



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

**Nº de Notificación:**

**I. INFORMACIÓN GENERAL**

1) Responsables de la actividad

a) Entidad

Nombre: Universidad de Zaragoza

Dirección postal: Pedro Cerbuna, 12. Campus San Francisco, 50009 ZARAGOZA

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Rosa Bolea Bailo

NIF: 72964847S

Cargo: Vicerrectora de Política científica en funciones

Tel: 976 761759

Fax:

Correo electrónico: [vrinves@unizar.es](mailto:vrinves@unizar.es)

3) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Juan Jose Badiola, Diez, Carlos Martín Montañés, y Julián Pardo Jimeno

NIF: 30040626G, 17866278Q y 25469556T

Cargo: Profesor e investigadores de la UNIZAR

Tel: 976 76 17 59

Correo electrónico: [carlos@unizar.es](mailto:carlos@unizar.es), [pardojim@unizar.es](mailto:pardojim@unizar.es)

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

Nombre y apellidos: Rosa Bolea Bailo

NIF: 72964847S

Cargo: Vicerrectora Política científica

Tel:

Fax:

Correo electrónico: [vrinves@unizar.es](mailto:vrinves@unizar.es)

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

los tres



- 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 especificando<sup>1</sup>:

RTI2018-097625-B-I00: Estudio inmunidad innata entrenada conferida por las vacunas vivas atenuadas, BCG y MTBVAC y su aplicación para el uso terapéutico en enfermedades con componente inmunológico. Agencia estatal de investigación; fondos FEDER. IPs Carlos Martín /Juan Ignacio Aguiló. (Universidad de Zaragoza). 01/01/2019- 31/12/2022.

SAF2017-83120-C2-1-R Granzimas extracelulares en inflamación, autoinmunidad e inmunoterapia de cáncer: Detección de formas activas, mecanismos de acción, inhibición y valor pronóstico. Agencia estatal de investigación; fondos FEDER. IP Julián Pardo (Universidad de Zaragoza).

- 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*)

Los experimentos en ratones se llevarán a cabo en la siguiente instalación.

- a) Fecha de comunicación / autorización de la instalación: CIOMG 14.09.16  
b) Número de referencia del expediente: A/ES/16/I-24

## II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

Finalidad de la actividad:

Estudio de la actividad profiláctica no específica (inmunidad entrenada) inducida por las vacunas vivas atenuadas contra la tuberculosis BCG y MTBVAC contra rSARS-CoV-2-M10<sup>1</sup> adaptada a ratón, en los modelos de ratón Balb/c, y C57Bl/6 utilizando diferentes vías de administración. Se estudiará el mecanismo inmunológico frente a la infección “in vivo” utilizando ratones wt o deficientes en perforina, gzmA, gzmB o gzmK.

El estudio se realizará en el laboratorio de la Universidad de Zaragoza en colaboración con el equipo del Profesor Volker Thiel que adaptó la cepa de SARS-CoV-2 a infección en ratón.

---

<sup>1</sup>TASAS

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.



Los objetivos concretos de la presente propuesta son:

- Establecer el modelo de infección con una cepa de SARS-CoV-2 adaptada a ratón (SARS-CoV-2-MA10).
- Analizar la eficacia de la vacunación con MTBVAC en comparación con BCG, en ratones wt Balb/c y C57Bl/6 frente a la infección por SARS-CoV-2-MA10.
- Analizar el curso de la infección con las cepas adaptadas a ratón en ratones wt o deficientes en perforina, *gzmA*, *gzmB* o *gzmK* vacunados o no con BCG y MTBVAC. Replicación viral, inflamación y mortalidad/morbilidad.
- Analizar el efecto de inhibidores de TRAIL, FasL, TNFa, IL6, *gzmA*, *gzmB* o *gzmK* sobre el curso de la infección con la cepa adaptada a ratón en ratones wt vacunados o no con BCG y MTBVAC.
- Analizar el efecto de nanobodies neutralizantes frente a Spike.

Respecto al estudio de la eficacia de las vacunas MTBVAC y BCG para proteger frente a la enfermedad causada por el coronavirus SARS-CoV-2 y su mecanismo de acción. Para ello se realizarán ensayos de patogenicidad y protección en ratones convencionales Balb/c, y C57Bl/6 frente a la infección con la cepa adaptada a ratón rSARS-CoV-2-MA10, desarrollada en el laboratorio del Profesor Volker Thiel utilizando como base una versión recombinante del virus rSARS-CoV-2<sup>17</sup>. Los ratones Balb/c, y C57Bl/6 son susceptibles a la infección viral, y mimetizan la enfermedad pulmonar severa observada en humanos, causando patología y una alta letalidad. Con el fin de analizar la respuesta inmunológica frente a la infección, así como su implicación en los mecanismos de protección activados por las vacunas MTBVAC y BCG, también se utilizarán ratones deficientes en perforina, granzima A o granzima B, inhibidores de estas proteínas y anticuerpos para eliminar poblaciones celulares específicas como T CD4/CD8 o NK. Los virus utilizados en los ensayos de patogenicidad y protección son virus recombinantes basados en el genoma del coronavirus SARS-CoV-2 aislado en 2020<sup>1</sup> de pacientes COVID19 de China. La construcción de estos recombinantes, se realizó en las instalaciones correspondientes de la Universidad de Berna.

Antecedentes: La actual vacuna contra la tuberculosis (TB), BCG es usada de forma universal en países con una incidencia media alta de la enfermedad, siendo su cobertura cercana al 90%, aunque su protección contra las formas respiratorias de la TB es baja. Numerosos estudios indican que BCG tiene efectos beneficiosos adicionales a los que confiere su protección específica contra la TB induciendo protección contra otros patógenos, al igual que otras vacunas vivas atenuadas en uso. Los efectos beneficiosos no específicos de BCG se han atribuido a la capacidad de la vacuna para reprogramar funcional y epigenéticamente las células inmunes innatas, como los monocitos, los macrófagos y las células NK, un proceso denominado "inmunidad entrenada". En los monocitos humanos, la inmunidad entrenada inducida por BCG activa vías metabólicas, que están reguladas por mecanismos epigenéticos a nivel de la organización de la cromatina aumentando la expresión de citoquinas relacionadas con la respuesta inmunitaria celular del huésped.



