MINISTERIO
DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN
Y MEDIO AMBIENTE

PARTE A

Tipos 2, 3 y 4

DIRECCION GENERAL DE
CALIDAD Y EVALUACION
AMBIENTAL Y MEDIO NATURAL

COMISIÓN NACIONAL DE
BIOSEGURIDAD

NOTIFICACIÓN SOBRE ACTIVIDADES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE ORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE

Nº de Registro:	**Nº de Notificación:**

I. INFORMACIÓN GENERAL

1) Responsables de la actividad

a) Entidad: Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)
Dirección postal: Rossellón 149-153, 08036 Barcelona
NIF: Q5856414G

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Rosa Vilavella Gasull
NIF:40287781S
Cargo: Apoderada
Tel: 93.227.18.42
Fax: 933129403
Correo electrónico: vilavella@clinic.cat

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Sofía Pérez del Pulgar Gallart
NIF: 46731316P
Cargo: Científica Senior
Tel: 932275400, ext. 2093
Fax: 933129405
Correo electrónico: sofiapp@clinic.cat

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

Nombre y apellidos: Sandra Piquer Gibert
NIF: 38098454N
Cargo: Coordinadora laboratorios IDIBAPS
Tel: 93.227.54.00 (ext.4388)
Fax: 933129405
Correo electrónico: sandra.piquer@idibaps.org

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

PLAZA DE SAN JUAN DE LA
CRUZ, S/N
28071 MADRID
TEL.: 91 597.59.08
FAX.: 91 534.05.82

Nombre y apellidos: Sandra Piquer Gibert
NIF: 38098454N
Cargo: Coordinadora laboratorios IDIBAPS
Tel: 93.227.54.00 (ext.4388)
Fax: 933129405
Correo electrónico: sandra.piquer@idibaps.org

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 X NO ☐

El proyecto con el que se financiará primeramente esta investigación es el PI15/00151 cuyo Investigador Principal es el Dr. Xavier Forns y que lleva por título ñEstudio de los factores virológicos e inmunológicos relacionados con la recurrencia de la infección por los virus de la hepatitis C y B tras la interrupción del tratamiento antiviralò
El mismo grupo de investigación ha pedido el proyecto PI16/00111, cuya investigadora principal es la Dra. Sofía Pérez del Pulgar y que lleva por título ñEstudio de la persistencia del cccDNA durante la infección por el VHB in vivo, e in vitro utilizando un bioreactor que simula el microambiente hepáticoòy que en caso que le sea concedido financiará el resto del proyecto.

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:

fecha autorización: 18/07/2013

b) Número de referencia del expediente:

A/ES/13/I-11

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1) Finalidad de la actividad:

Producción segura de virus infecciosos recombinantes de la hepatitis B (VHB) a partir de las líneas celulares hepáticas i) HepG2.2.15 y ii) HepAD38 , la cuales se establecieron transfectando el genoma completo del VHB en células HepG2 (genotipo D, subtipo awy). El objeto de esta actividad es estudiar la persistencia del cccDNA y su asociación con factores celulares y virales que regulan la infección por VHB en cultivo. Por una parte, se realizarán ensayos de infección in vitro utilizando los modelos convencionales: infección de hepatocitos primarios o líneas celulares hepáticas HepG2-hNTCP o HepaRG con suero de pacientes con hepatitis B crónica o con virus

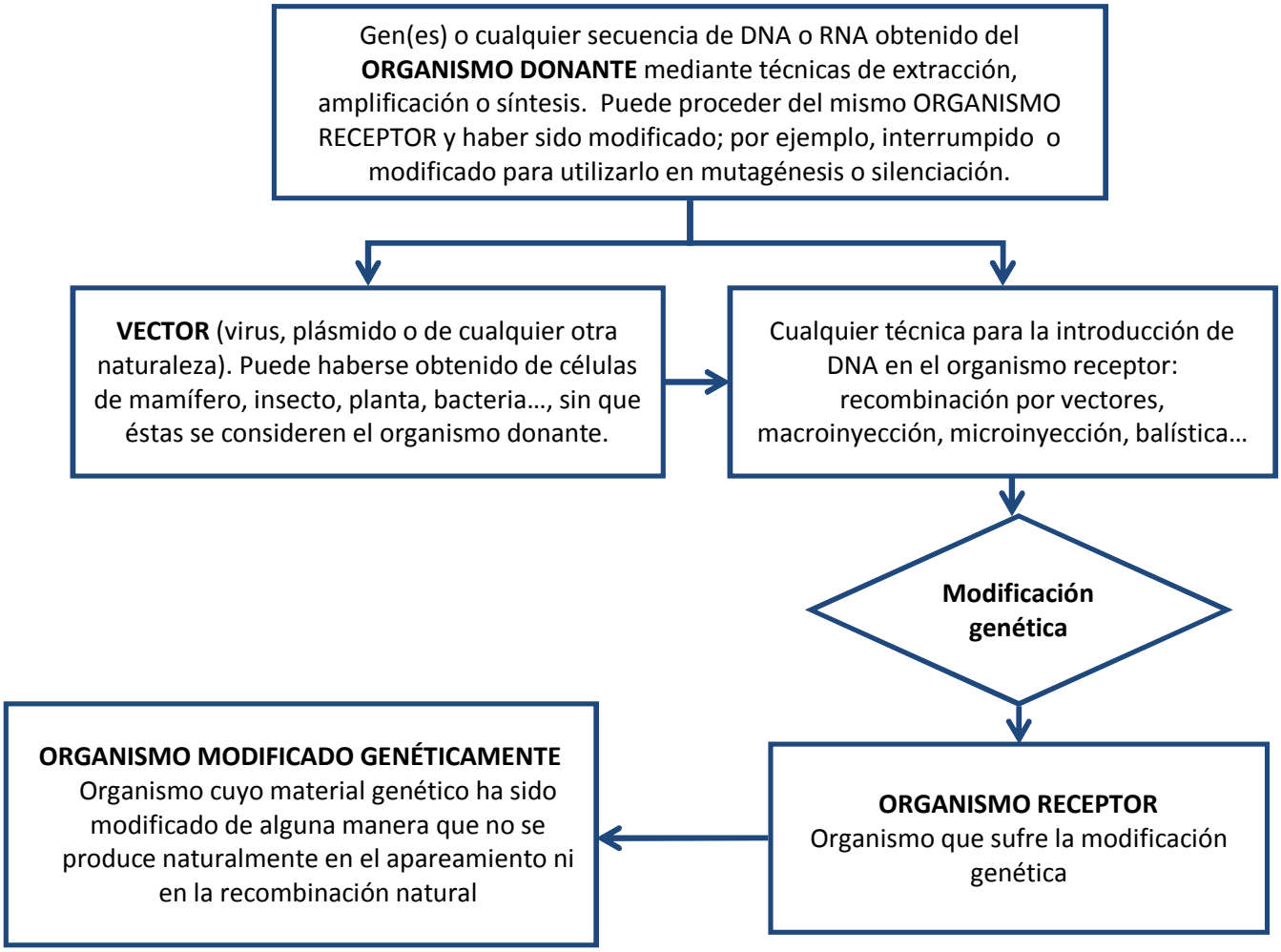
producido en cultivo celular. Por otra parte, se realizarán ensayos de infección utilizando un dispositivo microfluídico que simula el microambiente hepático. Este sistema ha sido desarrollado por el equipo del Dr. Jordi Gracia-Sancho del IDIBAPS, Hospital Clínic de Barcelona y está basado en una cámara que permite el cocultivo simultáneo de los principales tipos celulares del hígado. Las células hepáticas en este bioreactor se infectarán con virus infeccioso recombinante, producido por las células HepG2.2.15, HepAD38 o con suero de pacientes infectados por VHB. En ambos sistemas se analizarán los intermediarios de la replicación del VHB por PCR cuantitativa (cccDNA, ADN-VHB total, rcDNA y pgRNA), la expresión de antígenos virales y la producción de partículas infecciosas. El genotipo del VHB y la composición de la cuasiespecies, en el caso de infección por suero de pacientes, se analizarán por secuenciación masiva.

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	☐
Tipo 2	☐
Tipo 3	☒
Tipo 4	☐

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



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

1) Nombre científico: Virus de la hepatitis B (VHB)

Taxonomía:

Familia: Hepadnaviridae
Género: Orthohepadnavirus
Especie: Hepatitis B virus

Nombre común: Hepatitis B

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento:

El VHB tiene un tropismo exclusivamente humano. Experimentalmente, fue demostrado que el VHB puede infectar a chimpancés. El virus se encuentra en el hígado y circulando en sangre de pacientes infectados. El virus como tal, tanto el virus de suero de pacientes como el virus recombinante producido por las células HepG2.2.15 y HepAD38, puede ser aislado de formas muy laboriosas utilizando métodos de cromatografía de afinidad usando columnas de heparina ya que el virus tiene una afinidad alta con el heparán sulfato. El virus de forma habitual se aísla en forma de DNA viral usando kits específicos para el aislamiento de ácidos nucleicos (por ejemplo el QIAamp Ultrasens Virus de la empresa Qiagen) a partir de suero de pacientes o de sobrenadante de cultivo.

b) Técnicas de identificación:

Existen herramientas diagnosticas comerciales que determinan la presencia de VHB en pacientes basadas en la seropositividad. Precisamente, estas herramientas pueden diagnosticar la presencia de anticuerpos frente a varias proteínas del virus: anticuerpos contra al antígeno de la superficie s (HBsAg), anticuerpos contra al antígeno de la cápside c (HBcAg) y anticuerpos contra la proteína e (HBeAg). Adicionalmente, existen técnicas moleculares basadas en la amplificación del genoma de ADN viral por PCR cuantitativa a partir de sangre de individuos infectados. Ambas técnicas se emplean rutinariamente en clínica.

c) Marcadores genéticos:

Se dispone de secuencias completas de cientos de aislados de VHB en las bases de datos (https://hbvdb.ibcp.fr/, www.hepseq.org/). Si bien existen al menos 10 genotipos (denominados desde A hasta J) de VHB a su vez subdivididos en diferentes subgenotipos (existen como mínimo 24 subtipos). Sin embargo, existen secuencias conservadas en áreas del genoma viral que permiten amplificar por PCR los genomas virales. Para ello pueden emplearse los siguientes primers.

Forward primer 5NCTCGTGGTGGACTTCTCTC-3Nj
Reverse primer 5NCTGCAGGATGAAGAGGAA-3Nj

d) Marcadores fenotípicos:

Los pacientes infectados presentan viremia (presencia de ADN viral en sangre). La infección crónica por VHB se caracteriza por las alteraciones hepáticas (elevación de transaminasas en sangre, hepatoesteatosis), ictericia, y finalmente puede causar cirrosis y carcinoma hepatocelular.

e) Estabilidad genética:

El genoma del VHB está compuesto de ADN circular, y tiene la peculiaridad de que no se conforma una doble cadena completa. El extremo de una de las cadenas está asociado con la ADN polimerasa viral. El genoma contiene entre 3020-3320 (la cadena de longitud máxima) y 1700-2800 nucleótidos de longitud (la cadena de longitud mínima). El segmento no codificante tiene polaridad negativa y es complementario al ARN mensajero

viral. El ADN viral se puede encontrar en el núcleo celular de la célula huésped poco después de la infección de la célula. La porción del ADN que una vez fue parcialmente doble cadena se hace plenamente doble porque se completa la cadena corta de polaridad (+) y se elimina la molécula proteica de la cadena de polaridad (-), así como una corta secuencia de la cadena de sentido (+), constituida por ARN. Las bases que no son codificadas se eliminan de los extremos de las cadenas de polaridad (-), y esos extremos se unen luego el uno al otro. La tasa de mutaciones no sinónimas en este virus ha sido estimada en alrededor de 2×10^{-5} sustituciones de aminoácidos por sitio por año. El número medio de sustituciones de nucleótidos / sitio / año es de ~ $7{,}9 \times 10^{-5}$.

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

No se conocen.

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 VH B es un patógeno que infecta exclusivamente a humanos y, experimentalmente, a chimpancés a través de la inoculación de material biológico contaminado (principalmente sangre y hemoderivados). No existe zoonosis alguna y el virus se transmite por las siguientes vías:

- Contacto directo de sangre a sangre
- Relaciones sexuales sin protección
- Agujas sin esterilizar
- De una mujer infectada a su bebé durante el proceso de parto.

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.):

El VHB ha sido asignado al grupo de riesgo 3. No obstante la Directiva 2000/54/CE también indica que el riesgo de infección se encuentra limitado al personal expuesto puesto que no son infecciosos a través de aerosol.

a) ¿De que modo se manifiesta la patogenicidad?

La infección crónica por el VHB causa una inflamación hepática crónica de desemboca en fibrosis, cirrosis y, en un fracción importante de los infectados, en carcinoma hepatocelular. Aunque desde 1982 se dispone de una vacuna eficaz para prevenir la

infección por el VHB, no existe una cura definitiva contra la hepatitis crónica B. La terapia antiviral actual se basa en el tratamiento inmunomodulador con interferón y en el uso de análogos de nucleós(t)idos (NUCs), como entecavir y tenofovir. El interferón induce una serie de ISG (genes estimulados por interferón) que modifican el epigenoma del cccDNA (ADN circular covalentemente cerrado), controlan la replicación viral y activan a las células NK. Los NUCs actúan como antivirales directos sobre la replicación viral, inhibiendo la transcripción reversa del pgRNA (ARN pregenómico) a rcDNA (ADN circular relajado).

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

SI ☐ NO ☒

Porqué: Se desconocen las bases moleculares que determinan el grado de patogenicidad.

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

Sí. Se trata de las líneas celulares HepG2.2.15 y HepAD38 a partir del cual se genera virus infeccioso. Estas líneas celulares están libres de mycoplasma (contaminación biológica por bacteria). Los sueros de pacientes infectados por hepatitis B, coinfectados con otros agentes biológicos (hepatitis C, VIH, infecciones bacterianas), estarán excluidos de estos estudios.

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

La solicitante cuenta con una amplia experiencia en técnicas de biología celular y molecular. Además tiene 10 años de experiencia en el campo de la virología, en particular en el estudio de los virus de las hepatitis B, C y E procedentes de muestras de pacientes. Para adquirir más experiencia con los protocolos del VHB, la solicitante realizó una estancia de 3 meses (julio-septiembre 2015) en el grupo de Hepatitis Virales del Cancer Research Center of Lyon (CRCL) que dirige el Dr. Fabien Zoulim, que tiene una amplia experiencia en el estudio de la patogénesis de la infección por el VHB tanto a nivel clínico como básico.

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

La supervivencia del virus fuera del medio de cultivo o fuera de pacientes está calculada a 7 días. Sin embargo, el virus no se reproduce en el medio ambiente ya que es un parásito con replicación exclusivamente intracelular.

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

Sí.

En caso afirmativo:

b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

i)	esporas	☐
ii)	endosporas	☐
iii)	quistes	☐
iv)	esclerocios	☐
v)	esporas asexuales (hongos)	☐
vi)	esporas sexuales (hongos)	☐
vii)	otros, especifíquese	
	virus	☒

c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

La infectividad se pierde después de un ciclo de autoclave a 121 °C durante 20 min o tratamiento de calor seco a 160 °C durante 1 hora. El VHB se inactiva por exposición a hipoclorito de sodio (500 mg de cloro libre por litro) durante 10 minutos, glutaraldehído acuoso al 2% a temperatura ambiente durante 5 min, el tratamiento térmico a 98 °C durante 2 min, formaldehído en 18,5 g/l (5 % de formalina en agua), 70 % alcohol isopropílico , 80 % de alcohol etílico a 11 °C durante 2 min, o combinado ß - propiolactona e irradiación con ultravioleta. El VHB conserva la infectividad cuando se almacena a 30 ° C a 32 °C durante al menos 6 meses y cuando se congela a -15 °C durante 15 años. El virus presente en la sangre puede soportar de secado sobre una superficie durante al menos una semana.

d) Posibles nichos ecológicos:

Infección limitada a humanos y chimpancés. El virus se transmite esencialmente por vía sanguínea, vía sexual y por vía vertical (de madre al feto) por lo que la propagación espontánea del virus en el medio es virtualmente inexistente. Actualmente la población de mayor riesgo, además del personal sanitario y pacientes que requieren transfusión sanguínea o diálisis, es la de los toxicómanos que consumen drogas por inyección intravenosa así como personal sanitario expuesto a material infeccioso. La eventual liberación accidental al medio de este patógeno no supondría un peligro biológico inmediato. En caso de infección adquirida por el personal expuesto, no existe peligro inmediato de propagación al medio. Sin embargo, todo el personal sanitario está vacunado contra el VHB y el título de los anticuerpos contra el antígeno de la superficie HBsAg se controla anualmente.

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 aplica.

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

Los pacientes crónicos infectados con VHB pueden infectarse por el virus de la hepatitis D (VHD). El virus de la VHD es un virus del género deltavirus. Consta de una molécula de ARN circular de pequeño tamaño, con información necesaria para la replicación pero no para otras propiedades. Por ello, necesita que exista una infección de VHB en la misma célula para poder empaquetarse en su envoltura y propagarse. El VHD no es considerado un verdadero virus, sino una partícula subviral llamada ARN satélite o virusoide. Las vías de transmisión del VHD son: parenteral, sexual y vertical (similares al VHB). El tratamiento contra el VHD actualmente se realiza mediante la administración de interferón alfa a altas dosis durante, al menos, doce meses. La prevención viene dada por la administración previa de la vacuna del virus de la hepatitis B (VHB), ya que con ello se logra que no haya VHB y, por tanto, no se pueda replicar el VHD.

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

El VHB infecta a humanos y no se conoce ningún reservorio en el medio ni zoonosis alguna, por lo que su distribución geográfica coincide con la de la población humana.

12) Hábitat natural del organismo:

El VHB se encuentra en toda la población humana globalmente. 240 millones de personas de la población mundial se encuentra infectada persistentemente.

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) i)

Nombre científico: Virus de la hepatitis B (VHB)

Taxonomía:

Familia: Hepadnaviridae
Género: Orthohepadnavirus
Especie: Hepatitis B virus

Nombre común: Hepatitis B

ii)

Nombre científico: Escherichia coli

Taxonomía:

Familia: Enterobacteriaceae
Género: Escherichia
Especie: Escherichia coli strain K-12

Nombre común: E. coli

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante:

DNAs de cepas virales obtenidas de pacientes infectados y de las células HepG2.2.15 y HepAD38, y DNA correspondiente al gen de la neomicina fosfotransferasa E.coli, ambos obtenidos de plásmidos.

3) Método de obtención:

a) Extracción ☐

b) PCR ☒

c) Síntesis *in vitro* ☐

4) Función del gen/genes en el organismo donante

El DNA cepas virales obtenidas de pacientes infectados y de las células HepG2.2.15 y HepAD38 permite la detección de replicación viral mediante PCR cuantitativa. El gen de la neomicina fosfotransferasa permite la selección de células HepG2.2.15 y HepAD38 que están traducidas con los plásmidos de expresión del genoma del virus de la VHB y producen virus en el sobrenadante.

