



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

Nº de Registro:

Nº de Notificación:

I. INFORMACIÓN GENERAL

1) Responsables de la actividad

a) Entidad

Nombre: **Centro Nacional de Biotecnología (CNB, CSIC)**
Dirección postal: **c/ Darwin 3**
28049 - Madrid

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: **Fernando Rojo de Castro, Profesor de Investigación del CSIC**
NIF: : **50295113-R**
Cargo: **Director del CNB**
Tel: **91 585 45 03 / 91 585 45 39**
Fax: **91 585 45 06**
Correo electrónico: **direccion.cnb.csic.es / frojo@cnb.csic.es**

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: **Fernando Almazán Toral**
NIF: **02200595-R**
Cargo: **Científico Titular del CSIC**
Tel: **915854678**
Fax: **915854506**
Correo electrónico: **falmazan@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**
Fax: **91 585 45 06**
Correo electrónico: **fusera@cnb.csic.es**



e) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto
Fernando Usera Mena

- 2) Debe señalarse si para la ejecución de esta actividad se recibe financiación del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación. 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

- 3) Instalación donde se va a desarrollar la actividad de utilización confinada (cumplimente si previamente ha sido comunicada/autorizada para este tipo de actividades; en caso contrario, cumplimente el Formulario Parte B).

a) Fecha de comunicación / autorización de la instalación:

**Laboratorio de nivel 3 de contención biológica (NCB3) del CNB
07/03/2001**

b) Número de referencia del expediente:

A/ES/00/1-8

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1) Finalidad de la actividad:

1.1) Rescate del virus del ZIKA (ZIKV) a partir de un clon infectivo generado en un cromosoma artificial de bacterias (BAC). Se generará un clon infectivo del ZIKV en BAC en base a la secuencia del aislado Natal RGN (Ref GenBank KU527068) con una mutación puntual silenciosa que se utilizará como marcador genético. A partir del clon infectivo generado se rescatará virus infectivo mediante la transfección de este en células Vero. El objetivo de generar el clon infectivo es el de disponer de un sistema de genética reversa para el ZIKV. Además, utilizando el clon infectivo se generarán mutantes de sustitución de las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5, potencialmente implicadas en la inhibición de la respuesta a interferón. El objetivo de construir estos mutantes es estudiar las bases moleculares de la virulencia del ZIKV y generar virus atenuados que puedan ser utilizados como candidatos a vacunas.

1.2) Construcción de un replicón del ZIKV. Se generará a partir del clon infectivo mediante la delección de la secuencia codificante para la proteína de la envuelta (E), la cual es esencial para la producción de partículas virales infectivas pero no para la replicación del genoma viral. Con el replicón generado se podrá estudiar el mecanismo de replicación del virus y testar antivirales sin la necesidad de manipular virus infectivo.



2) Clasificación de la actividad

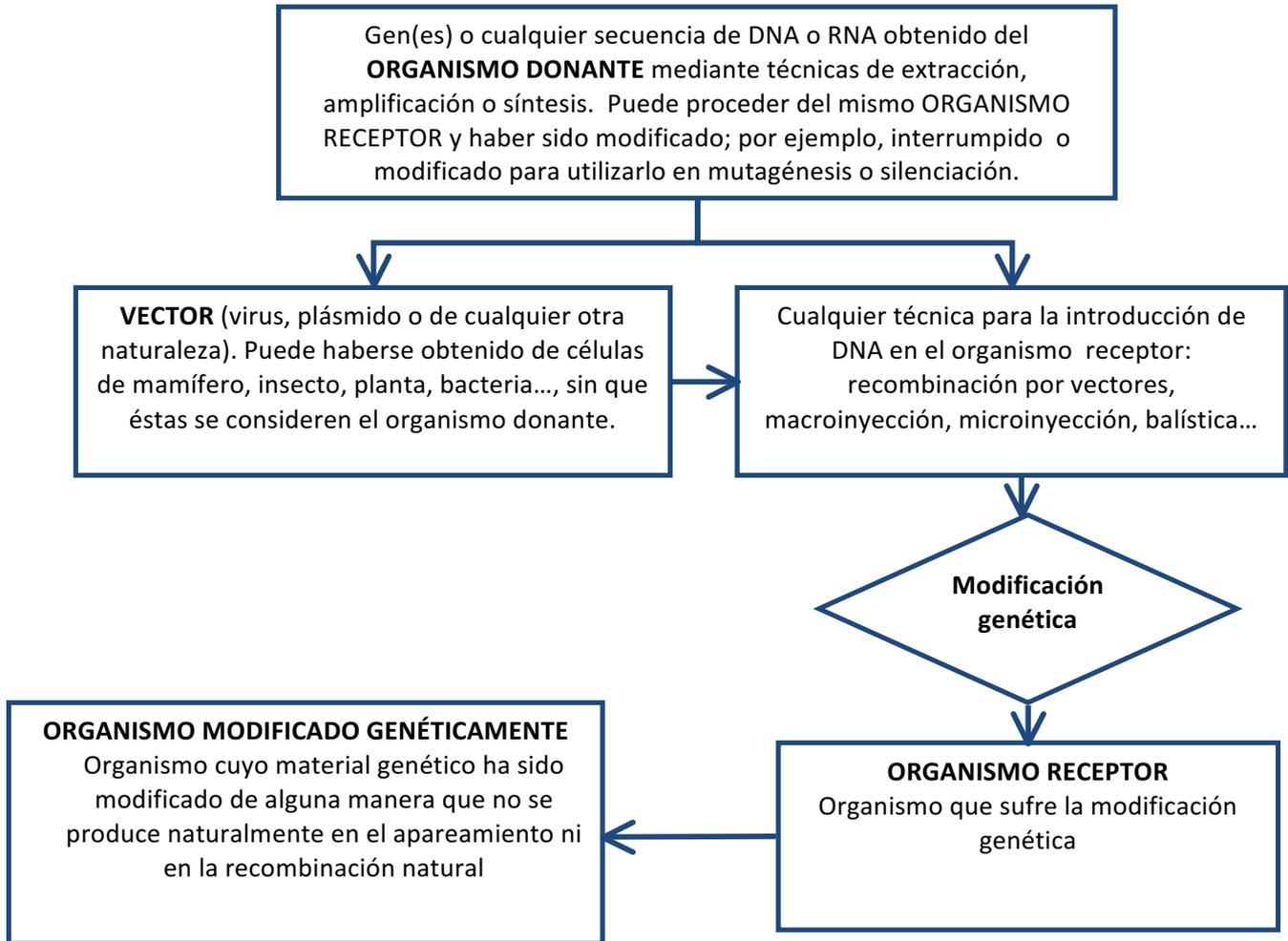
Para la clasificación del tipo de riesgo de las operaciones se seguirá el procedimiento establecido conforme al artículo 4 y el anexo III de la Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo, relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente, y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

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

Si bien, actualmente el ZIKV está clasificado oficialmente en la Unión Europea dentro del grupo de riesgo 2 de patógenos humanos, cabe la posibilidad de que se reclasifique a en el grupo de riesgo 3 por ser un flavivirus y por su posible relación con microcefalia en neonatos. Por este motivo, el rescate de virus infectivo se realizará en todos los casos en el laboratorio NCB3 del CNB.

En el caso del replicón generado, la actividad se clasificará como actividad confinada tipo 2, ya que a partir del replicón no se puede generar virus infectivo al carecer de la proteína E. Su manipulación y estudio se llevará a cabo en un laboratorio de nivel 2 de contención biológica. Por tanto, esta actividad confinada de tipo 2 se solicitará en formato aparte posteriormente.

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





3) INFORMACIÓN SOBRE EL ORGANISMO RECEPTOR DEL CUAL SE DERIVA EL OMG

1) Nombre científico: **ZIKV-Natal RGN**

Taxonomía: **Familia Flaviviridae, género flavivirus**

Nombre común: **Virus del ZIKA**

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento:

El organismo receptor es el flavivirus ZIKV-Natal RGN (Ref GenBank KU527068E1), el cual se modificará genéticamente utilizando un clon infectivo en BAC (pBAC-ZIKV-FL) que contiene el cDNA que codifica el genoma del virus bajo el control del promotor del virus citomegalovirus (CMV). El cDNA que codifica el genoma del virus se construirá a partir de 4 fragmentos solapantes generados mediante síntesis química. El clon infectivo se amplificará en la cepa DH10B de E. Coli (no patogénica) y se purificará utilizando el Kit LARGE CONSTRUCT de QIAGEN. Mediante la transfección del clon infectivo en células Vero se rescatará virus infectivo, el cual se amplificará en células Vero, se titulará y se almacenará a -70°C. Si bien, actualmente el ZIKV está clasificado dentro del grupo de riesgo 2, cabe la posibilidad de que se reclasifique a nivel 3 por ser un flavivirus y su posible relación con microcefalia. Por este motivo, el rescate de virus infectivo se realizará en todos los casos en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) utilizando equipos de protección individual.

La secuencia de nucleótidos del organismo receptor se detalla en el anexo adjunto.

b) Técnicas de identificación:

El ZIKV se identificará mediante técnicas convencionales como inmunofluorescencia, RT-PCR y secuenciación.

c) Marcadores genéticos:

El organismo receptor no presenta ningún marcador genético específico. El clon infectivo en BAC presentará una mutación silenciosa mediante la sustitución de una base para posible reconocimiento.

d) Marcadores fenotípicos:

El ZIKV presenta un efecto citopático característico en células Vero en cultivo, caracterizado por el redondeamiento de las células infectadas.



e) Estabilidad genética:

La estabilidad genética del ZIKV en cultivos celulares es similar a la descrita para otros virus RNA de cadena positiva.

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

Ninguna.

4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

SI NO

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:

El ZIKV es patógeno para los seres humanos

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

Como se ha indicado anteriormente, si bien, actualmente el ZIKV está clasificado dentro del grupo de riesgo 2, cabe la posibilidad de que se reclasifique a nivel 3 por ser un flavivirus y su posible relación con microcefalia.

a) ¿De que modo se manifiesta la patogenicidad?

El ZIKV es un flavivirus transmitido por mosquitos de la especie Aedes que infecta humanos. Usualmente la infección es asintomática. En los casos en los que aparecen síntomas, la enfermedad es leve y se caracteriza por la aparición de fiebre, erupciones cutáneas y conjuntivitis. Recientemente, el ZIKV ha adquirido una gran relevancia en salud humana por su posible relación con los casos de microcefalia en niños recién nacidos en varias regiones de Brasil con alta prevalencia del ZIKV. En este sentido, el virus se ha detectado en el cerebro de fetos con microcefalia y se ha demostrado que es capaz de infectar in vitro células progenitoras neurales del cortex.

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

No aplica. Hasta la fecha no se han descrito cepas no virulentas del ZIKV

SI NO



Porqué:

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

Tanto las bacterias donde se propagarán los clones infectivos, como las células Vero que se utilizarán para rescatar los virus recombinantes están libres de agentes biológicos contaminantes, por lo que se presupone que los virus obtenidos a partir de los clones infectivos también estarán libres de agentes biológicos contaminantes.

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

Nuestro laboratorio presenta una experiencia de más de 20 años en el manejo de virus RNA de cadena positiva, incluyendo coronavirus (TGEV, SARS-CoV, MERS-CoV) y el flavivirus DENGUE, no habiéndose detectado ningún problema de bioseguridad.

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

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

No. El ZIKV solo es capaz de sobrevivir en el vector de transmisión (mosquitos de la especie Aedes) o en las especies susceptibles de ser picadas por estos mosquitos como los seres humanos. Este virus es muy lábil si se somete a condiciones medioambientales externas (sequedad, luz ultravioleta, etc.). El mosquito vector no se encuentra actualmente en la zona central de la Península Ibérica.

En caso afirmativo:

- b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

- | | |
|-------------------------------|--------------------------|
| 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) otros, especifíquese | |

- c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

No se han descrito.



d) Posibles nichos ecológicos:

Mosquitos de la especie Aedes que actúan como reservorio y vector de transmisión.

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No aplica.

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

No se han descrito.

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

El ZIKV es un flavivirus transmitido por mosquitos de la especie Aedes que infecta humanos. Usualmente la infección en humanos es asintomática. En los casos en los que aparecen síntomas, la enfermedad es leve y se caracteriza por la aparición de fiebre, erupciones cutáneas y conjuntivitis. Recientemente, el ZIKV ha adquirido una gran relevancia en salud humana por su posible relación con los casos de microcefalia en niños recién nacidos en varias regiones de Brasil con alta prevalencia del ZIKV. En este sentido, el virus se ha detectado en el cerebro de fetos con microcefalia y se ha demostrado que es capaz de infectar in vitro células progenitoras neurales del cortex.

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

Actualmente el ZIKV se distribuye en la mitad norte del continente Africano y varios países de Sudamérica y el Sudoeste Asiático.

12) Hábitat natural del organismo:

El hábitat de los mosquitos de la especie Aedes que actúan como reservorio y vector de transmisión.



IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

En la actividad se propone la generación de un clon infectivo en BAC del aislado Natal RGN del ZIKV con el fin de disponer de un sistema de genética reversa que permita la manipulación genética del virus. El cDNA que codifica el genoma del virus se construirá a partir de 4 fragmentos solapantes generados mediante síntesis química, los cuales se clonarán secuencialmente en un BAC bajo el control del promotor del CMV. A partir del clon infectivo, se generarán nuevos clones infectivos con mutaciones en las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5, y un replicón mediante la delección de la secuencia codificante para la proteína E.

En este caso en concreto, no se pretende introducir un gen de un organismo en otro. Lo único que se pretende es mutar o deleccionar secuencias del genoma viral con el fin de generar virus recombinantes atenuados o un replicón que permita estudiar el mecanismo de replicación del virus y testar antivirales sin la necesidad de manipular virus infectivo. Por esta razón, no existe un organismo donante y por lo tanto la información requerida al este respecto no aplica en este actividad concreta.

1) Nombre científico:

Taxonomía:

Nombre común:

No aplica.

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante:

No aplica.

3) Método de obtención: **No aplica.**

a) Extracción

b) PCR

c) Síntesis *in vitro*

4) Función del gen/genes en el organismo donante

No aplica.

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



No aplica.

SI NO

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

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

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 aplica. No se van a insertar secuencias exógenas. Exclusivamente se van a introducir mutaciones silenciosas que muy posiblemente disminuirán la patogenicidad del organismo receptor y en el caso del replicón se deleccionará la secuencia codificante para la proteína E, de tal modo que el replicón no sea patogénico ya que no se podrá generar virus infectivo.

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

No aplica.

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:

Generar un clon infectivo a partir del cual obtener un virus recombinante con la secuencia del aislado Natal RGN del ZIKV (Ref GenBank KU527068) con una mutación puntual silenciosa que se utilizará como marcador genético. El objetivo de generar el clon infectivo es el de disponer de un sistema de genética reversa para ZIKV.

A partir del clon infectivo, introducir mutaciones silenciosas en las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5 (potencialmente implicadas en la inhibición de la respuesta a interferón), con el fin de desoptimizar la expresión de las



mismas y de este modo generar virus recombinantes atenuados que permitan estudiar las bases moleculares de la virulencia del ZIKV y puedan ser utilizados como candidatos a vacunas.

Construcción de un replicón del ZIKV. Se generará a partir del clon infectivo mediante la delección de la secuencia codificante para la proteína E, la cual es esencial para la producción de partículas virales infectivas pero no para la replicación del genoma viral. Con el replicón generado se podrá estudiar el mecanismo de replicación del virus y testar antivirales sin la necesidad de manipular virus infectivo.

