



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

Nº de Registro:	Nº de Notificación:
-----------------	---------------------

I. INFORMACIÓN GENERAL

A. Notificador

1) Nombre y titulación del responsable de la notificación:

*Dr. Luis Enjuanes Sánchez
Profesor de Investigación (CSIC). Doctor en Química.*

2) Centro, Institución o Empresa:

*Centro Nacional de Biotecnología (CNB)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)*

3) Domicilio:

*Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)
c/ Darwin 3. Campus de la Universidad Autónoma
28049-Madrid*

4) Persona de contacto:

*Fernando Usera Mena
Responsable del Servicio de Protección Radiológica y Seguridad Biológica*

*Tel: 915854541
Fax: 915854506
Correo electrónico: fusera@cnb.csic.es*



B. Instalación donde se va a desarrollar la operación de utilización confinada (sí previamente ha sido comunicada para este tipo de operaciones):

1) Fecha de comunicación de la notificación relativa a la instalación:

7/03/2001

2) Número de Notificación:

A/ES/00/I-8

C. Información sobre el personal y su formación (Titulación y experiencia en el sector):

1) Responsable de la actividad de utilización confinada objeto de la notificación:

*Dr. Luis Enjuanes Sánchez, jefe del laboratorio 114 del CNB
Profesor de investigación del CSIC, con más de 20 años de experiencia en la investigación sobre coronavirus.*

2) Responsables de la vigilancia y/o control (sólo en el caso que sean diferentes que los notificados para el caso de las instalaciones):

Fernando Usera Mena, Doctor en Ciencias. Científico Titular de Organismos Públicos de Investigación. Responsable del Servicio de Protección Radiológica y Seguridad Biológica del CNB desde 1993.



DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1) Finalidad de la actividad:

Contrucción de un virus recombinante basado en el genoma de un nuevo coronavirus aislado de un paciente de Arabia Saudí (HCoV-SA12-EMC), en el que se ha introducido un marcador genético. Además, se construirán mutantes de delección de este coronavirus, en los que se deleccionarán los genes específicos de grupo 3, 4a, 4b y 5, y el gen estructural E, solos o en distintas combinaciones. El objetivo de construir estos mutantes de delección es estudiar las bases moleculares de la virulencia de este nuevo coronavirus y generar virus atenuados con el objeto de obtener herramientas bioseguras de trabajo y para utilizarlos en vacunas o terapia génica. Estos virus se rescatarán en células de mamífero a partir de cromosomas artificiales de bacterias que codifican los distintos virus.

2) Clasificación de la actividad conforme al artículo 5 y Anexo III de la Directiva 98/81/CE y Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre:

- | | |
|--------|-------------------------------------|
| Tipo 1 | <input type="checkbox"/> |
| Tipo 2 | <input type="checkbox"/> |
| Tipo 3 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Tipo 4 | <input type="checkbox"/> |

II. INFORMACIÓN SOBRE EL ORGANISMO RECEPTOR O PARENTAL DEL CUAL SE DERIVA EL OMG

1) Nombre científico: *Fragmentos sintéticos de cDNA que codifican la secuencia completa del virus HCoV-SA12*

Taxonomía: fragmentos de cDNA de un virus perteneciente a la familia Coronaviridae, genero beta

Nombre común: secuencias sintéticas que codifican el genoma del coronavirus humano responsable de enfermedad respiratoria grave y fallo renal (HCoV-SA12-EMC).

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento:

El cDNA que codifica para el genoma del virus HCoV-SA12-EMC (Ref GenBank JX869059.2) con una mutación silenciosa en el nt 20761 como marcador genético, se generará mediante el clonaje secuencial de 6 fragmentos solapantes obtenidos por síntesis química. Los seis fragmentos solapantes se han sintetizado en la empresa canadiense Bio Basic, Inc. Estos fragmentos se clonarán secuencialmente en un cromosoma artificial de bacterias (BAC), que se utilizará como vector y se amplificará en una cepa de bacterias E. coli no patógena. La última etapa del clonaje y el rescate del



virus se realizará en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica del CNB. Para aislar el cDNA infeccioso, se partirá de cultivos de bacterias E.coli. El BAC se obtendrá mediante la purificación del plásmido utilizando el kit large construct de Qiagen.

La secuencia de dicho BAC y del inserto que codifica para rHCoV-SA12-EMC se adjunta.

El origen y la función específica del inserto presente en el vector (BAC) y que codifica para rHCoV-SA12-EMC es:

Open reading frame	Start nt	Stop nt
<i>ORF1ab</i>	<i>279</i>	<i>21514</i>
<i>ORF2, S</i>	<i>21456</i>	<i>25517</i>
<i>ORF 3</i>	<i>25532</i>	<i>25843</i>
<i>ORF 4a</i>	<i>25852</i>	<i>26181</i>
<i>ORF 4b</i>	<i>26093</i>	<i>26833</i>
<i>ORF 5</i>	<i>26840</i>	<i>27514</i>
<i>ORF 6, E</i>	<i>27590</i>	<i>27838</i>
<i>ORF 7, M</i>	<i>27853</i>	<i>28512</i>
<i>ORF 8a, N</i>	<i>28566</i>	<i>29807</i>
<i>ORF 8b</i>	<i>28762</i>	<i>29100</i>

ORF 1a y 1b codifican la replicasa viral. ORF2, codifica la proteína S. ORF6 codifica la proteína E. ORF7 codifica la proteína M. ORF 8a codifica la proteína N.

Los genes estructurales son S, M, N y E. El gen S codifica las espículas del virus, determinantes del tropismo viral. Los genes M y E están implicados en el ensamblaje y salida del virus. El gen N interacciona con el RNA para formar la nucleocápsida.

Los genes 3, 4a, 4b, 5 y 8b codifican proteínas específicas de grupo. Estas proteínas, en coronavirus, están generalmente implicadas en contrarrestar las defensas del huésped.

