



PARTE A Y C

**Actividades de
tipo 3 y 4**

DIRECCION GENERAL CALIDAD Y
EVALUACIÓN AMBIENTAL

COMISIÓN NACIONAL DE
BIOSEGURIDAD

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

I. INFORMACIÓN GENERAL

1. Responsables de la actividad

a. Entidad

Nombre: CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA (CSIC-UAM)

Dirección postal: C/ NICOLAS CABRERA 1, 28049 MADRID.

b. Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: PAOLA BOVOLENTA NICOLAO

NIF: 33534698P

Cargo: DIRECTORA DEL CBMSO

Tel: 911964424

Correo electrónico: direccion@cbm.csic.es

c. Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: LUIS ENJUANES SÁNCHEZ

NIF: 19418297H

Cargo: PROFESOR INVESTIGACIÓN CSIC

Tel: 91 585 45 55

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

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

Nombre y apellidos: GEMA CAPARRÓS DE LA JARA

NIF: 05432793D

Cargo: RESPONSABLE DE BIOSEGURIDAD DEL CBMSO

Tel: 911964537

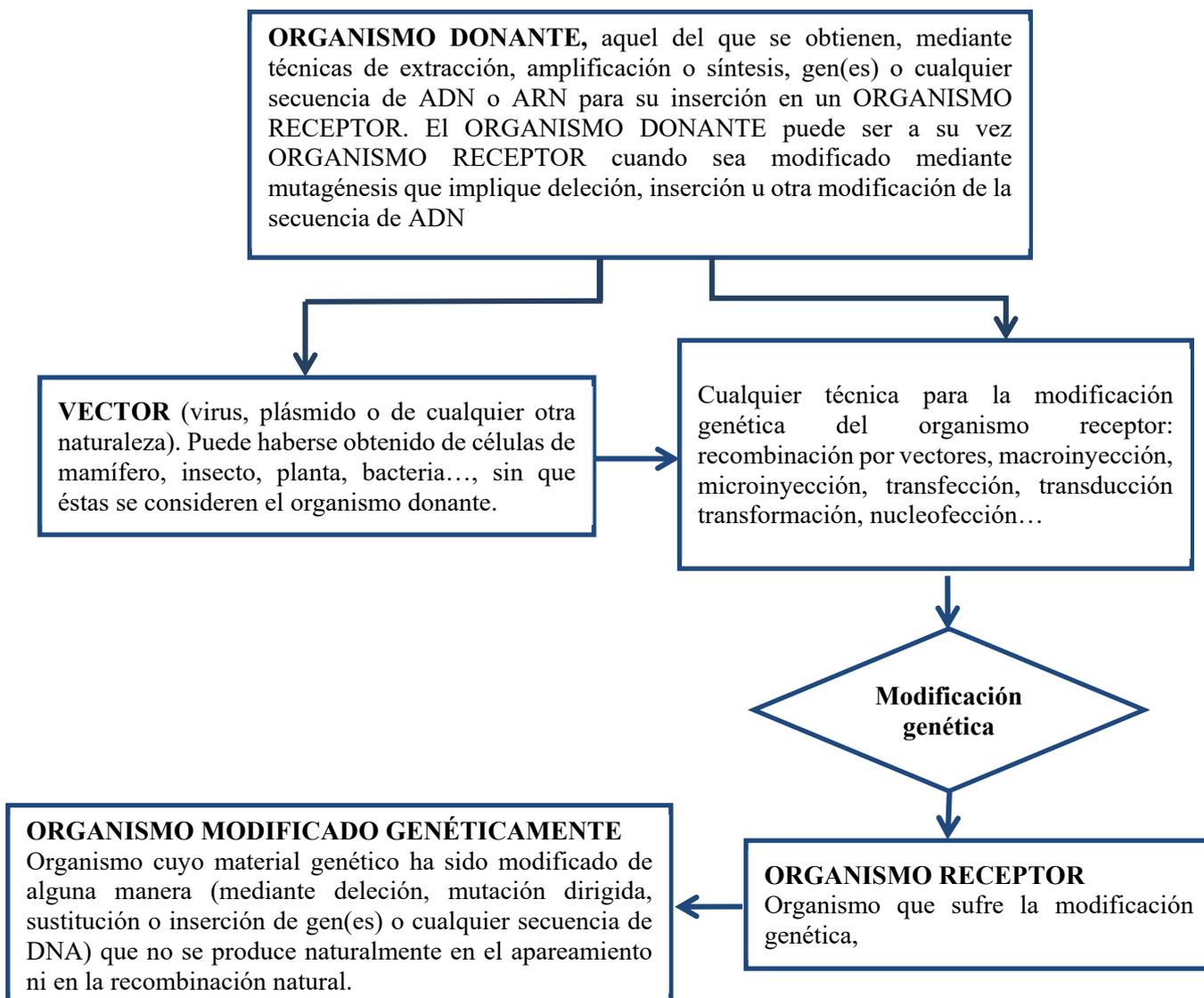
Correo electrónico: gcaparros@cbm.csic.es