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

Para modificar el genoma del ZIKV se generará un clon infectivo en BAC. El cDNA que codifica el genoma del aislado ZIKV-Natal RGN (Ref GenBank KU527068) con una mutación silenciosa en el nt 8408 (T por C) como marcador genético, se construirá a partir de 4 fragmentos solapantes generados mediante síntesis química por la empresa canadiense BioBasic Inc. Los 4 fragmentos se clonarán secuencialmente en un BAC para generar el clon infectivo pBAC-ZIKV-FL, en el cual el cDNA de longitud completa que codifica el genoma viral estará bajo el control del promotor del virus CMV. A partir del clon infectivo, se generarán nuevos clones infectivos con mutaciones en las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5, mediante técnicas convencionales de biología molecular. Finalmente, a partir de los clones infectivos generados se rescatarán los virus recombinantes mediante la transfección de células Vero con los correspondientes clones infectivos. Si bien, actualmente el ZIKV está clasificado dentro del grupo de riesgo 2, cabe la posibilidad de que se reclasifique a nivel 3 por ser un flavivirus y su posible relación con microcefalia. Por este motivo, el rescate de virus infectivo se realizará en todos los casos en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica del CNB utilizando equipos de protección individual.

Por otra parte, se generará un replicón del ZIKV-Natal RGN a partir del clon infectivo pBAC-ZIKV-FL, mediante delección de la secuencia codificante para la proteína E, utilizando técnicas convencionales de biología molecular. La funcionalidad del replicón generado se analizará en células Vero. Dado que el replicón no es infectivo, la manipulación y estudio funcional del mismo se realizará en el laboratorio de nivel 2 de contención biológica del CNB.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

- a. Tipo e identidad del vector:

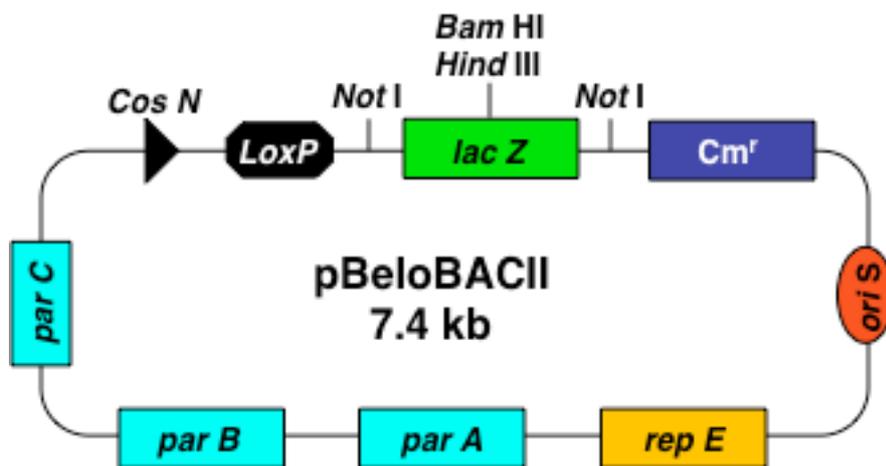
El vector utilizado es el plásmido pBeloBAC11 (7507 pb), un BAC basado en el Factor F de E. coli. (Shizuya et al. 1992. PNAS 89: 8794-8797). El pBeloBAC11 es un plásmido de copia única que permite clonar establemente fragmentos de DNA de hasta 500 kb.

b. Si se trata de un virus:

No aplica.

Es defectivo en replicación Sí NO

c. Aportar mapa de restricción del vector (funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación, origen, función y secuencia de otros elementos presentes en el vector):



oriS: Origen de replicación del factor F.

rep E: gen regulador que junto con el OriS median la replicación unidireccional del plásmido.

parA, parB y parC: genes que controlan el número de copias del plásmido y su segregación a las células hijas durante la división bacteriana.

lacZ: gen que permite la selección por color.

Cm^r: gen de resistencia a cloranfenicol.

Cos N y LoxP: elementos reguladores que contienen el sitio de corte para la terminasa del fago lambda y la cre-recombinasa P1, respectivamente.

BamHI, HindIII y NotI: sitios de restricción para la inserción de secuencias exógenas.

Tanto la secuencia del plásmido como la posición de los diferentes genes y elementos reguladores se describe en el anexo adjunto.

d. Gama de hospedadores del vector:

Cepa DH10B de E. Coli (no patogénica).

e. Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

No presenta.

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

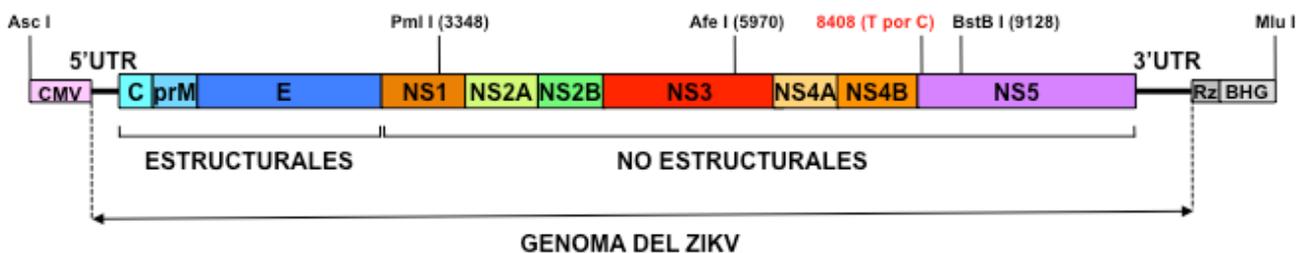
No aplica.

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

No.

5) Información del inserto:

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



Nombre: CMV-ZIKV*-RzBGH

Tamaño: 11733

El esquema se corresponde con el inserto que se va a clonar en el BAC para generar el clon infeccioso pBAC-ZIKV-FL. El inserto está constituido por la secuencia del promotor del virus CMV, seguida del genoma del ZIKV-Natal RGN (Ref GenBank KU527068) con una mutación silenciosa en el nt 8408 (T por C) como marcador genético, la secuencia de la ribozima del virus de la hepatitis delta (Rz) y las señales de terminación y poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH).

En el caso de los clones infecciosos con las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5 mutadas, el inserto será el mismo que en el caso del clon infeccioso pBAC-ZIKV-FL, incluyendo mutaciones silenciosas que desoptimicen la expresión de las proteínas NS4A, NS4B y NS5. Estos insertos se denominan CMV-ZIKV* (NS4A*)-RzBGH, CMV-ZIKV* (NS4B*)-RzBGH y CMV-ZIKV* (NS5*)-RzBGH, respectivamente.

En el caso del replicón, el inserto será el mismo que en el caso del clon infeccioso pBAC-ZIKV-FL pero con la secuencia codificante para la proteína E deletionada. El inserto se denomina CMV-ZIKV* (dE)-RzBGH.

La secuencia de todos los insertos descritos y la posición de los diferentes genes y elementos reguladores se muestra en el anexo adjunto.

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

CMV: promotor inmediatamente temprano del virus CMV. Permite la expresión del genoma viral por la RNA Polimerasa II celular cuando el clon infectivo es transfectado en células Vero.

Genoma del virus ZIKV-Natal RGN. Contiene la secuencia completa del aislado Natal RGN del virus ZIKA (Ref GenBank KU527068).

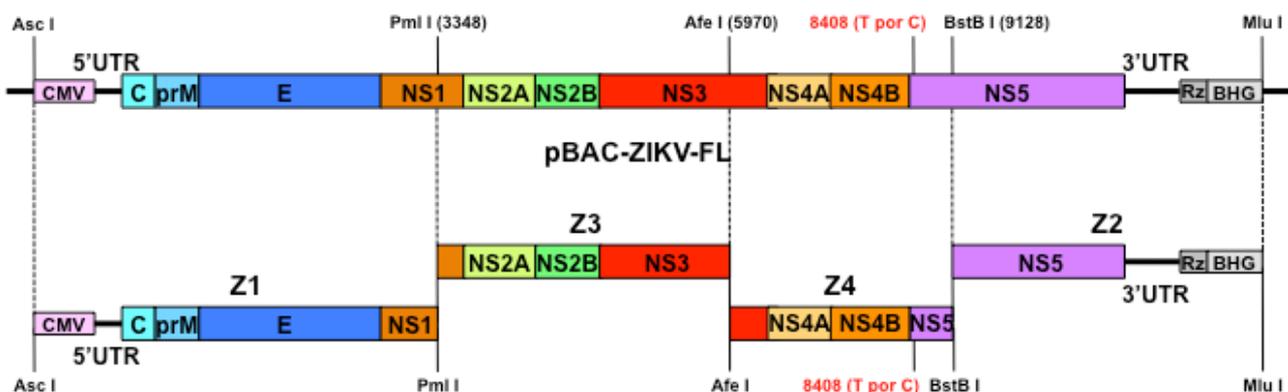
Rz: secuencia de la ribozima del virus de la hepatitis delta. Su función es procesar el RNA sintetizado por el clon infectivo a través del promotor del virus CMV de tal modo que el extremo 3' del RNA generado sea idéntico al del genoma viral.

BGH: secuencias de terminación y poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Regulan la terminación y poliadenilación del RNA sintetizado por el clon infectivo a través del promotor CMV.

c) Descripción del método utilizado para la transformación:

El cDNA que codifica el genoma del virus ZIKV-Natal RGN (Ref GenBank KU527068), flanqueado por los elementos reguladores CMV, Rz y BGH, se construirá a partir de 4 fragmentos solapantes generados mediante síntesis química por la empresa canadiense BioBasic Inc. Los 4 fragmentos se clonarán secuencialmente en un BAC utilizando las enzimas de restricción indicadas en el esquema para generar el clon infectivo pBAC-ZIKV-FL. A partir de este clon infectivo, se generaran los clones infectivos con mutaciones en las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5, y el replicón con la secuencia codificante para la proteína E deletionada, utilizando técnicas convencionales de biología molecular.

A continuación se muestra un esquema de cada uno de los fragmentos, flanqueados por los sitios de restricción y la estrategia de clonaje que se utilizaran para la construcción del clon infectivo pBAC-ZIKV-FL.



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

El genoma del ZIKV presente en el inserto contiene una única ORF que se traduce dando lugar a una poliproteína. Posteriormente, la poliproteína es procesada



proteolíticamente generándose 10 productos maduros. La función que se presupone a estas proteínas por homología con el virus DENGUE es la siguiente:

C: Proteína de la cápsida. Implicada en la en la encapsidación del genoma viral.

prM: proteína de membrana que es procesada para dar lugar a la proteína M madura.

E: proteína de la envuelta. Es el ligando viral.

NS1: Proteína no estructural 1.

NS2A: Proteína no estructural 2A. Implicada en la inhibición de la vía de señalización del interferón.

NS2B: Proteína no estructural 2B. Es una serín proteasa.

NS3: Proteína no estructural 3. Tiene actividad serín proteasa, Helicasa y RNA trifosfatasa. Junto con la NS2B participa en el procesamiento proteolítico de la poliproteína.

NS4A: Proteína no estructural 4A. Implicada en la inhibición de la vía de señalización del interferón.

NS4B: Proteína no estructural 4B. Implicada en la inhibición de la vía de señalización del interferón.

NS5: Proteína no estructural 4B. Es la RNA polimerasa dependiente de RNA. Además presenta actividad metiltransferasa. Implicada en los procesos de replicación y transcripción del genoma viral y en la inhibición de la vía de señalización del interferón.

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

CMV: promotor inmediatamente temprano del CMV. Permite la expresión del genoma viral por la RNA Polimerasa II celular cuando el clon infectivo es transfectado en células Vero.

5' y 3' UTRs: Secuencias no traducidas del extremo 5' y 3' del genoma del ZIKV, respectivamente. Son regiones altamente estructuradas implicadas en la replicación, transcripción y traducción del genoma viral.

Rz: secuencia de la ribozima del virus de la hepatitis delta. Su función es procesar el RNA sintetizado por el clon infectivo a través del promotor del virus CMV de tal modo que el extremo 3' del RNA generado sea idéntico al del genoma viral.

BGH: secuencias de terminación y poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Regulan la terminación y poliadenilación del RNA sintetizado por el clon infectivo a través del promotor CMV.

f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

Si. La secuencia se describe en el anexo adjunto.

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

No.

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

No.



VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

Los OMGs son virus recombinantes del ZIKV (con una mutación silenciosa puntual como marcador genético o con mutaciones en las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5) y un replicón con la secuencia codificante para la proteína E deletionada.

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre?

No.

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?

No.

En caso afirmativo:

i) número de copias:

ii) localización cromosómica:

iii) secuencias colindantes

iv) ¿La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes?:

c) Si se trata de un virus:

i) La inserción es específica

ii) La inserción se produce al azar

iii) Existe la posibilidad de formación de partículas víricas

El virus recombinante con la mutación puntual silenciosa como marcador genético dará lugar a partículas víricas infectivas. En cuanto a los virus recombinantes con mutaciones en las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5, estas serán silenciosas y se introducirán para desoptimizar el uso de codones con el fin de generar virus atenuados que puedan constituir buenos candidatos a



vacunas. Se prevé que den lugar a la formación de partículas víricas, si bien estas tendrán una probabilidad elevada de estar atenuadas.

Por el contrario, en el caso del replicón al carecer de la proteína E no será posible la formación de partículas víricas.

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

Cuando los OMGs sean generados se realizarán los siguientes análisis moleculares relativos a la expresión del producto deseado:

- | | | |
|------|--|-------------------------------------|
| i) | Determinación de la estructura del inserto (secuenciación) | <input checked="" type="checkbox"/> |
| ii) | Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA) | <input checked="" type="checkbox"/> |
| iii) | Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas) | <input checked="" type="checkbox"/> |
| iv) | Estabilidad genética | <input checked="" type="checkbox"/> |

Aportar toda la documentación al respecto.

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. Los virus recombinantes generados al igual que el organismo receptor (ZIKV) solo son capaces de sobrevivir en cultivos celulares, en el vector de transmisión (mosquitos de la especie Aedes) o en las especies susceptibles de ser picadas por estos mosquitos como los seres humanos. En cuanto al replicón, este solo es capaz de sobrevivir en cultivos celulares.

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

Presumiblemente, el virus recombinante con una mutación silenciosa como marcador genético replicará en células en cultivo e in vivo con la misma tasa de replicación que la descrita para el organismo receptor. Por otra parte, los virus con mutaciones en las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5, muy posiblemente estén atenuados y por lo tanto presentarán una tasa de replicación en cultivos celulares e in vivo igual o inferior a la del organismo receptor. Finalmente, el replicón generado replicará en cultivos celulares con una tasa similar a la del organismo receptor, pero no dará lugar a virus infectivo ya que carece de la secuencia codificante para la proteína E que es esencial para la formación de virus infectivo.



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

El ZIKV (organismo receptor) es un flavivirus transmitido por mosquitos de la especie Aedes que infecta humanos. Usualmente la infección es asintomática. En los casos en los que aparecen síntomas, la enfermedad es leve y se caracteriza por la aparición de fiebre, erupciones cutáneas y conjuntivitis. Recientemente, el ZIKV ha adquirido una gran relevancia en salud humana por su posible relación con los casos de microcefalia en niños recién nacidos en varias regiones de Brasil con alta prevalencia del ZIKV. En este sentido, el virus se ha detectado en el cerebro de fetos con microcefalia y se ha demostrado que es capaz de infectar in vitro células progenitoras neurales del cortex. En el caso del virus recombinante con una mutación silenciosa como marcador genético, se espera que la patogenicidad sea la misma que la descrita en el párrafo anterior para el organismo receptor. Por otra parte, se espera que los virus con mutaciones en las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5, estén atenuados con respecto al organismo receptor. En cuanto al replicón, ya que no da lugar a virus infectivo, no se prevé ningún tipo de patogenicidad.

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

No se ha descrito ningún efecto sobre el medio ambiente del organismo receptor y tampoco se espera de los virus recombinantes o el replicón, ya que estos se confinarán exclusivamente al laboratorio de nivel 3 o 2 de bioseguridad, respectivamente.

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

No se prevén diferencias en las características nutricionales entre el organismo receptor y los OMGs que se generen.

- f) Marcadores específicos del OMG:

En el caso del virus recombinante con el marcador genético y del replicón, ambos presentan una mutación silenciosa en el nt 8408 (NS4B), en la que se ha cambiado una T por una C. El replicón, además carece de la secuencia codificante para la proteína E. En el caso de los virus recombinantes con mutaciones en las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5, además de la mutación silenciosa en el nt 8408, estos presentaran diversas mutaciones silenciosas, las cuales se introducirán para desoptimizar el uso de codones y generar virus atenuados que puedan constituir buenos candidatos a vacunas. Los cambios introducidos se detallan en el anexo adjunto.



