



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

Nº de Notificación:

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

Fax: 91 585 45 06

Correo electrónico: direccion.cnb@csic.es

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Luis Enjuanes Sánchez

NIF: 19418297-H

Cargo: Profesor Investigación CSIC

Tel: 91 585 45 55

Fax: 91 585 45 06

Correo electrónico: ljenjuanes@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
Fax: 91 585 45 06
Correo electrónico: fusera@cnb.csic.es

e) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto:
Fernando Usera Mena

- 2) 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: Proyectos I+D+i

-Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo: PID2019-107001RB-100. IPs: Isabel Sola y Luis Enjuanes

-Organismo financiador: Ministerio de Ciencia e Innovación, Agencia Estatal de Investigación

- 3) Instalación donde se va a desarrollar la actividad de utilización confinada (*cumplimente si previamente ha sido comunicada/autorizada para este tipo de actividades; en caso contrario, cumplimente el Formulario Parte B*).

a) Fecha de comunicación / autorización de la instalación: 7/03/2001

b) Número de referencia del expediente: A/ES(00/I-8)

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.



II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1) Finalidad de la actividad:

Construcción de virus recombinantes basados en el genoma de un nuevo coronavirus (SARS-2 o SARS-CoV-2019) aislado de al menos 20 pacientes con enfermedad respiratoria grave en la ciudad china de Wuhan.

Las diferentes formas de virus SARS-2 o SARS-CoV-2019 recombinante, con el genoma completo o con deleciones en diferentes genes, se rescatarán a partir de un cromosoma artificial de bacterias (BAC) que crece en *E. coli*, que codifica el cDNA del virus. El genoma completo del virus solo presenta dos mutaciones silenciosas que se han introducido como marcadores genéticos. Además, se construirán mutantes de este coronavirus en los que se delecionarán o modificarán los genes específicos de género 3, 7a, 7b, 8 y 9b, y los genes estructurales E y N, solos o en distintas combinaciones. Estos virus rSARS-CoV-2019 se rescatarán en células de mamífero a partir de cromosomas artificiales de bacterias que codifican los distintos virus. Los virus rSARS-CoV-2019 con mutaciones en sus proteínas se comportarán en general como virus atenuados, con menor o igual tasa de replicación y menor patogenicidad que el organismo parental. Así mismo, se pretender generar virus eficientes en replicación y defectivos en propagación, lo que confiere un grado adicional de atenuación a los OMGs generados. **El objetivo final es generar virus atenuados que puedan servir como vacunas seguras.**

