



PARTE A Y C

**Actividades de
tipo 3 y 4**

DIRECCIÓN GENERAL CALIDAD Y
EVALUACIÓN AMBIENTAL

COMISIÓN NACIONAL DE
BIOSEGURIDAD

**NOTIFICACIÓN SOBRE ACTIVIDADES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE
ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE**

I. INFORMACIÓN GENERAL

1. Responsables de la actividad

a. Entidad

Nombre: Centro Nacional de Biotecnología (CNB). Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Dirección postal: Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Darwin 3. Campus Universidad Autónoma de Madrid. 28049 Madrid.

b. Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: José Mario Mellado García

NIF: 13295208N

Cargo: Director del CNB

Tel: 91 585 45 03 / 4852

Correo electrónico: direccion.cnb@csic.es

c. Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Marta López de Diego

NIF: 01188723Z

Cargo: investigadora principal

Tel: 915854552/ 682582856

Correo electrónico: marta.lopez@cnb.csic.es

d. Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad

Nombre y apellidos: Fernando Usera Mena

NIF: 00694865-N

Cargo: Responsable del Servicio de Seguridad Biológica y Protección Radiológica

Tel: 91 585 45 41

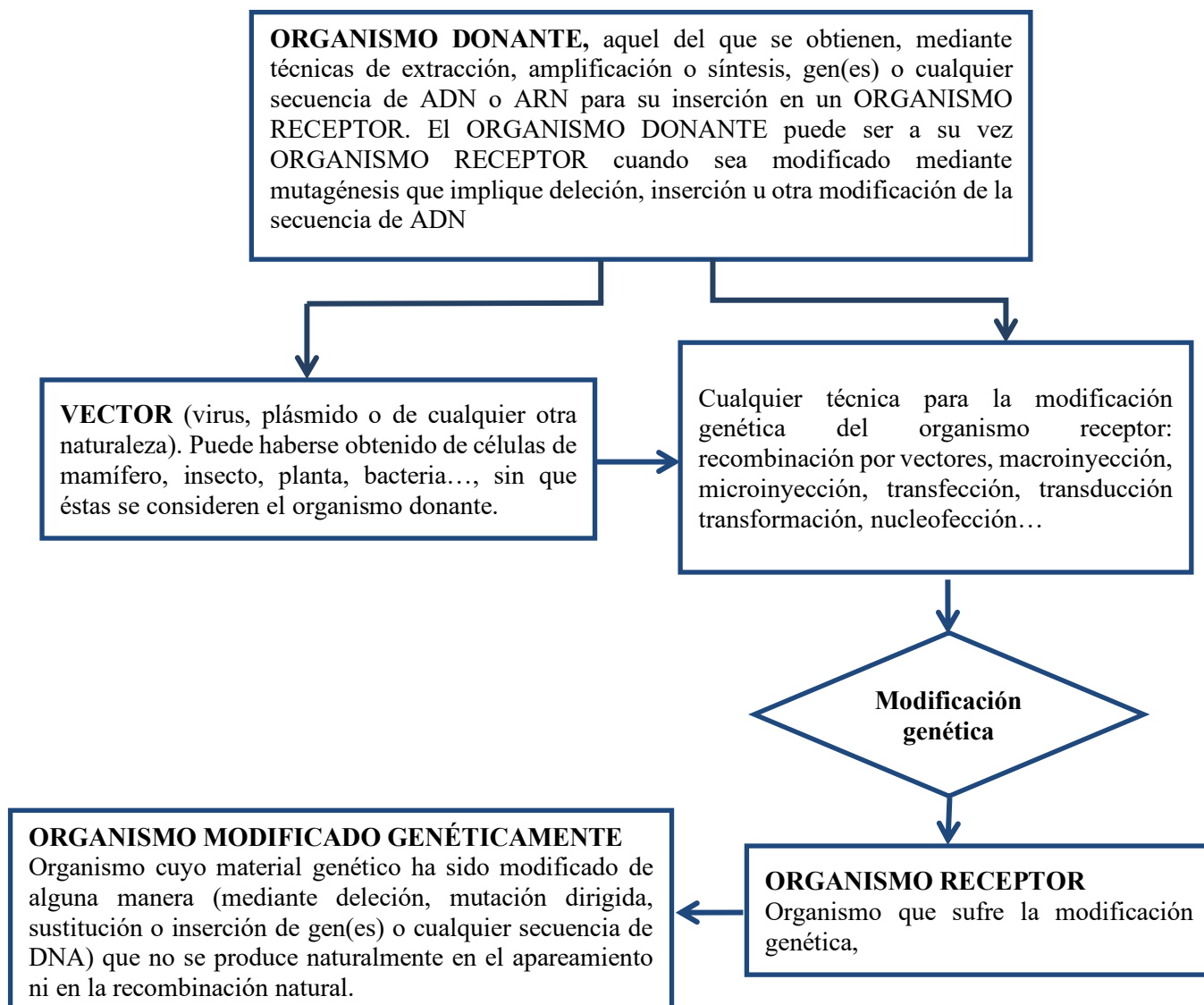
Correo electrónico: fusera@cnb.csic.es

e. Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto:

Fernando Usera Mena



PROCESO GENERAL PARA LA OBTENCIÓN DE UN OMG A EFECTOS DE NOMENCLATURA:





II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1. Debe señalarse si para la ejecución de esta actividad se recibe financiación del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica. Esta información es necesaria para determinar si la actividad se encuentra dentro del supuesto del artículo 3.2.b) de la Ley 9/2003 y, por lo tanto, la competencia recae en la Administración General del Estado.