Dada la baja protección de BCG contra las formas respiratorias de TB, desde hace más de 20 años nuestros equipos españoles trabajan en una nueva vacuna viva atenuada denominada MTBVAC. Esta nueva vacuna MTBVAC ha sido construida racionalmente atenuando un aislado clínico de *M. tuberculosis*, a diferencia con la actual vacuna BCG derivada de una cepa de *Mycobacterium bovis*, causante de TB en animales. MTBVAC contiene todos los genes presentes en las cepas que infectan a humanos, incluidos los genes ausentes de la actual vacuna BCG. MTBVAC contiene dos mutaciones de delección estables independientes en los genes de virulencia *phoP* y *fadD26*, cumpliendo los requisitos del consenso de Ginebra para el avance de las vacunas vivas atenuadas de TB a ensayos clínicos.

Los estudios de seguridad de MTBVAC en adultos y en bebés muestran unos perfiles de seguridad de MTBVAC similares a los de BCG, una inmunidad dosis dependiente y mayor inmunidad al estímulo con antígenos de TB para MTBVAC que BCG en los bebés. Actualmente están finalizando dos estudios de Fase 2a para la definición de dosis en adultos (NCT02933281) y en recién nacidos (NCT03536117) en Sudáfrica. Nuestros estudios recientes en colaboración con el equipo del Profesor Netea de la Universidad de Radboud en Nimega, Holanda, muestran que MTBVAC en células mieloides primarias humanas es capaz de inducir inmunidad entrenada no específica a través de cambios epigenéticos que conllevan el aumento de la metilación de histonas en los promotores de genes de citoquinas proinflamatorias comparables a los producidos por BCG. MTBVAC confiere una inmunidad innata similar a la proporcionada por BCG, y en colaboración con el Dr. Yuste del Centro Nacional de Majadahonda del Instituto de Salud Carlos III, hemos demostrado que MTBVAC muestra una mejor protección en un modelo experimental de neumonía por *Streptococcus pneumoniae*.

Respecto a los mecanismos inmunológicos responsables del posible efecto beneficioso de estas vacunas sobre el sistema inmune innato y adaptativo, todavía se desconoce el papel de las células del sistema inmune innato, en especial de las células NK y su relación con una activación posterior de la respuesta de células T CD4 o CD8. En este contexto resulta de especial relevancia el estudio del sistema perforina/granzimas y los ligandos mortales (FasL, TNFa, TRAIL), dado que son los mediadores principales de las células NK, responsables de la eliminación de células infectadas y más recientemente, también de la activación de procesos inflamatorios. Precisamente el estudio de del sistema perforina/granzimas durante enfermedades infecciosas e inflamatorias ha sido la principal línea de investigación del equipo de Julian Pardo en la Universidad de Zaragoza durante casi 20 años. En concreto se ha observado que la ausencia de granzima B o perforina<sup>14</sup> afecta al control de infecciones intracelulares mientras que la ausencia de granzima A protege de la patología inflamatoria asociada a infecciones como la sepsis. Teniendo en cuenta estas bases se espera que la ausencia de células NK o de perforina o granzima B reduzca la eficacia de la vacuna, mientras que la ausencia de granzima A (o su inhibición) podría tener un efecto beneficioso dado que reduciría la patología inflamatoria asociada a COVID19

## Referencias



1. Thao et al. Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. Nature . 2020 Jun;582(7813):561-565. doi: 10.1038/s41586-020-2294-9. Epub 2020 May 4.
2. WHO. Global Tuberculosis Report 2019. 1–297 (2019).
3. Kleinnijenhuis, J. J. *et al.* Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. Proc Natl Acad Sci USA 109, 17537–17542 (2012).
4. Benn et al A small jab - a big effect: nonspecific immunomodulation by vaccines. Trends in Immunology 34, 431–439 (2013).
5. Netea, M. G. *et al.* Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. Science 352, aaf1098–aaf1098 (2016).
6. Netea, M. G. *et al.* Defining trained immunity and its role in health and disease. Nature Reviews Immunology 173, 89 (2020).
7. Aguilo, N et al Reactogenicity to major tuberculosis antigens absent in BCG is linked to improved protection against *Mycobacterium tuberculosis*. Nature Communications 2017, 8, 16085.
8. Arbués, A *et al* Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials. Vaccine 2013, 31, 4867–4873.
9. Spertini, F. *et al.* Safety of human immunisation with a live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine: a randomised, double-blind, controlled phase I trial. The Lancet Respiratory Medicine 3, 953–962 (2015).
10. Tameris, M. *et al.* Live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine MTBVAC versus BCG in adults and neonates: a randomised controlled, double-blind dose-escalation trial. The Lancet Respiratory Medicine 1–14 (2019). doi:10.1016/S2213-2600(19)30251-6.
11. Tarancón, R.; Domínguez-Andrés, J.; Uranga, S.; Ferreira, A. V.; Groh, L. A.; Domenech, M.; González-Camacho, F.; Riksen, N. P.; Aguilo, N.; Yuste, J.; Martín, C.; Netea, M. G. New live attenuated tuberculosis vaccine MTBVAC induces trained immunity and confers protection against experimental lethal pneumonia. PLoS Pathog 2020, 16, e1008404.
12. Martínez-Lostao, L, Anel, A and Pardo, J. How do cytotoxic lymphocytes kill cancer cells? Clinical Cancer Research 2015, 21; 5047
13. Arias MA, Martínez-Lostao, L, Santiago L, Ferrandez, A, Granville, D and Pardo, J. The Untold Story of Granzymes in Onco-Immunology: novel opportunities with old acquaintances. Trends in Cancer, 2017, (6):407-422
14. Arias MA, Jiménez de Bagües MP, Aguilo N, Menao S, Hervás-Stubbs S, de Martino A, Alcaraz A, Simon MM, Froelich CJ and Pardo, J. Elucidating Sources and Roles of Granzymes A and B during Bacterial Infection and Sepsis. Cell Reports , 2014, 8, 420–42
15. Garzón-Tituaña M, Arias MA, Sierra-Monzón JL, Morte-Romea E, Santiago L, Ramirez-Labrada A, Martínez-Lostao L, Paño-Pardo JR, Galvez EM, Pardo J. The Multifaceted Function of Granzymes in Sepsis: Some Facts and a Lot to Discover. Front Immunol. 2020 Jun 17;11:1054.
16. Santiago L, Castro M, Sanz-Pamplona R, Garzón M, Ramirez-Labrada A, Tapia E, Moreno V, Layunta E, Gil-Gómez G, Garrido M, Peña R, Lanuza PM, Comas L, Jaime-Sanchez P, Uranga-Murillo I, Del Campo R, Pelegrín P, Camerer E, Martínez-Lostao L, Muñoz G, Uranga JA, Alcalde A, Galvez EM, Ferrandez A, Bird PI, Metkar S, Arias MA, Pardo J. Extracellular Granzyme A Promotes Colorectal Cancer Development by Enhancing Gut Inflammation. Cell Rep. 2020 Jul 7;32(1):107847.
17. Thi Nhu Thao, T., Labrousseau, F., Ebert, N. et al. Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. Nature 582, 561–565 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2294-9>
- 18.

