



**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: Mariano Esteban Rodríguez / Juan Francisco García Arriaza

NIF: 12.666.094-V / 52951803F

Cargo: Profesor de Investigación “Ad Honorem” / Investigador Postdoctoral

Tel: 91 5854553 / 91 5854560

Fax: 91 585 45 06

Correo electrónico: mesteban@cnb.csic.es / jfgarcia@cnb.csic.es



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

Nombre y apellidos: [Gonzalo Pascual Alvarez](#)

NIF: [05251912T](#)

Cargo: [Jefe del Servicio de Seguridad Biológica](#)

Tel: [916202300](#)

Fax: [916202247](#)

Correo electrónico: gpascual@inia.es

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

Nombre y apellidos: [Fernando Usera Mena](#)

NIF: [00694865-N](#)

Cargo: [Responsable del Servicio de Bioseguridad del CNB](#)

Tel: [91 585 45 41](#)

Fax: [91 585 45 06](#)

Correo electrónico: fusera@cnb.csic.es

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: [FONDO-COVID19: DESARROLLO DE UNA VACUNA, MVA-COVID-19, EXPRESANDO ANTÍGENOS DEL SARS-CoV-2.](#)
- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo: [COV20/00151. IP: Juan García Arriaza](#)
- Organismo financiador: [Instituto de Salud Carlos III](#)

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.



También hemos obtenido financiación como IP de otros tres proyectos adicionales:

- Nombre de la convocatoria: Proyecto Intramural Especial (PIE): DESARROLLO DE UNA VACUNA, MVA-COVID-19, EXPRESANDO ANTÍGENOS DEL SARS-CoV-2.
- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo: 202020E084. IP: Mariano Esteban Rodríguez.
- Organismo financiador: Ministerio de Ciencia e Innovación.

- Nombre de la convocatoria: FONDO-COVID19. Preclinical development of innovative mRNA/MVA vaccines against SARS-CoV2.
- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo: COV20_00214. CO-IP: Mariano Esteban Rodríguez
- Organismo financiador: Instituto de Salud Carlos III

- Fundación La Caixa, Programa CaixaImpulse. CoV2-BMEP and CoV2-TMEP: two novel polyvalent multiepitopic vaccines against SARS-CoV. IP: Mariano Esteban Rodríguez.

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:

Fecha de comunicación: 18/02/2000

Autorización: A/ES/00/I-1

b) Número de referencia del expediente:

Fecha: 4.12.00

Registro salida: 8443

Fecha: 5 diciembre de 2000



II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1) Finalidad de la actividad:

El objetivo de la actividad es el diseño de vacunas para proteger frente a la infección respiratoria causada por el coronavirus humano SARS-CoV-2-2019. Para ello se realizarán ensayos de inmunogenicidad y protección en ratones susceptibles a la infección viral que mimetizan la enfermedad pulmonar severa observada en humanos. Estos ratones susceptibles están modificados genéticamente para expresar el transgen (tg) que codifica el receptor humano hACE2. La eficacia de los candidatos vacunales se determinará en este modelo animal murino tg-hACE2. Para conseguir estos objetivos, el único modelo experimental que se puede utilizar son animales y particularmente ratones.

El modelo animal consiste en ratones transgénicos B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/J o K18-hACE2 (Stock No: 034860) procedentes de laboratorios Jackson (<https://www.jax.org/strain/034860>), que expresan la proteína ACE2 humana que actúa como receptor de SARS-CoV-1-2002 y SARS-CoV-2-2019, bajo el promotor de citoqueratina 18 (K18) humano, que dirige la expresión del transgen a las vías respiratorias.

Los candidatos vacunales utilizados en los ensayos de inmunogenicidad y protección son virus vaccinia modificado (MVA) que expresan la proteína S del coronavirus SARS-CoV-2, o bien otras proteínas o regiones, como la región RBD de la proteína S o las proteínas E, M o N. Estas construcciones se realizan en las instalaciones ya autorizadas A/ES/03/I-05 y A/ES/18/I-08 del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). La construcción de los candidatos vacunales que expresan S, E o M, ha sido aprobada por la Comisión Nacional de Bioseguridad (Número de Notificación A/ES/20/41). La construcción de los candidatos vacunales que expresan la región RBD de la proteína S o N, se ha notificado el 18 de junio con número de entrada en el registro de la sede electrónica: O00000226e2000010507.

