

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 253**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/00** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2015 PCT/EP2015/063812**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2015 WO15193472**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2015 E 15732188 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 3158060**

54 Título: **Método para la generación rápida de un virus de ARN infeccioso**

30 Prioridad:

**20.06.2014 EP 14305955**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**20.06.2019**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE (50.0%)**

**58, boulevard Charles Livon**

**13007 Marseille, FR y**

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**AUBRY, FABIEN;**

**NOUGAIREDE, ANTOINE;**

**QUÉRAT, GILLES;**

**DE LAMBALLERIE, XAVIER;**

**GOULD, ERNEST ANDREW y**

**DE FABRITUS, LAURIANE**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 717 253 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Método para la generación rápida de un virus de ARN infeccioso

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un método para la generación rápida de un virus de ARN infeccioso que elimina completamente la necesidad de construir un ADNc de longitud completa, clonando y propagando dicho ADNc de longitud completa.

10 **Estado de la técnica**

El desarrollo de métodos moleculares que permiten la producción de virus infecciosos a partir de copias de ADN de sus genomas, ha mejorado significativamente nuestro conocimiento sobre los ciclos de vida y la patogénesis de los virus de ARN, al permitir el desarrollo de la "genética inversa", es decir, estudios sobre el impacto de mutaciones específicas en las propiedades biológicas de los virus.

15 Sin embargo, las metodologías actuales para la construcción de clones de ADNc infecciosos son procesos impredecibles y laboriosos frecuentemente asociados con mutaciones no deseadas o clones inestables/tóxicos en bacterias.

20 Esto ha generado gran interés en métodos alternativos para generar virus de ARN. Se han propuesto varias mejoras metodológicas, tales como el uso de hospedadores alternativos, plásmidos de bajo número de copias, vectores cósmidos, cromosomas bacterianos artificiales, promotores modificados o secuencias modificadas de genomas víricos con actividad promotora bacteriana críptica reducida.

También se desarrollaron estrategias sin bacterias, por ejemplo, por Gritsun y Gould en 1995, con el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV, acrónimo del inglés *Virus Tick-Borne Encephalitis*) y por Edmonds et al. y Siridechadilok et al., con el virus del Nilo Occidental (WNV, *West Nile Virus*) y el virus del dengue (DENV, *Dengue Virus*), respectivamente, en el año 2013.

Aunque representaron avances significativos, estos métodos requieren una optimización sustancial para cada virus estudiado y no proporcionan un proceso metodológico unificado.

35 Por lo tanto, existe una necesidad no satisfecha de un método alternativo para generar un virus de ARN infeccioso, que sea eficaz, preciso e inmediato.

**Objeto de la invención**

40 Los inventores han demostrado que los fragmentos de ADNc solapantes, cubriendo cada uno de ellos una parte del genoma de un virus de ARN, pueden dar lugar a un virus de replicación sin el uso de un ADNc de longitud completa o un plásmido o un vector que comprenda dicho ADNc de longitud completa.

45 Por tanto, los inventores ponen en claro, que los fragmentos de ADN bicatenario solapantes, cubriendo cada uno de ellos una parte del genoma vírico, permiten la recombinación y la síntesis espontánea de una copia de ADN del genoma vírico completo *in cellulo*.

En consecuencia, **en un primer aspecto**, la invención se refiere a un método para generar un virus de ARN infeccioso que comprende las siguientes etapas:

- 50 a) la introducción de un promotor de la ARN polimerasa dependiente de ADN en la posición 5' y, opcionalmente, de una secuencia de terminación y de poliadenilación de ARN en la posición 3' del genoma completo de un virus de ARN;
- 55 b) la amplificación del genoma vírico completo preparado en la etapa a) que incluye dicho promotor y, opcionalmente, dicha secuencia de terminación y de poliadenilación de ARN, en al menos 2, preferentemente al menos 3, 4, 5 o 6 fragmentos de ADNc solapantes;
- c) la transfección de dichos fragmentos de ADNc en una célula hospedadora;
- d) la incubación de la célula hospedadora de la etapa c); y
- 60 e) la recuperación del virus de ARN infeccioso de dicha célula hospedadora incubada,

en donde dicho virus es un virus de ARN monocatenario positivo.

**En un segundo aspecto**, la invención concierne al uso del método para generar un virus de ARN infeccioso como se desvela en el presente documento, y/o del virus de ARN obtenido de acuerdo con dicho método, para el análisis genético inverso.

**En un tercer aspecto**, la invención se refiere al uso del método para generar un virus de ARN infeccioso como se desvela en el presente documento, y/o del virus de ARN obtenido de acuerdo con dicho método, para el envío seguro y eficaz de dicho virus de ARN infeccioso.

## 5 Descripción detallada de la invención

Los inventores descubrieron que, los fragmentos de ADN bicatenario solapantes, cubriendo cada uno de ellos una parte del genoma vírico, permiten la recombinación y la síntesis espontánea de una copia de ADN del genoma vírico completo después de la transfección. Basándose en este sorprendente descubrimiento, los inventores desarrollaron una nueva estrategia para generar un virus de ARN infeccioso que no requiere la clonación y propagación de un ADNc de longitud completa en bacterias.

**En un primer aspecto**, la invención se refiere por tanto a un método para generar un virus de ARN infeccioso que comprende las siguientes etapas:

- a) la introducción de un promotor de la ARN polimerasa dependiente de ADN en la posición 5' y, opcionalmente, de una secuencia de terminación y de poliadenilación de ARN en la posición 3' del genoma completo de un virus de ARN;
- b) la amplificación del genoma vírico completo preparado en la etapa a) que incluye dicho promotor y, opcionalmente, dicha secuencia de terminación y de poliadenilación de ARN, en al menos 2, preferentemente al menos 3, 4, 5 o 6 fragmentos de ADNc solapantes;
- c) la transfección de dichos fragmentos de ADNc en una célula hospedadora;
- d) la incubación de la célula hospedadora de la etapa c); y
- e) la recuperación del virus de ARN infeccioso de dicha célula hospedadora incubada, en donde dicho virus es un virus de ARN monocatenario positivo.

Basándose en sus exhaustivas investigaciones, los inventores superaron un prejuicio técnico desarrollando un método que exonera de:

- construir un ADNc de longitud completa, que cubra el genoma vírico completo; y/o
- utilizar un plásmido o un vector que comprenda dicho ADNc de longitud completa; y/o
- tener que reconstruir el ADNc de longitud completa o el genoma vírico completo antes de la transfección en una célula hospedadora; y/o
- modificar el genoma vírico, tal como la incorporación de un sitio de enzimas de restricción o de recombinación no natural; y/o
- utilizar virus auxiliares u otras proteínas víricas.

El método de la invención, denominado también método de "amplicones subgenómicos infecciosos" o "**ISA**", acrónimo del inglés *Infectious Subgenomic Amplicons*, es, por tanto, un procedimiento muy sencillo capaz de acelerar la producción de virus de ARN infecciosos en cuestión de días, con perfecto control de las secuencias víricas y a partir de una variedad de fuentes iniciales que incluyen clones infecciosos preexistentes, secuencias genómicas de ARN vírico o de ADN sintetizadas *de novo*. A diferencia de las otras estrategias que requieren bacterias, desveladas en la técnica anterior, el método de la invención no requiere ninguna etapa adicional junto a la preparación de fragmentos de ADNc. El ensamblaje de la construcción no se realiza *in vitro* mediante el ensamblaje de Gibson o la clonación por extensión de la polimerasa circular antes de la transfección, sino mediante un proceso de recombinación que tiene lugar directamente *in cellulo*, lo que facilita y reduce enormemente la metodología.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "**generación de virus de ARN infecciosos**" se refiere a la producción de un virus de ARN, en una forma de tipo silvestre o modificada genéticamente, de acuerdo con el método de la invención. La expresión "virus infeccioso", se refiere a un virus que tiene la capacidad de reproducirse, es decir, que es capaz de amplificar el genoma vírico en una célula hospedadora, empaquetar el genoma vírico en una célula y/o liberar partículas víricas infecciosas de una célula. Cabe destacar que un virus puede ser patógeno o no patógeno y aún así, ser infeccioso. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "sitio de recombinación no natural" se refiere a secuencias que permiten la recombinación específica de sitio que puede ilustrarse mediante los sistemas de recombinación Cre-Lox o FLP-FRT. Sitio de enzimas de restricción se refiere a secuencias que permiten el corte específico de sitio de ADN bicatenario mediante enzimas de restricción que pueden ilustrarse con las endonucleasas NotI o AluI.

El virus de ARN infeccioso que el método pretende generar (también denominado "virus diana" en este documento) es un virus de ARN monocatenario positivo. Más preferentemente, dicho virus se selecciona del grupo que consiste en flavivirus, alfavirus y enterovirus.

Una lista no limitativa de flavivirus comprende virus del dengue (DENV), virus de la fiebre amarilla(YFV), virus de la encefalitis de St. Louis (SLEV), virus de la encefalitis japonesa (JEV), virus de la encefalitis del valle del Murray (MVEV), virus del Nilo Occidental (WNV), virus Rocio (ROCV), virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV), virus de la fiebre hemorrágica de Omsk (OMSKV), virus de la enfermedad del bosque de Kyasanur (KFDV),

virus Powassan (POWV). Preferentemente, dicho flavivirus se selecciona del grupo que consiste en:

- virus de la encefalitis japonesa (JEV); tal como una cepa de genotipo I (JEV I) o una cepa de genotipo III (JEV III),
  - 5 - virus del Nilo Occidental(WNV), tal como una cepa de genotipo 2;
  - virus del Dengue (DENV), tal como una cepa de serotipo 4;
  - virus de la fiebre amarilla(YFV), tal como una cepa de tipo silvestre de América del Sur; y
  - virus de la encefalitis transmitida por garrapatas(TBEV), tal como una cepa de subtipo del Lejano Oriente.
- 10 Más preferentemente, dicho flavivirus es el virus del dengue.