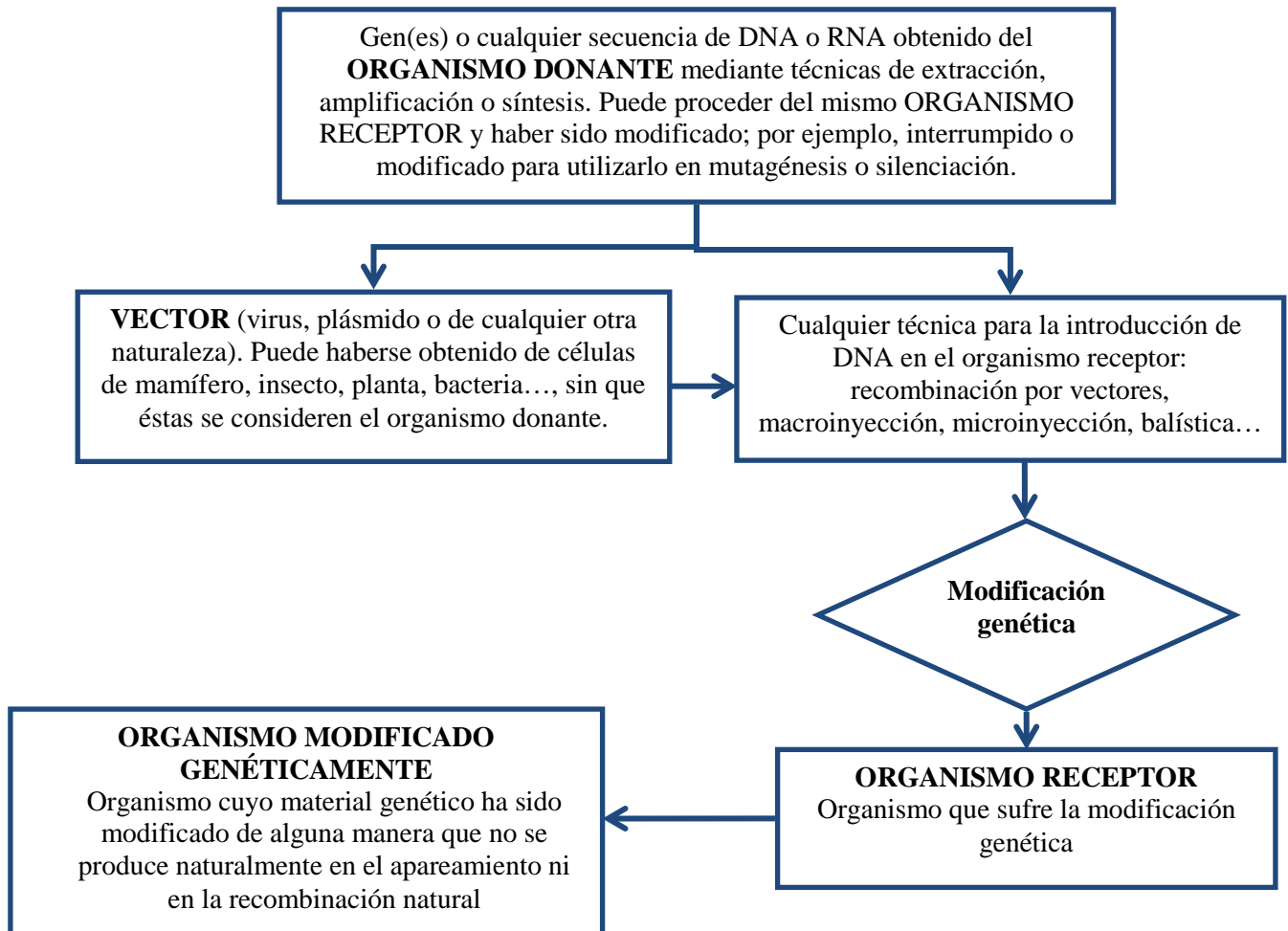
### 1) Clasificación de la actividad:

*(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:

Taxonomía:

Nombre común: SARS-COV2 MA10

En esta solicitud no se va a generar ningún virus, sino que se notifica el uso de un virus modificado genéticamente generado de modo sintético obtenido a partir de DNAs sintéticos que cubren todo el genoma del SARS-CoV-2, incluyendo las mutaciones necesarias para su adaptación a ratón. Por tanto, tampoco se usa en organismo receptor para generar el OMG. Este virus lo proporciona Volker Thiel.

Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento:

b) : Técnicas de identificación

c) Marcadores genéticos:

d) Marcadores fenotípicos:

e) Estabilidad genética:

2) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

Dos mutaciones silenciosas en los nt 10338 y 11163 como marcadores genéticos. No hay ninguna modificación genética no deseada que se encuentre con anterioridad

3) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

SI

NO

4) 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:

5) 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.*):

¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

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



No aplicable

SI  NO

Porqué:

- 6) La cepa/línea celular receptora: ¿está libre de agentes biológicos contaminantes?
- 7) Experiencia adquirida en relación con la seguridad en la utilización del organismo receptor:
- 8) 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?:

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:

d) Posibles nichos ecológicos:

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No aplicable

9) Efectos posibles sobre el medio ambiente:





- a) Implicaciones en procesos ambientales (*p.ej. fijación del nitrógeno o regulación del pH del suelo*):
- b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

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

11) Hábitat natural del organismo:

#### **IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE**

1) Nombre científico:

Taxonomía:

Nombre común:

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante:

3) Método de obtención:

- a) Extracción
- b) PCR
- c) Síntesis *in Vitro*

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

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

SI  NO

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

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

b) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

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



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

## V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1) Tipo de modificación genética:

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

2) Finalidad de la modificación genética:

Generación de un virus sintético a partir de la secuencia del SARS-CoV-2 donde se introduce una modificación (sustitución de bases) para generar una cepa recombinante (MA10) adaptada a ratón y que permita estudiar la interacción con el hospedador y virulencia de dicho virus en un modelo in vivo, así como analizar la eficacia de diferentes tratamientos incluyendo vacunas. Se llevaron a cabo estrategias similares a las que se han utilizado previamente en el equipo de Volker Thiel (Thao et al. Nature 2020). En concreto, para la generación del mutante MA10 adaptado a ratón se introdujeron las mutaciones dentro de los diferentes fragmentos de DNA sintéticos que se indican más abajo. Estas mutaciones se basaron en las descritas para la cepa no recombinante MA10 que se generó mediante infecciones consecutivas en ratones Balb/c (Leist et al. Cell 2020). Al contrario que la cepa original SARS-CoV-2 aislada de humanos, la cual no es virulenta en ratones, la cepa MA10 mostraba alta virulencia en ratones envejecidos.

Se obtuvieron distintos clones de YACs (Yeast Artificial Chromosomes, cromosoma artificial de levaduras) que contenían uno o varios genes virales modificados, a partir de los cuales se obtuvieron los virus modificados. **El objetivo final es generar virus adaptados a ratón que puedan servir para evaluar la eficacia de la vacuna BCG y MTBVAC para prevenir la enfermedad causada por SARS-CoV-2 y el mecanismo inmunológico implicado en la patogénesis del SARS y en la protección ofrecida por dicha vacuna.**

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

Se utilizó un sistema de genética inversa usando un YAC descrito en detalle anteriormente (Thao et al. Nature 2020). Tal y como se ha indicado anteriormente, esta modificación se llevó cabo en el laboratorio del Dr. Volker Thiel, el cual nos cederá el virus rMA10.

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

SÍ  NO



En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector:

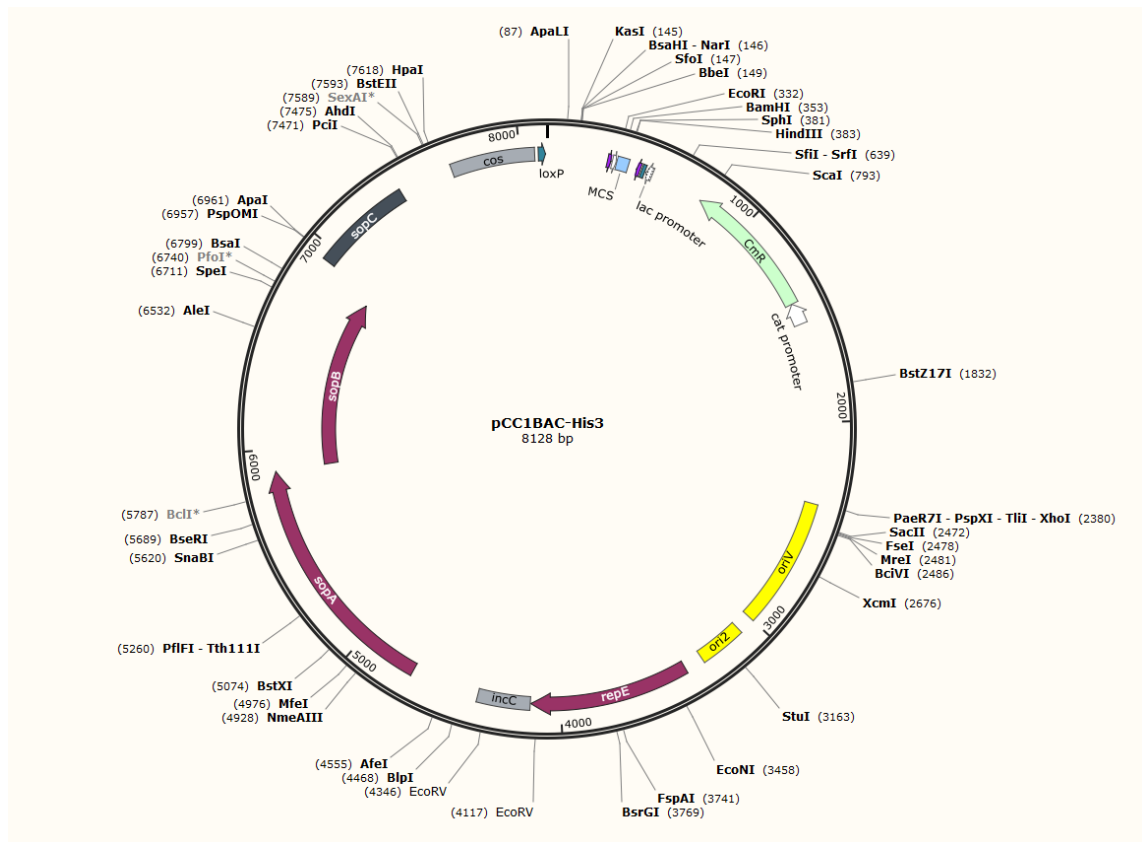
Como ya se ha descrito previamente (Thao et al. Nature 2020), durante la generación de la versión recombinante de SARS-COV2-MA10 (de aquí en adelante, rMA10) se utilizó un plásmido intermedio en el que se clonaron individualmente 14 fragmentos artificiales de DNA con extremos superponibles correspondientes al genoma completo de la variante MA10 del virus SARS-COV2. El plásmido utilizado como vector para el clonaje de estos fragmentos fue el **pCC1BAC-His3**. Los fragmentos clonados se transformaron en levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, donde mediante un proceso natural de recombinación denominado TAR (Transformed-Associated Recombination, recombinación asociada a transformación) se acoplaron formando el cDNA completo del virus en forma de YAC (cromosoma artificial de levaduras). Así pues, durante el proceso de producción de rMA10 nunca se produjo ni se obtuvo un plásmido que contuviese el contenido genético completo del virus, sólo se trabajó con fragmentos de DNA.

