



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

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

I. INFORMACIÓN GENERAL

A. Notificador

1) Nombre y titulación del responsable de la notificación:

Antonio Bernad Miana; Profesor de Investigación del CSIC.

2) Centro, Institución o Empresa:

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

3) Domicilio:

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC).
Campus Universidad Autónoma. Cantoblanco.
28049-Madrid

4) Persona de contacto:

Fernando Usera Mena
Responsable del Servicio de Protección Radiológica y Seguridad Biológica
Tel: 915854541
Fax: 915854506
Correo electrónico: fusera@cnb.uam.es



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

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

7/03/01

- 2) Número de Notificación:

A/ES/00/I-8

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

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

Antonio Bernad Miana
Profesor de Investigación del CSIC
E-mail: abernad@cnb.uam.es

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

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



II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1) Finalidad de la actividad:

Se plantea el desarrollo de una terapia génica anti-VIH. Concretamente se trata de destruir de forma selectiva las células infectadas con provirus latentes, para los cuales no existe en la actualidad ninguna terapia que pueda eliminarlos. Para ello se evaluará la acción de genes anti-VIH sobre las líneas celulares J1.1 y ACH-2, que están infectadas con provirus latentes (estas líneas proceden del NIH, AIDS Research and Reference Reagent Program).

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

Actividad confinada de Tipo 3. Actividad en la cual el grado 3 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente.

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

1) Nombre científico: Vector derivado del virus VIH-1

Taxonomía: Lentivirus

Nombre común: Vector lentiviral

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento:

El vector se obtiene a partir de bacterias XL1blue (E. Coli) transformadas con dicho vector purificado. Se utilizan técnicas de aislamiento y purificación de DNA plasmídico (Plasmid Purification Maxi Kit, JET star, GENOMED Genycell Biotech España SL).

b) Técnicas de identificación:

El vector se puede identificar por análisis de restricción enzimática. Digerido con BamHI (enzima única que lineariza el vector), se obtiene un fragmento de 8047 pares de bases. Además se realizará secuenciación.

c) Marcadores genéticos:

El vector presenta resistencia a ampicilina bajo un promotor de células procariotas. Como marcador, este vector expresa la proteína verde fluorescente (EGFP) en las células eucariotas que son transducidas con este vector.



d) Marcadores fenotípicos:

Como presenta resistencia a ampicilina, (bajo un promotor de células procariontas) es capaz de conferir a las bacterias XL1blue (E.Coli), que se utilizan para obtener grandes cantidades de vector, la capacidad de crecer en un medio de cultivo que contenga ampicilina.

e) Estabilidad genética:

Estable.

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

Para la generación de los vectores desarrollados a partir del VIH-1 que se utilizan (3ª generación), se eliminó de la estructura del virus original los genes que se relacionan con la patogenicidad del virus; los genes que son necesarios para la generación de las partículas virales integrativas pero defectivas en replicación, se aportan en unos vectores plasmídicos accesorios. El vector contendrá la información concerniente al gen de interés y un gen marcador (EGFP). Los plásmidos accesorios suministran la información necesaria para la retrotranscripción y expresión génica del genoma defectivo en la célula diana. En este caso son el gen *gag* que codifica proteínas de la matriz proteica entre la envuelta y la cápsida, proteínas que forman la cápsida, y proteínas encargadas de empaquetar el genoma; el gen *pro/pol* que codifica proteínas necesarias para el procesamiento de la poliproteína gag-pro-pol, la RT responsable de la conversión del genoma viral a ADN de doble cadena y la integrasa viral; el gen *env* que codifica la envuelta; y el gen *rev* que codifica la proteína encargada de la exportación de los transcritos virales. El virus original además contiene información que ha sido eliminada para la generación del vector y que no es necesaria para que el proceso de transducción de las células diana sea eficiente. Estos genes presentes en el virus pero no en el vector son el gen *tat* que codifica el activador transcripcional del LTR viral; el gen *nef* que codifica una proteína encargada de la modulación negativa de CD4 y MHC-1; el gen *vif* cuya función se desconoce, pero se sabe que aumenta la infectividad; el gen *vpr* que codifica una proteína de transporte nuclear de complejos de preintegración; y el gen *vpu* que codifica una proteína responsable de la degradación selectiva de CD4.