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

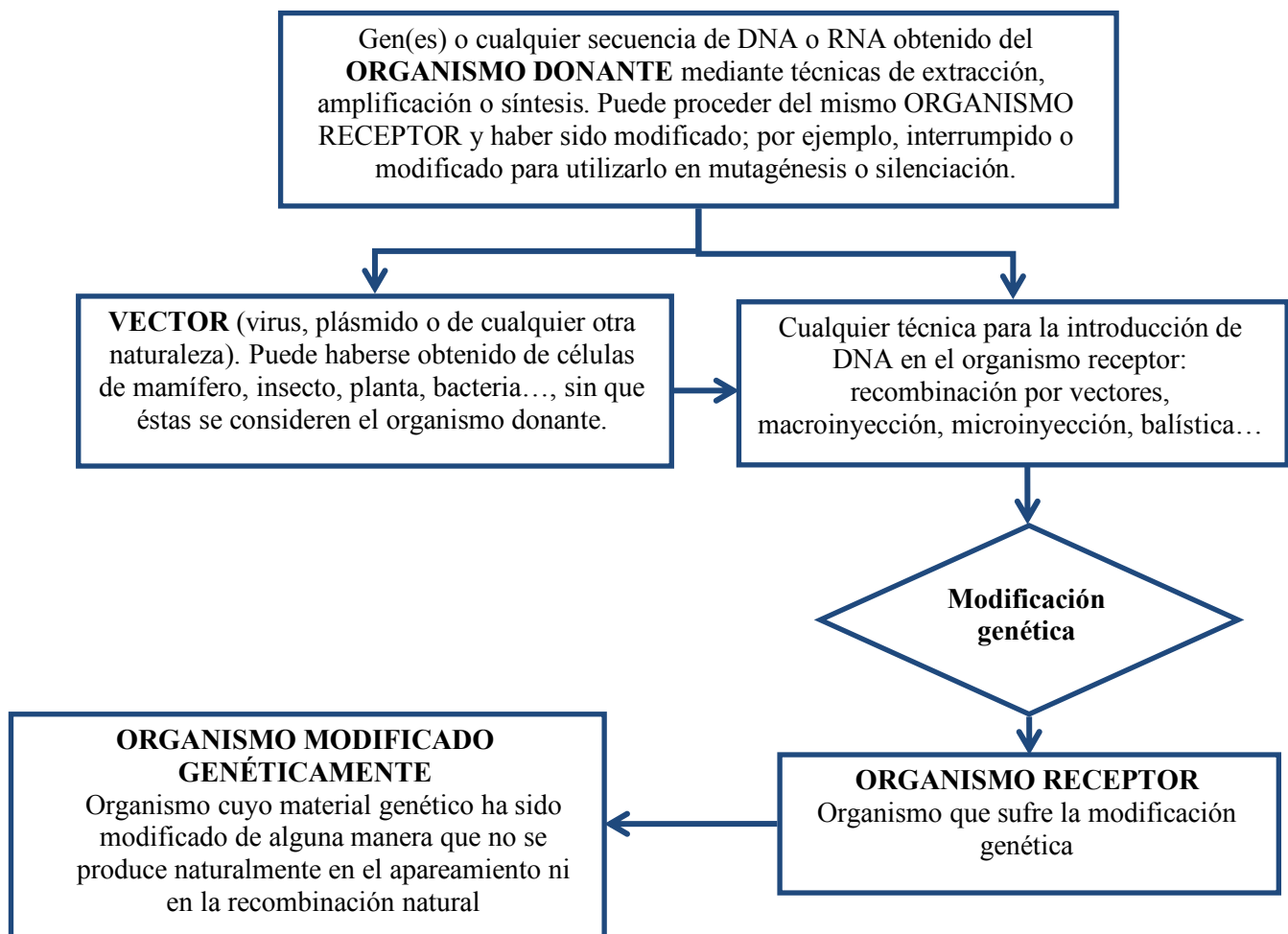
Tipo 2

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 vaccinia*

Taxonomía: Familia Poxviridae. Género Orthopoxvirus

Nombre común: virus de la vacuna cepa MVA

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento:

Infecciones en cultivos celulares. Los virus MVA-SARS-CoV-2 serán utilizados para infectar cultivos de células permisivas [DF-1 (línea celular establecida de células de pollo) y CEF (células primarias de pollo)] y células no permisivas (células humanas HeLa).

b) Técnicas de identificación:

PCR, secuenciación, western blot, ELISA

c) Marcadores genéticos:

No aplica

d) Marcadores fenotípicos:

No aplica

e) Estabilidad genética:

El MVA es estable en cultivos celulares.

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

El organismo receptor utilizado es el poxvirus MVA, virus altamente atenuado procedente de la cepa Ankara (CVA) (Mayr et al., Zentralbl. Bakteriol. B 167, 375–390, 1978). La atenuación se ha conseguido mediante la delección al azar, tras 560 pases seriados en cultivos celulares, de genes virales implicados en virulencia, rango de huésped y evasión del sistema inmune. Durante estos pases en cultivos el MVA ha perdido alrededor de 30 Kb del genoma, comparado con la cepa parental CVA (Antoine, et al., Virology, 244, 365–396, 1998).

4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

SI NO

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 MVA no es patógeno para seres humanos y animales ya que no produce progenie, con excepción de en unas pocas células en cultivo como las derivadas de pollo. Es un virus altamente atenuado procedente de la cepa Ankara. La atenuación se ha conseguido mediante la delección al azar (mediante pases seriados en cultivos celulares) de genes virales implicados en virulencia, rango de huésped y evasión del sistema inmune. El virus MVA ha sido ensayado en seres humanos demostrándose su inocuidad, sin efectos alérgicos o tóxicos.

El vector MVA se ha inoculado en cientos de miles de voluntarios y en personas con VIH, y además ha sido aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) de USA y por la EMA (European Medicinal Agency) como vacuna de uso humano contra la viruela, lo que demuestra su seguridad en la población.

- 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.*):

a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

No aplica

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

SÍ NO

Porqué: No existe probabilidad de reversión de la atenuación.

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

Sí. Libre de micoplasma, bacterias y hongos.

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

El virus MVA ha sido ensayado en seres humanos demostrándose su inocuidad, sin efectos alérgicos o tóxicos. El organismo receptor utilizado es el poxvirus MVA, virus altamente atenuado procedente de la cepa Ankara (CVA) (Mayr et al., Zentralbl. Bakteriologie B 167, 375–390, 1978). La atenuación se ha conseguido mediante la delección al azar, tras 560 pases seriados en cultivos celulares, de genes virales implicados en virulencia, rango de huésped y evasión del sistema inmune. Durante estos pases en cultivos el MVA ha perdido alrededor de 30 Kb del genoma, comparado con la cepa parental CVA (Antoine, et al., Virology, 244, 365–396, 1998).

El grupo posee una amplia experiencia de más de 30 años en la utilización del MVA, habiéndose utilizado como candidato vacunal frente a otros patógenos como VIH, chikungunya, ébola, zika, hepatitis C, entre otros. El virus MVA ha mostrado ser muy seguro



en modelos animales y en seres humanos. Su utilización se restringe a un laboratorio de contención biológica de nivel 2.

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?:

NO

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 MVA fuera de las condiciones de cultivo.

d) Posibles nichos ecológicos:

No aplica

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*):

No aplica

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

No aplica



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

No aplica

12) Hábitat natural del organismo:

No aplica

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: SARS-CoV-2

Taxonomía: Familia Coronaviridae, género Betacoronavirus.

Nombre común: Coronavirus tipo 2 (SARS-CoV-2) causante de enfermedad respiratoria grave COVID-19

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante:

Genes S (y región RBD del gen S), E, M, y N. Nunca se trabaja con el virus completo, sólo se trabaja con secuencias específicas del virus, en concreto con los genes que codifican para las proteínas estructurales S (y región RBD), E, M, y N.

3) Método de obtención:

a) Extracción

b) PCR

c) Síntesis *in Vitro*

Los genes S (y región RBD), E, M, y N se han obtenido a través de la empresa GeneArt por síntesis química.

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

El gen S codifica una glicoproteína de la superficie del virus. Es un gen estructural implicado en la unión del virus a su receptor celular y es la principal diana de anticuerpos. El RBD codifica el dominio de unión al receptor del gen S.

Los genes E y M codifican proteínas de la envuelta del virus. El gen E codifica una pequeña proteína de la envoltura y el gen M codifica una proteína de la matriz que une la envoltura con el núcleo vírico.

El gen N codifica por la proteína de la nucleocápsida.



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?

SARS-CoV-2 como virus patógeno en humanos. Causa un síndrome agudo respiratorio que puede desencadenar la muerte de la persona infectada.

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

Las secuencias insertadas son inmunogénicas y se han elegido en función de la posibilidad de inducir una buena respuesta inmunitaria frente al coronavirus. El gen S codifica una glicoproteína de la superficie del virus. Es un gen estructural implicado en la unión del virus a su receptor celular y es la principal diana de anticuerpos. La región RBD codifica el dominio de unión al receptor del gen S. Los genes E y M codifican proteínas de la envuelta del virus. El gen E codifica una pequeña proteína de la envoltura y el gen M codifica una proteína de la matriz que une la envoltura con el núcleo vírico. El gen N codifica la proteína de la nucleocápsida. No se trabaja con el material genético del virus, una molécula de RNA de unos 30.000 nucleótidos responsable de la virulencia.

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

NO



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:

Insertar los genes S (y región RBD), E, M, y N del coronavirus SARS-CoV-2 en el genoma del MVA, con la finalidad de generar vacunas frente al SARS-CoV-2. Se trata de un poxvirus MVA no relacionado con el coronavirus, que no replica de forma productiva en células humanas ni en ratón, pero que induce respuestas inmunes frente a las proteínas del coronavirus. En ningún momento se generarán partículas infectivas con RNA viral.

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

Inserción por un proceso de infección/transfección, y que mediante recombinación homóloga se introduce en zonas específicas las secuencias del coronavirus dentro del genoma del MVA.

