



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: Urtzi Garaigorta de Dios; Pablo Gastaminza Landart

NIF: 20223585F; 44145453N

Cargo: Jefes de grupo

Tel: 915855399

Correo electrónico:

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

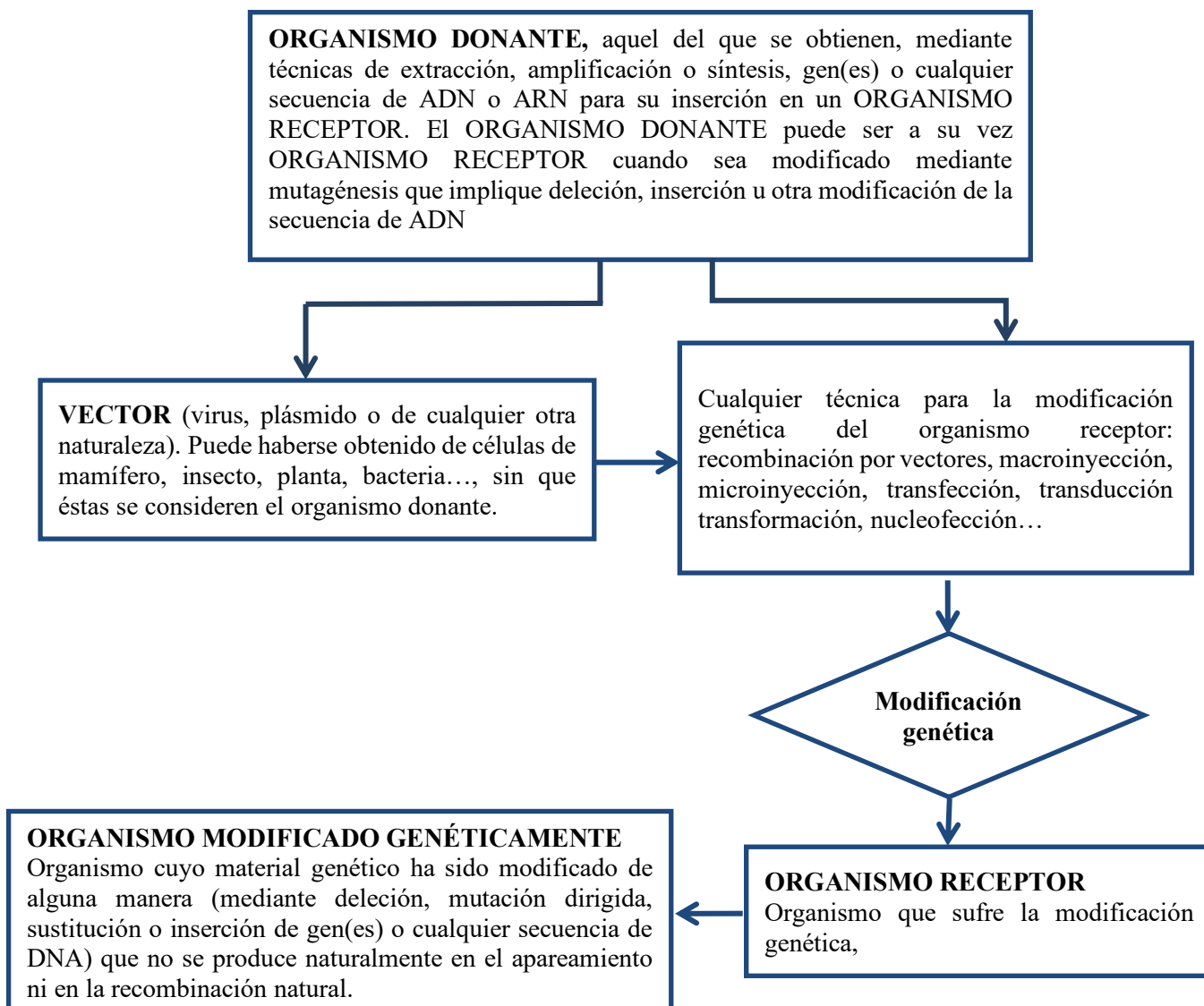
Correo electrónico: fusera@cnb.csic.es

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

Fernando Usera Mena



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:

- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

- Organismo financiador:

