

1 Los parientes cercanos de MERS-CoV en murciélagos usan ACE2 como sus receptores funcionales

2 qingxiong^{1,5}, Lei Cao^{2, 5}, Chengbao Ma^{1,5}, Chen Liu¹, Junyu Si¹, Peng Liu¹, Mengxue Gu¹, Chunli Wang¹,
3 lulú shi¹, FeiTong¹, Meiling Huang¹, Jing Li¹, Chufeng Zhao¹, Chao Shen¹, Yu Chen¹, Huabin Zhao⁴, Ke
4 LAN¹, Xiangxi Wang^{2, 3, *,} Huanyan^{1,*}

5 ¹Laboratorio Estatal Clave de Virología, Instituto de Investigación de Vacunas y Centro de Investigación de Virología Moderna,
6 Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad de Wuhan, Wuhan, Hubei, 430072, China.

7 ²CAS Laboratorio Clave de Infección e Inmunidad, Laboratorio Nacional de Macromoléculas, Instituto de
8 Biofísica, Academia China de Ciencias, Beijing, 100101, China.

9 ³Universidad de la Academia China de Ciencias, Beijing, 100049, China.

10 ⁴Departamento de Ecología, Centro Tibetano para la Ecología y la Conservación en WHU-TU, Laboratorio Clave de Hubei
11 de Homeostasis Celular, Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad de Wuhan, Wuhan 430072, China

12 ⁵Estos autores contribuyeron igualmente a este trabajo.

13 *Correspondencia: huanyan@whu.edu.cn , xiangxi@ibp.ac.cn

14

15 Resumen

dieciséis

El coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) y varios coronavirus de murciélago emplean

17 Dipeptidil peptidasa-4 (DPP4) como sus receptores funcionales¹⁻⁴. Sin embargo, el receptor de NeoCoV,

18 el pariente MERS-CoV más cercano descubierto hasta ahora en murciélagos, sigue siendo enigmático. En este estudio, nosotros

19 descubrió inesperadamente que NeoCoV y su pariente cercano, PDF-2180-CoV, pueden usar de manera eficiente algunos

20 tipos de enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) de murciélago y, menos favorablemente, ACE2 humana para la entrada.

21 Los dos virus usan los dominios carboxilo-terminales de la subunidad S1 de sus picos (S1-CTD) para alta afinidad

22 y unión ACE2 específica de especie. El análisis de microscopía crioelectrónica reveló una novela

23 interfaz de unión coronavirus-ACE2 y una interacción proteína-glucano, distinta de otras conocidas
24 Virus que utilizan ACE2. Identificamos un determinante molecular cercano a la interfaz de unión viral que
25 impide que la ACE2 humana apoye la infección por NeoCoV, especialmente alrededor del residuo Asp338.
26 Por el contrario, NeoCoV infecta eficientemente células humanas que expresan ACE2 después de una mutación T510F en el
27 motivo de unión al receptor (RBM). En particular, la infección no pudo ser neutralizada de forma cruzada por anticuerpos.
28 apuntando a SARS-CoV-2 o MERS-CoV. Nuestro estudio demuestra el primer caso de uso de ACE2 en
29 Virus relacionados con MERS, que arrojan luz sobre una posible amenaza para la bioseguridad de la aparición humana de un
30 ACE2 usando "MERS-CoV-2" con alta tasa de mortalidad y transmisión.

31

32 **Palabras clave:** NeoCoV, PDF-2180-CoV, MERS-CoV, merbecovirus de murciélago, ACE2, DPP4

33

34 **Introducción**

35 Los coronavirus (CoV) son una gran familia de virus de ARN de cadena positiva envueltos clasificados en
36 cuatro géneros: Alpha-, Beta-, Gamma- y Delta-CoV. Generalmente, Alpha y Beta-CoV pueden infectar
37 mamíferos como murciélagos y humanos, mientras que Gamma- y Delta-CoV infectan principalmente aves, ocasionalmente
38 mamíferos⁶⁻⁸. Se cree que los orígenes de la mayoría de los coronavirus que infectan a los humanos se remontan
39 a sus parientes cercanos en los murciélagos, el reservorio animal más importante de coronavirus de mamíferos
40 ^{9,10}. Los coronavirus son bien reconocidos por su capacidad de recombinación y de salto del huésped, lo que ha
41 condujo a los tres brotes principales en las últimas dos décadas causados por SARS-CoV, MERS-CoV y el
42 SARS-CoV-2 más reciente, respectivamente¹¹⁻¹⁴.

43 MERS-CoV pertenece al linaje C de Beta-CoV (Merbecovirus), lo que supone una gran amenaza
44 considerando su alta tasa de letalidad de aproximadamente 35%¹⁵. También se han encontrado merbecovirus

45 en varias especies animales, incluidos camellos, erizos y murciélagos. Aunque los camellos están confirmados
46 hospedadores intermedios del MERS-CoV, murciélagos, especialmente especies de la familia de *Vespertilionidae*, son
47 ampliamente considerado como la fuente evolutiva de MERS-CoV o su ancestro inmediato^{dieciséis}.

48 El reconocimiento del receptor específico de los coronavirus generalmente está determinado por la unión del receptor
49 dominios (RBD) en el extremo carboxilo de la subunidad S1 (S1-CTD) de las proteínas de pico¹⁷.
50 Entre los cuatro receptores de coronavirus bien caracterizados, tres son ectopeptidasas de unión a S1-CTD,
51 incluyendo ACE2, DPP4 y aminopeptidasa N (APN)^{1,18,19}. Por el contrario, el cuarto receptor,
52 molécula de adhesión celular relacionada con antígeno 1 (CEACAM1a), interactúa con el dominio amino-terminal
53 (NTD) de la subunidad espiga S1 del virus de la hepatitis murina^{20,21}. Curiosamente, el mismo receptor puede
54 ser compartido por coronavirus relacionados de forma lejana con RBD estructuralmente distintos. por ejemplo, el
55 NL63-CoV (un alfa-CoV) utiliza ACE2 como receptor de entrada ampliamente utilizado por muchos sarbecovirus
56 (beta-CoV linaje B)²². También se ha encontrado un fenotipo similar de uso de receptores entre géneros en
57 APN, que es compartido por muchos alfa-CoV y un delta-CoV (PDCoV)⁷. En comparación, el uso de DPP4
58 solo se ha encontrado en merbecovirus (beta-CoV linaje C) como HKU4, HKU25 y relacionados
59 son²⁻⁴.

60 Curiosamente, muchos otros merbecovirus no usan DPP4 para la entrada y el uso de su receptor.
61 sigue siendo esquivo, como los coronavirus de murciélago NeoCoV, PDF-2180-CoV, HKU5-CoV y hedgehog
62 coronavirus EriCoV-HKU3^{15,23-25}. Entre ellos, el NeoCoV, que infecta *Neoromicia capensis* en
63 Sudáfrica, representa un merbecovirus de murciélago que resulta ser el pariente más cercano del MERS-CoV
64 (85% de identidad a nivel de genoma completo)^{26,27}. PDF-2180-CoV, otro coronavirus más de cerca

sesenta y cinco relacionado con NeoCoV, infecta *Pipisrellus hesperidus* nativo del suroeste de Uganda^{23,28}. De hecho, NeoCoV

66 y PDF-2180-CoV comparten suficiente similitud con MERS-CoV en la mayor parte del genoma,

67 haciéndolos taxonómicamente la misma especie viral^{27,29}. Sin embargo, sus subunidades S1 son altamente
68 divergente en comparación con MERS-CoV (alrededor de 43-45% de similitud de aminoácidos), de acuerdo con
69 su diferente preferencia de receptor²³.

70 En este estudio, descubrimos inesperadamente que NeoCoV y PDF-2180-CoV usan ACE2 de murciélago como su
71 receptor funcional. La estructura crio-EM de NeoCoV RBD unida con la proteína ACE2
72 desde *Pipistrellus pipistrellus* reveló un nuevo modo de interacción ACE2 que es distinto de cómo
73 ACE2 humano (hACE2) interactúa con los RBD de SARS-CoV-2 o NL63. Aunque NeoCoV
74 y PDF-2180-CoV no pueden usar hACE2 de manera eficiente en función de sus secuencias actuales, el efecto indirecto
75 los eventos de este grupo de virus deben ser monitoreados de cerca, considerando su emergencia humana
76 potencial después de ganar aptitud a través de la deriva antigénica.

77

78 **Resultados**

79 **Evidencia de uso de ACE2**

80 Para arrojar luz sobre la relación entre los merbecovirus, especialmente NeoCoV y PDF-2180-CoV,
81 realizamos un análisis filogenético de las secuencias de una lista de coronavirus humanos y animales.
82 Las reconstrucciones filogenéticas de máxima verosimilitud basadas en secuencias completas del genoma mostraron
83 que NeoCoV y PDF-2180-CoV formaron un clado hermano con MERS-CoV ([Figura 1a](#)). En comparación, el
84 árbol filogenético basado en secuencias de aminoácidos de la subunidad S1 demostró que NeoCoV y
85 PDF-2180-CoV mostró una relación divergente con MERS-CoV pero está estrechamente relacionado con el
86 erizo coronavirus (EriCoV) ([Figura 1b](#)). Se consultó un análisis gráfico de similitud de secuencias (Simplot)
87 por MERS-CoV destacó una región más divergente que codifica S1 para NeoCoV y PDF-2180-CoV
88 en comparación con HKU4-CoV ([Figura 1c](#)). Primero probamos si la DPP4 humana (hDPP4) podría admitir

89 la infección de varios merbecovirus a través de un ensayo de entrada de pseudovirus³⁰. El resultado reveló que
90 solo MERS-CoV y HKU4-CoV mostraron una infección significativamente mejorada de 293T-hDPP4.
91 Inesperadamente, detectamos un aumento significativo de la entrada de NeoCoV y PDF-2180-CoV en
92 293T-hACE2 pero no 293T-hAPN, ambos configurados inicialmente como controles negativos ([figura 1d](#),
93 [Datos extendidos Fig.1](#)).

94 Para validar aún más la posibilidad de un uso más eficiente de bat ACE2, examinamos un bat ACE2
95 biblioteca de células que expresan individualmente ortólogos de ACE2 de 46 especies a lo largo de la filogenia de los murciélagos, como
96 descrito en nuestro estudio anterior³¹([Datos extendidos Figs.2-3](#), [Tabla complementaria 1](#)). Curiosamente,
97 NeoCoV y PDF-2180-CoV, pero no HKU4-CoV o HKU5-CoV, mostraron una entrada eficiente en las células
98 expresando ACE2 de la mayoría de las especies de murciélagos pertenecientes a *Vespertilionidae* (murciélagos vespertinos). Por el contrario, no
99 entrada o entrada muy limitada en células que expresan ACE2 de humanos o murciélagos del *Yinpterochiroptera*
100 grupo ([Fig. 1e-f](#), [datos extendidos Fig.4](#)). De acuerdo con los informes anteriores, la infección de
101 NeoCoV y PDF-2180-CoV podrían mejorar notablemente con una tripsina exógena
102 tratamiento²⁸([Datos extendidos Fig.5](#)). Según lo indicado por el ensayo de fusión basado en proteína dividida dual (DSP)³²,
103 Bat37ACE2 desencadena una fusión de membrana celular más eficiente que hACE2 en presencia de
104 Expresión de la proteína del pico de NeoCoV ([Figura 1g-h](#)). Cabe destacar el fallo del ACE2 humano o hedgehog
105 para respaldar la entrada de EriCoV-HKU31 indica que estos virus tienen un receptor diferente
106 uso ([Datos extendidos Fig.6](#)). De acuerdo con un estudio previo^{23,28}, nuestros resultados contra el
107 posibilidad de que DPP4 de murciélago actúe como receptor de NeoCoV y PDF-2180-CoV, ya que ninguno de los probados
108 Ortólogos DPP4, de los murciélagos vesper cuyos ACE2 son altamente eficientes para apoyar la entrada de viales,
109 podría admitir una entrada detectable de NeoCoV y PDF-2180-CoV ([Fig. 1i](#), [datos extendidos Fig.7](#)).
110 También se realizaron ensayos de infección usando otros tipos de células de diferentes especies, incluyendo

111 una línea celular de murciélago Tb 1 Lu, que expresa ectópicamente ACE2 o DPP4 de Bat40 (*Antrozous pallidus*), y

112 cada prueba arrojó resultados similares ([Datos extendidos Fig.8](#)).

113

114 **Unión específica de especie mediada por S1-CTD**

115 La incapacidad de NeoCoV y PDF-2180-CoV para usar DPP4 es consistente con su altamente divergente

116 Secuencia S1-CTD comparada con MERS-CoV y HKU4-CoV. Producimos S1-CTD-hFc

117 proteínas (RBD putativo fusionado con el dominio Fc de IgG humana) para verificar si sus S1-CTD son

118 responsable de la unión del receptor ACE2. El ensayo de unión de células vivas basado en células que expresan varios

119 bat ACE2 mostró un patrón de utilización específico de la especie de acuerdo con los resultados del

120 ensayos de entrada de pseudovirus ([Figura 2a](#)). La unión específica de varios murciélagos representativos ACE2 también fue

121 verificado por citometría de flujo ([Figura 2b](#)). Determinamos además la afinidad de unión por Bio-Layer

122 Análisis de interferometría (BLI). Los resultados indicaron que ambos virus se unen a la ACE2

123 desde *Pipistrellus pipistrellus* (Bat37) con la mayor afinidad ($K_D=1.98\text{nM}$ para NeoCoV y 1.29

124 nM para PDF-2180-CoV). Por el contrario, sus afinidades por hACE2 estaban por debajo del límite de detección de nuestro

125 Análisis BLI ([Fig. 2c](#), [datos extendidos Fig.9](#)). Un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) también

126 demostró la fuerte unión entre NeoCoV/PDF-2180-CoV S1-CTDs y Bat37ACE2, pero

127 no hACE2 ([Figura 2d](#)). En particular, como las secuencias ACE2 de los anfitriones de NeoCoV y PDF-2180-CoV

128 son desconocidos, Bat37 representa el pariente más cercano del anfitrión de PDF-2180-CoV (*Pipisrello*

129 *hesperidus*) en nuestro estudio. La afinidad de unión se verificó aún más mediante la neutralización competitiva.

130 ensayos que utilizan proteínas de ectodominio ACE2 solubles o proteínas virales S1-CTD-hFc. De nuevo, el soluble

131 Bat37ACE2 mostró la mayor actividad para neutralizar la infección viral causada por ambos virus ([Higo.](#)

132 [2e-f](#)). Además, NeoCoV-S1-CTD-hFc también podría neutralizar de forma potente NeoCoV y PDF-2180-CoV

133 infecciones de células que expresan Bat37ACE2 ([Figura 2g](#)). Además, demostramos el papel central de
134 S1-CTD en el uso de receptores mediante la construcción de virus quiméricos y probándolos para detectar receptores alterados
135 uso. Como era de esperar, el uso de batACE2 se cambió a uso de hDPP4 para un NeoCoV quimérico con CTD,
136 pero no NTD, secuencias reemplazadas por su contraparte MERS-CoV ([Fig. 2h](#)). Estos resultados confirmaron
137 que S1-CTD de NeoCoV y PDF-2180-CoV son RBD por su interacción específica de especie con
138 ACE2.

139

140 **Base estructural de la unión ACE2**

141 Para desvelar los detalles moleculares de la unión virus-ACE2, llevamos a cabo estudios estructurales
142 investigaciones del Bat37ACE2 en complejo con el NeoCoV y PDF-2180-CoV RBD. 3D
143 clasificación reveló que el complejo NeoCoV-Bat37ACE2 adopta principalmente un dimérico
144 configuración con dos copias de ACE2 unidas a dos RBD, mientras que solo un monomérico
145 conformación se observó en el Complejo PDF-2180-CoV-Bat37ACE2 ([higos. 3a-b, Extendido](#)
146 [Datos Fig. 10-11](#)). Determinamos las estructuras de estos dos complejos a una resolución de 3.5Å
147 y 3.8 Å, respectivamente, y realizó un refinamiento local para mejorar aún más las densidades alrededor del
148 interfaz vinculante, que permite un análisis fiable de los detalles de la interacción ([higos. 3a-b, datos extendidos](#)
149 [Fig. 12-13 y Tabla 1-2](#)). A pesar de existir en diferentes estados oligoméricos, las estructuras revelaron
150 que tanto NeoCoV como PDF-2180-CoV reconocieron el Bat37ACE2 de una manera muy similar. Nosotros usamos
151 la estructura NeoCoV-Bat37ACE2 para un análisis detallado ([higos. 3a-b y datos extendidos Fig. 14](#)).
152 Como otras estructuras de homólogos, la estructura NeoCoV RBD comprende un subdominio central
153 ubicado lejos del ACE2 atractivo y un subdominio externo que reconoce el receptor
154 ([Fig. 3c y datos extendidos Fig. 15](#)). El subdominio externo es una estructura enriquecida en cadenas con

155 cuatro hebras β antiparalelas (β_6 – β_9) y expone una punta plana de cuatro hebras para ACE2
156 compromiso ([Figura 3c](#)). Por el contrario, el MERS-CoV RBD reconoce la superficie lateral del DPP4
157 hélice β a través de su hoja de hoja de cuatro hilos ([Figura 3c](#)). La base estructural de las diferencias en
158 El uso del receptor se puede inferir de dos características: i) la configuración local de la cadena de cuatro cadenas
159 hoja en el dominio externo de NeoCoV muestra un cambio conformacional de η_3 y β_8 que interrumpe el
160 cara de hoja plana para encuadración DPP4 y ii) bucles 6-7 y 8-9 relativamente más largos observados en
161 MERS-CoV afecta su unión en la cavidad poco profunda del murciélago ACE2 ([Fig. 3c y datos extendidos](#)
162 [Figura 15](#)).

163 En el NeoCoV-Bat37ACE2 estructura compleja, áreas de superficie relativamente más pequeñas (498 Å² en
164 NeoCoV RBD y 439 Å² en Bat37ACE2) están enterrados por las dos entidades vinculantes en comparación con
165 sus contrapartes en el complejo MERS-CoV-DPP4 (880 Å² en MERS-CoV RBD y 812 Å² en
166 DPP4; 956 Å² en SARS-CoV-2 RBD y 893 Å² en hACE2). El NeoCoV RBD inserciones en una
167 depresión apical construida por hélices α_{11} , α_{12} y un bucle que conecta α_{12} y β_4 de Bat37ACE2
168 a través de su punta de hoja de cuatro hilos ([Fig. 3d y tabla de datos extendida. 2](#)). Examen adicional de
169 la interfaz de unión reveló un grupo de residuos hidrofílicos en el sitio, formando una red de
170 red de contactos polares (enlace H y puente salino) e interacciones hidrofóbicas. estos polares
171 las interacciones están mediadas predominantemente por los residuos N504, N506, N511, K512 y R550
172 del NeoCoV RBM y residuos T53, E305, T334, D338, R340 de Bat37ACE2 ([figura 3d,](#)
173 [Tabla de datos extendida. 2](#)). En particular, el grupo metilo de los residuos A509 y T510 del NeoCoV
174 RBM están parcialmente involucrados en la formación de un bolsillo hidrofóbico con residuos F308, W328, L333,
175 e I358 de Bat37ACE2 en la interfaz. Una sustitución de T510 por F en el PDF-2180-CoV
176 RBM mejora aún más las interacciones hidrofóbicas, lo que es consistente con una mayor unión

177 afinidad observada para esta mutación puntual ([higos. 3d, Tabla de datos extendida. 2](#)). Aparte de
178 contactos proteína-proteína, los glucanos de ACE2 de murciélago en las posiciones N54 y N329 intercalan las hebras
179 ($\beta 8$ - $\beta 9$), formando interacciones π - π con W540 y enlaces de hidrógeno con N532, G545 y R550
180 del NeoCoV RBD, que sustenta las asociaciones virus-receptor ([Fig. 3d y datos extendidos](#)
181 [Mesa. 2](#)).

182 Los residuos críticos se verificaron introduciendo mutaciones y probando su efecto sobre el receptor.
183 Unión y entrada viral. Como era de esperar, las mutaciones N504F/N506F, N511Y y R550N en el NeoCoV
184 RBD, aboliendo los contactos polares o introduciendo choques estéricos, resultó en una reducción significativa de
185 Unión a RBD y entrada viral ([Figura 3e-f](#)). De manera similar, la mutación E305K en Bat37ACE2 eliminando el
186 puente salino también perjudicó significativamente la función del receptor. Además, el efecto de pérdida de función de
187 la mutación N54A en Bat37ACE2 que abolía la N-glicosilación en el residuo 54 confirmó la
188 importancia de la interacción particular proteína-glicano en el reconocimiento viral-receptor. En comparación,
189 N329A que abolía la N-glicosilación en el sitio N329, ubicado lejos de la interfaz de unión, tenía
190 ningún efecto significativo sobre la función del receptor ([Figura 3g-h](#)).