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

El virus recombinante con el marcador genético en el nt 8408 y el replicón presentarán la misma estabilidad genética que el organismo receptor. Por otra parte, los virus con mutaciones en las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5, muy posiblemente estén atenuados y por lo tanto su estabilidad genética podría ser inferior a la del organismo receptor.

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

Tanto el organismo receptor como los OMGs generadas son virus RNA que replican en el citoplasma y no se integran en el cromosoma de las células infectadas. Por otra parte, su manejo estará confinado a laboratorios de nivel 3 de bioseguridad y no se prevé realizar coinfecciones entre ellos, por lo que la posibilidad de transferencia de material genético es prácticamente nula.

- 5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados.

- a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG.

Tanto los clones infectivos como el replicón generados en BAC se identificarán mediante análisis de restricción y secuenciación. Los virus recombinantes obtenidos a partir de los clones infectivos se identificarán por inmunofluorescencia, RT-PCR y secuenciación.

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

Los OMGs generados no existen en el medio ambiente y en ningún caso van a ser liberadas en el medio ambiente.



VII. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

1) Naturaleza de las operaciones:

- a) Enseñanza
- b) Investigación
- c) Desarrollo

2) Volumen o cantidad de OMG a utilizar:

a) Volumen máximo en el caso de microorganismos:

20 ml por ensayo con una concentración máxima de 10^8 unidades formadoras de placa virales por ml de cultivo.

En ningún caso se utilizarán placas petri. Los cultivos siempre se realizarán utilizando frascos de cultivo cerrados.

b) Número de plantas: **No aplica.**

c) Número de animales: **No aplica.**

3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada

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

Se prevé un periodo de 4 años desde la recepción de la autorización de la actividad confinada.

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

Generar un clon infectivo a partir del cual obtener un virus recombinante del ZIKV con la secuencia del aislado Natal RGN (Ref GenBank KU527068) con una mutación puntual silenciosa que se utilizará como marcador genético. El objetivo de generar el clon infectivo es el de disponer de un sistema de genética reversa para ZIKV.

A partir del clon infectivo, introducir mutaciones silenciosas en las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5 (potencialmente implicadas en la inhibición de la respuesta a interferón), con el fin de desoptimizar la expresión de las mismas y de este modo generar virus recombinantes atenuados que permitan estudiar las bases moleculares de la virulencia del ZIKV y puedan ser utilizados como candidatos a vacunas.

Construcción de un replicón del ZIKV. Se generará a partir del clon infectivo mediante la delección de la secuencia codificante para la proteína E, la cual es esencial para la producción de partículas virales infectivas pero no para la replicación del genoma



viral. Con el replicón generado se podrá estudiar el mecanismo de replicación del virus y testar antivirales sin la necesidad de manipular virus infectivo.

- 5) Origen del OMG: indicar si el OMG procede de otro centro o empresa (señalar nombre y ubicación), y si es así, si dicho centro o empresa está registrado conforme a la normativa española y/o europea vigente sobre OMG:

Los OMGs se generaran en las instalaciones de nivel 3 de bioseguridad del CNB. En el caso del replicón este se generará y se caracterizará en las instalaciones de nivel 2 de bioseguridad del CNB.

- 6) Información sobre el transporte de los OMG en el caso de que provengan de, o se destinen a otros centros o instalaciones, así como descripción de las medidas adoptadas durante el mismo en virtud de la legislación aplicable¹ (tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado).

No aplica.

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

El cDNA que codifica el genoma del virus ZIKV-Natal RGN (Ref GenBank KU527068), flanqueado por el promotor del virus CMV, la ribozima del virus de la hepatitis delta (Rz) y las secuencias de terminación y poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH), se construirá a partir de 4 fragmentos solapantes generados mediante síntesis química por la empresa canadiense BioBasic Inc. Los 4 fragmentos se clonarán secuencialmente en un BAC para generar el clon infectivo pBAC-ZIKV-FL. A partir de este clon infectivo, se generaran los clones infectivos con mutaciones en las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5, utilizando técnicas convencionales de biología molecular. Los clones infectivos generados se amplificarán en la cepa DH10B de E. Coli (no patogénica) y se purificarán utilizando el Kit LARGE CONSTRUCT de QIAGEN. Para el rescate de los virus recombinantes a partir de los clones infectivos, se transfectarán células Vero (1×10^6 células) con 5 μg del correspondiente clon infectivo en frascos cerrados de 12.5 cm² de superficie (F 12.5) en un volumen final de 3 ml de medio de cultivo y se incubaran a 37°C hasta la aparición de efecto citopático. Una vez detectado efecto citopático, se recogerán 0.5 ml de sobrenadante de cultivo que se utilizaran para amplificar el virus en células Vero frescas crecidas en F 12.5. Posteriormente el virus se clonará mediante dos ciclos de purificación a partir de placa de lisis en células Vero crecidas en placas de seis

¹ Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:

- 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. El formulario necesario para acompañar a los OMG en el transporte, puede encontrarse en el siguiente enlace: (<http://www.biodiv.org/biosafety/cop-mop/result.aspx?id=8288&lg=1>)
- Normativa nacional e internacional (OACI/IATA, OMI/MDG, TPF/RID y TPD/ADR) para el transporte de mercancías peligrosas y, en particular, de sustancias infecciosas y muestras para diagnóstico.

pocillos (M6) selladas herméticamente. El virus clonado se amplificará en células Vero crecidas en frascos cerrados de 75 cm² de superficie (F 75) en un volumen final de 10 ml de medio de cultivo, se alicuotará en criotubos de 1.5 ml y se almacenarán a -70°C en un ultracongelador dentro del laboratorio P3 del CNB. Finalmente, se determinará el título del stock viral generado utilizando células Vero crecidas en placas de 12 pocillos (M12). Para ello, se prepararán diluciones seriadas de factor 10 del stock viral y se inocularán 100 µl de las diluciones 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶ en pocillos de M12. Después de 2 h de adsorción a 37°C, se retirará el inóculo de virus y se reemplazará por 1 ml de medio semisólido (mezcla 1:1 de agar 1.4% y DMEM 2x suplementado con 4% de suero fetal bovino). Las placas de titulación se incubarán a 37°C durante 3-4 días. Posteriormente, se fijarán las células con formaldehído (10% formaldehído p/v en PBS completo) durante 1 h y se retirará el medio semisólido. Este procedimiento de fijación inactiva completamente el virus antes de que las placas salgan de la cabina de flujo laminar. A continuación se teñirán las células con cristal violeta (0.1% en una mezcla de metanol:agua en la proporción 20:80) durante 30 min para observar las placas de lisis. Los títulos de virus que se generarán estarán en torno a 1x10⁶ y 1x10⁸ ufp/ml.

El replicón del ZIKV-Natal RGN se generará a partir del clon infectivo pBAC-ZIKV-FL mediante delección de la secuencia codificante para la proteína E, utilizando técnicas estándar de biología molecular. El replicón generado se amplificará en la cepa DH10B de E. Coli (no patogénica) y se purificará utilizando el Kit LARGE CONSTRUCT de QIAGEN. Finalmente, la funcionalidad del replicón se analizará en células Vero. Dado que el replicón no es infectivo, la manipulación y estudio funcional del mismo se realizará en el laboratorio de nivel 2 de contención biológica del CNB. Para ello, Se transfectarán células Vero (1x10⁶ células) con 5 µg del replicón en frascos cerrados de 12.5 cm² de superficie (F 12.5) en un volumen final de 3 ml de medio de cultivo y se incubarán a 37°C. A las 24 y 48 hpt, se extraerá el RNA total de las células transfectadas utilizando el Kit RNeasy de Qiagen y se analizará la replicación del replicón mediante RT-PCR cuantitativa usando oligonucleótidos específicos.

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

Si bien actualmente el ZIKV está clasificado dentro del grupo de riesgo 2, cabe la posibilidad que se reclasifique a nivel 3 por ser un flavivirus y su posible relación con microcefalia. Por este motivo, la última etapa de clonaje para la generación de los clones infectivos y el rescate de los correspondientes virus infectivos se realizará en todos los casos en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica del CNB, siguiendo las normas indicadas en el Reglamento de Funcionamiento y en el Plan de Emergencias del laboratorio y utilizando la infraestructura de contención, (instalaciones generales, medios de protección colectiva e individual) de que dispone esta instalación NCB3. Se seguirán todos los procesos preceptivos, tales como no sacar los brazos de la cabina de trabajo sin desinfectarlos, desinfectar cualquier objeto que esté en el interior de la cabina y esperar diez minutos antes de sacarlo. Utilizar en todos los procedimientos doble contenedor, uso de cestillos de bioseguridad para las centrifugaciones y contenedores de transporte especiales, etc.

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.

Finalmente, dada la posible relación entre el ZIKV y la microcefalia en recién nacidos, ninguna persona embarazada estará expuesta al virus y todos los investigadores que trabajen regularmente en el NCB3 con el ZIKV, guardarán cuarentena antes de entrar a cualquier animalario de experimentación animal. El investigador responsable del proyecto y encargado de su ejecución ha recibido cursos de formación en bioseguridad en el CNB y de nivel 3 de contención biológica en el Instituto de Salud Carlos III, y ha trabajado con virus de nivel 3 de contención biológica (SARS-CoV) a lo largo de más de un año.

El replicón se generará a partir del clon infectivo mediante la delección de la secuencia que codifica la proteína E. Una vez generado y dado que no existe riesgo de generación de virus infectivo, su manipulación y posterior análisis funcional en células Vero se llevarán a cabo en el laboratorio de nivel 2 de contención biológica del CNB, siguiendo estrictamente el reglamento y plan de emergencias específicos para este tipo de laboratorios.

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 que impliquen el uso de virus infectivo se realizarán en uno de los tres sublaboratorios del laboratorio nº150 de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica del CNB con autorización del 7/03/01 y número de notificación A/ES/00/I-8.

Por otra parte, las operaciones con el replicón (no existe riesgo de generación de virus infectivo) se llevarán a cabo en el laboratorio nº180 de cultivos “in vitro” de nivel 2 de contención biológica del CNB.

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 ya expuestas en el reglamento de funcionamiento y plan de emergencias del laboratorio de nivel 3 de contención biológica (NCB3) del CNB.



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 doctorado.



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 decultivos “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 ACTIVIDADES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE
ORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE

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

I. **RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD**

1) Entidad

Nombre: **Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)**
Dirección postal: **c/ Darwin 3**
28049 - Madrid

2) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: **Fernando Rojo de Castro, Profesor de Investigación del CSIC**
NIF: : **50295113-R**
Cargo: **Director del CNB**
Tel: **91 585 45 03 / 91 585 45 39**
Fax: **91 585 45 06**
Correo electrónico: **direccion.cnb.csic.es / frojo@cnb.csic.es**

3) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: **Fernando Almazán Toral**
NIF: **02200595-R**
Cargo: **Científico Titular del CSIC**
Tel: **915854678**
Fax: **915854506**
Correo electrónico: **falmazan@cnb.csic.es**

4) 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**
Fax: **91 585 45 06**
Correo electrónico: **fusera@cnb.csic.es**



5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto

Fernando Usera Mena

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD.

1. Objetivo de la actividad:

1.1) Rescate del virus del ZIKA (ZIKV) a partir de un clon infectivo generado en un cromosoma artificial de bacterias (BAC). Se generará un clon infectivo del ZIKV en BAC en base a la secuencia del aislado Natal RGN (Ref GenBank KU527068) con una mutación puntual silenciosa que se utilizará como marcador genético. A partir del clon infectivo generado se rescatará virus infectivo mediante la transfección de este en células Vero. El objetivo de generar el clon infectivo es el de disponer de un sistema de genética reversa para ZIKV. Además, utilizando el clon infectivo se generarán mutantes de sustitución de las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5, potencialmente implicadas en la inhibición de la respuesta a interferón. El objetivo de construir estos mutantes es estudiar las bases moleculares de la virulencia del ZIKV y generar virus atenuados que puedan ser utilizados como candidatos a vacunas.

1.2) Construcción de un replicón del ZIKV. Se generará a partir del clon infectivo mediante la delección del gen de la envuelta (E), el cual es esencial para la producción de partículas virales infectivas pero no para la replicación del genoma viral. Con el replicón generado se podrá estudiar el mecanismo de replicación del virus y testar antivirales sin la necesidad de manipular virus infectivo.

2. Duración prevista de la actividad:

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

Se prevé un periodo de 4 años desde la recepción de la autorización de la actividad confinada

III. EVALUACIÓN DE RIESGO

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

1. Identificación de las propiedades nocivas del OMG, en función de las características del:
Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.

a) Organismo receptor.

El organismo receptor es el flavivirus ZIKV-Natal RGN (Ref GenBank KU527068EI), el cual se modificará genéticamente utilizando un clon infectivo en BAC (pBAC-ZIKV-FL) que contiene el cDNA que codifica el genoma del virus bajo el control del promotor del virus citomegalovirus (CMV). El cDNA que codifica el genoma del



virus se construirá a partir de 4 fragmentos solapantes generados mediante síntesis química. Mediante la transfección del clon infectivo en células Vero se rescatará virus infectivo, el cual se amplificará en células Vero, se titulará y se almacenará a -70°C.

El ZIKV es un flavivirus transmitido por mosquitos de la especie Aedes que infecta humanos. Usualmente la infección es asintomática. En los casos en los que aparecen síntomas, la enfermedad es leve y se caracteriza por la aparición de fiebre, erupciones cutáneas y conjuntivitis. Recientemente, el ZIKV ha adquirido una gran relevancia en salud humana por su posible relación con los casos de microcefalia en niños recién nacidos en varias regiones de Brasil con alta prevalencia del ZIKV. En este sentido, el virus se ha detectado en el cerebro de fetos con microcefalia y se ha demostrado que es capaz de infectar in vitro células progenitoras neurales del cortex. Si bien, actualmente el ZIKV está clasificado dentro del grupo de riesgo 2, cabe la posibilidad de que se reclasifique a nivel 3 por ser un flavivirus y su posible relación con microcefalia. Por este motivo, el rescate de virus infectivo se realizará en todos los casos en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) utilizando equipos de protección individual. Se seguirán todos los procesos preceptivos, tales como no sacar los brazos de la cabina de trabajo sin desinfectarlos, desinfectar cualquier objeto que esté en el interior de la cabina y esperar diez minutos antes de sacarlo. Todos los residuos biosanitarios generados se inactivarán en un primer paso en el interior de la cabina de flujo laminar. Posteriormente, volverán a ser inactivados mediante autoclave (residuos sólidos) o en la planta de inactivación de efluentes líquidos del laboratorio (residuos líquidos). Finalmente, dada la posible relación entre el ZIKV y la microcefalia en recién nacidos, ninguna persona embarazada estará expuesta al virus y todos los investigadores que trabajen regularmente en el P3 con el ZIKV, guardarán cuarentena antes de entrar a cualquier animalario de experimentación animal.

El organismo receptor solo es capaz de sobrevivir en el vector de transmisión (mosquitos de la especie Aedes) o en las especies susceptibles de ser picadas por estos mosquitos como los seres humanos. Este virus es muy lábil si se somete a condiciones medioambientales externas (sequedad, luz ultravioleta, etc.). Actualmente, el ZIKV se distribuye en la mitad norte del continente Africano y varios países de Sudamérica y el Sudoeste Asiático y el mosquito vector no se encuentra actualmente en la zona central de la Península Ibérica.

La secuencia de nucleótidos del organismo receptor se detalla en el anexo adjunto.