Las modificaciones generadas para desarrollar el vector hacen que la regeneración del virus original sea prácticamente imposible. Para incrementar aún más la bioseguridad de estos sistemas de transferencia génica, se eliminaron los elementos transcripcionales del VIH-1 haciendo estos vectores autoinactivantes (*self inactivating*, SIN). En los vectores SIN se deleta un fragmento en la región U3 del LTR del extremo 3' del ADN. Esta deleción es transferida al LTR en 5' del ADN proviral durante la retrotranscripción; se elimina una región suficientemente grande como para interrumpir la actividad transcripcional del LTR viral. El título y la capacidad de transducción de estos vectores no



se ve alterada en absoluto por esta modificación. Otra ventaja que presentan los vectores lentivirales SIN es que la expresión del transgén queda bajo control del promotor del vector, lo que permite controlar expresión del gen de interés mediante promotores específicos de tejido o promotores inducibles.

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

SI NO

No se considera patógeno por los motivos explicados en el apartado 3.

- 5) En caso afirmativo, especificar para qué clase de los organismos (seres humanos, animales, plantas) se considera patógeno este organismo, vivo o muerto, y/o sus productos extracelulares:

No aplica

- 6) Si el organismo receptor o parental es patógeno para los seres humanos, especificar el grupo de riesgo asignado de acuerdo con la legislación comunitaria existente, (en particular la Directiva 2000/54/CE) o según otros sistemas de clasificación nacionales o internacionales (OMS, NIH, etc.):

No aplica porque no es patógeno.

- a) ¿De que modo se manifiesta la patogenicidad?

No aplica

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

SI NO

¿Por qué?:

Porque las modificaciones generadas para desarrollar el vector hacen que la regeneración del virus original sea prácticamente imposible.

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

Si

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



El personal del laboratorio del Dr. Antonio Bernad, dispone de 7 años de experiencia en el diseño, manejo y producción de vectores lentivirales derivados del VIH-1.

9) Información sobre la capacidad de supervivencia y de reproducción en el medio ambiente:

No aplica.

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

No

En caso afirmativo:

b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo: No

- | | |
|-------------------------------|--------------------------|
| i) esporas | <input type="checkbox"/> |
| ii) endosporas | <input type="checkbox"/> |
| iii) quistes | <input type="checkbox"/> |
| iv) esclerocios | <input type="checkbox"/> |
| v) esporas asexuales (hongos) | <input type="checkbox"/> |
| vi) esporas sexuales (hongos) | <input type="checkbox"/> |
| vii) virus | <input type="checkbox"/> |
| viii) otros, especifíquese: | |

c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

No aplica

d) Posibles nichos ecológicos:

No aplica

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No aplica

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

No aplica

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

No aplica

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



No aplica

12) Hábitat natural del organismo:

No aplica

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: Homo Sapiens Sapiens

Taxonomía: Homo Sapiens

Nombre común: Hombre

2) Tipo de material genético utilizado para la transformación:

Secuencias relacionadas con el proceso de infección y desarrollo de la patogenicidad del virus VIH-1 obtenidas a partir de bibliotecas de cDNA humanas.

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

Identificar secuencias "protectoras" frente a la infección por VIH-1.

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

SI NO

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos: No aplica

- | | | |
|------|---------------|--------------------------|
| I) | seres humanos | <input type="checkbox"/> |
| II) | animales | <input type="checkbox"/> |
| III) | plantas | <input type="checkbox"/> |

b) ¿De que modo se manifiesta la patogenicidad?

No aplica

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

No



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

El genoma del parental, que es el vector lentiviral, sí se integra en el genoma del donante, que es el homo sapiens pero sólo cuando está en forma de partícula infectiva defectiva, no en forma de plásmido. Las partículas infectivas-defectivas del vector sólo se obtienen tras la cotransfección del vector lentiviral con los plásmidos accesorios en células 293T (humanas).

V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

- 1) Tipo de modificación genética:

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

- 2) Finalidad de la modificación genética:

Realizar experimentos con un vector lentiviral con genes anti-VIH sobre las líneas celulares J1.1 y ACH-2, que están infectadas con provirus latentes. Estas líneas proceden del NIH, AIDS Research and Reference Reagent Program. Estos experimentos se encuadran en un proyecto de investigación para el desarrollo de terapia génica anti-VIH. Concretamente se trata de destruir de forma selectiva las células infectadas con provirus latentes, para los cuales no existe en la actualidad ninguna terapia que pueda eliminarlos.