Una lista no limitativa de alfavirus comprende el virus de Chikungunya (CHIK), virus de la encefalitis equina del este (EEE), virus de la encefalitis equina occidental, virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), virus Mayaro (MAY), virus O'nyong'nyong (ONN), virus Sindbis, virus del bosque de Semliki, virus del bosque de Barmah, virus del río Ross, virus Una, virus Tonate. Preferentemente, dicho alfavirus es el virus Chikungunya.

Una lista no limitante de enterovirus comprende virus de Coxsackie, Echovirus, Poliovirus y Rinovirus. Preferentemente, dicho enterovirus es el virus de Coxsackie, más preferentemente, el virus de Coxsackie B.

20 El método de la invención comprende una etapa a) de introducción de un promotor de la ARN polimerasa dependiente de ADN en la posición 5' del genoma completo de un virus de ARN. Opcionalmente, dicha etapa a) comprende adicionalmente la introducción de una secuencia de terminación y de poliadenilación de ARN en la posición 3' del genoma completo de un virus de ARN.

25 Cabe destacar que cuando el genoma del virus diana está poliadenilado, tal como el genoma de alfavirus, la etapa a) es una etapa de introducción de un promotor de la ARN polimerasa dependiente de ADN en la posición 5' y de una secuencia de terminación y de poliadenilación de ARN en la posición 3' del genoma completo de un virus de ARN.

30 Incluyendo en el extremo 5' del primer fragmento de ADNc, un promotor de la ARN polimerasa dependiente de ADN, y en el extremo 3' del último fragmento de ADNc, una secuencia de ribozima y una secuencia señal para la poliadenilación del ARN, los fragmentos de ADNc se transcriben como un genoma de ARN de longitud completa con auténticos extremos 5' y 3'.

35 Preferentemente, dicho promotor de la ARN polimerasa dependiente de ADN en posición 5' es el promotor de citomegalovirus humano (pCMV), como se representa en la SEQ ID No 1. Preferentemente, dicha secuencia de terminación y de poliadenilación de ARN es, respectivamente, la ribozima delta de la hepatitis y la señal de poliadenilación del virus de simio 40 (HDR/SV40pA). La secuencia de HDR/SV40pA se proporciona en la SEQ ID No: 2.

40 En consecuencia, la etapa a) proporciona generar el genoma vírico completo del virus de ARN infeccioso, flanqueado respectivamente en los extremos 5' y 3' con el promotor del citomegalovirus humano (pCMV) (SEQ ID No: 1) y la ribozima delta de la hepatitis seguido de la señal de poliadenilación del virus de simio 40 (HDR/SV40pA) (SEQ ID No: 2).

45 El método de la invención comprende una **etapa b)** de amplificación del genoma vírico completo en varios fragmentos de ADNc solapantes.

En la etapa b), el genoma vírico completo corresponde al genoma vírico completo preparado en la etapa a), es decir, que incluye dicho promotor y, opcionalmente, dicha secuencia de terminación y de poliadenilación de ARN.

50 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "**fragmentos de ADNc solapantes**", "**fragmentos de ADNc**", también denominados "**amplicones**" o "**fragmentos subgenómicos de ADN**" o "**amplicones subgenómicos**", son fragmentos de ADN bicatenario que cubren solo una parte del genoma vírico de un virus de ARN. Dichos fragmentos corresponden a "**fragmentos subgenómicos**". Los inventores explicaron que, cuando dichos fragmentos se transfectan en el interior de una célula, sorprendentemente se recombinan de manera espontánea *in cellulo* para reconstituir el genoma vírico completo. Dicha recombinación se produce incluso si el genoma vírico no está modificado genéticamente para incorporar un sitio de recombinación adicional y no natural. En otras palabras, dicha recombinación se produce con genomas víricos de tipo silvestre.

60 Los fragmentos de ADNc de acuerdo con la invención incluyen:

- fragmentos de DNA obtenidos por amplificación, por ejemplo, mediante PCR; así como
- fragmentos de DNA obtenidos *de novo*.

65 Normalmente, Dichos fragmentos de ADNc pueden ser infecciosos o no infecciosos.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión **"ADNc de longitud completa"**, se refiere a un ADN que comprende el genoma vírico completo de un virus en una sola pieza.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión **"fragmento de ADNc que cubre una parte del genoma vírico completo"**, Se refiere a un fragmento de ADN que comprende una parte del genoma vírico completo. Normalmente, los fragmentos de ADNc de acuerdo con la invención se recombinan de manera espontánea en las células después de la transfección, para constituir una copia de ADN del genoma vírico completo, flanqueado en el extremo 5' con un promotor de la ARN polimerasa dependiente de ADN, y en el extremo 3' con una secuencia de terminación y una secuencia señal para la poliadenilación del ARN. La maquinaria celular transcribe esta  
10 construcción como un genoma de ARN de longitud completa con auténticos extremos 5' y 3'.

Por el contrario, un **"ADNc de longitud completa que cubre el genoma vírico completo"** es un ADNc sencillo que codifica la totalidad del genoma vírico.

15 Preferentemente, la etapa b) del método de la invención permite la producción de 2 a 15 fragmentos de ADNc solapantes, preferentemente de 3, 4, 5 o 6 fragmentos de ADNc solapantes. Normalmente, dichos fragmentos de ADNc tienen una longitud de aproximadamente 2 kb a aproximadamente 6 kb, preferentemente de aproximadamente 4 kb y cada fragmento de ADNc tiene regiones superpuestas de 70 a 100 pb.

20 Preferentemente, dichos fragmentos de ADNc solapantes de la etapa b) son:

- fragmentos de clones infecciosos no amplificados por PCR;
- fragmentos de clones infecciosos amplificados por PCR;
- fragmentos de clones no infecciosos no amplificados por PCR;
- 25 - fragmentos de clones no infecciosos amplificados por PCR;
- fragmentos sintetizados *de novo* no amplificados por PCR;
- fragmentos sintetizados *de novo* amplificados por PCR; y
- fragmentos del genoma vírico obtenidos por PCR de transcripción inversa.

30 En una realización preferida, dependiendo del virus diana que se vaya a generar, dichos fragmentos de ADNc solapantes pueden obtenerse gracias a los cebadores desvelados en la siguiente tabla:

Virus	Fragmento de ADNc a obtener	Cebador directo a utilizar SEQ ID No:	Cebador inverso a utilizar SEQ ID No:
JEV I	I	3	4
	II	5	6
	III	7	8
JEV II	I	9	10
	II	11	12
	III	13	14
WNV	I	15	16
	II	17	18
	III	19	20
TBEV	I	21	22
	II	23	24
	III	25	26
YFV	I	27	28
	II	29	30
	III	31	32
DENV-4	I	33	34
	II	35	36
	III	37	38
6 fragmentos de	I	39	40

Virus	Fragmento de ADNc a obtener	Cebador directo a utilizar SEQ ID No:	Cebador inverso a utilizar SEQ ID No:
JEV I	II	41	42
	III	43	44
	IV	45	46
	V	47	48
	VI	49	50
CHIKV	I	51	52
	II	53	54
	III	55	56
CV-B3	I	57	58
	II	59	60
	III	61	62

Dichos cebadores son útiles para obtener fragmentos de ADNc solapantes mediante PCR.

5 En consecuencia, en una realización, la etapa b) del método de la invención es una etapa de amplificación del genoma vírico completo preparado en la etapa a):

- en 3 fragmentos de ADNc solapantes utilizando los cebadores mostrados en SEC ID No 3 a SEC ID No: 8, o en 6 fragmentos de ADNc solapantes utilizando los cebadores mostrados en SEQ IN No: 39 a 50, cuando dicho virus de ARN infeccioso es JEV I; o
- 10 - en 3 fragmentos de ADNc solapantes utilizando los cebadores mostrados en SEC ID No: 9 a SEQ ID No: 14; , cuando dicho virus de ARN infeccioso es JEV II; o
- en 3 fragmentos de ADNc solapantes utilizando los cebadores mostrados en SEC ID No: 15 a SEQ ID No: 20, cuando dicho virus de ARN infeccioso es WNV; o
- en 3 fragmentos de ADNc solapantes utilizando los cebadores mostrados en SEC ID No: 21 a SEQ ID No: 26, cuando dicho virus de ARN infeccioso es TBEV; o
- 15 - en 3 fragmentos de ADNc solapantes utilizando los cebadores mostrados en SEC ID No: 27 a SEQ ID No: 32, cuando dicho virus de ARN infeccioso es YFV; o
- en 3 fragmentos de ADNc solapantes utilizando los cebadores mostrados en SEC ID No: 33 a SEQ ID No: 38, cuando dicho virus de ARN infeccioso es DENV-4; o
- 20 - en 3 fragmentos de ADNc solapantes utilizando los cebadores mostrados en SEC ID No: 51 a SEQ ID No: 56, cuando dicho virus de ARN infeccioso es CHIKV; o
- en 3 fragmentos de ADNc solapantes utilizando los cebadores mostrados en SEC ID No: 57 a SEQ ID No: 62, cuando dicho virus de ARN infeccioso es CV-B3.

25 El método de la invención comprende una **etapa c)** de transfección de dichos fragmentos de ADNc en una célula hospedadora.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "**transfección**" se refiere a la introducción de ácidos nucleicos (ADN o ARN) en células u organismos eucariotas o procariotas. Una célula que ha captado el ácido nucleico exógeno se denomina "célula hospedadora" o "célula transfectada". La transfección puede realizarse mediante una diversidad de medios conocidos en la técnica, entre los que se incluyen, coprecipitación con fosfato de calcio y ADN, transfección mediada con DEAE-dextrano, transfección mediada con polibreno, electroporación, microinyección, fusión de liposomas, lipofección, fusión de protoplastos, infección retroviral y biolística.