191

192 **Evaluación del potencial zoonótico**

193 Una preocupación importante es si NeoCoV y PDF-2180-CoV podrían saltar la barrera de las especies y
194 infectar a los humanos. Como se mencionó anteriormente, NeoCoV y PDF-2180-CoV no pueden interactuar de manera eficiente con
195 ACE2 humano. Aquí primero examinamos los determinantes moleculares que restringen hACE2 de
196 apoyando la entrada de estos virus. Al comparar la interfaz de enlace de los otros tres
197 Los coronavirus que usan hACE2, encontramos que el SARS-CoV, el SARS-COV-2 y el NL63 comparten
198 regiones de interacción que apenas se superponen con la región involucrada por NeoCoV ([Figura 4a](#)). Análisis de

199 las interfaces de unión superpuestas revelan un punto caliente de uso común alrededor de los residuos 329-330
200 ([Figura 4b](#)). A través de la alineación de secuencias y el análisis estructural de hACE2 y Bat37ACE2,
201 predijo que el uso ineficiente de hACE2 para la entrada de los virus podría atribuirse a
202 residuos incompatibles ubicados alrededor de las interfaces de unión, especialmente la diferencia en las secuencias
203 entre los residuos 337-342 ([Figura 4c](#)). Reemplazamos estos residuos de hACE2 con los de la
204 Contrapartes de Bat37ACE2 para probar esta hipótesis ([Figura 4c-d](#)). La sustitución condujo a aproximadamente
205 Aumento de 15 y 30 veces en la eficiencia de entrada de NeoCoV y PDF-2180-CoV, respectivamente,
206 confirmando que esta región es crítica para la determinación del rango de hospedantes. Más fino
207 La disección reveló que N338 es el residuo más crucial en la restricción del uso del receptor humano ([Higo](#).
208 [4e-g](#)).

209 Además, evaluamos el potencial zoonótico de NeoCoV y PDF-2180-CoV al identificar el
210 determinantes moleculares de RBM viral, lo que podría permitir la transmisión entre especies a través de
211 participación de hACE2. Después de examinar meticulosamente los residuos críticos basados en las estructuras complejas
212 y herramienta de predicción computacional mCSM-PPI₂₃₃ ([Fig. 4h](#), [Tabla de datos extendida. 4](#)), predijimos
213 el aumento de la hidrofobicidad alrededor del residuo T510 de NeoCoV podría mejorar el receptor del virus
214 interacción en hACE2 ([Figura 4 i](#)). Curiosamente, el PDF-2180-CoV ya tiene un F511
215 (correspondiente al sitio 510 de NeoCoV), lo cual es consistente con su afinidad ligeramente mayor con humanos
216 ACE2 ([Datos extendidos Fig.16](#)). Como era de esperar, las sustituciones de T510F en NeoCoV aumentaron notablemente
217 su afinidad de unión con hACE2 ($K_D = 16,9$ nM) y una ganancia significativa de infectividad en 293T-hACE2
218 células ([Fig. 4 jk](#), [datos extendidos Fig. 17-18](#)). Sin embargo, PDF-2180-CoV mostró mucho menor
219 eficiencia en el uso de hACE2 que NeoCoV-T510F, lo que indica que otros residuos desfavorables están restringiendo
220 su interacción eficiente con hACE2. De hecho, una mutación G a A (correspondiente a A509 en NeoCoV)

221 en el sitio 510, aumentando la hidrofobicidad local, restauró parcialmente su afinidad con hACE2 (Figura 4 jk). En
222 Además, el NeoCoV-T510F puede ingresar a la línea de células de colon humano Caco-2 con mucho mayor
223 eficiencia que el NeoCoV de tipo salvaje. Entra en el Caco-2 exclusivamente a través de ACE2 como la infección
224 puede ser neutralizado por un anticuerpo neutralizante H11B11 dirigido a ACE2³⁴ (Figura 4l). humorístico
225 la inmunidad provocada por una infección previa o la vacunación de otros coronavirus podría ser inadecuada para
226 proteger a los humanos de las infecciones por NeoCoV y PDF-2180-CoV porque ni los antiseros contra el SARS-CoV-2
227 ni diez nanocuerpos anti-MERS-CoV probados pueden inhibir de forma cruzada la infección causada por estos dos
228 virus³⁵. (Figura 4m-n).

229

230 **Discusión:**

231 La falta de conocimiento de los receptores de los coronavirus de murciélago ha limitado en gran medida nuestra comprensión de
232 estos patógenos de alto riesgo. Nuestro estudio proporcionó evidencia de que los familiares de posibles MERS-CoV
233 antecesores como NeoCoV y PDF-2180-CoV involucran bat ACE2 para una entrada celular eficiente. Sin embargo,
234 HKU5-CoV y EriCoV parecen no usar bat DPP4 o hedgehog ACE2 para la entrada, destacando el
235 complejidad de la utilización del receptor de coronavirus. Fue inesperado que NeoCoV y
236 PDF-2180-CoV usa ACE2 en lugar de DPP4 como sus receptores de entrada desde sus estructuras centrales RBD
237 parecerse más al MERS-CoV que a otros virus que usan ACE2 (Fig. 4a, datos extendidos Fig. 15).

238 El uso de diferentes receptores puede afectar la tasa de transmisión de los virus. aunque queda
239 no está claro si el uso de ACE2 supera el uso de DPP4 para una transmisión más eficiente, MERS-CoV
240 parece tener una transmisibilidad más baja con un R0 estimado de alrededor de 0,69. Comparativamente, el ACE2
241 el uso ha sido aprobado capaz de lograr una alta transmisibilidad. El R0 estimado del SARS-CoV-2 es
242 alrededor de 2,5 para la tinción original, 5,08 para la variante delta e incluso más para el omicron

243 variante³⁶⁻³⁸. Este uso inesperado de ACE2 de estos parientes cercanos de MERS-CoV destaca un problema latente
244 riesgo de bioseguridad, considerando una combinación de dos características potencialmente dañinas de alta letalidad
245 observado para MERS-CoV y la alta tasa de transmisión observada para SARS-CoV-2. Además, nuestro
246 Los estudios muestran que las vacunas actuales contra el COVID-19 son inadecuadas para proteger a los humanos de cualquier
247 eventualidad de las infecciones causadas por estos virus.

248 Muchos sarbecovirus, alfa-CoV NL63 y un grupo de merbecovirus informados en este estudio
249 compartir ACE2 para entrada celular. Nuestro análisis estructural indica NeoCoV y PDF-2180-CoV unirse a
250 una superficie lateral apical de ACE2, que es diferente de la superficie ocupada por otros que usan ACE2
251 coronavirus ([Figura 4a](#)). La interacción se caracteriza por enlaces intermoleculares de proteínas y glicanos formados
252 por la glicosilación en N54, que no se encuentra en las interacciones RBD-receptor de otros coronavirus.
253 Los diferentes modos de interacción de los tres coronavirus que usan ACE2 indican una historia de múltiples
254 eventos de adquisición de receptores independientes durante la evolución²². La ventaja evolutiva de ACE2
255 el uso en diferentes CoV sigue siendo enigmático.

256 Nuestros resultados respaldan la hipótesis anterior de que el origen del MERS-CoV podría ser el resultado de
257 un evento de recombinación intra-pico entre un virus similar a NeoCoV y un virus que usa DPP4²⁶. ARN
258 la recombinación puede ocurrir durante la coinfección de diferentes coronavirus, dando lugar a un nuevo virus
259 con diferentes usos de receptores y tropismos del hospedador^{39,40}. No está claro si el evento tuvo lugar.
260 en murciélagos o camellos, y dónde ocurrió el cambio de anfitrión. Aunque los merbecovirus de murciélago son
261 Geográficamente extendidos, los dos merbecovirus conocidos que usan ACE2 están habitados en África.
262 Además, la mayoría de los camellos en la Península Arábiga que muestran evidencia serológica de antecedentes
263 La infección por MERS-CoV se importa del Gran Cuerno de África con varias Neoromicia
264 especies⁴¹. Teniendo en cuenta que ambos virus son ineficientes para infectar células humanas en su forma actual, el

265 la adquisición del dominio de unión de hDPP4 sería un evento crítico que impulsaría la aparición de
266 MERS-CoV. Serán necesarios más estudios para obtener más evidencia sobre el origen de
267 MERS-CoV.

268 Los determinantes del rango de huéspedes en ACE2 son barreras para la transmisión entre especies de estos
269 virus. Nuestros resultados muestran que NeoCoV y PDF-2180-CoV favorecen a ACE2 de murciélagos del
270 *Yangochiropter* grupo, especialmente murciélagos vesper (*Vespertilionidae*), donde pertenece su anfitrión, pero
271 no ortólogos ACE2 de murciélagos del *Yinpterochiropter* grupo. Curiosamente, la mayoría de los merbecovirus
272 se encontraron en especies pertenecientes a la *Vespertilionidae* un grupo muy diverso y ampliamente
273 familia distribuida⁹. Aunque los dos virus no pudieron usar hACE2 de manera eficiente, nuestro estudio también revela
274 que la sustitución de un solo residuo que aumenta la hidrofobicidad local alrededor del sitio 510 podría mejorar su
275 afinidad por hACE2 y les permite infectar células humanas que expresan ACE2. Considerando el
276 mutaciones extensas en las regiones RBD de las variantes SARS-CoV-2, especialmente las fuertemente mutadas
277 variante omicron, estos virus pueden tener un potencial latente para infectar a los humanos a través de una mayor adaptación
278 a través de la deriva antigénica^{42,43}. También es muy probable que sus parientes con potencial de emergencia humana sean
279 circulando en algún lugar de la naturaleza.

280 En general, identificamos ACE2 como un receptor funcional buscado durante mucho tiempo del potencial MERS-CoV
281 ancestros en murciélagos, lo que facilita la investigación en profundidad de estos importantes virus con zoonosis
282 riesgos de emergencia. Nuestro estudio se suma al conocimiento sobre el complejo uso del receptor de
283 coronavirus, destacando la importancia de la vigilancia y la investigación sobre estos virus para preparar
284 para posibles brotes en el futuro.

285

286 **Información suplementaria**

287

288 **Métodos**

289 **Secuencias de virus y receptores.** La adquisición de secuencias de 46 murciélagos ACE2 y hACE fueron
290 descrito en nuestro estudio anterior³¹. Las cinco secuencias DPP4 y hDPP4 de murciélago se recuperaron directamente
291 de la base de datos GenBank (humano DPP4, NM_001935.3; Bat37, *Pipistrellus pipistrellus*,
292 KC249974.1) o extraídos de ensamblajes de secuencias del genoma completo de las especies de murciélagos recuperadas de
293 la base de datos GenBank (Bat25, *Sturnira hondurensis*, GCA_014824575.2; Bat29, *Mormoops*
294 *blainvillei*, GCA_004026545.1; Bat36, *Aeorestes cinereus*, GCA_011751065.1; Bat40, *antrozous*
295 *pálido*, GCA_007922775.1). Las secuencias del genoma completo de diferentes coronavirus fueron
296 recuperado de la base de datos GenBank. Los números de acceso son los siguientes: MERS-CoV
297 (JX869059.2), camello MERS-CoV KFU-HKU 19 Dam (KJ650296.1), HKU4 (NC_009019.1), HKU5
298 (NC_009020.1), *ErinaceusCoV/HKU31 cepa F6* (MK907286.1), *NeoCoV* (KC869678.4),
299 *PDF-2180-CoV* (NC_034440.1), *ErinaceusCoV/2012-174* (NC_039207.1), *BtVs-BetaCoV/SC2013*
300 (KJ473821.1), *BatCoV/H.savii/Italia* (MG596802.1), *BatCoV HKU25* (KX442564.1), *BatCoV*
301 *ZC45* (MG772933.1) y *SARS-CoV-2* (NC_045512.2), NL63 (JX504050.1) 229E (MT797634.1).
302 Todas las secuencias de genes utilizadas en este estudio fueron sintetizadas comercialmente por Genewiz. Las fuentes,
303 los números de acceso y las secuencias de los receptores y virus se resumieron en [Suplementario](#)
304 [tabla 1](#).

305

306 **Colección de antisueros SARS-CoV-2.** Todos los sueros vacunados se recolectaron de voluntarios aproximadamente
307 21 días después de la tercera dosis de la vacuna inactivada SARS-COV-2 aprobada por la OMS (CorovaVac,

308 Sinovac, China). Todos los voluntarios recibieron formularios de consentimiento informado por escrito, y todo el estudio

309 se realizó siguiendo los requisitos de las Buenas Prácticas Clínicas de China.

310

311 **Análisis bioinformático.** La alineación de la secuencia de proteínas se realizó utilizando el algoritmo MUSCLE

312 por el software MEGA-X (versión 10.1.8). Para el análisis filogenético, secuencias de nucleótidos o proteínas de

313 los virus se alinearon primero usando el algoritmo Clustal W y MUSCLE, respectivamente. Entonces,

314 los árboles filogenéticos se generaron utilizando el método de máxima verosimilitud en MEGA-X (1000

315 Bootstraps). Se aplicaron el modelo y los demás parámetros utilizados para el análisis filogenético

316 siguiendo las recomendaciones después de encontrar los mejores modelos de ADN/proteína por el software. El

317 La similitud de nucleótidos de los coronavirus se analizó mediante el software SimPlot (versión 3.5.1) con una diapositiva

318 tamaño de ventana de 1000 nucleótidos y un tamaño de paso de 100 nucleótidos usando alineaciones separadas

319 y el modelo de distancia Kimura (2 parámetros).

320

321 **plásmidos.** Secuencias optimizadas por codones humanos de varios ortólogos de ACE2 o DPP4 y sus mutantes

322 fueron clonados en un vector de transferencia lentiviral (pLVX-IRES-puro) con una etiqueta C-terminal 3xFlag

323 (DYKDHD-G-DYKDHD-I-DYKDDDDK). Las secuencias de ADN de codones humanos optimizados

324 Proteína NeoCoV S (AGY29650.2), proteína PDF-2180-CoV S (YP_009361857.1), HKU4-CoV S

325 proteína (YP_001039953.1), proteína HKU5-CoV S (YP_001039962.1), Proteína HKU31 S

326 (QGA70692.1), SARS-CoV-2 (YP_009724390.1) y proteína MERS-CoV S (YP_009047204.1)

327 fueron clonados en el vector pCAGGS con una delección de 13-15 aminoácidos C-terminal (correspondiente

328 a 18 aminoácidos en SARS-CoV-2) o reemplazo por una etiqueta HA (YPYDVPDYA) para mayor VSV

329 eficiencia de pseudotipado⁴⁴. Los plásmidos que expresan proteínas de fusión de coronavirus RBD-IgG-hFc fueron

330 generado al insertar las secuencias de codificación de NeoCoV RBD (aa380-585), PDF-2180-CoV RBD
331 (aa381-586), HKU4-CoV (aa382-593), HKU5-CoV RBD (aa385-586), HKU31-CoV RBD
332 (aa366-575), SARS-CoV-2 RBD (aa331-524) y MERS-CoV RBD (aa377-588) en el pCAGGS
333 vector con una secuencia principal de secreción de CD5 N-terminal (MPMGSLQPLATLYLLGMLVASVL).
334 Los plásmidos que expresan proteínas solubles de murciélago ACE2 y DPP4 se construyeron insertando el
335 secuencias codificantes del ectodominio en el vector pCAGGS con la secuencia líder de CD5 N-terminal y
336 C-terminal estrepococo gemelo etiqueta **y** 3×Bandera etiqueta **tándem** secuencias
337 (WSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK-GGGRS-DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK).

338 Las proteínas de pico de virus o mutantes o quimeras relacionados con el receptor se generaron mediante PCR superpuesta.

339 Para el ensayo de fusión célula-célula basado en proteína dividida dual (DSP), las proteínas divididas indicadoras duales fueron

340 expresado **por** pLVX-IRES-puro **vector** **expresando** **el** RLuc^{aa1-155}-GFP^{1-7(aa1-157)} **y**

341 GFP^{8-11(aa158-231)}-RLuc-aa¹⁵⁶⁻³¹¹ plásmidos, que se construyeron en el laboratorio sobre la base de un

342 estudio^{32,45}. Los plásmidos que expresan el anticuerpo anti-ACE2 optimizado por codón (H11B11; GenBank

343 códigos de acceso MZ514137 y MZ514138) se construyeron insertando la cadena pesada y

344 secuencias de codificación de cadena ligera en el vector pCAGGS con secuencias líder de CD5 N-terminal,

345 respectivamente³⁴. Para las proteínas de fusión anti-MERS-CoV nanobody-hFc, las secuencias de codificación de nanobody fueron

346 sintetizado y clonado en el vector pCAGGS con secuencias líder de CD5 N-terminal y

347 Etiquetas hFc C-terminal ³⁵.

348

349 **Expresión y purificación de proteínas.** Las proteínas de fusión RBD-hFc (S1-CTD-hFc) del SARS-CoV-2,

350 MERS-CoV, HKU4-CoV, HKU5-CoV, HKU31-CoV, NeoCoV y PDF-2180-CoV, y el

351 Las proteínas ACE2 solubles de humanos, Bat25, Bat29, Bat36, Bat37, Bat38 y Bat40 se expresaron mediante

352 293T transfectando los plásmidos correspondientes con el reactivo GeneTwin (Biomed, TG101-01)
353 siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Cuatro horas después de la transfección, el medio de cultivo de la
354 las células transfectadas se repusieron con medio de expresión SMM 293-TII (Sino Biological, M293TII).
355 El sobrenadante del medio de cultivo que contenía las proteínas se recogió cada 2-3 días. El
356 proteínas recombinantes RBD-hFc fueron capturadas por Pierce Protein A/G Plus Agarose (Thermo
357 Scientific, 20424), lavado con tampón de lavado W (100 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM
358 EDTA), eluido con tampón de glicina pH 3,0 (100 mM en H₂O), y luego inmediatamente balanceado por
359 UltraPure 1M Tris-HCl, pH 8,0 (15568025, Thermo Scientific). La etiqueta twin-strep que contiene
360 proteínas fueron capturadas por la resina de alta capacidad Strep-Tactin XT 4Flow (IBA, 2-5030-002), lavadas por
361 tampón W, y se eluyó con tampón BXT (100 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA,
362 biotina 50 mM). Las proteínas eluidas se pueden concentrar y cambiar de tampón a PBS mediante
363 ultrafiltración. Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante el ensayo de proteínas Omni-Easy Instant BCA
364 Kit (Epizima, ZJ102). Las proteínas purificadas se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C. Para crio-EM
365 análisis, NeoCoV RBD (aa380-588), PDF-2018-CoV RBD (381-589) y Bat37ACE2 (aa21-730)
366 fueron sintetizados y subclonados en el vector pCAGGS con una etiqueta twin-strep C-terminal. Brevemente,
367 estas proteínas se expresaron mediante transfección transitoria de 500 ml de células HEK Expi 293F (Gibco,
368 Thermo Fisher, A14527) usando polietilenimina Max Mw 40,000 (policiencias). La resultante
369 las muestras de proteínas se purificaron aún más mediante cromatografía de exclusión por tamaño utilizando un Superdex 75 10/300
370 Columna de aumento (GE Healthcare) o una columna de aumento Superdex 200 10/300 (GE Healthcare) en
371 HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5. Para complejo RBD-receptor (NeoCoV RBD-Bat37ACE2 /
372 PDF-2180-CoV RBD-Bat37ACE2), NeoCoV RBD o PDF-2180-CoV RBD se mezcló con
373 Bat37ACE2 en una proporción de 1,2:1, se incubó durante 30 minutos en hielo. A continuación, la mezcla se sometió a

374 cromatografía de filtración en gel. Las fracciones que contenían el complejo se recogieron y concentraron a 2
375 mg/ml.