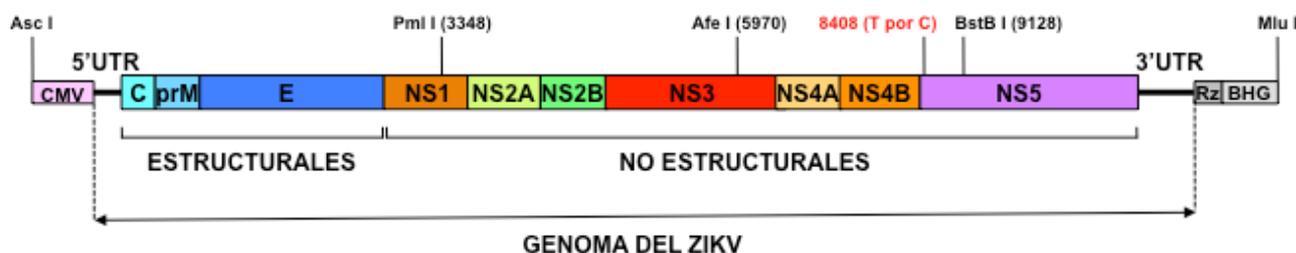
b) Organismo donante.

En la actividad se propone la generación de un clon infectivo en BAC del aislado Natal RGN del ZIKV con el fin de disponer de un sistema de genética reversa que permita la manipulación genética del virus. El cDNA que codifica el genoma del virus se construirá a partir de 4 fragmentos solapantes generados mediante síntesis química, los cuales se clonarán secuencialmente en un BAC bajo el control del promotor del CMV. A partir del clon infectivo, se generarán nuevos clones infectivos con mutaciones en las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5, y un replicón mediante la delección de la secuencia codificante para la proteína E.

En este caso en concreto, no se pretende introducir un gen de un organismo en otro. Lo único que se pretende es mutar o deletar secuencias del genoma viral con el fin de generar virus recombinantes atenuados o un replicón que permita estudiar el mecanismo de replicación del virus y testar antivirales sin la necesidad de manipular virus infeccioso. Por esta razón, no existe un organismo donante y por lo tanto la información requerida al este respecto no aplica en esta actividad concreta.

c) Inserto.

El inserto que se clonará en el BAC para generar un clon infeccioso del ZIKV está constituido por la secuencia del promotor del virus CMV, seguida del genoma del ZIKV-Natal RGN (Ref GenBank KU527068) con una mutación silenciosa en el nt 8408 (T por C) como marcador genético, la secuencia de la ribozima del virus de la hepatitis delta (Rz) y las señales de terminación y poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH).



En el caso de los clones infecciosos con las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5 mutadas, el inserto será el mismo que en el caso del clon infeccioso pBAC-ZIKV-FL, incluyendo mutaciones silenciosas que desoptimicen la expresión de las proteínas NS4A, NS4B y NS5. Estos insertos se denominan CMV-ZIKV (NS4A*)-RzBGH, CMV-ZIKV* (NS4B*)-RzBGH y CMV-ZIKV* (NS5*)-RzBGH, respectivamente.*

En el caso del replicón, el inserto será el mismo que en el caso del clon infeccioso pBAC-ZIKV-FL pero con la secuencia codificante para la proteína E deletada. El inserto se denomina CMV-ZIKV (dE)-RzBGH.*

Información sobre los genes estructurales presentes en el inserto

El genoma del ZIKV presente en el inserto contiene una única ORF que se traduce dando lugar a una poliproteína. Posteriormente, la poliproteína es procesada proteolíticamente generándose 10 productos maduros. La función que se presupone a estas proteínas por homología con el virus DENGUE es la siguiente:

***C:** Proteína de la cápsida. Implicada en la en la encapsidación del genoma viral.*

***prM:** proteína de membrana que es procesada para dar lugar a la proteína M madura.*

***E:** proteína de la envuelta. Es el ligando viral.*

***NS1:** Proteína no estructural 1.*

***NS2A:** Proteína no estructural 2A. Implicada en la inhibición de la vía de señalización del interferón.*

***NS2B:** Proteína no estructural 2B. Es una serín proteasa.*



NS3: Proteína no estructural 3. Tiene actividad serín proteasa, Helicasa y RNA trifosfatasa. Junto con la NS2B participa en el procesamiento proteolítico de la poliproteína.

NS4A: Proteína no estructural 4A. Implicada en la inhibición de la vía de señalización del interferón.

NS4B: Proteína no estructural 4B. Implicada en la inhibición de la vía de señalización del interferón.

NS5: Proteína no estructural 4B. Es la RNA polimerasa dependiente de RNA. Además presenta actividad metiltransferasa. Implicada en los procesos de replicación y transcripción del genoma viral y en la inhibición de la vía de señalización del interferón.

Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto

CMV: promotor inmediatamente temprano del CMV. Permite la expresión del genoma viral por la RNA Polimerasa II celular cuando el clon infectivo es transfectado en células Vero.

5' y 3' UTRs: Secuencias no traducidas del extremo 5' y 3' del genoma del ZIKV, respectivamente. Son regiones altamente estructuradas implicadas en la replicación, transcripción y traducción del genoma viral.

Rz: secuencia de la ribozima del virus de la hepatitis delta. Su función es procesar el RNA sintetizado por el clon infectivo a través del promotor del virus CMV de tal modo que el extremo 3' del RNA generado sea idéntico al del genoma viral.

BGH: secuencias de terminación y poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Regulan la terminación y poliadenilación del RNA sintetizado por el clon infectivo a través del promotor CMV.

En el caso del virus recombinante con una mutación silenciosa como marcador genético, se espera que la patogenicidad sea la misma que la descrita para el organismo receptor. Por otra parte, se espera que los virus con mutaciones en las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5, estén atenuados con respecto al organismo receptor. En cuanto al replicón, ya que no da lugar a virus infectivo, no se prevé ningún tipo de patogenicidad.

La secuencia de todos los insertos descritos y la posición de los diferentes genes y elementos reguladores se muestra en el anexo adjunto.

d) Vector.

El vector utilizado para generar los clones infectivos y el replicón es el plásmido pBeloBAC11 (7507 pb), un BAC basado en el Factor F de E. coli. (Shizuya et al. 1992. PNAS 89: 8794-8797). El pBeloBAC11 es un plásmido de copia única que permite clonar establemente fragmentos de DNA de hasta 500 kb. Este vector se amplifica en la cepa DH10B de E. Coli., la cual no es patogénica para el ser humano.

Tanto la secuencia del plásmido como la posición de los diferentes genes y elementos reguladores se describe en el anexo adjunto.



- e) Organismo modificado genéticamente resultante.

Los OMGs son virus recombinantes del ZIKV con una mutación silenciosa puntual como marcador genético o con mutaciones en las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5 y un replicón con la secuencia codificante para la proteína E deletada. El virus recombinante con la mutación puntual silenciosa como marcador genético dará lugar a partículas víricas infectivas y replicará en células en cultivo e in vivo con la misma tasa de replicación que la descrita para el organismo receptor. En cuanto a los virus recombinantes con mutaciones en las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5, estas serán silenciosas y se introducirán para desoptimizar el uso de codones con el fin de generar virus atenuados que puedan constituir buenos candidatos a vacunas. Se prevé que den lugar a la formación de partículas víricas, si bien estas tendrán una probabilidad elevada de estar atenuadas. Por el contrario, en el caso del replicón al carecer de la proteína E no será posible la formación de partículas víricas.

En cuanto a la capacidad de supervivencia de las OMGs generadas, estas al igual que el organismo receptor, solo serán capaces de sobrevivir en cultivos celulares, en el vector de transmisión (mosquitos de la especie Aedes) o en las especies susceptibles de ser picadas por estos mosquitos como los seres humanos. En cuanto al replicón, este solo es capaz de sobrevivir en cultivos celulares.

- f) Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.

El ZIKV (organismo receptor) es un flavivirus transmitido por mosquitos de la especie Aedes que infecta humanos. Usualmente la infección es asintomática. En los casos en los que aparecen síntomas, la enfermedad es leve y se caracteriza por la aparición de fiebre, erupciones cutáneas y conjuntivitis. Recientemente, el ZIKV ha adquirido una gran relevancia en salud humana por su posible relación con los casos de microcefalia en niños recién nacidos en varias regiones de Brasil con alta prevalencia del ZIKV. En este sentido, el virus se ha detectado en el cerebro de fetos con microcefalia y se ha demostrado que es capaz de infectar in vitro células progenitoras neurales del cortex. En lo que respecta a la patogenicidad de las OMGs generadas, es de esperar que en el caso del virus recombinante con una mutación silenciosa como marcador genético la patogenicidad sea la misma que la descrita para el organismo receptor. Por otra parte, se espera que los virus con mutaciones en las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5, estén atenuados con respecto al organismo receptor. En cuanto al replicón, ya que no da lugar a virus infectivo, no se prevé ningún tipo de patogenicidad.

No se ha descrito ningún efecto del organismo receptor en sanidad animal y vegetal y por lo tanto tampoco se prevé ningún efecto en el caso de las OMGs generadas.

- g) Efectos para el medio ambiente.

Los virus recombinantes generados al igual que el organismo receptor (ZIKV) solo son capaces de sobrevivir en cultivos celulares, en el vector de transmisión (mosquitos de la especie Aedes) o en las especies susceptibles de ser picadas por estos mosquitos como los seres humanos. En cuanto al replicón, este solo es capaz de sobrevivir en cultivos celulares. No se ha descrito ningún efecto sobre el



medio ambiente del organismo receptor y tampoco se espera de los virus recombinantes o el replicón, ya que estos se confinarán exclusivamente al laboratorio de nivel 3 o 2 de bioseguridad, respectivamente.

2. Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente:

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

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

Si bien, actualmente el ZIKV está clasificado dentro del grupo de riesgo 2, cabe la posibilidad de que se reclasifique a nivel 3 por ser un flavivirus y su posible relación con microcefalia. Por este motivo, la generación y manipulación de los OMGs que impliquen la generación de partículas virales se realizará en todos los casos en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica del CNB siguiendo las normas indicadas en el Reglamento de Funcionamiento y en el Plan de Emergencias del laboratorio y utilizando la infraestructura de contención biológica (instalaciones, medios de protección colectiva e individual) de la instalación.

En el caso del replicón generado, la actividad se clasificará como actividad confinada tipo 2, ya que a partir del replicón no se puede generar virus infeccioso al carecer de la proteína E. En solicitud aparte se declarará esta actividad confinada de tipo 2.

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

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

Las actividades que impliquen la manipulación de virus infeccioso se llevarán a cabo en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica del CNB, por lo que las OMGs estarán confinadas a este espacio y no saldrán en ningún momento del mismo. Se seguirán todos los procesos preceptivos, tales como no sacar los brazos de la cabina de trabajo sin desinfectarlos, desinfectar cualquier objeto que esté en el interior de la cabina y esperar diez minutos antes de sacarlo.

Utilizar en todos los procedimientos doble contenedor, uso de cestillos de bioseguridad para las centrifugaciones y contenedores de transporte especiales, etc.

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.

Finalmente, dada la posible relación entre el ZIKV y la microcefalia en recién nacidos, ninguna persona embarazada estará expuesta al virus y todos los investigadores que trabajen regularmente en el NCB3 con el ZIKV, guardarán cuarentena antes de entrar a cualquier animalario de experimentación animal. El investigador responsable del proyecto y encargado de su ejecución ha recibido cursos de formación en bioseguridad en el CNB y de nivel 3 de contención biológica en el Instituto de Salud Carlos III, y ha trabajado con virus de nivel 3 de contención biológica (SARS-CoV) a lo largo de más de un año.

El replicón se generará a partir del clon infectivo mediante la delección de la secuencia que codifica la proteína E. Una vez generado y dado que no existe riesgo de generación de virus infectivo, su manipulación y posterior análisis funcional en células Vero se llevarán a cabo en el laboratorio de nivel 2 de contención biológica del CNB, siguiendo estrictamente el reglamento y plan de emergencias específicos para este tipo de laboratorios.

b) Concentración y escala utilizadas.

Se prevé un volumen máximo de 20 ml de los respectivos OMGs con una concentración máxima de 10^8 unidades formadoras de placa virales por ml de cultivo. En ningún caso se utilizarán placas Petri y los cultivos siempre se realizarán utilizando frascos de cultivo cerrados.

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

El cDNA que codifica el genoma del virus ZIKV-Natal RGN (Ref GenBank KU527068), flanqueado por el promotor del virus CMV, la ribozima del virus de la hepatitis delta (Rz) y las secuencias de terminación y poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH), se construirá a partir de 4 fragmentos solapantes generados mediante síntesis química por la empresa canadiense BioBasic Inc. Los 4 fragmentos se clonarán secuencialmente en un BAC para generar el clon infectivo pBAC-ZIKV-FL. A partir de este clon infectivo, se generaran los clones infectivos con mutaciones en las secuencias codificantes para las proteínas NS4A, NS4B y NS5, utilizando técnicas convencionales de biología molecular. Los clones infectivos generados se amplificarán en la cepa DH10B de *E. Coli* (no patogénica) y se purificarán utilizando el Kit LARGE CONSTRUCT de QIAGEN. Para el rescate de los virus recombinantes a partir de los clones infectivos, se transfectarán células Vero (1×10^6 células) con 5 μ g del correspondiente clon infectivo en frascos cerrados de 12.5 cm² de superficie (F 12.5) en un volumen final de 3 ml de medio de cultivo y se incubaran a 37°C hasta la aparición de efecto citopático. Una vez detectado efecto citopático, se recogerán 0.5 ml de sobrenadante de cultivo que se utilizaran para amplificar el virus en células Vero frescas crecidas en F 12.5. Posteriormente el virus se clonará mediante dos ciclos de purificación a partir de



placa de lisis en células Vero crecidas en placas de seis pocillos (M6) selladas herméticamente. El virus clonado se amplificará en células Vero crecidas en frascos cerrados de 75 cm² de superficie (F 75) en un volumen final de 10 ml de medio de cultivo, se alicuotará en criotubos de 1.5 ml y se almacenarán a -70°C en un ultracongelador dentro del laboratorio P3 del CNB. Finalmente, se determinará el título del stock viral generado utilizando células Vero crecidas en placas de 12 pocillos (M12). Para ello, se prepararán diluciones seriadas de factor 10 del stock viral y se inocularán 100 µl de las diluciones 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶ en pocillos de M12. Después de 2 h de adsorción a 37°C, se retirará el inóculo de virus y se reemplazará por 1 ml de medio semisólido (mezcla 1:1 de agar 1.4% y DMEM 2x suplementado con 4% de suero fetal bovino). Las placas de titulación se incubarán a 37°C durante 3-4 días. Posteriormente, se fijarán las células con formaldehído (10% formaldehído p/v en PBS completo) durante 1 h y se retirará el medio semisólido. Este procedimiento de fijación inactiva completamente el virus antes de que las placas salgan de la cabina de flujo laminar. A continuación se teñirán las células con cristal violeta (0.1% en una mezcla de metanol:agua en la proporción 20:80) durante 30 min para observar las placas de lisis. Los títulos de virus que se generarán estarán en torno a 1x10⁶ y 1x10⁸ ufp/ml. Todo este proceso se llevará a cabo en el laboratorio de contención biológica de nivel 3, por lo que el personal y el entorno expuestos se reducen al máximo.

El replicón del ZIKV-Natal RGN se generará a partir del clon infeccioso pBAC-ZIKV-FL mediante delección de la secuencia codificante para la proteína E, utilizando técnicas estándar de biología molecular. El replicón generado se amplificará en la cepa DH10B de E. Coli (no patogénica) y se purificará utilizando el Kit LARGE CONSTRUCT de QIAGEN. Finalmente, la funcionalidad del replicón se analizará en células Vero. Dado que el replicón no es infeccioso, la manipulación y estudio funcional del mismo se realizará en el laboratorio de nivel 2 de contención biológica del CNB, siguiendo estrictamente el reglamento y plan de emergencias específicos para este tipo de laboratorios. Para ello, se transfectarán células Vero (1x10⁶ células) con 5 µg del replicón en frascos cerrados de 12.5 cm² de superficie (F 12.5) en un volumen final de 3 ml de medio de cultivo y se incubarán a 37°C. A las 24 y 48 hpt, se extraerá el RNA total de las células transfectadas utilizando el Kit RNeasy de Qiagen y se analizará la replicación del replicón mediante RT-PCR cuantitativa usando oligonucleótidos específicos.

