



PARTE A Y C

DIRECCION GENERAL CALIDAD Y
EVALUACIÓN AMBIENTAL

**Actividades de
tipo 3 y 4**

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

Dirección postal: Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Darwin 3. Campus Universidad Autónoma de Madrid. 28049 Madrid.

b. Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: José Mario Mellado García.

NIF: 13295208N.

Cargo: Director del CNB.

Tel: 91 585 45 03 / 4852.

Correo electrónico: direccion.cnb@csic.es

c. Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Marta López de Diego.

NIF: 01188723Z.

Cargo: investigadora principal

Tel: 915854552/ 682582856.

Correo electrónico: marta.lopez@cnb.csic.es

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

Nombre y apellidos: Fernando Usera Mena.

NIF: 00694865-N.

Cargo: Responsable del Servicio de Seguridad Biológica y Protección Radiológica.

Tel: 91 585 45 41.



Correo electrónico: fusera@cnb.csic.es

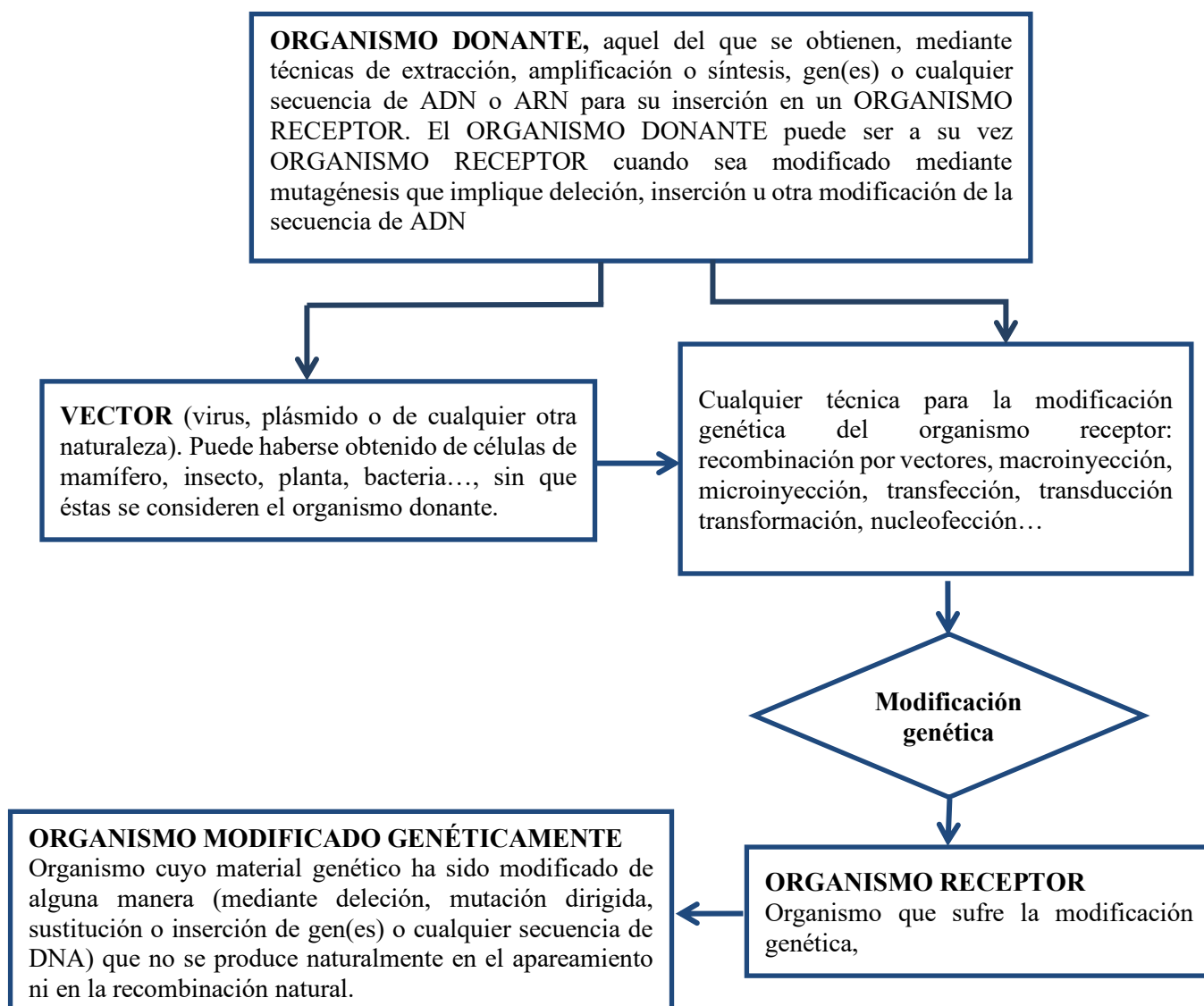
e. Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto:

Fernando Usera Mena

03/2023 Rev 1



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 NO

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

- Nombre de la convocatoria:

Consolidación Investigadora, Generación del conocimiento.

- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

CNS2022-135276, PID2021-123810OB-I00, IP: Marta López de Diego.

- Organismo financiador:

Ministerio de Ciencia e Innovación.

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/18/I-08, A/ES/00/I-08.

- Fecha de autorización de la instalación:

Julio 2018

Si el OMG no se genera en la instalación³:

- Nombre de la instalación de origen del OMG:

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

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.

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

³ Debe 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-...):

- 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:

3. Finalidad de la actividad:

-Introducción de deleciones de nucleótidos en las secuencias codificantes para ciertas proteínas, tales como GBP1, GBP6, TRIM34, MUC1, en las células A549 (células humanas epiteliales procedentes de adenocarcinoma pulmonar) y en las células 293T (células humanas epiteliales procedentes de riñón humano) para generar células knock-out para estos genes. Estas células knock-out nos permitirán analizar el efecto de estos genes en la replicación y en la inducción de respuestas inmunes innatas en células infectadas con el virus de la gripe y coronavirus (SARS-CoV-2). Estas células se generarán en el CNB-CSIC o se obtendrán a través de distintas empresas, tales como Abcam.

- Generación de células knock-out para el gen CD9. Las células a generar serán células A549, Calu-3 (células humanas de adenocarcinoma de pulmón) y células SW480 (células humanas de adenocarcinoma de colon). Estas células se usarán para analizar el efecto de estos genes en la replicación y en la inducción de respuestas inmunes innatas en células infectadas con el virus de la gripe y coronavirus (SARS-CoV-2).

- Generación de células knock-out para el gen PLAC8. Las células a generar serán las SUIT-2 (línea celular humana derivada de adenocarcinoma de páncreas) y MIAPaCa-2 (línea celular humana derivada de tejido tumoral de páncreas). Estas células se usarán para analizar el efecto de estos genes en la replicación y en la inducción de respuestas inmunes innatas en células infectadas con el virus de la gripe y coronavirus (SARS-CoV-2).

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).

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



Tipo 3

Tipo 4

III. INFORMACIÓN RELATIVA A LA OBTENCIÓN DEL OMG

1. Organismo receptor del cual deriva el OMG:

Células humanas/primates Detallar las líneas celulares: células humanas A549, 293T, Calu-3, SW480, SUIT-2, MIAPaCa-2

Taxonomía: células de la especie *Homo sapiens*

Células: otras Detallar las líneas celulares:

Animal

Planta

Bacteria

Hongo

Virus

Protozoos

-Especificar el nombre científico y común:

Taxonomía: células de la especie *Homo sapiens*

Nombre común: Células A549 epiteliales derivadas de un carcinoma de pulmón humanas, células 293T derivadas de cáncer de riñón, células Calu-3 derivadas de adenocarcinoma pulmonar, células SW480 derivadas de cáncer de colon, células SUIT-2 y MIAPaCa-2 derivadas de cáncer de páncreas.

a. Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

- i) Técnicas de aislamiento: A549: células establecidas altamente empleadas en los laboratorios. Proceden de un carcinoma de pulmón de un hombre de 58 años (https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-185.aspx?geo_country=es); 293T: células establecidas altamente empleadas en los laboratorios. Proceden del riñón de un paciente (<https://www.atcc.org/products/crl-3216>); Calu-3: células establecidas altamente empleadas en los laboratorios. Proceden de un adenocarcinoma pulmonar de un hombre de 25 años (<https://www.atcc.org/products/htb-55>); SW480: células establecidas altamente empleadas en los laboratorios. Proceden de un adenocarcinoma de colon (<https://www.atcc.org/products/ccl-228>); SUIT-2: células establecidas altamente empleadas en los laboratorios. Proceden de tejido tumoral de páncreas (https://www.cellosaurus.org/CVCL_3172) y MIAPaCa-2: células establecidas altamente empleadas en los laboratorios. Proceden de tejido tumoral de páncreas de un hombre de 65 años (<https://www.atcc.org/products/crl-1420>)