SI ☒ NO ☐

Si la respuesta a la pregunta anterior es **SI**, debe justificarlo especificando¹:

- Nombre de la convocatoria:

Consolidación Investigadora, Generación del conocimiento.

- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

CNS2022-135276, PID2021-123810OB-I00, IP: Marta López de Diego.

- Organismo financiador:

Ministerio de Ciencia e Innovación.

Otro tipo de financiación²

☐

2. Instalación donde se va a desarrollar la actividad (si la instalación no está autorizada, cumplimente el Formulario Parte B):

- Número de referencia de la notificación de la instalación (A/ES/./I-...):

A/ES/00/I-08.

- Fecha de autorización de la instalación:

06-marzo-2000

Si el OMG no se genera en la instalación³:

- Nombre de la instalación de origen del OMG:

- Número de referencia de la notificación de la actividad en el caso de que se realice en España (A/ES/./I-...)

¹TASAS

Están exentos del pago de la tasa los casos en los que se cumplan dos requisitos, que la actividad se realice en el marco de los Planes Estatales de Investigación Científica y Técnica y de Innovación; y que se desarrolle por una institución, ente u órgano público.

² Se deberá aportar la información que permita verificar esta circunstancia.

³ Debe tenerse en cuenta que, si los OMG proceden de otra instalación española, ésta deberá haber cumplido con los requisitos establecidos en la legislación española de OMG.



- Número de referencia de la notificación de la instalación en el caso de que se ubique en España (A/ES/.../I-...):

- Explicar cómo se realiza el transporte del OMG desde la instalación de origen teniendo en cuenta la legislación aplicable (especificar tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado)⁴:

3. Finalidad de la actividad:

Infección de células que sobreexpresan las proteínas en estudio mediante el uso de lentivirus, con el virus SARS-CoV-2. Las células que transduciremos serán las células humanas de adenocarcinoma pulmonar A549 y Calu-3, y las células de riñón HEK293. Las células transducidas nos permitirán analizar el efecto de los genes sobreexpresados en la replicación y en la inducción de respuestas inmunes innatas en células infectadas con coronavirus (SARS-CoV-2). Para ello se generarán lentivirus recombinantes que expresen genes humanos de interés, tales como los genes ACE2, GBP1, GBP6, y TRIM34. Estos lentivirus nos permitirán transducir células, y sobreexpresar en estas células transducidas, los genes humanos de interés.

La actividad de generación de lentivirus recombinantes y transducción de células humanas, ya se ha notificado como actividad de nivel 2 (número de registro por sede del MAPA: REGAGE23e00077601039), no obstante, se explica en este formulario de nuevo tanto la generación de lentivirus como la transducción de células.

4. Clasificación de la actividad:

(Para la clasificación del tipo de riesgo de las operaciones se seguirá el procedimiento establecido conforme al artículo 4 y el anexo III de la Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo, relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente, y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las Notas de orientación para la evaluación del riesgo).

Tipo 3 ☒

Tipo 4 ☐

III. INFORMACIÓN RELATIVA A LA OBTENCIÓN DEL OMG

1. Organismo receptor del cual deriva el OMG:

⁴ Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:

- (ADR) Clase 6.2 (Materias infecciosas) del Acuerdo Europeo de Transporte Internacional de Mercancías Peligrosas por Carretera y principales modificaciones.
- Reglamento (CE) N° [1/2005](#) del Consejo, de 22 de diciembre de 2004, relativo a la protección de los animales durante el transporte y las operaciones conexas y por el que se modifican las Directivas [64/432/CEE](#) y [93/119/CE](#) y el Reglamento (CE) N° [1255/97](#). Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio (BOE núm. 268, 8.11.2007)
- Reglamento (CE) N° [1946/2003](#) del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de julio de 2003, relativo al movimiento transfronterizo de organismos modificados genéticamente [Diario Oficial L 287 de 5.11.2003].
- Artículo 18.2.c del Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad. Documentación acompañamiento en el movimiento transfronterizo: <https://bch.cbd.int/protocol/>
- [Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances](#) Edición bianual de la OMS



Células humanas/primates	☐	Detallar las líneas celulares:
Células: otras	☐	Detallar las líneas celulares:
Animal	☐	
Planta	☐	
Bacteria	☐	
Hongo	☐	
Virus	☒	
Protozoos	☐	

-Especificar el nombre científico y común:

Lentivirus deficientes en replicación.
--

a. Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

- i) Técnicas de aislamiento: El organismo receptor son lentivirus derivados del virus HIV-1, deficientes en replicación. Los vectores lentivirales se generan mediante la expresión de varios de los componentes del sistema vector a partir de unidades separadas de DNA: (i) la unidad empaquetadora que contiene las proteínas estructurales, así como los enzimas necesarios para generar la partícula viral y (ii) el plásmido lentiviral genómico, que es el material genético que será transducido a la célula diana. - En la unidad empaquetadora se han eliminado cinco genes (env, vif, vpr, vpu y nef) que codifican proteínas virales que han sido identificadas o se sospecha que representan factores esenciales de virulencia. Esto elimina la posibilidad de que un virus de tipo silvestre sea reconstituido mediante recombinación durante la preparación de los vectores lentivirales basados en VIH-1.- La auto-inactivación consiste en la introducción de una delección en la región U3 de la repetición terminal larga (long terminal repeat, LTR) en el extremo 3' de la unidad de DNA utilizada para producir el vector RNA, el plásmido lentiviral genómico. Esta delección elimina la actividad promotora de la LTR, de manera que previene la síntesis de un vector RNA en la célula diana. Así se minimiza la probabilidad de que se origine un lentivirus replicativo tanto en las células productoras de los vectores como en las células diana. - Al eliminarse el gen de la envuelta viral, estos vectores lentivirales son pseudotipados con la glicoproteína G de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV), aumentando la estabilidad y el tropismo de los vectores lentivirales generados.
- ii) Técnicas de identificación: Secuenciación de nucleótidos de las partículas virales defectivas y de los plásmidos que se transfectan en las células para generar los lentivirus defectivos
- iii) Marcadores genéticos: Las partículas virales carecen de cinco genes (env, vif, vpr, vpu y nef) que codifican proteínas virales que han sido identificadas o se sospecha que representan factores esenciales de virulencia. Esto elimina la posibilidad de que un virus de tipo silvestre sea reconstituido mediante recombinación durante la preparación de los vectores lentivirales basados en VIH-1. Además, se ha introducido una delección en la región U3 de la repetición terminal larga (long terminal repeat, LTR) en el extremo 3' de la unidad de DNA utilizada para producir el vector RNA, el plásmido lentiviral genómico. Esta delección elimina la actividad promotora de la LTR, de manera que previene la síntesis de un vector RNA en la célula diana. Asimismo, se ha intercambiado la secuencia