Previamente a la modificación genética a realizar para generar el OMG se generará un plásmido vector de transferencia denominado pCyA-SARS-CoV-2(S) que contiene la secuencia del gen S del SARS-CoV-2 y el flanco izquierdo y derecho del locus TK de MVA.

También se generará un plásmido vector de transferencia denominado pHA-SARS-CoV-2(E,M) que contiene las secuencia de los genes E y M del SARS-CoV-2 y el flanco izquierdo y derecho del locus HA de MVA. Otros plásmidos serán pCyA-SARS-CoV-2(RBD,N) y pCyA SARS-CoV-2 (RBD). La generación de los plásmidos pCyA-SARS-CoV-2(S), pHA-SARS-CoV-2(E,M), pCyA-SARS-CoV-2(RBD,N), y pCyA-SARS-CoV-2 (RBD) se realizará en el laboratorio siguiendo la metodología descrita previamente para la generación de plásmidos de transferencia (Gómez et al., Vaccine, 25(15):2863-85, 2007).

Mediante un proceso de recombinación homóloga entre el plásmido vector de transferencia pCyA-SARS-CoV-2(S) y el MVA, se genera un virus recombinante MVA-SARS-CoV-2(S), donde se inserta el gen S del SARS-CoV-2 en el locus TK de MVA. El gen S se expresa bajo el control de un promotor temprano/tardío del virus vaccinia. Posteriormente, mediante un proceso de recombinación homóloga entre el plásmido vector de transferencia, ej pHA-SARS-CoV-2(E,M) y el MVA-SARS-CoV-2(S), se generará un virus recombinante MVA-SARS-CoV-2(S,E,M), donde se insertan los genes E y M del SARS-CoV-2 en el locus HA del MVA-SARS-CoV-2(S). Este mismo proceso se realiza también para generar los virus MVA-SARS-CoV-2(RBD,N) y MVA-SARS-CoV-2(RBD), donde se insertan los genes RBD



y N o solo el RBD del SARS-CoV- 2 en el locus TK del MVA-WT, respectivamente. Los genes S (y región RBD), E, M, y N se expresan bajo el control de un promotor temprano/tardío del virus vaccinia.

Como ejemplo: Para generar el virus recombinante MVA-SARS-CoV-2(S), se infectan células DF-1 (3×10^6 células) con virus parental MVA a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,05 PFU/célula y se transfectan 1 hora más tarde con 10 μ g de ADN del plásmido pCyA-SARS-CoV-2(S), utilizando reactivo lipofectamina de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Invitrogen). Tras 48 horas de infección, las células se recogen, se lisan mediante ciclos de congelación-descongelación, se sonican y se utilizan para la selección del virus recombinante.

Virus MVA recombinantes que contienen el gen S del SARS-CoV-2 y coexpresan transitoriamente el gen marcador β -Gal (MVA-SARS-CoV-2(S), X-Gal+) se seleccionan por rondas consecutivas de purificación de placas en células DF-1 teñidas con X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, 400 μ g/ml, tres pases en total). En las siguientes etapas de purificación en placa, virus MVA recombinantes que contienen el gen S del SARS-CoV-2, y que han eliminado el gen β -Gal mediante recombinación homóloga entre el flanco izquierdo TK y el flanco izquierdo corto TK que flanquean al gen marcador (MVA-SARS-CoV-2(S), XGal-) se aíslan mediante tres rondas consecutivas adicionales de selección de purificación de placa en células DF-1 en presencia de X-Gal. En cada ronda de purificación, las placas aisladas se expanden en células DF-1 durante 3 días, y los virus obtenidos se usan para la siguiente ronda de purificación de placa.

Otro ejemplo: Para generar el virus recombinante MVA-SARS-CoV-2(S,E,M), se infectan células DF-1 (3×10^6 células) con virus parental MVA-SARS-CoV-2(S) a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,05 PFU/célula y se transfectan 1 hora más tarde con 10 μ g de ADN del plásmido pHASARS-CoV-2(E,M), utilizando reactivo lipofectamina de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Invitrogen). Tras 48 horas de infección, las células se recogen, se lisan mediante ciclos de congelación-descongelación, se sonican y se utilizan para la selección del virus recombinante. Virus MVA recombinantes que contienen los genes E y M del SARS-CoV-2 y coexpresan transitoriamente el gen marcador β -Gus (MVA-SARS-CoV-2(S,E,M), β -Gus+) se seleccionan por rondas consecutivas de purificación de placas en células DF-1 teñidas con XGluc (400 μ g/ml, tres pases en total). En las siguientes etapas de purificación en placa, virus MVA recombinantes que contienen los genes E y M del SARS-CoV-2, y que han eliminado el gen β -Gus mediante recombinación homóloga entre el flanco izquierdo HA y el flanco izquierdo corto HA que flanquean al gen marcador (MVA-SARS-CoV-2(S,E,M), β -Gus-) se aíslan mediante tres rondas consecutivas adicionales de selección de purificación de placa en células DF-1 en presencia de X-Gluc. En cada ronda de purificación, las placas aisladas se expanden en células DF-1 durante 3 días, y los virus obtenidos se usan para la siguiente ronda de purificación de placa.

Los virus recombinantes MVA-SARS-CoV-2(S), MVA-SARS-CoV-2(S,E,M), MVA-SARS-CoV-2(RBD,N) y MVA-SARS-CoV-2(RBD) se cultivan en células CEF, se purifican a través de dos colchones de sacarosa al 36% , titulándose mediante ensayo de inmunotinción en placa. De forma similar se generarán los distintos virus recombinantes expresando los distintos genes



estructurales del SARS-CoV-2. Todos estos virus no son replicativos en células humanas ni generarán partículas infectivas del coronavirus al carecer de su material genético, por lo que son seguros.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector:

Plásmido vector de transferencia denominado pCyA-SARS-CoV-2(S) que contiene la secuencia del gen S del SARS-CoV-2 y el flanco izquierdo y derecho del locus TK de MVA. También se generará un plásmido vector de transferencia denominado pHA-SARS-CoV-2(E,M) que contiene las secuencia de los genes E y M del SARS-CoV-2 y el flanco izquierdo y derecho del locus HA de MVA. Otros plásmidos serán pCyA-SARS-CoV-2(RBD,N) con la secuencias de la región RBD de la proteína S y la nucleocápsida, pCyA-SARS-CoV-2(RBD), con la secuencias de la región RBD de la proteína.

La generación de los plásmidos pCyA-SARS-CoV-2(S), pHA-SARS-CoV-2(E,M), pCyA-SARS-CoV-2(RBD,N), y pCyA-SARS-CoV-2(RBD) se realizará en el laboratorio siguiendo la metodología descrita previamente para la generación de plásmidos de transferencia (Gómez et al., Vaccine, 25(15):2863-85, 2007).