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

Nombre y apellidos GEMA CAPARRÓS DE LA JARA



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





II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

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

SI X NO

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

- Nombre de la convocatoria:

Proyectos I+D+i

- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

PID2019-107001RB-100. IPs: Isabel Sola y Luis Enjuanes

- Organismo financiador:

Ministerio de Ciencia e Innovación, Agencia Estatal de Investigación

Otro tipo de financiación²

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

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

A/ES/17/I-23

- Fecha de autorización de la instalación:

06/11/2017

Si el OMG no se genera en la instalación³:

- Nombre de la instalación de origen del OMG:

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)

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

A/ES/20/16

¹TASAS

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

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

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



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

A/ES/00/I-08

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

El tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación y etiquetado seguirán la legislación internacional y nacional vigente para el transporte de material biológico infeccioso para humanos y animales. El transporte del virus recombinante SARS-CoV-2 desde el CNB-CSIC (Cantoblanco, Madrid), donde se ha construido, hasta el CBM-CSIC (Cantoblanco, Madrid), donde se realizarán los experimentos con animales, se llevará a cabo por una empresa autorizada conforme a dicha normativa como material infeccioso de categoría A.

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

3. Finalidad de la actividad:

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

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

El virus utilizado en los ensayos de patogenicidad y protección es un virus recombinante basado en el genoma del coronavirus SARS-CoV-2. La construcción de este virus, realizada en la

⁴ Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:

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



instalación ya autorizada A/ES/00/I-08, del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), ha sido aprobada por la Comisión Nacional de Bioseguridad (Número de Notificación A/ES/20/16).

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

4. Clasificación de la actividad:

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

Tipo 3

Tipo 4

III. INFORMACIÓN RELATIVA A LA OBTENCIÓN DEL OMG

1. Organismo receptor del cual deriva el OMG:

- | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| Células humanas/primates | <input type="checkbox"/> | Detallar las líneas celulares: |
| Células: otras | <input type="checkbox"/> | Detallar las líneas celulares: |
| Animal | <input type="checkbox"/> | |
| Planta | <input type="checkbox"/> | |
| Bacteria | <input type="checkbox"/> | |
| Hongo | <input type="checkbox"/> | |
| Virus | X | |
| Protozoos | <input type="checkbox"/> | |

-Especificar el nombre científico y común:

Virus recombinante SARS-CoV-2.

Taxonomía: perteneciente a la Familia Coronaviridae, género Betacoronavirus.

Nombre común: recombinante del coronavirus SARS-CoV-2 de la enfermedad conocida como COVID-19.



a. Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

- i)** Técnicas de aislamiento: El virus rSARS-CoV-2 se obtendrá a partir de un clon (cDNA) infeccioso. Éste cDNA codificará el genoma del virus SARS-CoV-2 (referencia GenBank: MN908947.3), con dos mutaciones silenciosas en los nt 20085 y 26840 como marcadores genéticos. Para su obtención se clonarán secuencialmente 6 fragmentos de DNA obtenidos por síntesis química en la empresa estadounidense GenScript. El cDNA se mantendrá en un cromosoma artificial de bacterias (BAC), que se utilizará como vector y se amplificará en una cepa de bacterias Escherichia coli no patógena. La última etapa del clonaje y el rescate del virus se realizará en el laboratorio NCB3 del CNB-CSIC. Para aislar el virus rSARS-CoV-2 se transfectarán células Vero E6 con el cDNA generado. Este procedimiento se realizará en frascos de cultivos cerrados. A las 48 -72 horas post-transfección (hpt) se recogerá el medio de cultivo que contendrá el rSARS-CoV-2. Las secuencias del BAC (pBeloBac11.pdf) y del inserto que codifica el rSARS-CoV-2 (SARSCoV_2019.pdf) así como las secuencias de los 6 fragmentos sintetizados químicamente (F1.pdf, F2.pdf, F3.pdf, F4.pdf, F5.pdf y F6.pdf) se adjuntaron en la solicitud de la que ya se tiene autorización Número de Notificación A/ES/20/16.
- ii)** Técnicas de identificación: Para la identificación del rSARS-CoV-2 se amplificará su genoma mediante RT-PCR y se procederá a secuenciar completamente el genoma viral. De este modo, se comprobará que su secuencia coincide con la codificada por el cDNA infeccioso, incluyendo los dos marcadores genéticos que distinguen este virus recombinante de cualquier SARS-CoV-2 aislado de pacientes.
- iii)** Marcadores genéticos: Se han introducidos dos marcadores genéticos que consisten en dos mutaciones silenciosas en los nt G20085 por A y C26840 por G.
- iv)** Marcadores fenotípicos: No aplica
- v)** Estabilidad genética: **En general, la estabilidad genética del virus recombinante rSARS-CoV-2 en cultivos celulares es elevada. En células Vero E6 se han descrito con los países variaciones de secuencia en el sitio de procesamiento por furina de la proteína S o en regiones próximas. La pérdida del procesamiento por furina de proteína S se asocia a atenuación del virus en modelos animales. Además, se darán pocos países una vez rescatado el rSARS-CoV-2 a partir del cDNA infeccioso.**

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

SI

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

Las células Vero E6, en las que se propaga el rSARS-CoV-2 están libres de agentes biológicos contaminantes. Esto puede demostrarse mediante el correspondiente Certificado de Análisis (COA) y el Certificado de Origen (COO) de la línea celular.

NO

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

c. Modificación genética anterior:



SI

– Describir:

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

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

No se esperan cambios en la patogenicidad, tropismo, etc.

NO

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

El rSARS-CoV-2 será idéntico al virus silvestre SARS-CoV-2 aislado de pacientes, excepto en los dos marcadores genéticos. Por tanto, se espera que sea patógeno para humanos, dado que el virus silvestre (SARS-CoV-2) produce la enfermedad COVID-19, sin cambios en la patogenicidad, tropismo, etc

SI

Para:

Humanos	<input checked="" type="checkbox"/>
Animales	<input checked="" type="checkbox"/>
Plantas	<input type="checkbox"/>
Otros	<input type="checkbox"/>



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

No aplican

NO

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

SI

NO

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

El trabajo con virus similares (SARS-CoV) que resultan letales para humanos, se realiza en todo el mundo (EEUU, Europa, China) en laboratorios de contención biológica NCB3, bajo condiciones y protocolos inferiores a los que utilizamos en el NCB3 del CNB, tal como certificó el equipo del NIH-CDC que inspeccionó las instalaciones y protocolos implementados en el CNB-CSIC. Nuestro grupo ha estado trabajando más de 17 años con SARS-CoV y, desde el año 2013, se trabaja con otro coronavirus humano que causa enfermedad respiratoria grave (MERS-CoV), en las instalaciones NCB3 del CNB, sin ningún problema. En este momento seis investigadores del laboratorio 114 trabajan regularmente con estos virus. Todos los investigadores que trabajen regularmente en el P3 con el SARS-CoV-2 guardarán cuarentena antes de entrar a cualquier animalario de experimentación animal, al igual que hacen cuando trabajan con SARS-CoV o con MERS-CoV. Todos los protocolos e instalaciones utilizados por nuestro grupo son superiores a las que se utilizan en los países indicados, incluyendo los laboratorios del NIH, tanto pertenecientes al NIAID, como los del nuevo edificio de Biodefensa en Bethesda (EEUU) hemos visitado. Los protocolos e instalaciones utilizadas se han contrastado con visitas a laboratorios de Alemania, Italia, Holanda y EEUU. Recientemente, después de una inspección exhaustiva, tanto las instalaciones como los protocolos de actuación han sido aprobados por el NIH-CDC. Consideramos que nuestro centro y nuestros equipos están preparados para realizar este trabajo que hemos ejecutado durante 17 años en el CNB.