2) 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 1

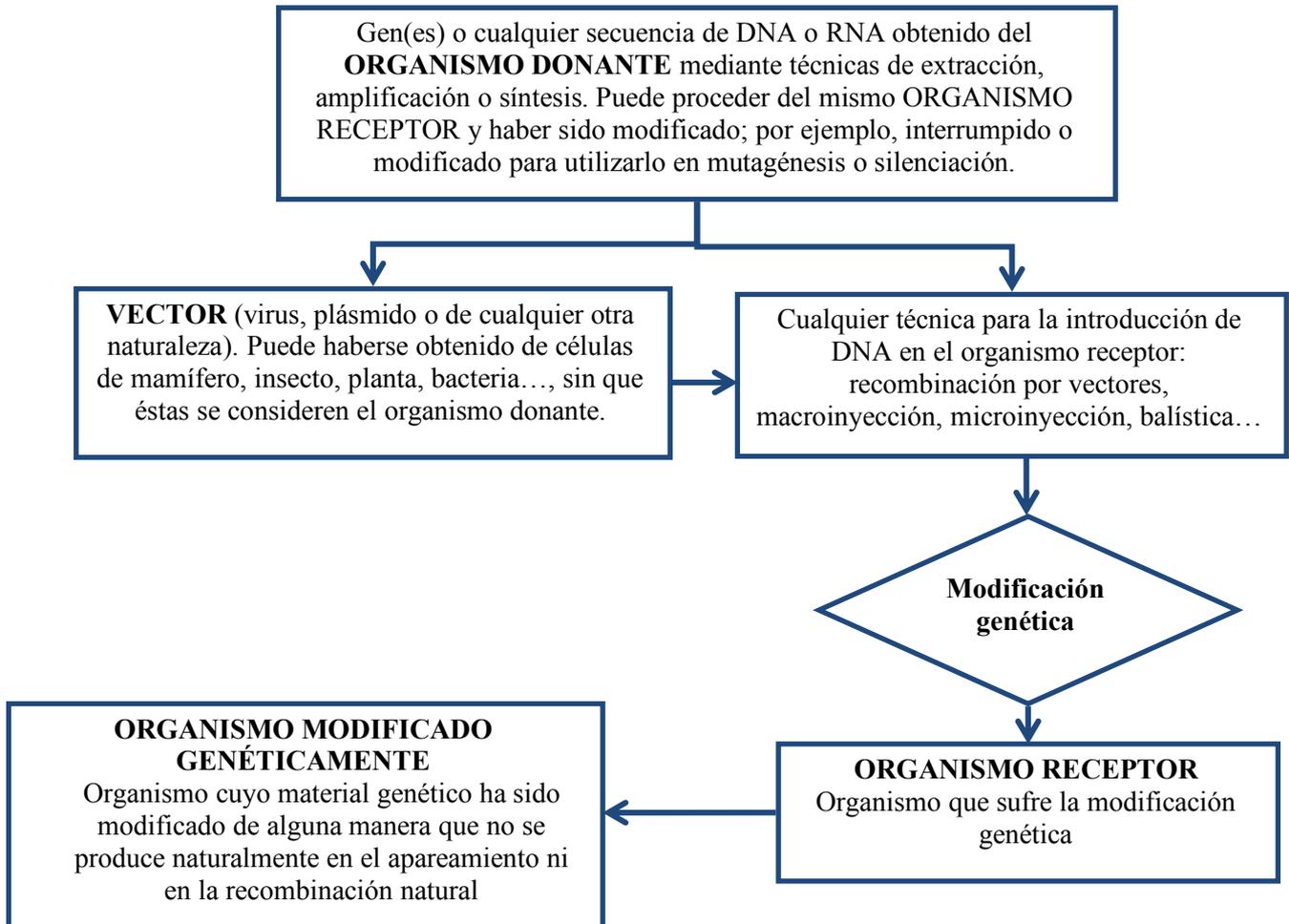
Tipo 2

Tipo 3

Tipo 4



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





III. INFORMACIÓN SOBRE EL ORGANISMO RECEPTOR DEL CUAL SE DERIVA EL OMG

1) Nombre científico: Virus recombinante SARS-CoV-2019 (rSARS-CoV-2019)

Taxonomía: perteneciente a la Familia *Coronaviridae*, género *Betacoronavirus*

Nombre común: recombinante del coronavirus de Wuhan causante de enfermedad respiratoria grave (SARS-CoV-2019).

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento:

El virus rSARS-CoV-2019 se obtendrá a partir de un clon (cDNA) infeccioso. Éste cDNA codificará el genoma del virus SARS-CoV-2019 (referencia GenBank: MN908947.3), con dos mutaciones silenciosas en los nt 20085 y 26840 como marcadores genéticos. Para su obtención se clonarán secuencialmente 6 fragmentos de DNA obtenidos por síntesis química en la empresa estadounidense GenScript. El cDNA se mantendrá en un cromosoma artificial de bacterias (BAC), que se utilizará como vector y se amplificará en una cepa de bacterias *Escherichia coli* no patógena. La última etapa del clonaje y el rescate del virus se realizará en el laboratorio NCB3 del CNB-CSIC. Para aislar el virus rSARS-CoV-2019 se transfectarán células Vero E6 con el cDNA generado. Este procedimiento se realizará en frascos de cultivos cerrados. A las 48 -72 horas post-transfección (hpt) se recogerá el medio de cultivo que contendrá el rSARS-CoV-2019.

Se adjuntan, en formato FASTA, las secuencias del BAC (pBeloBac11.pdf) y del inserto que codifica el rSARS-CoV-2019 (SARSCoV_2019.pdf). También se adjuntan las secuencias de los 6 fragmentos sintetizados químicamente (F1.pdf, F2.pdf, F3.pdf, F4.pdf, F5.pdf y F6.pdf).

b) Técnicas de identificación:

Para la identificación del rSARS-CoV-2019 se amplificará su genoma mediante RT-PCR y se procederá a secuenciar completamente el genoma viral. De este modo, se comprobará que su secuencia coincide con la codificada por el cDNA infeccioso, incluyendo los dos marcadores genéticos que distinguen este virus recombinante de cualquier SARS-CoV-2019 aislado de pacientes.

c) Marcadores genéticos:

Se han introducidos dos marcadores genéticos que consisten en dos mutaciones silenciosas en los nt G20085 por A y C26840 por G.

d) Marcadores fenotípicos:

No aplica



e) Estabilidad genética:

Con la información disponible en este momento, se prevé que la estabilidad genética del virus recombinante rSARS-CoV-2019 sea elevada. No se han descrito variaciones de secuencia debido al crecimiento de este tipo de virus en cultivos celulares. Además, se darán pocos pasos una vez rescatado el rSARS-CoV-2019 a partir del cDNA infeccioso.

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

Dos mutaciones silenciosas en los nt 20085 y 26840 como marcadores genéticos. No hay ninguna modificación genética no deseada que se encuentre con anterioridad.

4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

SI NO

El rSARS-CoV-2019 será idéntico al virus silvestre SARS-CoV-2019 aislado de pacientes, excepto en los dos marcadores genéticos. Por tanto, se espera que sea patógeno para humanos, dado que el virus silvestre (SARS-CoV-2019) produce enfermedad respiratoria severa en humanos.

5) En caso afirmativo, especificar para qué clase de los organismos (*seres humanos, animales, plantas*) se considera patógeno este organismo, vivo o muerto, y/o sus productos extracelulares:

El virus rSARS-CoV-2019 vivo será patógeno para humanos.

Con la información de la que se dispone en este momento, se considera que el origen más probable del virus silvestre (SARS-CoV-2019) es el murciélago, directamente o a través de un animal hospedador intermedio aún por identificar. Por lo tanto, no se puede descartar que el virus rSARS-CoV-2019 infecte animales. En cualquier caso, de acuerdo con lo que se sabe de coronavirus parecidos como el SARS-CoV o el MERS-CoV, este tipo de virus patógenos para humanos no causan enfermedad en los animales hospedadores intermedios.

6) Si el organismo receptor es patógeno para los seres humanos, especificar el grupo de riesgo asignado de acuerdo con la legislación comunitaria existente, (*en particular la Directiva 2000/54/CE*) o según otros sistemas de clasificación, nacionales o internacionales (*OMS, NIH, etc.*):

El organismo receptor rSARS-CoV-2019, patógeno para humanos, se clasifica como nivel 3.

a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

Se espera que la patogenicidad del rSARS-CoV-2019 sea idéntica a la del virus SARS-CoV-2019 silvestre, causando infección respiratoria que puede llegar a ser severa en el



20% de los individuos infectados. Los síntomas clínicos de la infección serían fiebre, tos y dificultad respiratoria con signos de neumonía en los casos más severos.

- b) En el caso de cepas no virulentas de especies patógenas: ¿es posible excluir la reversión a la patogenicidad?