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*):

La generación de los plásmidos pCyA-SARS-CoV-2(S), pHA-SARS-CoV-2(E,M), pCyA-SARS-CoV-2(RBD,N), y pCyA-SARS-CoV-2(RBD) se realizará en el laboratorio siguiendo la metodología descrita previamente para la generación de plásmidos de transferencia (Gómez et al., Vaccine, 25(15):2863-85, 2007). El plásmido pCyA contiene un promotor temprano/tardío del virus vaccinia, así como las regiones flanqueantes del locus TK del MVA. Se ha descrito previamente (Gómez et al., Journal of Virology, 2013), donde se incluye el mapa de restricción.

d) Gama de hospedadores del vector:

No aplica



- e) Características de la movilidad del vector:
- i) factores de movilización: **No aplica**
 - 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**

5) Información del inserto:

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

Los genes estructurales S (y región RBD), E, M y N del coronavirus SARS-CoV-2 (derivado de un paciente en China; número de acceso a genbank: MN908947.3).

- b) Origen y función específica de cada parte del inserto

El gen S codifica una glicoproteína de la superficie del virus. Es un gen estructural implicado en la unión del virus a su receptor celular y es la principal diana de anticuerpos. La región RBD de la proteína S codifica el dominio de unión al receptor.

Los genes E y M codifican proteínas de la envuelta del virus. El gen E codifica una pequeña proteína de la envoltura, y el gen M codifica una proteína de la matriz que une la envoltura con el núcleo vírico.

El gen N codifica la nucleocápsida.

- c) Descripción del método utilizado para la transformación:

Infección/transfección

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

El gen S codifica la proteína de la envuelta. Es un gen estructural implicado en la unión del virus a su receptor celular y es la principal diana de anticuerpos.

La región RBD de la proteína S codifica el dominio de unión al receptor.

Los genes E y M codifican proteínas de la envuelta del virus y tienen un papel fundamental en el ensamblaje y salida del virus. El gen E codifica una pequeña proteína de la envoltura y el gen M codifica una proteína de la matriz que une la envoltura con el núcleo vírico.

El gen N codifica la nucleocápsida que incorpora el RNA viral.

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

Promotor temprano/tardío del virus vaccinia,



f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

SI

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

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?:

NO

En caso afirmativo:

i) número de copias:

ii) localización cromosómica:

iii) secuencias colindantes:

iv) ¿La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes?:

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



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)

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

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 hombre, plantas o animales? En caso afirmativo, especificar:

NO

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:

No aplica



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

El OMG es estable en cultivos celulares tras 9 pases seriados a baja multiplicidad de infección, sin pérdida de los insertos introducidos en su genoma.

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

NO

- 5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:

- a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

PCR, secuenciación, western blot, ELISA, técnicas de biología molecular.

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

No aplica

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:

Ya hemos demostrado que tras la infección de 30 placas de p150 (3×10^7 células CEF por placa) con MVA-SARS-CoV-2 (S), y el virus purificado en dos colchones de 36% de sacarosa se obtienen 3 ml con un título viral aproximado de 10^9 pfu/ml.

- b) Número de plantas:

No aplica

- c) Número de animales:

En cada ensayo de protección se utilizarán 60 ratones transgénicos que expresan el receptor humano hACE2.



Para analizar la protección conferida por los candidatos vacunales seleccionados los experimentos se realizarán con 1 grupo de ratones no vacunados y 5 grupos vacunados con los diferentes candidatos vacunales (10 ratones/grupo). Los ratones se inocularán con dos dosis del candidato MVA ($1-2 \times 10^7$ PFU/ratón en un volumen de 100-200 μ l, por vía intraperitoneal o intramuscular). Cada grupo se distribuirá en dos jaulas (5 para analizar los signos clínicos de la enfermedad y 5 para toma de muestras). Posteriormente, los ratones se anestesiarán con isoflurano y se inocularán con una dosis intranasal de 100.000 pfu de SARS-CoV-2 virus en 50 μ l de DMEM. Posteriormente se evaluarán los signos de enfermedad en todos los grupos.

Se utilizarán distintos protocolos de inmunización, distintos vectores de MVA expresando antígenos del SARS-CoV-2, distintas rutas de inoculación y distintos tiempos de recogida, para establecer el procedimiento más óptimo que confiere mayor protección y mas duradera frente al SARS-CoV-2.

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 asociados las actividades con los OMG).

5 años

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

Generación de una vacuna frente al SARS-CoV-2 que expresa el gen S del coronavirus, o los genes S (región RBD), E, M, y N, y estudio de su capacidad inmunogénica y de protección en ratones humanizados hACE2.

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:

El OMG procede del CNB.

Los candidatos vacunales utilizados en los ensayos de inmunogenicidad y protección son virus vaccinia modificado (MVA) que expresan la proteína S del coronavirus SARS-CoV-2, la región RBD de la proteína S o las proteínas E, M o N. Estas construcciones se realizan en las instalaciones ya autorizadas A/ES/03/I-05 y A/ES/18/I-08 del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). La construcción de los candidatos vacunales que expresan S, E o M, ha sido aprobada por la Comisión Nacional de Bioseguridad (Número de Notificación A/ES/20/41). La construcción de los candidatos vacunales que expresan la región RBD de la proteína S o N, se ha notificado el 18 de junio con número de entrada en el registro de la sede electrónica: 000000226e2000010507.



- 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*):

El tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación y etiquetado seguirán la legislación internacional y nacional vigente para el transporte de material biológico infeccioso para humanos y animales.

El transporte de los candidatos vacunales (MVA-SARS-CoV-2) desde el CNB-CSIC (Cantoblanco, Madrid), donde se han generado, hasta el CISA-INIA (Valdeolmos), donde se realizarán los experimentos con animales, se llevará a cabo por una empresa autorizada conforme a dicha normativa como material infeccioso de categoría A.

El transporte de material biológico infeccioso para humanos y animales entre ambas instalaciones se llevará a cabo por una empresa autorizada conforme a dicha normativa como material infeccioso de categoría A.

- 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*):

Ensayos de protección con modelos animales:

Para los estudios de protección mediante candidatos vacunales se utilizará como modelo animal ratones modificados genéticamente para adquirir susceptibilidad a la infección por SARS-CoV-2. Estos ratones K18-hACE2 proceden de laboratorios Jackson, que los ha regenerado a partir de esperma donado por el Dr. Stanley Perlman (Universidad de Iowa, USA) (Ref. 1).

La cepa de ratones transgénicos, denominada **B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/J o K18-hACE2** (Stock No: 034860), expresa la proteína ACE2 humana, que es el receptor utilizado por el SARS-CoV-1-2002 y por el nuevo SARS-CoV-2-2019 para entrar en las células. Para dirigir la expresión específicamente a las células epiteliales de las vías respiratorias donde generalmente comienzan las infecciones, se ha utilizado un promotor de citoqueratina 18 (K18) humano. Estos ratones demostraron ser un modelo de infección letal con SARS-CoV-1-2002 (Ref. 2-5) y estudios recientes indican que serán también válidos para estudios de eficacia de candidatos vacunales para el nuevo SARS-CoV-2-2019.

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/>



La cepa K18-hACE2 se obtuvo a partir de la cepa origen (C57BL/6J x SJL/J)F2 por inserción de un transgén de 6.8 kb que incluye, desde el 5' al 3', los siguientes elementos: 2.5 kb de secuencias genómicas del gen humano K18, incluyendo el promotor y el primer intrón (con una mutación en el sitio 3'aceptor de splicing para reducir la omisión de exón); un enhancer de la traducción del virus del mosaico de la alfalfa; la secuencia codificante del gen humano de la enzima convertidora de angiotensina (hACE2); los exones 6-7 y la señal de poliadenilación del gen humano K18.