b) Si se trata de un virus:

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*):

El mapa del vector vacío **pCC1BAC-His3** se detalla a continuación:



La secuencia completa del plásmido se encuentra en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/157065011?>

Las secuencias de los distintos fragmentos clonados en el vector vacío pCC1BAC-His3 que dan lugar a la variante SARS-COV2, incluyendo los sitios de restricción utilizados para su clonaje, están directamente basados en los publicados en Thao et al. (Thao et al. Nature 2020), los cuales se detallan en:

[https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41586-020-2294-9/MediaObjects/41586\\_2020\\_2294\\_MOESM5\\_ESM.pdf](https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41586-020-2294-9/MediaObjects/41586_2020_2294_MOESM5_ESM.pdf)

Para la generación de la variante rMA10, se introdujeron las siguientes mutaciones en los fragmentos correspondientes del virus SARS-COV2:



<b>Fragmento de DNA sintético</b>	<b>Mutación en el fragment correspondiente de DNA sintético</b>	<b>Mutación en el genoma</b>	<b>Gen</b>
Fragmento 5	C720T	C9438T	Nsp4
	A3129G	A11847G	Nsp7
Fragmento 6	A190G (superpone a A3129G del fragmento 5)	A11847G	Nsp7
	A302G	A12159G	Nsp8
Fragmento 7	T791A	T15102A	ORF1ab
Fragmento 8	C662T	C18060T	ORF1ab
Fragmento 9	C2928A	C23039A	Spike
	C2943T	C23054T	Spike
	A2945C	A23056C	Spike
	C2946A	C23057A	Spike
	C2948G	C23059G	Spike
Fragmento 10	C65A (superpone a C2928A del fragmento 9)	C23039A	Spike
	C80T (superpone a C2943T del fragmento 9)	C23054T	Spike
	A82C (superpone a A2945C del fragmento 9)	A23056C	Spike
	C83A (superpone a C2946A del fragmento 9)	C23057A	Spike
	C85G (superpone a C2948G del fragmento 9)	C23059G	Spike
Fragmento 11	T1626C	T27221C	ORF6
	T2549C	T28144C	ORF6



d) Gama de hospedadores del vector:

Bacterias, levaduras

e) Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización. No aplicable

ii) Si el vector es un bacteriófago ¿se han inactivado sus propiedades lisogénicas?  
No aplicable

iii) ¿Puede el vector transferir marcadores de resistencia a otros organismos? No aplicable

5) Información del inserto:

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

Las secuencias de los distintos fragmentos clonados en el vector vacío pCC1BAC-His3 que dan lugar a la variante SARS-COV2, incluyendo los sitios de restricción utilizados para su clonaje, están directamente basados en los publicados en Thao et al. (Thao et al. Nature 2020), los cuales se detallan en:

[https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41586-020-2294-9/MediaObjects/41586\\_2020\\_2294\\_MOESM5\\_ESM.pdf](https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41586-020-2294-9/MediaObjects/41586_2020_2294_MOESM5_ESM.pdf)

b) Origen y función específica de cada parte del inserto: No aplicable

c) Descripción del método utilizado para la transformación: Para la transformación en bacterias, choque térmico. Para la transformación en levaduras, se utiliz

d) ó el método de alta eficiencia de acetato de litio/PEG, como se describe en Thao et al. 2020.

e) Información sobre los genes estructurales presentes en el inserto: No aplicable

f) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto: No aplicable

g) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente? No aplicable

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

i) ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida? En caso afirmativo, especifíquese. No aplicable



## VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre? No aplicable

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

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

En caso afirmativo:

i) número de copias: No aplicable

ii) localización cromosómica: No aplicable

iii) secuencias colindantes No aplicable

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)

Aportar toda la documentación al respecto.

Artículos:

Thi Nhu Thao, T., Labroussaa, F., Ebert, N. et al. Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. *Nature* 582, 561–565 (2020).  
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2294-9>



Leist SR, Dinno KH 3rd, Schäfer A, et al. A Mouse-Adapted SARS-CoV-2 Induces Acute Lung Injury and Mortality in Standard Laboratory Mice. Cell. 2020;183(4):1070-1085.e12. doi:10.1016/j.cell.2020.09.050

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

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

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

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

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

El SARS-COV2 humano no es virulento en ratones. El OMG sintético (rMA10) se ha adaptado para que provoque enfermedad en ratones, aunque es posible que mantenga su potencial infectivo en humanos.

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

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

- f) Marcadores específicos del OMG:

Virus rMA10: Mutaciones dentro de las secuencias que codifican las proteínas Nsp4 (C9438T), Nsp7 (A11847G), Nsp8 (A12159G), ORF1ab (T15102A, C18060T), Spike (C23039A, C23054T, A23056C, C23057A, C23059G), ORF6 (T27221C y T28144C).

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

- 3) 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 y animalario de nivel 3 de contención biológica (NCB3) y sólo se utilizarán para infectar ratones, en los que no se prevé que se integren en sus células.





- 4) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:
- a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:  
Secuenciación y PCR.
  - b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente:  
El OMG no se va a liberar al 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: Para las infecciones con animales un máximo de  $5 \times 10^6$  pfu ( $1 \times 10^5$  pfu / animal) en un volumen máximo de 1 ml.
  - b) Número de plantas:
  - c) Número de animales: En cada ensayo de patogenicidad y protección se utilizarán un máximo de 60 ratones Balb/c y C57Bl/6 en cada ensayo.
- 3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada:
- junio 2021 – Diciembre 2025

*(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).*

- 4) Finalidad de la actividad de utilización confinada, incluidos los resultados esperados:
- analizar la eficacia de la vacunación con MTBVAC en comparación con BCG, en ratones wt Balb/c y C57Bl/6 frente a la infección con la cepa SARS-CoV2-rMA10.
  - analizar el papel de la respuesta inflamatoria y de las células T y NK en el curso de la infección con la cepa adaptada a ratón en ratones wt vacunados o no con MTBVAC y BCG.
- 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 virus utilizado procede del laboratorio el Profesor Volker Thiel, de la Universidad de Berna.