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

Las secuencias génicas de interés serán clonadas en el vector lentiviral por técnicas de clonaje estándar.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

- a) Tipo e identidad del vector: No aplica
- b) Dimensiones del vector (pares de bases): No aplica
- c) Aportar mapa de restricción del vector (funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación, origen, función y secuencia de otros elementos presentes en el vector): No aplica



- c) Gama de hospedadores del vector: No aplica
- d) Características de la movilidad del vector: No aplica
 - i) factores de movilización
 - ii) Si el vector es un bacteriófago, un cósmido o un fásrido, ¿se han inactivado sus propiedades lisogénicas?
 - iii) ¿Puede transferir el vector marcadores de resistencia a otros organismos?

5) Información del inserto:

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

Insertos de tamaño variable entre 500 y 5000 pares de bases. Actualmente estamos trabajando en la obtención de dichas secuencias para clonarlas en el vector lentiviral. El efecto de estas secuencias es, *a priori*, imprevisible. En particular nos interesarán aquellas secuencias que presenten un efecto biológico relacionado con proceso de infección y la virulencia del VIH.

Dichas secuencias serán cuidadosamente analizadas y secuenciadas.

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

Se está trabajando en ello y aún se desconoce el origen y función de cada parte del inserto.

- c) Descripción del método utilizado para la transformación:

No aplica

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

Los genes de interés serán aquellos que permitan la destrucción de forma selectiva de células infectadas con provirus latentes.

- e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto:

Información todavía no disponible

- f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

En el momento en que sea identificada una secuencia con características potencialmente terapéuticas será inmediatamente secuenciada.

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

Actualmente no se dispone de dicha información porque aún no se han secuenciado.



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

No dispondremos de dicha información hasta que lo secuenciamos.

VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre? No

En caso afirmativo:

I) Número de copias: No aplica

II) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?: No aplica

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares? Si

En caso afirmativo:

I) Número de copias:
Una copia por genoma

II) Localización cromosómica:
Aleatoria

III) Secuencias laterales:
Desconocidas

IV) ¿La inserción inactiva la expresión de otros genes?:

Como se trata de una inserción aleatoria en el genoma celular las consecuencias son a priori impredecibles.

c) Si se trata de un virus: Vector lentiviral autoinactivante

I) Es defectivo

II) Es potencialmente inducible

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

Una vez tengamos identificadas las secuencias de interés se procederá a realizar un minucioso análisis de las mismas que incluirá por supuesto, las técnicas mencionadas en este apartado.

I) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación)

II) Transcripcionales (síntesis de niveles de mRNA)



III) Traduccionales (síntesis de niveles de proteínas)



Aportar toda la documentación al respecto.

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

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

No, en ambos casos se trata de un vector lentiviral autoinactivante.

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 los posibles efectos sobre el medio ambiente? En caso afirmativo, especifíquese:

No

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

No

e) Marcadores específicos del OMG:

Sólo aquellos que puedan estar incluidos en las secuencias que clonemos.

3) Estabilidad genética del OMG (Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones)

Estable

4) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos:

No, a no ser que se produjera un accidente por punción o inoculación.

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

El OMG puede conferir propiedades oncogénicas al integrarse en el genoma de las células diana, esto sería posible si consecuencia de la integración se alterara algún gen o secuencia reguladora implicada en el mecanismo de desarrollo de tumores.



El vector no es peligroso *per se*, lo peligroso son los efectos que se producen en las células que integran dicho vector en el genoma. La consecuencia de la integración y la expresión de las secuencias objeto de estudio es que las células quedan genéticamente modificadas y su comportamiento puede quedar alterado. Por esta razón, se va a trabajar en un laboratorio de nivel 3 de contención biológica.

6) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados.

a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG.

El OMG es fácilmente diferenciable del parental por tamaño (análisis con enzimas de restricción). La diferencia en tamaño se corresponderá con el tamaño del inserto clonado, que como hemos indicado oscilará entre 500 y 5000 pares de bases. Además por secuenciación son también identificables tanto el parental como el modificado.

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

El OMG no puede permanecer en el medio ambiente.

VII. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

1) Naturaleza de las operaciones:

- | | | |
|------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| a) Enseñanza | <input type="checkbox"/> | Volumen máximo: |
| b) Investigación | <input checked="" type="checkbox"/> | Volumen máximo: 50 ml |
| c) Desarrollo | <input type="checkbox"/> | Volumen máximo: |

2) Periodo propuesto para la utilización confinada:

Se estima un periodo de trabajo de unos 3 años

3) Finalidad de la utilización confinada, incluidos los resultados esperados:

En una primera fase se realizarán experimentos con un vector lentiviral con genes anti-VIH sobre las líneas celulares J1.1 (derivada de la línea Jurkat, presenta una morfología linfocítica) y ACH-2 (línea celular humana originada a partir de células T; de ambas líneas, J1.1 y ACH-2, se adjunta la información original disponible), que están infectadas con provirus latentes. Estas líneas proceden del NIH, AIDS Research and Reference Reagent Program.