No aplica

SI NO

Porqué:

- 7) La cepa/línea celular receptora: ¿está libre de agentes biológicos contaminantes?

Las células Vero E6, en las que se propaga el rSARS-CoV-2019, están libres de agentes biológicos contaminantes.

- 8) Experiencia adquirida en relación con la seguridad en la utilización del organismo receptor:

El trabajo con virus similares (SARS-CoV) que resultan letales para humanos, se realiza en todo el mundo (EEUU, Europa, China) en laboratorios de contención biológica NCB3, bajo condiciones y protocolos inferiores a los que utilizamos en el NCB3 del CNB, tal como certificó el equipo del NIH-CDC que inspeccionó las instalaciones y protocolos implementados en el CNB-CSIC. Nuestro grupo ha estado trabajando mas de 17 años con SARS-CoV y, desde el año 2013, se trabaja con otro coronavirus humano que causa enfermedad respiratoria grave (MERS-CoV), en las instalaciones NCB3 del CNB, sin ningún problema. En este momento seis investigadores del laboratorio 114 trabajan regularmente con estos virus. Todos los investigadores que trabajen regularmente en el P3 con el SARS-CoV-2019 guardarán cuarentena antes de entrar a cualquier animalario de experimentación animal, al igual que hacen cuando trabajan con SARS-CoV o con MERS-CoV. Todos los protocolos e instalaciones utilizados por nuestro grupo son superiores a las que se utilizan en los países indicados, incluyendo los laboratorios del NIH, tanto pertenecientes al NIAID, como los del nuevo edificio de Biodefensa en Bethesda (EEUU) hemos visitado. Los protocolos e instalaciones utilizadas se han contrastado con visitas a laboratorios de Alemania, Italia, Holanda y EEUU. Recientemente, después de una inspección exhaustiva, tanto las instalaciones como los protocolos de actuación han sido aprobados por el NIH-CDC. Consideramos que nuestro centro y nuestros equipos están preparados para realizar este trabajo que hemos ejecutado durante 17 años en el CNB.

- 9) Información sobre la capacidad de supervivencia y de reproducción en el medio ambiente:

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

Para sobrevivir el virus rSARS-CoV-2019 necesita de la maquinaria de la célula infectada. Por tanto, su capacidad de supervivencia fuera de las condiciones de cultivos será muy



limitada. Basándonos en la experiencia con coronavirus similares, el virus rSARS-CoV-2019 se prevé que podría sobrevivir 24 – 48 h fuera de la célula.

En caso afirmativo:

b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

- i) esporas
- ii) endosporas
- iii) quistes
- iv) esclerocios
- v) esporas asexuales (hongos)
- vi) esporas sexuales (hongos)
- vii) otros, especifíquese:

c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

La exposición a temperaturas iguales o mayores a 37°C, a luz ultravioleta, o a agentes químicos reduce drásticamente la capacidad de supervivencia del rSARS-CoV-2019 fuera de las condiciones de cultivo.

d) Posibles nichos ecológicos:

El virus rSARS-CoV-2019 no se encuentra en la naturaleza, dado que se obtendrá en el laboratorio a partir del cDNA infeccioso.

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No aplica

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

El virus rSARS-CoV-2019 no se encuentra en el medio ambiente.

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

El virus rSARS-CoV-2019 no interactúa con otros organismos ya que está confinado en el laboratorio NCB3 y es poco probable que salga de él ya que es incapaz de propagarse fuera de un cultivo celular.



11) Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor:

El virus rSARS-CoV-2019 con el que se va a trabajar no se encuentra en la naturaleza ya que ha sido generado en el laboratorio.

12) Hábitat natural del organismo:

El virus rSARS-CoV-2019 con el que se va a trabajar no se encuentra en la naturaleza ya que ha sido generado en el laboratorio.

El hábitat natural del virus silvestre SARS-CoV-2019 son los seres humanos, dado que este virus ha sido aislado de al menos 20 pacientes con enfermedad respiratoria severa.

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: No aplica

Taxonomía:

Nombre común:

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante:

3) Método de obtención:

a) Extracción

b) PCR

c) Síntesis *in Vitro*

4) Función del gen/genes en el organismo donante:

5) ¿Es patógeno o nocivo de cualquier otra forma (*incluidos sus productos extracelulares*) el organismo donante, vivo o muerto?

SI NO

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

i) seres humanos

ii) animales

iii) plantas

b) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

c) Las secuencias insertadas: ¿están implicadas de alguna forma en las propiedades patógenas o nocivas del organismo?

6) ¿Intercambian los organismos donante y receptor material genético de forma natural?



V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1) Tipo de modificación genética:

- a) Inserción de material genético
- b) Deleción de material genético
- c) Sustitución de bases
- d) Fusión celular
- e) Otros, especifíquese:

2) Finalidad de la modificación genética:

Eliminación de genes de rSARS-CoV-2019 para estudiar el papel de estos genes en la interacción con el hospedador y virulencia de dicho virus. En el caso de las proteínas estructurales E y N, también se podrán realizar mutaciones que eliminen motivos que se conoce que están implicados en la virulencia, siguiendo estrategias similares a las que se han utilizado previamente en nuestro laboratorio (Nieto-Torres J.L. et al, 2014, PLoS Pathog. 10:e1004077; Jimenez-Guardeño J.M. et al, 2014, PLoS Pathog. 10:e1004320). Se obtendrán distintos clones de BACs que contengan uno o varios genes virales modificados, a partir de los cuales se rescatarán virus defectivos. **El objetivo final es generar virus atenuados que puedan servir como vacunas seguras.**

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

Para generar el clon infectivo que codifica el virus rSARS-CoV-2019, se partirá de fragmentos de cDNA sintetizados químicamente. Estos fragmentos, se insertarán en el BAC disponible en el laboratorio (pBeloBac11.pdf), mediante técnicas de clonaje convencionales que consisten en el uso de enzimas de restricción adecuadas y posterior ligación de los fragmentos de DNA.