que codifica la proteína de la envuelta del virus HIV-1, por la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV)

iv) Marcadores fenotípicos: No aplica

v) Estabilidad genética: Los lentivirus defectivos solo replican en las células en las que se transfectan los plásmidos, por lo que son genéticamente estables en estas células.

b. La cepa/línea celular receptora: ¿está libre de agentes biológicos contaminantes?

SI ☒

– Especificar cómo se sabe que está libre de agentes biológicos contaminantes.

Los lentivirus parentales defectivos (organismo receptor) no se generarán durante los experimentos, solo generaremos los lentivirus defectivos que expresan los genes humanos de interés.

NO ☐

– Especificar si se conocen o se sospecha cuáles pueden ser.

c. Modificación genética anterior:

SI ☒

– Describir:

Los lentivirus que expresen los genes humanos de interés, son totalmente avirulentos, ya que contienen una delección que elimina la actividad promotora de la LTR, de manera que previene la síntesis de un vector RNA en la célula diana. Así se minimiza la probabilidad de que se origine un lentivirus replicativo tanto en las células productoras de los vectores como en las células diana. Además, se han eliminado cinco genes (env, vif, vpr, vpu y nef) que codifican proteínas virales que han sido identificadas o se sospecha que representan factores esenciales de virulencia. Esto elimina la posibilidad de que un virus de tipo silvestre sea reconstituido mediante recombinación durante la preparación de los vectores lentivirales basados en VIH-1

– Cambios en virulencia, patogenicidad, tropismo, toxicidad, otros efectos.

Los lentivirus parentales, de los que derivarán los lentivirus que expresen los genes humanos de interés, son totalmente avirulentos, ya que contienen delecciones. Estas delecciones resultan en lentivirus que no pueden replicar en células convencionales, en las que no se han transfectado los plásmidos para generar los lentivirus.

NO ☐

d. Se considera patógeno este organismo, vivo o muerto, y/o sus productos intra/extracelulares (Asignar grupo de riesgo conforme al anexo II de Real Decreto 664/1997 tras evaluación del riesgo específica):

No es patógeno

SI ☐

Para:



- | | |
|----------|--------------------------|
| Humanos | ☐ |
| Animales | ☐ |
| Plantas | ☐ |
| Otros | ☐ |



– Posibles efectos alérgicos y/o tóxicos (describir):

NO ☒

e. En el caso de cepas no virulentas de especies patógenas: ¿es posible excluir la reversión a la patogenicidad?

SI ☒

NO ☐

f. Experiencia previa adquirida en relación con la seguridad en la utilización del organismo receptor:

El organismo receptor son lentivirus deficientes en replicación. Estos vectores son muy seguros dado que no pueden sobrevivir fuera de las placas de cultivo.

g. Información sobre la capacidad de supervivencia y de reproducción en el medio ambiente:

i) ¿El organismo receptor es capaz de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo?:

SI ☐

- Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

esporas ☐

endosporas ☐

quistes ☐

esclerocios ☐

esporas asexuales (hongos) ☐

esporas sexuales (hongos) ☐

otros, especifíquese

NO ☒

ii) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

No aplica

iii) Posibles nichos ecológicos:

No aplica

iv) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No aplica

h. Efectos posibles sobre el medio ambiente:

i) Implicaciones en procesos ambientales (*p.ej. fijación del nitrógeno o regulación del pH del suelo*):

Ninguno



ii) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

Ninguna

i. Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor:

El organismo receptor son lentivirus defectivos, que solo se generan en las células en cultivo en las que se transfectan los plásmidos necesarios para generarlos. Estos lentivirus no existen fuera de las condiciones de cultivo.

j. Hábitat natural del organismo:

Ninguno, los lentivirus parentales defectivos solo están en los laboratorios BSL2 en los que se generan, mediante la transfección en células de los plásmidos necesarios para su crecimiento. Estos lentivirus solo crecen en las células transfectadas. No crecen en ninguna otra línea celular. Además, para sacarlos del laboratorio, los lentivirus se inactivarán químicamente previamente dentro de la cabina.

2. Organismo(s) donante(s). No completar el punto si no existiese organismo donante o si es el mismo que el organismo receptor.

Humanos	☒
Animal	☐
Planta	☐
Bacteria	☐
Hongo	☐
Virus	☐
Protozoos	☐

-Especificar el nombre científico y común:

El organismo donante son los humanos, de los cuales proceden las secuencias correspondientes a los genes humanos que expresaremos usando los lentivirus defectivos. Sin embargo, en ningún caso se utilizará ninguna muestra humana. Los genes humanos se sintetizarán por la empresa IDT DNA.

a. Se trabaja con él durante la actividad:

SI ☐ NO ☒

b. La cepa/línea celular donante: ¿está libre de agentes biológicos contaminantes?