35 Preferentemente, la célula hospedadora de la etapa c) es una célula permisiva, que permite la recuperación de un virus infeccioso. Normalmente, las células permisivas empleadas en el método de la presente invención son células que, después de la transfección con los fragmentos de ADNc, son capaces de realizar un ciclo completo de replicación del virus, incluida la producción de partículas víricas. Preferentemente, dicha célula hospedadora se selecciona del grupo que consiste en las líneas celulares SW13, BHK-21, HEK 293 y Vero.

40 En una realización preferida, la etapa c) es una etapa de transfección directa de los fragmentos de ADNc obtenidos tal cual en la etapa b), y la etapa c) se produce directamente después de la etapa b). En esta realización específica, los fragmentos de ADNc se transfectan tal cual en las células hospedadoras. Dichos fragmentos se recombinan de manera espontánea *in cellulo* en una copia de ADN del genoma vírico completo, flanqueado en el extremo 5' con un promotor de ARN polimerasa dependiente de ADN, y en el extremo 3' con una secuencia de terminación y una

45

- secuencia señal para la poliadenilación de ARN. Como se ha mencionado anteriormente, el método de la invención supera un prejuicio técnico, ya que exonera de transfectar un ADNc de longitud completa, que, tal cual, cubra el genoma vírico completo. Aparte de esto, el método no utiliza ningún plásmido o vector que comprenda dicho ADNc de longitud completa tal cual y/o no necesita reconstruir el ADNc completo o el genoma vírico completo antes de la transfección en una célula hospedadora. Por el contrario, el método se basa en la transfección de los fragmentos de ADNc solapantes, cubriendo cada uno de ellos una parte del genoma vírico. La transfección de fragmentos de ADN bicatenario solapantes, que cubren todo el genoma de un virus de ARN, en células permisivas, permite la recombinación y la síntesis de una copia de ADN del genoma vírico completo *in cellulo*.
- 5
- 10 En una realización alternativa, la etapa c) es una etapa de transfección de plásmidos, comprendiendo cada uno de ellos un fragmento de ADNc obtenido en la etapa b), donde cada fragmento de ADNc se incorpora en plásmidos o vectores individuales y distintos. En esta realización, cada fragmento de ADNc se incorpora en plásmidos o vectores individuales y distintos. Cada plásmido o vector comprende un fragmento sencillo de ADNc. En esta realización, el genoma vírico completo se reconstituye después de la transfección.
- 15 En una realización, el método de la invención comprende una etapa adicional b') después de la etapa b) y antes de la etapa c) de purificación de los fragmentos de ADNc solapantes. Dicha purificación puede realizarse mediante cualquier técnica conocida, preferentemente mediante cromatografía en columna.
- 20 El método de la invención comprende una **etapa d)** de incubación de las células hospedadoras, que preferentemente dura de 3 a 9 días. Durante dicha etapa de incubación, los fragmentos de ADNc transfectados se recombinan de manera espontánea en las células hospedadoras para constituir una copia de ADN del genoma vírico completo, flanqueado en el extremo 5' con un promotor de la ARN polimerasa dependiente de ADN, y en el extremo 3' con una secuencia de terminación y una secuencia señal para la poliadenilación del ARN. La maquinaria celular transcribe esta construcción como un genoma de ARN de longitud completa con auténticos extremos 5' y 3'.
- 25 En una realización alternativa, la invención se refiere a un método para generar *in vivo* un virus de ARN infeccioso.
- En esta realización, dicho método comprende las siguientes etapas:
- 30 a) la introducción de un promotor de la ARN polimerasa dependiente de ADN en la posición 5' y, opcionalmente, de una secuencia de terminación y de poliadenilación de ARN en la posición 3' del genoma completo de un virus de ARN;
- 35 b) la amplificación del genoma vírico completo preparado en la etapa a) que incluye dicho promotor y, opcionalmente, dicha secuencia de terminación y de poliadenilación de ARN, en al menos 2, preferentemente al menos 3, 4, 5 o 6 fragmentos de ADNc solapantes;
- 40 c) la inoculación de dichos fragmentos de ADNc en un modelo animal no humano;
- e) la recuperación del virus de ARN infeccioso de una muestra biológica obtenida de dicho animal no humano.
- Todos los datos técnicos previamente desvelados son aplicables en el presente documento.
- 45 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "modelo animal" es un eucariota heterótrofo multicelular, más preferentemente un mamífero. En una realización preferida, dicho modelo animal es un roedor, más preferentemente un ratón.
- Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "**muestra biológica**", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier muestra biológica procedente del modelo animal. En el método de la presente invención, la muestra puede comprender cualquier líquido corporal. Los ejemplos de muestras de ensayo incluyen sangre, suero, plasma, líquido de aspirado de pezón, orina, saliva. Como alternativa, dicha muestra biológica es un tejido obtenido de dicho modelo animal. Preferentemente, dicha muestra se selecciona del grupo que consiste en tejido adiposo, tejido mesangial, tejido hepático, tejido pancreático, tejido muscular, tejido de vasos sanguíneos, tejido neuronal y tejido de cerebro y bazo. Más preferentemente, dicha muestra biológica es tejido de cerebro y bazo.
- 50
- 55 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "**individuo**" se refiere a un animal, en algunas realizaciones un mamífero, y en algunas realizaciones un ser humano.
- 60 Normalmente, la etapa c') de "inoculación de dichos fragmentos de ADNc en un modelo animal", se refiere a una etapa en la que los fragmentos de ADNc se refieren a una etapa de administración al modelo animal. En otras palabras, dicha etapa permite preferentemente la introducción del fragmento de ADNc dentro del modelo animal o de las células de dicho modelo. Los fragmentos de ADNc pueden suministrarse o administrarse a un sujeto o a una célula utilizando una variedad de medios, incluyendo, pero sin limitación, la vía oral, intradérmica, oftálmica, sublingual, bucal, intramuscular, intravenosa, intraarterial, nasal, intraperitoneal, intracraneal, intracerebroventricular, intracerebral, intravaginal, intrauterina, rectal, parenteral. Preferentemente, la etapa c') se realiza mediante inyección
- 65

intraperitoneal, inyecciones intradérmicas o inyección intracerebral.

**En un segundo aspecto**, la invención concierne al uso del método para generar un virus de ARN infeccioso como se desvela en el presente documento, y/o del virus de ARN obtenido de acuerdo con dicho método, para el análisis genético inverso.

El método de la invención tiene la aptitud de generar el diseño de grandes experimentos de genética inversa para virus de ARN. También tiene la capacidad, de modular específicamente las características de los virus recuperados de procedimientos experimentales. Adicionalmente, dado que los fragmentos subgenómicos de ADN pueden obtenerse convenientemente por PCR, este método tiene la aptitud de conservar la diversidad genética de las poblaciones víricas al comenzar a partir de ARN vírico. También puede utilizarse PCR propensa a error para crear heterogeneidad vírica artificial, por ejemplo, para facilitar la selección de virus adaptados en diversas condiciones de selección experimental y, por otra parte, pueden utilizarse polimerasas de alta fidelidad y moldes de amplificación clonal para controlar el grado de clonalidad de los virus producidos.

Todos los datos técnicos previamente desvelados son aplicables en el presente documento.

**En un tercer aspecto**, la invención se refiere al uso del método para generar un virus de ARN infeccioso como se desvela en el presente documento, y/o del virus de ARN obtenido de acuerdo con dicho método, para el envío seguro y eficaz de dicho virus de ARN infeccioso. De hecho, el método de la invención mejora drásticamente la seguridad y la protección de intercambios de virus ARN, por ejemplo, entre centros científicos. De hecho, dichos intercambios pueden tener forma de envíos individuales a temperatura ambiente de fragmentos subgenómicos de ADN sencillo, no infeccioso. Después, dichos fragmentos podrían combinarse y transfectarse en el centro receptor. Por tanto, el método permite la recuperación rápida, sencilla y segura de la cepa vírica infecciosa.

Todos los datos técnicos previamente desvelados son aplicables en el presente documento.

Los siguientes ejemplos se dan con el propósito de ilustrar varias realizaciones de la invención y no pretenden limitar la presente invención de ninguna manera.

## Descripción de las figuras

### **Figura 1: Estrategia universal para rescatar virus de ARN monocatenarios positivos infecciosos**

El genoma vírico completo, representado esquemáticamente en la figura (genoma flavivírico), flanqueado respectivamente en los extremos 5' y 3' con el promotor del citomegalovirus humano (pCMV) y la ribozima delta de la hepatitis seguido de la señal de poliadenilación del virus de simio 40 (HDR/SV40pA), se amplificó por PCR en 3 fragmentos de ADNc solapantes. La transfección de los productos de la PCR en células permisivas, permitió la recuperación de virus infecciosos después de 3 a 9 días. Las flechas azules horizontales representan los cebadores utilizados para generar los 3 fragmentos de ADNc solapantes.