Más adelante prevemos la posibilidad de hacer nuevos experimentos con el mismo vector anti-VIH y linfocitos CD4+ de pacientes. Mediante métodos sustractivos se aislarán los linfocitos CD4+ de memoria, en los cuales se encuentran los provirus latentes en los pacientes. Al trabajar con células quiescentes la producción de partículas infecciosas de



VIH es también muy baja por lo que el riesgo es similar al experimento anterior, ya que el metabolismo de las células quiescentes está muy ralentizado y por tanto la producción de partículas virales es prácticamente nula.

Estos experimentos se encuadran en un proyecto de investigación para el desarrollo de terapia génica anti-VIH. Concretamente se trata de destruir de forma selectiva las células infectadas con provirus latentes, para los cuales no existe en la actualidad ninguna terapia que pueda eliminarlos

- 4) Descripción de los métodos de manejo de los OMG (incluyendo descripción de las fases de cultivo y concentración máxima de OMG en el cultivo):

En el laboratorio P3 se transducirán las células con las preparaciones del vector producidas en la Universidad de Jaén. Se realizarán cinéticas de muerte celular por apoptosis y de producción de partículas infecciosas mediante cuantificación del antígeno p24 con un ELISA comercial.

Infección de las líneas celulares J1.1 y ACH-2 con vectores lentivirales:

Sobre la población diana (100000 células por placa y entre 6 y 10 placas por experimento) se añade un volumen de 2-3 ml por placa de sobrenadante infectivo (título entre 10^8 y 10^6) y se mantiene en contacto aproximadamente 8 horas. Las células genéticamente modificadas se mantendrán en cultivo un periodo de tiempo variable en función de la finalidad del experimento. De las células modificadas se extraerá material proteico y genómico para realizar los estudios necesarios para la identificación y caracterización de las secuencias implicadas en la defensa frente al virus VIH. Este material ya extraído no presenta ningún tipo de riesgo biológico.

Los restos celulares y de sobrenadante se inactivarán y se desecharán según la normativa del laboratorio de nivel 3 de contención biológica.

- 5) Descripción de las medidas de confinamiento y protección que vayan a aplicarse incluida la información relativa a la gestión de los residuos (tratamiento, forma y destino final):

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

- 6) Resultados previstos:

Se plantea el desarrollo de una nueva terapia anti VIH. Concretamente se trata de destruir de forma selectiva las células infectadas con provirus latentes, para los cuales no existe en la actualidad ninguna terapia que pueda eliminarlos.



VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

El riesgo de contaminación en dependencias cercanas a la instalación o en el medio ambiente externo al Centro Nacional de Biotecnología es prácticamente inexistente por las siguientes razones:

-El laboratorio está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios, resaltándose el sistema de tratamiento de aire y el sistema de inactivación biológica de efluentes líquidos. Es más, consideramos que el nivel de contención obtenido excede en determinados parámetros el exigido por la legislación para las operaciones confinadas de tipo 3.

-Estos medios e infraestructura ya se han validado previamente por una empresa externa y serán validados por ésta empresa u otras anualmente o tras averías. Igualmente, el servicio de Seguridad Biológica validará periódicamente a nivel interno todos los métodos y sistemas de inactivación biológica y esterilización mediante la utilización de microorganismos testigo utilizando diferentes métodos.

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

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

-Tanto el laboratorio, como las instalaciones que aseguran las necesarias medidas de contención secundaria, disponen de variados medios de alarma "in situ" y en la consola de control central del edificio ante la ruptura accidental de las barreras de contención secundaria.

-El índice de ocupación de las dependencias cercanas al laboratorio es muy bajo al tratarse de servicios de apoyo a la investigación o de laboratorios de técnicas especiales de uso común. No hay ningún laboratorio con un grupo de investigación anexo a la instalación.

-El Centro Nacional de Biotecnología (CNB) se encuentra enclavado en una zona relativamente nueva del Campus de la Universidad Autónoma de Madrid. Esta zona se caracteriza por la amplitud existente entre los edificios que la constituyen, fundamentalmente otros centros de investigación.

-No existen zonas residenciales cercanas al CNB.