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

Si bien, actualmente el ZIKV está clasificado dentro del grupo de riesgo 2, cabe la posibilidad de que se reclasifique a nivel 3 por ser un flavivirus y su posible relación con microcefalia. Por este motivo, la generación y manipulación de los OMGs que impliquen la generación de partículas virales se realizará en todos los casos en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica del CNB, siendo este nivel de confinamiento suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente.

En el caso del replicón generado, la actividad se clasifica como actividad confinada tipo 2, ya que a partir del replicón no se puede generar virus infeccioso al carecer de la proteína E. Este nivel (grado 2) 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:
Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.

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

Proximidad a fuentes de peligro potenciales

El riesgo de contaminación en dependencias cercanas a la instalación o en el medio ambiente externo al CNB 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

- 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.

- 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.

- El 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.

Condiciones climáticas predominantes

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

Notificación de la instalación

Las operaciones que impliquen el uso de virus infectivo se realizarán en uno de los tres sublaboratorios del laboratorio NCB3nº150 de cultivos "in vitro" de nivel 3 de contención biológica del CNB con autorización del 7/03/01 y número de notificación A/ES/00/I-8. Por otra parte, las operaciones con el replicón (no existe riesgo de generación de virus infectivo) se llevarán a cabo en el laboratorio NCB2nº180 de cultivos "in vitro" de nivel 2 de contención biológica del CNB.

- b) 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.

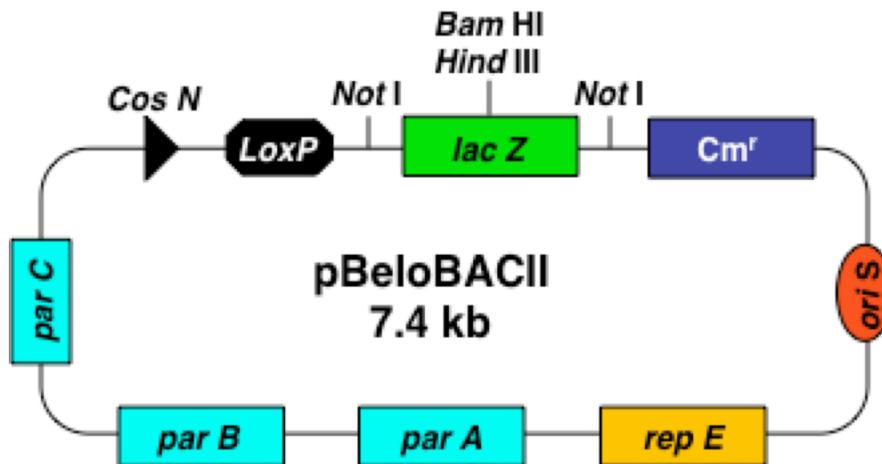
c) Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales.

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

d) Planes de emergencia (para actividades tipo 3 y 4).

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

SECUENCIA DEL PLÁSMIDO pBeloBAC11 (7507 pb)



LacZ: gen que permite la selección por color. Posición 56-436

BamHI: sitio de restricción para la inserción de secuencias exógenas. Posición 355

HindIII: sitio de restricción para la inserción de secuencias exógenas. Posición 385

Cm^r: gen de resistencia a cloranfenicol. Posición 766-1425.

OriS: Origen de replicación del factor F. Posición 2370-2436

Rep E: gen regulador que junto con el OriS median la replicación unidireccional del plásmido. Posición 2765-3520.

ParA, ParB y ParC: genes que controlan el número de copias del plásmido y su segregación a las células hijas durante la división bacteriana. Posiciones 4108-5274, 5274-6245 y 6318-6791, respectivamente.

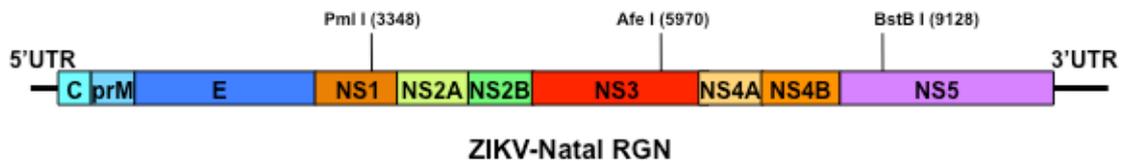
Cos N y LoxP: elementos reguladores que contienen el sitio de corte para la terminasa del fago lambda y la cre-recombinasa P1, respectivamente. Posiciones 7050-7449 y 7467-7500, respectivamente.

```
GCGGCCGCAAGGGGTTTCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTTCGGGGCTGGCTTAACCTATGCGGCA
TCAGAGCAGATTGTAAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAA
AATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGG
CCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCC
AGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGC
GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGCTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGAGTATTCTA
TAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTC
ACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCT
AACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCA
TTAATGAATCGGCCAACGCGAACCCCTTGC GGCCGCCCGGGCCGTCGACCAATTCTCATGTTTGACA
GCTTATCATCGAATTTCTGCCATTCATCCGCTTATTATCACTTATTCAGGCGTAGCAACCAGGCGTTA
AGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAATTACGCCCGGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATT
CATTAAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCAT
CAGCACCTTGTGCGCTTTCGTATAATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGCGAAGAAAGTTGCCATAT
TGCCACGTTTAAATCAAACCTGGTGAAACTACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCA
ATAAACCTTTAGGGAAATAGGCCAGTTTTACCCTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAG
AAACTGCCGGAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAA
CGGTGTAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTTCATTGCCATACGGAATTCC
GGATGAGCATTATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAACTTGTGCTTATTTTTCTT
TACGGTCTTTAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACT
GAAATGCCTCAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTT
TCTCCATTTTAGCTTCTTAGCTCCTGAAACTCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTA
TTTTATTATGGTGAAGTTGGAACCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTCGCCAAAAGTTGGCC
CAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGACACCAGGATTTATTTATTCTGCGAAGTGATCTTCCGTACAGG
TATTTATTCGCGATAAGCTCATGGAGCGGCGTAACCGTCGCACAGGAAGGACAGAGAAAGCGCGGAT
CTGGGAAGTGACGGACAGAACGGTCAGGACCTGGATTGGGAGGCGGTTGCCGCCGCTGCTGCTG
ACGGTGTGACGTTCTCTGTTCCGGTCACACCACATACGTTCCGCCATTCCTATGCGATGCACATGCTG
TATGCCGGTATACCGCTGAAAGTTCTGCAAAGCCTGATGGGACATAAGTCCATCAGTTCAACGGAAGT
```

CTACACGAAGGTTTTGCGCTGGATGTGGCTGCCCGGCACCGGGTGCAGTTTGCAGTGCCGGAGTC
TGATGCGGTTGCGATGCTGAAACAATTATCCTGAGAATAAATGCCTTGGCCTTTATATGGAAATGTGG
AACTGAGTGGATATGCTGTTTTGTCTGTTAAACAGAGAAGCTGGCTGTTATCCACTGAGAAGCGAAC
GAAACAGTCGGGAAAACTCCCATTATCGTAGAGATCCGCATTATTAATCTCAGGAGCCTGTGTAGCG
TTTATAGGAAGTAGTGTCTGTCTATGATGCCTGACAAGCGTAACGAAAAACGATTTGAATATGCCTCA
GGAACAATAGAAATCTTCGTGCGGTGTTACGTTGAAGTGGAGCGGATTATGTCAGCAATGGACAGAA
CAACCTAATGAACACAGAACCATGATGTGGTCTGTCCTTTACAGCCAGTAGTGCTCGCCGCGAGTCGA
GCGACAGGGCGAAGCCCTCGAGTGAGCGGAGGAAGCACCAGGGAACAGCACTTATATATTCTGCTTA
CACACGATGCCTGAAAAAACTTCCCTTGGGGTTATCCACTTATCCACGGGGATATTTTTATAATTATTT
TTTTTATAGTTTTAGATCTTCTTTTTTAGAGCGCCTTGTAGGCCTTTATCCATGCTGGTTCTAGAGAAG
GTGTTGACAAATGGCCCTTTCAGTGTGACAAATCACCTCAAATGACAGTCCCTGTCTGTGACAAAT
GCCCTAACCTGTGACAAATGGCCCTCAGAAAGCTGTTTTTTCACAAAGTTATCCCTGCTTATTGA
CTCTTTTTTATTTAGTGTGACAATCTAAAACTTGTACACCTTACATGGATCTGTACATGGCGAAACA
GCGGTTATCAATCACAAGAAACGTAAAAATAGCCCGGAATCGTCCAGTCAAACGACCTCACTGAGG
CGGCATATAGTCTCTCCCGGGATCAAAAACGTATGCTGTATCTGTTGTTGACCAGATCAGAAAATCT
GATGGCACCTACAGGAACATGACGGTATCTGCGAGATCCATGTTGCTAAATATGCTGAAATATTCGG
ATTGACCTCTGCGGAAGCCAGTAAGGATATACGGCAGGCATTGAAGAGTTTCGCGGGGAAGGAAGT
GGTTTTTATCGCCCTGAAGAGGATGCCGGCGATGAAAAAGGCTATGAATCTTTTCTTGGTTTATCA
AACGTGCGCAGTCCATCCAGAGGGCTTACAGTGTACATATCAACCCATATCTTCCCTTCTTTA
TCGGGTTACAGAACCCTTACGCAGTTTCGGCTTAGTGAAACAAAAGAAATCACAATCCCGTATGCC
ATGCGTTTATACGAATCCCTGTGTCAGTATCGTAAGCCGGATGGCTCAGGCATCGTCTCTGAAAAAT
CGACTGGATCATAGAGCGTTACCAGCTGCCTCAAAGTTACCAGCGTATGCCTGACTTCCGCCGCCGC
TTCTGACGGTCTGTGTTAATGAGATCAACAGCAGAACTCCAATGCGCCTCTCATACATTGAGAAAAA
GAAAGGCCGCCAGACGACTCATATCGTATTTTCTTCCCGGATATCACTTCCATGACGACAGGATAGT
CTGAGGGTATCTGTACAGATTTGAGGGTGGTTCGTACATTTGTTCTGACCTACTGAGGGTAATTT
GTACAGTTTTGCTGTTTCTTCCAGCTGCATGGATTTTCTCATACTTTTTGAACGTAAATTTTAAGGA
AGCCAAATTTGAGGGCAGTTTGTACAGTTGATTTCTTCTCTTTCCCTTCGTATGTGACCTGATATC
GGGGGTTAGTTGTCATCATTGATGAGGGTTGATTATCACAGTTTATTACTCTGAATTGGCTATCCGC
GTGTGTACCTCTACCTGGAGTTTTTCCACGGTGGATATTTCTTCTTGGCTGAGCGTAAGAGCTATC
TGACAGAACAGTTCTTCTTGGCTTCCGCGATTCGCTCGCTATGCTCGGTTACACGGCTGCGGCG
AGCGTAGTGATAATAAGTGAAGTGTGCTCTTCTTATCTCCTTTGTAGTGTGCTCTTATTT
TAAACAACTTGCGGTTTTTGTGACTTTGCGATTTTGTGTTGCTTTGCAGTAAATTGCAAGATTTAA
TAAAAAAGCCAAAGCAATGATTAAGGATGTTCCAGAATGAAACTCATGAAACACTAACCCAGTGCAT
AAACGCTGGTCATGAAATGACGAAGGCTATCGCCATTGACAGTTTAAATGATGACAGCCCGAAGCG
AGGAAAATAACCCGGCGCTGGAGAATAGGTGAAGCAGCGGATTTAGTTGGGGTTTCTTCTCAGGCTA
TCAGAGATGCCGAGAAAGCAGGGCGACTACCGCACCCGGATATGGAAATTCGAGGACGGGTTGAGC
AACGTGTTGGTTATACAATTGAACAAATTAATCATATGCGTGATGTGTTGGTACGCGATTGCGACGT
GCTGAAGACGATTTTCCACCGGTGATCGGGTTGCTGCCATAAAGGTGGCGTTTACAAAACCTCAG
TTTCTGTTTCTGCTCAGGATCTGGCTCTGAAGGGGCTACGTGTTTTGCTCGTGGAAAGGTAACGAC
CCCCAGGACCAAGCTCAATGTATCACGGATGGTACCAGATCTTCAATTCATGACAGACACTGCT
CCTGCCTTTCTATCTTGGGAAAAGGACGATGCTACTTATGCAATAAAGCCCACTTGGCTGGCCGGG
CTTGACATTATTCTTCTGCTGGCTCTGCACCGTATTGAAACTGAGTTAATGGGCAAAATTTGATGAA
GGTAAACTGCCACCGATCCACACCTGATGCTCCGACTGGCCATTGAAACTGTTGCTCATGACTATGA
TGTCATAGTTATTGACAGCGCGCCTAACCTGGGTATCGGCACGATTAATGTCGATGTGCTGCTGATG
TGCTGATTGTTCCACGCTGCTGAGTTGTTGACTACACCTCCGCACTGCAGTTTTTCGATATGCTT
CGTGATCTGCTCAAGAACGTTGATCTTAAAGGGTTCGAGCCTGATGTACGTATTTTGTACCAATA
CAGCAATAGTAATGGCTCTCAGTCCCGTGGATGGAGGACAAATTCGGGATGCTGGGGAAGCAT
GGTTTAAAAAATGTTGACTGAGTGAACCGATGAAGTTGGTAAAGGTGAGATCCGGATCCGGATGTT
TTGAACAGGCCATTGATCAACGCTCTTAACTGGTGCCTGGAGAAATGCTCTTTCTATTGGAACCT
GTCTGCAATGAAATTTTCGATCGTCTGATTAACCACGCTGGGAGATTAGATAATGAAGCGTGCGCC
GTTATTTCCAAAACATACGCTCAATACTCAACCGGTTGAAGATACTTCGTTATCGACACCAGCTGCCCC
GATGGTGGATTGTTAATTGCGCGCGTAGGAGTAATGGCTCGCGGTAATGCCATTACTTTGCCTGTAT
GTGGTCCGGATGTGAAGTTTACTCTTGAAGTGTCTCCGGGGTGATAGTGTGAGAAGACCTCTCGGGT
ATGGTCAGGTAATGAACGTGACCAGGAGCTGTTACTGAGGACGCACTGGATGATCTCATCCCTTCT
TTTCTACTGACTGGTCAACAGACACCGCGCTTCCGGTGAAGAGTATCTGGTGCATAGAAATTCGCGA
TGGGAGTCGCCGTCGTAAGGCTGCTGCACTTACCGAAAGTGATTATCGTGTCTGGTTGGCGAGCTG
GATGATGAGCAGATGGCTGCATTATCCAGATTGGGTAACGATTATCGCCCAACAAGTGCTTATGAACG
TGGTCAGCGTTATGCAAGCCGATTGCAGAATGAATTTGCTGGAAATATTTCTGCGCTGGCTGATGCG
GAAAATATTTACGTAAGATTATACCCGCTGTATCAACACCGCCAAATTCCTAAATCAGTTGTTGCT
CTTTTTTCTACCCCGGTGAACTATCTGCCCGGTGAGGTGATGCACTTCAAAAAGCCTTTACAGATAA
AGAGGAATTAAGCAGCAGGCATCTAACCTTACATGAGCAGAAAAAAGCTGGGGTGATATTTGAAG
CTGAAGAAGTTACTCTTTTAACTTCTGTCTTAAACGTCATCTGCATCAAGAAGTATTTAAGCT
CACGACATCAGTTTCTGCTGAGCGGATATTGATAAAGGGCGATAAAAATGGTCTTAACTGGAC
AGGTCTCGTGTCCAACGAGTGTATAGAGAAAATGAGGCCATTCTTAAAGAACTTAAAAGCCAGC
ACCCTGATGCGACCAGTTTTAGTCTACGTTTATCTGTCTTTACTTAATGTCTTTGTTACAGGCCAGA
AAGCATAACTGGCCTGAATATTCTCTGGGCCACTGTTCCACTTGTATCGTCCGGTCTGATAATCAG
ACTGGGACCACGGTCCCACTCGTATCGTCCGGTCTGATTATTAGTCTGGGACCACGGTCCCACTCGTA