## Ejemplos

### **EJEMPLO 1: Método ISA**

#### **MÉTODOS**

##### **Células, virus, clones infecciosos y anticuerpos**

Se cultivaron células de riñón de cría de hámster (BHK-21) a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % en un medio esencial mínimo (Life Technologies) con suero bovino fetal al 7 % termoinactivado (FBS; Life Technologies) y penicilina/estreptomomicina al 1 % (PS; 5 000 U/ml y 5 000 µg/ml; Life Technologies). Se cultivaron células de riñón embrionario humano 293 (HEK-293) y células de riñón de mono verde africano (VeroE6) a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % en el mismo medio que las células BHK-21 complementado con 1 % de aminoácidos no esenciales (Life technologies). Se cultivaron células de carcinoma suprarrenal humano (SW13) a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % en medio RPMI 1640 (Life Technologies) con FBS al 10 % y PS al 1 %. La cepa JEV\_CNS769\_Laos\_2009 (KC196115) del genotipo I de JEV, se aisló en junio de 2009 del líquido cefalorraquídeo de un paciente en Laos16; la cepa BOL 88/1999 (KF907504) del YFV, aislada en el año 2009 de un suero humano, la proporcionó amablemente el Centro Nacional de Enfermedades Tropicales (CENETROP), Santa-Cruz, Bolivia; La cepa Dak HD 34 460 (KF907503) del DENV-4, aislada de un suero humano, la proporcionó amablemente Robert B Tesh del Centro de Biodefensa y Enfermedades Infecciosas Emergentes - Sealy Center for Vaccine Development (Rama Médica de la Universidad de Texas, Galveston, Tejas, Estados Unidos); el clon infeccioso del JEV genotipo III, derivado de la cepa rp9 (DQ648597), lo proporcionó amablemente Yi-Ling Lin del Instituto de Ciencias Biomédicas, Academia Sinica, Taipei, Taiwán; el clon infeccioso del WNV derivaba de la cepa Uganda 1937 (M12294);

el clon infeccioso del TBEV derivaba de la cepa Oshima 5.10 (AB062063); el clon infeccioso del CV-B3 derivaba de la cepa 2679 (KJ489414). Para realizar los ensayos de inmunofluorescencia directa, se utilizó un suero inmuno-específico de JEV (obtenido después de la vacunación contra JEV) y 17 anticuerpos monoclonales

específicos de DENV.

Preparación de fragmentos de ADNc

- 5 El genoma completo flanqueado respectivamente en los extremos 5' y 3' con el promotor del citomegalovirus humano (pCMV) (SEQ ID No:1) y la ribozima delta de la hepatitis seguido de la señal de poliadenilación del virus de simio 40 (HDR/SV40pA) (SEQ ID No:2), se amplificó por PCR en tres fragmentos de ADNc solapantes de aproximadamente 4,8 kb, 3,0 kb y 4,3 kb (4,8 kb, 2,9 kb y 5,2 kb para CHIKV, 4,8 kb, 4,1 kb y 3,4 kb para TBEV y 2,9 kb, 2,8 kb y 2,7 kb para CV-B3) (véase la Tabla 1 mostrada a continuación).
- 10 Para WNV, TBEV, JEV III y CHIKV, los fragmentos de ADN se obtuvieron mediante PCR utilizando clones infecciosos (para JEV III, se corrigió una mutación utilizando PCR de fusión).
- 15 Para JEV I (todos los fragmentos de ADN), DENV-4 (fragmentos primero y tercero) y YFV (fragmentos primero y tercero), los fragmentos de ADN se sintetizaron *de novo* (Genscript) y se amplificaron por PCR. Los amplicones se produjeron utilizando el kit de alta fidelidad Platinum PCR SuperMix (Life Technologies).
- 20 La mezcla (volumen final: 50 µl) consistía en 45 µl de supermix, 2 µl de molde de ADN a 1 ng/µl (clon infeccioso o fragmento de ADN sintetizado) y 200 nM de cada cebador. Para DENV-4 y YFV, el segundo fragmento de ADN se obtuvo por PCR-TR a partir de sobrenadantes celulares aclarados. Los ácidos nucleicos se extrajeron utilizando el kit EZ1 Virus Mini v2 en el Biorrobot EZ1 (ambos de Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se amplificaron con el kit Taq Hifi Platinum de PCR-TR Superscript III One-Step (Life Technologies). La mezcla (volumen final: 50 µl) contenía 25 µl de mezcla de reacción, 2 µl de extracto de ácido nucleico, 100 nM de cada cebador, 1 µl de mezcla enzimática y 20 µl de agua sin nucleasa. Los ensayos se realizaron en un termociclador de
- 25 gradiente estándar profesional de Biometra T con las siguientes condiciones: 94 °C durante 2 minutos seguido de 40 ciclos de 94 °C durante 15 segundos, 64 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 5 minutos y una etapa preliminar de 50 °C durante 30 minutos para la RT-PCR. El tamaño de los productos de la PCR se verificó mediante electroforesis en gel y se purificó utilizando un kit Amicon Ultra de 0,5 ml (Millipore) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuando se utilizó ADN plasmídico como molde, la eliminación completa del molde se garantizó
- 30 mediante una etapa de digestión con la enzima de restricción Dpn1 (New England Biolabs) antes de la transfección. Para controlar la eficacia de esta etapa adicional, los inventores transfectaron (véase más adelante), como control, solo dos fragmentos de ADNc (el primero y el segundo, 1 µg final). Estos controles no produjeron ningún virus infeccioso.

35

Tabla 1: Cebadores utilizados para obtener fragmentos de ADNc

Virus	fragmento de ADNc	Cebador directo	Posición	SEQ ID	Cebador inverso	Posición	SEQ ID
JEV I	I	CACCCAACCTGATCTTCAGCATCT	-	3	GAAGAATGATTCTGTAAGTGTCAG	4054-4078	4
	II	CGTTGCCATGCCAATCTTAGCG	4002-4023	5	GGTGCTTGGCTCTCCACCAA	6983-7004	6
	III	CAAAATGAGTATGGAATGCTGGAAAA	6932-6956	7	CTCAGGGTCAATGCCAGCGCTT	-	8
JEV II	I	GCCCCACCGAAGGAGCTGAC	-	9	CAGAGAGCAAAATCCCTATGACGA	4078-4100	10
	II	CGTCACCATGCCAGTCTTAGCG	4001-4022	11	GCTTGGCAATCCAGTCAGTCCT	7004-7025	12
	III	CAAACGAGTACGGAATGCTAGAAA	6931-6954	13	CTCATGTTTGACAGCTTATCATCG	-	14
WNV	I	TCAATATTGGCCATTAGCCATATTAT	-	15	TGGATTGAACACTCCTGTAGACGC	4135-4158	16
	II	TGGTTGGAGTTGGAAGCCTCATC	4052-4074	17	GACCATGCCGTGGCCGGCC	7016-7034	18
	III	TGGACAAGACCAAGAAATGACATTG	6920-6943	19	GTTACAAAATAAGCAATAGCATACA	-	20
TBEV	I	CAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGA	-	21	GCCACGCCAGGAAGAGCATGA	4033-4054	22
	II	GGGCCCTCTGGAAATGGGGAGA	3892-3913	23	CAACCCAGGCTTGTACCATCTTT	8003-8026	24
	III	GGGTGAGTCTGGACCTTGGGA	7886-7907	25	CCTAGGAATTCACAAAATAAGCATTTT	-	26
YFV	I	CACCCAACCTGATCTTCAGCATCT	-	27	GCATGGAAGTGTCTCTTTGAGTTCT	4071-4094	28
	II	GACTTGCAACGATGCTCTTTTGCA	4020-4043	29	GAGAGAGCATCGTCAACAATGCC	7040-7061	30
	III	GATTCCATCCAGCACCCGCACC	6964-6984	31	CTCAGGGTCAATGCCAGCGCTT	-	32
DENV-4	I	GAATAAGGGCGACACGGAAATGT	-	33	TGAAGACAGCTTGTCTCTGCACAA	-	34
	II	GATCATGGCTTGGAGGACCATTTAT	3980-4003	35	GCTACTGCATAGAGCGTCCATG	6949-6970	36
	III	TTTACCAGGTAAAAACAGAAACCAC	6892-6916	37	CTCAGGGTCAATGCCAGCGCTT	-	38
6 fragmentos de JEV I	1	CACCCAACCTGATCTTCAGCATCT	-	39	CATGGAACCAATCCCTATGGACT	1635-1657	40
	II	ACTGGATTGTGAACCAAGGAGTG	1560-1582	41	GAAGAATGATTCTGTAAGTGTCAG	4054-4078	42
	III	CGTTGCCATGCCAATCTTAGCG	4002-4023	43	AATAAACCCCGAGCGCGGATG	5511-5532	44
	IV	ATGTCACCAACAGGGTGCCCAA	5440-5462	45	GGTGTGGCTCTCCACCAA	6983-7004	46
	V	CAAAATGAGTATGGAATGCTGGAAAA	6932-6956	47	GCGCCGTGCTCCATTGATTCTG	8950-8971	48
	VI	GGCTGTGGGCACATTTGTACCG	8843-8864	49	CTCAGGGTCAATGCCAGCGCTT	-	50

Virus	fragmento de ADNc	Cebador directo	Posición	SEQ ID	Cebador inverso	Posición	SEQ ID
CHIKV	I	CACCCAACTGATCTTCAGCATCT		51	CTGCTCGGGTGACCTGTCCTA	4050-4070	52
	II	TGAGATGTTTTTCCTATTCAGCAACT	3961-3986	53	AACAATGTGTTGACGAACAGAGTTA	6966-6990	54
	III	CTCCCTGCTGGACTTGATAGAG	6859-6880	55	CTCAGGGTCAATGCCAGCGCTT	-	56
CV-B3	1	CACCCAACTGATCTTCAGCATCT		57	CCACACAACATGCCGTACCAAGCA	2184-2206	58
	II	CAGGCGCTGGCGCTCCGACA	2148-2167	59	GTCTATGGTTATACTCTCTGAACA	4970-4994	60
	III	GACAGGAGGACACAAGTCAGAT	4921-4943	61	CTCAGGGTCAATGCCAGCGCTT	-	62