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

SI ☒ NO ☐

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

i) seres humanos ☒
ii) animales ☐
iii) plantas ☐

b) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

La infección crónica por el virus de la hepatitis B causa una inflamación hepática crónica de desemboca en fibrosis, cirrosis y, en un fracción importante de los infectados, en carcinoma hepatocelular. Aunque desde 1982 se dispone de una vacuna eficaz para prevenir la infección por el VHB, no existe una cura definitiva contra la hepatitis crónica B. La terapia antiviral actual se basa en el tratamiento

inmunomodulador con interferón y en el uso de análogos de nucleós(t)idos (NUCs), como entecavir y tenofovir. El interferón induce una serie de ISG (genes estimulados por interferón) que modifican el epigenoma del cccDNA (ADN circular covalentemente cerrado), controlan la replicación viral y activan a las células NK. Los NUCs actúan como antivirales directos sobre la replicación viral, inhibiendo la transcripción reversa del pgRNA (ARN pregenómico) a rcDNA (ADN circular relajado).

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

En el caso de las secuencias derivadas del virus de la hepatitis B, las secuencias insertadas son esenciales para la replicación y propagación del virus y, por lo tanto, para su la patogenicidad. En el caso del gen de la neomicina fosfatasa no está implicada en las propiedades patógenas o nocivas del organismo ya que su única función es la resistencia de las células HepG2.2.15 y HepAD38 al antibiótico G418.

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

No.

V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1) Tipo de modificación genética:

a) Inserción de material genético ☒
b) Deleción de material genético ☐
c) Sustitución de bases ☐
d) Fusión celular ☐
e) Otros, especifíquese

2) Finalidad de la modificación genética:

Para la línea celular HepG2.2.15:

La línea celular humana de hepatoblastoma HepG2 fue transfectada con el plásmido pDolTHBV-1, un vector que contiene insertados dos genomas díméros del VHB en una la orientación de cola a cola. Las células transformadas fueron cultivadas en presencia de

380 εg de G418 por ml. Clones de células que crecieron en presencia de G418 se aislaron y se dejaron que crecieran hasta la confluencia. En esta fase los diferentes clones fueron testados por su capacidad para sintetizar y secretar HBsAg y HBeAg. Uno de los clones obtenidos en de esta manera, designado 2.2.15, se ha mantenido en cultivo durante 6 meses y durante este periodo se ha verificado continuamente la producción de los antígenos HBsAg y HBeAg. El clon celular HepG2.2.15 fue generado en el laboratorio de George Acs (Mount Sinai Center, Nueva York, EEUU).

Para la línea celular HepAD38:

La línea celular humana de hepatoblastoma HepG2 fue co- transfectada con el plásmido ptetHBV, un vector que contiene insertados un genoma del VHB bajo del control del promotor de la tetraciclina y con el plásmido pUHD17-1neo que codifica el regulador transcripcional que actúa en trans al promotor de la tetraciclina y resistencia y un gen para la resistencia a neomicina . Las células transformadas fueron cultivadas en presencia de 400 εg de G418 por ml. Clones de células que crecieron en presencia de G418 se aislaron y se dejaron que crecieran hasta la confluencia. En esta fase los diferentes clones fueron testados por su capacidad para sintetizar y secretar HBsAg y HBeAg. Uno de los clones obtenidos en de esta manera, designado HepAD38, se ha mantenido en cultivo durante 6 meses y durante este periodo se ha verificado continuamente la producción de los antígenos HBsAg y HBeAg. El clon celular HepAD38 fue generado en el laboratorio de Robert King (Avid Therapeutics, Inc., Philadelphia, Pennsylvania, EEUU).

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

Para la línea celular HepG2.2.15:

Un vector recombinante, denominado pDolTHBV-1, se preparó por inserción de fragmentos de ADN del VHB al sitio del enzima de restricción BanI del plásmido pTHBV-1. Ese plásmido es un plásmido pBR322 que lleva dos copias del genoma de VHB en el sitio de restricción XhoI. El plásmido pBR322 es un plásmido que se lleva el gen de la neomicina fosfotransferasa también para selección en células eucariotas.

Para la línea celular HepAD38:

El plásmido ptetHBV, es un plásmido derivado del plásmido phCMV-IE y fue creado por la eliminación del promotor del citomegalovirus temprano inmediato (CMV-IE), y su sustitución con el promotor de la tetraciclina sensible (CMVtet). Inicialmente, la secuencia que corresponde al ADNc de pregenómico (pg) de ARN de HBV, subtipo ayw fue clonada bajo control del promotor CMVï IE. Después, el promotor CMV-IE fue sustituido por el promotor CMVtet.

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

SÍ ☒ NO ☐

En caso afirmativo:

a. Tipo e identidad del vector:

Para la línea celular HeG2.2.15:

pBR322 es un plásmido y fue uno de los primeros vectores de clonación en la bacteria E.coli. Contiene el origen de replicación en la bacteria E.coli, y contiene también el gen ampR, que codifica la proteína de resistencia a ampicilina.

Para la línea celular HepAD38:

pCMV es un plásmido básico y fue uno de los primeros vectores de clonación en la bacteria E.coli y expresión de los genes clonados en células eucariotas. Contiene el origen de replicación en la bacteria E.coli,y contiene también el gen ampR, que codifica la proteína de resistencia a ampicilina. Para la expresión en células eucariotas contiene el promotor de citomegalovirus (CMV-IE).

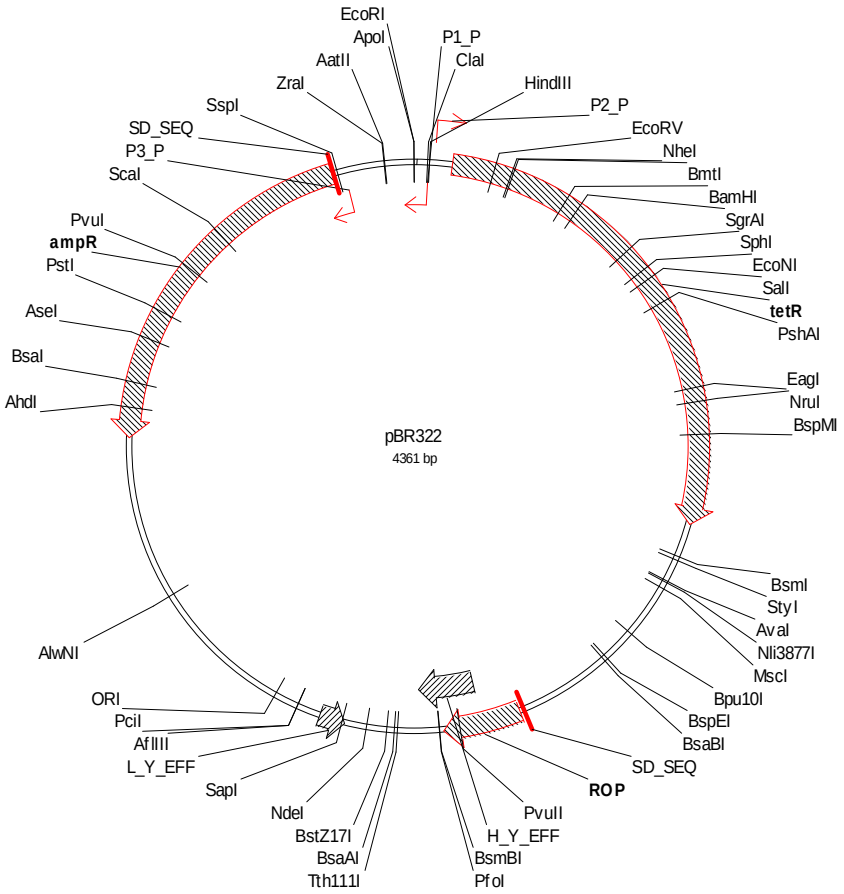
b. Si se trata de un virus:

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):

Vector utilizado para la generación de la línea HepG2.2.15:

Mapa del plásmido y secuencia del vector:



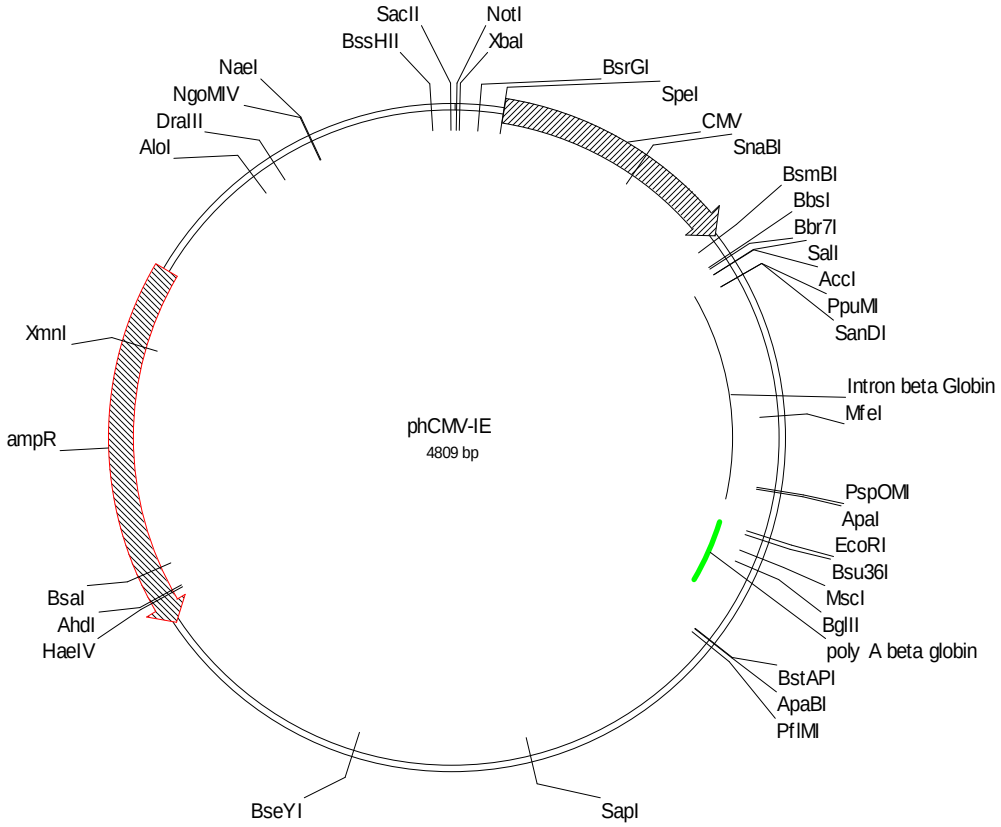
Secuencia del vector:

ttctcatgtttgacagcttatcatcgataagctttaatgcggtagtttatcacagttaaattgctaacgcagtcaggcaccgtgtatgaaatct
aacaatgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcaccctggatgctgtaggcataggcttggttatgccggtactgccgggcctcttgcgg
gatatcgtccattccgacagcatcgccagtcactatggcgtgctgctagcgctatatgcgttgatgcaatttctatgcgcacccgttctcgg
agcactgtccgaccgctttggccgccgcccagtcctgctcgcttcgctacttggagccactatcgactacgcgatcatggcgaccacac
ccgtcctgtggatcctctacgccggacgcatcgtggccggcatcaccggcgccacaggtgcggttgctggcgcctatatcgccgacat
caccgatggggaagatcgggctcgccacttcgggctcatgagcgcttgtttcggcgtgggtatggtggcaggccccgtggccgggggg
actgttgggcgccatctccttgcatgcaccattccttgcggcggcggtgctcaacggcctcaacctactactgggctgcttcctaatgcag
gagtcgcataagggagagcgtcgaccgatgcccttgagagccttcaacccagtcagctccttccggtgggcgcggggcatgactatc
gtcgccgcacttatgactgtcttctttatcatgcaactcgtaggacaggtgccggcagcgctctgggtcattttcggcgaggaccgctttcg
ctggagcgcgacgatgatcggcctgtcgcttgcggtattcggaatcttgcacgccctcgctcaagccttcgtcactggtcccgccaccaa
acgtttcggcgagaagcaggccattatcgccggcatggcggccgacgcgctgggctacgtcttgctggcgttcgcgacgcgaggctg
gatggccttccccattatgattcttctcgcttccggcggcatcgggatgcccgcgttgcaggccatgctgtccaggcaggtagatgacga
ccatcagggacagcttcaaggatcgctcgcggctcttaccagcctaacttcgatcactggaccgctgatcgtcacggcgatttatgccg
cctcggcgagcacatggaacgggttggcatggattgtaggcgccgccctataccttgtctgcctccccgcgttgcgtcgcggtgcatgg
agccgggccacctcgacctgaatggaagccggcggcacctcgctaacggattcaccactccaagaattggagccaatcaattcttgc
ggagaactgtgaatgcgcaaaccaacccttggcagaacatatccatcgcgtccgccatctccagcagccgcacgcggcgcatctcg

ggcagcgttgggtcctggccacgggtgcgcatgatcgtgctcctgtcgttgaggacccggctaggctggcggggttgccttactggttag
cagaatgaatcaccgatacgcgagcgaacgtgaagcgactgctgctgcaaaacgtctgcgacctgagcaacaacatgaatggtctt
cggtttccgtgtttcgtaaagtctggaaacgcggaagtcagcgccctgcaccattatgttccggatctgcatcgcaggatgctgctggcta
ccctgtggaacacctacatctgtattaacgaagcgctggcattgaccctgagtgatttttctctggtcccgccgcatccataccgccagttg
tttaccctcacaacgttccagtaaccgggcatgttcatcatcagtaacccgtatcgtgagcatcctctctcgtttcatcggtatcattaccccc
atgaacagaaatcccccttacacggaggcatcagtgaccaaacaggaaaaaaccgcccttaacatggcccgctttatcagaagcc
agacattaacgcttctggagaaactcaacgagctggacgcggatgaacaggcagacatctgtgaatcgcttcacgaccacgctgat
gagctttaccgcagctgcctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtct
gtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggcgcagccatgacccagtc
acgtagcgatagcggagtgtatactggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaatacc
gcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggc
gagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaag
gccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaat
cgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcct
gttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctatagctcacgctgtaggtatctcagtt
cggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttg
agtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgct
acagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcgga
aaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaa
aaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgag
attatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagt
taccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacga
tacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaacc
agccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccgggaagctagagt
aagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctgcaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagct
ccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaa
gtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggt
gagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaacacgggataataccgcgccac
atagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgat
gtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccg
caaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttccttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctca
tgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaa
gaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtcttcaagaa

Vectores utilizados para la generación de la línea HepAD38:

Mapa del plásmido y secuencia del vector phCMV-IE:

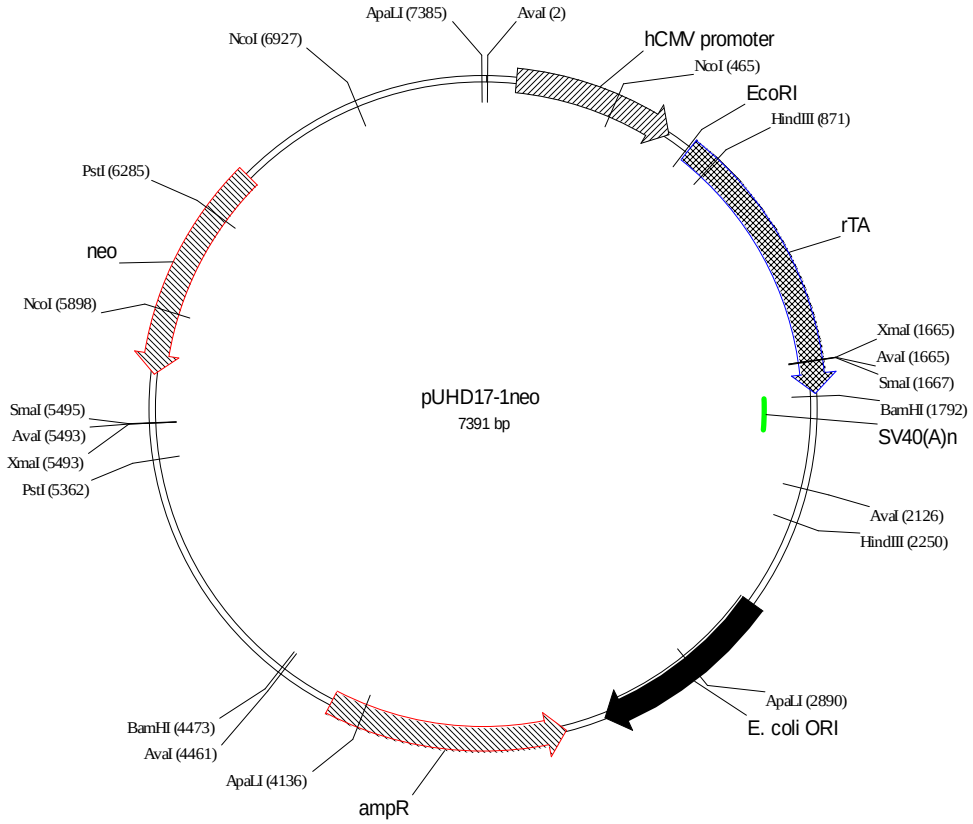


Secuencia del vector:

gcggccgctctagagagcttggcccattgcatacgttgtatccatatcataatatgtacatttatattggctcatgtccaacattaccgccat
gttgacattgattattgactagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacg
gtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaataggg
actttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctat
tgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattag
tcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccc
attgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggc
ggtaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgcctggagacgccatccacgctgttttga
cctccatagaagacaccgggaccgatccagcctccggtcgaccgatcctgagaacttcagggtgagtttggggacccttgattgttcttt
ctttttcgctattgtaaaattcatgttatatggaggggcaaagttttcagggtgttgtttagaatgggaagatgtcccttgtatcaccatggac
cctcatgataattttgtttctttcactttctactctgttgacaaccattgtctcctcttattttcttttcattttctgtaacttttcgttaaactttagcttgcat
ttgtaacgaatttttaaattcacttttgtttatttgtcagattgtaagtactttctctaatcacttttttttcaaggcaatcagggtatattatattgtactt
cagcacagttttagagaacaattgttataattaaatgataaggtagaatatttctgcatataaattctggctggcgtggaaatattcttattgg
tagaaacaactacaccctggtcatcatcctgcctttctctttatggttacaatgatatacactgtttgagatgaggataaaatactctgagtcc
aaaccgggcccctctgctaaccatgttcatgccttcttctttcctacagctcctgggcaacgtgctggttgttgtgctgtctcatcattttggc
aaagaatttgccaccatggtgaattcactcctcaggtgcaggctgcctatcagaaggtggtggctggtgtggccaatgccctggctcac
aaataccactgagatcttttcccctctgccaaaaattatggggacatcatgaagccccttgagcatctgacttctggctaataaaggaaat
ttattttcattgcaatagtgtgttggaatttttgtgtctctcactcggaaggacatatgggagggcaaatcatttaaaacatcagaatgagtat
ttggtttagagtttggcaacatatgcccatatgctggctgccatgaacaaaggttggctataaagaggtcatcagtatatgaaacagccc

cctgctgtccattccttattccatagaaaagccttgacttgaggttagatttttttatattttgttttgtgttatttttttctttaacatccctaaaattttcc
ttacatgttttactagccagatttttcctcctctcctgactactcccagtcatagctgtccctcttctcttatggagatccctcgacggatcggcc
gcaattcgtaatcatgtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacgagccggaagcataaagtgt
aaagcctggggtgcctaatgagtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccag
ctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcg
gtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaa
catgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgccccctgacg
agcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctc
cctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacg
ctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgaccgctgcgccttatcc
ggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgagg
tatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagc
cagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagat
tacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaaggg
attttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaa
cttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtg
tagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttat
cagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccg
ggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtat
ggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcgggttagctccttcggtcctcc
gatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatg
cttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaatacgggat
aataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttg
agatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaa
ggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttccttttcaatattattgaagcatttatc
agggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgc
cacctaaattgtaagcgttaatattttgttaaaattcgcgttaaatttttgttaaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaa
tcccttataaatcaaaagaatagaccgagatagggttgagtgttgttccagtttggaacaagagtccactattaaagaacgtggactcc
aacgtcaaagggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggcccactacgtgaaccatcaccctaatcaagttttttggggtcgaggtgcc
gtaaagcactaaatcggaaccctaaagggagcccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaacgtggcgagaaaggaa
gggaagaaagcgaaaggagcgggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccaccacacccgccgcgct
taatgcgccgctacagggcgcgtcccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattac
gccagctggcgaaaggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacgg
ccagtgagcgcgcgtaatacgactcactatagggcgaattggagctccaccgcggtg