El gen estructural E y los genes específicos de grupo 3, 4a, 4b, y 5 se delecionarán con el fin de generar virus atenuados y estudiar el papel de estos genes en la patogénesis del virus.

b) Técnicas de identificación:

El BAC que codifica la secuencia del genoma del virus HCoV-SA12, se identificará mediante patrones de restricción y mediante secuenciación.

c) Marcadores genéticos:

El marcador genético del BAC es la secuencia correspondiente al genoma del virus HCoV-SA12, con la excepción de una mutación puntual introducida en posición 20761, en la que se ha cambiado una T por una C.

d) Marcadores fenotípicos:



El BAC no presenta ningún marcador fenotípico.

El virus recombinante de longitud completa rescatado a partir del BAC producirá efecto citopático en células en cultivo.

No se sabe si los virus recombinantes defectivos en los genes 3, 4a, 4b, 5 y E producirán efecto citopático en células en cultivo. Esto depende de si los genes deletados 3, 4a, 4b, 5 y E son esenciales para el ciclo viral.

e) Estabilidad genética:

La estabilidad genética del cromosoma artificial de bacterias (BAC) que se va a utilizar es alta, en el caso de otros coronavirus como SARS-CoV, el BAC permanece estable en bacterias durante al menos 200 generaciones (Almazán et al. J. Virol. 2006)

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

Ninguna

4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor o parental?

SI NO

Los seis fragmentos que codifican la secuencia de HCoV-SA12 no son patógenos, dado que codifican solo parte de la secuencia. El cromosoma artificial de bacterias que codifica para rHCoV-SA12-EMC, no es patógeno en sí mismo. El virus codificado en él se espera que sí que lo sea porque el virus no recombinante del que procede (HCoV-SA12-EMC) sí que produce fallo respiratorio y renal en humanos.

Además, partiendo del BAC en el que se han clonado las secuencias que codifican el virus de longitud completa, se generarán virus recombinantes basados en HCoV-SA12-EMC defectivos en los genes 3, 4a, 4b, 5 y E aplicables en vacunas y terapia génica.

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:

6) Si el organismo receptor o parental 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.):

Los fragmentos de cDNA sintetizados no son patógenos. El virus rescatado a partir del BAC en el que se han clonado los fragmentos sintetizados, sí que es patógeno, y se ha asimilado al grupo de riesgo 3.

a) ¿De que modo se manifiesta la patogenicidad?



Los seis fragmentos que codifican la secuencia de HCoV-SA12 no son patógenos, dado que codifican solo parte de la secuencia. El cromosoma artificial de bacterias que codifica para rHCoV-SA12-EMC, no es patógeno en sí mismo. El virus codificado en él de longitud completa se espera que sí que lo sea porque el virus no recombinante del que procede (HCoV-SA12-EMC) sí que produce fallo respiratorio y renal en humanos.

Además, partiendo del BAC en el que se han clonado las secuencias que codifican el virus de longitud completa, se generarán virus recombinantes basados en HCoV-SA12-EMC de longitud completa o defectivos en los genes 3, 4a, 4b, 5 y E aplicables en vacunas y terapia génica. El virus de longitud completa produce fallo respiratorio y renal en humanos. Los virus defectivos se espera que estén atenuados con respecto al virus de longitud completa, al igual que pasa con otros coronavirus.

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

SI NO

Porqué:

Los virus defectivos se han generado mediante la delección de secuencias grandes en el genoma. Por ello, estos virus defectivos solo podrían recuperar los genes delecionados mediante recombinación con el virus de longitud completa. Dado que no se prevé realizar coinfecciones de virus defectivos con el virus de longitud completa, la posibilidad de reversión de los virus defectivos es prácticamente nula.

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

Las bacterias E.coli, en las que se propaga el BAC están libres de agentes biológicos contaminantes

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

En nuestro laboratorio y en otros laboratorios, se tiene amplia experiencia con el manejo de BACs, no habiéndose detectado ningún problema de bioseguridad.

- 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?:

Los fragmentos sintetizados y el cromosoma artificial de bacterias (BAC) en el que se clonan los fragmentos sintetizados no son capaces de sobrevivir fuera de las bacterias.



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) virus
 - viii) otros, especifíquese

No aplica

- c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

Los fragmentos sintetizados no sobreviven en el medio ambiente. El cromosoma artificial de bacterias es incapaz de sobrevivir fuera de la bacteria que se ha transformado con el mismo.

- d) Posibles nichos ecológicos:

Los fragmentos sintetizados no se encuentran en la naturaleza. El cromosoma artificial de bacterias tampoco se encuentra en la naturaleza, solo está en el laboratorio dentro de las bacterias del género E. coli.

- e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No aplica

- 10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

Los fragmentos sintetizados y el plásmido que se va a utilizar no se encuentran en el medio ambiente.

- b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

El cromosoma artificial de bacterias no interacciona con otros organismos ya que está confinado a las bacterias que existen en el laboratorio y es poco probable que salga de él ya que es incapaz de propagarse.

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

Los fragmentos sintetizados y el BAC con el que se va a trabajar no se encuentran en la naturaleza ya que han sido generados en el laboratorio.

12) Hábitat natural del organismo:

Los fragmentos sintetizados y el BAC con el que se va a trabajar no se encuentran en la naturaleza ya que han sido generados en el laboratorio.