Otro tipo de financiación²

Las actividades a realizar serán cubiertas por un proyecto intramural especial del CSIC

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-..):

- Fecha de autorización de la instalación:

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:

La finalidad de la actividad es evaluar el potencial antiviral de compuestos químicos para controlar la propagación de SARS-CoV-2 en modelos de cultivo celular en células modificadas genéticamente cuya generación fue autorizada previamente por la Comisión Nacional de Bioseguridad (A/ES/21/113). En el contexto de las actividades detalladas en esta solicitud no se contempla el uso de vectores que dan lugar a la expresión de luciferasa y están aprobadas en la solicitud (A/ES/21/113).

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
Calu3, Caco2 y SH-SY5 | <input checked="" type="checkbox"/> | Detallar las líneas celulares: Huh7, A549, |
| Células: otras | <input type="checkbox"/> | Detallar las líneas celulares: |
| Animal | <input type="checkbox"/> | |
| Planta | <input type="checkbox"/> | |

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



- Bacteria
- Hongo
- Virus
- Protozoos

-Especificar el nombre científico y común:

Las Huh7 son células hepáticas que provienen de un hepatocarcinoma humano bien diferenciado.
Las A549 son células que provienen de un adenocarcinoma pulmonar humano.
Las Calu3 son células epiteliales que provienen de un adenocarcinoma pulmonar humano.
Las Caco2 son células inmortalizadas de adenocarcinoma colorrectal humano.
Las SH-SY5 son células provenientes de un neuroblastoma humano.

a. Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

- i)** Técnicas de aislamiento: Todas las líneas celulares se obtuvieron a partir de recesiones de tumores sólidos de pacientes con cánceres: hepático (Huh-7), pulmonar (A549 y Calu3), colorrectal (Caco2) o cerebral (SH-SY5)
- ii)** Técnicas de identificación: Estas líneas celulares se pueden identificar teniendo en cuenta aspectos morfológicos, crecimiento en adherencia en cultivo celular y sobre todo mediante análisis de SNPs y/o por técnicas de secuenciación masiva de genoma completo.
- iii)** Marcadores genéticos: Se desconoce si hay marcadores genéticos específicos y únicos para cada línea celular
- iv)** Marcadores fenotípicos: Se desconoce si hay marcadores fenotípicos específicos y únicos para cada línea celular
- v)** Estabilidad genética: En general las líneas celulares tumorales suelen presentar inestabilidad genética alta debido a las características propias de las células cancerosas, incluyendo: la desregulación del ciclo celular, falta de inhibición por contacto en el crecimiento, problemas en la reparación de los daños que se generan durante la replicación de DNA... En concreto un estudio reciente ha caracterizado la inestabilidad genómica de las Huh7 indicando que es una línea celular con una alta heterogeneidad celular caracterizada por una pérdida de heterocigosidad en alrededor de la mitad de las células (PMID: 29774518).

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 líneas celulares se amplifican en cabinas de flujo laminar para garantizar condiciones estériles que minimicen el riesgo de contaminación con agentes biológicos. Periódicamente se realizan ensayos de determinación de contaminación por micoplasma que permitan identificar contaminaciones por dicha bacteria.

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):

Las líneas celulares receptoras no se consideran patógenas en ningún caso.

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):

Ninguno

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:

Se trata de líneas células que utilizamos habitualmente en el laboratorio de nivel 2 de contención biológica, sin haber experimentado ningún tipo de problema de bioseguridad hasta el momento.

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:

Las líneas celulares sobreviven únicamente en condiciones de cultivo celular con medios adecuados y en condiciones atmosféricas controladas de temperatura, humedad y CO₂.

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*):

No aplica



ii) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

No aplica

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

Las líneas celulares se encuentran confinadas en el ámbito del laboratorio de nivel 2 de contención biológica.

j. Hábitat natural del organismo:

Las líneas celulares se encuentran confinadas en el ámbito del laboratorio de nivel 2 de contención biológica.

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

Humanos

Animal

Planta

Bacteria

Hongo

Virus

Vector retroviral auto-inactivable basado en el *virus Moloney murine leukemia* (MoMLV) perteneciente al Genero *Gammaretrovirus* de la Familia *Retroviridae*

Protozoos

-Especificar el nombre científico y común:

Vector retroviral auto-inactivable basado en el *virus Moloney murine leukemia* (MoMLV) perteneciente al Genero *Gammaretrovirus* de la Familia *Retroviridae*

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.