Mapa del plásmido y secuencia del vector que contiene el gen de neomicina:



Secuencia del vector que contiene el gen de neomicina:

ctcgaggagcttggcccattgcatacgttgtatccatatcataatatgtacatttatattggctcatgtccaacattaccgccatgttgacattg
attattgactagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggc
ccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattg
acgtcaatgggtggagtatttacgctaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaat
gacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctatt
accatggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtca
atgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgt
gtacggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgcctggagacgccatccacgctgttttgacctccataga
agacaccgggaccgatccagcctccgcggccccgaattcatatgtctagattagataaaagtaaagtgattaacagcgcattagagc
tgcttaatgaggtcggaatcgaaggtttaacaacccgtaaactcgcccagaagcttggtgtagagcagcctacactgtattggcatgta
aaaaataagcgggctttgctcgacgccttagccattgagatgttagataggcaccatactcacttttgccctttaaaaggggaaagctgg
caagatttttacgcaataacgctaaaagttttagatgtgctttactaagtcatcgcaatggagcaaaagtacattcagatacacggccta
cagaaaaacagtatgaaactctcgaaaatcaattagccttttttatgccaacaaggtttttcactagagaacgcgttatatgcactcagcg
ctgtggggcattttactttaggttgcgtattggaagatcaagagcatcaagtcgctaaagaagaaagggaaacacctactactgatagt
atgccgccattattacgacaagctatcgaattatttgatcaccaaggtgcagagccagccttcttattcggccttgaattgatcatatgcgg
attagaaaaacaacttaaatgtgaaagtgggtccgcgtacagccgcgcgcgtacgaaaaacaattacgggtctaccatcgagggcc
tgctcgatctcccggacgacgacgccccgaagaggcggggctggcggctccgcgcctgtcctttctccccgcgggacacacgcgc
agactgtcgacggcccccccgaccgatgtcagcctgggggacgagctccacttagacggcgaggacgtggcgatggcgcatgccg
acgcgctagacgatttcgatctggacatgttgggggacggggattccccgggtccgggatttacccccacgactccgccccctacgg
cgctctggatatggccgacttcgagtttgagcagatgtttaccgatgcccttggaattgacgagtacggtgggtagggggcgcgaggat
ccagacatgataagatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgcta
ttgctttatttgtaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcagggggaggtgtggga
ggttttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgtggtatggctgattatgatcctgcaagcctcgtcgtctggccggaccacgctatctgtg

caaggtccccggacgcgcgctccatgagcagagcgcccgccgccgaggcaagactcgggcggcgccctgcccgtcccaccagg
tcaacaggcggtaaccggcctcttcatcgggaatgcgcgcgaccttcagcatcgccggcatgtcccctggcggacgggaagtatcag
ctcgaccaagcttggcgagattttcaggagctaaggaagctaaaatggagaaaaaaatcactggatataccaccgttgatatatccca
atggcatcgtaaagaacattttgaggcatttcagtcagttgctcaatgtacctataaccagaccgttcagctgcattaatgaatcggccaa
cgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcg
gtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagc
aaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgc
tcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttcccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccga
ccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcaatgctcacgctgtaggtatctcagttcggtgta
ggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaa
cccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagt
tcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagag
ttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggat
ctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaa
aggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgct
taatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggag
ggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagcc
ggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttc
gccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttcc
caacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttg
gccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactc
aaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcaga
actttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaaccca
ctcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaag
ggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttccttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggat
acatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccatt
attatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtcttcactcgaggtcgagggatccagacatgataagatac
attgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattat
aagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcagggggaggtgtgggaggttttttaaagcaagtaa
aacctctacaaatgtggtatggctgattatgatctctagtcaaggcactatacatcaaatattccttattaaccccctttacaaattaaaaagc
taaaggtacacaatttttgagcatagttattaatagcagacactctatgcctgtgtggagtaagaaaaaacagtatgttatgattataactg
ttatgcctacttataaaggttacagaatatttttccataattttcttgtatagcagtgcagctttttcctttgtggtgtaaatagcaaagcaagcaa
gagttctattactaaacacagcatgactcaaaaaacttagcaattctgaaggaaagtccttggggtcttctacctttctcttctttttttggagg
agtagaatgttgagagtcagcagtagcctcatcatcactagatggcatttcttctgagcaaaacaggttttcctcattaaaggcattccac
cactgctcccattcatcagttccataggttggaatctaaaatacacaaacaattagaatcagtagtttaacacattatacacttaaaaatttt
atatttaccttagagctttaaatctctgtaggtagtttgtccaattatgtcacaccacagaagtaaggttccttcacaaagatccgggacca
aagcggccatcgtgcctccccactcctgcagttcgggggcatggatgcgcggatagccgctgctggtttcctggatgccgacggatttg
cactgccggtagaactccgcgaggtcgtccagcctcaggcagcagctgaaccaactcgcgaggggatcgagcccggggtgggcg
aagaactccagcatgagatccccgcgctggaggatcatccagccggcgtcccggaaaacgattccgaagcccaacctttcatagaa
ggcggcggtggaatcgaaatctcgtgatggcaggttgggcgtcgcttggtcggtcatttcgaaccccagagtcccgctcagaagaact
cgtcaagaaggcgatagaaggcgatgcgctgcgaatcgggagcggcgataccgtaaagcacgaggaagcggtcagcccattcg
ccgccaagctcttcagcaatatcacgggtagccaacgctatgtcctgatagcggtccgccacacccagccggccacagtcgatgaat
ccagaaaagcggccattttccaccatgatattcggcaagcaggcatcgccatgggtcacgacgagatcctcgccgtcgggcatgcgc
gccttgagcctggcgaacagttcggctggcgcgagcccctgatgctcttcgtccagatcatcctgatcgacaagaccggcttccatccg
agtacgtgctcgctcgatgcgatgtttcgcttggtggtcgaatgggcaggtagccggatcaagcgtatgcagccgccgcattgcatcag
ccatgatggatactttctcggcaggagcaaggtgagatgacaggagatcctgccccggcacttcgcccaatagcagccagtcccttcc
cgcttcagtgacaacgtcgagcacagctgcgcaaggaacgcccgtcgtggccagccacgatagccgcgctgcctcgtcctgcagtt
cattcagggcaccggacaggtcggtcttgacaaaaagaaccgggcgcccctgcgctgacagccggaacacggcggcatcagag
cagccgattgtctgttgtgcccagtcatagccgaatagcctctccacccaagcggccggagaacctgcgtgcaatccatcttgttcaatc
atgcgaaacgatcctcatcctgtctcttgatcagatcttgatcccctgcgccatcagatccttggcggcaagaaagccatccagtttacttt
gcagggcttcccaaccttaccagagggcgccccagctggcaattccggttcgcttgctgtccataaaaccgcccagtctagctatcgcc

atgtaagcccactgcaagctacctgctttctctttgcgcttgcgttttcccttgtccagatagcccagtagctgacattcatccggggtcagc
accgtttctgcggactggctttctacgtgttccgcttcctttagcagcccttgcgccctgagtgcttgcggcagcgtgttgctagctttttgcaa
aagcctaggcctccaaaaaagcctcctcactacttctggaatagctcagaggccgaggcggcctcggcctctgcataaataaaaaa
aattagtcagccatggggcggagaatgggcggaactgggcggagttaggggcgggatgggcggagttaggggcgggactatggtt
gctgactaattgagatgcatgctttgcatacttctgcctgctggggagcctggggactttccacacctggttgctgactaattgagatgcatg
ctttgcatacttctgcctgctggggagcctggggactttccacaccctaactgacacacattccacagctgcctcgcgcgtttcggtgatg
acggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtca
gggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggcgcagccatgacccagtcacgtagcgatagcggagtgtatactggcttaactat
gcggcatcagagcagattgtactgagagtgcacca

d. Gama de hospedadores del vector:

E. coli

e. Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

No tiene.

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?

El vector pBR322 tiene origen de replicación de la bacteria E.coli. Para la replicación única en la bacteria E.coli, tiene el gen de la resistencia a la ampicilina. El vector recombinante lleva el gen que confiere resistencia a la geneticina (neomicina fosfotransferasa).

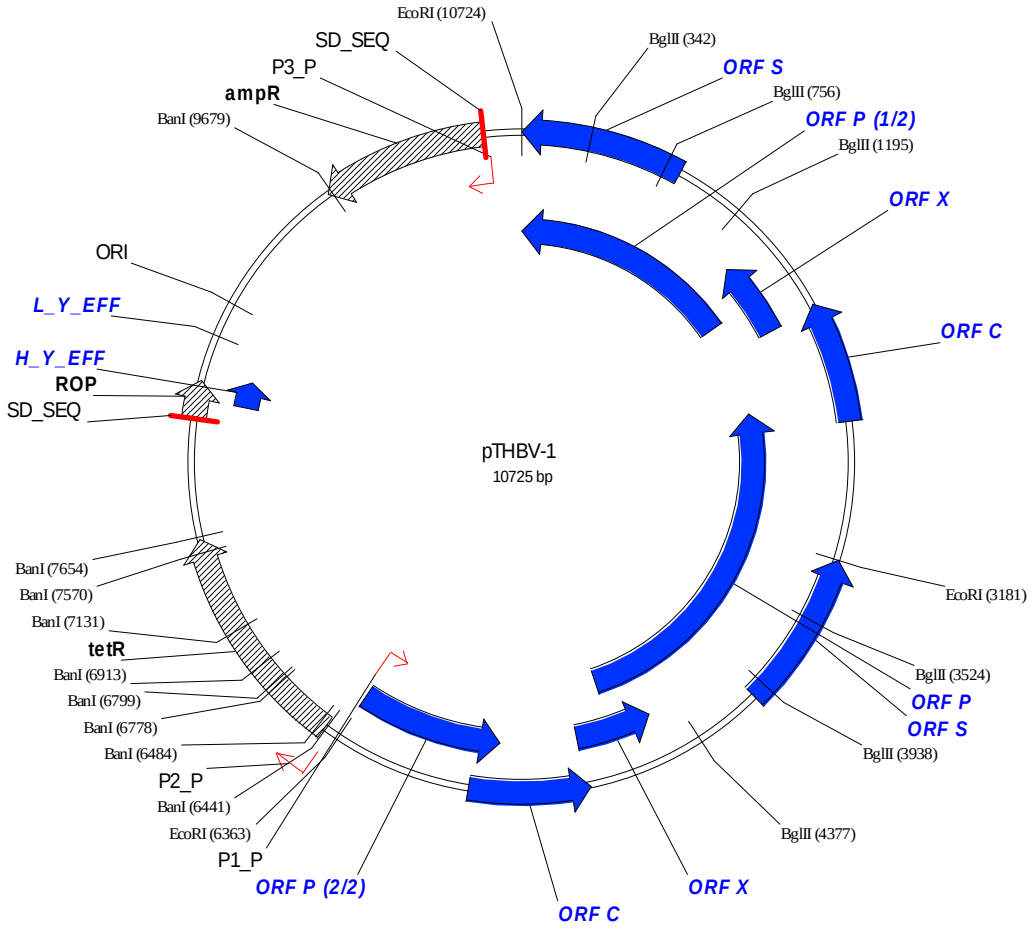
El vector phCMV-IE tiene también origen de replicación de E.coli pero no lleva ningún gen que confiere resistencia en células eucariotas.

5) Información del inserto:

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

Vectores con inserto para la línea celular HepG2.2.15:

Mapa del plásmido y secuencia del vector intermedio con inserto:



Secuencia del vector intermedio con inserto:

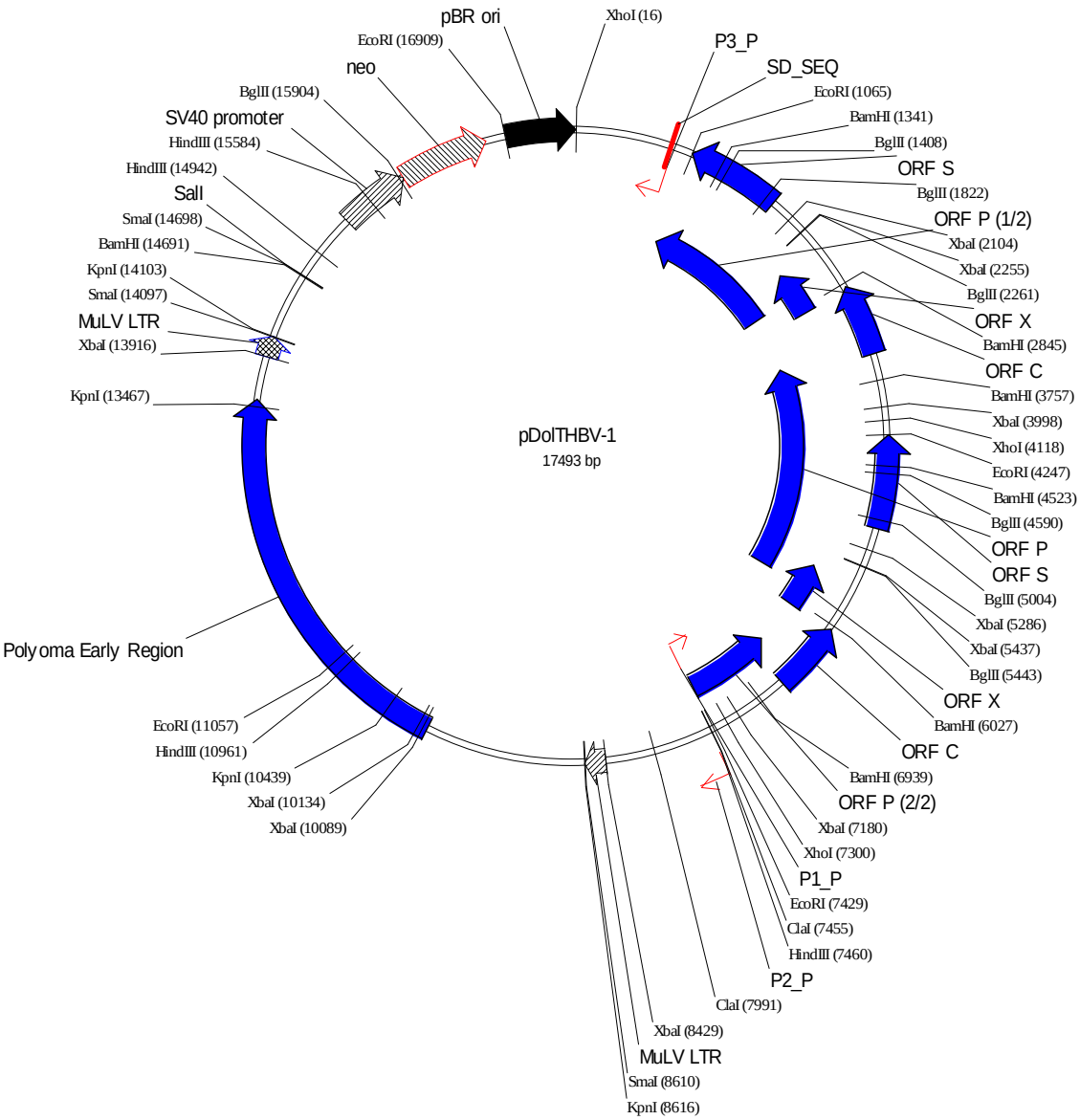
ttccactgcatggcctgaggatgagtgtttctcaaaggtggagacagcggggtaggctgccttcctgactggcgattggtggaggcagg
aggcggatttgctggcaaagtttgtagtatgccctgagcctgagggctccaccccaaaaggcctccgtgcggtggggtgaaacccag
cccgaatgctccagctcctaccttgttggcgtctggccaggtgtccttgttgggattgaagtcccaatctggatttgcggtgtttgctctgaag
gctggatccaactggtggtcgggaaagaatcccagaggattgctggtggaaagattctgccccatgctgtagatcttgttcccaagaat
atggtgacccacaaaatgaggcgctatgtgttgtttctctcttatataatatacccgccttccatagagtgtgtaaatagtgtctagtttggaa
gtaatgattaactagatgttctggataataaggtttaatacccttatccaatggtaaatatttggtaacctttggataaaacctggcaggcat
aatcaattgcaatcttcttttctcattaactgtgagtgggcctacaaactgttcacatttttgataatgtcttggtgtaaatgtatattaggaaaa
gatggtgttttccaatgaggattaaagacaggtacagtagaagaataaagcccagtaaagttccccaccttatgagtccaaggaatac
taacattgagattcccgagattgagatcttctgcgacgcggcgattgagaccttcgtctgcgaggcgagggagttcttcttctaggggac
ctgcctcgtcgtctaacaacagtagtctccggaagtgttgataggataggggcatttggtggtctataagctggaggagtgcgaatccac
actccgaaagacaccaaatactctataactgtttctcttccaaaagtgagacaagaaatgtgaaaccacaagagttgcctgaactttag
gcccatattagtgttgacataactgactactaggtctctagacgctggatcttccaaattaacacccacccaggtagctagagtcattagtt