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: *Fragmentos sintéticos de cDNA que codifican la secuencia completa del virus HCoV-SA12 (el mismo que el organismo receptor o parental).*

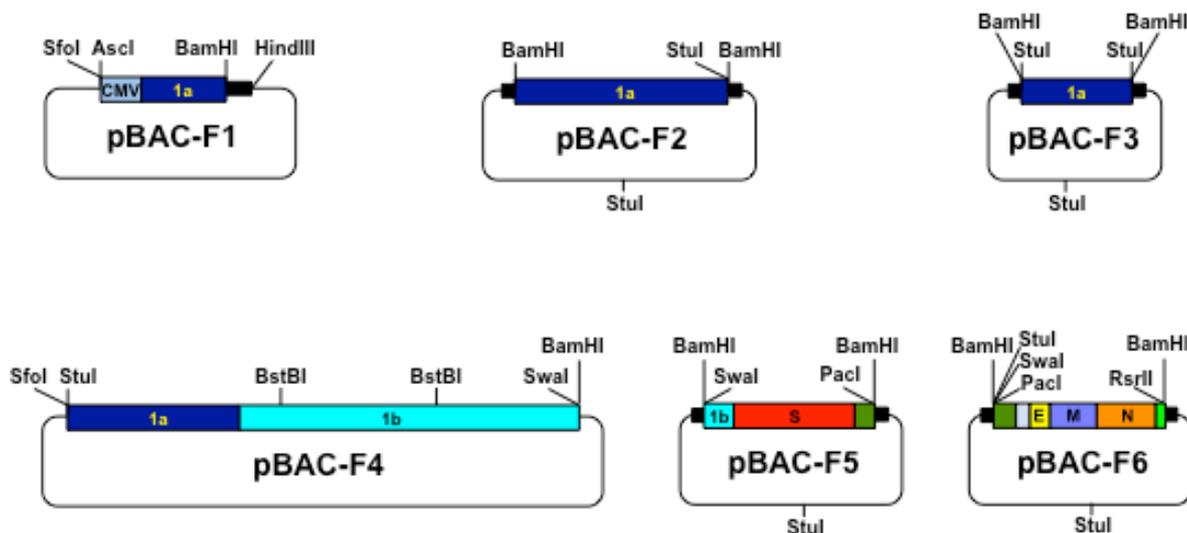
Taxonomía: *fragmentos de cDNA de un virus perteneciente Familia Coronaviridae, género beta.*

Nombre común: *secuencias sintéticas que codifican el genoma del coronavirus humano responsable de enfermedad respiratoria grave y fallo renal (HCoV-SA12-EMC).*

2) Tipo de material genético utilizado para la transformación:

cDNA (DNA complementario) del genoma de HCoV-SA12-EMC, en distintos fragmentos. Estos fragmentos se clonarán en un BAC para obtener el clon infeccioso que codifica el virus completo. Las secuencias de los 6 fragmentos sintetizados químicamente se adjuntan.

El esquema de los 6 fragmentos clonados en BAC, así como los sitios de restricción es:





3) Función prevista del material genético utilizado en la modificación genética:

Los genes estructurales de HCoV-SA12-EMC son los genes S, E, M y N. La función de los productos génicos de estos genes se ha especificado en el apartado correspondiente del organismo receptor.

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

SI NO

Se va a trabajar con DNAs complementarios al genoma de HCoV-SA12-EMC. Estos cDNAs y los productos génicos en ellos codificados no son patógenos. El virus completo del que derivan todos los genes sí es patógeno para seres humanos.

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

- i) seres humanos
- ii) animales
- iii) plantas

b) ¿De que modo se manifiesta la patogenicidad?

El virus HCoV-SA12-EMC causa enfermedad respiratoria grave y fallo renal en humanos.

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

No.

5) ¿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) Delección de material genético
- c) Sustitución de bases
- d) Fusión celular



e) Otros, especifíquese

2) Finalidad de la modificación genética:

Generar un virus recombinante derivado de HCoV-SA12-EMC, con la introducción de un marcador genético.

Generar virus recombinantes basados en HCoV-SA12-EMC defectivos en los genes 3, 4a, 4b, 5 y E aplicables en vacunas y terapia génica. Estudio de genes no estructurales de HCoV-SA12-EMC

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

Para generar el clon infectivo que codifica el virus rHCoV-SA12-EMC, se partirá de fragmentos de cDNA sintetizados químicamente. Estos fragmentos, se insertarán en un BAC disponible en el laboratorio, mediante técnicas de clonaje convencionales.

Partiendo de este BAC que codifica el virus rHCoV-SA12-EMC completo, se delecionarán los genes 3, 4a, 4b, 5 y E 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)

b) Dimensiones del vector (pares de bases):

7 Kb.

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):

Documento adjunto

c) Gama de hospedadores del vector:

Bacterias Escherichia coli.

d) Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización



No presenta.

ii) Si el vector es un bacteriófago, un cósmido o un fásmid, ¿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:

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

El inserto que se va a introducir en el cromosoma artificial de bacterias corresponde a la secuencia completa de HCoV-SA12-EMC con una mutación en posición 20761, como se ha indicado anteriormente. Además, en otros cromosomas artificiales de bacterias se introducirá esta secuencia, con deleciones en las ORFs de los genes 3, 4a, 4b, 5 y E. El mapa de restricción y la secuencia de estos insertos se adjuntan junto con el mapa de restricción y la secuencia de todo el virus.

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

El origen y función de los genes de las diferentes cepas son los mismos para todas las cepas y están detallados en el apartado correspondiente al organismo receptor.

c) Descripción del método utilizado para la transformación:

Los insertos correspondientes a distintos fragmentos de HCoV-SA12-EMC se han obtenido mediante síntesis química. Estos insertos se van a clonar en un BAC utilizando enzimas de restricción específicas para cada inserto.

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

Indicada en el apartado relativo al organismo receptor.

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.

f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?



Sí, la secuencia se adjunta así como la secuencia del virus completo.

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?

Los organismos modificados genéticamente (correspondientes al virus recombinante rHCoV-SA12-EMC completo, o con deleciones en los genes 3, 4a, 4b, 5 y E) son virus recombinantes.

Para obtener estos virus, se utilizará un BAC que codifica el genoma de los distintos virus. Este BAC se transfectará en células de mono Vero y LLC-MK2, de las que se obtendrán los virus recombinantes correspondientes.