El retrovirus se produce en condiciones de esterilidad en cultivo celular y los lotes son sometidos a filtración para evitar cualquier tipo de contaminación por bacterias

NO

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

c. Modificación genética anterior:

SI

– Describir:



Estos vectores retrovirales han sido modificados genéticamente para dar lugar a la expresión del gen humano ACE2. Esta modificación genética ya fue solicitada anteriormente obteniéndose la correspondiente resolución de autorización (A/ES/21/113). En el contexto de las actividades detalladas en esta solicitud no se contempla el uso de vectores que dan lugar a la expresión de luciferasa y están aprobadas en la solicitud (A/ES/21/113).

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

No ha habido ningún tipo de cambio en la virulencia, ni en la patogenicidad, ni tropismo, ni toxicidad de lo.

- 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 MoMLV es un patógeno natural de especies de roedores donde puede causar cánceres de tipo leucemia. Los vectores retrovirales a utilizar para transducir las células diana dan lugar a ciclos abortivos de infección. El riesgo más significativo es el de autoinoculación durante la manipulación, ya que estos vectores se integran en la célula diana. El riesgo biológico es muy bajo, aunque en casos en que se sobreexpresen genes con reconocido carácter patogénico deberían tomarse precauciones adicionales, aunque no es el caso del vector retroviral que expresa el gen humano de ACE2

SI Para:

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

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

Ninguno

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.):

Cassette de expresión del gen humano ACE2 clonado en el genoma del retrovirus

- g. Método de obtención:

- Extracción
- PCR
- Síntesis *in vitro*



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

El gen humano ACE2 no tiene ninguna función en el organismo donante

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

No, ya que los vectores retrovirales del tipo MoMLV no infectan de manera natural a líneas células en el laboratorio a menos que se expongan a ellos de manera experimental.



IV. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

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

La modificación genética consiste en la introducción del gen humano ACE2 en líneas celulares con el objetivo de hacerlas susceptibles a la infección por el virus SARS-CoV-2 y poder así estudiar la propagación del virus en cultivo celular y estudiar el potencial antiviral de compuestos químicos.

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:

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):

Vector retroviral del tipo MoMLV

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.

Ver punto ii) y anexo.

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.

La producción de vectores retrovirales se lleva a cabo en la línea celular HEK293T en incubadores a 37°C del laboratorio P2; las células se crecen en placas de cultivo de 100 cm² de superficie, como máximo se cultivarán 3 placas de cultivo por experimento. Las células se transfectan transitoriamente con tres plásmidos: (i) el *plásmido retroviral genómico* auto-inactivado (CBC-ACE2), (ii) el plásmido empaquetador (pMMLV-GalPol) y (iii) el plásmido que expresa la glicoproteína G del VSV (pCMV-VSV.G). Se recogerán los sobrenadantes de los cultivos conteniendo retrovirus a las 40-48 horas después de la transfección. El volumen máximo de cultivo por experimento será 30 ml y se esperan títulos virales de aproximadamente 10⁷ tu/ml. La producción de este vector retroviral fue descrito en la comunicación a la Comisión Nacional de Bioseguridad (A/ES/21/113).

Los mapas y secuencias de los plásmidos utilizados para rescatar el vector retroviral se aportan en el anexo adjunto

b. Gama de hospedadores del vector:

EL vector retroviral está pseudotipado con la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) por lo que tiene la capacidad de infectar líneas celulares muy diversas incluyendo las mencionadas en esta solicitud: Huh-7, A549, Calu3, Caco2 y SH-SY5.

c. Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

El vector retroviral está atenuado, por lo que es incapaz de amplificarse ni propagarse

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

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

El vector retroviral expresa el gen de resistencia a blasticidina que se utiliza para seleccionar las células transducidas con el vector.