Partiendo de este BAC que codifica el virus rSARS-CoV-2019 completo, se delecionarán o modificarán los genes 3, 6, 7a, 7b, 8, E y N mediante técnicas de clonaje convencionales.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector:

Cromosoma artificial de bacterias (BAC), en concreto el pBeloBac11.

b) Si se trata de un virus: No aplica



Es defectivo en replicación Sí NO

c) Aportar mapa de restricción del vector (*funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación, origen, función y secuencia de otros elementos presentes en el vector*):

Ver documentos adjuntos pBeloBAC_map.pdf y pBeloBac.pdf, que contienen toda la información solicitada.

d) Gama de hospedadores del vector:

Bacterias *Escherichia coli*.

e) Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización:

No presenta

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

No aplica

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

No aplica porque el BAC siempre se utilizará en bacterias.

5) Información del inserto:

Las modificaciones en el organismo receptor se realizarán generando cDNAs infectivos, mantenidos en cromosomas artificiales de bacterias (BACs), que contengan deleciones o modificaciones en los genes 3, 6, 7a, 7b, 8, E y N. Los DNAs mutantes se han sintetizado químicamente en la empresa GenScript (USA). Posteriormente se sustituirá el correspondiente fragmento del cDNA infectivo (F6.pdf) por los correspondientes con los genes delecionados o mutados.

a) Dimensiones del inserto, mapa de restricción y secuencia:

Se adjuntan las secuencias de los pBAC-F6 sin modificar (pBAC_F6.pdf) y con las correspondientes mutaciones: deleciones individuales de los genes 3 (pBAC_F6_Del3.pdf), 6 (pBAC_F6_Del6.pdf), 7 (pBAC_F6_Del7.pdf), 8 (pBAC_F6_Del8.pdf) y E (pBAC_F6_DelE.pdf); deleciones conjuntas de los genes 3 y E (pBAC_F6_Del3E.pdf) o de los genes 6,7 y 8 (pBAC_F6_Del678.pdf); y mutaciones que eliminan la funcionalidad del dominio PBM de virulencia de la proteína E (pBAC_F6_EdelPBM.pdf y pBAC_F6_EmutPBM.pdf).

b) Origen y función específica de cada parte del inserto

Los insertos mutantes se han sintetizado químicamente en la empresa GenScript.



c) Descripción del método utilizado para la transformación:

Una vez obtenidos los cDNAs infectivos con las correspondientes mutaciones, se transfectarán células Vero E6 con cada uno de los cDNA generados. Este procedimiento se realizará en frascos de cultivos cerrados. A las 48 -72 horas post-transfección (hpt) se recogerán los correspondientes medios de cultivo que contendrán los virus mutantes defectivos en cada uno de los genes.

d) Información sobre los genes estructurales presentes en el inserto:

El origen y la función específica del inserto presente en el vector (BAC) y que codifica rSARS-CoV-2019 es:

ORF	Proteína	Inicio (nt)	Final (nt)
1ab	pp1ab	266	21555
2	S	21563	25384
3	3	25393	26220
4	E	26245	26472
5	M	26523	27191
6	6	27202	27387
7a	7a	27394	27759
7b	7b	27756	27887
8	8	27894	28259
9	N	28274	29533
9b	9b	28305	28577

Las ORFs1a y 1b codifican la replicasa viral, que se autoproteoliza para dar lugar hasta a 16 proteínas no estructurales (nsps) que codifican las funciones esenciales para la replicación viral (polimerasa, helicasa, primasa, etc), el metabolismo del RNA (exonucleasa, endonucleasa), la formación del cap de los mRNAs virales (metiltransferasas) y otras funciones necesarias para la formación de estructuras membranosas donde ocurre la replicación viral. Además, muchas de estas nsps están implicadas en la modulación de la respuesta inmune innata.

Las ORFs 2, 4, 5 y 9 codifican las proteínas estructurales de la espícula (S), envuelta (E), membrana (M) y nucleocápsida (N), respectivamente. La proteína S está implicada en la interacción con el receptor celular y determina el tropismo viral. Las proteínas M y E tienen un papel fundamental en el ensamblaje y salida del virus. Además, la proteína E es un factor de virulencia. La proteína N interacciona con el genoma de RNA viral para formar la nucleocápsida, además, esta proteína posee múltiples funciones en la interacción virus-hospedador.



Las ORFs 3, 6, 7a, 7b, 8 y 9b codifican las proteínas accesorias específicas de género. Estas proteínas de coronavirus están implicadas en contrarrestar las defensas del hospedador.

Se delecionarán o modificarán los genes específicos de género 3, 7a, 7b, 8 y 9b, y los genes estructurales E y N, solos o en distintas combinaciones, con el fin de generar virus atenuados y estudiar el papel de estos genes en la patogénesis del virus.

e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto:

Los insertos contienen las secuencias reguladoras de la transcripción (TRS) tal y como se encuentran presentes en el genoma viral. Cada una de estas secuencias regula la expresión de los genes virales, tal y como sucede en el rSARS-CoV-2019.

No existe ningún otro elemento regulador en los OMGs generados.

f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

Sí, la secuencia se adjunta (SARSCoV_2019.pdf) así como la secuencia del virus completo (Wu_Hu_1.pdf)

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

No

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

No



VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre?: No aplica

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?: No aplica

En caso afirmativo:

i) número de copias: No aplica

ii) localización cromosómica: No aplica

iii) secuencias colindantes: No aplica

iv) ¿La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes?: No aplica

c) Si se trata de un virus:

i) La inserción es específica

ii) La inserción se produce al azar

iii) Existe la posibilidad de formación de partículas víricas

Los virus modificados genéticamente corresponderán a virus en los que se habrá suprimido o modificado la expresión de los genes 3, 6, 7a, 7b, 8, E y N. Estos virus podrían infectar células Vero, susceptibles a la infección viral, pudiéndose rescatar partículas víricas.