SI ☐

– Especificar cómo se sabe que está libre de agentes biológicos contaminantes.

No se utilizará ninguna línea celular para esto, los genes humanos se sintetizarán por la empresa IDT DNA

NO ☐

– Especificar si se conocen o se sospecha cuáles pueden ser.



c. Modificación genética anterior:

SI ☐

– Describir:

– Cambios en virulencia, patogenicidad, tropismo, toxicidad, otros efectos.

d. Se considera patógeno este organismo, vivo o muerto, y/o sus productos intra/extracelulares. (Asignar grupo de riesgo conforme al anexo II de Real Decreto 664/1997 tras evaluación del riesgo específica):

SI ☐ Para:

Humanos ☐

Animales ☐

Plantas ☐

Otros ☐

– Posibles efectos alérgicos y/o tóxicos (describir):

NO ☒

e. En el caso de cepas no virulentas de especies patógenas: ¿es posible excluir la reversión a la patogenicidad?

SI ☐

NO ☐

f. Tipo de material genético obtenido del organismo donante (gen codificante o fragmento del mismo. miRNA, lncRNA, etc.):

g. Método de obtención:

– Extracción ☐

– PCR ☐

– Síntesis *in vitro* ☒

h. Función del gen/genes o secuencias en el organismo donante:

Los genes GBP1 y GBP6 son genes cuya expresión se induce por interferón (Tretina et al. JEM, 2019).

GBP1 posee actividad antiviral frente al virus de la estomatitis vesicular, virus de la encefalomiocarditis y virus de la hepatitis C (Itsui et al. Hepatology, 2009; Anderson et al, Virology, 1999).



El efecto de GBP6 en la replicación viral no se conoce aún.

La proteína TRIM34 pertenece a la superfamilia de proteínas con motivos tripartitos (TRIM), que modulan las respuestas inmunes innatas (Ozato et al. Nature Review Immunol, 2008). Además, TRIM34 tiene actividad antiviral frente al virus causante del SIDA (Ohainle et al. Plos Path, 2020).

El gen ACE2 codifica la proteína “angiotensin-converting enzyme 2”, utilizada por el virus SARS-CoV-2 para entrar en las células (Shang et al. PNAS, 2020)

3. ¿Intercambian los organismos donante y receptor material genético de forma natural?

NO



IV. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1. Objetivo de la modificación genética (sobreexpresión, silenciamiento, otros):

Generación de lentivirus recombinantes que expresan genes de interés, tales como GBP1, GBP6, ACE2, TRIM34. La actividad de generación de lentivirus recombinantes, ya se ha notificado como actividad de nivel 2 (número de registro por sede del MAPA: REGAGE23e00077601039). Este documento es para notificar la infección de las células modificadas mediante lentivirus, con el virus SARS-CoV-2.

2. Tipo de modificación genética:

- Inserción de material genético ☒
- Deleción de material genético ☐
- Sustitución de bases ☐
- Otros, especifique:

3. Método utilizado para llevar a cabo la modificación genética:

- Transformación ☐
- Electroporación ☐
- Macroinyección ☐
- Microinyección ☐
- Infección ☐
- Transfección ☒
- Fusión celular ☐

Otros, especifique:

4. ¿Se ha utilizado un vector en el proceso de modificación?

SÍ ☒ NO ☐

En caso afirmativo:

a. Tipo e identidad del vector (plásmido, virus, otros):

Plásmidos MLV gag-pol, VSV-g y plásmidos CBC que contienen los genes que se quieren expresar

i) Aportar mapa de restricción del vector. Indicar las funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación y cualquier otro elemento presente en el vector.

El plásmido MLV gag-pol codifica las proteínas estructurales del virus, y las proteínas necesarias para la transcripción reversa y la integración del genoma viral en el genoma de las células, el plásmido VSV-g, codifica la proteína G de la envuelta del virus VSV,



necesaria para la entrada del virus en las células, y el plásmido CBC, que codifica un gen de resistencia al antibiótico blasticidina, y en el que se clonarán los genes humanos de interés. Los mapas de restricción de los plásmidos utilizados para generar los lentivirus recombinantes se han incluido en la notificación presentada por sede electrónica con número de registro por sede del MAPA: REGAGE23e00077601039.

ii) Si se trata de virus:

- Es defectivo en replicación SÍ ☐ NO ☐
- Indicar cómo se obtiene el vector viral. Si se utilizan plásmidos para su obtención aportar mapa de restricción del/los plásmidos. Indicar las funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación, origen, función y secuencia de otros elementos presentes.

b. Gama de hospedadores del vector:

Los plásmidos solo replican en las bacterias en las que deliberadamente se introduce el plásmido.

c. Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

ninguno

ii) Si el vector es un bacteriófago ¿se han inactivado sus propiedades lisogénicas?

El vector no es un bacteriófago.

iii) ¿Puede el vector transferir marcadores de resistencia a otros organismos?

no

5. Información de la secuencia insertada, delecionada o modificada.

a. Función específica de cada parte de la secuencia insertada, delecionada o modificada:

Se quieren generar lentivirus para expresar distintos genes de interés, para ello, las secuencias insertadas en los lentivirus se corresponderán con las fases de lectura abierta de los genes GBP1, GBP6, TRIM34, ACE2.

Los genes GBP1 y GBP6 son genes cuya expresión se induce por interferón (Tretina et al. JEM, 2019).