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

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

SI Para sobrevivir el virus rSARS-CoV-2 necesita de la maquinaria de la célula infectada. Por tanto, su capacidad de supervivencia fuera de las condiciones de cultivos será muy limitada. Basándonos en la experiencia con coronavirus similares, el virus rSARS-CoV-2 se prevé que podría sobrevivir 24 – 48 h fuera de la célula.

- Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

esporas

endosporas

quistes

esclerocios

esporas asexuales (hongos)

esporas sexuales (hongos)

otros, especifíquese



NO X

ii) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

La exposición a temperaturas iguales o mayores a 37°C, a luz ultravioleta, o a agentes químicos reduce drásticamente la capacidad de supervivencia del rSARS-CoV-2 fuera de las condiciones de cultivo.

iii) Posibles nichos ecológicos:

El virus rSARS-CoV-2 no se encuentra en la naturaleza, dado que se obtendrá en el laboratorio a partir del cDNA infeccioso.

iv) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No aplica

h. Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

El virus rSARS-CoV-2 no se encuentra en el medio ambiente.



ii) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

El virus rSARS-CoV-2 no interacciona con otros organismos ya que está confinado en el laboratorio NCB3 y es poco probable que salga de él ya que es incapaz de propagarse fuera de un cultivo celular.

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

El virus rSARS-CoV-2 con el que se va a trabajar no se encuentra en la naturaleza ya que ha sido generado en el laboratorio.

j. Hábitat natural del organismo:

El virus rSARS-CoV-2 con el que se va a trabajar no se encuentra en la naturaleza ya que ha sido generado en el laboratorio.

El hábitat natural del virus silvestre SARS-CoV-2 son los seres humanos, dado que este virus ha sido aislado de pacientes con COVID-19.

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

- | | |
|-----------|--------------------------|
| Humanos | <input type="checkbox"/> |
| Animal | <input type="checkbox"/> |
| Planta | <input type="checkbox"/> |
| Bacteria | <input type="checkbox"/> |
| Hongo | <input type="checkbox"/> |
| Virus | <input type="checkbox"/> |
| Protozoos | <input type="checkbox"/> |

-Especificar el nombre científico y común:

a. Se trabaja con él durante la actividad:

SI NO

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

SI

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

NO

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

c. Modificación genética anterior:

SI



– Describir:

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

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

SI Para:

Humanos

Animales

Plantas

Otros

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

NO

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

SI NO

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

g. Método de obtención:

– Extracción

– PCR

– Síntesis *in vitro*

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

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



IV. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

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

Eliminación de genes de rSARS-CoV-2 para estudiar el papel de estos genes en la interacción con el hospedador y virulencia de dicho virus. En el caso de las proteínas estructurales E y N, también se podrán realizar mutaciones que eliminen motivos que se conoce que están implicados en la virulencia, siguiendo estrategias similares a las que se han utilizado previamente en nuestro laboratorio (Nieto-Torres J.L. et al, 2014, PLoS Pathog. 10:e1004077; Jimenez-Guardeño J.M. et al, 2014, PLoS Pathog. 10:e1004320). Se obtendrán distintos clones de BACs que contengan uno o varios genes virales modificados, a partir de los cuales se rescatarán virus defectivos. **El objetivo final es generar virus atenuados que puedan servir como vacunas seguras.**

2. Tipo de modificación genética:

- Inserción de material genético
- Delección de material genético
- Sustitución de bases
- Otros, especifique:

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

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

Otros, especifique:

Para generar el clon infeccioso que codifica el virus rSARS-CoV-2, se partirá de fragmentos de cDNA sintetizados químicamente. Estos fragmentos, se insertarán en el BAC disponible en el laboratorio (pBeloBac11.pdf), mediante técnicas de clonaje convencionales que consisten en el uso de enzimas de restricción adecuadas y posterior ligación de los fragmentos de DNA.

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

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

SÍ NO

En caso afirmativo:



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

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

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

En los documentos pBeloBAC_map.pdf y pBeloBac.pdf que se adjuntaron en la solicitud de la que ya se tiene autorización con Número de Notificación: A/ES/20/16 contienen toda la información solicitada.

