecha/ Date: 9/12/20	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i> GALLARDO PEREZ, MARIA ESTHER (FIRMA) Firmado digitalmente por GALLARDO PEREZ, MARIA ESTHER (FIRMA) Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, serialNumber=07237143D, sn=GALLARDO, givenName=MARIA ESTHER, cn=GALLARDO PEREZ, MARIA ESTHER (FIRMA) Fecha: 2020.12.09 11:57:52 +01'00' María Esther Gallardo Pérez Fecha /Date
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Director científico del i+12	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Hospital Universitario 12 de Octubre Centro de Actividades Ambulatorias Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, i+12 Avda. de Córdoba s/n 28041-Madrid	Teléfono /Telephone: 91-779-27-13 Fax: E-mail: joaquin.arenas@salud.madrid.org

(1) Instrucciones para la realización del registro de líneas hESC y hiPSC generadas en España en el Human Pluripotent Stem Cell Registry

Entre en la página web: <https://hpscereg.eu/>

Cree su perfil rellenando el formulario on-line Sign up form. Después de hacer click en Sign up, recibirá el mensaje de confirmación de los datos y se le enviará el correo electrónico de confirmación.

Registro de líneas:

- Register Cell Line> Create a standard cell line name> Generator Institution: Assign an existing institution: Introducir: Spanish Stem Cell Bank
- hPSCreg Team <hpscereg-info@charite.de> le confirmará la asignación de Spanish Stem Cell Bank a su perfil por correo electrónico. En este momento su estado en Dashboard (My institutions) de Applicant cambiará a Registrant para esta institución.
- Volver a Generator Institution> seleccionar en el desplegable Spanish Stem Cell Bank.
- El nombre provisional (Provisional name) debe de empezar por ES.
- En Alternative names introduzca el nombre de la línea con el que se deposita en el BNLC, según las indicaciones:

Documento de Solicitud de registro y depósito de una línea iPS humana. Versión diciembre 2019
Los apartados que requieran entrada de texto, deben rellenarse tanto en castellano como en inglés
Text items should be filled in both Spanish and English

Página 8 de 8

- http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-el-instituto/fd-organizacion/fd-estructura-directiva/fd-subdireccion-general-investigacion-terapia-celular-medicina-regenerativa/fd-centros-unidades/fd-banco-nacional-lineas-celulares/Nomenclatura_iPS_BNLC_2015.pdf