GBP1 posee actividad antiviral frente al virus de la estomatitis vesicular, virus de la encefalomiocarditis y virus de la hepatitis C (Itsui et al. Hepatology, 2009; Anderson et al. Virology, 1999). El efecto de GBP6 en la replicación viral no se conoce aún.

La proteína TRIM34 pertenece a la superfamilia de proteínas con motivos tripartitos (TRIM), que modulan las respuestas inmunes innatas (Ozato et al. Nature Review Immunol, 2008). Además, TRIM34 tiene actividad antiviral frente al virus causante del SIDA (Ohainle et al. Plos Path, 2020).

El gen ACE2 codifica la proteína “angiotensin-converting enzyme 2”, utilizada por el virus SARS-CoV-2 para entrar en las células (Shang et al. PNAS, 2020)



b. Información sobre los genes estructurales:

El inserto no codifica genes estructurales

c. Información sobre los elementos reguladores:

El inserto no codifica elementos reguladores

d. ¿Ha sido secuenciada?

El inserto se secuenciará completamente una vez que se hayan generado los plásmidos.

e. ¿Contiene secuencias que no son necesarias para la función deseada? En caso afirmativo, especifíquese.

No contiene secuencias de función no deseada

f. ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida? En caso afirmativo, especifíquese.

No contiene secuencias de función desconocida

6. Si se ha utilizado un vector, ¿cuál es su situación final en el OMG?

a. Si el vector es un plásmido

i) Se pierde ☒

ii) Se inserta en el genoma ☐

- Aleatoriamente ☐

- En un sitio definido ☐

o Localización cromosómica:

o Secuencias colindantes:

o La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes:

iii) Se mantiene en forma episómica ☐

- Número de copias:

- Se dispone de información sobre la estabilidad del vector

b. Si el vector es un virus:

i) Se mantiene en forma episómica ☐

ii) Se inserta en el genoma ☐

- La inserción se produce al azar ☐



- La inserción es específica ☐

○ Localización cromosómica:

○ Secuencias colindantes:

○ La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes:

iii) Existe la posibilidad de formación de partículas víricas. Justificar:

c. Análisis moleculares previstos relativos a la expresión del producto deseado (*PCR, Southern, Northern, secuenciación, otros*):

i) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación) ☒

ii) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA) ☒

iii) Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas) ☒



V. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE (OMG)

1. Descripción del OMG final

Lentivirus que codifican en su genoma los genes humanos de interés. Estos lentivirus se utilizarán para transducir células humanas y expresar en las células los genes humanos codificados por los lentivirus. Estos lentivirus son deficientes en replicación, por lo que no podrán crecer fuera de las células en las que se han transfectado los plásmidos para generar los lentivirus. La diferencia entre los lentivirus parentales y los lentivirus recombinantes está en que estos últimos codifican en su genoma los genes humanos de interés.

Además, los lentivirus finales tienen las mismas modificaciones que los lentivirus receptores, que son:

- En la unidad empaquetadora se han eliminado cinco genes (env, vif, vpr, vpu y nef) que codifican proteínas virales que han sido identificadas o se sospecha que representan factores esenciales de virulencia. Esto elimina la posibilidad de que un virus de tipo silvestre sea reconstituido mediante recombinación durante la preparación de los vectores lentivirales basados en VIH-1.

-La auto-inactivación consiste en la introducción de una delección en la región U3 de la repetición terminal larga (long terminal repeat, LTR) en el extremo 3' de la unidad de DNA utilizada para producir el vector RNA, el plásmido lentiviral genómico. Esta delección elimina la actividad promotora de la LTR, de manera que previene la síntesis de un vector RNA en la célula diana. Así se minimiza la probabilidad de que se origine un lentivirus replicativo tanto en las células productoras de los vectores como en las células diana.

-Al eliminarse el gen de la envuelta viral, estos vectores lentivirales son pseudotipados con la glicoproteína G de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV), aumentando la estabilidad y el tropismo de los vectores lentivirales generados.

La actividad de generación de lentivirus recombinantes, ya se ha notificado como actividad de nivel 2 (número de registro por sede del MAPA: REGAGE23e00077601039).

2. Características genéticas y fenotípicas modificadas del organismo receptor como resultado de la manipulación genética:

- a. ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la capacidad de supervivencia fuera de las condiciones de cultivo? En caso afirmativo, especifíquese:

No. Estos lentivirus son deficientes en replicación, por lo que no podrán crecer fuera de las células en las que se han transfectado los plásmidos para generar los lentivirus.

- b. ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta al modo o tasa de reproducción? En caso afirmativo, especifíquese:

no

- c. ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad para el ser humano, plantas o animales? En caso afirmativo, especificar:

El organismo receptor, y el OMG son lentivirus que codifican los genes humanos de interés. No se prevé ningún efecto para la salud humana, animal, ni vegetal ni ningún efecto para el medio ambiente. Estos lentivirus defectivos no pueden crecer fuera de las placas de cultivo en las que se transfectan los plásmidos para generarlos.



- d. ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a los posibles efectos sobre el medio ambiente? En caso afirmativo, especifíquese:

No es diferente, no se esperan cambios sobre el medio ambiente. Estos lentivirus son deficientes en replicación, por lo que no podrán crecer fuera de las células en las que se han transfectado los plásmidos para generar los lentivirus.

- e. ¿Es diferente el OMG en cuanto a las características nutricionales? En caso afirmativo, especifíquese:

No.