- 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 aplicable (*tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado*)

El virus será enviado mediante la empresa World Courier, cumpliendo todas las medidas de seguridad según el reglamento de transporte de materias peligrosas por carretera. Los destinatarios cumplimentarán toda la documentación requerida, tal como corresponde a material infeccioso 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*):

Para los estudios de patogenicidad y de protección mediante la vacuna se utilizará como modelo animal ratones Balb/c y C57Bl/6 convencionales de 16 semanas de edad adquiridos de Laboratorios Envigo.

Varios miembros del equipo han trabajado durante más de 15 años con virus y otros patógenos incluyendo respiratorios de tipo 3 como LCMV, Ectromelia, M. tuberculosis o Brucella spp.

Durante los últimos meses hemos trabajado también con el con el SARS-CoV-1-MA15 (5 meses) y con el SARS-CoV-2 silvestre (12 meses) (coronavirus causante del COVID19). De hecho, nuestro equipo ha aislado la primera cepa en la Comunidad de Aragón con la que lleva trabajando desde abril y con la que se han llevado los primeros estudios que se encuentran en fase de revisión. Estos miembros tienen experiencia suficiente y han recibido cursos de formación en bioseguridad en el Servicio de Análisis Microbiológico de la Universidad de Zaragoza. En ningún momento se centrifugará el virus no inactivado ni se someterá a manipulaciones que puedan suponer un incremento del riesgo biológico. Se seguirán todos los procesos preceptivos, tales como no sacar los brazos de la cabina de trabajo sin desinfectarlos, desinfectar cualquier objeto que esté en el interior de la cabina y esperar diez minutos antes de sacarlo. Todos los investigadores que trabajen regularmente en el laboratorio NCB3 con SARS-CoV2-MA10, guardarán cuarentena antes de entrar a cualquier otro animalario de experimentación animal.

La experimentación con animales se enmarca dentro del procedimiento “Estudio del papel del sistema perforina/granzimas en el daño inflamatorio asociado a la infección por el virus



SARS-CoV-2 y de la eficacia de inhibidores que impiden la entrada del virus a las células” y del que es investigador responsable el Dr. Julián Pardo, ha sido autorizado por la Comunidad Autónoma de Aragón (PI44/20).

## REFERENCIAS

1. Almazán F, Dediego ML, Galán C, Escors D, Alvarez E, Ortego J, Sola I, Zuñiga S, Alonso S, Moreno JL, Nogales A, Capiscol C, Enjuanes L. Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J Virol.* 2006 Nov;80(21):10900-6. PubMed PMID: 16928748.
2. DeDiego ML, Alvarez E, Almazán F, Rejas MT, Lamirande E, Roberts A, Shieh WJ, Zaki SR, Subbarao K, Enjuanes L. A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J Virol.* 2007; 81(4):1701-13. PubMed PMID: 17108030
3. Enjuanes L, Dediego ML, Alvarez E, Deming D, Sheahan T, Baric R. Vaccines to prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus-induced disease. *Virus Res.* 2008;133(1):45-62.. PubMed PMID: 17416434. 21 de 284.
4. Alvarez E, DeDiego ML, Nieto-Torres JL, Jiménez-Guardeño JM, Marcos-Villar L, Enjuanes L. The envelope protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus interacts with the non-structural protein 3 and is ubiquitinated. *Virology.* 2010;402(2):281-91. doi: 10.1016/j.virol.2010.03.015. PubMed PMID: 20409569.
5. Netland J, DeDiego ML, Zhao J, Fett C, Álvarez E, Nieto-Torres JL, Enjuanes L, Perlman S. Immunization with an attenuated severe acute respiratory syndrome coronavirus deleted in E protein protects against lethal respiratory disease. *Virology.* 2010;399(1):120-128. doi: 10.1016/j.virol.2010.01.004. PubMed PMID: 20110095.
6. Roberts A, Deming D, Paddock CD, Cheng A, Yount B, Vogel L, Herman BD, Sheahan T, Heise M, Genrich GL, Zaki SR, Baric R, Subbarao K. 2007. A mouse-adapted SARS-coronavirus causes disease and mortality in BALB/c mice. *PLoS Pathogens.*
7. Fett , DeDiego, Regla-Nava, Enjuanes and Perlman. Complete protection against severe acute respiratory syndrome coronavirus-mediated lethal respiratory disease in aged mice by immunization with a mouse-adapted virus lacking E protein. *J Virol.* 2013 Jun;87(12):6551-9
8. Almazán , Dediego, Galán, Escors, Alvarez, Ortego, Sola, Zuñiga, Alonso, Moreno, Nogales, Capiscol and Enjuanes Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J Virol.* 2006
9. 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](#)



10. Thi Nhu Thao, T., Labroussaa, F., Ebert, N. et al. Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. Nature 582, 561–565 (2020).

<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2294-9>

11. Leist SR, Dinnon KH 3rd, Schäfer A, et al. A Mouse-Adapted SARS-CoV-2 Induces Acute Lung Injury and Mortality in Standard Laboratory Mice. Cell. 2020;183(4):1070-1085.e12. doi:10.1016/j.cell.2020.09.050

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

El laboratorio cuenta con medidas de confinamiento de nivel 3, presión negativa, SAS, autoclave de doble puerta, zona de acceso para cambio de ropa, zona de duchas de descontaminación, sala sucia para lavado de material. Las indicaciones de uso, acceso y limpieza de las distintas zonas están recogidas en el Anexo a esta documentación.

## **VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN**

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

Es un edificio independiente, aunque está ubicado dentro de un Campus Universitario, con edificios de aulas y servicios cercano

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

Zaragoza está situado en el centro del valle del Ebro. Temperaturas calurosas en verano, llegando a alcanzarse hasta los 40° en días puntuales, y frío ligero en invierno, llegando a mínimas de -2 -3°C puntualmente. Viento a rachas con una frecuencia del 40% y una velocidad media de 30km/hora.

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:

Nº notificación: A/ES/16/I-24 autorizada según CIOMG: 17.05.17, como de nivel 3

## **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 son las recogidas en el Manual para trabajos en animalarios y laboratorios con agentes de nivel 3.

El personal tiene experiencia en trabajos en el BSL3 y en técnicas de laboratorio en esta infraestructuras.