ii) Técnicas de identificación: No aplica

iii) Marcadores genéticos: No aplica

iv) Marcadores fenotípicos: No aplica



v) Estabilidad genética: No aplica

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 A549, 293T, Calu-3, SW480 y MIAPaCa-2 proceden de la “American Type Culture Collection (ATCC)”. Las células SUIT-2 proceden de Cellosaurus. En las hojas de seguridad de estas líneas celulares se indica que “no se conoce que estas líneas celulares causen enfermedad en humanos”. Estas líneas celulares se manejarán siempre en cabina y en laboratorios de bioseguridad de nivel 2.

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.

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):

No es patógeno

SI

Para:

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



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

Estas líneas celulares son muy comunes en muchos laboratorios, sin detectarse ningún problema de bioseguridad asociado a su uso. La investigadora principal lleva usando estas líneas celulares (sobretudo A549 y 293T) mas de 10 años sin haber detectado ningún problema de bioseguridad

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

- Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

esporas

endosporas

quistes

esclerocios

esporas asexuales (hongos)

esporas sexuales (hongos)

otros, especifíquese

NO

ii) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

No aplica

iii) Posibles nichos ecológicos:

No aplica

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*):

Ninguno



ii) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

Ninguna

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

El organismo receptor son células, que solo se encuentran en los laboratorios en las que se cultivan

j. Hábitat natural del organismo:

Ninguno, estas células solo están en el laboratorio

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 (sobreexpresión, silenciamiento, otros):

Generación de células knock-out, que no expresan el gen de interés

2. Tipo de modificación genética:

- Inserción de material genético
- Deleción 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:

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

SÍ NO

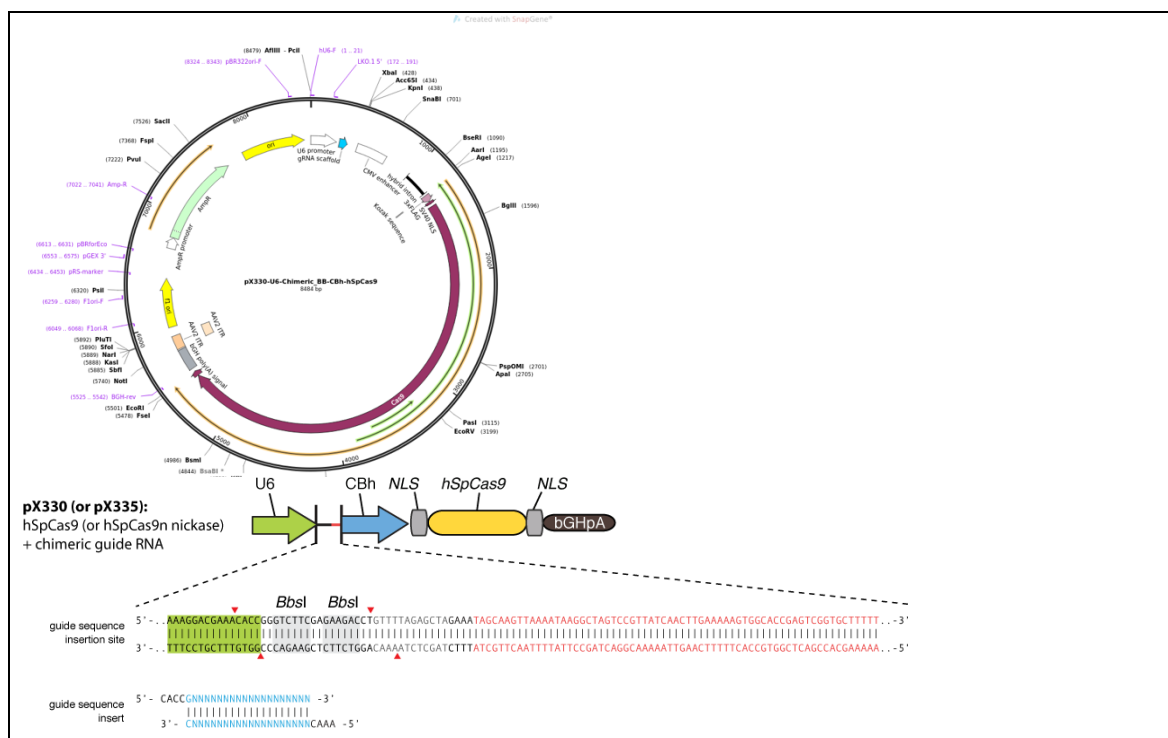
En caso afirmativo:

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

Plásmido px330.

