

REAL ACADEMIA DE CIENCIAS
EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

**CORONAVIRUS: EVOLUCIÓN,
PATOLOGÍA Y PROTECCIÓN**

DISCURSO LEÍDO EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN
COMO ACADÉMICO DE NÚMERO POR EL

EXCMO. SR. D. LUIS ENJUANES SÁNCHEZ

Y CONTESTACIÓN DEL
EXCMO. SR. D. ESTEBAN DOMINGO SOLANS
EL DÍA 31 DE ENERO DE 2024



MADRID
Domicilio de la Academia
Valverde, 22

ISSN: 0214-9540

ISBN: 978-84-87125-82-9

Depósito legal: M-33378-2023

ÍNDICE

Introducción	7
Diseminación de los virus	9
Clasificación de los coronavirus	12
Estructura genética de los coronavirus	16
Construcción del primer coronavirus sintético por genética inversa: una herramienta esencial	24
Epidemias por CoV altamente patógenos para las personas	26
Origen del SARS-CoV-2	29
Fijación de mutaciones en la proteína S del SARS-CoV-2 que han facilitado su diseminación	33
Genes de los CoVs asociados a su virulencia	35
Evolución SARS-CoV-2	42
Respuesta inmune a las infecciones por CoVs	45
Alteración de la respuesta inmune en infecciones por CoVs humanos letales	46
Proteínas de CoVs que interfieren con la inducción de interferon	48
Factores que favorecen la inflamación	48
COVID-19 de larga duración. Mecanismos causantes: posible combinación de varios mecanismos	49
Desarrollo de vacunas	51
Tipos y número de vacunas en desarrollo	51
Vacunas basadas en mRNAs	53
Vacunas frente el MERS-CoV y el SARS-CoV-2 basadas en replicones RNA de coronavirus	54
Desarrollo de vacunas para el SARS-CoV-2 basadas en replicones RNA derivados de CoVs	56
Características de la protección inducida en la vacunación con los replicones RNA diseñados en nuestro laboratorio	61
Etapas para mejorar los prototipos de la vacuna para el SARS-CoV-2 desarrollado en nuestro laboratorio	62
Referencias	65
Discurso de contestación del Excmo. Sr. D. Esteban Domingo Solans	97

**DISCURSO DE INGRESO
DEL
EXCMO. SR. D. LUIS ENJUANES SÁNCHEZ**

Excelentísimo Señor Presidente,
Excelentísimos Señores Académicos,
Señoras y señores:

Introducción

Tuve la suerte de estudiar el bachillerato en el Instituto Luis Vives de Valencia con excelentes profesores, pero recuerdo con especial interés al profesor Severino Gogh de Física y Química que me introdujo en estas materias lo que condicionó mi posterior entrada en la Facultad de Ciencias de Valencia donde me gradué en Ciencias Químicas (1968). En esta facultad también tuve excelentes profesores. Compartí el tiempo entre el estudio en la facultad y el trabajo necesario. Al terminar la licenciatura me interesé por las ciencias de la vida, y repartí mi tiempo entre el trabajo de investigación en la Cátedra de Química Orgánica y otro, mejor remunerado, en la Facultad de Medicina de Valencia. De allí, con el fin de ampliar mis conocimientos en Virología, me trasladé a Madrid para trabajar por primera vez con virus humanos, en el Instituto Nacional de Oncología de Madrid, asociado al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y dirigido por el Prof. Isidro Valladares. En este centro adquirí una formación en Virología, que luego me facilitó la entrada en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), en el excelente laboratorio de Genética Molecular dirigido por los Profs. Eladio Viñuela y Margarita Salas, que desarrollaron un laboratorio pionero en España. Este hecho representó un privilegio que ha condicionado mi carrera científica. Realicé mi Tesis Doctoral bajo la dirección del Prof. Viñuela, sobre el virus de la Peste Porcina Africana de alto interés científico y económico. Fueron tiempos intensamente dedicados a la investigación, en los que colaboré con gran entusiasmo con el Prof. Viñuela en la creación de esta línea de trabajo. Defendí mi tesis doctoral en la Facultad de Ciencias de la Universidad Complutense de Madrid en el año 1975, y posteriormente me trasladé a los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU., en Bethesda, con el Prof. Albert L. Notkins para trabajar en la respuesta inmune innata (interferón, IFN) y, posteriormente, en el “Frederick Cancer Research Center”, con el Prof.