En caso afirmativo:

i) Número de copias

El cromosoma artificial de bacterias (BAC) con el que se van a transformar las células está presente en bacterias en 1 o 2 copias por bacteria.

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

Sí.

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?

No

En caso afirmativo:



i) número de copias:
No aplica.

ii) localización cromosómica:
No aplica.

iii) secuencias laterales:
No aplica.

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

c) Si se trata de un virus:

El cromosoma artificial de bacterias que se va a utilizar codifica los virus rHCoV-SA12-EMC completo, o con deleciones en los genes 3, 4a, 4b, 5 y E, por lo que al transfectar células Vero y LLC-MK2, susceptibles a la infección viral, se pueden rescatar los virus recombinantes correspondientes.

- i) Es defectivo
- ii) Es potencialmente inducible

Los virus modificados genéticamente corresponderán al virus de longitud completa y a virus en los que se habrá suprimido la expresión de los genes 3, 4a, 4b, 5 y E. Si alguno de los virus en los que se han delecionado los genes 3, 4a, 4b, 5 o E no son viables, y no se rescatan virus, se generarán células que expresen la proteína correspondiente en trans para rescatar dichos virus.

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

- i) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación)
- ii) Transcripcionales (síntesis de niveles de mRNA)
- iii) Traduccionales (síntesis de niveles de proteínas)

Aportar toda la documentación al respecto.

2) Características genéticas y fenotípicas modificadas del organismo receptor o parental 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:



Con respecto a los plásmidos parental y modificados, no son diferentes en lo que respecta a la capacidad de supervivencia fuera de las condiciones de cultivo, ya que ninguno de los dos es capaz de crecer fuera de ellas.

En cuanto al virus recombinante de longitud completa generado es capaz de sobrevivir en células en cultivo, y también en humanos. Los virus defectivos rescatados, no se sabe si sobrevivirán en cultivos y en humanos, porque no se sabe si los genes delecionados son esenciales para que se complete el ciclo infectivo viral. En caso de que los virus defectivos no sean viables, se generarán líneas celulares que expresen la proteína viral delecionada en trans para rescatar los virus defectivos.

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

Presumiblemente, el virus rescatado de longitud completa se replica en células en cultivo e in vivo, con un ciclo viral de unas 6-8 h, al igual que se ha descrito con otros coronavirus. Los virus defectivos, no se sabe si se replicarán, porque no se ha determinado todavía si los genes delecionados son esenciales para el ciclo infectivo viral.

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

Los virus rescatados no se sacarán fuera del P3, por lo que no tendrán ningún efecto sobre el medio ambiente.

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

Los virus rescatados se crecerán en células en cultivo en presencia de Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), suplementado con un 10% de suero bovino fetal. En caso de que algún virus defectivo no fuera viable, por ser esencial el gen delecionado, se generarán células que expresen la proteína delecionada en trans para rescatar los virus defectivos.

- e) Marcadores específicos del OMG:

El OMG presentará un cambio de nt en posición 20761 con respecto a un virus silvestre HCoV-SA12-EMC. Los virus defectivos, llevarán además, deleciones en los genes 3, 4a, 4b, 5 y E.

- 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 inserto 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 y no se utilizarán en ningún caso para infectar organismos, por lo que la posibilidad de transferencia a otros organismos es prácticamente nula.

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

El virus recombinante rHCoV-SA12-EMC se espera que produzca enfermedad respiratoria grave y fallo renal en humanos de forma idéntica a lo que ocurre con los virus no recombinantes HCoV-SA12-EMC. Los virus defectivos en los genes 3, 4a, 4b, 5 y E previsiblemente estarán atenuados en humanos. De todas formas, todos estos virus estarán confinados dentro del laboratorio de nivel 3 de contención biológica.

6) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados.

a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG.

*Las técnicas que se utilizarán para la identificación de OMG serán:
Microscopía de fluorescencia mediante anticuerpos específicos de diferentes proteínas del virus HCoV-SA12-EMC.
RT-PCR empleando oligonucleótidos complementarios de la secuencia del gen S, E y N del virus HCoV-SA12-EMC.*

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: *100 ml por ensayo con una concentración máxima de 10^8 unidades formadoras de placa virales por ml de cultivo*

b) Cantidad de plantas:

c) Cantidad de animales:

3) Periodo propuesto para la utilización confinada:

Se prevé un periodo de dos 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 HCoV-SA12-EMC que infecte células humanas del tracto respiratorio y renal con objeto de utilizarlo en vacunas o terapia génica. Al dirigirse el vector generado al tracto respiratorio y al riñón se espera que al utilizarlo como vector e introducir en él un gen que codifica un antígeno, se induzca una fuerte respuesta secretora de anticuerpos. En el caso de utilizarlo para terapia génica se espera que al introducir en él un gen terapéutico, tenga el efecto deseado en dicha mucosa.

5) Origen del OMG: indicar si el OMG procede de otro Centro, y si es así, si dicho Centro está registrado conforme a la normativa española y/o europea vigente sobre OMG:

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 aplicable¹ (tipo de transporte, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado).