La información relativa a esta cepa de ratones K18-hACE2 está disponible en la web de Jackson laboratorios:

<https://www.jax.org/strain/034860>

Los ensayos de protección con ratones K18-hACE2 se realizarán en el Box Nº 5 del CISA-INIA (Valdeolmos, Madrid). Este box está equipado con una cabina de flujo laminar de clase IIA/B3 y un rack ventilado Allentown. Durante todo el experimento, los ratones permanecen en este rack de aislamiento que dispone de jaulas con doble filtración HEPA para asegurar la contención del virus.

REFERENCIAS

1. McCray PB Jr; Pewe L; Wohlford-Lenane C; Hickey M; Manzel L; Shi L; Netland J; Jia HP; Halabi C; Sigmund CD; Meyerholz DK; Kirby P; Look DC; Perlman S. 2007. Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* 81(2):813-21 [PubMed: 17079315](#) [MGI: J:283648](#)
 2. Dediego ML; Pewe L; Alvarez E; Rejas MT; Perlman S; Enjuanes L. 2008. Pathogenicity of severe acute respiratory coronavirus deletion mutants in hACE-2 transgenic mice. *Virology* 376(2):379-89 [PubMed: 18452964](#) [MGI: J:283998](#)
 3. Zhao J; Falcon A; Zhou H; Netland J; Enjuanes L; Perez Brena P; Perlman S. 2009. Severe acute respiratory syndrome coronavirus protein 6 is required for optimal replication. *J Virol* 83(5):2368-73 [PubMed: 19091867](#) [MGI: J:283997](#)
 4. Blumer JB; Lord K; Saunders TL; Pacchioni A; Black C; Lazartigues E; Varner KJ; Gettys TW; Lanier SM. 2008. Activator of G protein signaling 3 null mice: I. Unexpected alterations in metabolic and cardiovascular function. *Endocrinology* 149(8):3842-9 [PubMed: 18450958](#) [MGI: J:138126](#)
 5. Netland J; Meyerholz DK; Moore S; Cassell M; Perlman S. 2008. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection causes neuronal death in the absence of encephalitis in mice transgenic for human ACE2. *J Virol* 82(15):7264-75 [PubMed: 18495771](#) [MGI: J:138136](#)
- 8) Descripción de las medidas de confinamiento y protección que vayan a aplicarse:

La zona de contención biológica de 10.824 m², posee unas características arquitectónicas y funcionales reconocidas internacionalmente para la consecución de la bioseguridad.

La característica principal del laboratorio es proporcionar un grado de estanqueidad total para evitar la liberación al medio externo de cualquier agente patógeno sobre el que se esté llevando a cabo alguna línea de investigación.



Para llevar a cabo unas correctas medidas de seguridad, el Centro está diseñado siguiendo unos aspectos arquitectónicos, funcionales y buenas pautas de trabajo adecuados e integrados.

Dentro de los aspectos arquitectónicos y estructurales, el Centro está construido en hormigón armado hidrófugo, cuyo interior está pintado con pintura epoxídica para posibilitar las operaciones de descontaminación. Existen también ventanas blindadas de seguridad.

Todas las entradas a boxes y diferentes zonas o laboratorios, así como las de emergencia, presentan de puertas con cerradura de seguridad y ajuste neumático.

El Centro presenta un modelo tipo “sandwich” donde las zonas de trabajo (laboratorios, animalario y entrada y salida de personal) se localizan en una planta intermedia.

En la planta superior se encuentra todo el sistema de filtración de Alta Eficacia del aire y la planta inferior está habilitada para los procesos de gestión de residuos sólidos y efluentes y para la entrada y salida de animales y material mediante sistemas SAS y Airlocks.

Para asegurar un funcionamiento correcto incluso bajo situaciones de emergencia, todos los dispositivos de seguridad se encuentran instalados de forma redundante (duplicados) o por triplicado.

Dentro de las características funcionales, se encuentran:

- El tratamiento del aire y ventilación estando Las condiciones termo-higrométricas se encuentran reguladas en todo momento. La humedad relativa se mantiene a niveles reducidos (35%) para así evitar que agentes biológicos aerotransportables queden fijados en codos y rugosidades del sistema de circulación del aire.

- Existe establecido en toda la zona Biocontenida, un mantenimiento de la presión negativa respecto a la atmosférica en gradiente diferencial unidireccional de flujo continuo en laboratorios y en cascada en boxes de experimentación de pasos de ente 25 y 35 Pa, generado en extracción dinámica, consiguiendo que el aire siempre circule de zonas teóricamente menos contaminadas a mas contaminadas.

El 100% del aire que entra vuelve a salir, en ningún momento se recircula aire.

- El aire de salida es filtrado mediante un sistema simple o doble seriado de filtros HEPA H14 (High efficiency Particulate Air) que consta de una malla filtrante con paso de poro de 99.995% para partículas de máximo poder de penetración en superficie (MPPS) (0.12 μm -0.20 μm).

Existen diferentes zonas de filtración de salida independientes correspondientes con distintas secciones del laboratorio, de esta forma en caso de problemas puede evaluarse la efectividad de la zona afectada por separado.

- El control y tratamiento de residuos líquidos generales tiene lugar en la planta inferior del Centro. Con carácter previo se realiza una separación del 100% de los sólidos conformados presentes en el efluente y el 50% de los sólidos en suspensión.

Posteriormente se trata el efluente mediante una esterilización fisicoquímica en 3 reactores de 3 m³ controlando temperatura, presión y pH.



La temperatura se eleva por encima de 136°C durante un tiempo aproximado de 22 minutos. La fase química se realiza mediante la inyección de peróxido de hidrógeno durante el tratamiento térmico.

Existe un sistema adicional de tratamiento de efluentes en casos de emergencia por tratamiento químico.

- Para el control y tratamiento de sólidos biocontaminados existe un horno crematorio pirolítico, diferentes autoclaves de vapor y la presencia de sistemas de descontaminación química (SAS o Airlocks) a base de peróxido de hidrógeno gas o mediante ducha química superficial

A pesar de todos los recursos tecnológicos y de ingeniería, el buen funcionamiento del área de biocontención se culmina con una correcta actuación del personal trabajador correctamente formado, adoptando de forma obligada medidas de prevención de riesgos laborales

- *Control de entrada y salida del laboratorio*

La entrada al laboratorio está controlada y supervisada rigurosamente. Sin acreditación correspondiente, no está permitido el acceso. Los visitantes han de ir acompañados en todo momento por el personal de Seguridad Biológica.

Una vez dentro es necesario pasar por un vestuario para liberarse de toda la ropa y objetos personales antes de acceder a la zona biocontenida.

El acceso a la zona de Alta Contención Biológica (NCB3), presenta un riesgo especial para los trabajadores por lo que a esta zona sólo puede acceder personal especialmente formado y autorizado para trabajar en estas condiciones. Una serie de vestuarios a la entrada y duchas a la salida aseguran la descontaminación obligatoria del personal.