Éstos se comportarán en general como virus atenuados, con menor o igual tasa de replicación y menor patogenicidad que el organismo parental. Así mismo, se pretender generar virus eficientes en replicación y defectivos en propagación, lo que confiere un grado adicional de atenuación a los OMGs generados.

d) Análisis moleculares realizados relativos a la expresión del producto deseado (*PCR, Northern, secuenciación, otros*):

iv) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación)

v) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA)

vi) Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas)



Aportar toda la documentación al respecto:

Almazan F. et al, 2006, J. Virol. 80:10900-10906; Almazan F. et al, 2013, mBio 4:e00650-13.

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:

En cuanto a los virus recombinantes generados no se esperan cambios en la capacidad de supervivencia fuera de las condiciones en cultivo.

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

No. Se espera que los recombinantes sin los genes E y 3 sean defectivos en propagación.

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

Los virus defectivos o mutantes en los genes 3, 6, 7a, 7b, 8, E y N previsiblemente estarán atenuados en humanos.

De todas formas, todos estos virus estarán confinados dentro del laboratorio de nivel 3 de contención biológica (NCB3).

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

No.

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

No.

- f) Marcadores específicos del OMG:

El OMG presentará dos cambios de nt en las posiciones 20085 and 26840 con respecto a un virus silvestre SARS-CoV-2019. Los virus defectivos llevarán, además, deleciones o modificaciones en los genes 3, 6, 7a, 7b, 8, E y N.



3) Estabilidad genética del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*):

No se conoce, pero se prevé que la estabilidad genética del OMG sea alta, aunque podría sufrir algunas modificaciones puntuales en su secuencia en el paso de replicación.

4) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos:

Los virus resultantes no se prevé que se integren en el cromosoma de las células utilizadas para crecerlos, por lo que no se transferirá material genético a las mismas. Los virus resultantes estarán confinados en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica (NCB3) y no se utilizarán en ningún caso para infectar organismos, por lo que la posibilidad de transferencia a otros organismos es prácticamente nula.

5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:

a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

- Microscopía de fluorescencia mediante anticuerpos específicos de diferentes proteínas del virus SARS-CoV, cros-reactivos con el SARS-CoV-2019.
- RT-PCR específicas empleando oligonucleótidos complementarios de la secuencia de los genes ORF1b M del virus SARS-CoV-2019.

b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente:

El OMG no va a estar en el medio ambiente

VII. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

1) Naturaleza de las operaciones:

- a) Enseñanza
- b) Investigación
- c) Desarrollo

2) Volumen o cantidad de OMG a utilizar:

a) Volumen máximo en el caso de microorganismos: 250 - 375 ml por ensayo

Concentración máxima: Los títulos que se generarán con estos virus oscilan entre 1×10^5 y 5×10^8 ufp/ml.



- b) Número de plantas:
- c) Número de animales:

3) 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 asociadas las actividades con los OMG).

Se prevé un periodo de cinco años desde la recepción de la autorización de la actividad confinada.

4) Finalidad de la actividad de utilización confinada, incluidos los resultados esperados:

Construcción segura de un vector viral defectivo basado en el virus SARS-CoV-2019 que infecte células humanas del tracto respiratorio con objeto de utilizarlo en vacunas. Al dirigirse al tracto respiratorio se espera que se induzca una fuerte respuesta secretora de anticuerpos, que proteja frente a un virus SARS-CoV-2019 silvestre.

5) Origen del OMG: indicar si el OMG procede de otro centro o empresa (*señalar nombre y ubicación*), y si es así, si dicho centro o empresa está registrado conforme a la normativa española y/o europea vigente sobre OMG. En el caso de centros españoles, indicar el número de notificación si se conoce:

No aplica

6) Información sobre el transporte de los OMG en el caso de que provengan de, o se destinen a otros centros o instalaciones, así como descripción de las medidas adoptadas durante el mismo en virtud de la legislación aplicable² (*tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado*):

No aplica

² 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.
- **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/>



7) Descripción de los métodos de manejo de los OMG (*incluyendo descripción de las fases de cultivo y concentración máxima de OMG en el cultivo*):

En todos los casos, los virus recombinantes se manejarán en frascos cerrados en todo momento, ya que se utilizará tampón HEPES para mantener estable la concentración de CO₂, en cultivos que implican volúmenes de medio inferiores a 20 ml. Se utilizarán 5 frascos de 75 ml ó 10 frascos de 25 ml por ensayo. Los títulos que se generarán con estos virus oscilan entre 1×10^5 y 5×10^8 ufp/ml. Los virus se pasarán a intervalos de uno a tres días, dependiendo del efecto citopático producido.

Todas las manipulaciones se realizarán en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica (NCB3).

Se utilizarán equipos de protección individual compuestos por un capuz ventilado por el que se hace circular una corriente de aire estéril sobrepresionado. Como es preceptivo, todos los residuos biosanitarios generados se inactivarán en un primer paso en el interior de la cabina de bioseguridad clase IIA. Posteriormente volverán a ser inactivados mediante autoclave (residuos sólidos) o en la planta de inactivación de efluentes líquidos del laboratorio (residuos líquidos).