TCGTCGGTCTGATTATTAGTCTGGGACCACGGTCCCCTCGTATCGTTCGGTCTGATAATCAGACTGG
 GACCACGGTCCCCTCGTATCGTTCGGTCTGATTATTAGTCTGGGACCATGGTCCCCTCGTATCGTC
 GGTCTGATTATTAGTCTGGGACCACGGTCCCCTCGTATCGTTCGGTCTGATTATTAGTCTGGAACAC
 GGTCCCCTCGTATCGTTCGGTCTGATTATTAGTCTGGGACCACGGTCCCCTCGTATCGTTCGGTCTG
 ATTATTAGTCTGGGACCACGATCCCCTCGTGTGTTCGGTCTGATTATCGGTCTGGGACCACGGTCC
 CACTTGTATTGTCGATCAGACTATCAGCGTGAGACTACGATTCCATCAATGCCTGTCAAGGGCAAGTA
 TTGACATGTCGTCGTAACCTGTAGAACGGAGTAACCTCGGTGTGCGGTTGTATGCCTGCTGTGGATT
 GCTGCTGTGTCCTGCTTATCCACAACATTTTGCACGCTTATGTGGACAAAATACCTGGTTACCCAG
 GCCGTGCCGGCAGCTTAACCGGGCTGCATCCGATGCAAGTGTGTCGCTGTGACGAGCTCGCGAGC
 TCGGACATGAGGTTGCCCGTATTCAGTGTGCTGATTTGTATTGTCTGAAGTTGTTTTACGTTAAGT
 TGATGCAGATCAATTAATACGATACCTGCGTCATAATTGATTATTTGACGTGGTTTGTGGCCTCCAG
 CAGTTGTGATATGTAGATGATAATCATTATCACTTTACGGTCTTTCCGGTGTATCCGACAGGTTAC
 GGGGCGCGACCTCGCGGTTTTCGCTATTTATGAAAATTTCCGGTTTAAGGCGTTTTCCGTTCTTCT
 TCGTCATAACTTAATGTTTTATTTAAAATACCCTCTGAAAAGAAAGAAACGACAGGTGCTGAAAGCG
 AGCTTTTTGGCCTCTGTCGTTTCTTTCTGTTTTGTCCGTGGAATGAACAATGGAAGTCCGAGCTC
 ATCGCTAATAACTTCGTATAGCATACTATTATACGAAGTTATATTGAT

SECUENCIA DEL ORGANISMO RECEPTOR (ZIKV-Natal RGN) (10808 pb)



5'UTR: secuencia no traducida del extremo 5'. Implicada en la replicación, transcripción y traducción del genoma viral. Posición 1-107.

C: Proteína de la cápsida. Implicada en la encapsidación del genoma viral. Posición 108-482.

prM: proteína de membrana que es procesada para dar lugar a la proteína M madura. Posición 480-977

E: proteína de la envuelta. Es el ligando viral. Posición 978-2492.

NS1: Proteína no estructural 1. Posición 2492-3578

NS2A: Proteína no estructural 2A. Implicada en la inhibición de la vía de señalización del interferón. Posición 3579-4232.

NS2B: Proteína no estructural 2B. Es una serín proteasa. Posición 4233-4664.

NS3: Proteína no estructural 3. Tiene actividad serín proteasa, Helicasa y RNA trifosfatasa. Junto con la NS2B participa en el procesamiento proteolítico de la poliproteína. Posición 4665-6473.

NS4A: Proteína no estructural 4A. Implicada en la inhibición de la vía de señalización del interferón. Posición 6474-6914.

NS4B: Proteína no estructural 4B. Implicada en la inhibición de la vía de señalización del interferón. Posición 6915-8420.

NS5: Proteína no estructural 4B. Es la RNA polimerasa dependiente de RNA. Además presenta actividad metiltransferasa. Implicada en los procesos de replicación y transcripción del genoma viral y en la inhibición de la vía de señalización del interferón. Posición 8421-10376.

3'UTR: secuencia no traducida del extremo 3'. Implicada en la replicación, transcripción y traducción del genoma viral. Posición 10377-10808.

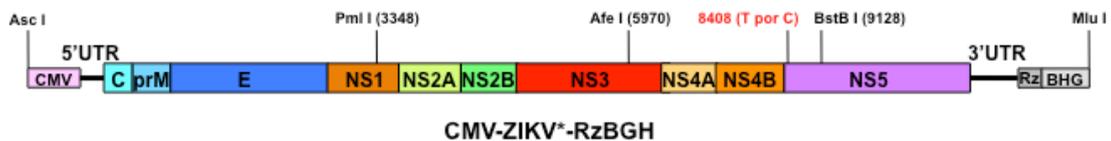
AGTTGTTGATCTGTGTGAATCAGACTGCGACAGTTTCGAGTTTTGAAGCGAAAGCTAGCAACAGTATCAA
 CAGGTTTTATTTTGGATTTGGAACGAGAGTTTTCTGGTTCATGAAAACCCAAAAAGAAATCCGGAGG
 ATTCCGGATTGTCAATATGCTAAAACGCGGAGTAGCCCGTGTGAGCCCTTTGGGGCCTTGAAGAGG
 CTGCCAGCCGACTTCTGCTGGGTTCATGGGCCATCAGGATGGTCTTGGCAATCTAGCTAGCTTTTGA
 GATTCACGGCAATCAAGCCATCACTGGGTCTCATCAATAGATGGGGTTCAGTGGGGAAAAAGAGGC
 TATGAAAATAATAAAGAAGTTCAAGAAAGATCTGGCTGCCATGCTGAGAATAATCAATGCTAGGAAGG
 AGAAGAAGAGACGAGGCCGAGATACTAGTGTCCGAATTGTTGGCCTCCTGCTGACCACAGCTATGCC
 AGCGGAGGTCAGTACGTTGGGAGTGCATACTATGTACTTGGACAGAAACGATGCTGGGGAGGC

CATATCTTTTCCAACCACATTGGGGATGAATAAGTGTTATATACAGATCATGGATCTTGGACACATGTG
TGATGCCACCATGAGCTATGAATGCCCTATGCTGGATGAGGGGGTGGAAACCAGATGACGTCGATTGT
TGGTGAACAGACGCTCAACTTGGGTTGTGTACGGAACCTGCCATCACAAAAAGGTGAAGCACGGA
GATCTAGAAGAGCTGTGACGCTCCCCTCCCATTCCACTAGGAAGCTGCAAACGCGGTGCGCAACCTG
GTTGGAATCAAGAGATAACACAAAGCACTTGTATTAGAGTCGAAAATTGGATATTGACGAAACCCTGGT
TCGCGTTAGCAGCAGCTGCCATCGCTTGGCTTTTGGGAAGCTCAACGAGCCAAAAAGTCATATACTT
GGTCATGATACTGCTGATTGCCCGGCATACAGCATCAGGTGCATAGGAGTCAGCAATAGGGACTTT
GTGGAAGGTATGTCAGGTGGGACTTGGGTTGATGTTGTCTTGAACATGGAGGTTGTGTCACCGTAA
TGGCACAGGACAAACCGACTGTCGACATAGAGCTGGTTACAACAACAGTCAGCAACATGGCGGAGGT
AAGATCCTACTGCTATGAGGCATCAATATCAGACATGGCTTCGGACAGCCGCTGCCAACACAAGGT
GAAGCCTACCTTGACAAGCAATCAGACACTCAATATGCTGCAAAAAGAACGTTAGTGGACAGAGGCT
GGGGAATGGATGTGGACTTTTTGGCAAAGGGAGCCTGTTGACATGCGCTAAGTTTGCATGCTCCAA
GAAAATGACCGGGAAGAGCATCCAGCCAGAGAATCTGGAGTACCGGATAATGCTGTCAGTTCATGGC
TCCCAGCACAGTGGGATGATCGTTAATGACACAGGACATGAAACTGATGAGAATAGAGCGAAGGTTG
AGATAACGCCCAATTCACCAAGAGCCGAAGCCACCCTGGGGGTTTTGGAAGCCTAGGACTTGATTG
TGAACCGAGGACAGGCCTTGACTTTTCAGATTTGATTACTTGACTATGAATAACAAGCACTGGTTGG
TCCACAAGGAGTGGTTCCACGACATTCATTACCTTGGCACGCTGGGGCAGACACCGGAACTCCACA
CTGGAACAACAAAGAAGCACTGGTAGAGTTCAAGGACGCACATGCCAAAAGGCAAACCTGTCGTGGTT
CTAGGGAGTCAAGAAGGAGCTTACACCGCCCTTGGAGCTCTGGAGCTGAGAGGCTGAGATGGATTG
GCAAAGGGGAAGCTGTCTCTGGCCACTTGAAATGTCGCCTGAAAATGGATAAACTTAGATTGAAGG
GCGTGTCACTCCTTGTGTACCGCAGCGTTCACATTCACCAAGATCCCGGCTGAAACACTGCACGG
GACAGTCACAGTGGAGGTACAGTACGCAGGGACAGATGGACCTTGAAGGTTCCAGCTCAGATGGC
GGTGGACATGCAAACTCTGACCCCAAGTTGGGAGGTTGATAACCGCTAACCCCGTAATCACTGAAAGC
ACTGAGAACTCTAAGATGATGCTGGAACCTTGTCCACCATTGGGGACTCTTACATTGTCATAGGAGT
CGGGGAGAAGAAGATCACCCACCCTGGCACAGGAGTGGCAGCACCATTGGAAAAGCATTGAAGC
CACTGTGAGAGGTGCCAAGAGAATGGCAGTCTTGGGAGACACAGCCTGGGACTTTGGATCAGTTGG
AGGCGCTCTCAACTCATTGGGCAAGGGCATCCATCAAATTTTTGGAGCAGCTTCAAATCATTGTTTTG
GAGGAATGTCTGTTCTCACAAATCCTCATTGGAACGTTGCTGATGTGGTTGGGTCTGAACACAAA
AATGGATCTATTTCCCTTATGTGCTTGGCCTTAGGGGGAGTGTTGATCTTCTTATCCACAGCCGTCTC
TGCTGATGTGGGGTGTCTCGGTGGACTTCTCAAAGAAGGAGACGAGATGCGGTACAGGGGTGTTCTG
CTATAACGACGTTGAAGCCTGGAGGGACAGGTACAAGTACCATCTGACTCCCCCGTAGATTGGCA
GCAGCAGTCAAGCAAGCCTGGGAAGATGGTATCTGCGGGATCTCTCTGTTTCAAGAATGGAGAACA
TCATGTGGAGTCAAGAGAAGGGAGCTCAACGCAATCTTGGAGAGAAATGGAGTCACTGACGGT
CGTTGTGGGATCTGTAAAAAACCCATGTGGAGAGTCCACAGAGATTGCCCGTGCCTGTGAAGGAG
CTGCCCCACGGCTGGAAGGCTTGGGGGAAATCGTACTTTCGTCAGAGCAGCAAAGACAAATAACAGCT
TTGTCGTGGATGGTGACACACTGAAGGAATGCCCACTCGAACATAGAGCATGGAACAGCTTTCTTGT
GGAGGATCATGGGTTCCGGGTATTTACACTAGTGTCTGGCTCAAGGTTAGAGAAGATTATTCATTAG
AGTGTGATCCAGCCGTTATTGGAACAGCTGTTAAGGGGAAGGAGGCTGTACACAGTGTCTAGGCTA
CTGGATTGAGAGTGAGAAGAATGACACATGGAGGCTGAAGAGGGCCCATCTAATCGAGATGAAAACA
TGTGAATGGCCAAAGTCCCACACATTTGGGCAAGTGAATAGAAGAGAGTGTCTGATCATTCCCA
AGTCTTTAGCTGGGCCACTCAGCCATCACAATACCAGAGGGCTACAGGACCCAAATGAAAGGGCC
ATGGCACAGTGAAGAGCTTGAATTCGGTTTGGGAATGCCCGGGCACTAAGGTCCACGTGGAGGAA
ACATGTGGAACAAGAGGACCATCTCTGAGATCAACCACTGCAAGCGGAAGGGTGTGAGGAATGGT
GCTGCAGGGAGTGCACAATGCCCCACTGTCGTTCCGGGCTAAAGATGGCTGTTGGTATGGAATGG
AGATAAGGCCCAGGAAAGAACCAGAAAGCAACTTAGTAAGGTCAAGTGGTACTGCAGGATCAACTGA
TCACATGGATCACTTCTCCCTTGGAGTGTCTGTGATTCTGCTCATGGTGCAGGAAGGGCTGAAGAAG
AGAATGACCACAAAGATCATATAAGCACATCAATGGCAGTGTCTGGTAGCTATGATCTGGGAGGATT
TTCAATGAGTGCCTGCTAAGCTTGAATTTGACTGGGCGCCACCTTCGCGGAAATGAACACTGGA
GGAGATGTAGCTCATCTGGCGCTGATAGCGGCATTCAAAGTCAGACCAGCGTTGCTGGTATCTTTCA
TCTTCAGAGCTAATTGGACACCCCGTGAAGCATGCTGCTGGCCTTGGCCTCGTGTCTTTTCAA
GCGATCTCCGCCTTGAAGGGCAGCTGATGTTCTCATCAATGGTTTTGCTTTGGCCTGTTGGCAA
TACGAGCGATGGTTGTTCCACGCACTGATAACATCACCTTGGCAATCCTGGCTGCTGACACCACT
GGCCCCGGGGCACACTGCTTGTGGCGTGGAGAGCAGGCCTTGTACTTGGCGGGGGTTTATGCTCCT
CTCTGAAGGGAAAAGGCAGTGTGAAGAAGAATACCATTGTCATGGCCCTGGGACTAACCCGCT
GTGAGGCTGGTGCACCCCATCAACGTGGTGGGACTGCTTGTCTACAAGGAGTGGGAAGCGGAGC
TGGCCCCCTAGCGAAGTACTCACAGCTGTTGGCCTGATATGCGCATTGGCTGGAGGGTTCCGCAAG
GCAGATATAGAGATGGCTGGGCCATGGCCGCGGTGGTCTGCTAATTGTCAGTTACGTGGTCTCAG
GAAAGAGTGTGGACATGTACATTGAAAGAGCAGGTGACATCACATGGGAAAAAGATGCGGAAGTCA
TGAAACAGTCCCCGGCTCGATGTGGCGCTAGATGAGAGTGGTATTCTCCCTGGTGGAGGATGA
CGGTCCCCCATGAGAGAGATCATACTCAAGGTGGTCTGATGACCATCTGTGGCATGAACCCAATA
GCCATACCTTTGACAGTGGAGCGTGGTACGTATACGTGAAGACTGGAAAAAGGAGTGGTGTCTAT
GGGATGTGCTGCTCCCAAGGAAGTAAAAAGGGGAGACCACAGATGGAGTGTACAGGATCAATGA
CTCGTAGACTGCTAGTTCAACACAAAGTTGGAGTGGGAGTTATGCAAGAGGGGGTCTTTACACTAT
GTGGCACGTCAAAAAGGATCCGCGCTGAGAAGCGGTGAAGGGAGACTTGTCCATACTGGGGAGA
TGCAAGCAGGATCTGGTGTACTGTGGTCCATGGAAGCTAGATGCCGCCTGGGACGGGCACAG
CGAGGTGCAGCTCTTGGCCGTGCCCCCGGAGAGAGCGAGGAACATCCAGACTCTGCCCGAAT
ATTTAAGACAAAGGATGGGGACATTGGAGCGGTTGCGCTGGATTACCCAGCAGGAACCTCAGGATCT