No aplica

¹ 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 (http://www.adr-digital.com/adr/adr1999/A2C62_MM99.pdf) y principales modificaciones: (ADR) versión 2005, **Clase 6.2 y Clase 9** (http://www.adr-digital.com/adr/adr2005/adr_2005.htm)
- Reglamento (CE) nº 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) nº 1255/97.
- Reglamento (CE) nº 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:
Decisión BS-I/6 (<http://www.biodiv.org/biosafety/cop-mop/result.aspx?id=8288&lg=1>)



- 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 se manejarán en frascos cerrados, en cultivos que implican volúmenes de medio inferiores a 20 mls. 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 1×10^6 y 5×10^7 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. Se utilizarán equipos de protección individual compuestos por un capuz 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 flujo laminar. 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 virus similares (SARS-CoV) a lo largo de más de dos años en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica del Instituto de Salud Carlos III y de seis años en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica del CNB y tienen experiencia suficiente. Han recibido cursos de formación en bioseguridad tanto en el CNB como en el Instituto mencionado. 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 de nivel 3 de contención biológica con rHCoV-SA12-EMC, 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 incluida la información relativa a la gestión de los residuos (tratamiento, forma y destino final):

*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.*

- 9) Resultados previstos:

Se prevé obtener virus recombinantes capaces de infectar el tracto respiratorio y el riñón humano. Además, se obtendrán virus recombinantes defectivos, útiles como herramientas bioseguras y que se podrán utilizar para vacunación y para terapia génica.



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 Seguridad Biológica 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 sublaboratorios 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.

6) Gestión de residuos (describir el sistema utilizado para cada tipo de residuo y quien lo lleva a cabo- contratación de empresa gestora, en su caso):



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.

7) Inactivación de residuos (método, forma final, destino):

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.

X. 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 Protección Radiológica, Seguridad Biológica y Química 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 Seguridad Biológica del CNB.*

- *Cursos y seminarios:*
 - *Seminarios generales sobre normas de seguridad frente a agentes biológicos, químicos y radiactivos impartido por el Servicio de Protección Radiológica y Seguridad Biológica 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 OPERACIONES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE
ORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE (Ver NOTA (1))**

Nº de Registro:	Nº de Notificación:
-----------------	---------------------

A. Notificador

1. Nombre del Centro, Institución o Empresa:

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

2. Domicilio del notificador:

**Centro Nacional de Biotecnología (CSIC).
c/ Darwin 3. Campus Universidad Autónoma
28049-Madrid**

3. Responsable de la actividad de utilización confinada:

**Dr. Luis Enjuanes Sánchez
Profesor de Investigación (CSIC)
Tel: 915854555
Correo electrónico: l.enjuanes@cnb.csic.es**

Firma del notificador:



B. Descripción de la actividad.

1. Objetivo de la actividad:

Se partirá de un cDNA que codifica el genoma completo del virus HCoV-SA12-EMC. En este cDNA se harán deleciones de distintos genes:

- Gen de la envuelta viral E. Es un gen estructural esencial. Su deleción tiene como objetivo obtener un virus defectivo en propagación. Para complementar el gen E delecionado se construirán células empaquetadoras que expresen la proteína E. Para la construcción de estas células se empleará la línea celular Vero.

El objetivo general es la construcción de un vector viral seguro derivado del virus HCoV-SA12-EMC que infecte células humanas con objeto de utilizarlo en vacunas o terapia génica.

- Genes accesorios específicos de grupo 3, 4a, 4b y 5. Se deleccionarán 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 de la deleción de estos genes es la obtención de vectores virales atenuados para utilizarlos en vacunas o terapia génica.

La deleción de genes en los virus recombinantes tiene por objeto generar virus atenuados para emplearlos como herramientas bioseguras de trabajo y para utilizarlos en vacunas o terapia génica.

2. Duración de la actividad:

Se preve un periodo de dos años desde la recepción de la autorización de la actividad confinada.



Evaluación de riesgo (Ver NOTA (2))

1. Identificación de las propiedades nocivas del OMG, en función de las características del: (Ver NOTA (3))

1.1. Organismo receptor.

El organismo receptor consiste en seis fragmentos sintéticos de cDNA que codifican la secuencia completa del virus HCoV-SA12, perteneciente a la familia Coronaviridae, genero beta.

El cDNA que codifica el genoma del virus HCoV-SA12-EMC (Ref GenBank JX869059.2) con una mutación silenciosa en el nt 20761 como marcador genético, se generará mediante el clonaje secuencial de 6 fragmentos solapantes obtenidos por síntesis química. Estos fragmentos se han sintetizado en la empresa canadiense Bio Basic, Inc. Los fragmentos se clonarán secuencialmente en un cromosoma artificial de bacterias (BAC), que se utilizará como vector y se amplificará en una cepa de bacterias E.coli no patógena. La última etapa del clonaje y el rescate del virus a partir del cDNA infectivo se realizará en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica del CNB. Para aislar el cDNA infectivo, se partirá de cultivos de bacterias E.coli. El BAC se obtendrá mediante la purificación del plásmido utilizando el kit large construct de Qiagen.

La secuencia de dicho BAC y del inserto que codifica para rHCoV-SA12-EMC se adjunta.

Open reading frame	Start nt	Stop nt
<i>ORF1ab</i>	279	21514
<i>ORF2, S</i>	21456	25517
<i>ORF 3</i>	25532	25843
<i>ORF 4a</i>	25852	26181
<i>ORF 4b</i>	26093	26833
<i>ORF 5</i>	26840	27514
<i>ORF 6, E</i>	27590	27838
<i>ORF 7, M</i>	27853	28512
<i>ORF 8a, N</i>	28566	29807
<i>ORF 8b</i>	28762	29100

ORF 1a y 1b codifican la replicasa viral. ORF2, codifica la proteína S. ORF6 codifica la proteína E. ORF7 codifica la proteína M. ORF 8a codifica la proteína N.

Los genes estructurales son S, M, N y E. El gen S codifica las espículas del virus, determinantes del tropismo viral. Los genes M y E están implicados en el ensamblaje y salida del virus. El gen N interacciona con el RNA para formar la nucleocápsida.

Los genes 3, 4a, 4b, 5 y 8b codifican proteínas específicas de grupo. Estas proteínas, en coronavirus, están generalmente implicadas en contrarrestar las defensas del huésped.

El gen estructural E y los genes específicos de grupo 3, 4a, 4b, y 5 se delecionarán con el fin de generar virus atenuados y estudiar el papel de estos genes en la patogénesis del virus.