376

377 **Cultivo de células.** 293T (CRL-3216), células VERO E6 (CRL-1586), A549 (CCL-185), BHK-21 (CCL-10),
378 y Huh-7 (PTA-4583), Caco2 (HTB-37) y la línea celular epitelial de murciélago Tb 1 Lu (CCL-88) fueron
379 adquirido de American Type Culture Collection (ATCC) y cultivado en Dulbecco's Modified
380 Eagle Medium, (DMEM, Monad, China) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, 2,0 mM
381 de L-glutamina, 110 mg/L de piruvato de sodio y 4,5 g/L de D-glucosa. Un hibridoma I1
382 (CRL-2700) línea celular que secreta un anticuerpo monoclonal de ratón neutralizante contra el VSV
383 glicoproteína (VSVG) se cultivó en Medio Mínimo Esencial con sales de equilibrio de Earles y
384 2,0 mM de L-glutamina (Gibico) y FBS al 10%. Todas las células fueron cultivos a 37 °C en 5 % de CO₂ con el
385 paso regular de cada 2-3 días. Líneas celulares estables 293T que sobreexpresan ortólogos de ACE2 o DPP4
386 se mantuvieron en un medio de crecimiento suplementado con 1 µg/ml de puromicina.

387

388 **Generación de líneas celulares estables.** Las líneas celulares estables que sobreexpresaban los ortólogos de ACE2 o DPP4 se
389 generada por transducción de lentivirus y selección de antibióticos. Específicamente, el lentivirus portador del
390 el gen objetivo se produjo por cotransfección del vector de transferencia lentiviral (pLVX-EF1a-Puro, Genewiz)
391 y plásmidos de empaquetamiento pMD2G (Addgene, plásmido n.º 12259) y psPAX2 (Addgene, plásmido
392 n.º 12260) en células 293T a través del reactivo de transfección Lip2000 (Biosharp, BL623B). El
393 Se recogió el sobrenadante que contenía lentivirus y se agrupó a las 24 y 48 horas después de la transfección. 293T
394 las células fueron transducidas por el lentivirus después de 16 horas en presencia de 8 µg/ml de polibreno. Células estables

395 fueron seleccionados y mantenidos en el medio de crecimiento con puromicina (1-2 $\mu\text{g/ml}$). Celdas seleccionadas para
396 al menos diez días se consideraron líneas celulares estables y se usaron en diferentes experimentos.

397

398 **Preparación de muestras Cryo-EM y recopilación de datos.** Para la preparación de muestras Cryo-EM, el NeoCoV

399 El complejo RBD-Bat37ACE2 o PDF-2018-CoV RBD-Bat37ACE2 se diluyó a 0,5 mg/ml.

400 La rejilla de oro de carbono sagrado (Cflat R1.2/1.3 mesh 300) se descargó recientemente con un Solarus 950

401 limpiador de plasma (Gatan) por 30s. Se transfirió una alícuota de 3 μL del complejo de mezcla a las rejillas,

402 se secó con papel de filtro a 16 $^{\circ}\text{C}$ y 100 % de humedad y se sumergió en el etano usando un Vitrobot

403 Marca IV (FEI). Para estos complejos, se recolectaron micrografías a 300 kV usando un Titan Krios

404 microscopio (Thermo Fisher), equipado con un detector K2 (Gatan, Pleasanton, CA), utilizando SerialEM

405 software de recopilación de datos automatizado. Películas (32 fotogramas, cada 0,2 s, dosis total $60\text{e}^{-\text{Å}^{-2}}$) fueron grabados

406 a un tamaño de píxel final de 0,82 Å con un desenfoque de entre -1,2 y -2,0 μm .

407

408 **Procesamiento de imágenes.** Para el complejo NeoCoV RBD-Bat37ACE2, se tomaron un total de 4234 micrografías.

409 grabado. Para el complejo PDF-2018-CoV RBD-Bat37ACE2, se tomaron un total de 3298 micrografías.

410 grabado. Ambos conjuntos de datos se procesaron de manera similar. En primer lugar, los datos brutos fueron procesados por

411 MotionCor2, que se alinearon y promediaron en imágenes sumadas con corrección de movimiento. Entonces la

412 el valor de desenfoque para cada micrografía se determinó usando Gctf. A continuación, las partículas fueron recogidas y

413 extraído para la alineación bidimensional. Las partículas parciales bien definidas fueron seleccionadas para la inicial

414 reconstrucción del modelo en Relion⁴⁶. El modelo inicial se usó como referencia para la tridimensionalidad.

415 clasificación. Después del refinamiento y el procesamiento posterior, la resolución general de PDF-2018-CoV

416 El complejo RBD-Bat37ACE2 fue de hasta 3,8 Å según la correlación de capa de Fourier estándar de oro

417 (umbral = 0,143)⁴⁷. Para el complejo NeoCoV RBD-Bat37ACE2, se amplió la simetría C2
418 antes del refinamiento 3D. Finalmente, se subió la resolución del complejo NeoCoV RBD-Bat37ACE2
419 a 3,5 Å. La calidad de la resolución local fue evaluada por ResMap⁴⁸.

420

421 **Construcción y refinamiento de modelos.** Las estructuras complejas NeoCoV RBD-Bat37ACE2 fueron
422 construido manualmente en los mapas refinados en COOT⁴⁷. Los modelos atómicos fueron refinados aún más por
423 refinamiento posicional y de factor B en espacio real usando Phenix⁴⁸. Para el PDF-2018-CoV
424 Construcción de modelo complejo RBD-Bat37ACE2, el complejo de refinamiento NeoCoV RBD-Bat37ACE2
425 las estructuras se acoplaron manualmente en los mapas refinados utilizando UCSF Chimera y se corrigieron aún más
426 manualmente por refinamiento del espacio real en COOT. Del mismo modo, los modelos atómicos fueron refinados aún más por
427 utilizando Fénix. La validación del modelo final se realizó con Molprobity⁴⁸. Los conjuntos de datos y
428 las estadísticas de refinamiento se muestran en la tabla 1 de datos ampliados.

429

430 **Ensayo de inmunofluorescencia.** Los niveles de expresión de los receptores ACE2 o DPP4 fueron evaluados por
431 ensayo de inmunofluorescencia que detecta las etiquetas C-terminales 3x FLAG. Las células que expresan la
432 Los receptores se sembraron en la placa de 96 pocillos (placas pretratadas con polilisina para células basadas en 293T) a una
433 densidad celular de 1~5×10⁵/ml (100 µl por pocillo) y se cultivó durante 24 horas. Las células se fijaron con 100%
434 metanol a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se incubó con un anticuerpo monoclonal de ratón
435 (M2) dirigido a la etiqueta FLAG (Sigma-Aldrich, F1804) diluido en BSA/PBS al 1 % a 37 °C durante 1 hora.
436 Después de un lavado con PBS, las células se incubaron con 2 µg/ml de cabra conjugada con Alexa Fluor 594.
437 IgG anti-ratón (Thermo Fisher Scientific, A32742) diluido en BSA/PBS al 1 % a temperatura ambiente durante

438 1 hora. El núcleo se tiñó de azul con Hoechst 33342 (dilución 1:5000 en PBS). Las imágenes fueron
439 capturado con un microscopio de fluorescencia (Mshot, MI52-N).

440

441 **Producción y titulación de pseudovirus.** Virus pseudotipados de proteína de punta de coronavirus (CoV-psV)
442 se empaquetaron de acuerdo con un protocolo descrito anteriormente basado en una replicación deficiente
443 Sistema de pseudotipado rabdoviral basado en VSV (VSV-dG). VSV deficiente en glicoproteína VSV-G
444 coexpresando GFP y luciferasa de luciérnaga (VSV-dG-GFP-fLuc) fue rescatado por una genética inversa
445 sistema en el laboratorio y plásmidos auxiliares de Karafast. Para producción CoV-psV, 293T o Vero E6
446 las células se transfectaron con los plásmidos que sobreexpresan las proteínas de pico de coronavirus a través de la
447 Reactivo de transfección Lip2000 (Biosharp, BL623B). Después de 36 horas, las células transfectadas fueron
448 transducido con VSV-dG-GFP-fLuc diluido en DMEM durante 4 horas a 37 °C con un cultivo de tejido al 50 %
449 dosis infecciosa (TCID₅₀) de 1×10⁶ TCID₅₀/ml. Las células transducidas se lavaron una vez con DMEM y
450 luego se incubó con medio de cultivo y sobrenadante cultivado con hibridoma I1 (dilución 1:10)
451 que contiene anticuerpos neutralizantes VSV para eliminar la infectividad de los virus de entrada residuales. El
452 Los sobrenadantes que contenían CoV-psV se recogieron a las 24 horas después del cambio de medio, se aclararon en
453 4.000 rpm durante 5 minutos, en alícuotas y almacenadas a -80 °C. El TCID₅₀ de pseudovirus se determinó por
454 un ensayo de infección basado en diluciones en serie en células 293T-bat40ACE2 para NeoCoV y PDF-2180-CoV o
455 Células 293T-hDpp4 para MERS-CoV y HKU4-CoV. El TCID₅₀ se calculó de acuerdo con la
456 Método Reed-Muench^{49,50}. El valor de la unidad de luminiscencia relativa (RLU) ≥ 1000 se considera
457 positivo. El título viral (equivalentes del genoma) de HKU5-CoV y HKU31-CoV sin un ideal
458 El sistema de infección se determinó mediante PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR). El
459 Se detectaron copias de ARN en el sobrenadante que contenía virus utilizando cebadores en el gen VSV-L

460 secuencias (VSV-LF: 5'-TTCCGAGTTATGGGCCAGTT-3'; VSVL-R:
461 5'-TTTGCCGTAGACCTTCCAGT-3').

462

463

464 **Ensayo de entrada de pseudovirus.** Las células para la infección se tripsinizaron y se incubaron con diferentes

465 pseudovirus (1×10^5 TCID₅₀/pocillo, o equivalente del mismo genoma) en una placa de 96 pocillos (5×10^4 /bien a

466 permitir la unión y la entrada viral simultáneamente. Para el tratamiento con TPCK-tripsina para potenciar la infección,

467 Se incubaron pseudovirus NeoCoV y PDF-2180-CoV en DMEM sin suero con 100 µg/ml

468 Tripsina tratada con TPCK (Sigma-Aldrich, T8802) durante 10 minutos a 25 °C y luego tratada con 100 µg/ml

469 inhibidor de tripsina de soja (Sigma-Aldrich, T6414) en DMEM+10% FBS para detener la proteólisis. A los 16

470 horas posteriores a la infección (hpi), las imágenes GFP de las células infectadas se adquirieron con una fluorescencia

471 microscopio (Mshot, MI52-N), y la actividad de luciferasa intracelular se determinó mediante un Bright-Glo

472 Luciferase Assay Kit (Promega, E2620) y medido con un SpectraMax iD3 Multi-well

473 Luminómetro (Molecular Devices) o un Luminómetro GloMax 20/20 (Promega).

474

475 **Ensayo de neutralización de pseudovirus.** Para los ensayos de neutralización de anticuerpos, los virus (2×10^5

476 TCID₅₀/pozo) se incubaron con los sueros (diluidos 50 veces) o 10 µg/ml de nanocuerpos específicos de MERS

477 a 37 °C durante 30 minutos, y luego se mezcla con células BHK-21-Bat37ACE2 tripsinizadas con la densidad de

478 2×10^4 /bien. Después de 16 horas, se retiró el medio de las células infectadas y se lisaron las células.

479 con 1 × reactivo de ensayo de luciferasa Bright-Glo (Promega) para la detección de quimioluminiscencia con un

480 Luminómetro de múltiples pocillos SpectraMax iD3 (dispositivos moleculares).

481

482 **mancha occidental.** Después de un lavado con PBS, las células se lisaron con TritonX-100 al 2 %/PBS que contenía
483 PMSF recién preparado 1 mM (Beyotime, ST506) en hielo durante 10 minutos. Luego se clarificó el lisado celular por
484 Centrifugación a 12.000 rpm a 4 °C durante 5 minutos, mezclado con tampón de carga SDS y luego incubado a
485 95 °C durante 5 min. Después de la electroforesis SDS-PAGE y la transferencia de membrana PVDF, la membrana
486 se bloqueó con leche descremada al 5%/PBST a temperatura ambiente durante una hora, se incubó con
487 anticuerpos contra Flag (Sigma, F1804), HA (MBL, M180-3) o gliceraldehído-3-fosfato
488 deshidrogenasa (GAPDH) (AntGene, ANT011) a una dilución de 1:10000 en leche al 1%/PBS durante la noche en un
489 agitador a 4°C. Después de un lavado extenso, la membrana se incubó con peroxidasa de rábano picante.
490 (HRP)-anticuerpo secundario conjugado AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson Immuno
491 Reseach, 115-035-003) en leche descremada al 1% en PBST, y se incubó durante una hora. Las manchas fueron
492 visualizado con el kit de quimioluminiscencia Omni-ECL Femto Light (EpiZyme, SQ201) de ChemiDoc
493 MP (Bio-Rad).

494

495 **Ensayo de unión de células vivas de coronavirus RBD-hFc.** Proteínas recombinantes de coronavirus RBD-hFc (1-16
496 µg/ml) se diluyeron en DMEM y luego se incubaron con las células durante una hora a 37 °C. Las células eran
497 se lavó una vez con DMEM y luego se incubó con 2 µg/ml de cabra conjugada con Alexa Fluor 488
498 IgG antihumana (Thermo Fisher Scientific; A11013) diluida en solución salina equilibrada de Hanks
499 (HBSS) con 1% BSA durante 1 hora a 37 °C. Las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con
500 Hoechst 33342 (dilución 1:5000 en HBSS) para tinción de núcleos. Las imágenes fueron capturadas con un
501 microscopio de fluorescencia (MI52-N). Para el análisis de citometría de flujo, las células se separaron con 5 mM de
502 EDTA/PBS y se analizó con un citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman).

503

504 **Ensayo de unión de interferometría de biocapa (BLI).** Las afinidades de unión a proteínas se determinaron mediante
505 Ensayos BLI realizados en un instrumento Octet RED96 (Molecular Devices). Brevemente, 20 µg/mL
506 Se cargaron proteínas recombinantes RBD-hFc marcadas con Fc humanas en biosensores de Proteína A (ProA)
507 (ForteBio, 18-5010) por 30s. Luego, los biosensores cargados se sumergieron en el tampón cinético (PBST)
508 durante 90 s para lavar las proteínas RBD-hFc no unidas. Posteriormente, los biosensores se sumergieron en el
509 tampón cinético que contiene ACE2 soluble con concentraciones que van desde 0 a 500 nM durante 120 s a
510 registrar la cinética de asociación y luego sumergirse en el tampón de cinética durante 300 s para registrar la cinética de disociación.
511 Se usó tampón cinético sin ACE2 para definir el fondo. La afinidad de unión correspondiente
512 (K_D) se calculó con el software Octet Data Analysis 12.2.0.20 mediante análisis cinético de ajuste de curvas
513 o análisis de estado estacionario con ajuste global.

514

515 **Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).** Para evaluar la unión entre RBD viral y
516 el ACE2 *in vitro*, se recubrieron inmunoplasmas de 96 pocillos con proteínas solubles ACE2 a 27 µg/ml en
517 BSA/PBS (100 µl/pocillo) durante la noche a 4 °C. Después de tres lavados con PBS que contenía Tween-20 al 0,1 %
518 (PBST), los pocillos se bloquearon con leche desnatada al 3 %/PBS a 37 °C durante 2 horas. A continuación, variando
519 Se añadieron a los pocillos concentraciones de proteínas RBD-hFc (1-9 µg/ml) diluidas en leche al 3 %/PBST
520 y se incubó durante una hora a 37 °C. Después de un lavado extenso, los pocillos se incubaron con 1:2000
521 anticuerpo Fc antihumano de cabra conjugado con HRP diluido (Sigma, T8802) en PBS durante una hora. Por fin,
522 se añadió la solución de sustrato (Solarbio, PR1210) a las placas y se calculó la absorbancia a 450nm.
523 medido con un luminómetro de pocillos múltiples SpectraMax iD3 (Molecular Devices).

524

525 **Ensayo de fusión célula-célula**

526 El ensayo de fusión célula-célula basado en proteínas Dual Split (DSP) se realizó en células BHK-21 de forma estable
527 expresando diferentes receptores³². Las células se transfectaron por separado con Spike y
528 RLuc_{aa1-155}-GFP_{1-10(aa1-157)} expresando plásmidos, y Spike y GFP_{11(aa158-231)} RLuc-C_{aa156-311}
529 expresando plásmidos, respectivamente. A las 12 horas después de la transfección, las células se tripsinizaron y se mezclaron
530 en una placa de 96 pocillos a las 8×10⁴/bien. A las 26 horas después de la transfección, las células se lavaron con DMEM una vez
531 y luego se incubó con DMEM con o sin 12,5 µg/ml de TPCK-tripsina durante 25 minutos a temperatura ambiente. Cinco
532 horas después del tratamiento, el núcleo se tiñó de azul con Hoechst 33342 (dilución 1:5000 en HBSS) para
533 30min a 37°C. Luego, las imágenes GFP se capturaron con un microscopio de fluorescencia (MI52-N; Mshot).
534 Para el ensayo de luciferasa de células vivas, se añadió el sustrato de células vivas EnduRen (Promega, E6481) al
535 células (una concentración final de 30 µM en DMEM) durante al menos 1 hora antes de la detección por un GloMax
536 Luminómetro 20/20 (Promega).

537

538 **Análisis estadístico.**

539 La mayoría de los experimentos se repitieron de 2 a 5 veces con 3 a 4 repeticiones biológicas, cada una con resultados similares.
540 Los datos se presentan como MEDIO±SD o MEDIA±SEM como se especifica en las leyendas de las figuras. Todo estadístico
541 Los análisis se realizaron con GraphPad Prism 8. Las diferencias entre muestras independientes se
542 evaluado mediante pruebas t de dos colas no apareadas; Las diferencias entre dos muestras relacionadas fueron evaluadas por
543 Pruebas t de dos colas pareadas. P<0,05 se consideró significativo. * p<0,05, ** p <0,01, *** p <0,005 y
544 * * * * p<0,001.

545

546 **Agradecimientos**

547 Agradecemos al Dr. Xiaojun Huang, al Dr. Xujing Li y al Dr. Lihong Chen por la recopilación de datos crio-EM en el
548 Centro de Imagenología Biológica (CBI) en Institución de Biofísica, CAS. Agradecemos al Dr. Yuanyuan
549 Chen, Zhenwei Yang, Bingxue Zhou y Xianjin Ou por el soporte técnico en BLI y SPR. Nosotros
550 gracias a la profesora Qihui Wang (Instituto de Microbiología de la Academia China de Ciencias) por su
551 generoso regalo del plásmido Hedgehog ACE2. Agradecemos a Ye Fu por sus recomendaciones sobre
552 escritura manuscrita. Agradecemos a la Fundación Beijing Taikang Yicai por su apoyo a este trabajo. Esta
553 el estudio fue apoyado por proyectos de China NSFC (32070160); Fondos de Investigación Fundamental para la
554 Universidades Centrales (2042020kf0024); Fondo Especial para la Investigación de COVID-19 de la Universidad de Wuhan;
555 El Programa de Investigación de Prioridad Estratégica (XDB29010000, XDB37030000), CAS (YSBR-010);
556 Programa Nacional de Investigación y Desarrollo Clave (2020YFA0707500, 2018YFA0900801); Xiangxi
557 Wang recibió el apoyo del Programa Ten Thousand Talent y el Grupo de Investigación Innovadora de la NSFS
558 (N° 81921005).

559

560 **Contribuciones de autor**

561 HY XXW y concebido y diseñado el estudio. QX, LC, CBM, CL, JYS, PL y FT
562 realizó los experimentos. QX, LC, CBM, CL, CFZ, HY y XXW analizaron los datos. HY,
563 XXW, QX, LC, CBM y CL interpretaron los resultados. HY y XXW escribieron los borradores iniciales de
564 el manuscrito. HY, XXW, HY, XXW, LC y QX revisaron el manuscrito. CBM, CL, P.
565 L., MXG, CLW, LLS, FTMLH, JL, CS, YC, HBZ y KL comentaron sobre el
566 manuscrito.

567

568 **Conflicto de intereses**

569 Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

570

571 **Disponibilidad de datos**

572 Los mapas crio-EM han sido depositados en el Banco de Datos de Microscopía Electrónica
573 (www.ebi.ac.uk/emdb) y están disponibles con los números de acceso: EMD-32686 (NeoCoV
574 complejo RBD-Bat37ACE2) y EMD-32693 (complejo PDF-2180-CoV RBD-Bat37ACE2). Atómico
575 los modelos correspondientes a EMD-32686, EMD-32693 han sido depositados en el Protein Data Bank
576 (www.rcsb.org) y están disponibles con los números de acceso, PDB ID 7WPO, PDB ID 7WPZ,
577 respectivamente. Los autores declaran que todos los demás datos que respaldan los hallazgos de este estudio están disponibles
578 con el papel y sus archivos de información complementaria.