- ii)** Si se trata de virus:

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

b. Gama de hospedadores del vector:

Bacterias *Escherichia coli*.

c. Características de la movilidad del vector:

- i)** factores de movilización

No presenta

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

No aplica

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

No aplica porque el BAC siempre se utilizará en bacterias.

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

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

- b.** Información sobre los genes estructurales:

- c.** Información sobre los elementos reguladores:

Los insertos contienen las secuencias reguladoras de la transcripción (TRS) tal y como se encuentran presentes en el genoma viral. Cada una de estas secuencias regula la expresión de los genes virales, tal y como sucede en el rSARS-CoV-2.

No existe ningún otro elemento regulador en los OMGs generados.

- d.** ¿Ha sido secuenciada?



Sí, la secuencia (SARSCoV_2019.pdf) así como la secuencia del virus completo (Wu_Hu_1.pdf) se adjuntaron en la solicitud de la que ya se tiene autorización con Número de Notificación: **A/ES/20/16**

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

No

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

No

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

- a. Si el vector es un plásmido

i) Se pierde

ii) Se inserta en el genoma

- Aleatoriamente

- En un sitio definido

- o Localización cromosómica:

- o Secuencias colindantes:

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

iii) Se mantiene en forma episómica

- Número de copias:

- Se dispone de información sobre la estabilidad del vector

- b. Si el vector es un virus:

i) Se mantiene en forma episómica

ii) Se inserta en el genoma

- La inserción se produce al azar

- La inserción es específica

- o Localización cromosómica:

- o Secuencias colindantes:



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

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

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

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



V. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE (OMG)

1. Descripción del OMG final

A partir de los BACs que contengan los cDNAs modificados genéticamente, se rescatarán virus recombinantes (rSARS-CoV-2) con mutaciones en alguna de sus proteínas. Estos virus rSARS-CoV-2 se comportarán en general como virus atenuados, con menor o igual tasa de replicación y menor patogenicidad que el organismo parental. Así mismo, se pretender generar virus eficientes en replicación y defectivos en propagación, lo que confiere un grado adicional de atenuación a los OMGs generados.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

No

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

No

- f. Marcadores específicos del OMG:

El OMG presentará dos cambios de nt en las posiciones 20085 and 26840 con respecto a un virus silvestre SARS-CoV-2. Los virus defectivos llevarán, además, deleciones o modificaciones en los genes 3, 6, 7a, 7b, 8, E y N.

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

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



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

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

5. Descripción de métodos de identificación y aislamiento planificados:

a. Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

Microscopía de fluorescencia mediante anticuerpos específicos de diferentes proteínas del virus SARS-CoV-2.

RT-PCR específicas empleando oligonucleótidos complementarios de la secuencia de los genes ORF1b y M del virus SARS-CoV-2.

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

El OMG no va a estar en el medio ambiente.



VI. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

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

En este proyecto proponemos el diseño de vacunas y la selección de antivirales para proteger frente a las infecciones respiratorias humanas causadas por coronavirus (CoVs) mediante la modulación de la respuesta inmune innata tanto en la población joven como mayor. Los objetivos de este proyecto son:

1. Identificar genes de CoVs responsables de la **virulencia viral**, para eliminarlos o modificarlos con el fin de generar virus atenuados que sean buenos **candidatos a vacuna**. La eficacia de estos candidatos vacunales se determinará en modelos animales.
2. Identificar rutas de señalización celular requeridas para la replicación de CoVs, con el fin de **seleccionar antivirales** que inhiban estas rutas e interfieran con la replicación viral sin afectar a la viabilidad celular. Estos estudios incluirán el análisis de las redes de fosforilación celulares que afectan a proteínas virales responsables de la virulencia, con el objetivo de seleccionar los correspondientes antivirales.
3. Determinar cómo afecta la infección por CoVs a la respuesta inmune innata con el fin de regular la magnitud y la clase de respuesta necesarias para el control de la patogénesis inducida por CoVs. Se prestará especial atención a la inducción de inflamación y a la activación del inflammasoma, dado que la sobreestimulación de estas rutas celulares parece ser responsable del aumento de la mortalidad durante las epidemias de SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2.
4. Investigar el control epigenético del RNA en la respuesta inmune innata frente a CoVs con el propósito de promover la expresión de RNAs no codificantes, tanto pequeños como largos, que favorezcan la respuesta inmune innata o de neutralizar la producción de RNAs que inhiban esta respuesta.