James Ihly, sobre los mecanismos de inducción de leucemia por el retrovirus de Moloney (1976-1980).

En el año 1979 obtuve la plaza de Investigador Titular en el CIB y un año después regresé al laboratorio del Prof. Viñuela, en el Centro de Biología Molecular (CBM-CSIC) (1 abril de 1980). Tres años más tarde establecí mi primer laboratorio como investigador independiente iniciando mi investigación sobre los coronavirus, que han centrado mi trabajo científico hasta la actualidad. Accedí a Investigador científico Asociado (1986-1989) y unos años después a Profesor de Investigación del CSIC (1993-presente). Durante todos estos años fue para mí un privilegio trabajar en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa y quisiera dar las gracias a toda las enseñanzas y ayudas recibidas del Prof. Eladio Viñuela, y también del Prof. Esteban Domingo, que me apoyó en todo momento.

Doy las gracias a mis colaboradores principales en el laboratorio, las Dras. Isabel Sola y Sonia Zúñiga, que me han ayudado en la dirección del Laboratorio de Coronavirus del CNB, y al Dr. Juan Antonio García una fuente interminable de conocimiento.

Así mismo, agradezco todo su trabajo científico a los doctorandos y colaboradores que han trabajado con gran dedicación en el desarrollo de los proyectos del laboratorio:

Ángel López Carrascosa, 1985; Merche Pérez Melgosa, 1984; Joan Fibla Palazón, 1990; Ignacio Casal Álvarez, 1984; Blanca García-Barrero, 1985; Antonio Sanz Fernández, 1990; Gustavo Jiménez Wiener, 1991; María J. Bullido, 1988; Isabel Correa, 1988; Carles Suñé, 1992; Fátima Gebauer, 1986; Cristian Smerdou Picazo, 1993; Inés M. Antón, 1994; Ana Méndez Álvarez, 1995; María L. Ballesteros, 1996; Joaquín Castilla Castrillón, 1996; Carlos Sánchez Sánchez, 1997; Isabel Sola Gurpegui, 1997; Ander Izeta Permisán, 2000; José Manuel González, 2000; José Manuel Sánchez Morgado, 2001; Sara Alonso Villanueva, 2001; David Escors Murugarren, 2001; Cristina Riquelme Gabriel, 2005; Carmen Galán Avella, 2008; M. Carmen Capiscol Pérez de Tudela, 2008; Juan E. Ceriani, 2008; José Luis Moreno, 2008; Marta L. DeDiego, 2008; Aitor Nogales González, 2012; Jazmina González Cruz, 2011; José Luis Nieto Torres, 2014; Pedro Antonio Mateos Gómez, 2012; Silvia Márquez Jurado, 2015; José Manuel Jiménez Guardeña, 2015; Martina Bécares Palacios,

2015; Jose Angel Regla Nava, 2015; María Lucía Morales Rodríguez, 2017; Carlos Castaño Rodríguez, 2018; Alejandro Pascual Iglesias, 2020; Javier Cantón Bailón, 2020; Javier Gutiérrez Álvarez, 2020; José Manuel Honrubia Belenguer, 2022; Li Wang, 2022; Ricardo Requena Platek, 2020; Jesús Hurtado Tamayo, 2020; María Guzmán Colomina, 2022; Marta Villarejo Torres, 2022; María Alicia Rueda Huélamo, 2023; Ana Marchena Pasero, 2023, y Marga González.

Mas que una mirada al pasado, centraré la mayor parte del espacio de esta memoria en el trabajo de la última etapa científica dedicada a los coronavirus.