579

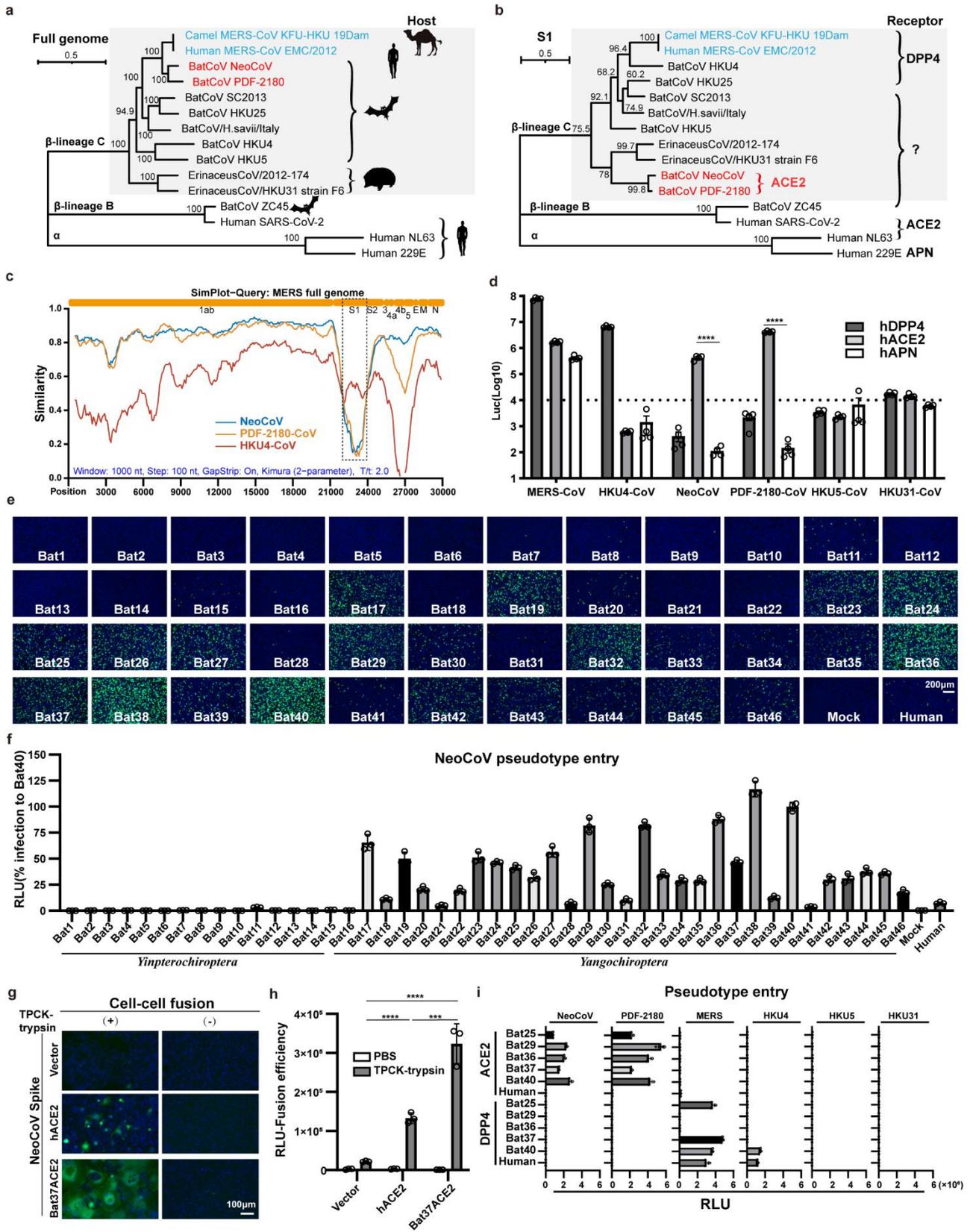
580

581 **Información adicional:**

582 La información complementaria está disponible para este documento.

583 La correspondencia y las solicitudes de materiales deben dirigirse a HY (huanyan@whu.edu.cn)

584



585

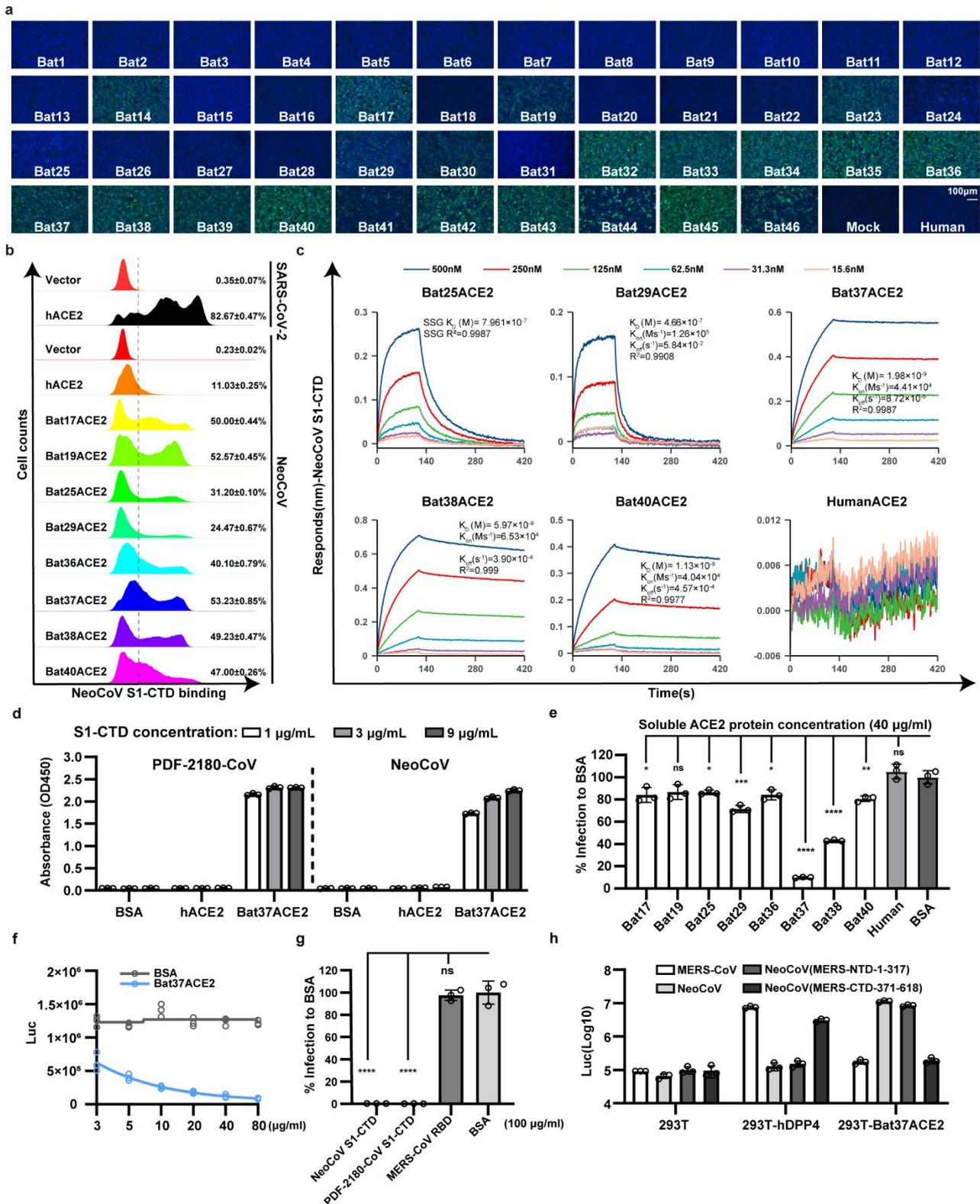
586 **Figura 1 | Un clado de merbecovirus de murciélago puede usar ACE2 pero no DPP4 para una entrada eficiente. ab,**

587 **Análisis filogenético de merbecovirus (gris) basado en secuencias genómicas completas (a) y S1**

588 secuencias de aminoácidos (**B**). NL63 y 229E se establecieron como grupos externos. El uso de huéspedes y receptores fue
589 indicado.**C**, Análisis simple que muestra la similitud del genoma completo de tres merbecovirus
590 en comparación con MERS-CoV. Las regiones que codifican las proteínas MERS-CoV se indicaron en la parte superior.
591 Cuadro punteado: región divergente S1.**D**, Eficiencia de entrada de seis merbecovirus en células 293T de manera estable
592 expresando hACE2, hDPP4 o hAPN. **ef**, Eficiencia de entrada de NeoCoV en células que expresan ACE2
593 de diferentes murciélagos. Intensidad de EGFP (**mi**); actividad de luciferasa de luciérnaga (**F**). **gh**, Ensayo de fusión célula-célula
594 basado en proteínas de doble división que muestran la fusión mediada por la proteína del pico de NeoCoV en células BHK-21
595 expresando los receptores indicados. Intensidad de EGFP (**gramo**), actividad de luciferasa de Renilla de células vivas (**h**). **I**, Entrada
596 eficiencia de seis merbecovirus en células 293T que expresan de forma estable la ACE2 o DPP4 de murciélago indicada.
597 Significar±SEM para **D**, **I**; Significar±SD para **F**, y **h**.(n=3). RLU: unidad de luz relativa.

598

599



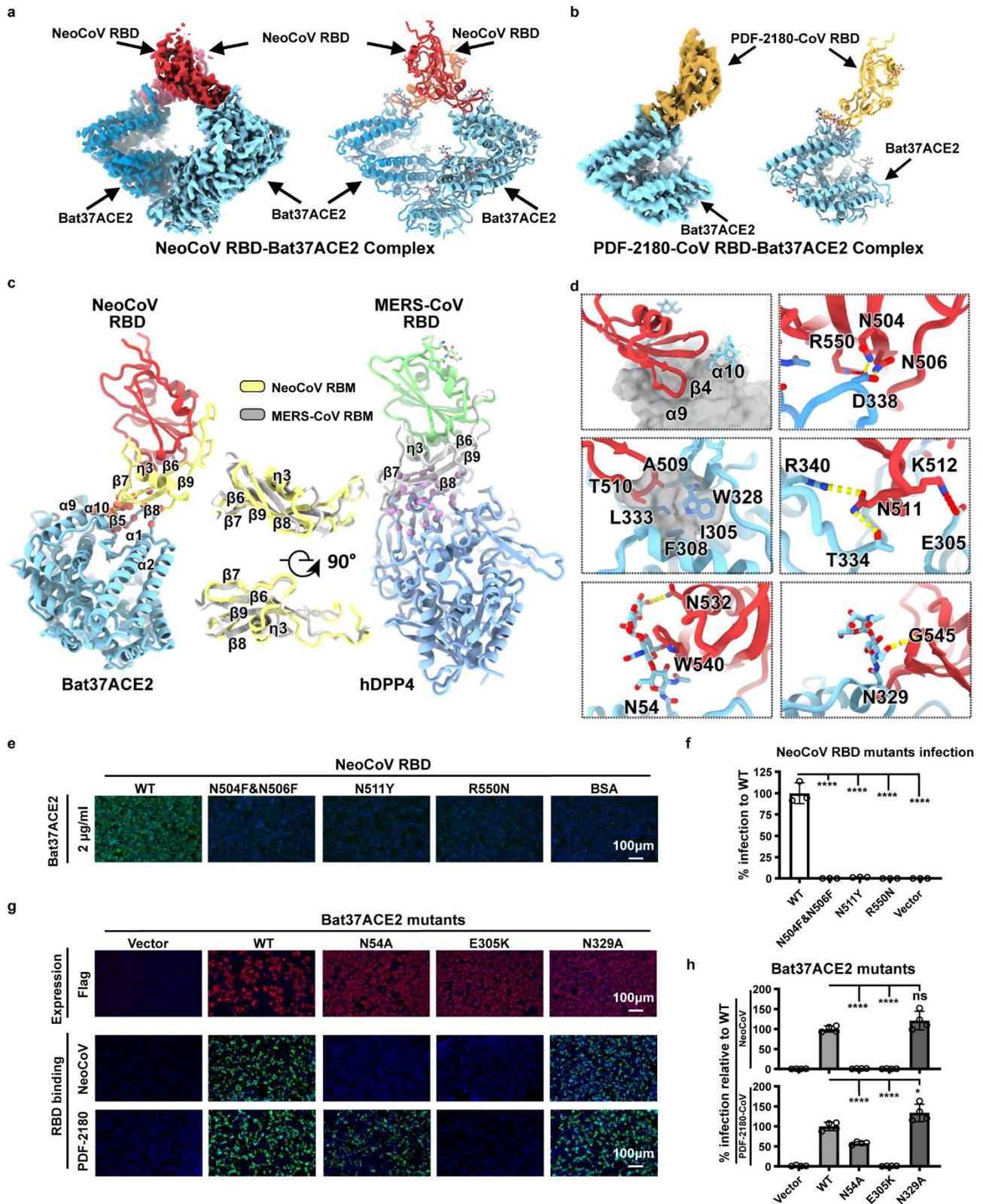
600

601 **Figura 2| Se requirió S1-CTD de NeoCoV y PDF-2180-CoV para la unión de ACE2 específica de especie.**

602 **a**, Unión de NeoCoV-S1-CTD-hFc con células ACE2 de murciélago 293T mediante detección de inmunofluorescencia

603 **el hfc. B**, Análisis de citometría de flujo de la unión de NeoCoV-S1-CTD-hFc con células 293T que expresan el

604 indicó ACE2. La relación positiva se indicó en función del umbral (línea discontinua).**C**, Ensayos BLI
605 analizando la cinética de unión entre NeoCoV-S1-CTD-hFc con proteínas ACE2-ecto seleccionadas. **D**,
606 Ensayo ELISA que muestra la eficiencia de unión de NeoCoV y PDF-2180-CoV S1-CTD a humanos y
607 Proteínas Bat37ACE2-ecto.**mi**,La actividad inhibitoria de las ectoproteínas ACE2 solubles contra NeoCoV
608 infección en 293T-Bat37ACE2.**F**,Competencia dependiente de la dosis de la infección por NeoCoV por
609 Proteínas Bat37ACE2-ecto en células 293T-Bat37ACE2.**gramo**,El efecto inhibitorio de NeoCoV,
610 Proteínas PDF-2180-CoV S1-CTD-hFc y MERS-CoV RBD-hFC en la infección por NeoCoV en
611 Células 293T-Bat37ACE2.**h**,Preferencia de receptor de virus quiméricos con intercambio S1-CTD o S1-NTD
612 mutaciones en células que expresan los receptores indicados. Significar \pm SD para **D**, **mi**, **gramo**, y **h**, (n=3).
613

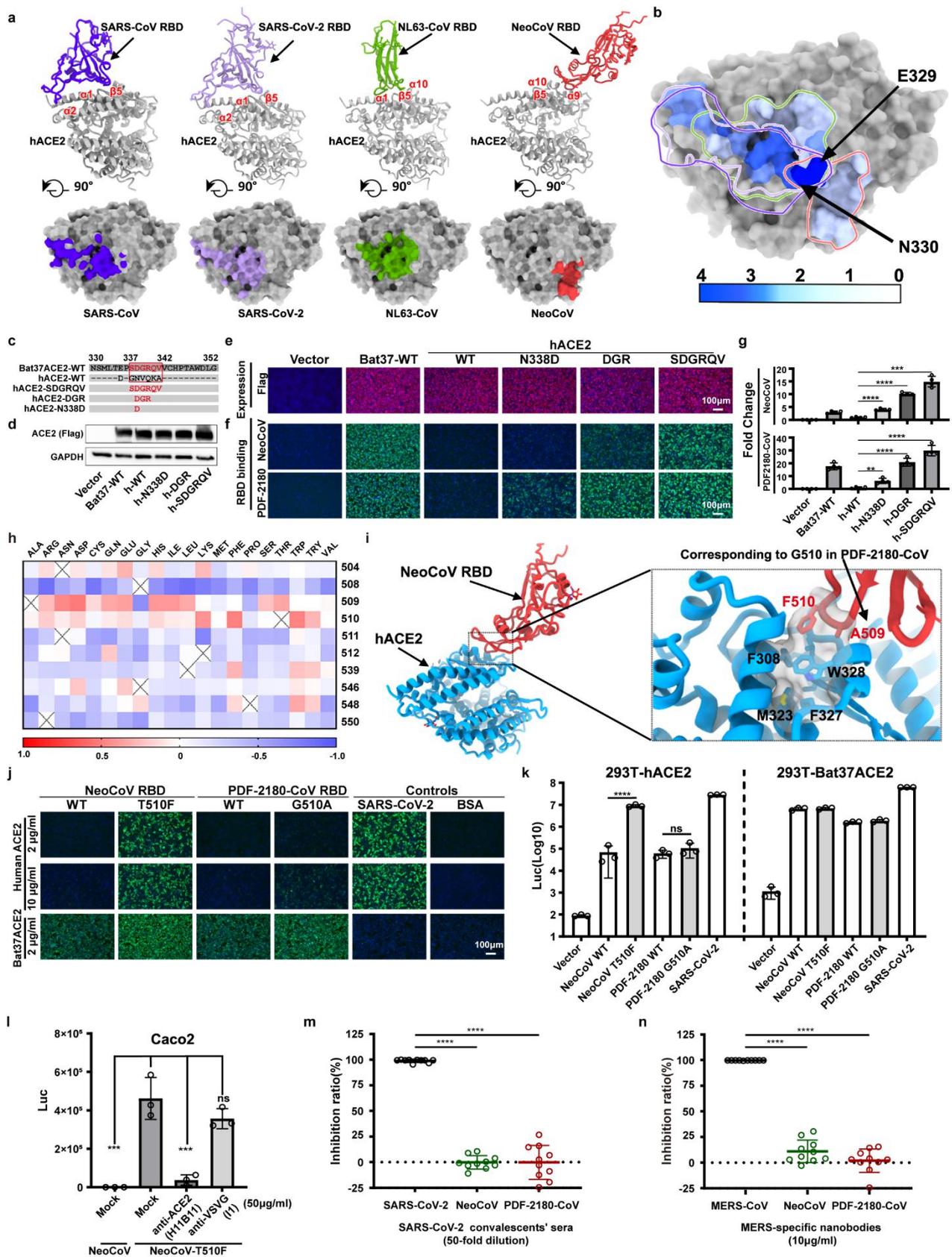


614

615 **Figura 3 | Estructura del NeoCoV RBD-Bat37ACE2 y PDF-2018-CoV RBD-Bat37ACE2**

616 **complejo. a-B**, mapa de densidad Cryo-EM y representación de dibujos animados de NeoCoV RBD-Bat37ACE2

617 complejo (**a**) y complejo PDF-2018CoV RBD-Bat37ACE2 (**B**). El NeoCoV RBD,
618 PDF-2180-CoV RBD y Bat37ACE2 se colorearon en rojo, amarillo y cian, respectivamente. **C**,
619 Comparación de estructuras entre el complejo NeoCoV RBD-Bat37ACE2 (izquierda) y MERS-CoV
620 Complejo RBD-hDPP4 (derecha). NeoCoV RBD, MERS-CoV RBD, NeoCoV RBM, MERS-CoV
621 RBM, Bat37ACE2 y hDPP4 se colorearon en rojo, verde claro, amarillo claro, gris, cian y azul.
622 respectivamente.**D**, Detalles de la interfaz compleja NeoCoV RBD-Bat37ACE2. Todas las estructuras son
623 se muestra como cinta con los residuos clave que se muestran con palos. Los puentes salinos y los enlaces de hidrógeno son
624 presentado como líneas discontinuas rojas y amarillas, respectivamente.**mi-F**, Verificación de los residuos críticos en
625 NeoCoV RBD que afecta la unión viral (**mi**), y eficiencia de entrada (**F**) en células 293T-Bat37ACE2.**gramo-h**,
626 Verificación de los residuos críticos en Bat37ACE2 que afectan la unión de NeoCoV RBD (**gramo**), y viral
627 eficiencia de entrada (**h**). Significar \pm SD para **F**(n=3) y**h**(n=4).
628