-No existen en las cercanías cultivos, explotaciones ganaderas, cotos, reservas de caza, o zonas naturales protegidas o con especial interés ecológico.



- 2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

Clima continental-mediterráneo con primaveras y otoños húmedos e inviernos y veranos secos, fuerte gradiente de temperaturas estacional. Viento predominante N.O.

- 3) Notificación de la instalación: indicar las secciones donde se desarrolla la actividad objeto de la notificación, con indicaciones de la categoría de confinamiento prevista:

Las operaciones indicadas se realizarán en uno de los tres sublaboratorios del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica con autorización del 7/03/01; número de notificación: A/ES/00/I-8

IX. DESCRIPCIÓN DE LAS MEDIDAS DE PROTECCIÓN Y CONTROL ADOPTADAS DURANTE LA UTILIZACIÓN CONFINADA

- 1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

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

- 2) Formación del personal adscrito:

El personal adscrito ha recibido la formación e información indicada en “Descripción de la información suministrada a los trabajadores”, apartado que se adjunta 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 ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

- 4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:

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



5) Programas de inspección y control del confinamiento:

Vienen descritos en el apartado 6.D. del Reglamento de funcionamiento de la instalación y más específicamente en “Procedimientos y planes de comprobación de la eficacia permanente de las medidas de confinamiento”.

Esta información se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio

Además el servicio de seguridad biológica velará por el cumplimiento de las normas de control de acceso, manipulación, descontaminación, esterilización, sanitización, etc. según se indica en diferentes apartados del citado Reglamento.

6) Gestión de residuos (describir el sistema utilizado para cada tipo de residuo y quien lo lleva a cabo):

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

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

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

X. PREVENCIÓN DE ACCIDENTES (Cumplimentar para los tipos 2, 3 y 4)

1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

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

2) Equipamiento de seguridad (especifíquese):

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

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

Documentación:

- Manual de Protección Radiológica, Seguridad Biológica y Química del CNB.
- Reglamento de Funcionamiento y Plan de Emergencias del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica del CNB
- Procedimientos Normalizados de Trabajo del Servicio de Seguridad Biológica del CNB.



Cursos y seminarios:

- Seminarios generales sobre normas de seguridad frente a agentes biológicos, químicos y radiactivos impartido por el Servicio de Protección Radiológica y Seguridad Biológica del CNB.
- Seminarios específicos sobre el Reglamento de Funcionamiento y Plan de Emergencias del laboratorio de cultivos "in vitro" de nivel 3 de contención biológica del CNB

4) Planes de emergencia:

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



**EVALUACIÓN DE RIESGO DE OPERACIONES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE
ORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE (Ver NOTA (1))**

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

A. Notificador

1. Nombre del Centro, Institución o Empresa:

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

2. Domicilio del notificador:

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC).
Campus Universidad Autónoma. Cantoblanco.
28049-Madrid

3. Responsable de la actividad de utilización confinada:

Antonio Bernad Miana
Profesor de Investigación del CSIC
E-mail: abernad@cnb.uam.es

Firma del notificador:

Persona de contacto:

Fernando Usera Mena, responsable del Servicio de Protección Radiológica y Seguridad Biológica del CNB
Tel: 915854541
Fax: 915854506
Correo electrónico: fusera@cnb.uam.es



B. Descripción de la actividad.

1. Objetivo de la actividad:

La finalidad de este proyecto de investigación es el desarrollo de una terapia génica anti-VIH. Concretamente se trata de destruir de forma selectiva las células infectadas con provirus latentes, para los cuales no existe en la actualidad ninguna terapia que pueda eliminarlos.

2. Duración de la actividad:

Estimamos que el estudio completo supondrá unos 3 años de trabajo.