ccccccagcaaagaattgcttgcctgagtgcagtatggtgaggtgaacaatgctcaggagactctaaggcttcccgatacagagctg
aggcggtatctagaagatctcgtactgaaggaaagaagtcagaaggcaaaaacgagagtaactccacagtagctccaaattctttat
aagggtcgatgtccatgccccaaagccacccaaggcacagcttggaggcttgaacagtaggacatgaacaagagatgattaggca
gaggtgaaaaagttgcatggtgctggtgcgcagaccaatttatgcctacagcctcctagtacaaagacctttaacctaatctcctccccc
aactcctcccagtctttaaacaaacagtctttgaagtatgcctcaaggtcggtcgttgacattgctgagagtccaagagtcctcttatgtaa
gaccttgggcaatatttggtgggcgttcacggtggtctccatgcgacgtgcagaggtgaagcgaagtgcacacggtccggcagatga
gaaggcacagacggggagtccgcgtaaagagaggtgcgccccgtggtcggtcggaacggcagacggagaaggggacgagag
agtcccaagcgaccccgagaagggtcgtccgcaggattcagcgccgacgggacgtaaacaaaggacgtcccgcgcaggatcca
gttggcagcacagcctagcagccatggaaacgatgtatatttgcgggataggacaacagagttatcagtcccgataatgtttgctccag
acctgctgcgagcaaaacaagcggctaggagttccgcagtatggatcggcagaggagccgaaaaggttccacgcatgcgctgatg
gcccatgaccaagccccagccagtgggggttgcgtcagcaaacacttggcacagacctggccgttgccgggcaacggggtaaag
gttcaggtattgtttacacagaaaggccttgtaagttggcgagaaagtgaaagcctgcttagattgaatacatgcatacaaaggcatca
acgcaggataaccacattgtgtaaaaggggcagcaaaacccaaaagacccacaattcgttgacatactttccaatcaataggcctgt
taataggaagttttctaaaacattctttgatttttgtatgatgtgttcttgtggcaaggacccataacatccaatgacataacccataaaattt
agagagtaaccccatctctttgttttgttagggtttaaatgtatacccaaagacaaaagaaaattggtaacagcggtaaaaagggactc
aagatgctgtacagacttggccccaataccacatcatccatataactgaaagccaaacagtgggggaaagccctacgaaccactg
aacaaatggcactagtaaactgagccaggagaaacgggctgaggcccactcccataggaattttccgaaagcccaggatgatggg
atgggaatacaggtgcaatttccgtccgaaggtttggtacagcaacaggagggatacatagaggttccttgagcagtagtcatgcagg
tccggcatggtcccgtgctggttgttgaggatcctggaattagaggacaaacgggcaacatacttgatagtccagaagaaccaaca
agaagatgaggcatagcagcaggatgaagaggaagatgataaaacgccgcagacacatccagcgataaccaggacaagttgg
aggacaagaggttggtgagtgattggaggttggggactgcgaattttggccaagacacacggtagttccccctagaaaattgagaga
agtccaccacgagtctagactctgcggtattgtgaggattcttgtcaacaagaaaaaccccgcctgtaacacgagaaggggtcctag
gaatcctgatgtgatgttctccatgttcagcgcagggtccccaatcctcgagaagattgacgataagggagaggcagtagtcagaaca
gggtttactgttcctgaactggagccaccagcagggaaatacaggcctctcactctgggatcttgcagagtttggtggaaggttgtggaa
ttccactgcatggcctgaggatgagtgtttctcaaaggtggagacagcggggtaggctgccttcctgactggcgattggtggaggcagg
aggcggatttgctggcaaagtttgtagtatgccctgagcctgagggctccaccccaaaaggcctccgtgcggtggggtgaaacccag
cccgaatgctccagctcctaccttgttggcgtctggccaggtgtccttgttgggattgaagtcccaatctggatttgcggtgtttgctctgaag
gctggatccaactggtggtcgggaaagaatcccagaggattgctggtggaaagattctgccccatgctgtagatcttgttcccaagaat
atggtgacccacaaaatgaggcgctatgtgttgtttctctcttatataatatacccgccttccatagagtgtgtaaatagtgtctagtttggaa
gtaatgattaactagatgttctggataataaggtttaataccctatccaatggtaaatatttggtaacctttggataaaacctggcaggcat
aatcaattgcaatcttctttctcattaactgtgagtgggcctacaaactgttcacatttttttgataatgtcttggtgtaaatgtatattaggaaaa
gatggtgttttccaatgaggattaaagacaggtacagtagaagaataaagcccagtaaagttccccaccttatgagtccaaggaatac
taacattgagattcccgagattgagatcttctgcgacgcggcgattgagaccttcgtctgcgaggcgagggagttcttcttctaggggac
ctgcctcgtcgtctaacaacagtagtctccggaagtgttgataggataggggcatttggtggtctataagctggaggagtgcgaatccac
actccgaaagacaccaaatactctataactgtttctcttccaaaagtgagacaagaaatgtgaaaccacaagagttgcctgaactttag
gcccatattagtgttgacataactgactactaggtctctagacgctggatcttccaaattaacacccacccaggtagctagagtcattagtt
ccccccagcaaagaattgcttgcctgagtgcagtatggtgaggtgaacaatgctcaggagactctaaggcttcccgatacagagctg
aggcggtatctagaagatctcgtactgaaggaaagaagtcagaaggcaaaaacgagagtaactccacagtagctccaaattctttat
aagggtcgatgtccatgccccaaagccacccaaggcacagcttggaggcttgaacagtaggacatgaacaagagatgattaggca
gaggtgaaaaagttgcatggtgctggtgcgcagaccaatttatgcctacagcctcctagtacaaagacctttaacctaatctcctccccc
aactcctcccagtctttaaacaaacagtctttgaagtatgcctcaaggtcggtcgttgacattgctgagagtccaagagtcctcttatgtaa
gaccttgggcaatatttggtgggcgttcacggtggtctccatgcgacgtgcagaggtgaagcgaagtgcacacggtccggcagatga
gaaggcacagacggggagtccgcgtaaagagaggtgcgccccgtggtcggtcggaacggcagacggagaaggggacgagag
agtcccaagcgaccccgagaagggtcgtccgcaggattcagcgccgacgggacgtaaacaaaggacgtcccgcgcaggatcca
gttggcagcacagcctagcagccatggaaacgatgtatatttgcgggataggacaacagagttatcagtcccgataatgtttgctccag
acctgctgcgagcaaaacaagcggctaggagttccgcagtatggatcggcagaggagccgaaaaggttccacgcatgcgctgatg
gcccatgaccaagccccagccagtgggggttgcgtcagcaaacacttggcacagacctggccgttgccgggcaacggggtaaag
gttcaggtattgtttacacagaaaggccttgtaagttggcgagaaagtgaaagcctgcttagattgaatacatgcatacaaaggcatca
acgcaggataaccacattgtgtaaaaggggcagcaaaacccaaaagacccacaattcgttgacatactttccaatcaataggcctgt
taataggaagttttctaaaacattctttgatttttgtatgatgtgttcttgtggcaaggacccataacatccaatgacataacccataaaattt
agagagtaaccccatctctttgttttgttagggtttaaatgtatacccaaagacaaaagaaaattggtaacagcggtaaaaagggactc

aagatgctgtacagacttggcccccaataccacatcatccatataactgaaagccaaacagtgggggaaagccctacgaaccactg
aacaaatggcactagtaaactgagccaggagaaacgggctgaggcccactcccataggaattttccgaaagcccaggatgatggg
atgggaatacaggtgcaatttccgtccgaaggtttggtacagcaacaggagggatacatagaggttccttgagcagtagtcatgcagg
tccggcatggtcccgtgctggttgttgaggatcctggaattagaggacaaacgggcaacataccttgatagtccagaagaaccaaca
agaagatgaggcatagcagcaggatgaagaggaagatgataaaacgccgcagacacatccagcgataaccaggacaagttgg
aggacaagaggttggtgagtgattggaggttggggactgcgaattttggccaagacacacggtagttccccctagaaaattgagaga
agtccaccacgagtctagactctgcggtattgtgaggattcttgtcaacaagaaaaaccccgcctgtaacacgagaaggggtcctag
gaatcctgatgtgatgttctccatgttcagcgcagggtccccaatcctcgagaagattgacgataagggagaggcagtagtcagaaca
gggtttactgttcctgaactggagccaccagcagggaaatacaggcctctcactctgggatcttgcagagtttggtggaaggttgtggaa
ttctcatgtttgacagcttatcatcgataagctttaatgcggtagtttatcacagttaaattgctaacgcagtcaggcaccgtgtatgaaatct
aacaatgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcaccctggatgctgtaggcataggcttggttatgccggtactgccgggcctcttgcgg
gatatcgtccattccgacagcatcgccagtcactatggcgtgctgctagcgctatatgcgttgatgcaatttctatgcgcacccgttctcgg
agcactgtccgaccgctttggccgccgcccagtcctgctcgcttcgctacttggagccactatcgactacgcgatcatggcgaccacac
ccgtcctgtggatcctctacgccggacgcatcgtggccggcatcaccggcgccacaggtgcggttgctggcgcctatatcgccgacat
caccgatggggaagatcgggctcgccacttcgggctcatgagcgcttgtttcggcgtgggtatggtggcaggccccgtggccgggggg
actgttgggcgccatctccttgcatgcaccattccttgcggcggcggtgctcaacggcctcaacctactactgggctgcttcctaatgcag
gagtcgcataagggagagcgtcgaccgatgcccttgagagccttcaacccagtcagctccttccggtgggcgcggggcatgactatc
gtcgccgcacttatgactgtcttctttatcatgcaactcgtaggacaggtgccggcagcgctctgggtcattttcggcgaggaccgctttcg
ctggagcgcgacgatgatcggcctgtcgcttgcggtattcggaatcttgcacgccctcgctcaagccttcgtcactggtcccgccaccaa
acgtttcggcgagaagcaggccattatcgccggcatggcggccgacgcgctgggctacgtcttgctggcgttcgcgacgcgaggctg
gatggccttccccattatgattcttctcgcttccggcggcatcgggatgcccgcgttgcaggccatgctgtccaggcaggtagatgacga
ccatcagggacagcttcaaggatcgctcgcggctcttaccagcctaacttcgatcactggaccgctgatcgtcacggcgatttatgccg
cctcggcgagcacatggaacgggttggcatggattgtaggcgccgccctataccttgtctgcctccccgcgttgcgtcgcggtgcatgg
agccgggccacctcgacctgaatggaagccggcggcacctcgctaacggattcaccactccaagaattggagccaatcaattcttgc
ggagaactgtgaatgcgcaaaccaaccccttggcagaacatatccatcgcgtccgccatctccagcagccgcacgcggcgcatctcg
ggcagcgttgggtcctggccacgggtgcgcatgatcgtgctcctgtcgttgaggacccggctaggctggcggggttgccttactggttag
cagaatgaatcaccgatacgcgagcgaacgtgaagcgactgctgctgcaaaacgtctgcgacctgagcaacaacatgaatggtctt
cggtttccgtgtttcgtaaagtctggaaacgcggaagtcagcgccctgcaccattatgttccggatctgcatcgcaggatgctgctggcta
ccctgtggaacacctacatctgtattaacgaagcgctggcattgaccctgagtgatttttctctggtcccgccgcatccataccgccagttg
tttaccctcacaacgttccagtaaccgggcatgttcatcatcagtaacccgtatcgtgagcatcctctctcgtttcatcggtatcattaccccc
atgaacagaaatcccccttacacggaggcatcagtgaccaaacaggaaaaaaccgcccttaacatggcccgctttatcagaagcc
agacattaacgcttctggagaaactcaacgagctggacgcggatgaacaggcagacatctgtgaatcgcttcacgaccacgctgat
gagctttaccgcagctgcctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtct
gtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggcgcagccatgacccagtc
acgtagcgatagcggagtgtatactggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaatacc
gcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggc
gagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaag
gccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgccccccctgacgagcatcacaaaaat
cgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttcccccctggaagctccctcgtgcgctctcct
gttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagtt
cggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttg
agtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgct
acagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcgga
aaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaa
aaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgag
attatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagt
taccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacga
tacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaacc
agccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccgggaagctagagt
aagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctgcaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagct
ccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaa

gtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggt
gagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaacacgggataataccgcgccac
atagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgat
gtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccg
caaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttccttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctca
tgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaa
gaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtcttcaagaa

Mapa del plásmido final y secuencia del vector:



Secuencia del vector final con inserto:

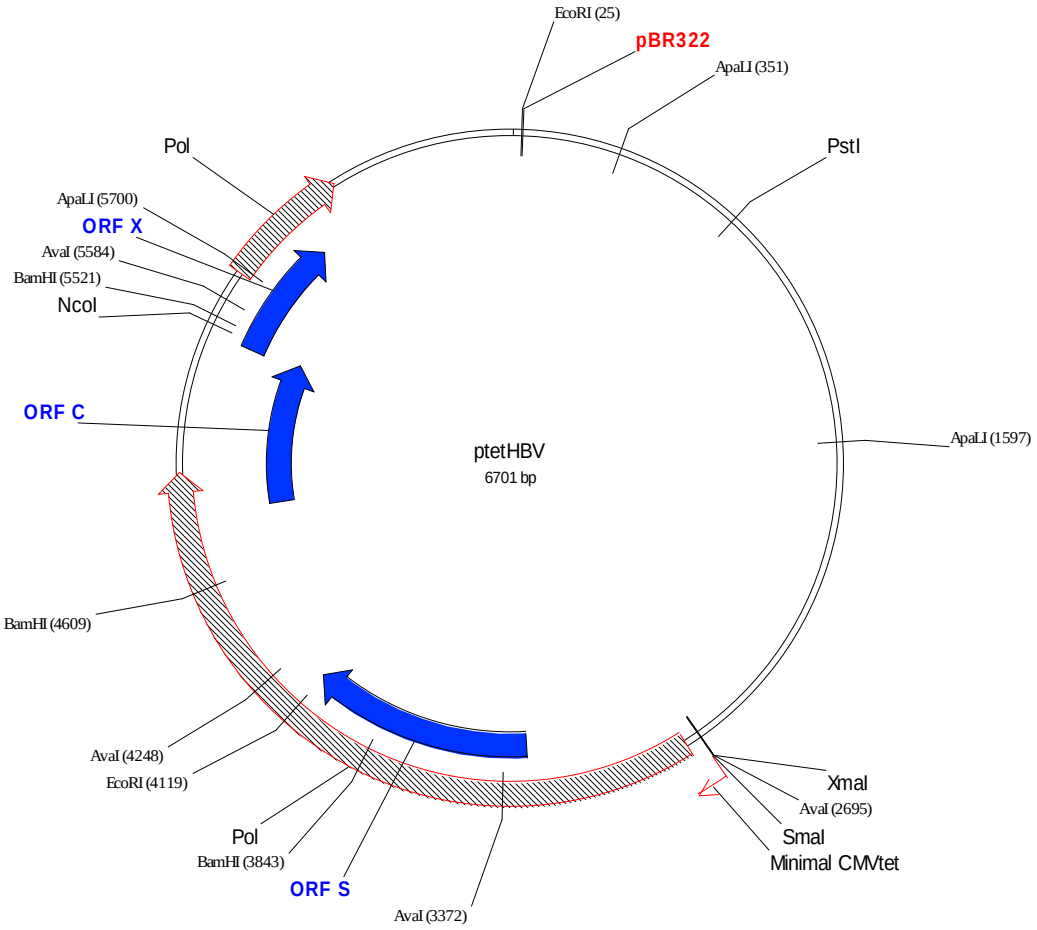
ccgagatgcgccgcctcgagcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacga
tacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaacc
agccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccgggaagctagagt
aagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctgcaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagct
ccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaa
gtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggt
gagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaacacgggataataccgcgccac
atagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgat
gtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccg
caaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttcctttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctca
tgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaa
gaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtcttcaagaattccactgcatggcctgaggat
gagtgtttctcaaaggtggagacagcggggtaggctgccttcctgactggcgattggtggaggcaggaggcggatttgctggcaaagt
ttgtagtatgccctgagcctgagggctccaccccaaaaggcctccgtgcggtggggtgaaacccagcccgaatgctccagctcctac
cttgttggcgtctggccaggtgtccttgttgggattgaagtcccaatctggatttgcggtgtttgctctgaaggctggatccaactggtggtcg
ggaaagaatcccagaggattgctggtggaaagattctgccccatgctgtagatcttgttcccaagaatatggtgacccacaaaatgag
gcgctatgtgttgtttctctcttatataatatacccgccttccatagagtgtgtaaatagtgtctagtttggaagtaatgattaactagatgttctg
gataataaggtttaatacccttatccaatggtaaatatttggtaaccttggataaaacctggcaggcataatcaattgcaatcttcttttctca
ttaactgtgagtgggcctacaaactgttcacatttttgataatgtcttggtgtaaatgtatattaggaaaagatggtgttttccaatgaggatt
aaagacaggtacagtagaagaataaagcccagtaaagttccccaccttatgagtccaaggaatactaacattgagattcccgagatt
gagatcttctgcgacgcggcgattgagaccttcgtctgcgaggcgagggagttcttcttctaggggacctgcctcgtcgtctaacaacag
tagtctccggaagtgttgataggataggggcatttggtggtctataagctggaggagtgcgaatccacactccgaaagacaccaaata
ctctataactgtttctcttccaaaagtgagacaagaaatgtgaaaccacaagagttgcctgaactttaggcccatattagtgttgacataa
ctgactactaggtctctagacgctggatcttccaaattaacacccacccaggtagctagagtcattagttccccccagcaaagaattgctt
gcctgagtgcagtatggtgaggtgaacaatgctcaggagactctaaggcttcccgatacagagctgaggcggtatctagaagatctcg
tactgaaggaaagaagtcagaaggcaaaaacgagagtaactccacagtagctccaaattctttataagggtcgatgtccatgcccca
aagccacccaaggcacagcttggaggcttgaacagtaggacatgaacaagagatgattaggcagaggtgaaaaagttgcatggtg
ctggtgcgcagaccaatttatgcctacagcctcctagtacaaagacctttaacctaatctcctcccccaactcctcccagtctttaaacaa
acagtctttgaagtatgcctcaaggtcggtcgttgacattgctgagagtccaagagtcctcttatgtaagaccttgggcaatatttggtggg
cgttcacggtggtctccatgcgacgtgcagaggtgaagcgaagtgcacacggtccggcagatgagaaggcacagacggggagtc
cgcgtaaagagaggtgcgccccgtggtcggtcggaacggcagacggagaaggggacgagagagtcccaagcgaccccgaga
agggtcgtccgcaggattcagcgccgacgggacgtaaacaaaggacgtcccgcgcaggatccagttggcagcacagcctagcag
ccatggaaacgatgtatatttgcgggataggacaacagagttatcagtcccgataatgtttgctccagacctgctgcgagcaaaacaa
gcggctaggagttccgcagtatggatcggcagaggagccgaaaaggttccacgcatgcgctgatggcccatgaccaagccccagc
cagtgggggttgcgtcagcaaacacttggcacagacctggccgttgccgggcaacggggtaaaggttcaggtattgtttacacagaa
aggccttgtaagttggcgagaaagtgaaagcctgcttagattgaatacatgcatacaaaggcatcaacgcaggataaccacattgtgt
aaaaggggcagcaaaacccaaaagacccacaattcgttgacatactttccaatcaataggcctgttaataggaagttttctaaaacatt
ctttgatttttgtatgatgtgttcttgtggcaaggacccataacatccaatgacataacccataaaatttagagagtaaccccatctctttgttt
tgttagggtttaaatgtatacccaaagacaaaagaaaattggtaacagcggtaaaaagggactcaagatgctgtacagacttggccc
ccaataccacatcatccatataactgaaagccaaacagtgggggaaagccctacgaaccactgaacaaatggcactagtaaactg
agccaggagaaacgggctgaggcccactcccataggaattttccgaaagcccaggatgatgggatgggaatacaggtgcaatttcc
gtccgaaggtttggtacagcaacaggagggatacatagaggttccttgagcagtagtcatgcaggtccggcatggtcccgtgctggttg
ttgaggatcctggaattagaggacaaacgggcaacataccttgatagtccagaagaaccaacaagaagatgaggcatagcagca
ggatgaagaggaagatgataaaacgccgcagacacatccagcgataaccaggacaagttggaggacaagaggttggtgagtga
ttggaggttggggactgcgaattttggccaagacacacggtagttccccctagaaaattgagagaagtccaccacgagtctagactct
gcggtattgtgaggattcttgtcaacaagaaaaaccccgcctgtaacacgagaaggggtcctaggaatcctgatgtgatgttctccatgt
tcagcgcagggtccccaatcctcgagaagattgacgataagggagaggcagtagtcagaacagggtttactgttcctgaactggagc
caccagcagggaaatacaggcctctcactctgggatcttgcagagtttggtggaaggttgtggaattccactgcatggcctgaggatga
gtgtttctcaaaggtggagacagcggggtaggctgccttcctgactggcgattggtggaggcaggaggcggatttgctggcaaagtttg
tagtatgccctgagcctgagggctccaccccaaaaggcctccgtgcggtggggtgaaacccagcccgaatgctccagctcctacctt
gttggcgtctggccaggtgtccttgttgggattgaagtcccaatctggatttgcggtgtttgctctgaaggctggatccaactggtggtcggg