Varios miembros del equipo han trabajado con este tipo de virus a lo largo de más de 17 años en el laboratorio NCB3 del CNB y tienen experiencia suficiente y han recibido cursos de formación en bioseguridad en el CNB. En ningún momento se centrifugará el virus no inactivado ni se someterá a manipulaciones que puedan suponer un incremento del riesgo biológico. Se seguirán todos los procesos preceptivos, tales como no sacar los brazos de la cabina de trabajo sin desinfectarlos, desinfectar cualquier objeto que esté en el interior de la cabina y esperar diez minutos antes de sacarlo. Todos los investigadores que trabajen regularmente en el laboratorio NCB3 con SARS-CoV-2019, guardarán cuarentena antes de entrar a cualquier animalario de experimentación animal.

Por lo indicado, estas manipulaciones producen mucho menos riesgo que las que se realizan en otros centros con menos condiciones de contención biológica y en los que no se propaga el virus.

8) Descripción de las medidas de confinamiento y protección que vayan a aplicarse:

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.



VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

El riesgo de contaminación en dependencias cercanas a la instalación o en el medio ambiente externo al Centro Nacional de Biotecnología es prácticamente inexistente por las siguientes razones:

- El laboratorio está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios, resaltándose el sistema de tratamiento de aire y el sistema de inactivación biológica de efluentes líquidos. Es más, consideramos que el nivel de contención obtenido excede en determinados parámetros el exigido por la legislación para las operaciones confinadas de tipo 3.
- Estos medios e infraestructura ya se han validado previamente por una empresa externa y serán validados por ésta empresa u otras anualmente o tras averías. Igualmente, el servicio de Bioseguridad validará periódicamente a nivel interno todos los métodos y sistemas de inactivación biológica y esterilización mediante la utilización de microorganismos testigo utilizando diferentes métodos.
- 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.



2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

Clima continental-mediterráneo con primaveras y otoños húmedos e inviernos y veranos secos, fuerte gradiente de temperaturas estacional. Viento predominante N.O.

3) Notificación de la instalación: indicar las secciones donde se desarrolla la actividad objeto de la notificación, con indicaciones de la categoría de confinamiento prevista:

Las operaciones indicadas se realizarán en uno de los tres sub-laboratorios del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica con autorización del 7/03/01; número de notificación: A/ES/00/I-8 .

IX. DESCRIPCIÓN DE LAS MEDIDAS DE PROTECCIÓN Y CONTROL ADOPTADAS DURANTE LA UTILIZACIÓN CONFINADA

1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

Las normas a seguir serán las expuestas en el reglamento de funcionamiento del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica incluido en la solicitud de autorización.

2) Formación del personal adscrito:

El personal adscrito ha recibido la formación e información indicada en “Descripción de la información suministrada a los trabajadores”, apartado que se adjuntó a la documentación para la solicitud de autorización del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica.

Todo el personal implicado tiene experiencia en la manipulación de los agentes biológicos que se indican en esta solicitud y su formación académica es licenciatura o doctorado.

3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

Viene descrito en el apartado 6.F del reglamento de funcionamiento de la instalación que se incluyó en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:

Vienen descritos en los apartados 6.B, 6.C, 6.D y 6.G. del Reglamento de funcionamiento de la instalación que se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.



5) Programas de inspección y control del confinamiento:

Vienen descritos en el apartado 6.D. del Reglamento de funcionamiento de la instalación y más específicamente en “Procedimientos y planes de comprobación de la eficacia permanente de las medidas de confinamiento”. Esta información se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio Además el servicio de seguridad biológica velará por el cumplimiento de las normas de control de acceso, manipulación, descontaminación, esterilización, sanitización, etc. según se indica en diferentes apartados del citado Reglamento.

X. GESTION E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS

1) Encargado de la gestión de residuos:

a) gestión interna: SÍ NO

b) gestión por una empresa externa: SÍ NO

Si es el caso, nombre de la empresa externa encargada de la gestión de los residuos:

INTERLUM

2) Inactivación de residuos: método, forma final, destino de cada uno de los tipos de residuos generados:

Todo lo concerniente a la gestión de los residuos generados se especifica en los apartados 4.F y 6.H del Reglamento de funcionamiento de la instalación que se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

XI. PREVENCIÓN DE ACCIDENTES (Cumplimentar para los tipos 2, 3 y 4)

1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

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

2) Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Viene indicado en el Plan de emergencias y evacuación incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

Documentación:

- Manual de Seguridad e Higiene en los laboratorios del CNB.



- Reglamento de Funcionamiento y Plan de Emergencias del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica del CNB.
- Procedimientos Normalizados de Trabajo del Servicio de Bioseguridad del CNB.

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.

4) Planes de emergencia:

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



**EVALUACIÓN DE RIESGO DE ACTIVIDADES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE
ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE**

Nº de Notificación:

I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD

1) 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.

2) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Jose Mario Mellado García

NIF: 13295208N

Cargo: Director del CNB

Tel: 91 585 45 03 / 4852

Fax: 91 585 45 06

Correo electrónico: direccion@cnb.csic.es

3) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Luis Enjuanes Sánchez

NIF:

Cargo: Profesor de Investigación CSIC

Tel: 91 585 45 55

Fax: 91 585 45 06

Correo electrónico: l.enjuanes@cnb.csic.es



4) 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

Fax: 91 585 45 06

Correo electrónico: fusera@cnb.csic.es

5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto

Fernando Usera Mena

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD.

(En el caso de que se notifiquen varias actividades de tipo 1, deberá rellenarse este apartado y adjuntar un cuadro resumen en que se recojan todas las actividades, según el modelo que figura en el anexo).

1) Objetivo de la actividad:

Construcción de virus recombinantes basados en el genoma de un nuevo coronavirus (SARS-2 o SARS-CoV-2019) aislado de al menos 20 pacientes con enfermedad respiratoria grave en la ciudad china de Wuhan.