Transfección celular

Un µg final de una mezcla equimolar de todos los fragmentos de ADNc amplificados por PCR o 1 µg de clon infeccioso de CV-B3, se incubó con 12 µl de Lipofectamine 2000 (Life Technologies) en 600 µl de medio Opti-MEM (Life Technologies). De acuerdo con las instrucciones del fabricante, la mezcla se añadió a un matraz de cultivo de 12,5 cm<sup>2</sup> de células subconfluentes que contenían 1 ml de medio sin antibióticos. Después de 4 horas de incubación, se extrajo el sobrenadante, las células se lavaron dos veces (HBSS; Life Technologies) y se añadieron 3 ml de medio reciente. El sobrenadante celular se recogió cuando se observó un enorme efecto citopático (CPE, *cytopathic effect*) (3-9 días dependiendo del tipo de célula y de la velocidad de crecimiento del virus) o 9 días después de la transfección en el caso de virus no citopáticos, se aclaró mediante centrifugación, se dividió en alícuotas y se conservó a -80 °C. Después, con cada virus, se realizaron pases cuatro veces utilizando el mismo tipo de célula, excepto para los virus DENV-4 y YFV para los que se utilizaron células VeroE6 y HEK-293, respectivamente. Los pases se realizaron inoculando, sobre las células, 333 µl de sobrenadante celular aclarado, en un matraz de cultivo de 12,5 cm<sup>2</sup> que contenía 666 µl de medio: después de 2 horas de incubación, las células se lavaron dos veces (HBSS) y se añadieron 3 ml de medio reciente. Después de 2-6 días se recogió el sobrenadante celular, se aclaró mediante centrifugación, se dividió en alícuotas y se conservó a -80 °C. Los sobrenadantes celulares aclarados (reservas de virus) se utilizaron para realizar la cuantificación del ARN vírico, el ensayo TCID<sub>50</sub> (del inglés *Median Tissue Culture Infectious Dose*, dosis infecciosa media en cultivo tisular), el ensayo de inmunofluorescencia directa y la secuenciación hologénica.

Ensayos de PCR en tiempo real y de RT-PCR

Para evaluar la producción de virus infecciosos y garantizar que la detección positiva no fue el resultado de la contaminación del ADNc, el ARN vírico se cuantificó y se comparó con la cantidad de ADNc detectado utilizando el kit Access RT-PCR Core Reagent (Promega) con o sin transcriptasa inversa. El ARN se extrajo utilizando el kit EZ1 mini virus 2.0 y el Biorobot EZ1 (ambos de Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La mezcla (volumen final: 25 µl) contenía una cantidad estándar de tampón de reacción AMV/Tfl 5X, 0,5 µM de cada cebador, 0,5 µl de mezcla de dNTP, 0,5 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0,5 µl de transcriptasa inversa de AMV (solo para la RT-PCR), 0,5 µl de ADN polimerasa de Tfl (*Thermus flavus*), 15,5 µl de agua sin nucleasa y 2 µl de ácidos nucleicos extraídos. Los ensayos se realizaron utilizando el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch™ (Biorad) con las siguientes condiciones: 50 °C durante 15 minutos, 95 °C durante 2 minutos, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 40 segundos. La recogida de datos se realizó durante la etapa de 60 °C. La diferencia entre los valores de umbral de ciclo (ct, *Cycle Threshold*) obtenidos mediante ensayos de PCR en tiempo real y de RT-PCR en tiempo real, se ha utilizado para evaluar la producción de ARN vírico. Además, la cantidad de ARN vírico, expresada como límite de detección de dosis (unidad arbitraria; UA), se calculó a partir de curvas patrón (los ácidos nucleicos de los sobrenadantes celulares de los virus cultivados se utilizaron como patrón; se agruparon cinco extractos de ácido nucleico y se conservaron alícuotas de 10 µl a una temperatura de -80 °C).

Ensayo de dosis infecciosa media en cultivo tisular (TCID<sub>50</sub>)

Para cada determinación, un cultivo en placas de 96 pocillos que contenía 20.000 células BHK-21 en 100 µl de medio por pocillo (añadidos justo antes de la inoculación) se inoculó con 50 µl de diluciones en serie de factor 10 de sobrenadantes de cultivos celulares aclarados: cada fila incluía 6 pocillos de la misma dilución y dos controles negativos. Las placas se incubaron durante 7 días y se leyeron en busca de la ausencia o la presencia de CPE en cada pocillo. La determinación de la TCID<sub>50</sub>/ml se realizó utilizando el método de Reed y Muench<sup>18</sup>.

Ensayo de inmunofluorescencia directa (dIFA, *Direct Immuno-Fluorescence assay*)

Se realizó IFA directa utilizando matraces de cultivo de 12,5 cm<sup>2</sup> de células SW13 para JEV I y JEV III, y células VeroE6 infectadas respectivamente 2 y 6 días antes de utilizar el sobrenadante celular aclarado (véase anteriormente: pases de virus). El sobrenadante se retiró y las células se lavaron dos veces (HBSS; Invitrogen), se digirieron con tripsina, se recogieron y se diluyeron (1/5) con medio reciente. Después de la citocentrifugación de 150 µl de esta suspensión celular (3 minutos, 900 rpm); Cytospin, Thermo Scientific), los portaobjetos se secaron, se sumergieron durante 20 minutos y acetona fría para la fijación, se secaron, se incubaron durante 30 minutos a 37 °C con suero inmuoespecífico de JEV debidamente diluido (véase anteriormente) o con anticuerpos monoclonales específicos de DENV, se lavaron dos veces con PBS, se lavaron una vez con agua destilada, se secaron, se incubaron durante 30 minutos a 37 °C con el anticuerpo secundario conjugado con FITC debidamente diluido y tiñeron con tinción de contraste azul Evans, se lavaron dos veces con PBS, se lavaron una vez con agua destilada, se secaron, se montaron y se efectuó la lectura con un microscopio de fluorescencia.

Análisis de secuencia del genoma de longitud completa

La secuenciación completa del genoma se realizó con el secuenciador Ion PGM 19 (Life Technologies) y los análisis se realizaron con el programa informático CLC de Genomics Workbench 6. En primer lugar, los sobrenadantes de virus se aclararon y se trataron con la nucleasa Benzonasa HC> 99 % (Novagen) a 37 °C durante la noche. Después de la extracción de ARN (no se utilizó ningún transportador de ARN; véase anteriormente) utilizando el kit EZ1 mini

virus 2.0 y el Biorrobot EZ1 (ambos de Qiagen), se realizó amplificación aleatoria de ácidos nucleicos, como se describió anteriormente 20. El ADN amplificado se analizó utilizando el secuenciador Ion PGM, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las lecturas obtenidas se perfilaron: utilizando primero puntuación de calidad, y después, eliminando los cebadores utilizados durante la amplificación aleatoria y finalmente en los extremos 5' y 3' eliminando sistemáticamente 6 nucleótidos. Solo se utilizaron lecturas con una longitud superior a 29 nucleótidos y, como referencia, se mapearon en la secuencia del genoma original. Las frecuencias de mutación (proporción de genomas víricos con la mutación) para cada posición, se calcularon simplemente como el número de lecturas con una mutación en comparación con la referencia dividido entre el número total de lecturas en ese sitio.

## 10 RESULTADOS

Los inventores desarrollaron una genética inversa sencilla y versátil que facilita la recuperación de virus de ARN infecciosos a partir de material de ADN genómico sin requerir la clonación, la propagación de ADNc en bacterias o la transcripción de ARN *in vitro*. Su hipótesis de trabajo fue que la transfección de fragmentos de ADN bicatenario solapantes, que cubren todo el genoma de un virus de ARN, en células permisivas, permitiría la recombinación de manera espontánea y la síntesis de una copia de ADN de todo el genoma vírico. Incluyendo en el extremo 5' del primer fragmento de ADNc (5'), un promotor de la ARN polimerasa dependiente de ADN, y en el extremo 3' del último fragmento de ADNc (3'), una secuencia de ribozima y una secuencia señal para la poliadenilación del ARN, los inventores anticiparon que esta copia de ADN genómico se transcribiría como un genoma de ARN de longitud completa con extremos 5' y 3' auténticos que se exportaría de manera eficaz fuera del núcleo (en el caso de un virus que se replica en el compartimento citoplasmático).

Los inventores ensayaron esta hipótesis por primera vez con 6 flavivirus (es decir, virus con envoltura transmitidos por artrópodos con un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva, que se replica en el citoplasma de las células infectadas) que representan los principales linajes evolutivos flavivíricos: dos virus de la encefalitis japonesa (JEV; genotipo I (JEV I) y genotipo III (JEV III)), un virus del Nilo Occidental (WNV) de genotipo 2, un virus del dengue de serotipo 4 (DENV-4), una cepa de tipo silvestre del virus de la fiebre amarilla (YFV) y un virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) de subtipo del Lejano Oriente (Tabla 1).

Los genomas completos se amplificaron por PCR en 3 fragmentos de ADN de aproximadamente 4 kb, cada uno con regiones solapantes de 70 a 100 pb. El primer y último segmentos se flanquearon respectivamente en los extremos 5' y 3' con el promotor del citomegalovirus humano (pCMV) y la ribozima delta de la hepatitis seguido de la señal de poliadenilación del virus de simio 40 (HDR/SV40pA) (Figura 1). Los productos de la PCR se purificaron en columna y 1 µg de una mezcla equimolar de todos los fragmentos, se transfeció en las líneas celulares SW13y/o BHK-21, que garantizan la recuperación eficaz de genomas flavivíricos infecciosos. Se efectuaron pases en serie cuatro veces de los medios sobrenadantes celulares de estos cultivos infecciosos utilizando los mismos tipos de células, lo que permitió el aislamiento de JEV I, JEV III, TBEV y WNV. Para virus más exigentes, el aislamiento podría realizarse efectuando pases en otras células permisivas (por ejemplo, DENV - 4: células VeroE6; YFV: células HEK-293). Para cada virus, la replicación del virus después de cuatro pases en serie se demostró utilizando una combinación de los siguientes criterios:

- (i) producción de genomas víricos en medio de sobrenadante celular utilizando métodos de RT-PCR en tiempo real,
- (ii) producción de partículas infecciosas en medio sobrenadante celular mediante ensayos TCID<sub>50</sub>,
- (iii) detección del efecto citopático (CPE),
- (iv) detección de antígenos víricos mediante ensayos de inmunofluorescencia directa, y
- (v) secuenciación del genoma vírico completo utilizando el método de secuenciación de nueva generación (NGS, acrónimo del inglés *next generation sequencing*).