- 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.

El plásmido codifica un gen de resistencia al antibiótico ampicilina (Amp) para seleccionar las bacterias en las que se ha introducido el plásmido mediante el crecimiento de las bacterias en medio con ampicilina. El plásmido codifica el gen de la proteína CAS9, orígenes de replicación en bacterias (f1 ori) y un sitio de clonaje con BbsI para introducir la secuencia de cDNA de los RNAs guías que se expresarán en las células eucariotas bajo el control del promotor U6.



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.

No aplica

b. Gama de hospedadores del vector:

El plásmido solo replica en las bacterias en las que deliberadamente se introduce el plásmido.

c. Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

ninguno

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

El vector no es un bacteriófago.

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

no

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

a. Función específica de cada parte de la secuencia insertada, deletionada o modificada:



El inserto son secuencias complementarias a los genes que se quieren deletar de unos 20 nucleótidos. Se utilizarán dos secuencias complementarias para cada gen, que se clonarán en el plásmido px330.

Los genes GBP1 y GBP6 son genes cuya expresión se induce por interferón (Tretina et al. JEM, 2019).

GBP-1 posee actividad antiviral frente al virus de la estomatitis vesicular, virus de la encefalomiocarditis y virus de la hepatitis C (Itsui et al. Hepatology, 2009; Anderson et al, Virology, 1999). El efecto de GBP6 en la replicación viral no se conoce aún.

La proteína TRIM34 pertenece a la superfamilia de proteínas con motivos tripartitos (TRIM), que modulan las respuestas inmunes innatas (Ozato et al. Nature Review Immunol, 2008). Además, TRIM34 tiene actividad antiviral frente al virus causante del SIDA (Ohainle et al. Plos Path, 2020).

La proteína PLAC8 está implicada en la autofagia celular, y posiblemente facilita la entrada del SARS-CoV-2 en las células (Ugalde et al. EMBO J, 2022).

La tetraspanina CD9 es una proteína del sistema inmune que participa en señalización intracelular, proliferación, activación, supervivencia, migración y adhesión de células inmunes (Reyes et al, Frontiers in Immunol, 2018).

b. Información sobre los genes estructurales:

c. Información sobre los elementos reguladores:

d. ¿Ha sido secuenciada?

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

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

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:



- Secuencias colindantes:

- 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

- Localización cromosómica:

- 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

Células knock-out para genes en estudio. La única diferencia con las células parentales será la delección de un número pequeño de nucleótidos (normalmente de 1 a 30 nucleótidos) en el gen de interés, de tal forma que la proteína de interés no se va a expresar.

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

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

no

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

no

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

El organismo receptor, y el OMG son células humanas, no patógenas para ningún organismo. El vector utilizado para la delección de nucleótidos (plásmido pX330) tampoco es patógeno. No se prevé ningún efecto para la salud humana, animal, ni vegetal ni ningún efecto para el medio ambiente.

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

No es diferente, no se esperan cambios sobre el medio ambiente. Las células no son capaces de crecer fuera de las condiciones de cultivo en las que se mantienen en los laboratorios.

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

No.

- f. Marcadores específicos del OMG:

El OMG (células knock-out) solo difiere de las células parentales en la delección de nucleótidos en los genes GBP1, GBP6, TRIM34, MUC1, CD9 y PLAC8.

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

El inserto no se integra en el OMG. Las secuencias introducidas en el plásmido servirán para sintetizar los RNAs guías en la célula. El RNA guía producido hibridará con el gen a noquear, y la proteína CAS9 (codificada en el plásmido) producirá un corte en el material genético, deleccionará unos nucleótidos, y la maquinaria de reparación de DNA celular volverá a ligar el material genético cortado. Este proceso es comúnmente conocido como sistema de generación de células knock-out mediante la técnica de CRISPR/CAS9. El OMG se mantendrá estable genéticamente



después de que las células se dividan. Las deleciones de nucleótidos se mantendrán con los pases de las células.