C. Evaluación de riesgo (Ver NOTA (2))

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

1.1. Organismo receptor.

Vector lentiviral derivado del VIH-1 de 3ª generación

- Naturaleza de la patogenicidad, virulencia, infecciosidad, alergenicidad, toxicidad y vectores de transmisión de enfermedades:
El vector *per se* no es patógeno.
- Naturaleza de los vectores autóctonos y los agentes adventicios en los casos en que puedan movilizar el material genético insertado, y frecuencia de movilización:
No aplica
- Naturaleza y estabilidad de las mutaciones inactivadoras, si se producen:
No aplica
- Toda modificación genética previa:
Para la generación de los vectores desarrollados a partir del VIH-1 que se utilizan (3ª generación), se eliminó de la estructura del virus original los genes que se relacionan con la patogenicidad del virus; los genes que son necesarios para la generación de las partículas virales integrativas pero defectivas en replicación, se aportan en unos vectores plasmídicos accesorios. El vector contendrá la información concerniente al gen de interés y un gen marcador (EGFP). Los plásmidos accesorios suministran la información necesaria para la retrotranscripción y expresión génica del genoma defectivo en la célula diana. En este caso son el gen *gag* que codifica proteínas de la matriz proteica entre la envuelta y la cápsida, proteínas que forman la cápsida, y proteínas encargadas de empaquetar el genoma; el gen *pro/pol* que codifica proteínas necesarias para el procesado de la poliproteína gag-pro-pol, la RT responsable de la conversión del genoma viral a ADN de doble cadena y la integrasa viral; el gen *env* que codifica la envuelta; y el gen *rev* que codifica la proteína encargada de la exportación de los transcritos virales. El virus original además contiene información que ha sido eliminada para la generación del vector y que no es necesaria para que el proceso de transducción de las células diana sea eficiente. Estos genes presentes en el virus pero no en el vector son el gen *tat* que codifica el activador transcripcional del LTR viral; el gen *nef* que codifica una proteína encargada de la modulación negativa de CD4 y MHC-1; el gen *vif* cuya función se desconoce, pero se sabe que aumenta la infectividad; el gen *vpr* que codifica una proteína de transporte nuclear de complejos de preintegración; y el gen *vpu* que codifica una proteína responsable de la degradación selectiva de CD4.
Las modificaciones generadas para desarrollar el vector hacen que la



regeneración del virus original sea prácticamente imposible. Para incrementar aún más la bioseguridad de estos sistemas de transferencia génica, se eliminaron los elementos transcripcionales del VIH-1 haciendo estos vectores auto inactivantes (*self inactivating*, SIN). En los vectores SIN se deleta un fragmento en la región U3 del LTR del extremo 3' del ADN. Esta delección es transferida al LTR en 5' del ADN proviral durante la retrotranscripción ; se elimina una región suficientemente grande como para interrumpir la actividad transcripcional del LTR, así, la producción de un vector en las células transducidas queda totalmente imposibilitada. El título y la capacidad de transducción de estos vectores no se ve alterada en absoluto por esta modificación. Otra ventaja que presentan los vectores lentivirales SIN es que la expresión del transgén queda bajo control del promotor del vector, lo que permite controlar expresión del gen de interés mediante promotores específicos de tejido o promotores inducibles.

- Gama de hospedadores (si procede):
No aplica
- Todo rasgo fisiológico significativo que pueda alterarse en el MMG final y, si procede, su estabilidad:
Todavía no está establecido.
- Hábitat natural y distribución geográfica:
No aplica
- Participación significativa en procesos ambientales (Fijación del nitrógeno, regulación del pH., etc):
No aplica
- Interacción con otros organismos del entorno y efectos sobre éstos (incluyendo las probables propiedades competitivas, patogénicas o simbióticas):
No aplica
- Capacidad de formar estructuras de supervivencia (como esporas o esclerocios):
No aplica

1.2. Organismo donante.

Homo sapiens: genes humanos implicados en el proceso de infección del VIH y procesos implicados en la respuesta a esta infección.

- Naturaleza de la patogenicidad, virulencia, infecciosidad, toxicidad y vectores de transmisión de enfermedades:
No aplica
- Naturaleza de los vectores autóctonos:
No aplica



- ✓ Secuencia:
- ✓ Frecuencia de movilización y especificidad:
- ✓ Presencia de genes que confieren resistencia a las sustancias antimicrobianas, incluidos los antibióticos:
- Gama de hospedadores:
No aplica
- Otros rasgos fisiológicos pertinentes:
No aplica

1.3. Inserto.

- Identidad y función específicas del inserto (genes):
Secuencias genómicas relacionadas con la patogenicidad del virus VIH-1
- Nivel de expresión del material genético insertado:
Variable e impredecible *a priori*, en función de la proteína que se exprese (si se expresa) y la línea celular que la exprese, así como del lugar de inserción del vector en el genoma celular.
- Fuente del material genético e identidad del organismo u organismos donantes y características, si procede:
El material genético procede de DNA genómico humano ó mRNA.
- Historia de las modificaciones genéticas previas, si procede:
No existen modificaciones previas.
- Situación del material genético insertado (posibilidad de activación o desactivación de los genes del hospedador debido a la inserción):
La situación del material genético insertado es impredecible debido al carácter de inserción aleatorio de los vectores lentivirales que contendrán el inserto.