Las diferentes formas de virus SARS-2 o SARS-CoV-2019 recombinante, con el genoma completo o con deleciones en diferentes genes, se rescatarán a partir de un cromosoma artificial de bacterias (BAC) que crece en *E. coli*, que codifica el cDNA del virus. El genoma completo del virus solo presenta dos mutaciones silenciosas que se han introducido como marcadores genéticos. Además, se construirán mutantes de este coronavirus en los que se deleccionarán o modificarán los genes específicos de género 3, 7a, 7b, 8 y 9b, y los genes estructurales E y N, solos o en distintas combinaciones. Estos virus rSARS-CoV-2019 se rescatarán en células de mamífero a partir de cromosomas artificiales de bacterias que codifican los distintos virus. En este momento no se dispone de información específica sobre la función de estas proteínas del SARS-CoV-2019. Sin embargo, las proteínas 3, 6, 7a, 7b, 9b, E y N poseen una identidad de secuencia con las correspondientes del SARS-CoV del 67 -95%. Además, comparando con los homólogos de SARS-CoV, se conservan motivos funcionales relevantes. Por tanto, es muy posible que se conserven las funciones que se han identificado hasta el momento de estas proteínas. En ese sentido, y basándonos en nuestros resultados previos, podemos prever que:

- Las proteínas 3 y E serán factores de virulencia y que un virus que carezca de la proteína E estará atenuado y el virus que no exprese ambas proteínas será eficiente el replicación y



defectivo en propagación; pudiendo ser la base para la generación de replicones, con un grado adicional de seguridad.

- Las proteínas 6, 7a, 7b, 8, 9b y N serán antagonistas de una o varias rutas de señalización de la respuesta inmune innata, por lo que esperamos que modificaciones en las mismas conducirán a virus atenuados. Los genes accesorios específicos de género 3, 6, 7a, 7b y 8 se delecionarán individualmente y en combinaciones de dos o más genes. Los genes accesorios en coronavirus no son esenciales para la replicación viral, pero habitualmente están regulando la virulencia del virus porque intervienen en la interacción con el hospedador.

El objetivo final de la delección y modificación de estos genes es **generar virus atenuados que puedan servir como vacunas seguras.**

2) Duración prevista de la actividad:

(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).

Se prevé un periodo de cinco años desde la recepción de la autorización de la actividad confinada

III. EVALUACIÓN DE RIESGO

(Para llevar a cabo dicha evaluación se tendrá en cuenta el procedimiento establecido en 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 de riesgo).

(En el caso de actividades de tipo 1 se incluirá en este apartado un listado de los principales organismos y material genético utilizados (organismos receptores, organismos donantes, insertos, vectores y organismos modificados genéticamente resultantes), así como la evaluación del riesgo para la salud humana y el medio ambiente de los mismos).

1) Identificación de las propiedades nocivas del OMG, en función de las características del:

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

a) Organismo receptor.

El organismo receptor en todo momento es un OMG que consiste en un virus recombinante rSARS-CoV-2019, que se obtendrá a partir de un cDNA infectivo que codifica el cDNA completo del virus referencia (GenBank: MN908947.3). Este cDNA presenta dos mutaciones silenciosas en los nt 20085 y 26840 como marcadores genéticos que lo distinguen del genoma del virus silvestre.

Al ser el OMG (rSARS-CoV-2019) idéntico al virus silvestre SARS-CoV-2019 aislado de pacientes, excepto en los dos marcadores genéticos. Por tanto, se espera que



sea patógeno para humanos, dado que el virus silvestre (SARS-CoV-2019) produce enfermedad respiratoria severa en humanos.

En lo que respecta al hábitat natural del OMG, éste no existe en la naturaleza dado que se ha generado en el laboratorio y permanecerá confinado en las instalaciones NCB3 del CNB-CSIC. El hábitat natural del virus cuyo genoma codifican los fragmentos de cDNA, SARS-CoV-2019 silvestre, sin modificaciones, son los seres humanos. Este nuevo coronavirus ha sido aislado al menos 20 pacientes con enfermedad respiratoria grave en la ciudad china de Wuhan. De momento (11 Febrero 2020), ha causado la muerte de 1017 personas. Hasta el momento se han confirmado 42718 casos, de los cuales 4096 pacientes se han recuperado de la infección. La mayoría de los casos se han detectado en China, además se ha identificado en al menos 24 países de Asia, América, Europa y Oceanía, tales como Taiwan, Tailandia, Corea del Sur, Japón, Malasia, Emiratos Árabes Unidos, Australia, Estados Unidos, Canadá, Alemania o Francia. Una de las características que distinguen este virus de el SARS-CoV es su diseminación a partir de individuos asintomáticos, durante el periodo de incubación que se ha estimado en 7-14 días. Se sospecha que el origen de este virus es zoonótico, dado que tiene una homología de secuencia del 96% con coronavirus SARS-like que se encuentran en murciélagos (Zhou P. et al, 2020, Nature, doi:10.1038/s41586-020-2012-7). Aunque aún no se ha identificado el hospedador intermedio a partir del cuál se ha producido el salto a humanos,

b) Organismo donante.

No aplica

c) Inserto.

Los insertos corresponden a fragmentos de DNA que contienen las distintas modificaciones en los genes virales 3, E, 6, 7, 8 y N, que se sintetizarán químicamente. Estos fragmentos se clonarán en el cDNA infeccioso para, posteriormente, rescatar virus defectivos en estos genes virales.

La función de los genes que codifican estos fragmentos se detalla en la Parte A.

Cuando se rescaten los virus recombinantes rSARS-CoV-2019 defectivos, los genes estructurales y accesorios se expresarán bajo las secuencias reguladoras de la transcripción del virus silvestre por lo que el nivel de expresión de dichos genes será el mismo que el de los genes de la cepa Wuhan-Hu-1 de SARS-CoV-2019.

d) Vector.