CCAATCCTAGACAAGTGTGGGAGAGTGATAGGACTTTATGGCAATGGGGTTCGTGATCAAAAATGGGA
GTTATGTTAGTGCCATCACCAAGGGAGGAGGGAGGAAGAGACTCCTGTTGAGTGCTTCGAGCCTTC
GATGCTGAAGAAGAAGCAGCTAACTGTCTTAGACTTGCATCCTGGAGCTGGGAAAACCAGGAGAGTT
CTTCTGAAATAGTCCGTGAAGCCATAAAAACAAGACTCCGTAAGTGTGATCTTAGCTCAACCAAGGGT
TGTGCTGCTGAAATGGAGGAAGCCCTTAGAGAGGCTTCCAGTGCCTTATATGACAAACAGCAGTCAAT
GTCACCCACTCTGGAACAGAAATCGTTCGACTTAATGTGCCATGCCACCTTCACTTCACGTCTACTACA
GCCAATCAGAGTCCCCAACTATAATCTGTATATTATGGATGAGGCCCACTTCACAGATCCCTCAAGTA
TAGCAGCAAGAGGATACATTTCAACAAGGGTTGAGATGGGCGAGGCGGCTGCCATCTTCATGACCGC
CAGGCCACCAGGAACCCGTGACGCATTTCCGGACTCCAACCTACCAATTATGGACACCGAAGTGGAA
GTCCCAGAGAGACCTGGAGCTCAGGCTTTGATTGGGTGACGGATCATTCTGGAAAAACAGTTTGGT
TTGTTCCAAGCGTGAGGAACGGCAATGAGATCGCAGCTTGTCTGACAAAGGCTGGAAAAACGGGTCAT
ACAGCTCAGCAGAAAGACTTTTGGACAGAGTTCCAGAAAAACAACATCAAGAGTGGGACTTTGTCG
TGACAACTGACATTTAGAGATGGGCGCCAACCTTTAAAGCTGACCGTGTCTAGATTCCAGGAGATGC
CTAAAGCCGGTCACTTGTGAGGCGAGAGAGTCAATTTGGCTGGACCCATGCCTGTACACATGCCA
GCGCTGCCAGAGGAGGGGGCGCATAGGCAGGAATCCCAACAACCTGGAGATGAGTATCTGTATG
GAGGTGGGTGCGCAGAGACTGACGAAGACCATGCACACTGGCTTGAAGCAAGAATGCTCCTTGACA
ATATTTACCTCCAAGATGGCCTCATAGCCTCGCTCTATCGACCTGAGGCCGACAAAGTAGCAGCCATT
GAGGGAGAGTTCAAGCTTAGGACGGAGCAAGGAAGACCTTTGTGGAATCATGAAAAGAGGAGATC
TTCTGTTTGGCTGGCCTATCAGTTGCATCTGCCGAATAACCTACACAGATAGAAGATGGTGCCTT
GATGGCAGCAACAACACCATAATGGAAGACAGTGTGCCGGCAGAGGTGTGGACAGACACGGGA
GAGAAAAGAGTGCTCAAACCGAGGTGGATGGACGCCAGAGTTTGTTCAGATCATGCGGCCCTGAAGT
CATTCAAGGAGTTTGGCGCTGGGAAAAGAGGAGCGGCTTTTGGAGTGATGGAAGCCCTGGGAACAC
TGCCAGGACACATGACAGAGAGATTCCAGGAAGCCATTGACAACCTCGCTGTGCTCATGCGGGCAGA
GACTGGAAGCAGGCCTTACAAAGCCGCGGCGGCCCAATTGCCGGAGACCTTAGAGACCATTATGCT
TTTGGGGTTGCTGGGAACAGTCTCGCTGGGAATCTTTTTCGTCTTGTGAGGAACAAGGGCATAGGG
AAGATGGGCTTTGGAATGGTACTCTTGGGGCCAGCGCATGGCTCATGTGGCTCTCGAAATTGAGC
CAGCCAGAATTGCATGTGTCTCATTGTTGTGTTCTATTGCTGGTGGTGTCTACCTGAGCCAGAA
AAGCAAAGATCTCCCCAGGACAACCAATGGCAATCATCATCATGGTAGCAGTAGGTCTTCTGGGCTT
GATTACCGCCAATGAACTCGGATGGTTGGAGAGAACAAGAGTGACCTAAGCCATCTAATGGGAAGG
AGAGAGGAGGGAGCAACCATAGGATTCTCAATGGACATTGACCTGCGGCCAGCCTCAGCTTGGGCC
ATCTATGCTGCCTTGACAACCTTTCATTACCCAGCCGTCCAACATGCAGTGACCACTTCATACAACAA
CTACTCCTAATGGCGATGGCCACGCAAGCTGGAGTGTGTTTGGTATGGGCAAAAGGGATGCCATTC
TAGCATGGGCTTTGGAGTCCCGTCTAATGATAGTTGCTACTCACAATTAACACCCCTGACCCT
AATAGTGGCCATCTTTTGTCTGCTGGCGCACTACTGTACTTGTATCCAGGGCTGCGAGCAGCAGCT
GCGCGTGCTGCCCAGAAGAGAACGGCAGCTGGCATCATGAAGAACCCTGTTGTGGATGGAATAGTG
GTGACTGACATTGACACAATGACAATTGACCCCAAGTGGAGAAAAAGATGGGACAGGTGCTACTCA
TAGCAGTAGCAGTCTCCAGCGCCATACTGTGCGGACCGCCTGGGGGTGGGGGGAGGCTGGGGCC
CTGATCACAGCCGCAACTTCCACTTTGTGGGAAGGCTCTCCGAACAAGTACTGGAACCTCTACAG
CCACTTCACTGTGTAACATTTTTAGGGGAAGTTACTTGGCTGGAGCTTCTCTAATCTACATAGTAACAA
GAAACGCTGGCTTGGTCAAGAGACGTGGGGTGAAGGAGGAGAGACCCTGGGAGAGAAATGGAAG
GCCCGCTTGAACCAGATGTCGGCCCTGGAGTTCTACTCCTACAAAAAGTCAGGCATCCAGGAGGT
GCAGAGAAGAGGCCCGCCGCGCCCTCAAGGATGGTGTGGCAACGGGAGGCCATGCTGTGTCCCGA
GGAAGTGCAAAGCTGAGATGGTTGGTGGAGCGGGGATACCTGCAGCCCTATGAAAAGTCAATTGAT
CTTGGATGTGGCAGAGGGGGCTGGAGTTACTACGCCGCCACCATCCGCAAAGTTCAAGAAAGTAAA
GGATACACAAAAGGAGGCCCTGGTCATGAAGAACCCTGTTGGTGCAAAAGCTATGGGTGGAACATAG
TCCGTCTTAAGAGTGGGGTGGACGTCTTTCATATGGCGGCTGAGCCGTGTGACACGTTGCTGTGTGA
CATAGTGTAGTCACTAGTCTGAAGTGAAGAAGACGACGACGCTCAGAGTCCCTCCATGGTG
GGGGATTGGCTTGA AAAAAGACCAGGACCTTTTGTATAAAAAGTGTGTGCCATACACCAGCATAT
GATGGA AACCTGGAGCGACTGCAGCGTAGGTATGGGGGAGGACTGGTCAGAGTGCCACTCTCCCG
CAACTCTACACATGAGATGTACTGGGTCTCTGGAGCGAAAAGCAACACCATAAAAAGTGTGTCCACCA
CGAGCCAGCTCCTCTTGGGGCGCATGGACGGCCCTAGGAGGCCAGTAAAATATGAGGAGGATGTGA
ATCTCGGCTCTGGCACGCGGGCTGTGGTAAGCTGCGCTGAAGCTCCCAACATGAAGATCATTGGTAA
CCGATTGAAAGGATCCGCAGTGAGCACGCGGAAACGTGGTTCTTTGACGAGAACCACCCATATAGG
ACATGGGCTTACCATGGAAGCTATGAGGCCCCACACAAGGGTCAGCGTCTCTCTAATAAACGGGG
TTGTCAGGCTCCTGTCAAAAACCTGGGATGTGGTACTGAGTACAGGAATGCCATGACCCGAC
CACACCGTATGGTCAGCAAAGAGTTTTCAAGGAAAAAGTGGACACTAGGGTGCAGACCCCAAGAA
GGCACTCGTCAGGTTATGAGCATGGTCTCTTCTGGTTGTGGAAAGAGCTAGGCAAACACAACGGC
CACGAGTCTGTACCAAAGAAGAGTTCATCAACAAGTTCGTAGCAATGCAGCATTAGGGCAATATTT
GAAGAGGAAAAAGAGTGAAGACTGCAGTGAAGCTGTGAACGATCCAAGTTCTGGGCTCTAGTG
GACAAGGAAAAGAGAGCACCACCTGAGAGGAGAGTGCCAGAGTTGTGTGTACAACATGATGGGAAAA
GAGAAAAGAAAACAAGGGGAATTTGGAAAGGCCAAGGGCAGCCGCGCCATCTGGTATATGTGGCTAG
GGCTAGATTTCTAGAGTTCAAGCCCTTGGATTCTTGAACGAGGATCACTGGATGGGAGAGAGAA
CTCAGGAGGTGGTGTGTAAGGGCTGGGATTACAAAGACTCGGATATGTCTAGAAAGAGATGAGTCG
ATACCAGGAGGAAGGATGTATGCAGATGACACTGCTGGCTGGGACACCCGCATCAGCAGGTTTCGAT
CTGGAGAATGAAGCTCTAATCACCACCAAAATGGAGAAAAGGGCATAGGGCCTTGGCATTGGCCATAA
TCAAGTACACATACCAAAAACAAAGTGGTAAAGTCTTAGACCAGCTGAAAAAGGGAAAAACAGTTATG
GACATTATTTGAGACAAGACCAAAAGGGGGAGCGGACAAGTTGTCACTTACGCTCTTAACACATTTAC

CAACCTAGTGGTGCAACTCATTTCGGAATATGGAGGCTGAGGAAGTTCTAGAGATGCAAGACTTGTGG
 CTGCTGCGGAGGTGAGAGAAAGTGACCAACTGGTTGCAGAGCAACGGATGGGATAGGCTCAAACGA
 ATGGCAGTCAAGTGGAGATGATTGCGTTGTGAAGCCAATTGATGATAGGTTTGCACATGCCCTCAGGTT
 CTTGAATGATATGGGAAAAGTTAGGAAGGACACACAAGAGTGAAACCCTCAACTGGATGGGACAAC
 TGGGAAGAAGTTCGGTTTTGCTCCACCACACTTCAACAAGTCCATCTCAAGGACGGGAGGTCCATTG
 TGGTCCCTGCCGCCACCAAGATGAACTGATTGGCCGGGCGCGTCTCTCCAGGGGCGGGATGGA
 GCATCCGGGAGACTGCTTGCCTAGCAAAATCATATGCGCAAATGTGGCAGCTCCTTTATTTCCACAGA
 AGGGACCTCCGACTGATGGCCAATGCCATTTGTTTCATCTGTGCCAGTTGACTGGGTTCCAACCTGGGA
 GAACTACCTGGTCAATCCATGAAAAGGAGAATGGATGACCACTGAAGACATGCTTGTGGTGTGGAA
 CAGAGTGTGGATTGAGGAGAACGACCACATGGAAGACAAGACCCCAAGTTACGAAATGGACAGACATT
 CCCTATTTGGGAAAAAGGGAAGACTTGTGGTGTGGATCTCTCATAGGGCACAGACCGCGCACCACCT
 GGGTAGAACAATAAAAACACAGTCAACATGGTGCAGGATCATAGGTGATGAAGAAAAAGTACAT
 GGACTACCTATCCACCCAAGTTCGCTACTTGGGTGAAGAAGGGTCTACACCTGGAGTGTGTAAGCA
 CCAATCTTAATGTTGTCAGGCCTGCTAGTCAGCCACAGCTTGGGGAAAGCTGTGCAGCCTGTGACCC
 CCCCAGGAGAAGCTGGGAAACCAAGCCTATAGTCAGGCCGAGAACGCCATGGCACGGAAGAAGCCA
 TGCTGCCTGTGAGCCCTCAGAGGACACTGAGTCAAAAAACCCCATGCGCTTGGAGGCGCAGGATG
 GGAAAAGAAGGTGGCGACCTTCCCCACCCTCAATCTGGGGCCTGAACTGGAGATCAGCTGTGGATC
 TCCAGAAGAGGGACTAGTGGTTAGAGGAGACCCCGGAAAACGCAAACAGCATATTGACGCTGG
 GAAAGACCAGAGACTCCATGAGTTTCCACCACGCTGGCCGCCAGGCACAGATCGCCGAATAGCGGC
 GGCCGGTGTGGGAAATCCATGGGTCTT

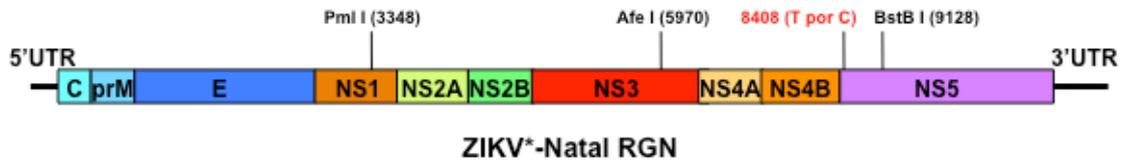
SECUENCIA DEL INSERTO CMV-ZIKV*-RzBGH (11723 pb)



El inserto está constituido por la secuencia del promotor del virus CMV (posición 1-602), seguida del genoma del ZIKV-Natal RGN (Ref GenBank KU527068) con una mutación silenciosa en la posición del genoma viral 8408 (T por C) como marcador genético (posición 603-11411), la secuencia de la ribozima del virus de la hepatitis delta (Rz) (posición 11412-11494) y las señales de terminación y poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH) (posición 11495-11723).

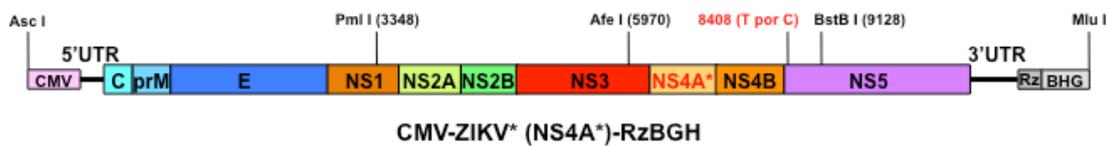
GTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATAT
 GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCC
 ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGG
 TGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCT
 ATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCC
 TACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAA
 TGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGT
 TTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAT
 GGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTGTAGTGAACCGT-----
 -----**SECUENCIA DEL ZIKV-Natal RGN CON UNA MUTACIÓN T POR C EN LA POSICIÓN
 GENÓMICA 8408**-----
 TCCCAGCATGCCTGCTATTGTCTTCCAATCCTCCCCCTTGGTGTCTGCCCCACCCACCCCCCA
 GAATAGAATGACACCTACTCAGACAATGCGATGCAATTTTCTCATTATTTATTAGGAAAGGACAGTGGGA
 GTGGCACCTTCCAGGTCAAGGAAGGCACGGGGAGGGGCAAACAACAGATGGCTGGCAACTAGAA
 GGCACAGTCCAGGCGGATCGATCCGAGCTCTCCCTTAGCCATCCGAGTGGACGACGTCCTCCTTCG
 GATGCCCAGGTCCGACCGGAGGAGGTGGAGATGCCATGCCGACCC

SECUENCIA DEL OMG ZIKV*-Natal RGN (10808 pb)



La secuencia es idéntica al organismo receptor (ZIKV-Natal RGN) con una sustitución de una T por una C en posición 8408

SECUENCIA DEL INSERTO CMV-ZIKV* (NS4A*)-RzBGH (11723 pb)