La fuerza, la flexibilidad y la versatilidad de los métodos se cuestionó además de la siguiente manera. En primer lugar, los inventores redujeron el tamaño y aumentaron el número de fragmentos solapantes combinados para la transfección. Esto se ilustró en el caso de JEV I, para el cual el método ISA generó virus infecciosos, cuando se utilizaban hasta 6 amplicones solapantes de aproximadamente 2 kb. En segundo lugar, aplicaron el método ISA a virus con un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva que pertenecían a diferentes familias: virus Chikungunya (CHIKV, un virus con envoltura, de la familia *Togaviridae*) y el virus de Coxsackie B3 (CV-B3, un virus sin envoltura, de la familia *Picornaviridae*). De nuevo, pudieron aislarse virus infecciosos después de la transfección y de cuatro pases en células HEK-293 (CHIKV) o células BGM (CV-B3) (Tabla 2 más adelante). Asimismo, los inventores utilizaron como control el CV-B3 obtenido después de la transfección de un genoma infeccioso portador de plásmido y obtuvieron resultados similares en cuanto a infectividad y datos de secuencias (Tabla 2).

Tabla 2: Caracterización de los virus recuperados

Virus	Cepa	Origen del material utilizado para producir amplicones subgenómicos			Línea celular utilizada para la transfección	Línea celular utilizada durante los pases	RT-PCR en tiempo real (U.A)	Log10 TCID50/ml	CPE	dIFA	dN/dS (todas las mutaciones)	dN/dS (mutaciones fijas)	Sustituciones por sitio después de 4 pases (todas las mutaciones)	Sustituciones por sitio después de 4 pases (mutaciones fijas)
		I	II	III										
JEV	JEVI	DNS	DNS	DNS	BHK-21	BHK-21	1.32E+08	5,8	Sí	N/D	3,273	N/D	127E-03	7.29E-04
					SW13	SW13	1.52E+07	5,2	Sí	Positivo	0,409	N/D	7.29E-04	9.11E-05
					SW13*	SW13*	9.33E+06	2.8*	Sí	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	JEV III	C.I.	C.I.	C.I.	BHK-21	BHK-21	3.77E+07	6,1	Sí	N/D	1,286	1,143	1.54E-03	1.45E-03
					SW13	SW13	4.04E+06	4,8	Sí	Positivo	0,536	N/D	6.37E-04	-
	JEV I/JEV III quiméricos	DNS	C.I.	C.I.	BHK-21	BHK-21	933E+07	6,7	Sí	N/D	0,404	1,571	1.36E-03	3.64E-04
					SW13	SW13	1.00E+07	6,8	Sí	N/D	1,19	1,589	9.10E-04	7.28E-04
	JEV III/JEV I quiméricos	C.I.	DNS	DNS	BHK-21	BHK-21	6.58E-07	6,6	Sí	N/D	0,268	0,268	2.73E-04	1.73E-04
					SW13	SW13	3.06E+07	6,4	Sí	N/D	5,357	3,178	1.00E-03	6.38E-04
	WNV	Uganda	C.I.	C.I.	C.I.	BHK-21	BHK-21	5.73E+07	5,3	Sí	N/D	0,268	N/D	4.55E-04
TBEV	Oshima 5.10	C.I.	C.I.	C.I.	BHK-21	BHK-21	12SE+08	9,1	Sí	N/D	3,214	N/D	7.20E-04	9.00E-05
DENV-4	Dak HD 34 460	DNS	ARN vírico	DNS	SW13	VeroE6	6.59E+04	N/D	No	Positivo	0,436	0,535	8.45E-04	5.63E-04
YFV	BOL 88/199	DNS	ARN vírico	DNS	SW13	HEK	1.42E+05	5,2	Sí	N/D	0,818	0,818	4.63E-04	4.63E-04
CHIKV	OPY1	C.I.	C.I.	C.I.	HEK-293	HEK-293	2.01E+07	7	Sí	N/D	2,24	N/D	4.21 E-04	-
CV-B3	2679	C.I.	C.I.	C.I.	SW13	BGM	4.64E+07	7,4	Sí	N/D	N/D	N/D	2.70E-04	-
CV-B3	2679	No obtenido mediante PCR			SW13	BGM	9.33E+07	7,4	Sí	N/D	N/D	N/D	-	-

Resumen de los diferentes virus producidos en este estudio: el nombre específico de la cepa, el origen del material inicial (DNS, Síntesis De Novo; C.I., Clon Infeccioso; o ARN vírico) utilizado como molde para la producción del primer (I), segundo (II) y tercer (III) fragmento, la línea celular utilizada para la transfección y los pases, la cuantificación relativa de la cantidad de ARN vírico y de los títulos infecciosos en sobrenadantes celulares en el cuarto pase mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real y de TCID<sub>50</sub>, la presencia o la ausencia de efecto citopático (CPE), así como la búsqueda de antígenos víricos mediante el ensayo de inmunofluorescencia directa (dIFA). Se obtuvieron secuencias del genoma vírico completo utilizando tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS). dN y dS corresponden respectivamente al número de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo y al número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo. \* Resultados obtenidos por transfección de seis fragmentos solapantes. Resultados obtenidos por transfección directa del clon infeccioso portador del plásmido CV-B3.

N/D y UA significa no disponible y unidades arbitrarias respectivamente.

En tercer lugar, los inventores demostraron la capacidad del método ISA para generar virus modificados genéticamente en cuestión de días. Esto se ilustró mediante la corrección basada en PCR de una mutación de marco de lectura (1915del) en el fragmento uno de un clon infeccioso de JEV III defectuoso y la posterior recuperación del virus correspondiente (Métodos Complementarios). También pudieron producir virus quiméricos intercambiando el primer fragmento de ADN (que codifica las proteínas estructurales) de los genotipos I y III de los virus de la encefalitis japonesa, JEV. A pesar de los 11 desapareamientos en la región solapante de los dos primeros fragmentos, la transfección dio lugar a la producción de quimeras intergenotípicas de JEV I/JEV III y JEV III/JEV I. El análisis de secuencias genómicas completas establecidas en el cuarto pase, utilizando NGS, mostró que la deriva genética (tasa de cambio de secuencias) fue moderada (varió de 1,45E-03 a 9,00E-05 sustituciones por sitio cuando se consideraron mutaciones fijas). Una mayoría de mutaciones no sinónimas, la presencia de mutaciones compartidas entre las diferentes cepas de JEV (7/85), y la distribución no aleatoria de mutaciones (a una frecuencia superior al 10 %) a lo largo del genoma (con puntos calientes y regiones muy conservadas) indicaron adaptación las condiciones del cultivo celular.

La tasa de mutación varió según las células utilizadas para el aislamiento y, como se esperaba, fue mayor en los virus derivados de cepas de pocos pases que en los derivados de cepas adaptadas a las condiciones del cultivo. En conclusión, el método ISA es un procedimiento muy sencillo con el que se acelerara la producción de virus de ARN infecciosos modificados genéticamente en cuestión de días, con perfecto control de las secuencias víricas y a partir de una variedad de fuentes iniciales que incluyen clones infecciosos preexistentes, secuencias genómicas de ARN vírico o de ADN sintetizadas *de novo*. Esta técnica tiene la futura aptitud de generar el diseño de grandes experimentos de genética inversa para virus de ARN, en una escala que previamente no podría haber sido considerada. También tiene la capacidad, de modular específicamente las características de los virus recuperados de procedimientos experimentales. Adicionalmente, dado que los fragmentos subgenómicos de ADN pueden obtenerse convenientemente por PCR, este método tiene la aptitud de conservar la diversidad genética de las 13 poblaciones víricas al comenzar a partir de ARN vírico. También puede utilizarse PCR propensa a error para crear heterogeneidad vírica artificial, por ejemplo, para facilitar la selección de 15 virus adaptados en diversas condiciones de selección experimentales y, por otra parte, pueden utilizarse polimerasas de alta fidelidad y moldes de amplificación clonal para controlar el grado de clonalidad de los virus producidos.

Por último, el método de la invención tiene la aptitud de revolucionar la seguridad y la protección de futuros intercambios de virus ARN entre centros científicos, mediante el envío individual a temperatura ambiente de fragmentos subgenómicos de ADN sencillo, no infeccioso que, después, podrían combinarse y transfectarse en el centro receptor, permitiendo la recuperación rápida, sencilla y segura de la cepa vírica infecciosa.

### **EJEMPLO 2: Método ISA con fragmentos de ADNc en plásmidos individuales y distintos**

Los inventores ilustraron además el método ISA en la realización específica en la que la etapa c) es una etapa de transfección de plásmidos o vectores que comprenden un fragmento de ADNc obtenido en la etapa b), donde cada fragmento de ADNc está en un plásmido o en un vector individual y distinto.

Este experimento se realizó utilizando tres plásmidos que contenían los mismos fragmentos del genoma del virus de la encefalitis japonesa (genotipo I, cepa de Laos) que los utilizados previamente para recuperar el virus infeccioso mediante el método ISA después de la amplificación por PCR.