Cada persona que abandone el laboratorio deberá seguir escrupulosamente unas pautas de descontaminación entre las que se incluyen la obligación de descontaminación por arrastre y dilución gracias a la toma una ducha automática de agua de 3 minutos de duración.

Bajo ningún concepto es posible extraer cualquier objeto de dentro del laboratorio sin la descontaminación pertinente.

- *Cumplimiento de procedimientos de trabajo y seguridad*

Resulta imprescindible por parte de los trabajadores, el cumplimiento de los procedimientos de trabajo (métodos, procedimientos normalizados de trabajo, instrucciones para aseguramiento de calidad, etc.) existentes y por lo tanto la información sobre los riesgos de los productos y operaciones, y las medidas de seguridad y protección a aplicar.

Dentro de ellas, está especialmente controlado el uso obligatorio de equipos de protección individual (EPI), para evitar de forma accidental, inhalaciones, ingestiones, cortes, pinchazos, arañazos, mordeduras o picaduras cuando se enfrentan a situaciones especiales de riesgo biológico.



Para ello el trabajador es formado, informado y acepta dejando constancia documental del cumplimiento de las normas y cuarentenas establecidas (se adjunta formato), destacando:

- Las normas que señalan la protección de las heridas y lesiones de las manos antes de iniciar la actividad laboral.
- Las normas que limitan o prohíben el trabajo directo con animales y/o manejo de equipos contaminados al personal que presenta lesiones cutáneas que no se pueden cubrir.
- La utilización constante de guantes de protección en la manipulación de muestras biológicas, objetos, materia o superficies contaminados con fluidos biológicos, etc.
- La prohibición de comer, beber, fumar, aplicarse cosméticos o llevar lentes de contacto en las áreas de trabajo.
- La obligación del uso de batas de protección, mascarillas y protección ocular (entre otras) en aquellas operaciones que pueden implicar salpicaduras de sangre o fluidos.
- El seguimiento estricto de las instrucciones que contemplan la actuación en caso de accidente o incidente en el que intervenga la presencia de un agente biológico.
- El seguimiento de la situaciones de riesgo adicional que podría suponer a aquellos trabajadores especialmente sensibles (patologías previas, trastornos inmunitarios, embarazo, lactancia, discapacidad, etc.).
- El uso de ropa de trabajo especial como pijamas, camisetas, monos, ropa interior, zuecos o zapatillas, botas, etc.
- El cambio de ropa en los accesos y salidas a la zona de alta seguridad.

De igual manera y en cumplimiento de la legislación vigente, los trabajadores que vayan a desarrollar cualquier actividad en el zona de Contención, se encuentran obligados a recibir formación para el desarrollo de sus tareas que incluyen los siguientes aspectos: agentes biológicos a los que están expuestos y grupo de riesgo al que pertenecen, prácticas de trabajo seguras, características y uso correcto de los equipos de protección individual [R.D. 664/1997].

- *Establecimiento de cuarentenas*

Finalmente y en cumplimiento de la legislación y normativa internacional de la OIE y la FAO, todo trabajador de la zona de Contención está sujeto a cuarentenas especiales entendiendo estas como el espacio de tiempo que transcurre entre el abandono de la zona de Riesgo y todo contacto con animales sensibles de contraer enfermedades desarrolladas en el Centro.

Estas cuarentenas varían entre los 3 y 5 días mínimo.

De igual manera que con los equipos de protección individual, el trabajador deja constancia documental de cumplimiento de esta circunstancia (se adjunta formato).



El box de experimentación donde se va a desarrollar las actividades con OMGs del SARS-CoV 2, además de las medidas reflejadas, ofrece:

- Inactivación de residuos en CSB mediante procedimientos normalizados.
- Inactivación de contenedores en las duchas de box.
- Autoclaves de doble frontera animalario/laboratorios y 2º interior NCB3/ exterior NCB3.
- Validaciones microbiológicas de todos los procesos de biodescontaminación por gas y calor mediante *Geobacillus stearothermophilus* en población de 10^6
- Equipo de 8 personas de técnicos especializados de seguridad biológica.

VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

El CISA está ubicado a 700 m de la localidad de Valdeolmos que presenta una baja densidad de población (< 1.000 habitantes).

No existen próximos, explotaciones ganaderas, cotos, reservas de caza.

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

- El laboratorio está equipado con medios e infraestructura de biocontención superiores a los establecidos para las operaciones confinadas de Tipo 3, en la legislación de aplicación y normativas nacionales e internacionales.
- La Instalación se encuentra validada por empresa externa, inspeccionada y declara como nivel 3 de contención biológica por el Instituto Regional de Seguridad y Salud en el Trabajo de la CAM, auditada interna y externamente en riesgo biológico por empresas ajenas, cualificada anualmente por empresa especializadas en CSB y filtración y verificada por el equipo propio de seguridad biológica periódicamente de forma rutinaria y frente a operaciones de mantenimiento correctivo.
- Se dispone de procedimientos de bioseguridad por actividades tales como, investigadores, animalario, seguridad biológica, mantenimiento, limpieza, vigilancia perimetral y equipo médico, donde se especifican las normas de bioseguridad para descontaminaciones, gestión de residuos, operaciones de mantenimiento correctivo, envíos y recepción de muestras, transporte interior, uso de airlocks y SAS, etc.
- Se dispone de un programa mensual, bimestral, trimestral, cuatrimestral semestral y anual de actuaciones de verificación y seguimiento de instalaciones críticas.
- Se dispone de documentos de control de acciones, trabajos y seguimiento de parámetros de bioseguridad.



- Se dispone de estación informática de control y seguimiento de parámetros esenciales de bioseguridad e infraestructura de mantenimiento redundante (interior NCB3-exterior).
- Se dispone de estación informática de seguimiento de parámetros para tratamiento de efluentes redundante (interior NCB3 y exterior).
- Se dispone de redundancia en suministro eléctrico con dos líneas de alta tensión, dos transformadores de baja autoconmutados, dos grupos electrógenos y dos UPS /SAI.
- Todas las operaciones de mantenimiento preventivo se encuentran verificadas.
- Se realiza tratamiento de residuos “in situ”.
- La instalación dispone de un plan de emergencias de actuación en caso de accidente biológico y plan de evacuación sobre incidentes en incendios, aviso de bomba, accidente biológico, químico y evacuación de accidentados.

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

Clima continental-mediterráneo con primaveras y otoños húmedos e inviernos y veranos secos.

Con 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 desarrollaran en un box de experimentación (nº5) en contención biológica de nivel 3 (NCB3).

Toda la Instalación se encuentra autorizada para trabajos con OMG Tipo 3 (A/ES/00/I-1) con fecha de Resolución de 5 de diciembre de 2000 por la Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental; Subdirección General de Impacto Ambiental y Prevención de Riesgos; Secretaría General del Ministerio de Medio Ambiente (nº registro salida 8443).

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

1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

Las normas básicas de bioseguridad seguir son las recogidas en el Manual de Bioseguridad para trabajos en el animalario con SARS - MERS y Manuel de Procedimientos Generales de Bioseguridad para trabajos con SARS-Cov (se adjuntan).