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

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

El gen humano ACE2 que se insertará en las líneas celulares es el receptor natural para la entrada de algunos coronavirus como el SARS- CoV-2

b. Información sobre los genes estructurales:

No aplica

c. Información sobre los elementos reguladores:

El cassette de expresión del gen ACE2 está flanqueado por las secuencias LTRs que son elementos reguladores necesarios para la generación del vector retroviral y para la integración del genoma retroviral en la célula diana, dando lugar a la generación del OMG.

d. ¿Ha sido secuenciada?



Se ha verificado la presencia y naturaleza del gen ACE2 a nivel de secuencia en el vector retroviral mediante secuenciación. Su expresión a nivel del OMG resultante en células se ha evaluado por selección antibiótica y por western-blot.

- 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 episódica

- Número de copias:

- Se dispone de información sobre la estabilidad del vector

- b. Si el vector es un virus:

i) Se mantiene en forma episódica

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:

ii) Existe la posibilidad de formación de partículas víricas. Justificar:

No, el vector retroviral no es replicativo por lo que no se pueden generar partículas víricas.

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) Se ha verificado la expresión del gen ACE mediante RT-qPCR en las líneas celulares transducidas con el vector retroviral

iii) Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas) Se ha verificado la expresión de la proteína ACE mediante Western-blot en las líneas celulares transducidas con el vector retroviral



V. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE (OMG)

1. Descripción del OMG final

Se trata de líneas celulares humanas (Huh-7-ACE2, A549-ACE2, Calu3-ACE2, Caco2-ACE2 y SH-SY5-ACE2) que sobreexpresan el gen humano ACE2, que es el receptor del virus SARS-CoV-2.

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, las líneas celulares no sobreviven fuera de las condiciones de cultivo celular

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

No es esperable que la tasa de reproducción de las líneas celulares sea diferente a las líneas originales de las cuales derivan.

- 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:

No se trata de líneas patogénicas y la sobreexpresión de ACE2 no se espera que de lugar a ningún cambio al respecto.

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

Las líneas celulares se mantendrán en laboratorios de nivel 2 y 3 de contención biológica por lo que no hay efectos sobre el medio ambiente.

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

La única diferencia de los OMGs con respecto a las líneas parentales es que las primeras se mantienen en medio de cultivo (DMEM + 10% FBS) suplementado con blasticidina para asegurar el mantenimiento y expresión del transgén.

- f. Marcadores específicos del OMG:

Sobreexpresan el gen ACE2 y son susceptibles a infección por SARS-CoV-2, mientras que las células parentales no lo son.

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

Los OMGs generados por transducción retroviral suelen ser muy estables en cuanto a su capacidad de expresar el transgén. Además, se cultivan en presencia de blasticidina para garantizar que en caso de inestabilidad genómica y pérdida del transgén las células no puedan sobrevivir. Habitualmente sometemos este tipo de líneas celulares a 25-30 pases sin observar alteraciones significativas en su crecimiento, en su capacidad de resistir la selección con blasticidina, ni en la expresión del transgén, lo que sugiere una alta estabilidad genómica.



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

Ninguna ya que estas líneas celulares se mantienen en laboratorios de nivel 2 y 3 de contención biológica.

5. Descripción de métodos de identificación y aislamiento planificados:

a. Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

Expresión del transgén mediante western-blot o RT-qPCR; resistencia a blasticidina; susceptibilidad a infección por SARS-CoV-2.

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

No aplica, ya que el OMG no va a abandonar en ningún momento las instalaciones de nivel 2 y 3 de contención biológica.



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).

Las líneas celulares modificadas genéticamente para expresar el gen humano ACE2 se utilizarán en experimentos de infección con el virus SARS-CoV-2 en instalaciones de nivel 3 de contención biológica, con la finalidad doble, por una parte, de estudiar el crecimiento y propagación viral, y, por otra parte, evaluar la capacidad de compuestos químicos para interferir con dicha infección. Esto nos permitirá identificar, optimizar y caracterizar el mecanismo de acción de nuevos compuestos antivirales en el contexto de la búsqueda de antivirales contra virus patógenos humanos.

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

No aplica

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

No aplica

- b. Número aproximado de plantas por ensayo:

No aplica

- c. Número aproximado de animales por ensayo:

No aplica

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).

Al menos 5 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.

Las líneas celulares descritas no se consideran patógenas ni nocivas

b. Organismo donante.