- f. Marcadores específicos del OMG:

Los lentivirus codificarán en el genoma los genes humanos tales como GBP1, GBP6, TRIM34 o ACE2

3. Información sobre la estabilidad genética previsible del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*):

Los lentivirus codificarán en el genoma los genes humanos tales como GBP1, GBP6, TRIM34 o ACE2. Estos lentivirus son deficientes en replicación, y solo se producirán las partículas virales después de la transfección de los 3 plásmidos especificados anteriormente. Los lentivirus recombinantes serán genéticamente estables durante la replicación del virus en las células transfectadas con los plásmidos que se usan para generarlos. Dado que el lentivirus solo replicará en las células transfectadas con los plásmidos, las secuencias insertadas en los lentivirus se mantendrán estables

4. Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos. Justificar:

Ninguna

5. Descripción de métodos de identificación y aislamiento planificados:

- a. Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

Secuenciación de las regiones en las que se introducen las fases de lectura abiertas que codifican los genes de interés.

- b. Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente:

El OMG no estará en el medio ambiente, solo en las placas de cultivo que se mantendrán en las instalaciones NCB2 o NCB3 (en este último caso solo cuando las células estén infectadas con SARS-CoV-2).

VI. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

1. Descripción de la actividad. (Breve resumen de los ensayos que se prevén realizar, incluidos los que se llevarán a cabo con el OMG).

Para rescatar los lentivirus recombinantes (OMGs) que expresan los distintos genes de interés (i.e. ACE2, GBP1, GBP6 y TRIM34), se transfectarán células HEK293 con el plásmido MLV gag-pol (que codifica las proteínas estructurales del virus, y las proteínas necesarias para la transcripción reversa y la integración del genoma viral en el genoma de las células), el plásmido VSV-g, que codifica la proteína de la envuelta del virus VSV, necesaria para la entrada del virus en las células, y un plásmido CBC, que codifica un gen de resistencia al antibiótico blasticidina, y en el que se clonarán los genes humanos de interés. Una vez generados los stocks de lentivirus, estos se utilizarán para transducir células, y las células que expresen el gen de interés se seleccionarán mediante el crecimiento de las células en presencia de blasticidina. Estos lentivirus son deficientes en replicación, por lo que aunque entrarán en las células se integrarán el genoma viral en el genoma de las células, estos virus no se replicarán ni se generarán virus infectivos. Las líneas celulares que se transducirán con los lentivirus recombinantes serán las líneas celulares humanas de adenocarcinoma de pulmón A549 y Calu-3, y las células epiteliales de riñón, HEK293 (todas libres de agentes biológicos contaminantes). Esta actividad de generación de lentivirus recombinantes y transducción de células, ya se ha notificado como actividad de nivel 2 (número de registro por sede del MAPA: REGAGE23e00077601039)

Una vez que se tengan las células que expresen los genes de interés, estas células y las células control (que no expresan los genes de interés), se infectarán con SARS-CoV-2 (en el laboratorio NCB3 con autorización: A/ES/00/I-08). Para estas infecciones, se manejarán como máximo células en 2 frascos de 75 cm² de superficie cada vez, equivalentes a 3x10⁷ células en 30 ml. Se recogerán los sobrenadantes para titular la cantidad de SARS-CoV-2 infectivos mediante ensayos de formación de placas de lisis en células Vero. También se recogerán extractos proteicos y extractos para RNA para analizar la inducción de respuestas inmunes innatas después de la infección viral mediante RT-qPCR y Western blot.

2. Información sobre el volumen o cantidad de OMG a utilizar:

- a. Volumen o concentración máxima por ensayo en el caso de microorganismos.

- i) Para preparación de lotes

Para generar los lentivirus se transfectarán células HEK293 con los plásmidos, usando como máximo células en 6 placas de 100 mm de diámetro cada vez, equivalentes a 1x10⁷ células en 10 ml por placa (total 6x10⁷ células en 60 ml).

Para transducir las células HEK293, A549 y Calu-3 con los lentivirus, se transducirán como máximo células en 6 placas de 100 mm de diámetro cada vez, equivalentes a 1x10⁷ células en 10 ml por placa (total 6x10⁷ células en 60 ml)

Para infectar con SARS-CoV-2 las células transducidas con los lentivirus, se manejarán como máximo células en dos frascos de 75 cm² de superficie, equivalentes a 1.5x10⁷ células en 15 ml por frasco (total 3x10⁷ células en 30 ml).

- ii) Para Inoculaciones. Método de inoculación *in vitro/ in vivo*:

Una vez que se tengan los lentivirus recombinantes, estos se usarán para transducir células A549, HEK293 y Calu-3, para sobreexpresar así los genes de interés. Estas



células en las que se sobreexpresen los genes de interés se infectarán con SARS-CoV-2. Se manejarán como máximo células en dos frascos de 75 cm² de superficie, equivalentes a 1.5×10^7 células en 15 ml por frasco (total 3×10^7 células en 30 ml).

b. Número aproximado de plantas por ensayo:

0

c. Número aproximado de animales por ensayo:

0

3. Naturaleza de las operaciones:

- a. Enseñanza ☐
- b. Investigación ☒
- c. Desarrollo ☐

4. Periodo previsto para la actividad de utilización confinada:

(Debe concretarse lo más posible la duración de la actividad, por ejemplo, teniendo en consideración la duración de la financiación de los proyectos a los que están asociados las actividades con los OMG).

3 años

VII. EVALUACIÓN DE RIESGO

Se tendrán en cuenta los elementos y el procedimiento conforme al Anexo I del Real Decreto 178/2004 de 30 de enero, por el que se aprueba el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003, de 25 de abril, y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las notas de orientación para la evaluación de riesgo).