aaagaatcccagaggattgctggtggaaagattctgccccatgctgtagatcttgttcccaagaatatggtgacccacaaaatgaggc
gctatgtgttgtttctctcttatataatatacccgccttccatagagtgtgtaaatagtgtctagtttggaagtaatgattaactagatgttctgga
taataaggtttaatacccttatccaatggtaaatatttggtaaccttggataaaacctggcaggcataatcaattgcaatcttcttttctcatta
actgtgagtgggcctacaaactgttcacatttttttgataatgtcttggtgtaaatgtatattaggaaaagatggtgttttccaatgaggattaa
agacaggtacagtagaagaataaagcccagtaaagttccccaccttatgagtccaaggaatactaacattgagattcccgagattga
gatcttctgcgacgcggcgattgagaccttcgtctgcgaggcgagggagttcttcttctaggggacctgcctcgtcgtctaacaacagta
gtctccggaagtgttgataggataggggcatttggtggtctataagctggaggagtgcgaatccacactccgaaagacaccaaatact
ctataactgtttctcttccaaaagtgagacaagaaatgtgaaaccacaagagttgcctgaactttaggcccatattagtgttgacataact
gactactaggtctctagacgctggatcttccaaattaacacccacccaggtagctagagtcattagttccccccagcaaagaattgcttg
cctgagtgcagtatggtgaggtgaacaatgctcaggagactctaaggcttcccgatacagagctgaggcggtatctagaagatctcgt
actgaaggaaagaagtcagaaggcaaaaacgagagtaactccacagtagctccaaattctttataagggtcgatgtccatgcccca
aagccacccaaggcacagcttggaggcttgaacagtaggacatgaacaagagatgattaggcagaggtgaaaaagttgcatggtg
ctggtgcgcagaccaatttatgcctacagcctcctagtacaaagacctttaacctaatctcctcccccaactcctcccagtctttaaacaa
acagtctttgaagtatgcctcaaggtcggtcgttgacattgctgagagtccaagagtcctcttatgtaagaccttgggcaatatttggtggg
cgttcacggtggtctccatgcgacgtgcagaggtgaagcgaagtgcacacggtccggcagatgagaaggcacagacgggggagtc
cgcgtaaagagaggtgcgccccgtggtcggtcggaacggcagacggagaaggggacgagagagtcccaagcgaccccgaga
agggtcgtccgcaggattcagcgccgacgggacgtaaacaaaggacgtcccgcgcaggatccagttggcagcacagcctagcag
ccatggaaacgatgtatatttgcgggataggacaacagagttatcagtcccgataatgtttgctccagacctgctgcgagcaaaacaa
gcggctaggagttccgcagtatggatcggcagaggagccgaaaaggttccacgcatgcgctgatggcccatgaccaagccccagc
cagtgggggttgcgtcagcaaacacttggcacagacctggccgttgccgggcaacggggtaaaggttcaggtattgtttacacagaa
aggccttgtaagttggcgagaaagtgaaagcctgcttagattgaatacatgcatacaaaggcatcaacgcaggataaccacattgtgt
aaaaggggcagcaaaacccaaaagacccacaattcgttgacatactttccaatcaataggcctgttaataggaagttttctaaaacatt
ctttgatttttttgtatgatgtgttcttgtggcaaggacccataacatccaatgacataacccataaaatttagagagtaaccccatctctttgttt
tgttagggtttaaatgtatacccaaagacaaaagaaaattggtaacagcggtaaaaagggactcaagatgctgtacagacttggccc
ccaataccacatcatccatataactgaaagccaaacagtgggggaaagccctacgaaccactgaacaaatggcactagtaaactg
agccaggagaaacgggctgaggcccactcccataggaattttccgaaagcccaggatgatgggatgggaatacaggtgcaatttcc
gtccgaaggtttggtacagcaacaggagggatacatagaggttccttgagcagtagtcatgcaggtccggcatggtcccgtgctggttg
ttgaggatcctggaattagaggacaaacgggcaacatacccttgatagtccagaagaaccaacaagaagatgaggcatagcagca
ggatgaagaggaagatgataaaacgccgcagacacatccagcgataaccaggacaagttggaggacaagaggttggtgagtga
ttggaggttggggactgcgaattttggccaagacacacggtagttccccctagaaaattgagagaagtccaccacgagtctagactct
gcggtattgtgaggattcttgtcaacaagaaaaaccccgcctgtaacacgagaaggggtcctaggaatcctgatgtgatgttctccatgt
tcagcgcagggtccccaatcctcgagaagattgacgataagggagaggcagtagtcagaacagggtttactgttcctgaactggagc
caccagcagggaaatacaggcctctcactctgggatcttgcagagtttggtggaaggttgtggaattctcatgtttgacagcttatcatcg
ataagctttaatgcggtagtttatcacagttaaattgctaacgcagtcaggcacggaaccctggccctattattgggtggactaaccatgg
ggggaattgccgctggaataggaacagggactactgctctaatggccactcagcaattccagcagctccaagccgcagtacaggat
gatctcagggaggttgaaaaatcaatctctaacctagaaaagtctctcacttccctgtctgaagttgtcctacagaatcgaaggggccta
gacttgttatttctaaaagaaggagggctgtgtgctgctctaaaagaagaatgttgcttctatgcggaccacacaggactagtgagaga
cagcatggccaaattgagagagaggcttaatcagagacagaaactgtttgagtcaactcaaggatggtttgagggactgtttaacaga
tccccttggtttaccaccttgatatctaccattatgggacccctcattgtactcctaatgattttgctcttcggaccctgcattcttaatcgattagt
ccaatttgttaaagacaggatatcagtggtccaggctctagttttgactcaacaatatcaccagctgaagcctatagagtacgagccata
gataaaataaaagattttatttagtctccagaaaaaggggggaatgaaagaccccacctgtaggtttggcaagctagcttaagtaacg
ccattttgcaaggcatggaaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggtcaggaacagatggaacagctgaatatgg
gccaaacaggatatctgtggtaagcagttcctgccccggctcagggccaagaacagatggaacagctgaatatgggccaaacagg
atatctgtggtaagcagttcctgccccggctcagggccaagaacagatggtccccagatgcggtccagccctcagcagtttctagaga
accatcagatgtttccagggtgccccaaggacctgaaatgaccctgtgccttatttgaactaaccaatcagttcgcttctcgcttctgttcgc
gcgcttctgctccccgagctcaataaaagagcccacaaccctcactcggcgcgccagtcctccgattgactgagtcgcccgggtac
ccgtgtatccaataaaccctcttgcagttgcatccgacttgtggtctcgctgttccttgggagggtctcctctgagtgattgactacccgtcag
cgggggtctttcaactttattagctatgctaatacccccccccaattgccctacccccaatttttccttcatttaaccctaagtatggtgttatagg
cctgtaaatccaagcatttgggatattgaagctggagtatgagttcatcctatactgtctatcaagttccaggccaccctggtctacatgag
accttgctcaaaaagccaaagcggcagtgtaccactagatcagtggtagaatgcaaaggcctgtgtaaactaacaccacaaagaa
gagatagatagatagatagatagatagatagatagatagatagatagatttatgggtagatagatgtatagatttatggatagatagata

gatagatagatgtatagatttatgatagatgtatagatttatgggtagatagatgtgtagatttatgggtagataaattagcatagccataaa
atgtgggctgtcgagacacttgatggacaatcatgaagaccagaatttggaccccagtctccacataaggagcaaggcacacctgg
ggcttattcgttaaagaaaagaaaagtataagctgcacgctcacagacagactttgcctcaaaggagtagggagacaacgatagag
gccattcaatggcctcttctggtttccacaaatgtgtacatgcacgcctatgccatacactcacacaaattagtgtttaaagatttttgtaact
gaagatttgaaaaaaaaaaaccctgatagatttgtggatgtgggtaggtggctcacagtcacctataactcacattccacggtatctgac
actccagggtgtctgacaccctcttcttgcctcctcagacaccatactcacatgcatataccagaacacagagacacacatataattca
aaataaaatagatattttagaaaaatggggccagatccggaccgctttggaaaaacaaagactgtatttcctggaaattaatgtttattca
ataaactgtgtattcagctatattcacatatgtccttcaaggggtcgtcgccttcttgcacattacaaagtatatcacaaaacaaactgtag
gagcactcactagcaaactggtcacgaacctccttcacaagaccctgaatatcaggatcaaatacatctgaagtgaaattccatatga
gtaatagggcaagggtatctccactctgaataattctttcccttgcaaaaattcacacttttcaagagattgggccagatggggtttgcag
gtgaaatccaacaccatgtgaaaccgggcccatactgtttgtggtaggagatattcattcattgtacacacacagggtggaaagagttgt
gacctttgttgctgtgctttttttctagattgacctttacactcccatccaggtagtccctgagattatctagattagccactcccatccctggct
gcagttgtttgttcaaggctatttgacccttacatcttcaaaacagaccacaaactggtcctgtgccacaccaagctcaaaagcaagttt
atctgcagggcaatttatgttgagagacttgcctcctaacaggctaataagcgcggctgctaggcctgtctttcctgaattaactggtcctct
aaaaagtatgttgcgtcgttttggcacattttctgttagcagcttaagcatcttaaacagggtttgaggaaagtcctctaaaagacactggt
accaagcgacacctgctaggtagagtagagcatcggaggagccaagttcttttagcctgaggagagactgttgcaatctctcctttaat
agctggctgcgggtacactctactaatttcagtctcctggatgccaagactccgtcagctgcctgctgacagattgtcttttgagctttacaa
ttcaggaagaggtctgcattctctgcatgctttctatggtttttccaatgtatttggaggcgggtttcctctttgctacactttatgcatgaaggaa
cctctttggcaaaatcaagataataccccataattaacaggggatcatcaaggttgttttctagtgcaaagtctgctaccataatccagtct
actgctttctgttcttctggctcgtctgtaaactcgaattggtggaggcctggcttattttctgttattaactgaaatggtgctgcggttacaactt
gatagcattccataggcttggtgactgccttacacattaggaagctgacgctgcaaagcttagagcaataattcttaactgctgaaaccc
tgtgcttagtcatagttagaaagaacagcatgccccctcctcataatggaccaggcatttgaattcgggcctgaacttccctatggtatc
atataattgtttgcatttctctttggtggagtatactagaaatgccgggaacgttttattagaataaatagcatgagacaaatacccagtaag
gctgctaggaaagtcactaggagcagggtcctccctagccttcttaggtggcgttgcattgaatgagctctgagagcagctctgtgagta
gctctcattctctgactcgcatctaggatcggatcgaaatgagccctctgcaaatcccgaagaatcagaccctcccatggactcagacc
cgccctgggaatgatagggggggggatgagctggggtacttgttcctccggtaggatgtccaaatacagatcctccattggcatgtact
cctcctcctcctcctccagtggctccagctggtcttggtcgctttctggatacaggagttctgggggggggccggggatatgctgtcatcggg
ctcagcaacacaaggatttcgtcttcttccagcagtatgtgcgggtgtatctgttggagaactcgggttgggggataggagtggctcctca
taacagaataggtcgggttgctcagaagactcggcagtcttaggcggcgactggtagctggggtcccactttctgaagaaatcattcca
ttcccttgtgaagtacttgcttccatagctgaatgaccagtagtcatcgtgtagtggactgtggccgctctcctcagttcctcgctccgccgtt
ctaggggggagagccctgtaagaatataggccgtaaatacccacccgccctcttgatacttacttggattatacacgctgtgcacatcca
ggtccagccagtctataggcatgcttgcaatgaagtctgcatacaggttcagcacatctcgggttggtgttccaaaccattgcatgtaaca
ttcaagacaaaaacattctccaagtactaggcacctggcatcacatttgtctttgagctctctatgttgctttctaagcaggcataatataca
actacatgagctgtatttaacatttactaggcaggtaagaggcattctgcagaaccgctggtagtatctatcaccaaaggtgtctttggtac
ttagattccacccatccgcatgtagccttcttacctggaagccggttcctcctagattcattctcagattgtatacttcagttttaaatgttcccc
agagactgttcaattcctgcattaaggcatggcttccacctttgtctgggtgcagtagcagtgactgctgcttatatgcctgctgcattcttcc
aaaatccccccatagttgtctgggaagttttagaagttctagcagcctttctttgtcagctctgctcagaactctatccatgatggtggtgagg
ctgaaatgaggcgggaagaggcggttggggcttaattatatcaatttgggtggccccacagcgcctccaaggcgccagtcctgttttga
caagttgcctctggaagcctctacaatgcctctcttctttttctccagagtaagcggaggccaggggccccccggcctctgcttaatactaa
aaaaaacagctgttgtcatagtaatgattgggtggaaacattctaggcctgggtggagaggctttttgcttcctcttgcaaaaccacactg
cccctggagggcagttgcctagcaactaattaaaagaggatgtcgcacggccagctgcggtcagttagtcacttcctgcttaactaatg
cctctcttctttttctccagagtaagcggaggccaagggcccccggcctctgcttaatactaaaaaaaacagctgttgtcatagtaatgatt
gggtggaaacattctaggcctgggtggagaggctttttgcttcctcttgcaaaaccacactgcccctggagggcagttgcctagcaacta
attaaaagaggatgtcgcacggccagctgcggtcagttagtcacttcctgcttaactgacttgacattttctattttaagagtcgggaggaa
aattactgtgttggaggccctccgccatcttctgaagctgatcaagtaagtgaattttcaaaatgggagccgcactgactattctagtaga
cctcatcgagggattagctgaagtgtctacccttacgggactctcggcagaagctattttatctggagaagccctcgctgcccttgatggc
gaaattacagctctgactttggagggtgtaatgagttcggagacagccctagcaactatgggtatttcagaggaggtgtatgggtttgtca
gtactgtgcctgtgtttgtaaatcgaacagcgggggctatatggctgatgcagacagttcaaggtgcctctactatttccctaggaataca
gcggtacctacacaacgaagaggtccctactgtaaatagaaatatggcgttgataccatggcgggatctgggaacagttgtcttcagg
gagcccagttgcttccctccaccttgcagaccaagcagaacaggaccaagaccacactgaccttggctactttgaaagaccccacct
gtaggtttggcaagctagcttaagtaacgccattttgcaaggcatggaaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggtc

aggaacagatggaacagctgaatatgggccaaacaggatatctgtggtaagcagttcctgccccggctcagggccaagaacagat
ggaacagctgaatatgggccaaacaggatatctgtggtaagcagttcctgccccggctcagggccaagaacagatggtccccagat
gcggtccagccctcagcagtttctagagaaccatcagatgtttccagggtgccccaaggacctgaaatgaccctgtgccttatttgaact
aaccaatcagttcgcttctcgcttctgttcgcgcgcttctgctccccgagctcaataaaagagcccacaacccctcactcggcgcgcca
gtcctccgattgactgagtcgcccgggtacccgtgtatccaataaacccttgcagttgcatccgacttgtggtctcgctgttccttgggag
ggtctcctctgagtgattgactacccgtcagcgggggtctttcatttgggggctcgtccgggatcgggagacccctgcccagggaccac
cgacccaccaccgggagataagctgggtcggagacccctgcccagggaccaccgacccaccaccgggaggtaagctggccag
caacttatctgtgtctgtccgattgtctagtgtctatgactgattttatgcgcctgcgtcggtactagttagctaactagctctgtatctggcgga
cccgtggtggaactgacgagttcggaacacccggccgcaaccctgggagacgtcccagggacttcgggggccgtttttgtggcccg
acctgagtccaaaaatcccgatcgttttggactctttggtgcacccccttagaggagggatatgtggttctggtaggagacgagaacct
aaaacagttcccgcctccgtctgaatttttgctttcggtttgggaccgaagccgcgccgcgtcttgtctgccagatcccggatccccgg
gtcgacatagcagaataggcgttactcgacagaggagagcaagaaatggagccagtagatcctagactagagccctggaagcatc
caggaagtcagcctaaaactgcttgtaccaattgctattgtaaaaagtgttgctttcattgccaagtttgtttcatgacaaaagccttaggca
tctcctatggcaggaagaagcggagacagcgacgaagagctcatcagaacagtcagactcatcaagcttctctatcaaagcagtaa
gtagtacatgtaatgcaacctataatagtagcaatagtagcattagtagtagcaataataatagcaatagttgtgtggtccatagtaatca
tagaatataggaaaatattaagacaaagaaaaatagacaggttaattgatagactaatagaaagagcagaagacagtggcagatg
ggtggcaagtggtcaaaaagtagtgtgattggatggcctgctgtaagggaaagaatgagacgagctgagccagcagcagatgggg
tgggagcagtatctcgaccctgtggaatgtgtgtcagttagggtgtggaaagtccccaggctccccagcaggcagaagtatgcaaag
catgcatctcaattagtcagcaaccaggtgtggaaagtccccaggctccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaatta
gtcagcaaccatagtcccgcccctaactccgcccatcccgcccctaactccgcccagttccgcccattctccgccccatggctgactaa
ttttttttatttatgcagaggccgaggccgcctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggcctaggcttttgcaa
aaagcttcacgctgccgcaagcactcagggcgcaagggctgctaaaggaagcggaacacgtagaaagccagtccgcagaaac
ggtgctgaccccggatgaatgtcagctactgggctatctggacaagggaaaacgcaagcgcaaagagaaagcaggtagcttgcag
tgggcttacatggcgatagctagactgggcggttttatggacagcaagcgaaccggaattgccagctggggcgccctctggtaaggtt
gggaagccctgcaaagtaaactggatggctttcttgccgccaaggatctgatggcgcaggggatcaagatctgatcaagagacagg
atgaggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggctatgactgggc
acaacagacaatcggctgctctgatgccgccgtgttccggctgtcagcgcaggggcgcccggttctttttgtcaagaccgacctgtccg
gtgccctgaatgaactgcaggacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacgggcgttccttgcgcagctgtgctcgacgttgt
cactgaagcgggaagggactggctgctattgggcgaagtgccggggcaggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagta
tccatcatggctgatgcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagc
gagcacgtactcggatggaagccggtcttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttc
gccaggctcaaggcgcgcatgcccgacggcgaggatctcgtcgtgacccatggcgatgcctgcttgccgaatatcatggtggaaaat
ggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatcaggacatagcgttggctacccgtgatattgctgaag
agcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgctttacggtatcgccgctcccgattcgcagcgcatcgccttctatcgccttcttgac
gagttcttctgagcgggactctggggttcgaaatgaccgaccaagcgacgcccaacctgccatcacgagatttcgattccaccgccgc
cttctatgaaaggttgggcttcggaatcgttttccgggacgccggctggatgatcctccagcgcggggatctcatgctggagttcttcgcc
caccccggaattcgtaatctgctgattgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaact
ctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaact
ctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactca
agacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctac
accgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagc
ggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctc
tgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaac

Vector con inserto para la línea celular HepAD38:



Secuencia del vector:

gatgataagctgtcaaacatgagaattcttgaagacgaaagggcctcgtgatacgcctatttttataggttaatgtcatgataataatggttt
cttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgag
acaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgcccttattccctttttgcggc
attttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaa
ctggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgc
ggtattatcccgtgttgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcac
agaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataacactgcggccaacttactt
ctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccgg
agctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgcagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactgg
cgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttc
cggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccct
cccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgat
taagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatcct
ttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgag
atcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaact
ctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaact

ctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactca
agacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctac
accgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagc
ggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctc
tgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgatgcgccgcgtgcggctgctg
gagatggcggacgcgatggatatgttctgccaagggttggtttgcgcattcacagttctccgcaagaattgattggctccaattcttggagt
ggtgaatccgttagcgaggtgccgccggcttccattcaggtcgaggtggcccggctccatgcaccgcgacgcaacgcggggaggc
agacaaggtatagggcggcgcctacaatccatgccaacccgttccatgtgctcgccgaggcggcataaatcgccgtgacgatcagc
ggtccagtgatcgaagttaggctggtaagagccgcgagcgatccttgaagctgtccctgatggtcgtcatctacctgcctggacagcat
ggcctgcaacgcgggcatcccgatgccgccggaagcgagaagaatcataatggggaaggccatccagcctcgcgtcgagcttttg
caaaagcctaggcctccaaaaaagcctcctcactacttctggaatagctcagaggccgaggcggcctttaccactccctatcagtgat
agagaaaagtgaaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagag
aaaagtgaaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaa
gtgaaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtga
aagtcgagctcggtacccgggtcgagtaggcgtgtacggtgggaggcctatataagcgtcgagcaccagcaccatgcaacttttcac
ctctgcctaatcatctcttgttcatgtcctactgttcaagcctccaagctgtgccttgggtggctttggggcatggacatcgacccttataaag
aatttggagctactgtggagttactctcgtttttgccttctgacttctttccttcagtacgagatcttctagataccgcctcagctctgtatcgggga
agccttagagtctcctgagcattgttcacctcaccatactgcactcaggcaagcaattctttgctgggggggaactaatgactctagctacc
tgggtgggtgttaatttggaagatccagcatctagagacctagtagtcagttatgtcaacactaatatgggcctaaagttcaggcaactct
tgtggtttcacatttcttgtctcacttttggaagagaaaccgttatagagtatttggtgtctttcggagtgtggattcgcactcctccagcttatag
accaccaaatgcccctatcctatcaacacttccggaaactactgttgttagacgacgaggcaggtcccctagaagaagaactccctcg
cctcgcagacgaaggtctcaatcgccgcgtcgcagaagatctcaatctcgggaacctcaatgttagtattccttggactcataaggtgg
ggaactttactggtctttattcttctactgtacctgtctttaatcctcattggaaaacaccatcttttcctaatatacatttacaccaagacattatc
aaaaaatgtgaacagtttgtaggcccacttacagttaatgagaaaagaagattgcaattgattatgcctgctaggttttatccaaaggtta
ccaaatatttaccattggataagggtattaaaccttattatccagaacatctagttaatcattacttccaaactagacactatttacacactct
atggaaggcgggtatattatataagagagaaacaacacatagcgcctcattttgtgggtcaccatattcttgggaacaagatctacagc
atggggcagaatctttccaccagcaatcctctgggattctttcccgaccaccagttggatccagccttcagagcaaacacagcaaatcc
agattgggacttcaatcccaacaaggacacctggccagacgccaacaaggtaggagctggagcattcgggctgggtttcaccccac
cgcacggaggccttttggggtggagccctcaggctcagggcatactacaaactttgccagcaaatccgcctcctgcctccaccaatcg
ccagacaggaaggcagcctaccccgctgtctccacctttgagaaacactcatcctcaggccatgcagtggaattccacaacctttcac
caaactctgcaagatcccagagtgagaggcctgtatttccctgctggtggctccagttcaggagcagtaaaccctgttccgactactgcc
tctcccttatcgtcaatcttctcgaggattggggaccctgcgctgaacatggagaacatcacatcaggattcctaggacccttctcgtgtt
acaggcgggggttttcttgttgacaagaatcctcacaataccgcagagtctagactcgtggtggacttctctcaattttctagggggaacta
ccgtgtgtcttggccaaaattcgcagtccccaacctccaatcactcaccaacctcctgtcctccaacttgtcctggttatcgctggatgtgtc
tgcggcgttttatcatcttcctcttcatcctgctgctatgcctcatcttcttgttggttcttctggactatcaaggtatgttgcccgtttgtcctctaatt
ccaggatcctcaaccaccagcacgggaccatgccgaacctgcatgactactgctcaaggaacctctatgtatccctcctgttgctgtac
caaaccttcggacggaaattgcacctgtattcccatcccatcatcctgggctttcggaaaattcctatgggagtgggcctcagcccgtttct
cctggctcagtttactagtgccatttgttcagtggttcgtagggctttcccccactgtttggctttcagttatatggatgatgtggtattgggggcc
aagtctgtacagcatcttgagtccctttttaccgctgttaccaattttcttttgtctttgggtatacatttaaaccctaacaaaacaaagagatg
gggttactctctgaattttatgggttatgtcattggaagttatgggtccttgccacaagaacacatcatacaaaaaatcaaagaatgttttag
aaaacttcctattaacaggcctattgattggaaagtatgtcaacgaattgtgggtcttttgggttttgctgccccatttacacaatgtggttatc
ctgcgttaatgcccttgtatgcatgtattcaatctaagcaggctttcactttctcgccaacttacaaggcctttctgtgtaaacaatacctgaa
cctttaccccgttgcccggcaacggccaggtctgtgccaagtgtttgctgacgcaacccccactggctggggcttggtcatgggccatc
agcgcgtgcgtggaacctttcggctcctctgccgatccatactgcggaactcctagccgcttgttttgctcgcagcaggtctggagcaaa
cattatcgggactgataactctgttgtcctctcccgcaaatatacatcgtatccatggctgctaggctgtgctgccaactggatcctgcgcg
ggacgtcctttgtttacgtcccgtcggcgctgaatcctgcggacgacccttctcggggtcgcttgggactctctcgtccccttctccgtctgc
cgttccgaccgaccacggggcgcacctctctttacgcggactccccgtctgtgccttctcatctgccggaccgtgtgcacttcgcttcacct
ctgcacgtcgcatggagaccaccgtgaacgcccaccgaatgttgcccaaggtcttacataagaggactcttggactctctgcaatgtca
acgaccgaccttgaggcatacttcaaagactgtttgtttaaagactgggaggagttgggggaggagattagattaaaggtctttgtacta
ggaggctgtaggcataaattggtctgcgcaccagcaccatgcaacttttcacctctgcctaatcatctcttgttcatgtcctactgttcaagc
ctccaagctgtgccttgggtggctttggggcatggacatcgacccttataaagaatttggagctactgtggagttactctcgtttttgccttctg

acttctttccttcagtacgagatccactagttctagagcggccgccaccgcggtggagcttggtaagtgaccagctacagtcggaaacc
atcagcaagcaggtatgtactctccagggtgggcctggcttccccagtcaagacccaagggatttgagggacctgtgggctcttctctta
catgtacctttgctaggtgaccttcaaaccttggcactggaagtggtaagtgaccagctacagtcggaaaccatcagcaagcaggtat
gtactctccagggtgggcctggcttccccagtcaagactccagggatttgagggacgctgtgggctcttctcttacatgtacctttgctag
gtgaccttcagaccttggcactggaggtggcccggcagaagcgcggcatcgtggatcagtgctgcaccagcatctgctctctctacca
actggagaactactgcaactaggcccaccactaccctgtccacccctctgcaatgaataaaaccctttgaaagagcactacaagttgtgt
gtacatgcgtgcgtgtgcatatgtggtgcgggggggaacatgagtggggtcggctggagtggtcgcggcttaatctatctgg

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

Hay cuatro genes conocidos codificados por el genoma, llamados C, X, P y S:

- La proteína del núcleo (core) es codificada por el gen C (HBcAg), y su codón de inicio está precedido por otro codón de inicio hacia arriba AUG de donde se sintetizan la proteína del pre-core. El procesamiento de esa proteína pre-core por proteólisis produce el antígeno HBeAg.
- La ADN polimerasa es codificada por el gen P.
- El gen S es el que codifica para el antígeno de superficie (HBsAg). El gen HBsAg es un extenso marco de lectura abierto, dentro del cual existen tres codones de inicio ATG que dividen la secuencia en tres secciones: pre-S1, pre-S2, y S. Debido a la existencia de estos múltiples codones de inicio, se producen tres polipéptidos de diferentes tamaños, llamados grandes, medianos y pequeños: pre-S1 + pre-S2 + S, pre-S2 + S, o S.
- La región X, codifica una proteína antigénica, de 154 aa, que da lugar a la aparición de anticuerpos que se encuentran en mayor proporción en los pacientes afectados de carcinoma hepático.
- El gen de la neomicina fosfotransferasa confiere resistencia al antibiótico geneticina.

c) Descripción del método utilizado para la transformación:

Fragmentación: La preparación de los fragmentos para la clonación se obtiene porPCR, digestión con enzimas de restricción y purificación mediante electroforesis en gel de agarosa.
Ligación: Consiste en la inserción del fragmento (ADN) en un vector. Para ello, el vector (que generalmente es circular) se convierte en una secuencia lineal (mediante digestión con enzimas de restricción), y se incuba con el fragmento que contiene el gen de interés en presencia del enzima ADN ligasa.
Transformación en bacterias: Los productos de la ligación se transfectan a bacterias competentes de E.coli por el método del shock térmico. Las bacterias en las cuales el vector se replica, crean colonias en placas de Petri con ampicilina. Las colonias de E.coli se prueban por la presencia del vector con el inserto a través de extracción del y PCR del vector.
Transfección a células eucariotas: El vector recombinante correcto se transfecta por lipofección en las células diana. La lipofección (o transfección de liposomas) es una técnica utilizada para inyectar material genético en una célula por medio de liposomas,

que son vesículas que se puede combinar fácilmente con la membrana de la célula, ya que están hechos de una bicapa de fosfolípidos.

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

Indicada en el apartado relativo al organismo receptor.

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

Para el vector pDolTHBV-1:

No existen elementos reguladores en el inserto.

Para el vector ptetHBV:

La expresión del inserto está bajo control del sistema Tetraciclina-on (Tet-on y su incontrario Tet-off). Este sistema hace uso del transactivador de la proteína de la tetraciclina (tTA), que se crea por la fusión de una proteína, TetR (tetraciclina represor), que se encuentra en la bacteria Escherichia coli, con el dominio de activación de otra proteína, VP16, que se encuentra en el Herpes Virus Simplex.

La proteína tTA resultante es capaz de unirse a ADN en secuencias específicas de operador TetO. En la mayoría de los sistemas Tet-Off, varias repeticiones de tales secuencias TetO se encuentran arriba de un promotor mínimo tal como el promotor CMV. La totalidad de varias secuencias de TetO con un promotor mínimo se denomina un elemento de respuesta de tetraciclina (TRE), porque responde a la unión de la proteína tTA por un aumento de la expresión del gen o genes los cuales están abajo de su promotor.

En un sistema Tet-Off, la expresión de genes controlados TRE puede ser reprimida por la tetraciclina y sus derivados. La tetraciclina y sus derivados pueden unirse al tTA y hacen que sea incapaz de unirse a secuencias TRE, evitando de ese modo la transactivación de los genes controlados por el TRE.

El sistema Tet-On funciona de manera similar, pero de la manera opuesta. Mientras que en un sistema Tet-Off, tTA es capaz de unirse al operador sólo si no está unida a la tetraciclina o uno de sus derivados, tales como doxiciclina, en un sistema Tet-On, la proteína rtTA es capaz de unirse al operador sólo si está unida a una tetraciclina. Así, la introducción de doxiciclina para el sistema inicia la transcripción del producto genético. El sistema Tet-On es a veces preferible a Tet-Off por su capacidad de respuesta más rápido.

f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

Sí.

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.

La mayoría de las funciones de las proteínas virales a estudio se conoce aunque pueden existir funciones adicionales no descritas previamente. El virus y las proteínas virales per se son objeto de estudio.

VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre? Sí.

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

El número de copias de cada uno de los genes en el vector es 1.

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

Sí.

c) ¿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 ☐

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

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

Aportar toda la documentación al respecto.

Esta información ha sido publicada en el trabajo original descrito en el Anexo 1 así como en publicaciones subsecuentes por un ámplio número de laboratorios. Se adjunta un resumen traducido de dicho manuscrito.

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

El organismo receptor no tiene modificaciones modificadas. Se trata de un genoma del virus VHB ñwild typeò

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

No.

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

El OMG se reproduce en las células HepG2.2.15. El organismo receptor se reproduce en hígados humanos. El OMG puede infectar humanos también y reproducir en sus células hepáticas. Se desconocen en detalles las características que regulan las tasas de reproducción tanto in vivo como in vitro.

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

No.

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

No.

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

No.

f) Marcadores específicos del OMG:

Los virus resultantes tienen una secuencia conocida (Anexo) que puede ser analizada mediante PCR y secuenciación, empleando para ello primers específicos. Al disponerse de DNAs completos pueden asimismo generarse sondas específicas para detectar el ADN viral mediante Southern Blot.

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

Los plásmidos utilizados y las células diana tienen una estabilidad genética alta. El virus generado a partir del ADN viral transfectado a las células HepG2.2.15 presenta una estabilidad genética alta.

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

La probabilidad es extremadamente baja, virtualmente imposible.

5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados.

a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG.

El OMG se identificará al final del proceso. Se infectarán las células de mamífero HepG2-hNTCP las cuales derivan de la línea HepG2 transducida con un vector lentiviral que expresa el polipéptido cotransportador de taurocolato sódico humano (hNTCP), que es el receptor del VHB específico para la región pre-S1. Además, se infectarán las células de mamíferoHepaRG las cuales son células hepáticas diferenciadas derivadas de una línea celular progenitora hepática humana, que conserva muchas de las características de los hepatocitos humanos primarios (Gripon P et al. PNAS 2002). En el caso del bioreactor se infectarán también células humanas primarias. En todos los casos las células se infectarán con el sobrenadante de las células HepG2.2.15 o con sueros de pacientes infectados con VHB crónicamente. En las células diana se comprobará si se han producidos viriones de VHB mediante 2 técnicas principales:

1. PCR cuantitativa a tiempo real: La determinación del cccDNA del VHB se realizará utilizando sondas y primers específicos que abarcan la región del cccDNA que contiene el ñickò en la cadena negativa y el ñgapò en la cadena positiva del rcDNA, y las condiciones qPCR descritas por Malmström S et al. (PLoS ONE 2012).
2. Southern Blot: La extracción de cccDNA se realizará según el método de Hirt para extraer ADN libre de proteínas (J Mol Biol 1967). El ADN viral se analizará según el protocolo descrito por Cai et al. (Methods Mol Biol. 2013), utilizando sondas radiactivas, específicas para detectar rcDNA y cccDNA lineal y súper enrollado.

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

El OMG no puede sobrevivir en el medio ambiente, por tanto no son necesarias.

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: 50 mL

b) Número de plantas:

c) Número de animales:

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 mínimo de 5 años desde la recepción de la autorización de la actividad confinada.

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

Producción de virus de la hepatitis B infeccioso para estudiar aspectos básicos de la infección por este patógeno humano, incluyendo los factores celulares y virales que regulan su replicación en cultivo celular.

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:

El OMG será generado en el IDIBAPS a partir de las líneas celulares HepG2.2.15 y HepAD38. Por lo tanto el OMG no procede de otro centro. Tanto las líneas celulares productoras HepG2.2.15 como las líneas celulares dianas provienen del el grupo de Hepatitis Virales del Cancer Research Center of Lyon (CRCL) que dirige el Dr. Fabien Zoulim (Lyon, Francia).
La línea celular productora HepAD38 proviene del laboratorio de Robert King (Avid Therapeutics, Inc., Philadelphia, Pennsylvania, EEUU).