Los vectores retrovirales utilizados para generar los OMGs son deficientes en replicación y propagación, pero mantienen su capacidad para integrarse en el genoma celular. Por lo tanto, existe el riesgo potencial de integración en la persona por manipulación accidental y dependiendo de la localización de dicha integración en el genoma celular podría dar lugar a un proceso de transformación celular y el desarrollo de un tumor. Aunque posible, éste se considera un riesgo muy poco probable ya que todas las manipulaciones se realizan con equipos de protección individual (bata, guantes y gafas) en cabinas de flujo laminar y con material plástico, no punzante, para minimizar el posible riesgo.

c. Inserto.

En cuanto a la sobreexpresión del gen ACE2, no es esperable que dicha manipulación de lugar a un mayor riesgo que las descritas para el organismo receptor,

d. Vector.

Para generar el vector retroviral se utilizará el plásmido genómico retroviral CBC-ACE2 que da lugar a la expresión del gen ACE2. Como se ha explicado anteriormente el vector tiene la capacidad de integrarse (ver descripción en el apartado VII1b. Organismo donante).

2. Identificar las posibles propiedades nocivas del OMG⁵

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

Las líneas celulares generadas no tienen efectos sobre la salud humana, animal o vegetal. Además, se mantendrán en laboratorios de nivel 2 y 3 de contención biológica y únicamente abandonarán dichas instalaciones tras ser sometidos a inactivación química.

b. Efectos para el medio ambiente.

Las líneas celulares generadas no tienen efectos sobre el medio ambiente. Además, se mantendrán en laboratorios de nivel 2 y 3 de contención biológica y únicamente abandonarán dichas instalaciones tras ser sometidos a inactivación química

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

Las fases críticas de bioseguridad tienen que ver con la infección de las líneas celulares con el virus SARS-CoV-2. Se utilizará un aislado clínico de SARS-CoV-2 de la cepa NL/2020 obtenido del laboratorio del Dr. Molenkamp (Universidad Erasmus, Rotterdam, Países Bajos) perteneciente al repositorio europeo EVAG. El SARS-CoV-2 es un virus que se transmite por vía aérea por lo que procesos de centrifugación o formación de aerosoles podrían suponer un riesgo de bioseguridad durante la manipulación del virus. Es por ello que 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 perceptivos 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

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



esperar diez minutos antes de sacarlo. Las personas que realicen estas manipulaciones habrán sido entrenadas adecuadamente en el manejo de virus patógenos humanos en instalaciones de nivel 3 de contención biológica para minimizar cualquier riesgo potencial.

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

Todos los experimentos de infección con el SARS-CoV-2 se realizarán en las instalaciones de nivel 3 de contención biológica siguiendo las normas de bioseguridad establecidas y recogidas en el reglamento de funcionamiento del laboratorio de cultivo de nivel 3 del CNB.

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

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:

El personal adscrito ha recibido la formación e información indicada en “Descripción de la información suministrada a los trabajadores”, apartado que se adjuntó a la documentación para la solicitud de autorización del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica.

Todo el personal implicado tiene experiencia en la manipulación de los agentes biológicos que se indican en esta solicitud y su formación académica es licenciatura o doctorado.

3. Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

Viene descrito en el apartado 6.F del reglamento de funcionamiento de la instalación que se incluyó en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio

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

Vienen descritos en los apartados 6.B, 6.C, 6.D y 6.G. del Reglamento de funcionamiento de la instalación que se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

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

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.



Vienen descritos en el apartado 6.D. del Reglamento de funcionamiento de la instalación y más específicamente en “Procedimientos y planes de comprobación de la eficacia permanente de las medidas de confinamiento”. Esta información se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio Además el servicio de seguridad biológica velará por el cumplimiento de las normas de control de acceso, manipulación, descontaminación, esterilización, sanitización, etc. según se indica en diferentes apartados del citado Reglamento.

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:

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

b. Gestión por una empresa externa: SÍ NO

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

Consenur

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 incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio

2. Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Viene indicado en el Plan de emergencias y evacuación incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio

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

Documentación:

- Manual de Seguridad e Higiene en los laboratorios del CNB.
- Reglamento de Funcionamiento y Plan de Emergencias del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica del CNB.
- Procedimientos Normalizados de Trabajo del Servicio de Bioseguridad del CNB.

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.

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.