El personal tiene experiencia en trabajos en box NCB3 y técnicas de laboratorio con la infraestructura específica.



2) Formación del personal adscrito:

El personal actuante ha sido formado antes de iniciar la actividad mediante un curso teórico práctico sobre Bioseguridad en contención 3 en el laboratorio y Animalario específico.

Fueron sometidos a test de comprensión.

El personal recibe un curso de reciclaje en bioseguridad anualmente.

3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

Limpieza: Se dispone de personal entrenado específico de limpieza para áreas NCB3 comunes.

Se dispone de personal entrenado y acreditado en trabajos de animalario.

Se dispone de procedimientos de desinfección, descontaminación y esterilización que son llevados a cabo por personal técnico especializado en bioseguridad (Técnicos Superiores de Laboratorio y Titulados Superiores en Ciencias).

4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:

Llevado a cabo por personal especializado en mantenimiento 24horas / 365 días año.

5) Programas de inspección y control del confinamiento:

Llevado a cabo por técnicos especializados en Seguridad Biológica.

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: **HIBISA**

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

In situ: Sólidos:

Dos ciclos por autoclave de vapor 134°C - 18 minutos

Tratamiento químico superficial por ducha química o gas en SAS o Airlocks



Tratamiento químico por inmersión en Dunk Tank

Líquidos:

Tratamiento termo-químico de efluentes

Aire:

Filtración HEPA H14 simple o doble seriada.

Descontaminación por inyección de gas (formaldehído o peróxido de hidrógeno gas) antes de su retirada de caja.- Sistema adicional bag in – bag out

2º Tratamiento del filtro por autoclave de vapor antes de su salida del NCB3.

Exterior: Una vez tratados “in situ”, retirada de vidrio y en su caso de residuos biosanitarios especiales o clase II por gestor acreditado para tratamiento en incineración o autoclave de vapor.

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

1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Indicadas en Plan de Evacuación

2) Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Reflejados en procedimientos específicos SARS-Cov

Reflejados en Plan de Evacuación

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

Manual de bioseguridad para animalario SARS-Cov;

Plan de Evacuación

Procedimientos de Bioseguridad específicos para SARS-Cov en animalario

4) Planes de emergencia:

Presentado en Protección Civil y expuesto en el acceso a la zona NCB3 para información a personal específico.

Las acciones técnicas son llevadas a cabo por personal CISA-INIA de Dirección, de Seguridad Biológica y de Mantenimiento para control o parada de equipamiento auxiliar (calderas, bombas, equipos de frío o torres de refrigeración, etc.), bajo indicación y supervisión del Jefe de Servicio de Seguridad Biológica.



**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: [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

3) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: [Mariano Esteban Rodríguez / Juan Francisco García Arriaza](#)

NIF: [12.666.094-V / 52951803F](#)

Cargo: [Profesor de Investigación “Ad Honorem” / Investigador Postdoctoral](#)

Tel: [91 5854553 / 91 5854560](#)

Fax: [91 585 45 06](#)

Correo electrónico: mesteban@cnb.csic.es / jfgarcia@cnb.csic.es



4) Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad

Nombre y apellidos: [Gonzalo Pascual Alvarez](#)

NIF: [05251912T](#)

Cargo: [Jefe del Servicio de Seguridad Biológica](#)

Tel: [916202300](#)

Fax: [916202247](#)

Correo electrónico: gpascual@inia.es

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

Nombre y apellidos: [Fernando Usera Mena](#)

NIF: [00694865-N](#)

Cargo: [Responsable del Servicio de Bioseguridad del CNB](#)

Tel: [91 585 45 41](#)

Fax: [91 585 45 06](#)

Correo electrónico: fusera@cnb.csic.es



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:

El objetivo de la actividad es el diseño de vacunas para proteger frente a la infección respiratoria causada por el coronavirus humano SARS-CoV-2-2019. Para ello se realizarán ensayos de inmunogenicidad y protección en ratones susceptibles a la infección viral que mimetizan la enfermedad pulmonar severa observada en humanos. Estos ratones susceptibles están modificados genéticamente para expresar el transgen (tg) que codifica el receptor humano hACE2. La eficacia de los candidatos vacunales se determinará en este modelo animal murino tg-hACE2. Para conseguir estos objetivos, el único modelo experimental que se puede utilizar son animales y particularmente ratones.

El modelo animal consiste en ratones transgénicos B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/J o K18-hACE2 (Stock No: 034860) procedentes de laboratorios Jackson (<https://www.jax.org/strain/034860>), que expresan la proteína ACE2 humana que actúa como receptor de SARS-CoV-1-2002 y SARS-CoV-2-2019, bajo el promotor de citoqueratina 18 (K18) humano, que dirige la expresión del transgen a las vías respiratorias.

Los candidatos vacunales utilizados en los ensayos de inmunogenicidad y protección son virus vaccinia modificado (MVA) que expresan la proteína S del coronavirus SARS-CoV-2, o bien otras proteínas o regiones, como la región RBD de la proteína S o las proteínas E, M o N. Estas construcciones se realizan en las instalaciones ya autorizadas A/ES/03/I-05 y A/ES/18/I-08 del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). La construcción de los candidatos vacunales que expresan S, E o M, ha sido aprobada por la Comisión Nacional de Bioseguridad (Número de Notificación A/ES/20/41). La construcción de los candidatos vacunales que expresan la región RBD de la proteína S o N, se ha notificado el 18 de junio con número de entrada en el registro de la sede electrónica: O00000226e2000010507.

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 asociadas 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.

Virus vaccinia, virus de la vacuna cepa MVA.

Es un virus altamente atenuado procedente de la cepa Ankara que ha sido ensayado en humanos demostrándose su inocuidad, sin efectos alérgicos o tóxicos. No produce propiedades nocivas.

b) Organismo donante.

SARS-CoV-2, género betacoronaviridae, familia Coronaviridae.

Las secuencias de los genes S, E, M y N del SARS-CoV-2 que codifican las proteínas S, E, M y N, respectivamente no produce propiedades nocivas.

c) Inseto.

Las secuencias de los genes S, región RDB (S), E, M y N del SARS-CoV-2 que codifican las proteínas S, E, M y N, respectivamente no produce ninguna propiedad nociva.

d) Vector.

Los vectores plasmídicos utilizados para insertar los genes S, E, M y N del SARS-CoV-2 no producen ninguna propiedad nociva.

e) Organismo modificado genéticamente resultante.

Los virus recombinantes MVA-SARS-CoV-2 generados no producen propiedades nocivas.



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

Los OMG generados [virus recombinantes MVA-SARS-CoV-2] no producen efectos nocivos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.

f) Efectos para el medio ambiente.

Los OMG generados [virus recombinante MVA-SARS-CoV-2] no producen efectos nocivos para el medio ambiente.

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

La generación de los OMG [virus recombinante MVA-SARS-CoV-2] se ha realizado en un Grado de Confinamiento tipo 2. Sin embargo, los estudios “in vivo” en los que se va a utilizar el virus SARS-CoV-2 es necesario un Grado de Confinamiento Tipo 3.