629

630

631

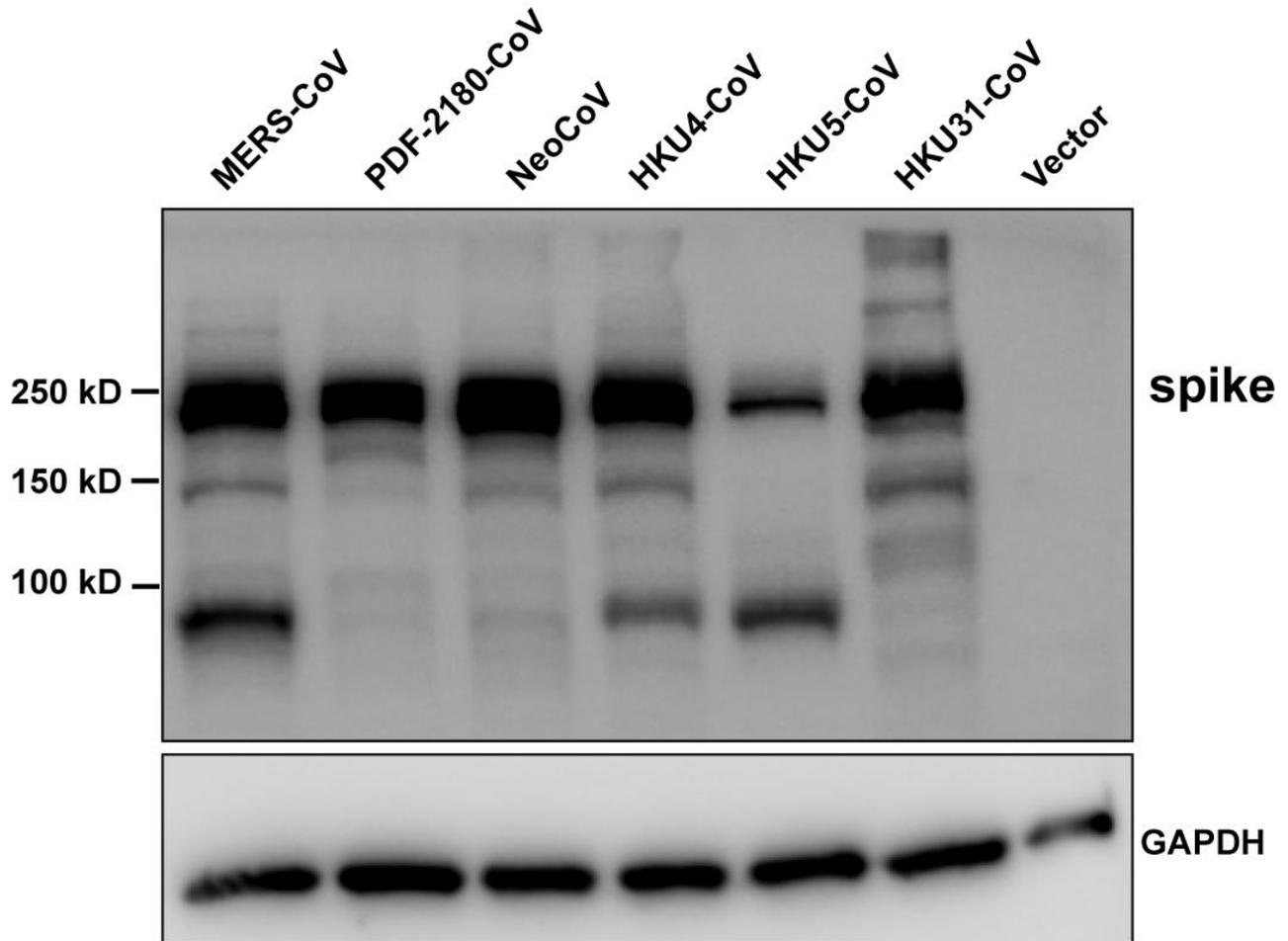
Figura 4 | Determinantes moleculares que afectan el reconocimiento de hACE2 por los virus. **a**, Modos vinculantes de Coronavirus adaptados a ACE2. El SARS-CoV RBD, SARS-CoV-2 RBD, NL63-CoV RBD y

632 NeoCoV RBD se coloreó en púrpura, púrpura claro, verde y rojo, respectivamente. **B**, Una común
633 punto caliente de unión a virus en ACE2 para los cuatro virus. Por frecuencia de residuos reconocida por el
634 Se calcularon y mostraron los RBD de coronavirus. **C**, Ilustración esquemática de los mutantes de intercambio hACE2
635 con contrapartes Bat37ACE2. **D-mi**, El nivel de expresión de los mutantes hACE2 por Western blot (**D**)
636 e inmunofluorescencia (**mi**). **F-gramo**, Función del receptor de mutantes hACE2 evaluada por el virus RBD
637 ensayo de unión (**F**) y ensayo de entrada de pseudovirus (**gramo**). **h**, Análisis de dinámica molecular (MD) del efecto
638 de variaciones críticas de residuos en la interacción entre NeoCoV y Bat37ACE2 por mCSM-PPI2. **I**,
639 Estructura del modelado complejo NeoCoV RBD-hACE2 por superposición en COOT. El NeoCoV
640 RBD y hACE2 se colorearon en rojo y azul cielo, respectivamente. Detalles de la clave NeoCoV RBD
641 se mostró la mutación T510F. Todas las estructuras se presentan como una cinta con los residuos clave que se muestran con
642 palos **jk**, El efecto de las mutaciones NeoCoV y PDF-2180-CoV RBM en la aptitud de hACE2 como
643 demostrado por unión (**j**) y eficiencia de entrada (**k**) en células 293T-hACE2 y 293T-Bat37ACE2. **yo**,
644 Entrada dependiente de hACE2 de NeoCoV-T510F en células Caco2 en presencia de 50 µg/ml de Anti-ACE2
645 (H11B11) o Anti-VSVG (I1). **metro**, Actividad neutralizante de sueros vacunados con SARS-CoV-2 contra el
646 infección por SARS-CoV-2, NeoCoV y PDF-2180-CoV. **norte**, Actividad neutralizante de MERS-RBD
647 dirigido a nanocuerpos contra las infecciones por MERS-CoV, NeoCoV y PDF-2180-CoV. Significar ±
648 SD para **gramo, kn; gramo**(n=4), **k-yo** (n=3), **gramometro-norte** (n=10).

649

650 **Cifras de datos extendidos**

651



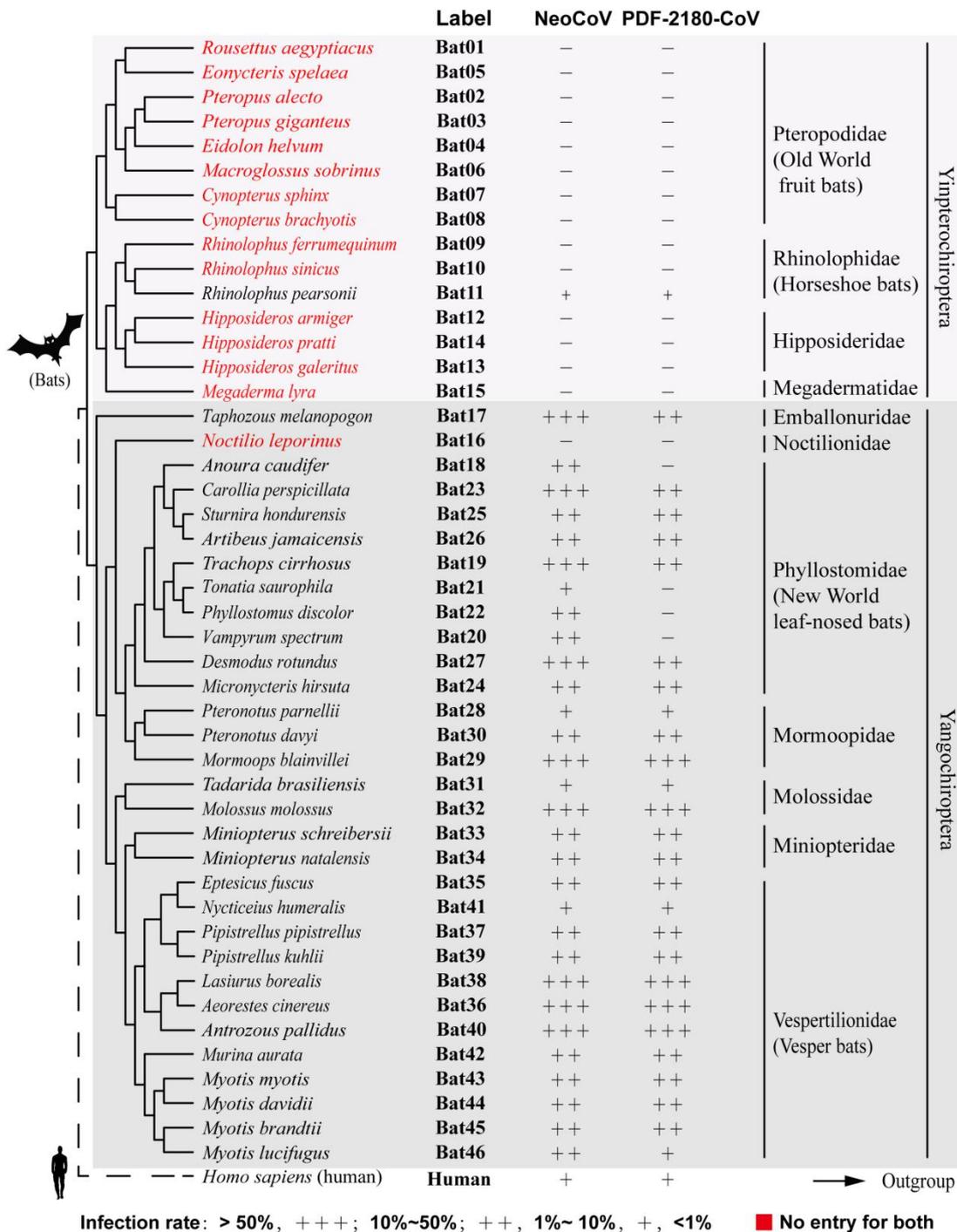
652

653 **Datos extendidos Figura 1 | Nivel de expresión de proteínas de punta de coronavirus utilizadas para**

654 **pseudotipado**

655

656



657

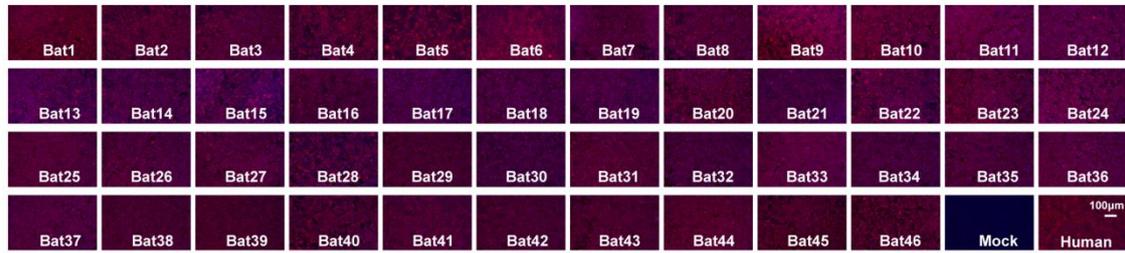
658

659 **Datos extendidos Figura 2 | Función del receptor de ACE2 de 46 especies de murciélagos para apoyar**

660 **Entrada NeoCoV y PDF-2180-CoV.**

661

662



663

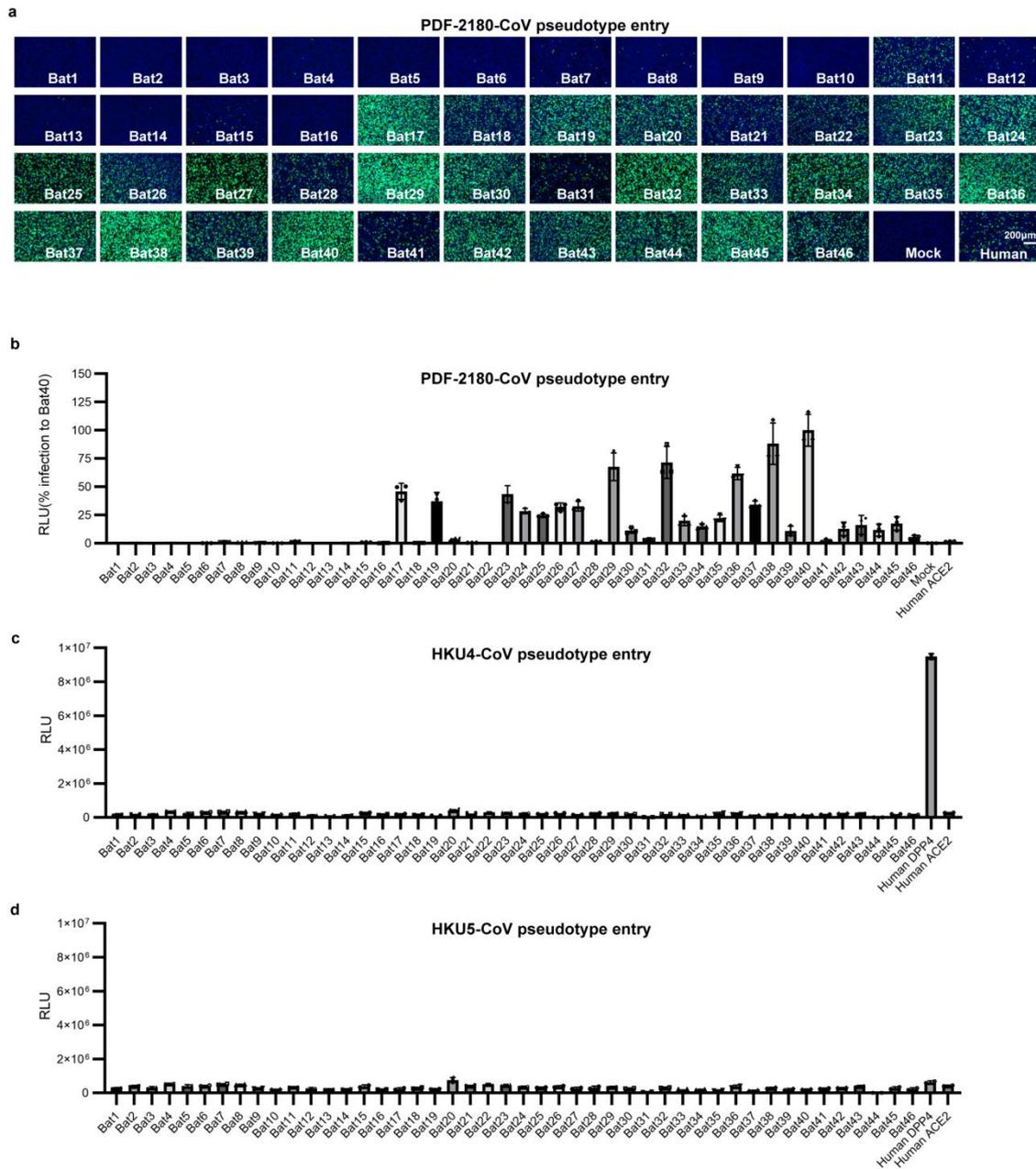
664

665 **Datos extendidos Figura 3 | El nivel de expresión de 46 ortólogos de ACE2 de murciélago en células 293T como**

666 **indicado por el ensayo de inmunofluorescencia que detecta la etiqueta 3xFLAG C-terminal.**

667

668



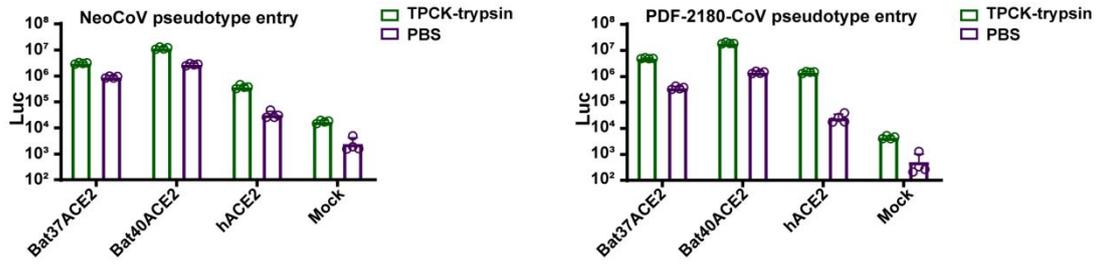
669

670 **Datos extendidos Figura 4 | Eficiencia de entrada de PDF-2180-CoV (ab), HKU4-CoV (c) y**

671 **Pseudovirus HKU5-CoV (d) en células 293T que expresan diferentes ortólogos de ACE2 de murciélago**

672

673



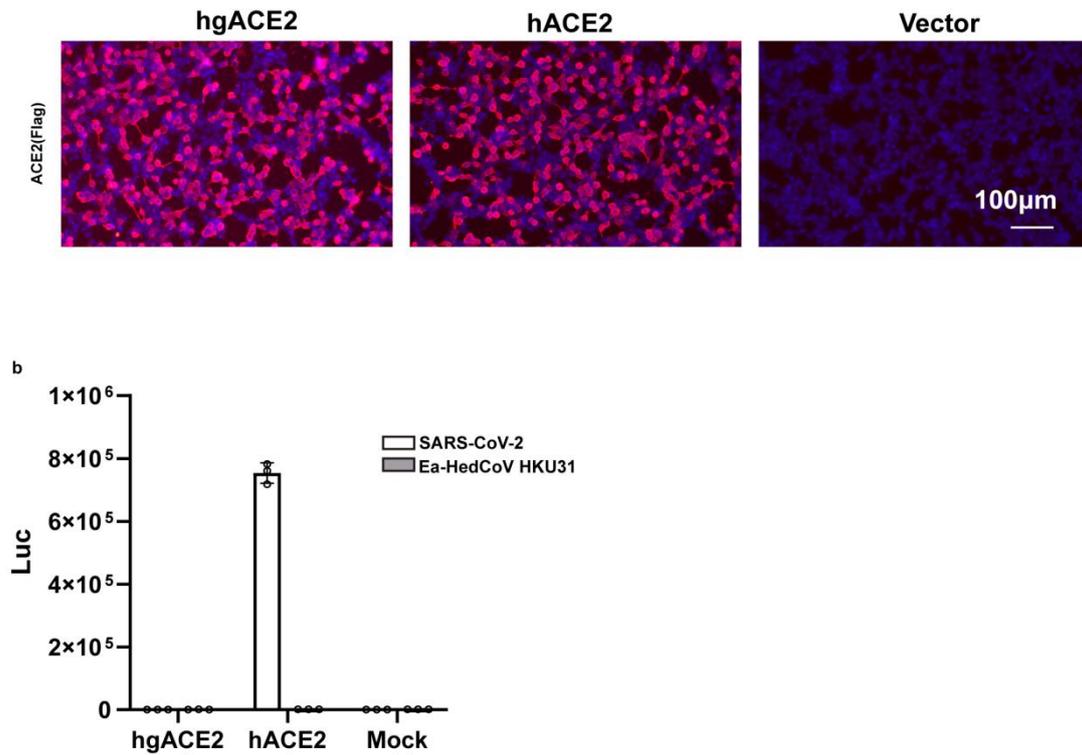
674

675 **Datos extendidos Figura 5 | El tratamiento con TPCK-tripsina aumentó significativamente la eficiencia de entrada de**

676 **NeoCoV y PDF-2180-CoV en células 293T que expresan diferentes ortólogos de ACE2.**