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 aplicable[1] (tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado).

No se prevé el transporte de OMGs.

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):

Producción de virus infeccioso a partir de la línea celular HepG2.2.15:

Se cultivan las células HepG2.2.15 y HepAD38 en DMEM/F-12, 2% FBS y 2% DMSO y 400 ε g/ml G418 en frascos Hyperflask (Corning). Recoger el sobrenadante 2 veces por semana durante 2 o 3 semanas; filtrar y guardar a 4ºC (corto plazo) o -80ºC (largo plazo). Precipitar con 8% PEG durante 12-16h a 4ºC (Hanz O et al. J Gen Virol 2009). Centrifugar a máxima velocidad (1h a 4ºC), resuspender el pellet, alicuotar y guardar el stock de virus a -20ºC o -80ºC.

Titulación del stock de VHB:
Purificar el ADN viral con el kit QIAamp UltraSens Virus Kit (Qiagen). Hacer una batería de 3-4 diluciones (por triplicado) y cuantificar por PCR a tiempo real. Dado que el virus no se propaga en cultivo celular, no es posible titular los stocks mediante $TCID_{50}$ o FFU. Es por ello que la titulación se realiza mediante la cuantificación de los genomas de VHB (copias) en el sobrenadante.

Infección con VHB:

Diluir stock de virus a la MOI deseada en medio de cultivo + 2.5%DMSO+ 4%PEG. Infectar y transcurridas 12-16h cambiar el medio. El día 7, detener la infección y recoger células (cuantificación de cccDNA, rcDNA, pgRNA por qPCR; inmunofluorescencia de antígenos virales) y sobrenadante (cuantificación HBsAg y HBeAg
por ELISA).

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

El laboratorio de seguridad biológica contención 3 (laboratorios LSB-3) está situado en la planta -1 del edificio CEK del IDIBAPS. La entrada del laboratorio está señalizada con el símbolo universal de advertencia de riesgo biológico. El acceso a dicho laboratorio está restringido mediante control biométrico de forma que solamente se permite el acceso al personal autorizado.

[1] Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:

- Reglamento (CE) Nº 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.

La conducción de agua es independiente del resto de laboratorios del edificio CEK y en la planta -3 se dispone de un digestor donde son tratados los efluentes. Las conducciones de aire en el laboratorio LSB-3 también son independientes del resto de laboratorios del edificio CEK y la aportación de aire a la sala se realiza a través de cinco filtros y la extracción por tres filtros, en ambos casos son filtros absolutos, HEPA H13. El laboratorio está diseñado para tener una presión negativa de 25Pa entre la zona de trabajo y el pasillo y de 10Pa entre el transfer y el pasillo. La regulación del flujo y de la presión requerida es controlada a través del programa informático ñScada de climaò A su vez, este programa permite el control de la presión negativa de la sala y se activa una alarma cuándo la presión es inferior a los 10Pa negativos. El laboratorio LSB-3 está dividido en tres zonas bien diferenciadas: Zona transfer, zona de trabajo y zona de limpieza.

Los espacios entre mobiliario y equipos son accesibles para facilitar una correcta limpieza. Las superficies de trabajo son impermeables al agua, resistentes al calor moderado y a los disolventes orgánicos, ácidos y álcalis, como también a los productos desinfectantes utilizados para descontaminar superficies e instrumentos. Las cabinas de seguridad biológica están instaladas a la distancia necesaria de la puerta de entrada para evitar fluctuaciones. Se dispone de un autoclave de doble puerta, dónde serán introducidos los materiales para ser desinfectados. Para la entrada y salida de material se dispone de SAS de paso biológico y SAS de paso de puertas hinchables que permiten la esterilización con formol y UV según sea necesario. El laboratorio LSB-3 dispone de teléfono y una ventana de observación de la zona de trabajo, de manera que se pueda ver sus ocupantes así como comunicar los accidentes o incidentes que se puedan producir. Los laboratorios IDIBAPS disponen de un programa de control de insectos y ratones.

Los usuarios deberán apuntarse en el registro de acceso al laboratorio LSB-3 a la entrada y a la salida. Si el acceso se realiza en fin de semana o fuera del horario laboral el personal también debe registrarse en la recepción del centro ubicada en la planta 0 del edificio CEK para que el personal de seguridad pueda localizarlos en caso de emergencia. El número mínimo de personas en el LSB-3 será de 2 y el máximo permitido será de 4. Se admite el trabajo de una persona en solitario dentro del laboratorio LSB-3 solamente de lunes a viernes de 9:00 h a 14:00 h SIEMPRE que el trabajador haga uso del dispositivo de aviso TWIG PROTECTOR. Fuera de este horario así como en festivos y fines de semana no se permite el trabajo en solitario en los laboratorios LSB-3. La utilización de este dispositivo por parte de los estudiantes de master está totalmente prohibida.

Los usuarios deberán vestirse antes de acceder al laboratorio con los EPI requeridos: ropa de trabajo, bata, gorro, cubre zapatos, mascarilla y doble guante. El acceso se realizará a través del transfer. Las instalaciones están diseñadas para tener una presión negativa entre las diferentes habitaciones de la sección.

El primer usuario que entre en el laboratorio deberá realizar una revisión general de la sala, verificar el correcto funcionamiento de los incubadores y de los congeladores, comprobar el correcto funcionamiento del enclavamiento de las puertas y comprobar que el valor del marcador digital del interior de la sala sea superior a 20Pa negativos. Si el valor de la presión es inferior a los 10Pa negativos o suena la alarma avisar al coordinador/a de los laboratorios IDIBAPS o al personal responsable de vigilancia y control de los LSB-3.

En los laboratorios LSB-3 se seguirán las normas de seguridad biológica y los protocolos de uso de los equipos. Todos los protocolos serán de lectura obligatoria y a la vez todo el personal investigador y ajeno será formado y informado de las normas en un curso realizado

por los miembros de la Comisión de P3 de IDIBAPS. Cuando se realicen procedimientos que puedan generar aerosoles o salpicaduras se utilizaran cabinas de seguridad biológica de tipo II. Por ejemplo: después de la centrifugación, pulverización, agitación, sonicación o apertura de recipientes de materiales infecciosos donde sus presiones internas puedan ser diferentes a la presión ambiental. Se centrifugaran con tapa de seguridad cuando se utilicen concentraciones altas o volúmenes grandes de agentes infecciosos y deben abrirse en el interior de la cabina de seguridad biológica.

Los usuarios deben seguir el plan de mantenimiento de los equipos aprobado por la comisión del laboratorio LSB-3 y el Comité de Bioseguridad del IDIBAPS. Las instalaciones (climatización y electricidad) y los equipos de los LSB-3 seguirán un plan de mantenimiento anual y de verificación realizadas por empresas externas especializadas.

Cada usuario será responsable de mantener limpia la superficie de trabajo, durante y después de cada uso. Una empresa de limpieza realizará limpiezas periódicas a las instalaciones, siguiendo el protocolo establecido por la Comisión de P3 de IDIBAPS.

Todo el material sólido y líquido (pipetas, frascos, placas, tubos, etc...) que haya tenido contacto con material infeccioso se debe limpiar pasando lejía al 10% por el interior para neutralizar el agente. Una vez neutralizado se puede eliminar en el contenedor de residuos biológicos.

La descontaminación de los residuos de los LSB-3 se hará a través del autoclave de la sala y su eliminación se realizará a través de la empresa CONSENUR que realiza la recogida y gestión de los residuos químicos y sanitarios (grupo III y IV).

Cualquier derrame o incidente que provoque una sobreexposición del personal investigador a materiales infectados deberá ser comunicado al coordinador/a de los laboratorios IDIBAPS o al personal responsable de vigilancia y control de los LSB-3. Se seguirá el circuito de accidente biológico establecido y redactado por PRL de IDIBAPS.

VIII.- INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

Ninguna.

El plano de situación fue entregado en la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11.**

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

La temperatura de los laboratorios LSB-3 está controlada entre 21 y 25ºC para el buen funcionamiento de los equipos.

El laboratorio está diseñado para tener una presión negativa de 25Pa entre la zona de trabajo y el pasillo y de 10Pa entre el transfer y el pasillo.

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:

Existe una sección ubicada en la planta -1 del edificio. Está dividida en tres habitaciones:

- El transfer de personal con control de acceso con lector biométrico y doble puerta con cierre automático. A la vez, subdividido en dos habitaciones, antesala o zona limpia y zona sucia.
- Laboratorio de trabajo P3. Dónde se desarrolla las técnicas de laboratorio y equipado con los instrumentos y equipos necesarios.
- Zona de lavado. Limpieza del material de laboratorio y zona de entrada y salida de material bilógico.

Se desarrollará actividad con organismos clasificados tipo III y con organismos Tipo II con los cuales se recomienda trabajar en laboratorios de contención 3.

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 fueron las expuestas en la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11.** Se detallan apartado 10 y 12 del protocolo de funcionamiento del laboratorio LSB-3. También se adjunto **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11** el Manual de prevención de riesgos en el laboratorio, redactado por el Servicio de Prevención de Riesgos Laborales.

Dentro de las buenas prácticas de laboratorio se tendrá en cuenta los siguientes aspectos:

- Evaluación del riesgo de los agentes biológicos que se manipulen.
- Identificación con el símbolo y signo internacional de advertencia de peligro biológico.
- En el laboratorio se debe llevar ropa protectora apropiada (batas sin abertura delantera o envolventes, trajes de dos piezas de tipo pijama, monos, gorros y, si corresponde, protección para el calzado).
- Toda manipulación abierta de material potencialmente infeccioso debe realizarse dentro de una Cabina de Seguridad Biológica.
- Tener un inventario actualizado de las muestras

2) Formación del personal adscrito:

En cuanto a las normas de autoprotección, se seguirán las indicadas en el manual de formación y información de prevención de riesgos laborales para el personal de laboratorio investigador y técnico de laboratorio entregado en la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11**. Se detallan en el ANEXO 13_Actividad B_Formación y información PRL de la Actividad B

Se hace entrega de gafas de seguridad y se pone a disposición de todo el personal manuales de actuación en caso de vertidos accidentales y los siguientes equipos de trabajo de protección individual para su utilización en las distintas actividades aplicables:

- **Guantes (nitrilo) conforme EN 374:1, 2 y 3**
- **Protección respiratoria máscaras: FFP1(con carbón activo), FFP2 y FFP3**
- **Máscara completa dotada con filtro universal y material absorbente para la recogida de derrames químicos (chemizorb).**
- **Ropa de abrigo para acceder a cámaras frigoríficas y de congelación**
- **Guantes antitérmicos para la manipulación de material/equipos calientes** (autoclave)
- **Guantes para la manipulación de material frio** (muestras congeladas)
- **Guantes para la manipulación de nitrógeno líquido**
- Protección auditiva (sonicador)

El personal de nueva incorporación debe leer y aceptar ñlas normas básicas de trabajo en laboratoriosò así como asistir a una sesión informativa sobre este tema.

El personal de nueva incorporación es informado sobre el trabajo que va a realizar, técnicas que empleará, equipos de trabajo, agentes químicos, biológicos y físicos implicados en las tareas a desarrollar. Dicha información la recibe a partir del responsable científico, o del personal técnico del laboratorio al cual se va a incorporar.

3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

Viene descrito en el apartado 15 del Protocolo funcionamiento del laboratorio de seguridad biológica nivel 3 de contención entregado en la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11**.La limpieza de la sala y la limpieza y desinfección de los filtros HEPA del sistema de ventilación de la sala y de la cabinas de seguridad Biológica están detallados en el protocolo normalizado de trabajo entregado en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-1**1.ANEXO 10a_Actividad B_PNT Descontaminación filtros Hepa
Además el servicio de seguridad biológica velará por el cumplimiento de las normas de control de acceso, manipulación, descontaminación, esterilización, sanitización, etc.

También se adjunto en la notificación de instalación el protocolo interno P-011_Protocolo de limpieza de los laboratorios LSB-3, dónde se detalla las limpiezas y descontaminaciones programadas de la sala.

Para el edificio del CEK se dispone de un contrato para el control de plagas con la empresa DEPEC, contrato entregado en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-1.** ANEXO 12_Actividad B_Contrato control de plagas

4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:

El personal labmanger (responsables de vigilancia y control) es el encargado del buen funcionamiento de los laboratorios LSB-3 y del control de los aparatos, autoclave y residuos.
Se adjunto con el Protocolo funcionamiento del laboratorio de seguridad biológica nivel 3 de contención entregado en el ANEXO 6 de la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-1** las fichas de uso y mantenimiento de cada uno de los equipos y instrumentos que dispone la instalación, detallando la periocidad del mantenimiento preventivo, las validaciones y revisiones.
Los incubadores serán revisados anualmente.
La centrífuga de alta velocidad es revisada anualmente por la empresa Calservice contrato entregado en el **ANEXO 7** de la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-1**
El SAS será revisado periódicamente por personal técnico de la empresa Telstar contrato entregado en el **ANEXO 8** de la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-1**
El autoclave es revisado periódicamente por personal técnico de la empresa MATACHANA contrato entregado en el **ANEXO 9** de la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-1**
Los filtros HEPA del sistema de clima y de las cabinas de seguridad biológica se descontaminaran y se revisaran periódicamente según el protocolo entregado como **ANEXO 10** de la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-1.**

5) Programas de inspección y control del confinamiento:

El personal de mantenimiento de IDIBAPS realizará unas tareas de mantenimiento de componentes de la sala.
CUADRO DE MANDO Y PROTECCIÓN LSB-3
Se realizará una parada técnica una vez al año y se realizaran las siguientes acciones:

- Verificar la resistencia de tierra
- Reapretar los contactos eléctricos
- Comprobar la ausencia de calentamientos anormales
- Verificar intensidad y tiempo de disparo de la protecciones

- Verificar la resistencia de aislamiento de los conductores
- Limpieza de cuadro
- Revisión luminarias de emergencia
- Revisión de estado general

  CLIMATIZADORES Y EXTRACIÓN LSB-3

  Los filtros que componen els sistema de climatización tendrán el siguiente mantenimiento:
- Cada tres meses se revisarán las correas y cambiarán los prefiltros de aire.
- Cada seis meses se revisarán los filtros F7 y F9 de aire y se comprobará el funcionamiento de la válvulas de calor/frío.
- Anualmente se realizará:
  1. Limpieza de filtros de agua
  2. Revisión del aislamiento térmico
  3. Reapriete de bornes
  4. Cambio de correas

  Una empresa externa realizará la revisión y cambio de los filtros HEPA de extracción y impulsión, cada 2 y 4 años respectivamente (pendiente de contratación).

X.- GESTION E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS

1) Encargado de la gestión de residuos:

gestión interna:	SÍ	☐	NO	☐
gestión por una empresa externa:	SÍ	☒	NO	☐

Si es el caso, nombre de la empresa externa encargada de la gestión de los residuos:
La descontaminación de los residuos de los LSB-3 se hará a través del autoclave de la sala y su eliminación se realizará a través de la **empresa CONSENUR** que realiza la recogida y gestión de los residuos químicos y sanitarios (grupo III y IV). El contrato fue entregado en la Actividad B que corresponde a los indicados en el ANEXO 11de la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11.**

2) Inactivación de residuos: método, forma final, destino de cada uno de los tipos de residuos generados

Existen procedimientos sobre gestión de residuos:

Todo lo que concierne a la gestión de los residuos generados se especifica en los apartados 13 y 14 del Protocolo funcionamiento del laboratorio de seguridad biológica nivel 3 de contención entregado en la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11.**Este documento es de obligada lectura para todo el personal investigador.

o Inactivación de residuos biológicos contaminados para líquidos

El personal investigador será responsable de presentar el procedimiento de inactivación de los agentes biológicos con los que trabaja. Este procedimiento quedará reflejado el la ficha de inactivación entregados en la Actividad B que corresponde a los indicados los ANEXO 5 en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11**.

Los residuos líquidos generados en la sala (sobrenadantes de cultivos,...) serán eliminados con desinfectante Environ Vesphene a una dilución 1/34, en el contenedor de residuo líquido que se ubicará en el interior de la cabina. Se llenará de residuo hasta un 75% de si capacidad, una vez lleno se cerrará

correctamente y se pondrá dentro del contenedor negro de 30l. Una vez el contenedor esté lleno se pasará por el SAS y será tratado como un residuo biológico. El desinfectante utilizado a la concentración indicada elimina a todo tipo de agentes infecciosos.

El centro dispone de un digestor (autoclave a 150ºC) para poder inactivar los efluentes de las picas de la sala de lavado y ducha.

o Autoclave para sólidos y sólidos y líquidos

Todo el material sólido y líquido (pipetas, frascos, placas, tubos, etc...) que haya tenido contacto con material infeccioso se debe limpiar pasando lejía al 10% por el interior para neutralizar el agente. Una vez neutralizado la descontaminación de los residuos de los LSB-3 se hará a través del autoclave de la sala y su eliminación se realizará a través de la empresa CONSENUR .

o La gestión de residuos se realiza con gestores autorizados.

La descontaminación de los residuos de los LSB-3 se hará a través del autoclave de la sala y su eliminación se realizará a través de la **empresa CONSENUR** que realiza la recogida y gestión de los residuos químicos y sanitarios (grupo III y IV). El contrato fue entregado en la Actividad B que corresponde a los indicados en el ANEXO 11 de la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11.**

o Se adjuntan procedimientos (gestión interna y gestión externa).

Todo lo que concierne a la gestión de los residuos generados se especifica en los apartados 13 y 14 del Protocolo funcionamiento del laboratorio de seguridad biológica nivel 3 de contención entregado en la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11.**Este documento es de obligada lectura para todo el personal investigador.

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

1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Tipo de incidencia	Análisis/observaciones
Intrusión.	El acceso al laboratorio LSB-3 es restringido, de modo que sólo puede acceder personal autorizado mediante sistema de huella digital.
Derrame de material biológico	Durante el derrame es factible que se generen aerosoles y salpicaduras pudiendo afectar directamente a los trabajadores del laboratorio LSB-3. Las probabilidades de que se produzca esta incidencia fuera de las cabinas de seguridad biológica es menor ya que fuera de estas no debe trabajarse con material en abierto.