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

Ninguna

5. Descripción de métodos de identificación y aislamiento planificados:

- a. Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

Secuenciación de las regiones en las que se introducen las deleciones de nucleótidos. Western blot para verificar que las proteínas codificadas por los genes en los que se han introducido deleciones ya no se expresan.

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

El OMG no estará en el medio ambiente, solo en las placas de cultivo que se mantendrán en las instalaciones NCB2 o NCB3 (en este último caso solo cuando las células estén infectadas con SARS-CoV-2).



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).

Se generarán células knock-out para que los genes GBP1, GBP6, TRIM34, MUC1, CD9 y PLAC8 no se expresen en las células. El objetivo final es determinar si estos genes afectan de algún modo la replicación y la inducción de las respuestas inmunes innatas después de las infecciones con el virus de la gripe y SARS-CoV-2, comparando estos parámetros en las células parentales infectadas y en las células knock-out infectadas. Se generará una línea celular knock-out para cada gen.

Las células knock-out generadas se utilizarán para infectarlas con los virus SARS-CoV-2 y el virus de la gripe y analizar los títulos virales a distintos tiempos post-infección, en comparación con los títulos virales obtenidos en las células parentales. También se comparará la inducción de genes de respuesta inmune innata mediante PCR cuantitativa y Western blot en las células knock-out y las células parentales después de las infecciones virales.

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

Las células modificadas genéticamente se crecerán adheridas a placas de cultivos celulares. Como máximo se manejarán células en 5 placas de 100 mm de diámetro cada vez, equivalentes a 1×10^7 células en 10 ml por placa (total 5×10^7 células en 50 ml).

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

Las células modificadas genéticamente se crecerán adheridas a placas de cultivos celulares. Como máximo se manejarán células en 5 placas de 100 mm de diámetro cada vez, equivalentes a 1×10^7 células en 10 ml por placa (total 5×10^7 células en 50 ml).

- b. Número aproximado de plantas por ensayo:

0

- c. Número aproximado de animales por ensayo:

0

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).

3 años



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 son las células A549 de pulmón humanas, células de riñón humanas 293T, células Calu-3 de adenocarcinoma pulmones, células SW480 de adenocarcinoma de páncreas, y células tumorales de páncreas SUIT2, y MIAPaCa-2 que no cuentan con propiedades nocivas.

- b. Organismo donante.

Ninguno

- c. Inserto.

Las secuencias complementarias a los genes GBP1, GBP6, TRIM34, MUC1, CD9 y PLAC8, estas secuencias de nucleótidos **no** se integran en el genoma de las células, se acaban perdiendo y además, no tienen propiedades nocivas.

- d. Vector.

El vector usado para generar las células knock-out es el plásmido px330, sin propiedades nocivas. Este plásmido se pierde a medida que las células se van dividiendo. Este plásmido NO replica en las células eucariotas.

2. Identificar las posibles propiedades nocivas del OMG⁵

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

Las células knock-out para los genes GBP1, GBP6, TRIM34, MUC1, CD9 y PLAC8 no son nocivas para ninguna especie. No se espera que la delección de estos genes sea nocivo para las células. Asimismo, las células knock-out generadas no tienen propiedades nocivas.

- b. Efectos para el medio ambiente.

No se prevé ningún efecto nocivo para el medio ambiente.

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

Aunque las modificaciones genéticas que se van a realizar sobre las líneas celulares se clasifican como ACT tipo 2, dado que van a utilizarse para ser infectadas por el coronavirus SARS-CoV-2 se clasificarán como ACT tipo 3.

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.



La actividad se va a llevar a cabo en los laboratorios de contención de nivel 2 y 3, por lo que el organismo modificado estará confinado a este espacio y no saldrá en ningún momento del mismo. El riesgo de inoculación accidental las células knock-out es prácticamente nulo debido a la ausencia de material punzante y cortante en los laboratorios de nivel 2 y 3 de contención biológica y no hay riesgo de contagio por contacto.

El OMG son células knock-out que se crecerá adheridas a placas de cultivo. Las células knock-out no pueden sobrevivir fuera de las condiciones en las que se cultivan.

VIII. DESCRIPCIÓN DE LAS MEDIDAS DE PROTECCIÓN Y CONTROL ADOPTADAS DURANTE LA UTILIZACIÓN CONFINADA⁶

1. Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

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

2. Formación del personal adscrito:

Asistencia a cursos y seminarios:

Seminarios generales sobre normas de seguridad frente a agentes biológicos, químicos y radiactivos impartido por el Servicio de Bioseguridad del CNB.