- *Naturaleza de la patogenicidad, virulencia, infecciosidad, alergenicidad, toxicidad y vectores de transmisión de enfermedades:*

Los seis fragmentos que codifican la secuencia de HCoV-SA12 no son patógenos, dado que codifican solo parte de la secuencia viral. El cromosoma artificial de bacterias en el que se clonará el cDNA que codifica el genoma del virus recombinante rHCoV-SA12-EMC, no es patógeno en sí mismo. El virus codificado en él se espera que sí lo sea porque el virus no recombinante del que procede (HCoV-SA12-EMC) sí que produce fallo respiratorio y renal en humanos. El virus patógeno que se rescatará a partir del cDNA infectivo se clasifica como nivel 3.

Además, partiendo del BAC en el que se han clonado las secuencias que codifican el virus de longitud completa, se generarán virus recombinantes basados en HCoV-SA12-EMC defectivos en los genes 3, 4a, 4b, 5 y E aplicables en vacunas y terapia génica.

No se han descrito casos de alergenicidad y toxicidad.

No se conocen vectores de transmisión de la enfermedad tales como artrópodos.

- *Naturaleza de los vectores autóctonos y los agentes adventicios en los casos en que puedan movilizar el material genético insertado, y frecuencia de movilización:*

No aplica

- *Naturaleza y estabilidad de las mutaciones inactivadoras, si se producen:*

El organismo receptor no tiene mutaciones inactivadoras. Contiene una mutación silenciosa en el nt 20761 como marcador genético. Utilizando el BAC en el que se ha clonado el cDNA del virus rHCoV-SA12-EMC, se generarán virus recombinantes defectivos en el gen estructural E (HCoV-SA12-EMC- Δ E) y en los genes 3, 4a, 4b y 5. Presumiblemente, estos virus estarán atenuados con respecto al virus de longitud completa, al igual que pasa en otros coronavirus

- *Toda modificación genética previa:*

No existen modificaciones genéticas previas.

- *Gama de hospedadores (si procede):*

*Los fragmentos de cDNA sintetizados no son patógenos. Una vez clonados en el cromosoma artificial de bacterias, el hospedador de este BAC es la bacteria *E. coli*, no patógena. El virus rescatado a partir del BAC en el que se han clonado los fragmentos sintetizados, sí que podría infectar humanos.*

- *Todo rasgo fisiológico significativo que pueda alterarse en el MMG final y, si procede, su estabilidad:*

Ninguno.

- *Hábitat natural y distribución geográfica:*

Los fragmentos de cDNA que constituyen el organismo receptor no existen en la naturaleza, ya que se han generado por síntesis química. El hábitat natural del virus cuyo genoma codifican los fragmentos de cDNA, HCoV-SA12-EMC silvestre, sin modificaciones, son los seres humanos. La transmisión del virus silvestre entre seres humanos no parece muy eficiente, dado que el personal sanitario que atendió a los pacientes infectados no mostró ningún síntoma de la enfermedad. Se ha postulado que los casos detectados



procederían de eventos de transmisión zoonótica aislados desde murciélagos (donde se han aislado virus filogenéticamente muy próximos a HCoV-SA12-EMC) u otro animal hospedador que actuaría como reservorio en la naturaleza (Zaki AM et al. 2012, N Engl J Med Oct 17).

- *Participación significativa en procesos ambientales (Fijación del nitrógeno, regulación del pH., etc):*

Los fragmentos de cDNA que codifican el genoma del virus HCoV-SA12-EMC no tienen efecto sobre el medio ambiente porque no se encuentran en él.

- *Interacción con otros organismos del entorno y efectos sobre éstos (incluyendo las probables propiedades competitivas, patogénicas o simbióticas):*

Los fragmentos de cDNA que codifican el genoma del virus HCoV-SA12-EMC no se encuentran en la naturaleza, por lo que no interaccionan con otros organismos del entorno.

- *Capacidad de formar estructuras de supervivencia (como esporas o esclerocios):*

Los fragmentos sintetizados y el cromosoma artificial de bacterias (BAC) en el que se clonan no forman estructuras de resistencia ni son capaces de sobrevivir fuera de las bacterias.

1.2. Organismo donante.

Fragmentos sintéticos de cDNA que codifican la secuencia completa del virus HCoV-SA12 (el mismo que el organismo receptor o parental).

El coronavirus humano HCoV-SA12-EMC se aisló de pacientes, en los que causa un síndrome respiratorio agudo severo y fallo renal. Se partirá de un cDNA que codifica el genoma completo de este virus y a partir de él se delecionará el gen esencial E y los genes accesorios 3, 4a, 4b, y 5.

- *Naturaleza de la patogenicidad, virulencia, infecciosidad, toxicidad y vectores de transmisión de enfermedades:*

Los fragmentos de cDNA sintéticos que codifican el genoma del virus HCoV-SA12 no son patógenos. Los productos génicos codificados en los fragmentos de cDNA no son patógenos. El cromosoma artificial de bacterias (BAC) en el que se han clonado los fragmentos no es patógeno. Se va a trabajar con este BAC y solo ocasionalmente con el virus en él codificado.

El HCoV-SA12 es un patógeno humano que causa un síndrome respiratorio agudo severo y fallo renal. No se ha descrito que pueda infectar a plantas.

Además, los datos epidemiológicos disponibles indican que la transmisión del virus silvestre entre seres humanos no es muy eficiente (Zaki AM et al. 2012, N Engl J Med Oct 17).

Este virus se ha asimilado al Grupo 3 de riesgo.

Respecto a la virulencia, se han descrito 4 casos en pacientes en Arabia Saudí. Dos de ellos han fallecido, otra persona se encuentra hospitalizada (Al-Ahdal MN et al. 2012, J Infect Dev Ctries 6: 692-694) y la cuarta persona se ha recuperado de la enfermedad (C.Drosten, comunicación personal).