Durante los experimentos se obtendrán muestras de suero, sangre y tejidos para poder medir la respuesta inmune generada por los virus recombinantes y evaluar la protección conferida siguiendo protocolos establecidos en el laboratorio.

Todos los experimentos con animales se realizarán en las instalaciones de alta seguridad biológica (NCB-3) del CBM-SO (CSIC) una vez aprobados por los comités de experimentación animal (CBM-SO, CSIC y CAM) y el Comité de Bioseguridad del CBM-SO.

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

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

- i) Para preparación de lotes

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

Para cada uno de los experimentos en el que se inocularán ratones con los virus recombinante o drogas antivirales utilizará una dosis intranasal de 100.000 pfu de virus (CoVs) en 50 μ l de DMEM.



Un grupo se inoculará con DMEM para servir como control negativo del experimento. Para mejorar la respuesta inducida, en algunos casos, se procederá a inocular 1 dosis adicional (*boost*) de los virus recombinantes en un intervalo de 21 días.

- b. Número aproximado de plantas por ensayo:

- c. Número aproximado de animales por ensayo:

En cada ensayo de patogenicidad y protección se utilizarán 60 ratones transgénicos de 26 semanas que expresan el receptor humano hACE2.

1. Para analizar la **virulencia** de cada mutante los experimentos se realizarán con 1 grupo de ratones no infectados, otro de infectados con el virus silvestre y 4 grupos infectados con los virus mutantes de delección (9 ratones/ grupo). Cada grupo distribuido en dos jaulas (5 para analizar los signos clínicos de la enfermedad y 4 para toma de muestras).

2. Para analizar la **protección conferida por los virus atenuados** seleccionados en el 1, los experimentos se realizarán con 1 grupo de ratones no vacunados y 5 grupos vacunados con los virus atenuados (9 ratones/grupo). Posteriormente, se analizará el efecto antiviral frente a la infección por SARS-CoV-2-2. Cada grupo distribuido en dos jaulas (5 para analizar los signos clínicos de la enfermedad y 4 para toma de muestras).

3. Para el **análisis de drogas antivirales** se utilizarán 5 grupos de ratones que serán inoculados con varias dosis de las drogas seleccionadas y 1 de no tratados. 9 ratones cada grupo distribuidos en dos jaulas (5 para analizar los signos clínicos de la enfermedad y 4 para la toma de muestras).

3. Naturaleza de las operaciones:

- a. Enseñanza
b. Investigación
c. Desarrollo

4. Periodo previsto para la actividad de utilización confinada:

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

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

VII. EVALUACIÓN DE RIESGO

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

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



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

a. Organismo receptor.

El organismo receptor en todo momento es un OMG que consiste en un virus recombinante rSARS-CoV-2, que se obtendrá a partir de un cDNA infectivo que codifica el cDNA completo del virus referencia (GenBank: MN908947.3). Este cDNA presenta dos mutaciones silenciosas en los nt 20085 y 26840 como marcadores genéticos que lo distinguen del genoma del virus silvestre.

El OMG (rSARS-CoV-2) es idéntico al virus silvestre SARS-CoV-2 aislado de pacientes, en Wuhan en diciembre de 2019, excepto en los dos marcadores genéticos. Por tanto, se espera que sea patógeno para humanos, dado que el virus silvestre (SARS-CoV-2) produce la enfermedad COVID-19.

En lo que respecta al hábitat natural del OMG, éste no existe en la naturaleza dado que se ha generado en el laboratorio y permanecerá confinado en las instalaciones NCB3 del CNB-CSIC. El hábitat natural del virus cuyo genoma codifican los fragmentos de cDNA, SARS-CoV-2 silvestre, sin modificaciones, son los seres humanos. Este coronavirus se aisló inicialmente de pacientes con enfermedad respiratoria grave en la ciudad china de Wuhan. SARS-CoV-2 es el agente etiológico de la pandemia de COVID-19, que ha causado a día de hoy (14 Junio 2023) más de 690 millones de infecciones y la muerte de 6,8 millones de personas. Una de las características que distinguen el virus SARS-CoV-2 de SARS-CoV es su diseminación a partir de individuos asintomáticos, durante el periodo de incubación que se ha estimado en 7-14 días. SARS-CoV-2 es un virus zoonótico. Tiene una homología de secuencia del 96% con coronavirus SARS-like que se encuentran en murciélagos (Zhou P. et al, 2020, Nature, doi:10.1038/s41586-020-2012-7). Aún no se ha identificado el hospedador intermedio a partir del cuál se ha producido el salto a humanos, aunque una hipótesis plausible es que sean mapaches, dado que se han encontrado secuencias de SARS-CoV-2 .