Diseminación de los virus

Los virus se encuentran donde hay vida, dado que para su replicación dependen de las células. La cantidad de virus en las aguas puede oscilar entre 5.000 y 250 millones de partículas por mililitro, tal como sucede en ciertos lagos alemanes (Hamilton, 2006). Los virus son los mayores generadores de diversidad mediante el intercambio de material genético con células del hospedador, que les ayudan a su multiplicación, lo que lo hace muy relevantes en su evolución y en la de las células que infectan. Los virus se reinventan a sí mismos constantemente, adaptándose al medio en el que se replican, cambiando de especie, y causando amplias epidemias y pandemias, como la que tiene lugar en este momento con el SARS-CoV-2 (Wu et al., 2020) y otras del pasado. Basta con recordar la pandemia de la gripe de 1918 que causó más de 20 millones de muertos (Petersen et al., 2020). El Prof. Brian Mahy, cuando era director de la División de Virología del Centro para el Control de Enfermedades Infecciosas (CDC, Atlanta, EE. UU.), con amplia información para conocer las epidemias que nos invaden, en una de sus visitas a nuestro laboratorio en Madrid, comunicó al periódico *El País*, a las puertas del año 2000, que cada año emergen de uno a tres nuevos virus que infectan a las personas aunque, afortunadamente, no todos ellos son mortales. Reforzando esta idea, Ian Lipkin del Instituto Rockefeller de Nueva York publicó hace unos años que, según sus predicciones, deberían de existir unos 300.000 virus no identificados todavía (Anthony et al., 2013), lo que sugiere fuertemente que nos hemos de preparar para un futuro lleno de epidemias virales.

Los coronavirus (CoV) afectan de forma muy importante a las personas y también a los animales domésticos y silvestres. Los animales más importantes en la cadena alimentaria de las personas, como el ganado porcino, bovino, ovino y aviar sufren importantes infecciones por CoVs, que les causan la muerte o graves patologías. Esto es lo que sucede a los lechones recién nacidos que se infectan por el virus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV, por sus siglas en inglés) dando lugar frecuentemente a su eliminación. En las aves, los CoVs causan la bronquitis infecciosa (IBV), con amplias consecuencias económicas y sociales. Las pérdidas económicas debidas a las epidemias virales, oscilan entre el 1,5 y 5,5 % del producto interior bruto (PIB) de los distintos países, siendo el efecto mucho más grave en los más pobres que en los ricos (Harlem Brundtland and As Sy, 2020).

Se ha acumulado amplia información sobre la influencia del cambio climático en la emergencia de los virus. Estos, se pueden transmitir por mosquitos, como es el caso del virus del Nilo Occidental (WNV) y del Zika, o por el aire y entre personas, como los CoVs, que se pueden transmitir directamente entre personas, o entre roedores y personas, como los hantavirus. El cambio climático afecta a la diseminación de los vectores como las garrapatas, los mosquitos y las aves, que los trasladan a largas distancias durante los procesos migratorios. Hay otros factores que tienen una relevancia elevada en esta forma de transmisión y que favorecen el impacto del cambio climático en la diseminación de los virus: la temperatura y la humedad. Otros factores también favorecen esta diseminación. Este es el caso del uso de la tierra por el hombre, el control de las plagas, la interacción del virus con el hospedador, el estado inmunitario de este, la evolución genética del virus, particularmente elevada en los virus con un genoma RNA, el comercio de mercancías que frecuentemente trasladan a estos vectores, y los viajes de las personas, que hoy en día parecen no tener límites geográficos. Se han validado modelos que establecen evidencias directas sobre el efecto del cambio climático en la emergencia de los virus. Uno de ellos se ha basado en la diseminación del virus de la lengua azul (BTV, del acrónimo inglés *blue tong virus*) que afecta a todo tipo de animales ungulados, como las ovejas, ganado vacuno, llamas, alces y otros. Esta enfermedad es causada por un virus que ha hecho incursiones esporádicas en el sur de Europa. Sin embargo, desde 1998, el virus BTV se ha diseminado por 12 países, situados a 800 km al norte de Europa. Esta diseminación está asociada al cambio

climático en Europa, que ha permitido la persistencia del virus durante el invierno y la expansión hacia el norte del mosquito *Culicoides imicola*, el principal vector del virus (Purse et al., 2005). La distribución del mosquito *C. imicola* en el mundo se extiende a lo largo de una franja comprendida entre el paralelo 35° Sur y el 40° Norte, una zona que coincide con la presencia del BTV, lo que refuerza el concepto de que esta diseminación depende de la presencia del citado mosquito. Otra observación significativa que refuerza la relevancia del cambio climático en el desplazamiento del virus BTV desde el norte de África y el Oriente Medio hacia Europa es que al menos 5 serotipos del BTV, denominados 1, 2, 4, 9 y 16, se desplazaron simultáneamente desde el Sur al Norte de Europa, lo que implica que su desplazamiento no se debía una mutación específica incorporada en uno de estos virus, sino a una causa común a todos ellos, que se extendía por una amplia zona entre África y el Oriente Medio.