677

678



679

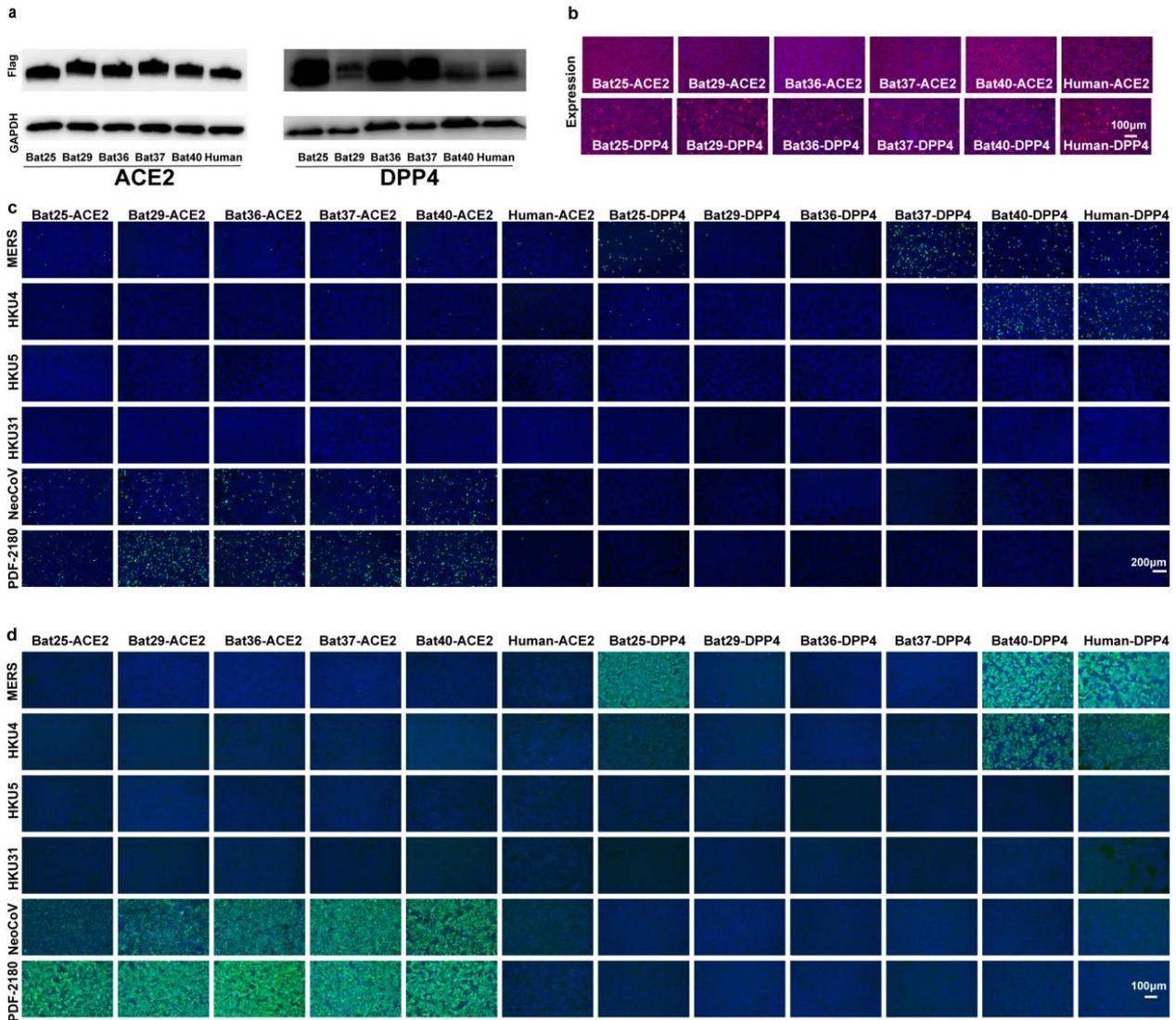
680 **Datos extendidos Figura 6 | Hedgehog ACE2 (hgACE2) no puede admitir la entrada de**

681 **Ea-HedCoV-HKU31.**(a) El nivel de expresión de ACE2 fue evaluado por inmunofluorescencia

682 detectando la etiqueta de bandera fusionada del terminal C. (B) Entrada viral de SARS-CoV-2 y HKU31 en las células

683 expresando hACE2 o hgACE2.

684



685

686 **Datos extendidos Figura 7 | Uso de los receptores ACE2 y DPP4 de diferentes merbecovirus. a,**

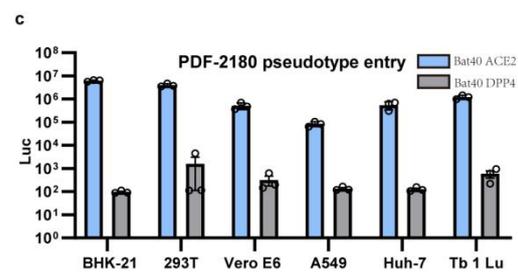
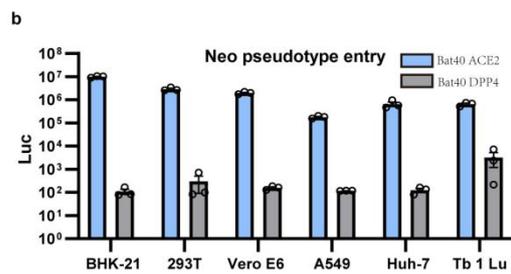
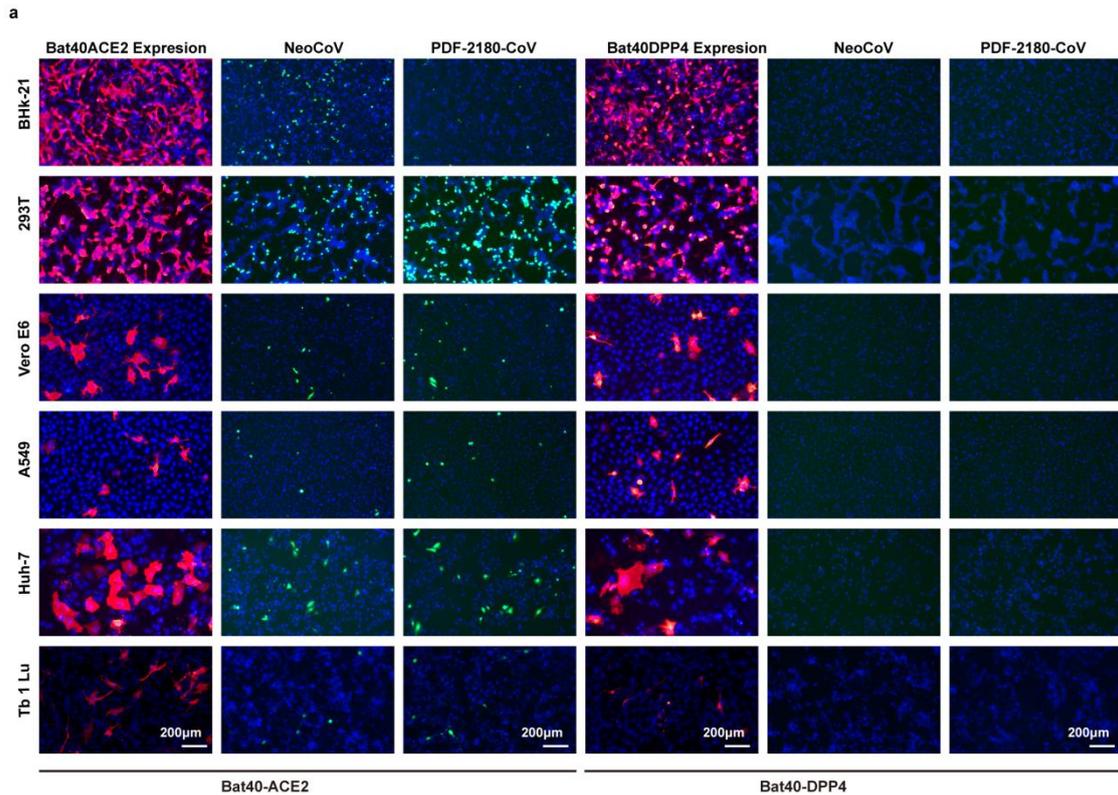
687 Western blot detectó los niveles de expresión de los ortólogos ACE2 y DPP4 en células 293T. **B,** El

688 nivel de expresión de ACE2 de murciélago intracelular mediante ensayo de inmunofluorescencia que detecta el C-terminal

689 3×BANDERA-etiqueta. **CD,** Entrada vírica (**C**) y enlace RBD (**D**) de diferentes coronavirus en células 293T

690 expresando diferentes ortólogos de ACE2 y DPP4.

691



692

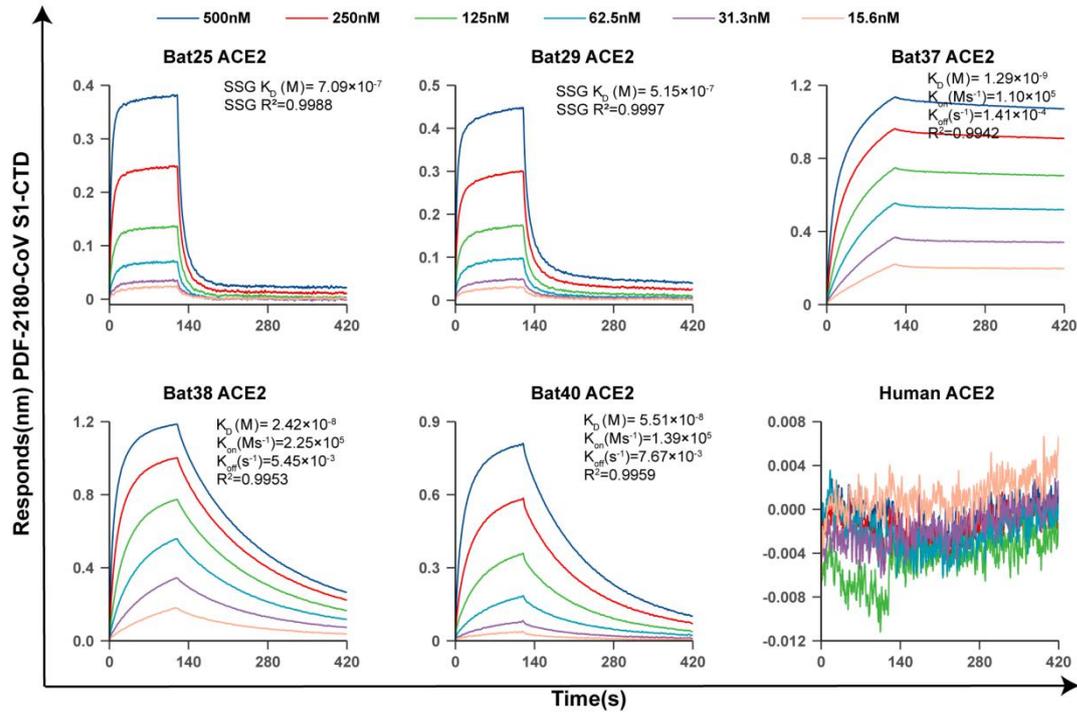
693 **Datos extendidos Figura 8 | Infección NeoCoV y PDF2180-CoV de diferentes tipos de células**

694 **expresando Bat40ACE2 o Bat40DPP4.**El BHK-21, 293T, Vero E6, A549, Huh-7 y Tb

695 Se transfearon 1 Lu con Bat40ACE2 o Bat40DPP4. La expresión y entrada viral (GFP)

696 (a) y la actividad de luciferasa (c) se detectaron a las 16 hpi.

697

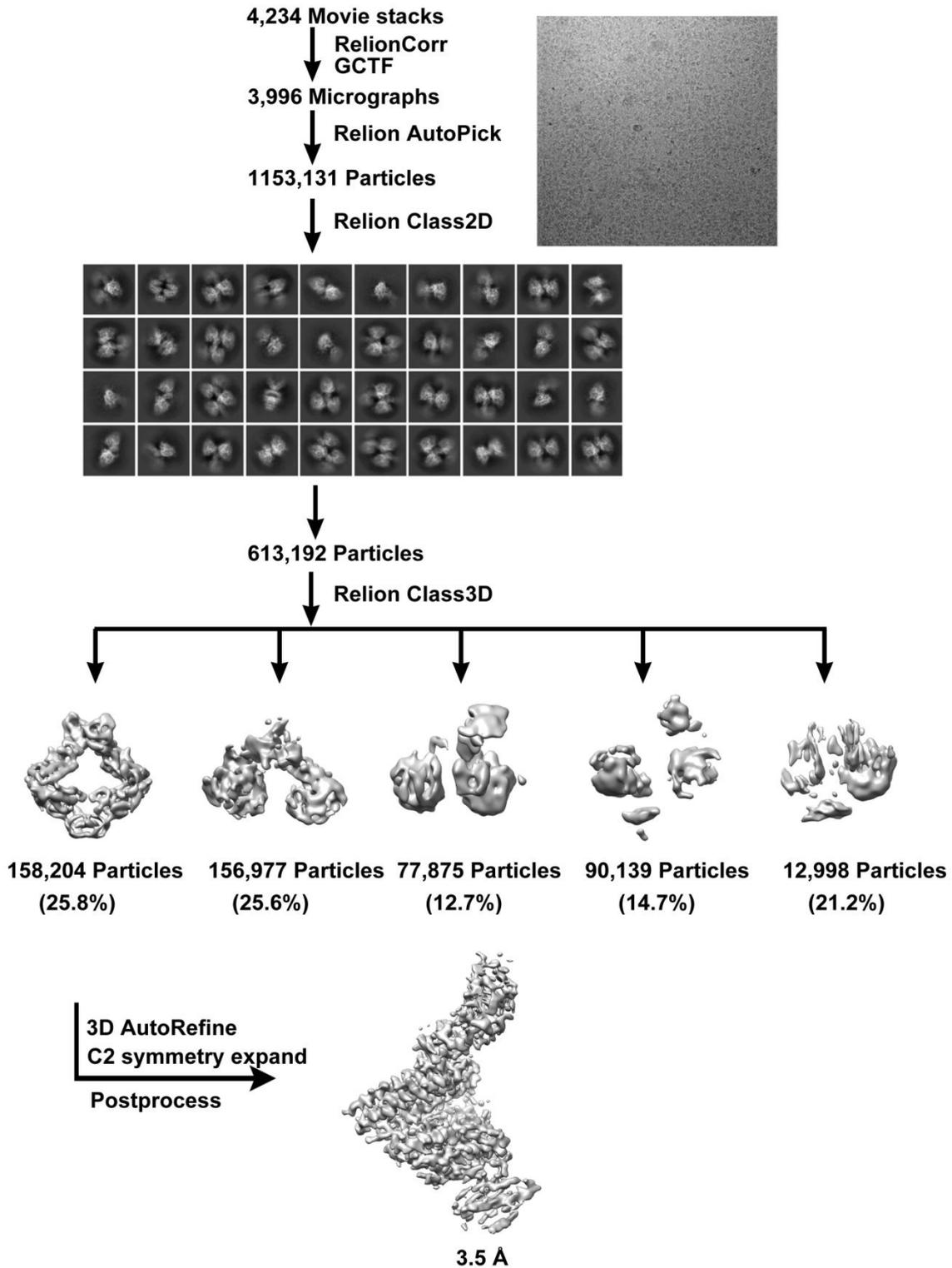


698

699 **Datos extendidos Figura 9 | Análisis BLI de la cinética de unión de PDF-2180-CoV S1-CTD**

700 interactuando con diferentes ortólogos de ACE2.