Emisión de agentes biológicos	**Interior área de contención**	La probabilidad de que se produzca esta incidencia fuera de las cabinas de seguridad biológica es baja ya que fuera de estas no debe trabajarse con material en abierto. Esta incidencia se podría producir en caso de fallo en el funcionamiento de una cabina de seguridad biológica o de un derrame de material infeccioso fuera de cabina (incidencia ya analizada).
	Exterior área de contención	La probabilidad de que se produzca esta incidencia es todavía más baja; esta incidencia se podría producir como concatenación de las incidencias anteriores sumadas al fallo de sendos ventiladores de extracción, conectados en paralelo, del laboratorio LSB-3, perdiéndose los niveles de depresión en el laboratorio respecto del exterior.
Accidente	**Accidente biológico**	Se entiende accidente con riesgo biológico como aquel en el que se ha producido un contacto con un agente biológico, ya sea de forma percutánea o a través de mucosas: - Percutánea: pinchazos, cortes o contacto con piel no intacta. - A través de mucosas: salpicaduras. - Contacto / inhalación de aerosoles.
	Accidente no biológico.	Se entiende como tal, toda lesión no definida como accidente biológico.
Derrame de productos químicos.		Las sustancias empleadas en los laboratorios LSB-3 son alícuotas de p-formaldehído, glutaraldehído y algunas soluciones de MgCl2 y NaCl. Los volúmenes de los recipientes que las contienen son de 50 ml máximo
Incendio y otro tipo de emergencias que puedan ocasionar daños estructurales en los laboratorios LSB-3(terremotos, explosiones)		En los laboratorios LSB-3 se estima una carga térmica de fuego baja. Principalmente, un inicio de un incendio puede deberse a un fallo eléctrico de la instalación o como consecuencia de una técnica con llama abierta. En los laboratorios LSB-3 hay un autoclave de vapor (equipo a presión).
Tipo de incidencia		**Recursos previstos**
Intrusión.		El acceso al laboratorios LSB-3 es restringido de modo que sólo puede acceder personal autorizado mediante sistema de huella digital. El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.
Derrame de material biológico		Deberá disponerse del siguiente material para la recogida del derrame, sin perjuicio de otros equipos de protección personal especificados en los procedimientos de trabajo: - Desinfectante de eficacia probada y activa según el tipo de agente infeccioso. - Guantes conforme EN 374: 1, 2 y 3. - Guantes anticorte (en caso de rotura de material de vidrio). - Gafas de seguridad EN 166 con montura integral. - Mascarilla FFP3.

	- Bata desechable. - Protección desechable de calzado. El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.
Emisión de agentes biológicos	La instalación dispone de: - Aviso acústico por flujo demasiado bajo o demasiado alto en las cabinas de seguridad biológica (Nuaire NU-437-400E). - Aviso acústico por pérdida de nivel de depresión negativa requerido en el interior del laboratorio LSB-3. El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.
Accidente	La antecámara dispone de un lavaojos y una ducha de emergencia. En la antecámara hay un botiquín con material básico para primeros auxilios. El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.
Derrame de productos químicos.	Deberá disponerse del siguiente material para la atención del derrame: - Absorbedor inerte. - Guantes conforme EN 374:1, 2 y 3. - Gafas de seguridad EN 166. - Máscara de protección respiratoria con filtro universal, en su grado de protección más alto (A2B2E2K1P3). El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.
Incendio y otro tipo de emergencias que puedan ocasionar daños estructurales en el Laboratorios LSB-3(terremotos, explosiones)	En área de laboratorio y en antecámara hay instalados detectores de humo conectados a la central de alarmas del edificio. En el caso de ser precisa una evacuación rápida del laboratorio, en función de la gravedad de la emergencia y la capacidad para contenerla, en la salida del los laboratorios LSB-3 hay un pulsador tipo ñsetaò que permite anular el bloqueo de las puertas de laboratorio y antecámara. Igualmente, en el pasillo a la entrada de la antecámara hay otro pulsador tipo ñsetaò que para ser activado requiere de desbloqueo mediante llave en posesión del personal de Mantenimiento y de Seguridad del edificio CEK. En la antecámara de los laboratorios LSB-3 se dispone de un extintor portátil de anhídrido carbónico. Se desaconseja el uso de otro agente extintor (polvo, agua). El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento. El personal autorizado para la entrada en los laboratorios LSB-3 contará con conocimientos básicos en el uso del extintor portátil impartidos dentro de la formación específica para trabajar en dicho laboratorio.

2) Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Todo lo que concierne a los equipos de seguridad, barreras primarias y secundarias de los LSB-3 es detallado en el apartado 12 del Protocolo funcionamiento del laboratorio de seguridad biológica nivel 3 de contención entregado en la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11**. Este documento es de obligada lectura para todo el personal investigador.

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

En el protocolo de funcionamiento de los laboratorios LSB-3 entregado en la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11** se incluye el apartado 17 donde se establecen los siguientes apartados:

- Análisis de incidencias, donde se refleja los tipos de emergencias que se ha considerado pueden ocurrir en el laboratorio.
- Recursos materiales y humanos precisos para hacer frente a las incidencias.
- Protocolos de actuación por parte del personal del laboratorio y personal de los equipos de emergencia del edificio en función de las emergencias que se han analizado.
- Implantación, fundamentada en que el personal autorizado para trabajar en el laboratorio es conocedor del contenido dicho capítulo.

También con el protocolo de funcionamiento del laboratorios LSB-3 se adjunta el Manual de prevención de riesgos en el laboratorio, redactado por el Servicio de Prevención de Riesgos Laborales también entregado en la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11** .

4) Planes de emergencia:

En la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11** se adjunto el protocolo interno de los laboratorios IDIBAPS P-008_Protocolo de actuación en caso de emergencia en LSB-3 y evacuación del edificio y Manual de Prevención donde se describen los planes de emergencia del edificio CEK en caso de derrame químico o biológico, accidente laboral y evacuación del edificio.

PARTE C

EVALUACIÓN DE RIESGO DE ACTIVIDADES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE ORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE

Barcelona, 5 de julio del 2016

Nº de Registro:	**Nº de Notificación:**

Cumplimentar un formulario tipo C por cada actividad tipo 2, 3 o 4. En caso de actividades tipo 1, deben seguirse las instrucciones recogidas en el apartado III.1.a de la Guía para la remisión de solicitudes de registro de instalaciones.

I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD

b) Entidad: Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)
Dirección postal: Rossellón 149-153
08036 Barcelona
NIF: Q5856414G

c) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Rosa Vilavella Gasull
NIF:40287781S
Cargo: Apoderada
Tel: 93.227.18.42
Fax: 933129403
Correo electrónico: vilavella@clinic.cat

d) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Sofía Pérez del Pulgar Gallart
NIF: 46731316P
Cargo: Científica Senior
Tel: 932275400, ext. 2093
Fax: 933129405
Correo electrónico: sofiapp@clinic.cat

e) Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad

Nombre y apellidos: Sandra Piquer Gibert
NIF: 38098454N
Cargo: Coordinadora laboratorios IDIBAPS
Tel: 93.227.54.00 (ext.4388)
Fax: 933129405
Correo electrónico: sandra.piquer@idibaps.org

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

Nombre y apellidos: Sandra Piquer Gibert
NIF: 38098454N
Cargo: Coordinadora laboratorios IDIBAPS
Tel: 93.227.54.00 (ext.4388)
Fax: 933129405
Correo electrónico: sandra.piquer@idibaps.org

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD.

1. Objetivo de la actividad:

Producción de virus de la hepatitis B infeccioso para estudiar aspectos básicos de la infección por este patógeno humano, incluyendo los factores celulares y virales que regulan su replicación en cultivo celular.

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 mínimo de 5 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.

Virus de la hepatitis B (VHB).

b) Organismo donante.

i. Virus de la hepatitis B (VHB).
ii. Escherichia coli (E. coli) , strain K12

c) Inserto.

i. 2 copias del virus VHB.
ii. El gen de la neomicina fosfotrasferasa.

d) Vector.

pBR322

e) Organismo modificado genéticamente resultante.

El virus de la hepatitis B.

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

El VHB (anteriorment està lâabreviació) es un patógeno que infecta exclusivamente a humanos y, experimentalmente, a chimpancés a través de la inoculación de material biológico contaminado (principalmente sangre y hemoderivados). No existe zoonosis alguna y el virus se transmite por las siguientes vías:

Å Contacto directo de sangre a sangre
Å Relaciones sexuales sin protección
Å Agujas sin esterilizar
Å De una mujer infectada a su bebé durante el proceso de parto.

La infección crónica por el VH B causa una inflamación hepática crónica de desemboca en fibrosis, cirrosis y, en un fracción importante de los infectados, en carcinoma hepatocelular. Aunque desde 1982 se dispone de una vacuna eficaz para prevenir la infección por el VHB, no existe una cura definitiva contra la hepatitis crónica B. La terapia antiviral actual se basa en el tratamiento inmunomodulador con interferón y en el uso de análogos de nucleós(t)idos (NUCs), como entecavir y tenofovir. El interferón induce una serie de ISG (genes estimulados por interferón) que modifican el epigenoma del cccDNA (ADN circular covalentemente cerrado), controlan la replicación viral y activan a las células NK. Los NUCs actúan como antivirales directos sobre la replicación viral, inhibiendo la transcripción reversa del pgRNA (ARN pregenómico) a rcDNA (ADN circular relajado).

g) Efectos para el medio ambiente.

El VHB no está implicado en procesos ambientales como la fijación de nitrógeno, y la regulación del pH de suelo,. En cuanto a interacciones con otros organismos, los pacientes crónicos infectados con VHB pueden infectarse por el virus de la hepatitis D (VHD). El virus de la VHD es un virus del género deltavirus. Consta de una molécula de ARN circular de pequeño tamaño, con información necesaria para la replicación pero no para otras propiedades. Por ello, necesita que exista una infección de VHB en la misma célula para poder empaquetarse en su envoltura y propagarse. El VHD no es considerado un verdadero virus, sino una partícula subviral llamada ARN satélite o virusoide. Las vías de transmisión del VHD son: parenteral, sexual y vertical (similares al VHB). El tratamiento contra el VHD actualmente se realiza mediante la administración de interferón alfa a altas dosis durante, al menos, doce meses. La prevención viene dada por la

administración previa de la vacuna del VHB, ya que con ello se logra que no haya VHB y, por tanto, no se pueda replicar el VHD.

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	☐
Tipo 2	☐
Tipo 3	☒
Tipo 4	☐

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).

Se cultivan las células HepG2.2.15 y HepAD38 en DMEM, 2% FBS y 2% DMSO en frascos Hyperflask (Corning). Recoger el sobrenadante 2 veces por semana durante 2 o 3 semanas; filtrar y guardar a 4ºC (corto plazo) o -80ºC (largo plazo). Precipitar con 8% PEG durante 12-16h a 4ºC (Hanz O et al. J Gen Virol 2009). Centrifugar a máxima velocidad (1h a 4ºC), resuspender el pellet, alicuotar y guardar el stock de virus a -20ºC o -80ºC.
Todas las actividades se realizarán en el interior de la cabina de bioseguridad de clase II tipo A2. En ningún caso se abrirán los tubos con sobrenadantes fuera de la cabina de bioseguridad.

b) Concentración y escala utilizadas.

El VHB no se propaga en cultivo celular y por tanto no es posible titular los stocks mediante $TCID_{50}$ o FFU (ñtissue culture infectious dose 50ò o ñfocus forming unitsò). El ADN viral se purifica con el kit QIAamp UltraSens Virus Kit (Qiagen). Se hace una batería de 3-4 diluciones (por triplicado) y se cuantifica por PCR a tiempo real. El volumen de sobrenatante que se utiliza es de 50 mL y se concentra por centrifugación a 4ºC).

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 VHB en cultivo celular sólo infecta a la línea celular HepG2-hNTCP (derivada de la línea HepG2 transducida con un vector lentiviral que expresa el polipéptido cotransportador de taurocolato sódico humano (hNTCP), que es el receptor del VHB

específico para la región pre-S1), a la línea celular HepaRG (células hepáticas diferenciadas derivadas de una línea celular progenitora hepática humana, que conserva muchas de las características de los hepatocitos humanos primarios) y a los hepatocitos primarios.
La supervivencia fuera de las condiciones del cultivo celular es muy baja. Cabe destacar que el VHB no se encuentra en el medio ambiente, sólo se transmite por contacto sanguíneo, por la vía sexual, por las agujas sin esterilizar y por la madre al feto, y su replicación está prácticamente restringida a células hepáticas y algunas líneas celulares derivadas de hepatoma.

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

El VHB ha sido clasificado como agente biológico del grupo 3(*)D. No obstante la Directiva 2000/54/CE también indica que el riesgo de infección se encuentra
limitado al personal expuesto puesto que no son infecciosos a través de aerosol. Por ello, su manejo debe quedar restringido al laboratorio de bioseguridad de nivel 3.

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.)

La situación del edificio CEK dónde se encuentran los laboratorios IDIBAPS está descrita en el Plano de situación entregado en la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11.**

El laboratorio de seguridad biológica contención 3 (laboratorios LSB-3) está situado en la planta -1 del edificio CEK del IDIBAPS. La entrada del laboratorio está señalizada con el símbolo universal de advertencia de riesgo biológico.

La conducción de agua es independiente del resto de laboratorios del edificio CEK y en la planta -3 se dispone de un digestor donde son tratados los efluentes.
Las conducciones de aire en el laboratorio LSB-3 también son independientes del resto de laboratorios del edificio CEK y la aportación de aire a la sala se realiza a través de cinco filtros y la extracción por tres filtros, en ambos casos son filtros absolutos, HEPA H13. El laboratorio está diseñado para tener una presión negativa de 25Pa entre la zona de trabajo y el pasillo, y de 10Pa entre el transfer y el pasillo.
La regulación del flujo y de la presión requerida es controlada a través del programa informático ñScada de climaò A su vez, este programa permite el control de la presión negativa de la sala y se activa una alarma cuándo la presión es inferior a los 10Pa negativos.
La temperatura de los laboratorios LSB-3 está controlada entre 21 y 25ºC para el buen funcionamiento de los equipos.

b) Condiciones en las que podría producirse un accidente.

Tipo de incidencia	Análisis/observaciones

Intrusión.		El acceso al laboratorio LSB-3 es restringido, de modo que sólo puede acceder personal autorizado mediante sistema de huella digital.
Derrame de material biológico		Durante el derrame es factible que se generen aerosoles y salpicaduras pudiendo afectar directamente a los trabajadores del laboratorio LSB-3. Las probabilidades de que se produzca esta incidencia fuera de las cabinas de seguridad biológica es menor ya que fuera de estas no debe trabajarse con material en abierto.
Emisión de agentes biológicos	**Interior área de contención**	La probabilidad de que se produzca esta incidencia fuera de las cabinas de seguridad biológica es baja ya que fuera de estas no debe trabajarse con material en abierto. Esta incidencia se podría producir en caso de fallo en el funcionamiento de una cabina de seguridad biológica o de un derrame de material infeccioso fuera de cabina (incidencia ya analizada).
	Exterior área de contención	La probabilidad de que se produzca esta incidencia es todavía más baja; esta incidencia se podría producir como concatenación de las incidencias anteriores sumadas al fallo de sendos ventiladores de extracción, conectados en paralelo, del laboratorio LSB-3, perdiéndose los niveles de depresión en el laboratorio respecto del exterior.
Accidente	**Accidente biológico**	Se entiende accidente con riesgo biológico como aquel en el que se ha producido un contacto con un agente biológico, ya sea de forma percutánea o a través de mucosas: - Percutánea: pinchazos, cortes o contacto con piel no intacta. - A través de mucosas: salpicaduras. - Contacto / inhalación de aerosoles.
	Accidente no biológico.	Se entiende como tal, toda lesión no definida como accidente biológico.
Derrame de productos químicos.		Las sustancias empleadas en los laboratorios LSB-3 son alícuotas de p-formaldehído, glutaraldehído y algunas soluciones de MgCl2 y NaCl. Los volúmenes de los recipientes que las contienen son de 50 ml máximo
Incendio y otro tipo de emergencias que puedan ocasionar daños estructurales en los laboratorios LSB-3(terremotos, explosiones)		En los laboratorios LSB-3 se estima una carga térmica de fuego baja. Principalmente, un inicio de un incendio puede deberse a un fallo eléctrico de la instalación o como consecuencia de una técnica con llama abierta. En los laboratorios LSB-3 hay un autoclave de vapor (equipo a presión).

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

Tipo de incidencia	Recursos previstos
Intrusión.	El acceso al laboratorio LSB-3 es restringido de modo que sólo puede acceder personal autorizado mediante sistema de huella

	digital. El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.
Derrame de material biológico	Deberá disponerse del siguiente material para la recogida del derrame, sin perjuicio de otros equipos de protección personal especificados en los procedimientos de trabajo: - Desinfectante de eficacia probada y activa según el tipo de agente infeccioso. - Guantes EN 374:1,2 y 3. - Guantes anticorte (en caso de rotura de material de vidrio). - Gafas de seguridad EN 166 con montura integral. - Mascarilla FFP3. - Bata desechable. - Protección desechable de calzado. El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.
Emisión de agentes biológicos	La instalación dispone de: - Aviso acústico por flujo demasiado bajo o demasiado alto en las cabinas de seguridad biológica (Nuaire NU-437-400E). - Aviso acústico por pérdida de nivel de depresión negativa requerido en el interior del laboratorio LSB-3. El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.
Accidente	La antecámara dispone de un lavaojos y una ducha de emergencia. En la antecámara hay un botiquín con material básico para primeros auxilios. El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.
Derrame de productos químicos.	Deberá disponerse del siguiente material para la atención del derrame: - Absorbedor inerte. - Guantes conforme EN 374:1, 2 y 3. - Gafas de seguridad EN 166. - Máscara de protección respiratoria con filtro universal, en su grado de protección más alto (A2B2E2K1P3). El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.
Incendio y otro tipo de emergencias que puedan ocasionar daños estructurales en el Laboratorios LSB-3(terremotos, explosiones)	En área de laboratorio y en antecámara hay instalados detectores de humo conectados a la central de alarmas del edificio. En el caso de ser precisa una evacuación rápida del laboratorio, en función de la gravedad de la emergencia y la capacidad para contenerla, en la salida del los laboratorios LSB-3 hay un pulsador tipo ñsetaò que permite anular el bloqueo de las puertas de laboratorio y antecámara. Igualmente, en el pasillo a la entrada de la antecámara hay otro pulsador tipo ñsetaò que para ser activado requiere de desbloqueo mediante llave en posesión del personal de Mantenimiento y de Seguridad del edificio CEK. En la antecámara de los laboratorios LSB-3 se dispone de un extintor portátil de anhídrido carbónico. Se desaconseja el uso de

	otro agente extintor (polvo, agua). El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento. El personal autorizado para la entrada en los laboratorios LSB-3 contará con conocimientos básicos en el uso del extintor portátil impartidos dentro de la formación específica para trabajar en dicho laboratorio.

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

Los laboratorios IDIBAPS disponen de un protocolo de actuación en caso de emergencia en LSB-3 y evacuación del edificio, y Manual de Prevención y corresponden a los indicados en la notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11. En ellos se describen los planes de emergencia del edificio CEK en caso de derrame químico o biológico, accidente laboral y evacuación del edificio.

Barcelona, 5 de julio de 2016