Seminarios específicos sobre el Reglamento de Funcionamiento y Plan de Emergencias del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica del CNB.

Además, todos los trabajadores son supervisados y formados por la investigadora principal (Marta López de Diego) durante al menos dos semanas.

3. Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

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

4. Programas de mantenimiento de los sistemas de confinamiento y protección:

- La instalación dispone de un completo reglamento de funcionamiento donde se especifican las normas de higiene, protección, contención y gestión de residuos, tanto para el personal usuario como para el propio servicio de seguridad biológica. Con ello se pretende realizar una gestión integral en Bioseguridad. Todos los protocolos de manipulación, transporte y conservación de agentes biológicos y OMG, limpieza y sanitización de zona, esterilización e inactivación biológica se encuentran protocolizados por escrito y se dispone de programas de actuación para aquellos procedimientos en que sea conveniente.

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

⁶ En el caso de que la actividad se realice en una instalación ya autorizada, se deberán describir las medidas de protección adicionales a las descritas en el formulario B que se presentó en la solicitud para la autorización de la instalación, teniendo en cuenta el riesgo específico de la actividad.



- Tanto el laboratorio, como las instalaciones que aseguran las necesarias medidas de contención secundaria, disponen de variados medios de alarma “in situ” y en la consola de control central del edificio ante la ruptura accidental de las barreras de contención secundaria.
- El índice de ocupación de las dependencias cercanas al laboratorio es muy bajo al tratarse de servicios de apoyo a la investigación o de laboratorios de técnicas especiales de uso común. No hay ningún laboratorio con un grupo de investigación anexo a la instalación.
- El Centro Nacional de Biotecnología (CNB) se encuentra enclavado en una zona relativamente nueva del Campus de la Universidad Autónoma de Madrid. Esta zona se caracteriza por la amplitud existente entre los edificios que la constituyen, fundamentalmente otros centros de investigación.
- No existen zonas residenciales cercanas al CNB.
- No existen en las cercanías cultivos, explotaciones ganaderas, cotos, reservas de caza, o zonas naturales protegidas o con especial interés ecológico.

5. Programas de verificación y validación de los sistemas de confinamiento y protección:

La actividad de producción de células knock-out y de infección con el virus de la gripe se realizará en el laboratorio de actividad confinada tipo 2. Actividad en la cual el grado 2 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente.

La infección de las células con SARS-CoV-2 se producirá en el laboratorio de actividad confinada tipo 3. Actividad en la cual el grado 3 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente.

IX. GESTION E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS

1. Encargado de la gestión de residuos:

a. Gestión interna: SÍ NO

- Método de inactivación, forma final, destino de cada uno de los tipos de residuos generados:

Todos los residuos biológicos que se generen serán inmediatamente inactivados dentro de los recintos de contención (cabines de bioseguridad) mediante la utilización de germicidas de amplio espectro usados en rotación. Posteriormente, los residuos líquidos ya inactivados se enviarán a la planta de tratamiento de efluentes líquidos del laboratorio y los sólidos se autoclavarán. Los procedimientos de autoclavado y esterilización por calor en la planta “Biowaste” se han validado previamente y se validarán periódicamente mediante la utilización de kits de esporas del microorganismo testigo *Bacillus stearothermophilus*. Estas validaciones se han realizado a nivel interno (servicio de bioseguridad del CNB) y a nivel externo (empresas especializadas en validaciones de estos sistemas). Para mayor información remitirse a la solicitud de autorización de la instalación.

b. Gestión por una empresa externa: SÍ NO

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

CONSENER

X. PREVENCIÓN DE ACCIDENTES DE LA ACTIVIDAD NOTIFICADA



1. Condiciones en las que podría producirse un accidente:

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

2. Equipamiento de seguridad (especifíquese):

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

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

Cursos y seminarios:

Seminarios generales sobre normas de seguridad frente a agentes biológicos, químicos y radiactivos impartido por el Servicio de Bioseguridad del CNB.

Seminarios específicos sobre el Reglamento de Funcionamiento y Plan de Emergencias del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica del CNB.

Además, todos los trabajadores son supervisados y formados por la investigadora principal (Marta López de Diego) durante al menos dos semanas.

4. Planes de emergencia y contingencia:

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