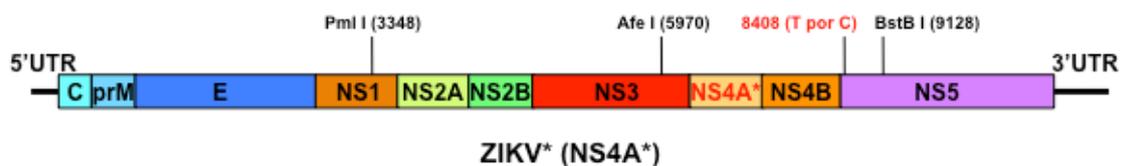


La secuencia es idéntica a la del inserto CMV-ZIKV*-RzBGH, con la diferencia que la secuencia codificante para la proteína NS4A presenta una serie de mutaciones silenciosas. Solo se muestra la secuencia codificante para la proteína NS4A con los nucleótidos mutados en rojo.

```

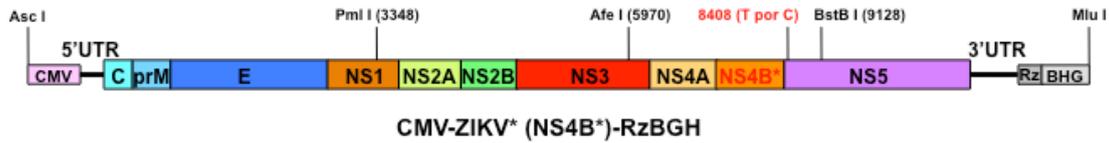
TTT GGT GTA ATG GAA GCG CTA GGT ACG CTA CCG GGT CAT ATG ACG GAA
CGT TTT CAA GAA GCG ATA GAT AAT CTA GCG GTA CTA ATG CGT GCG GAA
ACG GGT TCG CGT CCG TAT AAA GCG GCG GCG GCG CAA CTA CCG GAA ACG
CTA GAA ACG ATA ATG CTA CTA GGT CTA CTA GGT ACG GTA TCG CTA GGT
ATA TTT TTT GTA CTA ATG CGT AAT AAA GGT ATA GGT AAA ATG GGT TTT
GGT ATG GTA ACG CTA GGT GCG TCG GCG TGG CTA ATG TGG CTA TCG GAA
ATA GAA CCG GCG CGT ATA GCG TGT GTA CTA ATA GTA GTA TTT CTA CTA
CTA GTA GTA CTA ATA CCG GAA CCG GAA AAA CAA CGT TCG CCG CAA GAT
AAT CAA ATG GCG ATA ATA ATA ATG GTA GCG GTA GGT CTA CTA GGT CTA
ATA ACG GCG
    
```

SECUENCIA DEL OMG ZIKV* (NS4A*) (10808 pb)



La secuencia es idéntica al OMG ZIKV*-Natal RGN, con la excepción de la secuencia codificante para la proteína NS4A que presenta las mutaciones indicadas en el gráfico anterior.

SECUENCIA DEL INSERTO CMV-ZIKV* (NS4B*)-RzBGH (11723 pb)

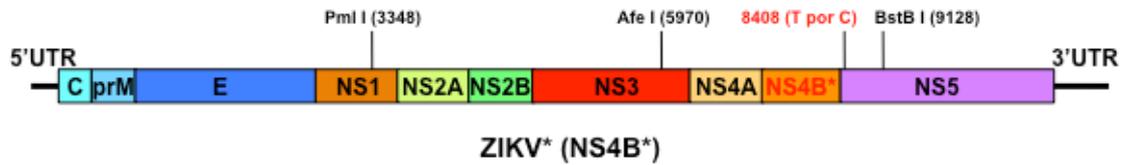


La secuencia es idéntica a la del inserto CMV-ZIKV*-RzBGH, con la diferencia que la secuencia codificante para la proteína NS4B presenta una serie de mutaciones silenciosas. Solo se muestra la secuencia codificante para la proteína NS4B con los nucleótidos mutados en rojo.

```

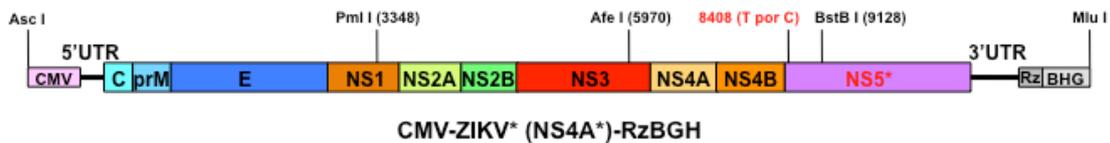
AAT GAA CTA GGT TGG CTA GAA CGT ACG AAA TCG GAT CTA TCG CAT CTA ATG
GGT CGT CGT GAA GAA GGT GCG ACG ATA GGT TTT TCG ATG GAT ATA GAT CTA
CGT CCG GCC TCA GCG TGG GCG ATA TAT GCG GCG CTA ACG ACG TTT ATA ACG
CCG GCG GTA CAA CAT GCG GTA ACG ACG TCG TAT AAT AAT TAT TCG CTA ATG
CCG ATG GCG ACG CAA GCG GGT GTA CTA TTT GGT ATG GGT AAA GGT ATG CCG
TTT TAT GCG TGG GAT TTT GGT GTA CCG CTA CTA ATG ATA GGT TGT TAT TCG
CAA CTA ACG CCG CTA ACG CTA ATA GTA GCG ATA ATA CTA CTA GTA GCG CAT
TAT ATG TAT CTA ATA CCG GGT CTA CAA GCG GCG GCG GCG CGT GCG GCG CAA
AAA CGT ACG GCG GCG GGT ATA ATG AAA AAT CCG GTA GTA GAT GGT ATA GTA
GTA ACG GAT ATA GAT ACG ATG ACG ATA GAT CCG CAA GTA GAA AAA AAA ATG
GGT CAA GTA CTA CTA ATA GCG GTA GCG GTA TCG TCG GCG ATA CTA TCG CGT
ACG GCG TGG GGT TGG GGT GAA GCG GGT GCG CTA ATA ACG GCG GCG ACG TCG
ACG CTA TGG GAA GGT TCG CCG AAT AAA TAT TGG AAT TCG TCG ACG GCG ACG
TCG CTA TGT AAT ATA TTT CGT GGT TCG TAT CTA GCG GGT GCG TCG CTA ATA
TAT ATA GTA ACG CGT AAT GCG GGT CTA GTA AAA CGT CGT GGT GGT GGT ACG
GGT GAA ACG CTA GGT GAA AAA TGG AAA GCG CGT CTA AAT CAA ATG TCG GCG
CTA GAA TTT TAT TCG TAT AAA AAA TCG GGT ATA ACG GAA GTA TGT CGT GAA
GAA GCG CGT CGT GCG CTA AAA GAT GGT GTA GCG ACG GGT GGT CAT GCG GTA
TCG CGT GGT TCG GCG AAA CTA CGT TGG CTA GTA GAA CGT GGT TAT CTA CAA
CCG TAT GGT AAA GTA ATA GAT CTA GGT TGT GGT CGT GGT GGT TGG TCG TAT
TAT GCG GCG ACG ATA CGT AAA GTA CAA GAA GTA AAA GGT TAT ACG AAA GGT
GGT CCG GGT CAT GAA GAA CCG GTA CTA GTA CAA TCG TAT GGT TGG AAT ATA
GTA CGT CTA AAA TCG GGT GTA GAT GTA TTT CAT ATG GCG GCG GAA CCG TGT
GAT ACG CTA CTA TGT GAT ATA GGT GAA TCG TCG TCG TCG CCG GAA GTA GAA
GAA GCG CGT ACG CTA CGT GTA CTA TCG ATG GTA GGT GAT TGG CTA GAA AAA
CGT CCG GGT GCG TTT TGT ATA AAA GTA CTA TGT CCG TAT ACG TCG ACG ATG
ATG GAA ACG CTA GAA CGT CTA CAA CGT CGT TAT GGT GGT GGT CTA GTA CGT
GTA CCG CTA TCG CGT AAT TCG ACG CAT GAA ATG TAT TGG GTA TCG GGT GCG
AAA TCG AAT ACG ATA AAA TCG GTA TCG ACG ACG TCG CAA CTA CTA CTA GGT
CGT ATG GAT GGT CCT AGG
    
```

SECUENCIA DEL OMG ZIKV* (NS4B*) (10808 pb)



La secuencia es idéntica al OMG ZIKV*-Natal RGN, con la excepción de la secuencia codificante para la proteína NS4B que presenta las mutaciones indicadas en el gráfico anterior.

SECUENCIA DEL INSERTO CMV-ZIKV* (NS5*)-RzBGH (11723 pb)



La secuencia es idéntica a la del inserto CMV-ZIKV*-RzBGH, con la diferencia que la secuencia codificante para la proteína NS5 presenta una serie de mutaciones silenciosas. Solo se muestra la región de la secuencia codificante para la proteína NS4B en la cual se han introducido las mutaciones (nucleótidos en rojo).

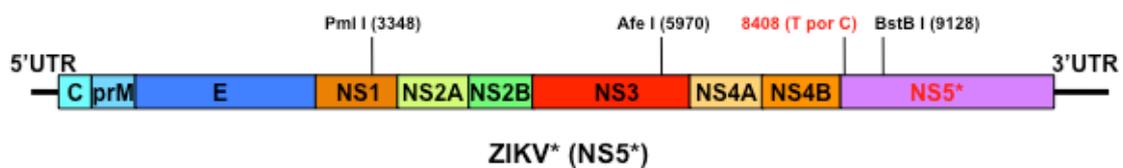
```

AAA TAT GAA GAA GAT GTA AAT CTA GGT TCG GGT ACG CGT GCG GTA GTA TCG
TGT GCG GAA GCG CCG AAT ATG AAA ATA ATA GGT AAT CGT ATA GAA CGT ATA
CGT TCG GAA CAT GCG GAA ACG TGG TTT TTT GAT GAA AAT CAT CCG TAT CGT
ACG TGG GCG TAT CAT GGT TCG TAT GAA GCG CCG ACG CAA GGT TCG GCG TCG
TCG CTA ATA AAT GGT GTA GTA CGT CTA CTA TCG AAA CCG TGG GAT GTA GTA
ACG GGT GTA ACG GGT ATA GCG ATG ACG GAT ACG ACG CCG TAT GGT CAA CAA
CGT GTA TTT AAA GAA AAA GTA GAT ACG CGT GTA CCG GAT CCG CAA GAA GGT
ACG CGT CAA GTA ATG TCG ATG GTA TCG TCG TGG CTA TGG AAA GAA CTA GGT
AAA CAT AAA CGT CCG CGT GTA TGT ACG AAA GAA GAA TTT ATA AAT AAA GTA
CGT TCG AAT GCG GCG CTA GGT GCG ATA TTT GAA GAA AAA GAA TGG AAA
ACG GCG GTA GAA GCG GTA AAT GAT CCG CGT TTT TGG GCG CTA GTA GAT AAA
GAA CGT GAA CAT CAT CTA CGT GGT GAA TGT CAA TCG TGT GTA TAT AAT ATG
ATG GGT AAA CGT GAA AAA AAA CAA GGT GAA TTT GGT AAA GCG AAA GGT TCG
CGT GCG ATA TGG TAT ATG TGG CTA GGT GCG CGT TTT CTA GAA TTT GAA GCG
CTA GGT TTT CTA AAT GAA GAT CAT TGG ATG GGT CGT GAA AAT TCG GGT GGT
GGT GTA GAA GGT CTA GGT CTA CAA CGT CTA GGT TAT GTA CTA GAA GAA ATG
TCG CGT ATA CCG GGT GGT CGT ATG TAT GCG GAT GAT ACG GCG GGT TGG GAT
ACG CGT ATA TCG CGT TTT GAT CTA GAA AAT GAA GCG CTA ATA ACG AAT CAA
ATG GAA AAA GGT CAT CGT GCG CTA GCG CTA GCG ATA ATA AAA TAT ACG TAT
CAA AAT AAA GTA GTA AAA GTA CTA CGT CCG GCG GAA AAA GGT AAA ACG GTA
ATG GAT ATA ATA TCG CGT CAA GAT CAA CGT GGT TCG GGT CAA GTA GTA ACG
TAT GCG CTA AAT ACG TTT ACG AAT CTA GTA GTA CAA CTA ATA CGT AAT ATG
GAA GCG GAA GAA GTA CTA GAA ATG CAA GAT CTA TGG CTA CTA CGT CGT TCG
GAA AAA GTA ACG AAT TGG CTA CAA TCG AAT GGT TGG GAT CGT CTA AAA CGT
ATG GCG GTA TCG GGT GAT GAT TGT GTA GTA AAA CCG ATA GAT GAT CGT TTT
GCG CAT GCG CTA CGT TTT CTA AAT GAT ATG GGT AAA GTA CGT AAA GAT ACG
CAA GAA TGG AAA CCG TCG ACG GGT TGG GAT AAT TGG GAA GAA GTA CCG TTT

```

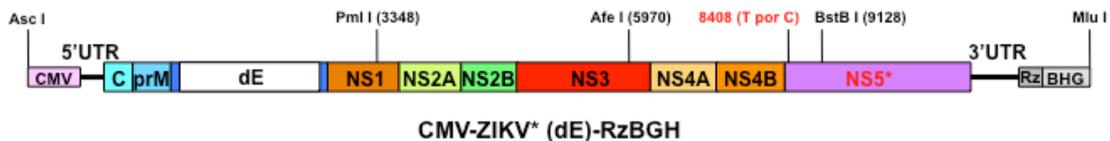
TGT TCG CAT CAT TTT AAT AAA CTA CAT CTA AAA GAT GGT CGT TCG ATA GTA
 GTA CCG TGT CGT CAT CAA GAT GAA CTA ATA GGT CGT GCG CGT GTA TCG CCG
 GGT GCG GGT TGG TCG ATA CGT GAA ACG GCG TGT CTA GCG AAA TCG TAT GCG
 CAA ATG TGG CAA CTA CTA TAT TTT CAT CGT CGT GAT CTA CGT CTA ATG GCG
 AAT GCG ATA TGT TCG TCG GTA CCG GTA GAT TGG GTA CCG ACG GGT CGT ACG
 ACG TGG TCG ATA CAT GGT AAA GGT GAA TGG ATG ACG ACG GAA GAT ATG CTA
 GTA GTA TGG AAT CGT GTA TGG ATA GAA GAA AAT GAT CAT ATG GAA GAT AAA
 ACG CCG GTA ACG AAA TGG ACG GAT ATA CCG TAT CTA GGT AAA CGT GAA GAT
 CTA TGG TGT GGT TCG CTA ATA GGT CAT CGT CCG CGT ACG ACG TGG GCG GAA
 AAT ATA AAA AAT ACG GTA AAT ATG GTA CGT CGT ATA ATA GGT GAT GAA GAA
 AAA TAT ATG GAT TAT CTA TCG ACG CAA GTA CGT TAT CTA GGT GAA GAA GGT
 TCG ACG CCG GGT GTA CTA

SECUENCIA DEL OMG ZIKV* (NS5*) (10808 pb)



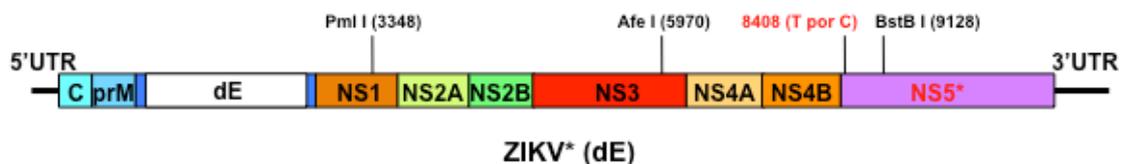
La secuencia es idéntica al OMG ZIKV*-Natal RGN, con la excepción de la secuencia codificante para la proteína NS5 que presenta las mutaciones indicadas en el gráfico anterior.

SECUENCIA DEL INSERTO CMV-ZIKV* (dE)-RzBGH (10257 pb)



La secuencia es idéntica a la del inserto CMV-ZIKV*-RzBGH, con la diferencia que se ha deletado una región de 1466 nt de secuencia codificante para la proteína E localizada en la posición genómica 999-2464.

SECUENCIA DEL OMG ZIKV* (dE) (9342 pb)



La secuencia es idéntica al OMG ZIKV*-Natal RGN, con la diferencia que se ha deletado una región de 1466 nt de secuencia codificante para la proteína E localizada en la posición genómica 999-2464.