Para poder realizar la modificación genética del rSARS-CoV-2019 se utilizarán como vectores plásmidos pBAC en los que se insertarán los fragmentos con las mutaciones, obtenidos mediante síntesis química.

e) Organismo modificado genéticamente resultante.



A partir de los BACs que contengan los cDNAs modificados genéticamente, se rescatarán virus recombinantes (rSARS-CoV-2019) con mutaciones en alguna de sus proteínas. Estos virus rSARS-CoV-2019 se comportarán en general como virus atenuados, con menor o igual tasa de replicación y menor patogenicidad que el organismo parental. Así mismo, se pretender generar virus eficientes en replicación y defectivos en propagación, lo que confiere un grado adicional de atenuación a los OMGs generados.

f) Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.

El organismo modificado genéticamente consiste en virus recombinantes derivados de rSARS-CoV-2019 en los que se delecionarán o modificarán los genes específicos de género 3, 7a, 7b, 8 y 9b, y los genes estructurales E y N, solos o en distintas combinaciones. No se prevé que los virus resultantes tengan efectos tóxicos o alergénicos sobre el hospedador, ya que son virus defectivos mediante la eliminación de genes esenciales.

La patogenicidad del virus recombinante con los genes 3 y E delecionados será previsiblemente mucho menor que la del organismo donante, de acuerdo con lo observado en otros coronavirus, dado que será eficiente en replicación pero defectivo en propagación. Por tanto, este virus no tendrá capacidad para propagarse ni por el medio ambiente ni en la especie humana, salvo que se haya introducido deliberadamente.

Se prevé que los virus recombinantes con otros genes delecionados podrían estar atenuados con respecto al organismo receptor rSARS-CoV-2019.

f) Efectos para el medio ambiente.

El virus deficiente en propagación es casi imposible que se propague, puesto que al haberse delecionado los genes 3 y E, es incapaz de salir de la célula una vez que ha entrado. En el caso de que llegara a diseminarse accidentalmente por medio del aire, podría sobrevivir en el medio ambiente, dentro de los humanos, pero no se propagaría a otros seres por ser defectivo.

Los virus mutantes que se generarán no serán patógenos en animales. Tampoco serán patógenos en humanos, por haberse delecionado uno o varios genes. Tampoco serían patógenos para plantas, porque no puede entrar en ellas al no tener estas los receptores apropiados.

2) Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente:

(Para establecer esta primera valoración se tendrá en cuenta lo dispuesto en el artículo 4 de la Directiva 2009/41/CE y, en caso de ser aplicable, otros sistemas de clasificación nacionales e internacionales existentes, por ejemplo, la Directiva 2000/54/CE sobre protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo).



- Tipo 1
- Tipo 2
- Tipo 3
- Tipo 4

3) Probabilidad de que se produzcan efectos nocivos y gravedad de los mismos, en función de: Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.

- a) Características de la/s actividad/es (medidas de confinamiento y control, y exposición humana y ambiental).

La actividad se va a llevar a cabo en el laboratorio de contención de nivel 3, por lo que el organismo modificado estará confinado a este espacio y no saldrá en ningún momento del mismo. El riesgo de inoculación accidental del virus recombinante es prácticamente nulo debido a la ausencia de material punzante y cortante en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica y no hay riesgo de contagio por contacto.

- b) Concentración y escala utilizadas.

Se utilizará un volumen máximo de 250 – 375 ml por ensayo. La concentración máxima que se estima es de entre 1×10^5 y 5×10^8 ufp/ml, que son los títulos que se alcanzan en cultivos con este tipo de virus.

- c) Condiciones de cultivo (se tendrá en cuenta el entorno potencialmente expuesto, la presencia de especies susceptibles, supervivencia del OMG y efectos sobre el entorno físico):

El rescate de los virus defectivos producidos a partir de los cDNAs que contengan deleciones o modificaciones en los genes específicos de género 3, 7a, 7b, 8 y 9b, y los genes estructurales E y N, solos o en distintas combinaciones, se realizará en células Vero E6 reduciendo así la capacidad de colonizar los organismos y medio ambiente. Los experimentos se realizarán en los laboratorios de contención biológica de nivel 3 (NCB3), por lo que el personal y el entorno expuestos se reducen al máximo. Además, los virus mutantes generados se prevé que no serán patógenos para el ser humano, y ninguno de ellos será nocivo para el medio ambiente.

4) Determinación de la clasificación y medidas de confinamiento definitivas y confirmación de su idoneidad:

Actividad confinada de Tipo 3. Actividad en la cual el grado 3 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente.



5) Determinación del riesgo en el caso de que se produzca una liberación accidental:

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

- a) Información adicional relativa a la ubicación de la instalación (proximidad a fuentes de peligro potenciales, condiciones climáticas predominantes, etc.)

El riesgo de contaminación en dependencias cercanas a la instalación o en el medio ambiente externo al Centro Nacional de Biotecnología es prácticamente inexistente por las siguientes razones:

- El laboratorio está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios, resaltándose el sistema de tratamiento de aire y el sistema de inactivación biológica de efluentes líquidos. Es más, consideramos que el nivel de contención obtenido excede en determinados parámetros el exigido por la legislación para las operaciones confinadas de tipo 3.

- Estos medios e infraestructura ya se han validado previamente por una empresa externa y serán validados por ésta empresa u otras anualmente o tras averías. Igualmente, el servicio de Bioseguridad validará periódicamente a nivel interno todos los métodos y sistemas de inactivación biológica y esterilización mediante la utilización de microorganismos testigo utilizando diferentes métodos.

- 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 bioseguridad. 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.

b) 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.

c) Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales.

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

d) Planes de emergencia.

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