701

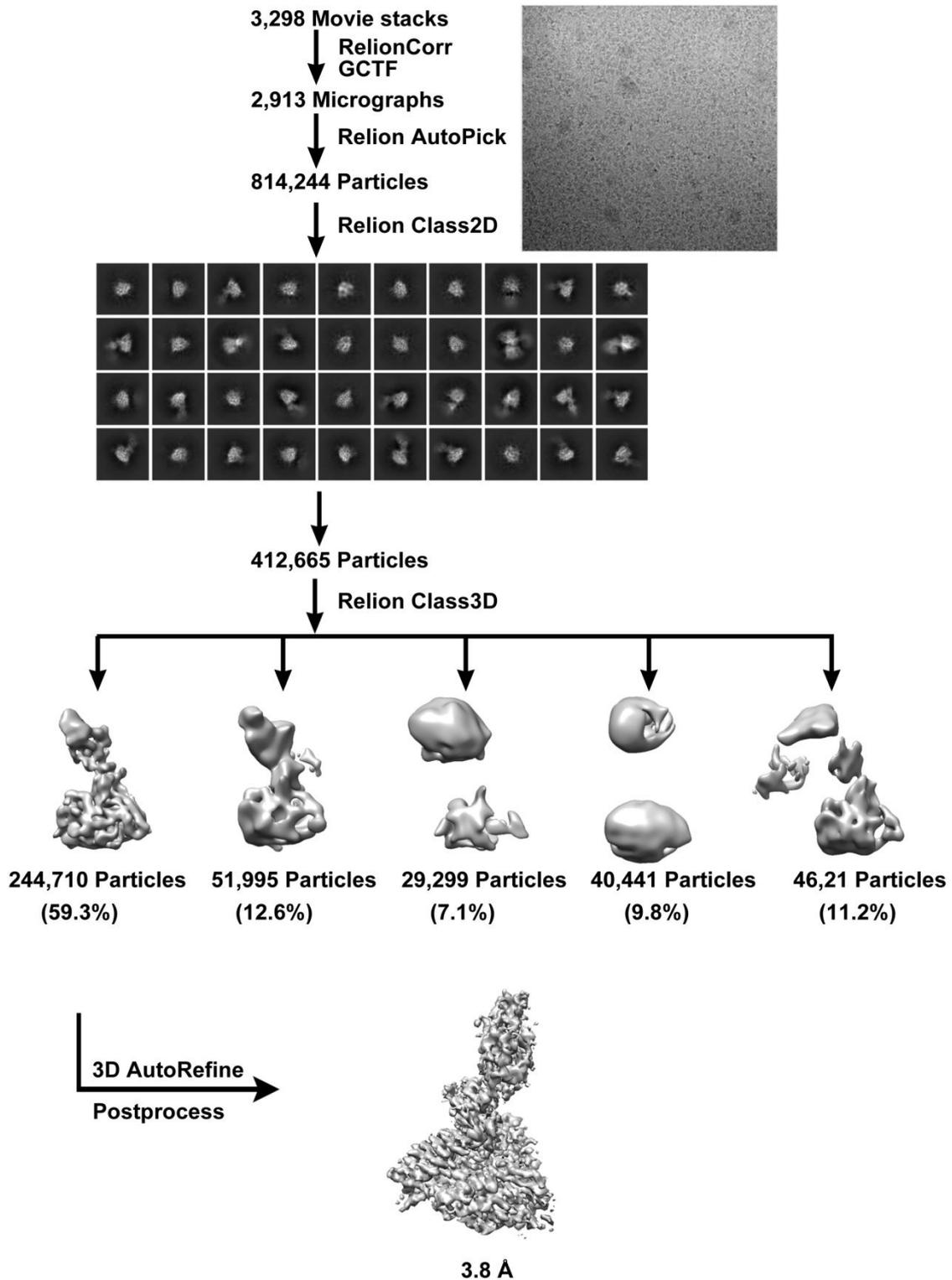


702

703 Datos extendidosFigura10 | Diagramas de flujo para el procesamiento de datos crio-EM de Neo-CoV

704 Complejo RBD-Bat37ACE2.

705

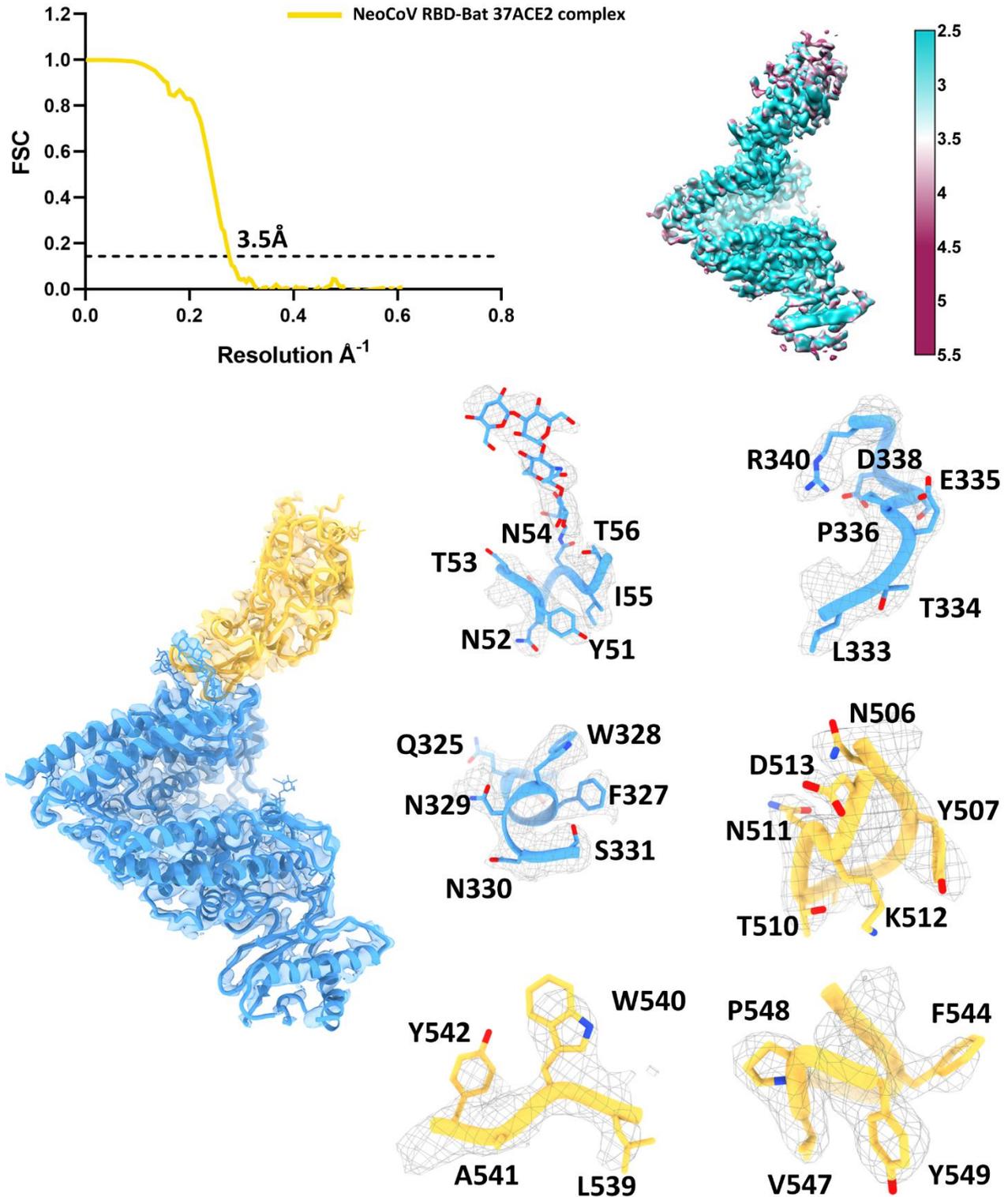


706

707 Datos extendidosFigura11 | Diagramas de flujo para el procesamiento de datos crio-EM de PDF-2180-CoV

708 Complejo RBD-Bat37ACE2.

709

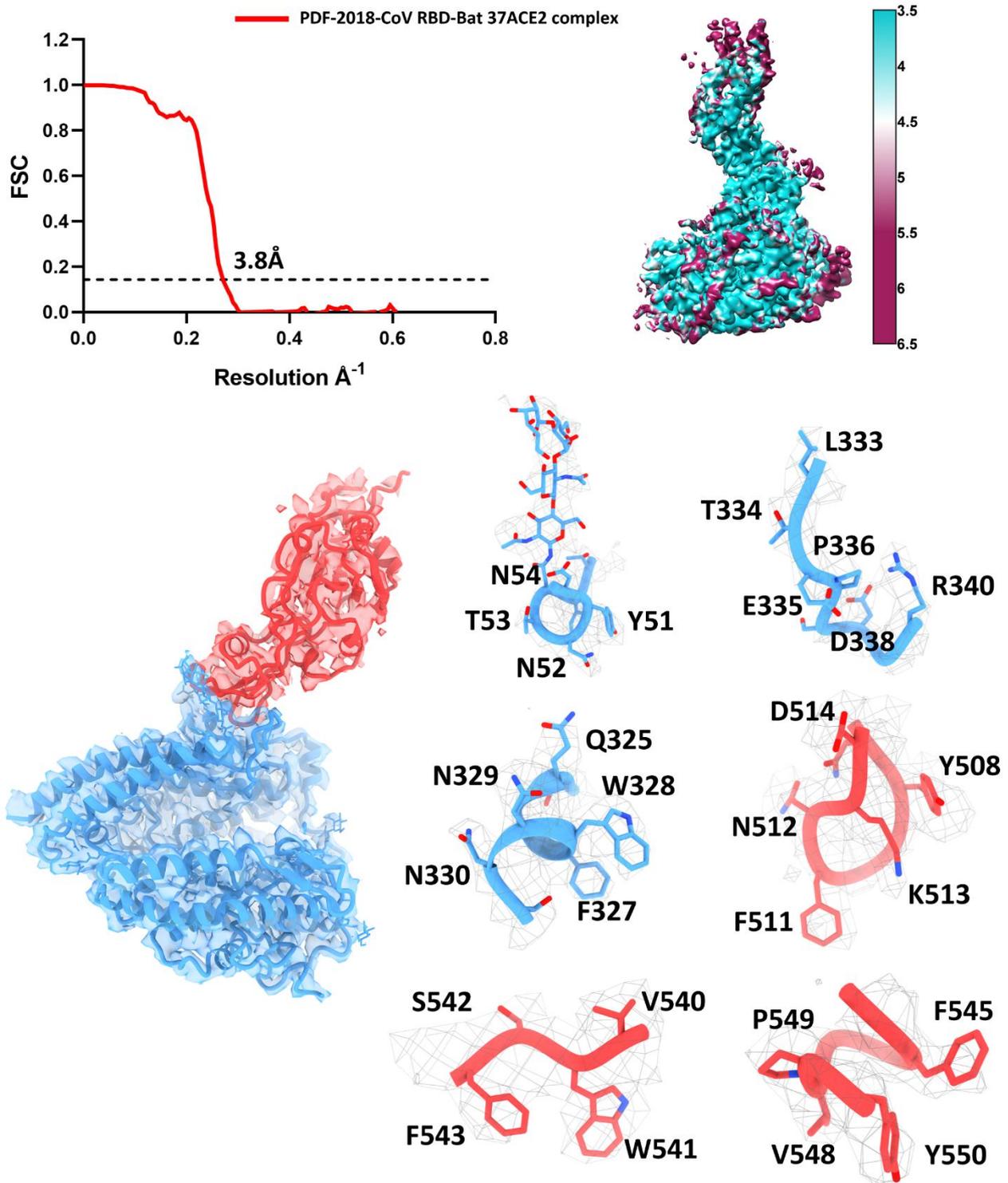


710

711 Datos extendidos Figura 12 | Estimación de resolución de los mapas EM, mapas de densidad y atómicos

712 modelos del complejo NeoCoV RBD-Bat37ACE2.

713

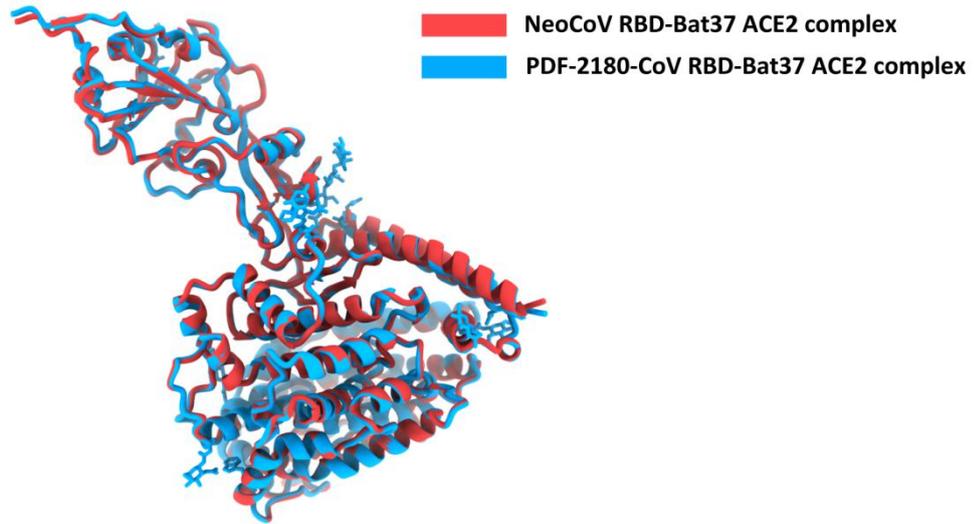


714

715 **Datos extendidos Figura 13 | Estimación de resolución de los mapas EM, mapas de densidad y atómicos**

716 **modelos del complejo PDF-2180-CoV RBD-Bat37ACE2.**

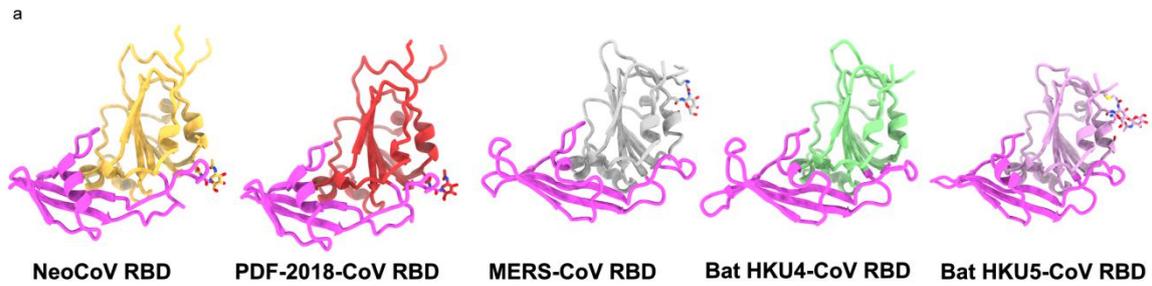
717



718

719 **Datos extendidos Figura 14 | Superposición de estructuras generales de NeoCoV RBD-Bat37ACE2**
720 **complejo (rojo) y complejo PDF-2018-COV RBD-Bat37ACE2 (azul).**

721



b

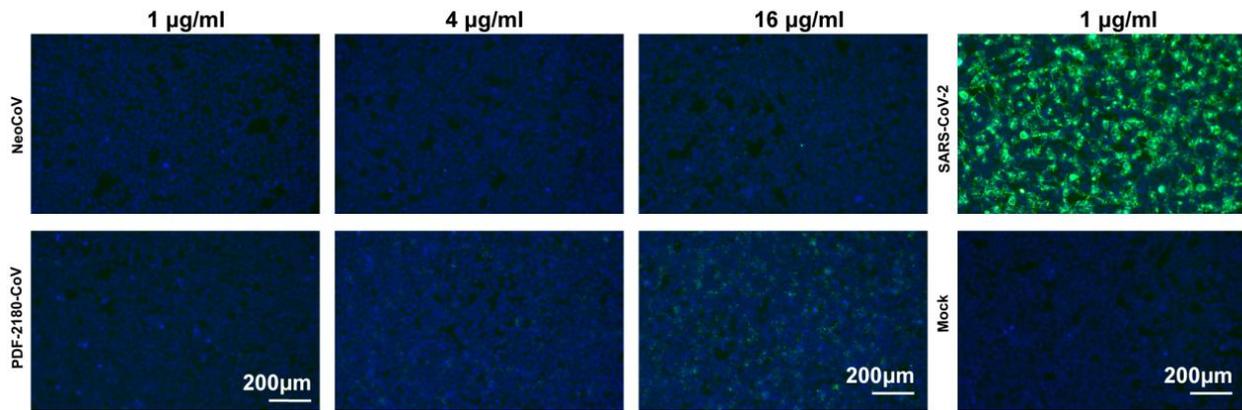
MERS	377	Q	A	E	G	V	E	C	D	F	S	P	L	L	S	G	T	P	P	Q	V	Y	N	F	K	R	L	V	F	T	N	C	N	Y	N	L	T	K	L	L	S	L	F	S	V	N	D	F	T	C	S	Q	I	S	P	A	A	T	A	S	N	
HKU4		Q	P	N	A	T	E	C	D	F	S	P	M	L	T	G	V	A	P	P	Q	V	Y	N	F	K	R	L	V	F	S	N	C	N	Y	N	L	T	K	L	L	S	L	F	A	V	D	E	F	S	C	N	G	I	S	P	D	A	I	A	R	G
HKU5		Q	A	T	Q	E	C	D	F	T	P	M	L	T	G	T	P	P	I	Y	N	F	K	R	L	V	F	T	N	C	N	Y	N	L	T	K	L	L	S	L	F	Q	V	S	E	F	S	C	H	Q	V	S	P	S	S	L	A	T	G			
Neo		A	H	V	Y	P	D	C	N	F	T	E	L	F	R	E	R	A	P	T	I	M	Q	Y	K	R	E	V	F	T	R	C	N	Y	N	L	S	L	L	S	L	V	Q	V	D	E	F	V	C	D	K	I	T	P	E	A	L	A	T	G		
PDF-2180		A	H	V	Y	P	D	C	N	F	T	D	L	F	R	E	N	A	P	T	I	M	Q	Y	K	R	Q	V	F	T	R	C	N	Y	N	L	T	L	L	S	L	V	Q	V	D	E	F	V	C	D	K	I	T	P	E	A	L	A	T	G		
HKU31		A	N	E	L	E	E	C	A	L	D	V	L	F	K	N	I	A	P	Q	I	A	N	Y	S	R	R	V	F	T	N	C	N	Y	N	L	T	K	L	L	S	L	V	E	V	D	E	F	V	C	D	K	I	T	P	E	S	L	A	T	G	
MERS	437	C	Y	S	S	L	T	V	D	Y	F	A	Y	P	L	S	M	K	S	D	L	S	V	S	A	G	P	I	S	Q	F	N	Y	K	Q	S	F	S	N	P	T	C	L	I	L	A	T	V	P	H	N	L	T	T	I	T	K	P	L			
HKU4		C	Y	S	S	L	T	V	D	Y	F	A	Y	P	L	S	M	K	S	Y	I	R	P	G	S	A	G	N	I	P	L	Y	N	Y	K	Q	S	F	A	N	P	T	C	R	V	M	A	S	V	P	A	N	V	T	I	T	K	P	Q			
HKU5		C	Y	S	S	L	T	V	D	Y	F	A	Y	S	T	D	M	S	S	Y	L	Q	P	G	S	A	G	A	I	V	Q	F	N	Y	K	Q	D	F	S	N	P	T	C	R	V	L	A	T	V	P	Q	N	L	T	I	T	K	P	S			
Neo		C	Y	S	S	L	T	V	D	W	E	F	A	F	P	Y	A	W	K	S	Y	L	A	I	G	S	A	D	R	I	V	R	F	N	Y	N	Q	D	Y	S	N	P	S	C	R	I	H	S	K	V	N	S	S	I	G	I	S	Y	A	G		
PDF-2180		C	Y	S	S	L	T	V	D	W	E	F	A	F	P	Y	A	W	K	S	Y	L	A	I	G	S	A	D	R	I	V	R	F	N	Y	N	Q	D	Y	S	N	P	S	C	R	I	H	S	K	V	N	S	S	V	G	I	S	Y	S	G		
HKU31		C	Y	S	S	L	V	D	W	E	F	A	L	P	L	S	M	K	S	T	L	A	I	G	S	A	E	A	I	S	M	F	N	Y	N	Q	D	Y	S	N	P	T	C	R	I	H	A	T	I	N	S	N	V	S	S	L	N	F	T	A		
MERS	496	.	.	K	Y	S	Y	I	N	K	C	S	R	L	S	D	D	R	.	T	E	V	P	Q	L	V	N	A	N	Q	Y	S	P	C	V	S	I	V	P	S	T	V	W	E	D	G	D	Y	R	K	Q	L	S	P	L	E	G	G				
HKU4		.	.	A	Y	G	Y	I	S	K	C	S	R	L	T	G	S	N	Q	D	V	E	T	P	L	Y	I	N	P	G	E	Y	S	I	C	R	D	F	S	P	G	G	F	S	E	D	G	Q	V	F	K	R	L	T	Q	F	E	G	G			
HKU5		.	.	N	Y	A	Y	L	T	E	C	Y	K	T	S	A	Y	G	K	.	.	.	N	Y	L	Y	N	A	P	G	A	Y	T	P	C	L	S	L	A	S	R	G	F	S	T	K	Y	Q	S	H	S	D	E	.			
Neo		.	.	A	Y	S	Y	I	T	N	C	N	Y	G	A	T	N	K	D	.	.	.	D	V	V	K	P	G	G	R	A	S	Q	Q	C	I	T	G	A	L	N	S	P	T	T	G	.	.	.	Q	L	W	A	N	F	G	G	V	P			
PDF-2180		.	.	L	Y	S	Y	I	T	N	C	N	Y	G	G	F	N	K	D	.	.	.	D	V	V	K	P	G	G	R	A	S	Q	Q	C	V	T	G	A	L	N	S	P	T	T	G	.	.	.	Q	V	W	S	F	N	F	G	G	V	P		
HKU31		N	N	N	Y	A	Y	I	S	R	Q	.	G	T	D	G	K	P	.	.	.	I	L	L	Q	K	Q	L	P	N	I	A	C	R	S	G	V	L	G	L	S	N	D	V	.	.	.	D	Y	F	G	Y	N	F	N	C	R	I				
MERS	553	W	L	V	A	S	G	S	T	V	A	M	T	E	Q	.	.	L	Q	M	G	F	G	I	T	V	Q	Y	G	T	D	T	N	S	V	C	P	K	L																							
HKU4		L	L	I	G	V	G	T	R	V	P	M	T	D	N	.	.	L	Q	M	S	F	I	I	S	V	Q	Y	G	T	G	T	D	S	V	C	P	M	L																							
HKU5		.	L	T	T	G	Y	I	P	V	T	G	N	.	.	L	Q	M	A	F	I	I	S	V	Q	Y	G	T	D	T	N	S	V	C	P	M	Q																									
Neo		Y	R	V	S	R	L	T	Y	T	D	H	L	S	D	.	P	L	D	M	V	Y	V	I	T	V	K	Y	E	P	G	A	E	T	V	C	P	K	Q																							
PDF-2180		Y	R	T	S	R	L	T	Y	T	D	H	L	K	N	.	P	L	D	M	V	Y	V	I	T	V	K	Y	E	P	G	A	E	T	V	C	P	K	Q																							
HKU31		F	Y	I	G	R	K	S	Y	T	P	R	T	S	E	G	S	I	Q	M	V	Y	V	I	T	A	N	Y	A	E	G	P	N	N	V	C	P	L	K																							

722

723 **Datos extendidos Figura 15 | Estructuras y comparación de secuencias de RBD de diferentes**

724 **merbecovirus.**

725

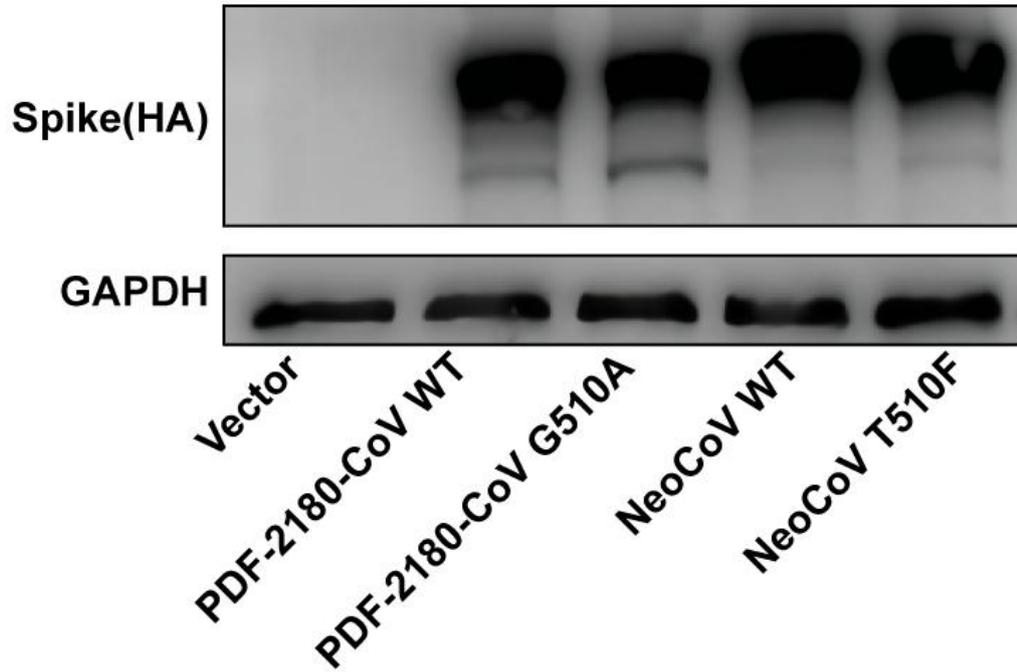


726

727 **Datos extendidos Figura 16 | Comparación de la afinidad de unión de NeoCoV y PDF-2180-CoV**

728 **RBD con hACE2 utilizando SARS-CoV-2 RBD como control positivo.**

729

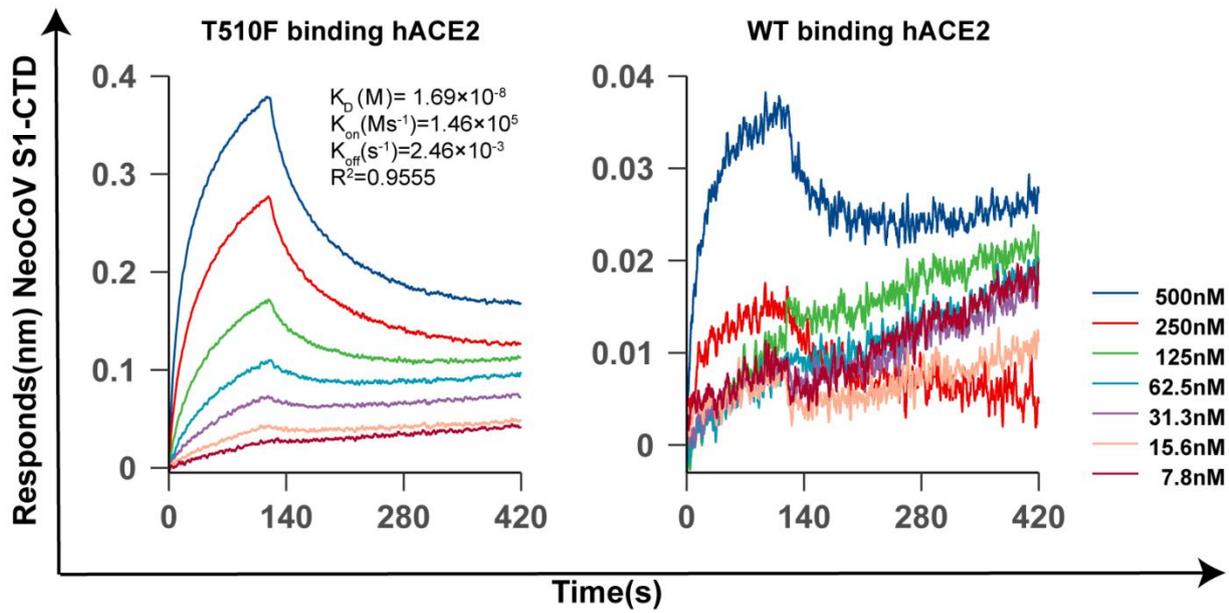


730

731 **Datos extendidos Figura 17 | Nivel de expresión de las proteínas de punta NeoCoV y PDF-2180-CoV**

732 **y sus mutantes.**

733



734

735 **Datos extendidos Figura 18 | Análisis BLI de la cinética de unión de NeoCoV S1-CTD WT y**

736 **T510F interactuando con ACE2 humano.**

737

738 **Tabla de datos extendidos 1. Recopilación de datos Cryo-EM y estadísticas de refinamiento del modelo atómico de RBD**
739 **complejo mutante-mACE2**

740

Recopilación de datos y estadísticas de reconstrucción.