La transmisión del BTV está modulada por la temperatura porque la replicación de este virus se inhibe por debajo de 8-10 °C y es óptima a 18-29 °C, debido a que la actividad de la RNA-polimerasa viral tiene una actividad óptima a las mismas temperaturas. La humedad es la segunda variable más importante que afecta a la transmisión del BTV: el transporte de los mosquitos por el viento (8 km/h) depende de la humedad, ampliamente controlada por el cambio climático. La evolución de la temperatura en Europa, particularmente desde el año 1982 ha mostrado un incremento constante, y ha subido más de medio grado centígrado, lo que representa una subida muy elevada que afecta a la distribución de los mosquitos.

El virus del Nilo Occidental (WNV) reemergió en el año 1999 en un parque cerca de Nueva York (EE. UU.). El virus se transmite principalmente por aves, su hospedador natural junto a otros mamíferos, y por 62 especies de mosquitos. El virus se perpetúa en un círculo, transmitiéndose entre el mosquito *Culex pipiens* y un hospedador vertebrado, los grajos o cuervos merenderos, unos pájaros córvidos de unos 45 cm de longitud y plumaje negro violáceo, que duermen en colonias en las copas de los árboles. Desde este círculo de mantenimiento, el virus se transmite a las personas, a los caballos y, ocasionalmente, a otros mamíferos.

Clasificación de los coronavirus

El reservorio natural de todos los CoVs humanos y animales son los murciélagos que se encuentran volando en todos los continentes de la Tierra (Fig. 1). Los CoVs son virus con envuelta y genoma RNA de polaridad positiva y pertenecen a la familia *Coronaviridae*, que junto con las familias *Arteriviridae*, *Roniviridae* y *Mesoviridae* componen el orden de los *Nidovirales* (Walker et al., 2021). Este orden comprende ocho subórdenes: *Abnidovirinaeae*, *Arnidovirinae*, *Cornidovirinaeae*, *Ronidovirinae*, *Tornidovirinae*, *Cornidovirinaeae*, *Monidovirinaeae* y *Nanidovirinaeae* siendo este último al que pertenecen los CoVs. La característica común de los *Nidovirales* es la producción de mRNAs subgenómicos 5' y 3' coterminales o anidados, que da el nombre al orden (Carstens, 2010; de Groot et al., 2012; Enjuanes et al., 2008).

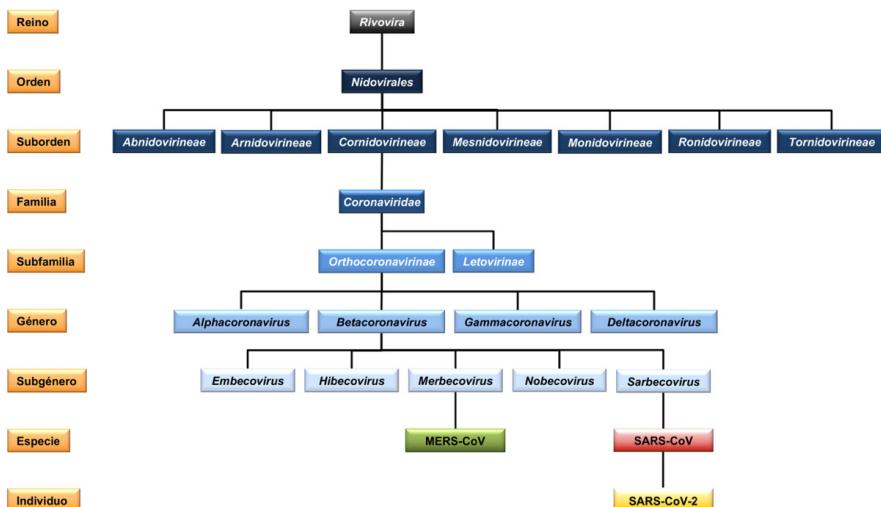


Figura 1. Taxonomía del orden Nidovirales. La figura muestra las familias, subfamilias y géneros relacionados con los CoVs que forman el orden de los Nidovirales.