b. Organismo donante.

No aplica

c. Inserto.

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

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

Cuando se rescate los virus recombinantes rSARS-CoV-2 defectivos, los genes estructurales y accesorios se expresarán bajo las secuencias reguladoras de la transcripción del virus silvestre por lo que el nivel de expresión de dichos genes será el mismo que el de los genes de del aislado de Wuhan-Hu-1 de SARS-CoV-2.

d. Vector.

Para poder realizar la modificación genética del rSARS-CoV-2 se utilizarán como vectores plásmidos pBAC en los que se insertarán los fragmentos con las mutaciones, obtenidos mediante síntesis química.



2. Identificar las posibles propiedades nocivas del OMG⁵

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

El organismo modificado genéticamente consiste en virus recombinantes derivados de rSARS-CoV-2 en los que se delecionarán o modificarán los genes específicos de género 3, 7a, 7b, 8 y 9b, y los genes estructurales E y N, solos o en distintas combinaciones. No se prevé que los virus resultantes tengan efectos tóxicos o alergénicos sobre el hospedador, ya que son virus defectivos mediante la eliminación de genes esenciales.

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

Se prevé que los virus recombinantes con otros genes delecionados podrían estar atenuados con respecto al organismo receptor rSARS-CoV-2.

b. Efectos para el medio ambiente.

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

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

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

Las características de la actividad son un uso confinado del OMG para inoculación en animales de experimentación (ratones) y obtención de muestras para el análisis de la virulencia de mutantes, análisis de la protección conferida por los virus atenuados seleccionados y el análisis de drogas antivirales.

El confinamiento será el típico de una instalación de alta seguridad biológica (NCB-3). Todas las barreras de confinamiento y control garantizan su no diseminación al exterior, por tanto, nulo impacto ambiental. Todos los residuos generados serán objeto de recogida por gestores autorizados.

En los que respecta a la exposición humana, durante los procedimientos experimentales el personal trabajará con todos los EPIs (p. ej. equipos de protección individual de un solo uso, mascarilla FFP2 con válvula, capuz, respirador motorizado, guantes) y medidas de protección (p.ej. cabinas de bioseguridad de tipo II) que se especifiquen en las normas de trabajo establecidas.

Los animales se alojarán en jaulas de ratones conectadas a circuito de aire filtrado (racks ventilados).

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

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



Los residuos líquidos son inactivados por calor en el sistema de tratamiento de efluentes líquidos del que dispone la instalación. (Biowaste).

b. Gestión por una empresa externa: SÍ NO

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

SERVICIOS INTEGRALES DE MADRID (SIS)

X. PREVENCIÓN DE ACCIDENTES DE LA ACTIVIDAD NOTIFICADA

1. Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Siguiendo las Normas de trabajo establecidas y teniendo en cuenta el nivel de contención de la Instalación, es difícil que se produjera un accidente. En el manual de Bioseguridad están contemplados los pasos a seguir en caso de incidente o accidente y serán conocidos éstos por todos los usuarios

2. Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Sensores de verticalidad, equipos de protección individual de un solo uso, mascarilla FFP2 con válvula, capuz, respirador motorizado, guantes, cabinas de bioseguridad de tipo II, jaulas de ratones conectadas a circuito de aire filtrado (racks ventilados),

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

Los trabajadores recibirán toda la información por escrito y formación por parte de los técnicos responsables del laboratorio, necesaria antes de realizar la experimentación para así garantizar que el trabajo se realizará de forma segura.

4. Planes de emergencia y contingencia:

Los planes de emergencia son los incluidos en la memoria de la Instalación y serán conocidos por todo el personal que vaya a entrar en la misma