No se conocen efectos alérgicos y tóxicos.

No se han descrito vectores que transmitan la enfermedad tales como artrópodos.

- *Naturaleza de los vectores autóctonos:*

- ✓ *Secuencia: No aplica*
- ✓ *Frecuencia de movilización y especificidad: No aplica*
- ✓ *Presencia de genes que confieren resistencia a las sustancias antimicrobianas, incluidos los antibióticos: No aplica*

- *Gama de hospedadores: el virus silvestre HCoV-SA12 cuyo genoma codifican los fragmentos de cDNA infecta la especie humana, en concreto el tracto respiratorio y el riñón.*

- *Otros rasgos fisiológicos pertinentes:*

1.3. Inserto.

- *Identidad y función específicas del inserto (genes):*

El inserto que se pretende introducir en el cromosoma artificial de bacterias corresponde al DNA complementario (cDNA) de la cepa EMC de HCoV-SA12, dividido en seis fragmentos obtenidos por síntesis química. Las secuencias de los 6 fragmentos sintetizados químicamente se adjuntan.

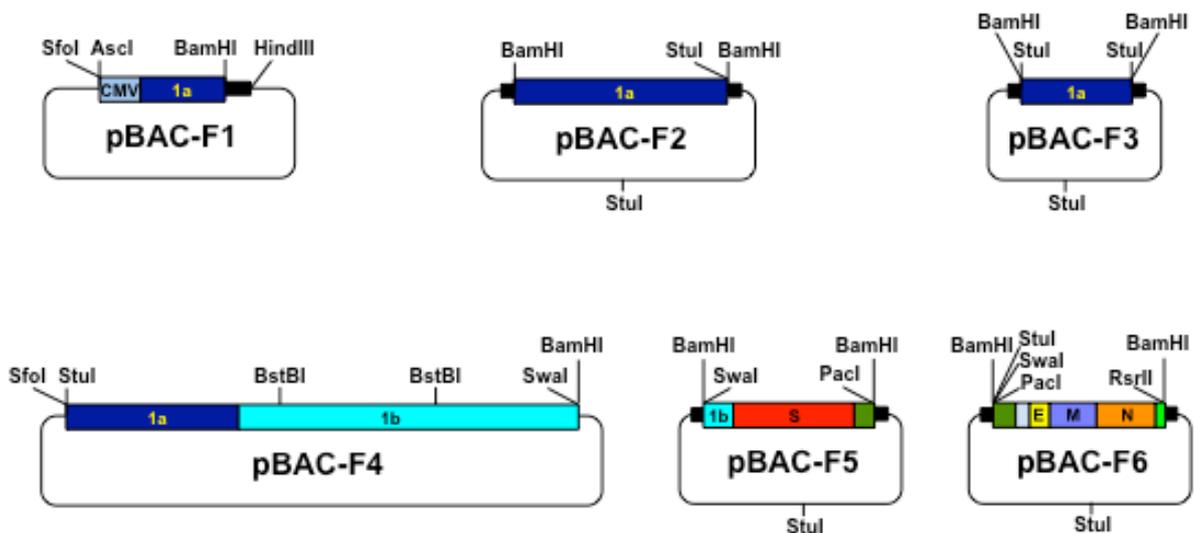
La función de los productos de los genes codificados en el cDNA es:

El gen de la replicasa codifica los componentes del complejo de replicación-transcripción del virus.

El gen S codifica las espículas del virus, determinantes del tropismo viral. Los genes M y E están implicados en el ensamblaje y salida del virus. La delección del gen E en el virus recombinante rHCoV-SA12-EMC-ΔE, hace que el virus rescatado sea defectivo en propagación. El gen N interacciona con el RNA para formar la nucleocápsida.

Los genes 3, 4a, 4b y 5 son accesorios y su función precisa es todavía desconocida, si bien en otros coronavirus suelen estar implicados en contrarrestar las defensas del hospedador.

El esquema de los 6 fragmentos clonados en BAC, así como los sitios de restricción es:



- *Nivel de expresión del material genético insertado:*

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 EMC de HCoV-SA12.

- *Fuente del material genético e identidad del organismo u organismos donantes y características, si procede:*

El material genético que se clonará en el BAC corresponde a seis fragmentos de DNA complementario que codifican, en conjunto, el genoma del coronavirus HCoV-SA12 cepa EMC. La secuencia de este virus está incluida en el GenBank con Ref JX869059.2. Los seis fragmentos de cDNA han sido sintetizados químicamente por la empresa canadiense (Bio Basic Inc.) e incluyen una mutación silenciosa en el nt 20761 como marcador genético.

- *Historia de las modificaciones genéticas previas, si procede:*

La inserción de genes estructurales y accesorios del coronavirus HCoV-SA12 cepa EMC se va a realizar en un cromosoma artificial de bacterias.

- *Situación del material genético insertado (posibilidad de activación o desactivación de los genes del hospedador debido a la inserción):*

El plásmido pBAC-HCoV-SA12-EMC no se integra en el cromosoma del huésped, por lo que no se preve que se produzca inactivación o activación de ningún gen del hospedador, aunque sí se podría producir alguna variación en la expresión de algunos genes del hospedador como consecuencia de la expresión de los genes del virus, aspecto que se va a estudiar previamente en animales de experimentación.

1.4. Vector.

No se van a utilizar vectores intermediarios ya que los genes estructurales y accesorios del virus se van a obtener mediante síntesis química y llevarán en sus extremos las dianas de enzimas de restricción que permitan insertar los genes en el plásmido pBAC directamente, como se muestra en la figura del apartado 1.3.