- 1) Condiciones en las que podría producirse un accidente: Rotura golpes en contenedores cultivos, rotura en centrifugación, Indicadas todas ellas en el plan de autoprotección del Edificio
- 2) Equipamiento de seguridad (especifíquese): EPIS de seguridad (monos, mascarillas, máscara antisalpicaduras, Cabinas de bioseguridad, Centrífugas con rotores antierosoles, racks con filtros HEPA, y ventilación independiente
- 3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores: Usuarios con experiencia en el trabajo con virus en condiciones de contención biológica, tal como se indica anteriormente. Training de acceso, uso de la instalación previa a su comienzo.
- 4) Planes de emergencia: La Facultad de Veterinaria, y en concreto el Edificio de Encefalopatías actualiza el plan de emergencias del edificio. Salidas de emergencias y evacuación indicado en la cartelería de la que dispone el edificio. Todo este material está disponible para los investigadores involucrados, la Unidad de prevención de Riesgos laborales de la institución suministra este tipo de material previo a la firma de cualquier contrato de trabajo, tanto investigador, como laboral.

La instalación, en su PNT “Acceso y Uso del laboratorio”, contiene un apartado en el que se describe la actuación a llevar a cabo en caso de producirse una emergencia dentro de la propia sala de contención.



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

Nº de Notificación:

**I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD**

- 1) Entidad  
Nombre: Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergente. Universidad de Zaragoza  
Dirección postal: Pedro Cerbuna, 12. Campus San Francisco, 50009 ZARAGOZA
- 2) Representante legal de la entidad  
Nombre y apellidos: Rosa Bolea Bailo  
NIF: 72964847S  
Cargo: Vicerrectora de Política científica  
Tel: 976 761759  
Fax:  
Correo electrónico: [vrinves@unizar.es](mailto:vrinves@unizar.es)
- 3) Responsable científico de la actividad  
Nombre y apellidos: Juan Jose Badiola, Diez, Carlos Martín Montañés, y Julián Pardo Jimeno  
NIF: 30040626G, 17866278Q y 25469556 T  
Cargo: Profesores e investigadores de la UNIZAR  
Tel: 976 761759  
Fax:  
Correo electrónico: [badiola@unizar.es](mailto:badiola@unizar.es), [carlos@unizar.es](mailto:carlos@unizar.es), [pardojim@unizar.es](mailto:pardojim@unizar.es)
- 4) Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad  
Nombre y apellidos: Rosa Bolea Bailo  
NIF: 72964847S  
Cargo: Vicerrectora de Política científica  
Tel: 976 761759  
Fax:  
Correo electrónico: [vrinves@unizar.es](mailto:vrinves@unizar.es)
- 5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto: Los tres

**II.**



## 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:

Estudio de la actividad profiláctica no específica (inmunidad entrenada) inducida por las vacunas vivas atenuadas contra la tuberculosis BCG y MTBVAC contra rSARS-CoV-2-M10<sup>1</sup> adaptada a ratón, en los modelos de ratón Balb/c, y C57Bl/6 utilizando diferentes vías de administración. Se estudiará el mecanismo inmunológico frente a la infección “in vivo” utilizando ratones wt o deficientes en perforina, gzmA, gzmB o gzmK.

El estudio se realizará en el laboratorio de Seguridad Biológica del Centro de Encefalopatías y enfermedades emergentes transmisibles de la Universidad de Zaragoza en colaboración con el equipo del Profesor Volker Thiel que adaptó la cepa de SARS-CoV-2 a infección en ratón.

Los objetivos concretos de la presente propuesta son:

- Establecer el modelo de infección con una cepa de SARS-CoV-2 adaptada a ratón (SARS-CoV-2-MA10).
- Analizar la eficacia de la vacunación con MTBVAC en comparación con BCG, en ratones wt Balb/c y C57Bl/6 frente a la infección por SARS-CoV-2-MA10.
- Analizar el curso de la infección con las cepas adaptadas a ratón en ratones wt o deficientes en perforina, gzmA, gzmB o gzmK vacunados o no con BCG y MTBVAC. Replicación viral, inflamación y mortalidad/morbilidad.
- Analizar el efecto de inhibidores de TRAIL, FasL, TNFa, IL6, gzmA, gzmB o gzmK sobre el curso de la infección con la cepa adaptada a ratón en ratones wt vacunados o no con BCG y MTBVAC.
- Analizar el efecto de nanobodies neutralizantes frente a Spike.

Respecto al estudio de la eficacia de las vacunas MTBVAC y BCG para proteger frente a la enfermedad causada por el coronavirus SARS-CoV-2 y su mecanismo de acción. Para ello se realizarán ensayos de patogenicidad y protección en ratones convencionales Balb/c, y C57Bl/6 frente a la infección con la cepa adaptada a ratón rSARS-CoV-2-MA10, desarrollada en el laboratorio del Profesor Volker Thiel utilizando como base una versión recombinante del virus rSARS-CoV-2. Los ratones Balb/c, y C57Bl/6 son susceptibles a la infección viral, y mimetizan la enfermedad pulmonar severa observada en humanos, causando patología y una alta letalidad. Con el fin de analizar la respuesta inmunológica frente a la infección, así como su implicación en los mecanismos de protección activados por las vacunas MTBVAC y BCG, también se utilizarán ratones deficientes en perforina, granzima A o granzima B, inhibidores de estas proteínas y anticuerpos para eliminar





poblaciones celulares específicas como T CD4/CD8 o NK. Los virus utilizados en los ensayos de patogenicidad y protección son virus recombinantes basados en el genoma del coronavirus SARS-CoV-2 aislado en 2020 de pacientes COVID19 de China. La construcción de estos recombinantes, se realizó en las instalaciones correspondientes de la Universidad de Berna.