Proteína	Complejo NeoCoV RBD-Bat37ACE2	
	PDF-2018-CoV	complejo RBD-Bat37ACE2
Voltaje (kV)	300	300
Detector	K2	K2
Tamaño de píxel (Å)	1.04	1.04
Dosis de electrones (e-/Å ²)	60	60
Rango de desenfoque (µm)	1.25-2.7	1.25-2.7
partículas finales	62, 545	130,308
Resolución (Å)	3.5	3.8

Estadísticas de refinamiento y validación de modelos

Ramachandran		
Estadísticas		
Favorecido (%)	96.38	92.12
Permitido (%)	3.54	7.79
Valores atípicos (%)	0.00	0.09
Valores atípicos de rotámeros (%)	0.09	0.09
Rmsd		
Longitudes de enlace (Å)	0.02	0.02
Ángulos de enlace (°)	1.26	1.26

741

742

743

744 **Tabla de datos extendidos 2. Residuos de NeoCoV RBD interactuando con Bat37ACE2 en el enlace**
745 **interfaz ($d < 4,5 \text{ \AA}$)**

746

Bat37ACE2	NeoCoV RBD
residuos	residuos
	K512
	A509 G546 P548
	T510
	T510 N511
	N506 L539
	R550

747

748

749 **Tabla de datos extendidos 3. Residuos de PDF-2180-CoV RBD interactuando con Bat37ACE2 en el**
750 **interfaz de unión (d < 4,5 Å)**
751

Bat37ACE2	PDF-2180-CoV RBD
residuos	residuos
	K513
	F511
	G510 G547 P549
	G547 P549
	F511
	N512
	N507 L540
	R551

752

753 **Tabla de datos extendidos 4. Predicción MD del efecto de las variaciones críticas de residuos en la**
 754 **interacción entre NeoCoV y Bat37ACE2 por mCSM-PPI2.**
 755

Sustitución	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)									
	N504	G508	A509	T510	N511	K512	L539	G546	P548	R550
A	-0.087	-0.573		0.041	-0.477	-0.396	-0.22	-0.106	-0.646	-0.434
R	0.133	-0.849	0.261	0.196	-0.315	0.001	-0.273	-0.164	-0.152	
norte		-0.515	0.466	0.078		0.015	-0.283	-0.008	-0.33	-0.369
D	0.098	-0.401	0.518	0.179	-0.038	-0.362	-0.257	0.219	-0.167	-0.543
C	-0.103	-0.805	0.148	-0.052	-0.525	-0.473	-0.261	-0.223	-0.385	-0.405
q	0.113	-0.572	0.341	0.077	-0.577	0.211	-0.215	-0.007	-0.121	-0.285
mi	0.294	-0.324	0.37	0.131	-0.277	-0.348	-0.302	0.21	0.006	-0.486
GRAMO	-0.129		-0.671	-0.102	-0.435	-0.543	-0.236		0.147	-0.591
H	0.156	-0.64	0.402	0.146	-0.065	-0.157	-0.064	-0.16	-0.304	-0.12
I	-0.182	-0.787	0.403	0.081	-0.184	-0.319	-0.178	-0.177	-0.403	-0.265
L	-0.137	-0.857	0.334	0.061	-0.123	-0.02		-0.189	-0.508	-0.269
k	0.27	-0.767	0.009	0.416	-0.722		-0.175	-0.098	-0.187	-0.113
METRO	-0.255	-0.682	-0.1	-0.001	-0.246	-0.325	-0.251	-0.105	-0.526	-0.311
F	-0.073	-0.476	1.012	0.487	-0.12	-0.134	0.287	-0.023	0.1504	-0.281
PAGS	0.051	-0.712	-0.44	-0.149	-0.478	-0.41	-0.379	-0.125		-0.161
S	-0.101	-0.441	0.237	-0.011	-0.454	-0.17	-0.142	-0.082	-0.279	-0.3
T	-0.061	-0.567	0.342		-0.476	-0.226	-0.186	-0.077	-0.414	-0.32
W	-0.002	-0.158	1.396	0.481	0.033	-0.132	0.234	0.09	0.335	-0.066
Y	-0.072	-0.439	1.355	0.284	-0.083	-0.065	0.204	0.02	0.1918	-0.282
V	-0.086	-0.673	0.025	0.003	-0.341	-0.408	0.031	-0.082	-0.563	-0.405

756

- 757 1 Raj, VS *et al.* La dipeptidil peptidasa 4 es un receptor funcional para el emergente coronavirus
758 humano-EMC. *Naturaleza***495**, 251-254, doi:10.1038/nature12005 (2013).
- 759 2 yang, y. *et al.* El uso del receptor y la entrada en la célula del coronavirus de murciélago HKU4 brindan información
760 sobre la transmisión del coronavirus MERS de murciélago a humano. *Proc Natl Acad Sci EE. UU.***111**, 12516-12521,
761 doi:10.1073/pnas.1405889111 (2014).
- 762 3 Lau, SKP *et al.* El uso del receptor de un nuevo betacoronavirus del linaje C de murciélago revela la
763 evolución de las proteínas de pico de coronavirus relacionadas con el síndrome respiratorio de Oriente
764 Medio para la unión de la dipeptidil peptidasa 4 humana. *J infectar enfermedad***218**, 197-207, doi:10.1093/
765 infdis/jiy018 (2018). Luo, CM *et al.* Descubrimiento de nuevos coronavirus de murciélago en el sur de China
766 que utilizan el mismo receptor que el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio. *J Viro***92**,
767 doi:10.1128/JVI.00116-18 (2018).
- 768 5 Ithete, Países Bajos *et al.* Pariente cercano del coronavirus humano del síndrome respiratorio de Oriente
769 Medio en murciélago, Sudáfrica. *Infecciones emergentes* **19**, 1697-1699, doi:10.3201/eid1910.130946
770 (2013). Cui, J., Li, F. & Shi, ZL Origen y evolución de los coronavirus patógenos. *Nat Rev Microbiol* **17**,
771 181-192, doi:10.1038/s41579-018-0118-9 (2019).
- 772 7 Li, W. *et al.* El amplio compromiso del receptor de un coronavirus global emergente puede
773 potenciar su diversa transmisibilidad entre especies. *Proc Natl Acad Sci EE. UU.***115**, E5135-E5143,
774 doi:10.1073/pnas.1802879115 (2018).
- 775 8 Lednicky, JA *et al.* Infecciones independientes de deltacoronavirus porcino entre niños haitianos.
776 *Naturaleza***600**, 133-137, doi:10.1038/s41586-021-04111-z (2021).
- 777 9 Latinne, A. *et al.* Origen y transmisión entre especies de coronavirus de murciélago en China. *comuna*
778 *nacional***11**, 4235, doi:10.1038/s41467-020-17687-3 (2020).
- 779 10 Wong, ACP, Li, X., Lau, SKP & Woo, PCY Epidemiología global de coronavirus de murciélago.
780 *virus***11**, doi:10.3390/v11020174 (2019).
- 781 11 Ksiazek, TG *et al.* Un nuevo coronavirus asociado con el síndrome respiratorio agudo severo. *N*
782 *Inglés J Med***348**, 1953-1966, doi:10.1056/NEJMoa030781 (2003).
- 783 12 Zaki, AM, van Boheemen, S., Bestebroer, TM, Osterhaus, AD y Fouchier, RA Aislamiento de un
784 nuevo coronavirus de un hombre con neumonía en Arabia Saudita. *N Inglés J Med***367**,
785 1814-1820, doi:10.1056/NEJMoa1211721 (2012).
- 786 13 Zhou, p. *et al.* Un brote de neumonía asociado a un nuevo coronavirus de probable origen murciélago.
787 *Naturaleza***579**, 270-273, doi:10.1038/s41586-020-2012-7 (2020).
- 788 14 Chen, I. *et al.* El enfoque mNGS basado en ARN identifica un nuevo coronavirus humano de dos casos
789 individuales de neumonía en el brote de Wuhan de 2019. *Los microbios emergentes infectar***9**, 313-319,
790 doi:10.1080/22221751.2020.1725399 (2020).
- 791 15 QUIÉN. *medio oriente respiratorio* *síndrome* *coronavirus* *(MERS-CoV)*,
792 <<http://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/>> (
- 793 dieciséis Mohd, HA, Al-Tawfiq, JA & Memish, ZA Origen del coronavirus del síndrome respiratorio de
794 Oriente Medio (MERS-CoV) y reservorio animal. *Viro J.* **13**, 87, doi:10.1186/s12985-016-0544-0
795 (2016).
- 796 17 Li, F. Mecanismos de reconocimiento de receptores de coronavirus: una década de estudios estructurales. *J*
797 *Viro***89**, 1954-1964, doi:10.1128/JVI.02615-14 (2015).
- 798 18 Li, W. *et al.* La enzima convertidora de angiotensina 2 es un receptor funcional para el coronavirus del
799 SARS. *Naturaleza***426**, 450-454, doi:10.1038/nature02145 (2003).
- 800 19 Yeager, CL *et al.* La aminopeptidasa N humana es un receptor para el coronavirus humano 229E.

- 801 *Naturaleza***357**, 420-422, doi:10.1038/357420a0 (1992).
- 802 20 Williams, RK, Jiang, GS & Holmes, KV El receptor para el virus de la hepatitis de ratón es un miembro
803 de la familia de glicoproteínas del antígeno carcinoembrionario. *Proc Natl Acad Sci EE. UU.***88**,
804 5533-5536, doi:10.1073/pnas.88.13.5533 (1991).
- 805 21 Tsai, JC, Zelus, BD, Holmes, KV & Weiss, SR El dominio N-terminal de la glucoproteína del pico del
806 coronavirus murino determina la especificidad del receptor CEACAM1 de la cepa del virus. *J Virol*
807 **77**, 841-850, doi:10.1128/jvi.77.2.841-850.2003 (2003).
- 808 22 Hoffman, H. *et al.* El coronavirus humano NL63 emplea el receptor del coronavirus del síndrome
809 respiratorio agudo severo para la entrada celular. *Proc Natl Acad Sci EE. UU.***102**, 7988-7993,
810 doi:10.1073/pnas.0409465102 (2005).
- 811 23 Antonio, SJ *et al.* Evidencia adicional de los murciélagos como la fuente evolutiva del coronavirus
812 del síndrome respiratorio de Oriente Medio. *mBio* **8**, doi:10.1128/mBio.00373-17 (2017). Corman,
813 24 VM *et al.* Caracterización de un nuevo betacoronavirus relacionado con el coronavirus del
814 síndrome respiratorio de Oriente Medio en erizos europeos. *J Viro***88**, 717-724, doi:10.1128/
815 JVI.01600-13 (2014).
- 816 25 Lau, SKP *et al.* Identificación de un nuevo betacoronavirus (merbecovirus) en erizos de
817 Amur de China. *virus***11**, doi:10.3390/v11110980 (2019).
- 818 26 Corman, VM *et al.* Enraizamiento del árbol filogenético del coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente
819 Medio mediante la caracterización de un virus conespecífico de un murciélago africano. *J Viro***88**,
820 11297-11303, doi:10.1128/JVI.01498-14 (2014).
- 821 27 Geldenhuys, M. *et al.* Un enfoque de descubrimiento viral metagenómico identifica posibles virus
822 zoonóticos y nuevos de mamíferos en murciélagos Neoromicia dentro de Sudáfrica. *Más uno***13**,
823 e0194527, doi:10.1371/journal.pone.0194527 (2018).
- 824 28 Menaje, VDet *et al.* El tratamiento con tripsina desbloquea la barrera para la infección por coronavirus de
825 murciélago zoonótico. *J Viro***94**, doi:10.1128/JVI.01774-19 (2020).
- 826 29 Adams, DJ, Spendlove, JC, Spendlove, RS & Barnett, BB Estabilidad en aerosol de partículas
827 de reovirus infecciosas y potencialmente infecciosas. *Appl Environ Microbiol***44**, 903-908,
828 doi:10.1128/aem.44.4.903-908.1982 (1982).
- 829 30 Whitt, MA Generación de pseudotipos de VSV utilizando DeltaG-VSV recombinante para estudios sobre la
830 entrada de virus, identificación de inhibidores de entrada y respuestas inmunitarias a las vacunas. *Métodos*
831 *J Viro***169**, 365-374, doi:10.1016/j.jviromet.2010.08.006 (2010).
- 832 31 Yan, H. *et al.* El uso del receptor ACE2 revela una variación en la susceptibilidad a la infección por
833 SARS-CoV y SARS-CoV-2 entre las especies de murciélagos. *Nat Ecol Evo***5**, 600-608,
834 doi:10.1038/s41559-021-01407-1 (2021).
- 835 32 Ishikawa, H., Meng, F., Kondo, N., Iwamoto, A. & Matsuda, Z. Generación de una proteína indicadora
836 dividida de doble función para monitorear la fusión de membranas usando GFP dividida autoasociada.
837 *Proteína Ing Des Sel***25**, 813-820, doi:10.1093/protein/gzs051 (2012).
- 838 33 Rodrigues, CHM, Myung, Y., Pires, DEV y Ascher, DB mCSM-PPI2: predicción de los efectos de las
839 mutaciones en las interacciones proteína-proteína. *Ácidos Nucleicos Res* **47**, W338-W344,
840 doi:10.1093/nar/gkz383 (2019).
- 841 34 du, y. *et al.* Un anticuerpo humanizado dirigido a ACE2 ampliamente neutralizante contra las variantes del
842 SARS-CoV-2. *comuna nacional***12**, 5000, doi:10.1038/s41467-021-25331-x (2021).
- 843 35 Wrapp, D. *et al.* Base estructural para la neutralización potente de betacoronavirus por
844 anticuerpos de camélidos de dominio único. *Celda***181**, 1004-1015 e1015,

- 845 doi:10.1016/j.cell.2020.04.031 (2020).
- 846 36 Liu, Y., Gayle, AA, Wilder-Smith, A. & Rocklov, J. El número reproductivo de COVID-19 es mayor en
847 comparación con el coronavirus SARS. *J Travel Med* **27**, doi:10.1093/jtm/taaa021 (2020). Liu, Y. &
848 37 Rocklov, J. El número reproductivo de la variante Delta del SARS-CoV-2 es mucho más alto en
849 comparación con el virus ancestral SARS-CoV-2. *J Travel Med* **28**, doi:10.1093/jtm/taab124 (2021).
- 850
- 851 38 Nishiura, H. *et al.* Número relativo de reproducción de SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) en
852 comparación con la variante Delta en Sudáfrica. *J Clin Med* **11**, doi:10.3390/jcm11010030
853 (2021).
- 854 39 Baric, RS, Fu, K., Schaad, MC & Stohlman, SA Establecimiento de un mapa de recombinación genética
855 para grupos de complementación de la cepa A59 del coronavirus murino. *Virología* **177**, 646-656,
856 doi:10.1016/0042-6822(90)90530-5 (1990).
- 857 40 Banner, LR, Keck, JG & Lai, MM Una agrupación de sitios de recombinación de ARN adyacentes a
858 una región hipervariable del gen peplomer del coronavirus murino. *Virología* **175**, 548-555,
859 doi:10.1016/0042-6822(90)90439-x (1990).
- 860 41 Chu, DK *et al.* Coronavirus MERS en dromedarios, Egipto. *Infecciones emergentes* **20**,
861 1049-1053, doi:10.3201/eid2006.140299 (2014).
- 862 42 Harvey, W.T. *et al.* Variantes de SARS-CoV-2, mutaciones de pico y escape inmunológico. *Nat Rev*
863 *Microbiol* **19**, 409-424, doi:10.1038/s41579-021-00573-0 (2021).
- 864 43 Callaway, E. La variante de Omicron fuertemente mutada pone a los científicos en alerta. *Naturaleza* **600**, 21,
865 doi:10.1038/d41586-021-03552-w (2021).
- 866 44 Schwegmann-Wessels, C. *et al.* Comparación del virus de la estomatitis vesicular
867 seudotipado con las proteínas S de un coronavirus porcino y humano. *J Gen Virol* **90**,
868 1724-1729, doi:10.1099/vir.0.009704-0 (2009).
- 869 45 Wang, J., Kondo, N., Long, Y., Iwamoto, A. & Matsuda, Z. Monitoreo de la fusión de membrana
870 mediada por la envoltura del VIH-1 usando proteínas fluorescentes verdes divididas modificadas.
871 *Métodos J Viro* **161**, 216-222, doi:10.1016/j.jviromet.2009.06.017 (2009).
- 872 46 Scheres, SH RELION: implementación de un enfoque bayesiano para la determinación de la estructura
873 crio-EM. *Biol de estructura* **180**, 519-530, doi:10.1016/j.jsb.2012.09.006 (2012).
- 874 47 marrón, a. *et al.* Herramientas para la construcción y refinamiento de modelos macromoleculares en
875 reconstrucciones de criomicroscopía electrónica. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **71**, 136-153,
876 doi:10.1107/S1399004714021683 (2015).
- 877 48 Afonine, PV *et al.* Hacia el refinamiento automatizado de la estructura cristalográfica
878 con phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **68**, 352-367,
879 doi:10.1107/S0907444912001308 (2012).
- 880 49 LJ REED, HM UN MÉTODO SENCILLO PARA ESTIMAR EL CINCUENTA POR CIENTO DE LOS PUNTOS FINALES. *Revista*
881 *americana de epidemiología* **27**, 493-497 (1938).
- 882 50 Ni, J. *et al.* Cuantificación del anticuerpo neutralizante del SARS-CoV-2 mediante un ensayo basado en virus
883 pseudotipificado. *protocolo nacional* **15**, 3699-3715, doi:10.1038/s41596-020-0394-5 (2020).

884