- *Naturaleza y fuente del vector: No aplica*
- *Estructura y cantidad de todo ácido nucleico del vector y/o donante que quede en la construcción final del microorganismo modificado: No aplica*
- *Si está presente en el MMG final, frecuencia de movilización del vector insertado y/o capacidad de transferencia de material genético: No aplica*

1.5. Organismo modificado genéticamente resultante.

1.5.1 Efectos para la salud humana.

- *Efectos tóxicos o alergénicos previstos del MMG y/o sus productos metabólicos: El organismo modificado genéticamente consiste en virus recombinantes derivados de HCoV-SA12-EMC de longitud completa o virus en los que se delecionarán individualmente o en combinación los genes 3, 4a, 4b, 5 y E. El virus completo causa fallo respiratorio y fallo renal en humanos. No se preve que los virus resultantes tengan efectos tóxicos o alergénicos sobre el hospedador, ya que son virus defectivos mediante la eliminación de genes esenciales. Estos virus defectivos serán aplicables en vacunas y terapia génica.*



- *Comparación de la patogenicidad del microorganismo modificado con la del receptor o (en su caso) del organismo parental:*

La patogenicidad del virus recombinante con el gen esencial E deletado HCoV-SA12-EMC-ΔE será previsiblemente menor que la del virus completo, de acuerdo con lo observado en otros coronavirus. Se prevé que los virus recombinantes con otros genes deletados podrían estar atenuados con respecto al organismo donante HCoV-SA12-EMC.

- *Capacidad de colonización prevista:*

El virus rescatado no tiene capacidad de propagarse por el medio ambiente, por lo que solo se encontrará y colonizará los seres humanos en los que se haya introducido deliberadamente.

- *Si el microorganismo es patógeno para personas inmunocompetentes:
El virus rescatado defectivo en el gen E no es patógeno por ser defectivo.*

- *Enfermedades causadas y mecanismos de transmisión, incluidas la capacidad de invasión y la virulencia:*

✓ *Dosis infecciosa:*

✓ *Posible alteración de la ruta de infección o de la especificidad tisular: ninguna*

✓ *Posibilidad de supervivencia fuera del hospedador humano: El virus no puede propagarse fuera del hospedador humano ya que se le ha deletado un gen esencial.*

✓ *Estabilidad biológica:*

1.5.2 Efectos para el medio ambiente.

- *Ecosistemas a los que el microorganismo podría pasar accidentalmente a partir de la utilización confinada:*

Los virus generados en ningún caso se sacarán del P3 por lo que no se propagarán al medio ambiente.

- *Supervivencia, multiplicación y grado de diseminación previstos para el microorganismo modificado en los ecosistemas correspondientes:*

El virus defectivo es casi imposible que se propague, puesto que al haberse deletado el gen E, gen esencial, 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.

- *Resultados previstos para la interacción entre el microorganismo modificado y los organismos o microorganismos que pudieran verse expuestos en caso de liberación accidental al entorno:*

En caso de que se liberaran al entorno, no se producirían interacciones, ya que la cantidad de virus que entraría en los organismos sería insuficiente para interaccionar



significativamente con los mismos.

- *Efectos conocidos o previstos sobre plantas y animales como, por ejemplo, patogenicidad, toxicidad, alergenicidad, vector de patógenos, pautas alteradas de resistencia a los antibióticos, alteraciones de tropismos o especificidad de hospedador, y colonización:*

El virus completo causa fallo respiratorio y fallo renal en humanos. Los virus defectivos en los genes 3, 4a, 4b y 5 presumiblemente estarán atenuados con respecto al virus de longitud completa, al igual que pasa con otros coronavirus. Todos estos virus no serán patógenos para plantas, porque no pueden entrar en ellas al no tener estas los receptores apropiados.

- *Implicaciones conocidas o previstas en procesos biogeoquímicos:
No se preven*

Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente: (Ver NOTA (4))

- | | |
|--------|-------------------------------------|
| Tipo 1 | <input type="checkbox"/> |
| Tipo 2 | <input type="checkbox"/> |
| Tipo 3 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Tipo 4 | <input type="checkbox"/> |

2. Probabilidad de que se produzcan efectos nocivos y gravedad de los mismos, en función de: (Ver NOTA (5))

3.1. Características de la actividad (medidas de confinamiento y control, y exposición humana y ambiental).

La actividad se va a llevar a cabo en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica, por lo que el organismo modificado estará confinado a este espacio y no saldrá en ningún momento del mismo.

3.2. Concentración y escala utilizadas.

3.3. 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 virus defectivos producidos a partir del pBAC-HCoV-SA12-ΔE se realizará en células Vero empaquetadoras reduciendo así la capacidad de colonizar los organismos y medio ambiente. Los experimentos se realizarán en el laboratorio de contención biológica de nivel 3, por lo que el personal y el entorno expuestos se reducen al máximo.

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: (Ver NOTA (6))

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

4) *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 son validados por esta empresa u otras anualmente o tras averías. Igualmente, el servicio de Seguridad Biológica valida 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 situado 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.

5) *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.

6) *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 sublaboratorios 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

5.2. 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.

5.3. Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales.

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

5.4. Planes de emergencia.

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



NOTAS al Modelo de Evaluación de riesgo de operaciones de utilización confinada de organismos modificados genéticamente

- (1) Para la elaboración de la evaluación de riesgo de la actividad propuesta se tendrá en cuenta toda la información suministrada, en su caso, en el formulario relativo a la Notificación de Operaciones con organismo modificados genéticamente (Parte A), así como el relativo a la Notificación de Instalaciones donde se realizan operaciones con organismos modificados genéticamente (Parte B).
- (2) Para llevar a cabo dicha evaluación se tendrá en cuenta el procedimiento establecido en el Anexo III de la Directiva 98/81/CE, de 26 de octubre de 1998 y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las notas de orientación para la evaluación de riesgo descrita en el Anexo III de la Directiva 98/81/CE.
- (3) Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.
- (4) Para establecer esta primera valoración se tendrá en cuenta lo dispuesto en el artículo 5.3 de la Directiva 98/81/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).
- (5) Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.
- (6) Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.