Los tres plásmidos se linealizaron mediante digestión con la enzima de restricción Fse I y se transfectaron directamente en una cantidad equimolar (1 µg final) en células SW13 sin amplificación por PCR previa. Después de 9 días y 1 pase, el virus se recuperó del cultivo satisfactoriamente.

### **EJEMPLO 3: Aplicación del método ISA *in vivo***

Los fragmentos solapantes que cubren todo el genoma de los virus de ARN y que están flanqueados respectivamente en los extremos 5' y 3' con el promotor de la ARN polimerasa dependiente de ADN y las secuencias de terminación/señal de poliadenilación, se prepararon utilizando el método de la invención.

Estos fragmentos de ADN se inocularon directamente en animales vivos y se permitió recuperar los virus infecciosos de varias muestras de animales. Además, la vigilancia clínica de los animales (aparición de síntomas y pérdida significativa de peso) permitió observar signos típicos de infección.

5 **a) Experimento 1: Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas(TBEV; Flavivirus)**

Los inventores utilizaron una cepa de tipo silvestre del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (cepa Oshima 5.10 (número de registro del GenBank AB062063)). Aplicaron el método de la invención a fragmentos de ADN solapantes.

10 Se inocularon cinco ratones hembra C57B1/6J de cinco semanas de vida con tres fragmentos de ADN solapantes.

La evolución clínica de la infección vírica se monitorizó siguiendo

- 15 (i) las manifestaciones clínicas de la enfermedad (temblores, cifosis, suciedad ocular, hemiparesia o tetraparesia, hemiplegia o tetraplegia); y  
 ii) el peso de los ratones exactamente como lo describen Fabritus L et al., 2015, Attenuation of Tick-Borne Encephalitis Virus Using Large-Scale Random Codon Re-encoding. PLoS Pathog 11(3).

20 Los cerebros y los bazo se extrajeron de ratones sacrificados 14 días después de la inoculación. Los cerebros y los bazo se trituraron y se centrifugaron. El sobrenadante resultante se utilizó para evaluar la presencia de virus infecciosos.

25 La presencia de virus infecciosos se evaluó utilizando métodos moleculares (PCR-RT en tiempo real) y clásicos (aislamiento de virus infecciosos) de cultivo celular.

Utilizando una cantidad inicial de ADN que variaba entre 2 a 5 µg, y dos vías de inoculación diferentes (inyección intraperitoneal e intradérmica), se detectaron virus infecciosos tanto en los cerebros como en los bazo. También se observaron manifestaciones clínicas (pérdida significativa de peso y síntomas) de las enfermedades.

30 **b) Experimento 2: Inoculación intracerebral de ratones lactantes**

Los inventores utilizaron cepas de tipo silvestre del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (cepa Oshima 5.10 (número de registro del GenBank AB062063)) y de la encefalitis japonesa (JEV\_CNS769\_Laos\_2009 (número de registro del GenBank KC196115)). Utilizaron el método de la invención para generar los fragmentos de ADN solapantes.

35 Se utilizaron fragmentos de ADN solapantes diluidos en PBS o se mezclaron con un reactivo de transfección.

40 Se inocularon ratones lactantes OF1 mediante inyección intracerebral de fragmentos de ADN solapantes. La evolución clínica de la infección vírica se monitorizó siguiendo la manifestación clínica de la enfermedad (temblores, aletargamiento). Los cerebros se extrajeron de ratones sacrificados 6-12 días después de la inoculación. Los cerebros se trituraron y se centrifugaron. El sobrenadante resultante se utilizó para evaluar la presencia de virus infecciosos.

45 La presencia de virus infecciosos se evaluó utilizando métodos moleculares (PCR-RT en tiempo real) y clásicos (aislamiento de virus infecciosos) de cultivo celular.

Utilizando 2 µg de ADN, en los cerebros se detectaron virus infecciosos de ambos virus (TBEV y JEV) y con o sin adición de reactivo de transfección. También se observaron las manifestaciones clínicas de las enfermedades.

50 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Université d'Aix-Marseille

55 <120> Método para la generación rápida de un virus de ARN infeccioso

<130> BCT150167QT

<160> 62

60 <170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 781

65 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 717 253 T3

<220>  
<223> Promotor

5 <400> 1

gaataagggc gacacggaaa tgtcacccaa ctgatcttca gcatcttcaa tattggccat	60
tagccatatt attcattggt tatatagcat aatcaatat tggctattgg ccattgcata	120
cgttgatctc atatcataat atgtacattt atattggctc atgtccaata tgaccgccat	180
gttggcattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata	240
gccccatata ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggccccgct ggctgaccgc	300
ccaacgacc cgcgccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag	360
ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgccac ttggcagtac	420
atcaagtgta tcatatgcca agtccgcccc ctattgacgt caatgacggg aatggcccg	480
cctggcatta tgcccagtac atgaccttac gggactttcc tacttggcag tacatctacg	540
tattagtcac cgctattacc atgggtgatgc ggttttggca gtacaccaat gggcgtggat	600
agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt	660
tttggcacca aatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa taaccccgcc ccgttgacgc	720
aatggggcgg taggcgtgta cgggtgggagg tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc	780
g	781

<210> 2  
<211> 192  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

15 <400> 2

ggccggcatg gtcccagcct cctcgtctggc gccggctggg caacattccg aggggaccgt	60
cccctcgtga atggcgaatg ggactcgcga cagacatgat aagatacatt gatgagtttg	120
gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt aagcgtggc	180
attgaccctg ag	192

20 <210> 3  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> cebador D (directo)

<400> 3

ES 2 717 253 T3

Cys Ala Cys Cys Cys Ala Ala Cys Thr Gly Ala Thr Cys Thr Thr Cys  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Cys Ala Thr Cys Thr  
 20

5 <210> 4  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador I (inverso)

<400> 4  
 gaagaatgat tctgtaagtg tccag 25

15 <210> 5  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cebador D (directo)

<400> 5  
 cgttgccatg ccaatcttag cg 22

25 <210> 6  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> cebador I (inverso)

<400> 6  
 ggtgcttgcg tcctccacc aa 22

35 <210> 7  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> cebador D (directo)

<400> 7  
 caaatgagta tggaatgctg gaaaa 25

45 <210> 8  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> cebador I (inverso)

55 <400> 8  
 ctcagggtca atgccagcgc tt 22

60 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador D (directo)

5 <400> 9  
 gccaccgga aggagctgac 20

10 <210> 10  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> cebador I (inverso)

<400> 10  
 cagagagcaa atccctatga cga 23

20 <210> 11  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> cebador D (directo)

<400> 11  
 cgtcaccatg ccagtcttag cg 22

30 <210> 12  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> cebador I (inverso)

<400> 12  
 gcttggcaat ccagtcagtc ct 22

40 <210> 13  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> cebador D (directo)

<400> 13  
 caaacgagta cggaatgcta gaaa 24

50 <210> 14  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> cebador I (inverso)

60 <400> 14  
 ctcatgttg acagcttacc atcg 24

<210> 15  
 <211> 26

ES 2 717 253 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> cebador D (directo)  
 <400> 15  
 tcaatattgg ccattagcca tattat 26  
 10 <210> 16  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> cebador I (inverso)  
 <400> 16  
 20 tggattgaac actcctgtag acgc 24  
 <210> 17  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> cebador D (directo)  
 <400> 17  
 30 tggttggagt tggagcctc atc 23  
 <210> 18  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> cebador I (inverso)  
 40 <400> 18  
 gaccatgccg tggccggcc 19  
 <210> 19  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> cebador D (directo)  
 50 <400> 19  
 tggacaagac caagaatgac attg 24  
 <210> 20  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> cebador  
 60 <400> 20  
 gttacaata aagcaatagc atcaca 26

# ES 2 717 253 T3

5	<210> 21 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
10	<400> 21 caggggtatt gtctcatgag cgga	24
	<210> 22 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador	
20	<400> 22 gccacgcca ggaagagcat ga	22
	<210> 23 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> cebador	
30	<400> 23 gggccctctg gaaatgggga ga	22
	<210> 24 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador	
40	<400> 24 caaccaggc ttgtcacat ctt	24
	<210> 25 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador	
50	<400> 25 gggtaggtc gtggacctg ga	22
	<210> 26 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador	
60	<400> 26 cctaggaatt tcacaataa agcattt	28

5 <210> 27  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 10 <400> 27  
 cacccaactg atcttcagca tct 23  
  
 15 <210> 28  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 20 <400> 28  
 gcatggaagt gtccttgag ttct 24  
  
 25 <210> 29  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 30 <400> 29  
 gacttgcaac gatgctctt tgca 24  
  
 35 <210> 30  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 40 <400> 30  
 gagagagcat cgtcacaatg cc 22  
  
 45 <210> 31  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 50 <400> 31  
 gattccatcc agcaccgcac c 21  
  