1.4. Vector.

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

1.5. Organismo modificado genéticamente resultante.



1.5.1. Efectos para la salud humana.

- Efectos tóxicos o alergénicos previstos del MMG y/o sus productos metabólicos:
Existe riesgo de inoculación del vector lentiviral y modificación del material genético del propio manipulador que puede dar lugar a procesos aberrantes originados por mutagénesis insercional del vector, aunque este riesgo es prácticamente nulo por la ausencia de material cortante o punzante en el laboratorio.
Las líneas celulares J1.1 y ACH-2, están infectadas con provirus latentes. Estas líneas proceden del NIH, AIDS Research and Reference Reagent Program. El riesgo de estos experimentos es muy bajo porque estas líneas tienen una muy baja producción de partículas infecciosas de VIH-1 (ver documentación original que se adjunta sobre ambas líneas celulares), por otra parte, el contagio requiere el contacto directo con la sangre por lo que es muy fácil protegerse.
- Comparación de la patogenicidad del microorganismo modificado con la del receptor o (en su caso) del organismo parental:
Ni el organismo parental ni el OMG son patógenos.
- Capacidad de colonización prevista:
No aplica
- Si el microorganismo es patógeno para personas inmunocompetentes:
No
- Enfermedades causadas y mecanismos de transmisión, incluidas la capacidad de invasión y la virulencia:
No aplica
 - ✓ Dosis infecciosa:
 - ✓ Posible alteración de la ruta de infección o de la especificidad tisular:
 - ✓ Supervivencia fuera del hospedador humano:
 - ✓ Estabilidad biológica:
 - ✓ Pautas de resistencia a los antibióticos:
 - ✓ Alergenicidad:
 - ✓ Toxigenicidad:
 - ✓ Disponibilidad de terapias apropiadas y de medidas profilácticas:

1.5.2. Efectos para el medio ambiente.

- Ecosistemas a los que el microorganismo podría pasar accidentalmente a partir de la utilización confinada:
El OMG es incapaz de sobrevivir en el medio ambiente.
- Supervivencia, multiplicación y grado de diseminación previstos para el microorganismo modificado en los ecosistemas correspondientes:
No aplica



- Resultados previstos para la interacción entre el microorganismo modificado y los organismos o microorganismos que pudieran verse expuestos en caso de liberación accidental al entorno:
No aplica
- Efectos conocidos o previstos sobre plantas y animales como, por ejemplo, patogenicidad, toxicidad, alergenicidad, vector de patógenos, pautas alteradas de resistencia a los antibióticos, alteraciones de tropismos o especificidad de hospedador, y colonización:
No aplica
- Implicaciones conocidas o previstas en procesos biogeoquímicos:
No aplica

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

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

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

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

El riesgo de inoculación accidental del vector lentiviral es prácticamente nulo debido a la ausencia de material punzante y cortante en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica y por contacto no hay riesgo de contagio.

En caso de producirse inoculación accidental del vector, el riesgo de integración del mismo en el genoma es realmente bajo. En caso de integración del vector el riesgo de regeneración del virus parental en individuos inmunocompetentes es prácticamente nulo. La población seropositiva para el VIH-1 presenta un riesgo bajo medio.

Como consecuencia de la integración y la expresión de las secuencias presentes en el vector lentiviral en las células del manipulador, se podrían producir alteraciones en dichas células.

Existe riesgo de contagio del VIH-1 y desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, las líneas celulares J1.1 y ACH-2 infectadas con provirus latentes, tienen una producción de partículas infecciosas de VIH-1 muy baja, por lo que el riesgo de estos experimentos es bajo. Por otra parte, el contagio requiere un contacto directo con la sangre por lo que es muy fácil protegerse y evitarse al trabajar en un laboratorio de nivel 3 de contención biológica.

3.2. Concentración y escala utilizadas.

Se trabajará con sobrenadantes que contienen partículas virales infectivas defectivas en replicación de alto título ($10E6$). El volumen total máximo será de 50 ml.



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

Producción de stocks de vectores lentivirales:

En el laboratorio P3 se transducirán las células con preparaciones del vector producidas en la Universidad de Jaén.