1. Identificar cómo pudieran afectar las posibles propiedades nocivas del organismo receptor, donante, inserto y vector al OMG que se va a generar:

(Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto).

a. Organismo receptor.

El organismo receptor son lentivirus deficientes en replicación. Estos lentivirus receptores por lo tanto no son patógenos ni nocivos para ningún organismo ni para el medio ambiente. El organismo receptor además en ningún caso se generará, solo generaremos los OMG finales que difieren del organismo receptor en que expresan los genes humanos de interés. La actividad de generación de lentivirus recombinantes, ya se ha notificado como actividad de nivel 2 (número de registro por sede del MAPA: REGAGE23e00077601039).

b. Organismo donante.

El organismo donante son los humanos, de los cuales derivan las secuencias correspondientes a los genes de interés. Sin embargo, estas secuencias de nucleótidos se sintetizarán químicamente por la empresa IDT DNA, en ningún caso se manejarán muestras humanas

c. Inserto.



Los insertos son las secuencias correspondientes a las fases de lectura abierta son los genes GBP1, GBP6, TRIM34, y ACE2. Estas secuencias de nucleótidos se integrarán en el genoma de los virus recombinantes, pero no se espera que tengan ningún efecto sobre el OMG final, dado que además el OMG es defectivo en replicación. Estas secuencias se sintetizarán químicamente por la empresa IDT DNA, en ningún caso se manejarán muestras humanas.

d. Vector.

El vector usado para generar los lentivirus son plásmidos. Estos plásmidos NO replican fuera de las células eucariotas en las que se transfectan.

2. Identificar las posibles propiedades nocivas del OMG⁵

a. Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.

Los lentivirus recombinantes son deficientes en replicación, por lo que no serán nocivos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal, ni para el medio ambiente. Estos lentivirus no pueden crecer fuera de las placas de cultivo en las que se transfectan los plásmidos para generarlos.

b. Efectos para el medio ambiente.

No se prevé ningún efecto nocivo para el medio ambiente. Estos lentivirus no pueden crecer fuera de las placas de cultivo en las que se transfectan los plásmidos para generarlos

3. Descripción de las fases críticas de los ensayos en cuanto a bioseguridad):

Aunque los lentivirus que se van a generar se clasifican como ACT 2 (notificación ya presentada), dado que van a utilizarse para transducir células y que después algunas de estas células se infectarán por el coronavirus SARS-CoV-2 se clasificarán como ACT 3.

Las células transducidas con los lentivirus se infectarán con SARS-CoV-2, con volúmenes no superiores a 30 ml por ensayo (equivalente a 2 frascos de 75 cm² de superficie). Los frascos infectados con SARS-CoV-2 se cerrarán completamente para una mayor bioseguridad y las células se crecerán en medio de cultivo suplementado con Hepes. Además, en el caso de que se usen placas multipocillo para las infecciones con SARS-CoV-2, dichas placas multipocillo se sellarán con parafilm. Tanto los frascos como las placas se introducirán en cajas de metacrilato dentro de la cabina de flujo laminar antes de introducirlas en el incubador. Todas las manipulaciones que impliquen el uso de virus infectivos, se realizarán en las cabinas de bioseguridad en laboratorios BSL3. Además, no se sacará del laboratorio BSL3 ningún material infeccioso. En el caso de sacar del laboratorio algún material infeccioso, se inactivará previamente y se confirmará antes de su salida que el material no contiene virus infectivo. Además, todo el material no infeccioso se rociará con el germicida Virkon sacar a través de un SAS con peróxido de hidrógeno.

4. Descripción de las medidas de confinamiento y protección que vayan a aplicarse en las diferentes fases:

La actividad de generación de lentivirus se va a llevar a cabo en los laboratorios de contención de nivel 2, por lo que el organismo modificado estará confinado a este espacio y no saldrá en ningún momento del mismo.

El OMG son lentivirus recombinantes que se aislarán después de la transfección en células HEK293 de los plásmidos correspondientes. Los lentivirus recombinantes son defectivos y no pueden

⁵. Si se considera que no tienen efectos adversos para la salud y el medio ambiente, también hay que justificarlo.



sobrevivir fuera de las condiciones en las que se cultivan. La actividad de generación de lentivirus recombinantes, ya se ha notificado como actividad de nivel 2 (número de registro por sede del MAPA: REGAGE23e00077601039).

Las células transducidas con los lentivirus se infectarán con SARS-CoV-2 en el laboratorio NCB3, en los que el grado 3 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente. Se utilizarán equipos de protección individual compuestos por un pijama que solo se usa una vez, un mono tyvek encima del pijama, y un capuz por el que se hace circular una corriente de aire estéril sobrepresionado. A la salida del laboratorio, el investigador se duchará y se pondrá su ropa de calle.

Los frascos infectados con SARS-CoV-2 se cerrarán completamente para una mayor contención del virus y las células se crecerán en medio de cultivo suplementado con Hepes. Además, en el caso de que se usen placas multipocillo para las infecciones con SARS-CoV-2, dichas placas multipocillo se sellarán con parafilm. Tanto los frascos como las placas se introducirán en cajas de metacrilato dentro de la cabina de flujo laminar antes de introducirlas en el incubador. Todas las manipulaciones que impliquen el uso de virus infectivos, se realizarán en las cabinas de bioseguridad en el laboratorio NCB3. Como es preceptivo, todos los residuos biosanitarios generados se inactivarán en un primer paso en el interior de la cabina de flujo laminar. Posteriormente volverán a ser inactivados mediante autoclavado (residuos sólidos) o en la planta de inactivación de efluentes líquidos del laboratorio (residuos líquidos).