 55 <210> 32  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 60

ES 2 717 253 T3

<400> 32  
 ctcagggtca atgccagcgc tt 22

5 <210> 33  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador

<400> 33  
 gaataagggc gacacggaaa tgt 23

15 <210> 34  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cebador

<400> 34  
 tgaagacagc ttgtcctgca caa 23

25 <210> 35  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> cebador

<400> 35  
 gatcatggct tggaggacca ttat 24

40 <210> 36  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador

45 <400> 36  
 gctactgcat agagcgtcca tg 22

50 <210> 37  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador

55 <400> 37  
 ttaccaggt aaaaacagaa accac 25

60 <210> 38  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 717 253 T3

<223> cebador  
 <400> 38  
 ctcagggtca atgccagcgc tt 22

5

<210> 39  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> cebador

<400> 39  
 cacccaactg atcttcagca tct 23

15

<210> 40  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> cebador

<400> 40  
 catggaacca ttcctatgg act 23

25

<210> 41  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> cebador

<400> 41  
 actggattgt gaaccaagga gtg 23

35

<210> 42  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40

<220>  
 <223> cebador

<400> 42  
 gaagaatgat tctgtaagtg tccag 25

45

<210> 43  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> cebador

<400> 43  
 cgttgccatg ccaatcttag cg 22

55

<210> 44  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60

<220>

65

<223> cebador  
 <400> 44  
 aatataaccc cgagcggcga tg 22

5 <210> 45  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador

<400> 45  
 atgtcaccaa acaggggtgcc caa 23

15 <210> 46  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cebador

<400> 46  
 25 ggtgcttgcg tcctccacc aa 22

<210> 47  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador

35 <400> 47  
 caaatgagta tggaatgctg gaaaa 25

<210> 48  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador

45 <400> 48  
 gcgccgtgct ccattgattc tg 22

<210> 49  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador

55 <400> 49  
 ggctgtgggc acattgtca cg 22

60 <210> 50  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 50  
 5 ctcagggtca atgccagcgc tt 22  
  
 <210> 51  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 51  
 15 cacccaactg atcttcagca tct 23  
  
 <210> 52  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 52  
 25 ctgctcgggt gacctgtcct a 21  
  
 <210> 53  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 53  
 35 tgagatgttt ttctattca gcaact 26  
  
 <210> 54  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 54  
 45 aacaatgtgt tgacgaacag agtta 25  
  
 <210> 55  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 55  
 55 ctccctgctg gacttgatag ag 22  
  
 <210> 56  
 <211> 22

ES 2 717 253 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 5 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 56  
 ctcagggtca atgccagcgc tt 22  
  
 10 <210> 57  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 57  
 caccacaactg atcttcagca tct 23  
 20  
  
 <210> 58  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 58  
 ccacacaaca tgcgtaccaa gca 23  
 30  
  
 <210> 59  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 59  
 caggcgctgg cgctccgaca 20  
 40  
  
 <210> 60  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 60  
 gtctatggtt atactctctg aaca 24  
 50  
  
 <210> 61  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 61  
 gacaggagga cacaagtcag at 22  
 60  
  
 <210> 62  
 65

# ES 2 717 253 T3

<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> cebador

<400> 62  
10 ctcagggtca atgccagcgc tt 22

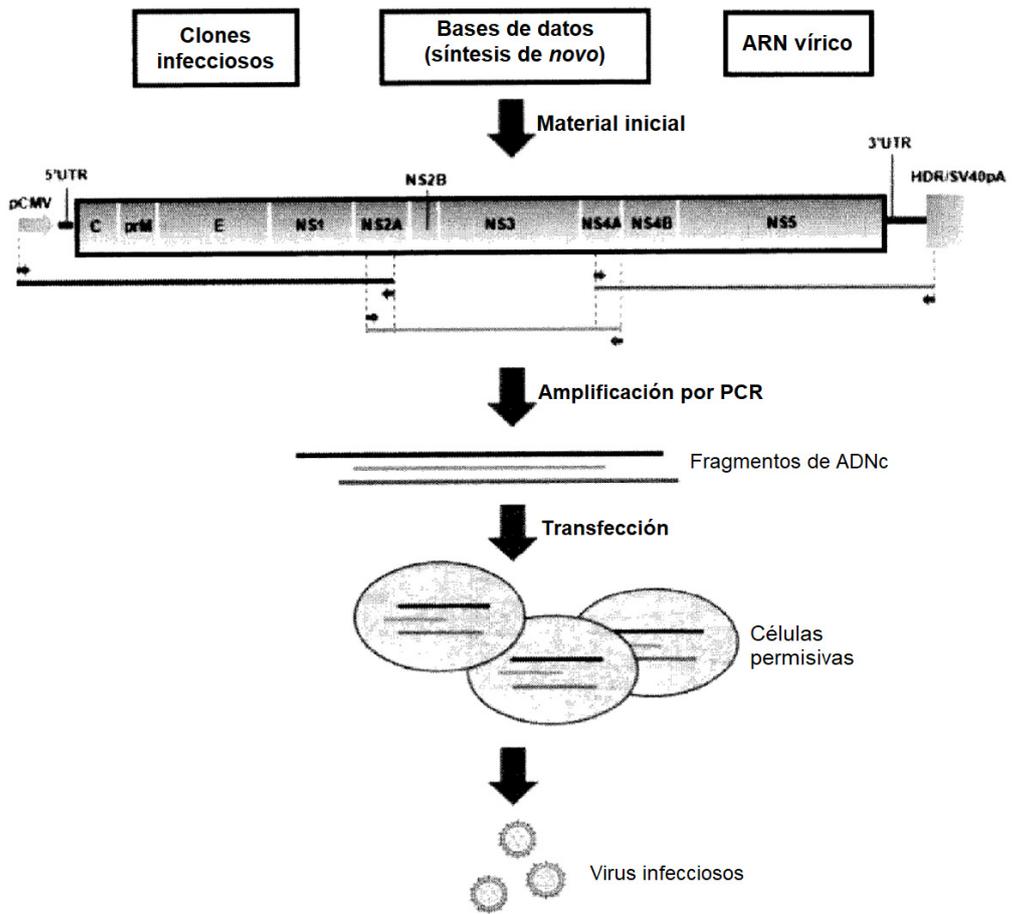
**REIVINDICACIONES**

1. Método para generar un virus de ARN infeccioso que comprende las siguientes etapas:
  - 5 a) la introducción de un promotor de la ARN polimerasa dependiente de ADN en la posición 5' y, opcionalmente, de una secuencia de terminación y de poliadenilación de ARN en la posición 3' del genoma completo de un virus de ARN;
  - b) la amplificación del genoma vírico completo preparado en la etapa a) que incluye dicho promotor y, opcionalmente, dicha secuencia de terminación y de poliadenilación de ARN, en al menos 2, preferentemente al menos 3, 4, 5 o 6 fragmentos de ADNc solapantes;
  - 10 c) la transfección de dichos fragmentos de ADNc en una célula hospedadora,
  - d) la incubación de la célula hospedadora de la etapa c); y
  - e) la recuperación del virus de ARN infeccioso de dicha célula hospedadora incubada;
- 15 en donde dicho virus es un virus de ARN monocatenario positivo.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho virus se selecciona del grupo que consiste en flavivirus, alfavirus y enterovirus.
- 20 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde:
  - dicho flavivirus se selecciona del grupo que consiste en virus de la encefalitis japonesa (JEV); preferentemente una cepa de genotipo I (JEV I) o una cepa de genotipo III (JEV III), virus del Nilo Occidental (WNV), preferentemente una cepa de genotipo 2; virus del Dengue (DENV), preferentemente una cepa de serotipo 4;
  - 25 virus de la fiebre amarilla (YFV), preferentemente una cepa de tipo silvestre; y virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV), preferentemente una cepa de subtipo del Lejano Oriente;
  - dicho alfavirus es preferentemente el virus de Chikungunya;
  - dicho enterovirus es preferentemente el virus de Coxsackie, más preferentemente, el virus de Coxsackie B.
- 30 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde:
  - dicho promotor de la ARN polimerasa dependiente de ADN en la posición 5' es el promotor de citomegalovirus humano (pCMV); y/o
  - dicha secuencia opcional de terminación y de poliadenilación de ARN es, respectivamente, la ribozima delta de la hepatitis y la señal de poliadenilación del virus de simio 40 (HDR/SV40pA).
- 35 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la etapa b) permite la producción de 2 a 15 fragmentos de ADNc solapantes, preferentemente de 3, 4, 5 o 6 fragmentos de ADNc solapantes.
- 40 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha célula hospedadora se selecciona del grupo que consiste en las líneas celulares SW13 y BHK-21 y HEK 293 y Vero.
- 45 7. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, en donde:
  - la etapa c) es una etapa de transfección directa de los fragmentos de ADNc obtenidos tal cual en la etapa b), y
  - dicha etapa c) se produce directamente después de la etapa b).
- 50 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la etapa c) es una etapa de transfección de plásmidos o de vectores que comprenden un fragmento de ADNc obtenido en la etapa b), donde cada fragmento de ADNc está en un plásmido o en un vector individual y distinto.
- 55 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho método comprende adicionalmente una etapa b') después de la etapa b) y antes de la etapa c) de purificación de los fragmentos de ADNc solapantes.
- 60 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la etapa d) de incubación dura de 3 a 9 días.
- 65 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde los fragmentos de ADNc transfectados de la etapa c) se recombinan de manera espontánea en las células hospedadoras durante la etapa de incubación d).
12. El uso del método como se desvela en las reivindicaciones 1 a 11 para el análisis genético inverso.
13. El uso del método como se desvela en las reivindicaciones 1 a 11 para el envío seguro de dicho virus de ARN

infeccioso.

14. Un método para generar *in vivo* un virus de ARN infeccioso que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) la introducción de un promotor de la ARN polimerasa dependiente de ADN en la posición 5' y, opcionalmente, de una secuencia de terminación y de poliadenilación de ARN en la posición 3' del genoma completo de un virus de ARN;
- b) la amplificación del genoma vírico completo preparado en la etapa a) que incluye dicho promotor y, opcionalmente, dicha secuencia de terminación y de poliadenilación de ARN, en al menos 2, preferentemente al menos 3, 4, 5 o 6 fragmentos de ADNc solapantes;
- 10 c') la inoculación de dichos fragmentos de ADNc en un modelo animal no humano; y
- e') la recuperación del virus de ARN infeccioso de una muestra biológica obtenida de dicho animal no humano; en donde dicho virus es un virus de ARN monocatenario positivo.



**Figura 1**