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 un box de experimentación animal dotado de toda la infraestructura científica necesaria (CSB, rack ventilado, ultracongelador, etc.) como para no tener necesidad de llevar a cabo actividades de riesgo fuera del mismo en otra área del espacio NCB3

El OMG estará confinado a este espacio y no saldrá en ningún momento del mismo.

Los animales de experimentación (ratones), se ubicarán en un rack ventilado dotado de las medidas de seguridad convencionales (presión negativa, filtración HEPA, conexión a Grupo electrógeno y UPS).

Toda la actividad y este rack se situará y desarrollará dentro de un box NCB3 que presenta:



- Ubicación en espacio NCB3,
- Acceso al animalario independiente a través de “preroom” de doble puerta con apertura por huella,
- Puertas de acceso a área de box estancas por junta activa (neumáticas),
- Vestuario interior por box limpio –sucio
- Ducha de descontaminación exclusiva por arrastre y dilución (agua)
- Puertas secundarias de acceso a espacio de box estancas por junta estática,
- Cámaras de vigilancia en box y ojo de buey para vigilancia presencial,
- Presión negativa en 30 Pa mínimo respecto a pasillo de animalario y de 45Pa de este respecto a exterior,
- Doble filtración HEPA en aire de extracción,
- Valvulería automática “airtigh” en impulsión,
- Drenajes con conexión directa a líneas de tratamiento de efluentes por sistema termoquímico validado física y microbiológicamente con carácter anual y microbiológicamente con carácter trimestral,
- Seguimiento de parámetros de biocontención de la Instalación NCB3 por control informático duplicado (interior-exterior), dotado de sistemas de alarma con comunicación por in situ y por e mail,
- suministro eléctrico triple (dos líneas de alta tensión, dos centros de transformación (alta-media), dos grupos electrógenos, dos UPS/SAI,
- Presencia de personal de mantenimiento correctivo, preventivo y predictivo, 24 horas día; 365 días /año.

El riesgo de exposición es muy bajo al disponer de rack ventilado para el aislamiento de ratones y Cabina de Seguridad Biológica Clase II A para toma de muestras y manipulación de animales.

La cabina se validará “in situ” anualmente por empresa ajena y se verifica por personal propio de seguridad biológica y el propio

No hay riesgo de contagio por contacto

El riesgo de contaminación indoor out door por estas razones es prácticamente inexistente

El nivel de biocontención aplicado excede en determinados parámetros el exigido por la legislación para las operaciones confinadas de tipo 3.

El servicio de Bioseguridad verifica, vigila y comprueba periódicamente a nivel interno todos los métodos y sistemas de inactivación biológica y esterilización mediante la utilización de microorganismos testigo utilizando diferentes métodos.



Se dispone de procedimientos escritos de bioseguridad para cualquier tipo de operación donde se especifican las normas de bioseguridad, equipos de protección individual necesarios, limpiezas y biodescontaminaciones, cualificaciones y validaciones físicas y microbiológicas, traslado de muestras, envíos y paquetería, accesos de personas, animales y objetos independientes, establecimiento de cuarentenas y gestión de residuos, entre otros

Se imparten cursos específicos para animalario teórico y práctico antes de iniciar la actividad.

Se realizan seminarios periódicos

La instalación completa dispone de un plan de emergencias y evacuación que ha intentado cubrir todos los procedimientos de actuación ante supuestos de incidente, accidente y emergencia.

b) Concentración y escala utilizadas.

Tras la infección de 30 placas de p150 (3×10^7 células CEF por placa) con los virus recombinante MVA-SARS-CoV-2, el virus se purifica y se obtienen alrededor de 2-3 ml de virus purificado, con un título viral aproximado de 10^8 - 10^9 pfu/ml.

En ratones se inoculará $1-2 \times 10^7$ PFU/ratón en un volumen de 100-200 μ l, por vía intraperitoneal o intramuscular. Se inocularán 10 ratones por cada grupo de inmunización. En cada ensayo de protección se utilizarán 60 ratones transgénicos que expresan el receptor humano hACE2.

Para analizar la protección conferida por los candidatos vacunales seleccionados los experimentos se realizarán con 1 grupo de ratones no vacunados y 5 grupos vacunados con los diferentes candidatos vacunales (10 ratones/grupo). Los ratones se inocularán con dos dosis del candidato MVA ($1-2 \times 10^7$ PFU/ratón en un volumen de 100-200 μ l, por vía intraperitoneal o intramuscular). Cada grupo se distribuirá en dos jaulas (5 para analizar los signos clínicos de la enfermedad y 5 para toma de muestras). Posteriormente, los ratones se anestesiarán con isoflurano y se inocularán con una dosis intranasal de 100.000 pfu de SARS-CoV-2 virus en 50 μ l de DMEM. Posteriormente se evaluarán los signos de enfermedad en todos los grupos.

Se utilizarán distintos protocolos de inmunización, distintos vectores de MVA expresando antígenos del SARS-CoV-2, distintas rutas de inoculación y distintos tiempos de recogida, para establecer el procedimiento más óptimo que confiere mayor protección y más duradera frente al SARS-CoV-2.

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):

Los virus recombinantes MVA-SARS-CoV-2 se manejan utilizando la infraestructura de contención del laboratorio NCB2 nº 180 con autorización nº: A/ES/18/I-08.



Se realizan infecciones en líneas celulares permisivas (DF-1, CEF) o no permisivas (HeLa). Las infecciones se realizan siempre en cabinas de seguridad biológica (con filtros HEPA) presentes en el laboratorio NCB2 nº 180. Los cultivos celulares infectados se incuban en un incubador a 37°C. Las infecciones se realizan siguiendo protocolos de infección previamente descritos (Gómez et al., Vaccine, 25(15):2863-85, 2007). Todos los procesos de manipulación se llevarán a cabo en cabina de bioseguridad y usando equipos de protección individual (bata, mascarilla y guantes). Los residuos biosanitarios líquidos se inactivarán con lejía durante 30 minutos. Los residuos biosanitarios sólidos serán posteriormente autoclavados y retirados por una empresa autorizada.

La utilización de ratones K18-hACE2 supondría un riesgo limitado, porque la modificación genética los hace susceptibles a SARS-CoV-2. Sin embargo, consideramos que el riesgo real es poco probable, casi desdeñable, dadas las estrictas medidas de contención en las que se realiza la actividad dentro de la instalación CISA-INIA, que impedirían la liberación estos ratones al 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:

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

El Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA) se encuentra ubicado a 700 metros de la localidad de Valdeolmos.

Valdeolmos presenta una densidad de población escasa (< 1000 habitantes).

Se asienta en una penillanura a una altitud de 685 m sobre el nivel del mar.

Se encuentra rodeado de tierras de cultivo de secano (trigo, centeno, avena) y nos dispone cercana, ninguna explotación ganadera. Es zona CEPA.

Presenta un conjunto de Instalaciones reunidas en un solo edificio subdividido en área administrativa, zona NCB2 y zona NCB3

Actualmente trabajan alrededor de 170 personas en las diferentes áreas.

- b) Condiciones en las que podría producirse un accidente.

Indicadas en el Plan de emergencias y evacuación.



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

Explicados anteriormente y desarrollados en el Plan de emergencias y evacuación y en la parte A (anexo de documentación correspondiente a la solicitud)

- d) Planes de emergencia.

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