El riesgo de inoculación accidental de los lentivirus recombinantes es prácticamente nulo debido a la ausencia de material punzante y cortante en los laboratorios de nivel 3 de contención biológica y no hay riesgo de contagio por contacto.

VIII. DESCRIPCIÓN DE LAS MEDIDAS DE PROTECCIÓN Y CONTROL ADOPTADAS DURANTE LA UTILIZACIÓN CONFINADA⁶

1. Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

Las normas a seguir serán las expuestas en el reglamento de funcionamiento de los laboratorios de cultivos “in vitro” de niveles 2 y 3 de contención biológica

2. Formación del personal adscrito:

Asistencia a cursos y seminarios:

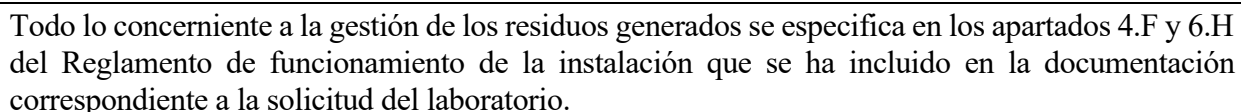
Seminarios generales sobre normas de seguridad frente a agentes biológicos, químicos y radiactivos impartido por el Servicio de Bioseguridad del CNB.

Seminarios específicos sobre el Reglamento de Funcionamiento y Plan de Emergencias del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica del CNB.

Además, todos los trabajadores son supervisados y formados por la investigadora principal (Marta López de Diego) durante al menos dos semanas

3. Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

⁶ En el caso de que la actividad se realice en una instalación ya autorizada, se deberán describir las medidas de protección adicionales a las descritas en el formulario B que se presentó en la solicitud para la autorización de la instalación, teniendo en cuenta el riesgo específico de la actividad.



- La instalación dispone de un completo reglamento de funcionamiento donde se especifican las normas de higiene, protección, contención y gestión de residuos, tanto para el personal usuario como para el propio servicio de seguridad biológica. Con ello se pretende realizar una gestión integral en Bioseguridad. Todos los protocolos de manipulación, transporte y conservación de agentes biológicos y OMG, limpieza y sanitización de zona, esterilización e inactivación biológica se encuentran protocolizados por escrito y se dispone de programas de actuación para aquellos procedimientos en que sea conveniente.
- La instalación dispone de un plan de emergencias y evacuación que ha intentado cubrir todos los procedimientos de actuación ante supuestos de incidente, accidente y emergencia.
- Tanto el laboratorio, como las instalaciones que aseguran las necesarias medidas de contención secundaria, disponen de variados medios de alarma “in situ” y en la consola de control central del edificio ante la ruptura accidental de las barreras de contención secundaria.
- El índice de ocupación de las dependencias cercanas al laboratorio es muy bajo al tratarse de servicios de apoyo a la investigación o de laboratorios de técnicas especiales de uso común. No hay ningún laboratorio con un grupo de investigación anexo a la instalación.
- El Centro Nacional de Biotecnología (CNB) se encuentra enclavado en una zona relativamente nueva del Campus de la Universidad Autónoma de Madrid. Esta zona se caracteriza por la amplitud existente entre los edificios que la constituyen, fundamentalmente otros centros de investigación.
- No existen zonas residenciales cercanas al CNB.
- No existen en las cercanías cultivos, explotaciones ganaderas, cotos, reservas de caza, o zonas naturales protegidas o con especial interés ecológico.

La actividad de producción de lentivirus, y de transducción de células con los lentivirus se realizará en el laboratorio de actividad confinada tipo 2. Actividad en la cual el grado 2 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente.

La infección de las células con SARS-CoV-2 se producirá en el laboratorio de actividad confinada tipo 3. Actividad en la cual el grado 3 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente.

- Método de inactivación, forma final, destino de cada uno de los tipos de residuos generados:

Todos los residuos biológicos que se generen serán inmediatamente inactivados dentro de los recintos de contención (cabinas de bioseguridad) mediante la utilización de germicidas de amplio espectro usados en rotación. Posteriormente, los residuos líquidos ya inactivados



se enviarán a la planta de tratamiento de efluentes líquidos del laboratorio y los sólidos se autoclavarán. Los procedimientos de autoclavado y esterilización por calor en la planta “Biowaste” se han validado previamente y se validarán periódicamente mediante la utilización de kits de esporas del microorganismo testigo *Bacillus stearothermophilus*. Estas validaciones se han realizado a nivel interno (servicio de bioseguridad del CNB) y a nivel externo (empresas especializadas en validaciones de estos sistemas). Para mayor información remitirse a la solicitud de autorización de la instalación.

b. Gestión por una empresa externa: SÍ ☒ NO ☐

– Nombre de la empresa externa encargada de la gestión de los residuos:

CONSEUR

X. PREVENCIÓN DE ACCIDENTES DE LA ACTIVIDAD NOTIFICADA

1. Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Vienen indicadas en el Plan de emergencias y evacuación del CNB incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

2. Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Vienen indicados en el Plan de emergencias y evacuación del CNB incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

3. Descripción de la información y formación suministrada a los trabajadores:

Cursos y seminarios:

Seminarios generales sobre normas de seguridad frente a agentes biológicos, químicos y radiactivos impartido por el Servicio de Bioseguridad del CNB.

Seminarios específicos sobre el Reglamento de Funcionamiento y Plan de Emergencias del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica del CNB.

Además, todos los trabajadores son supervisados y formados por la investigadora principal (Marta López de Diego) durante al menos dos semanas

4. Planes de emergencia y contingencia:

El Plan de emergencias y evacuación del laboratorio se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.