Infección de líneas celulares J1.1 y ACH-2, que están infectadas con provirus latentes. Estas líneas proceden del NIH, AIDS Research and Reference Reagent Program. con vectores lentivirales:

Sobre la población diana (J1.1 y ACH-2) (100000 células por placa, entre 6 y 10 placas por experimento), se añade un volumen de 2-3 ml por placa de sobrenadante infectivo, con los posibles genes antiVIH (título entre 10E8 y 10E6) y se mantiene en contacto aproximadamente 8 horas. Las células genéticamente modificadas se mantendrán en cultivo un periodo de tiempo variable en función de la finalidad del experimento. Se realizarán cinéticas de muerte celular por apoptosis y de producción de partículas infecciosas mediante cuantificación del antígeno p24 con un ELISA comercial.

Los restos celulares y de sobrenadante se inactivarán y se desecharán según la normativa del laboratorio de nivel 3.

Al trabajar en un laboratorio de nivel 3 de contención biológica, los efectos sobre el entorno son mínimos.

4. Determinación de la clasificación y medidas de confinamiento definitivas y confirmación de su idoneidad:

Actividad confinada de Tipo 3. Actividad en la cual el grado 3 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente.

5. Determinación del riesgo en el caso de que se produzca una liberación accidental: (Ver NOTA (6))

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

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

El riesgo de contaminación en dependencias cercanas a la instalación o en el medio ambiente externo al Centro Nacional de Biotecnología es prácticamente inexistente por las siguientes razones:

-El laboratorio está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios, resaltándose el sistema de tratamiento de aire y el sistema de inactivación biológica de efluentes líquidos. Es más, consideramos que el nivel de contención obtenido excede en determinados parámetros el exigido por la legislación para las operaciones confinadas de tipo 3.



-Estos medios e infraestructura ya se han validado previamente por una empresa externa y serán validados por ésta empresa u otras anualmente o tras averías. Igualmente, el servicio de Seguridad Biológica validará periódicamente a nivel interno todos los métodos y sistemas de inactivación biológica y esterilización mediante la utilización de microorganismos testigo utilizando diferentes métodos.

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

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

-Tanto el laboratorio, como las instalaciones que aseguran las necesarias medidas de contención secundaria, disponen de variados medios de alarma "in situ" y en la consola de control central del edificio ante la ruptura accidental de las barreras de contención secundaria.

-El índice de ocupación de las dependencias cercanas al laboratorio es muy bajo al tratarse de servicios de apoyo a la investigación o de laboratorios de técnicas especiales de uso común. No hay ningún laboratorio con un grupo de investigación anexo a la instalación.

-El Centro Nacional de Biotecnología (CNB) se encuentra enclavado en una zona relativamente nueva del Campus de la Universidad Autónoma de Madrid. Esta zona se caracteriza por la amplitud existente entre los edificios que la constituyen, fundamentalmente otros centros de investigación.

-No existen zonas residenciales cercanas al CNB.

-No existen en las cercanías cultivos, explotaciones ganaderas, cotos, reservas de caza, o zonas naturales protegidas o con especial interés ecológico.

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

Clima continental-mediterráneo con primaveras y otoños húmedos e inviernos y veranos secos, fuerte gradiente de temperaturas estacional. Viento predominante N.O.

3) Notificación de la instalación: indicar las secciones donde se desarrolla la actividad objeto de la notificación, con indicaciones de la categoría de confinamiento prevista:

Las operaciones indicadas se realizarán en uno de los tres sublaboratorios del laboratorio de cultivos "in vitro" de nivel 3 de contención biológica con autorización del 7/03/01; número de notificación: A/ES/00/I-8



5.2. Condiciones en las que podría producirse un accidente.

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

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

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

5.4. Planes de emergencia.

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



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

- (1) Para la elaboración de la evaluación de riesgo de la actividad propuesta se tendrá en cuenta toda la información suministrada, en su caso, en el formulario relativo a la Notificación de Operaciones con organismo modificados genéticamente (Parte A), así como el relativo a la Notificación de Instalaciones donde se realizan operaciones con organismos modificados genéticamente (Parte B).
- (2) Para llevar a cabo dicha evaluación se tendrá en cuenta el procedimiento establecido en el Anexo III de la Directiva 98/81/CE, de 26 de octubre de 1998 y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las notas de orientación para la evaluación de riesgo descrita en el Anexo III de la Directiva 98/81/CE.
- (3) Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.
- (4) Para establecer esta primera valoración se tendrá en cuenta lo dispuesto en el artículo 5.3 de la Directiva 98/81/CE y, en caso de ser aplicable, otros sistemas de clasificación nacionales e internacionales existentes (Por ejemplo, la Directiva 2000/54/CE sobre protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo).
- (5) Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.
- (6) Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.