Duración prevista de la actividad:

### III. EVALUACIÓN DE RIESGO

*(Para llevar a cabo dicha evaluación se tendrá en cuenta el procedimiento establecido en el Anexo III de la Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo, relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las notas de orientación para la evaluación de riesgo).*

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

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

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

- a) Organismo receptor:

El organismo receptor en todo momento es un OMG. Es un virus rSARS-CoV2 obtenido por sustitución de bases, para generar una cepa recombinante (rMA10) adaptada a ratón y que permite estudiar la interacción con el hospedador y la virulencia de dicho virus en un modelo in vivo, así como analizar la eficacia de diferentes tratamientos incluyendo vacunas. Para su obtención se llevaron a cabo estrategias similares a las que se han utilizado previamente en el laboratorio del Profesor Volker Thiel utilizando un sistema de genética inversa usando un YAC descrito en detalle anteriormente (Thi Nhu Thao, T., Labroussaa, F., Ebert, N. et al. Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. Nature 582, 561–565 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2294-9>). En concreto, se introdujeron de manera artificial las mutaciones descritas en por Leist et al. (Leist SR, Dinnon KH 3rd, Schäfer A, et al. A Mouse-Adapted SARS-CoV-2 Induces Acute Lung Injury and Mortality in Standard Laboratory Mice. Cell. 2020;183(4):1070-1085.e12. doi:10.1016/j.cell.2020.09.050). En concreto, se introdujeron las siguientes mutaciones dentro de las secuencias que codifican las proteínas Nsp4 (C9438T), Nsp7 (A11847G), Nsp8 (A12159G), ORF1ab (T15102A, C18060T), Spike (C23039A, C23054T, A23056C, C23057A, C23059G), ORF6 (T27221C y T28144C). Al contrario que la cepa original SARS-CoV2 aislada de humanos la cual no es virulenta en ratones, la cepa rMA10 muestra una alta virulencia en ratones envejecidos (Leist et al. 2020).

Durante la generación de la versión recombinante de SARS-COV2-MA10 (de aquí en adelante, rMA10) se utilizó un plásmido intermedio en el que se clonaron individualmente 14 fragmentos artificiales de DNA con extremos superponibles correspondientes al genoma completo de la variante MA10 del virus SARS-COV2. El plásmido utilizado como vector para el clonaje de estos fragmentos fue el **pCC1BAC-His3**. Los fragmentos clonados se transformaron en levaduras *Saccaromyces cerevisiae*, donde mediante un proceso natural de recombinación denominado TAR (Transformed-Associated Recombination, recombinación asociada a transformación) se acoplaron formando el cDNA completo del virus en forma de YAC (cromosoma artificial de levaduras).



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

El OMG es idéntico al virus silvestre SARS-CoV2 aislado de pacientes excepto en las citadas mutaciones. Se espera que sea patógeno para humanos, dado que el virus wt (SARS-CoV2) produce enfermedad respiratoria severa en seres humanos

Efectos para el medio ambiente.

El OMG no existe en la naturaleza, se generó en el laboratorio y en todo momento permanecerá confinado dentro de las instalaciones. El virus silvestre generó la pandemia global de COVID19, iniciada en Wuhan (China) en diciembre de 2019. Es un virus zoonótico, siendo su origen el murciélago y los armadillos que actuaron como animal hospedador intermedio. Este virus, aunque es patógeno para humanos, no causa enfermedad en los animales hospedadores intermedios.

2) Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente:

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

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

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

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

Las infecciones se van a llevar a cabo en un box de experimentación (laboratorio indicado en la solicitud) dotado de todos los equipos científicos necesarios (CBS, rack ventilado, congeladores y ultracongelador, incubadores, etc), a fin de minimizar al máximo los riesgos fuera de esa área. Los animales se alojan en racks ventilados que cumplen con las medidas de seguridad, presión negativa, filtros HEPA, conexión a grupo eléctrico. Dicha sala dispone también de cabinas de seguridad adecuadas (Clase II) para la infección de los animales.

El virus se cultivará y titulará en el laboratorio de contención de nivel 3 del Dr. Volker Thiel. Una vez titulado los cultivos se enviarán al animalario de nuestro centro donde se almacenará en los ultracongeladores. Los envíos se llevarán a cabo mediante una empresa especializada (World Courier) utilizando un contenedor de triple envase, siguiendo los protocolos establecidos.



El acceso al animalario únicamente será posible al personal autorizado. El acceso se realiza a través de esclusa, con puertas estancas. Existen vestuarios interiores para limpio/sucio

Se incluyen las siguientes instalaciones:

Ducha de descontaminación y protocolo de descontaminación química.

Vigilancia de los habitáculos y en el box mediante ventana de observación

Doble filtración HEPA en el aire de extracción

Filtración en el aire de impulsión

Tratamiento de efluentes.

Suministro eléctrico independiente para la instalación, y grupo electrógeno para equipos.

Control de parámetros de biocontención de la instalación, conectado a sistema de alarma

Seguridad Biológica Clase II, y rack ventilado para el aislamiento de los ratones

La cabina se valida anualmente, y se verifica su funcionamiento antes de cada experimento.

La Universidad, por medio de su servicio de prevención, ha actualizado este año el plan de autoprotección del edificio, contemplando las posibles emergencias y planes de evacuación.

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

El cultivo de los virus in vitro se realizará en células VERO E6 en el laboratorio NCB3 del Dr. Volker Thiel, y el personal expuesto será el menor número posible, todo ello en el laboratorio en condiciones de contención de nivel 3, EPIS, presión negativa, filtración aire, recogida residuos, autoclave, desinfección, etc.

- 1) El uso de ratones dentro del rack ventilados y del box donde se ubica, con sus medidas de seguridad impedirán que estos ratones se liberen al medio ambiente Determinación de la clasificación y medidas de confinamiento definitivas y confirmación de su idoneidad:

Grado 3, para actividad de riesgo en condiciones de confinamiento tipo3

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

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

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



El CIEETE, es un edificio independiente, aunque está ubicado dentro de un Campus Universitario, con edificios de aulas y servicios cercanos.

Zaragoza está situado en el centro del valle del Ebro. Temperaturas calurosas en verano, llegando a alcanzarse hasta los 40° en días puntuales, y frío ligero en invierno, llegando a mínimas de -2 -3°C puntualmente. Viento a rachas con una frecuencia del 40% y una velocidad media de 30km/hora.

El edificio cuenta con instalaciones destinadas a Administración fuera de la zona de contención.

- b) Condiciones en las que podría producirse un accidente. Documentación enviada en la solicitud para autorización actividad con OMG en esta instalación
- c) Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales. Adjuntada con la instalación
- d) Planes de emergencia. Aportada en la solicitud de autorización instalación A/ES/16/I-24