La familia *Coronaviridae* alberga a las subfamilias *Letovirinae*, *Pitovirinae* y *Orthocoronavirinae*. Esta última se divide a su vez en los géneros *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, *Delta-coronavirus*, y según algunos autores, *Epsilovirus*, que engloban más de 20 especies que infectan vertebrados, entre ellos mamíferos y aves (de

Groot et al., 2012). El género *Betacoronavirus* incluye cinco subgéneros: *Embecovirus*, *Hibecovirus*, *Merbecovirus*, *Nobecovirus* y *Sarbecovirus* (ICTV Taxonomy 2019, <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomyhistory?taxnode.id=202001868>). Los CoVs humanos (hCoVs) causantes del síndrome respiratorio agudo y grave (SARS-CoV) y del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) (Drosten et al., 2003; Zaki et al., 2012) pertenecen a los subgéneros *Sarbecovirus* y *Merbecovirus*, respectivamente. El último CoV humano identificado ha sido el coronavirus causante de otro síndrome respiratorio agudo y grave, el SARS-CoV-2, que también pertenece al subgénero *Sarbecovirus*, y se clasifica dentro de la especie de virus relacionados con el SARS-CoV (Gorbalenya et al., 2020a).

Durante los últimos diez años han emergido o reemergido en torno a diez CoVs que infectan a los animales domésticos y al hombre. En aquellos países como China, donde existen muchas granjas abiertas al exterior, la aparición de los CoVs se ve facilitada por el contacto de cualquier animal doméstico con los murciélagos, dando lugar a contagios que se pueden amplificar en los mercados húmedos que existen en China, donde la venta de animales vivos es muy frecuente. Este es el caso del mercado de Guandong, al Sureste de China, o de Huanan en la parte Norte de la ciudad de Wuhan. Los CoVs se transmiten por contacto entre personas o por el aire y son virus que pueden infectar muchos tejidos del cuerpo humano. En general son específicos de especie, pero debido a la generación de una cantidad enorme de mutantes, producen variantes que adquieren la propiedad de cruzar la barrera de las especies, iniciando zoonosis que pueden terminar en una pandemia, como ha sucedido con el SARS-CoV-2.

Los CoV humanos (hCoVs) se han asociado con infecciones respiratorias leves. De hecho, de los siete CoVs humanos aislados, los primeros cuatro: HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-HKU1 y HCoV-NL63 son responsables del 5-30% de los resfriados comunes, y son los causantes de enfermedades pulmonares graves en recién nacidos, personas mayores o individuos inmunodeprimidos (Garbino et al., 2006; McIntosh et al., 1969). Sin embargo, la relevancia de los hCoVs aumentó radicalmente en el año 2002 con la aparición en China del SARS-CoV, que provocó una pandemia con 8.422 enfermos diagnosticados en 32 países y que dejó un balance de 916 fallecidos, con un 10% de mortalidad (Drosten et al., 2003; Rota et al., 2003). La epidemia del SARS-CoV

fomentó la búsqueda del reservorio animal del virus. Se identificaron CoVs muy similares al SARS-CoV en mapaches (*Nyctereutes procyonoides*), tejones chinos (*Melogale moschata*) y en civetas (*Paguma larvata*) que se criaban en granjas y se comercializaban en mercados. En 2005 se detectaron virus similares al SARS-CoV en murciélagos, en civetas y humanos (Lau et al., 2005; Li et al., 2005), pero hasta 2017 no se han encontrado poblaciones de murciélagos con virus tan parecidos al SARS-CoV que pudiesen ser considerados antecesores directos del mismo (Hu et al., 2017). La elevada identidad de las secuencias de los genomas de los CoV humanos y de las civetas, superior al 99,99%, determinada en el año 2002 durante la emergencia del SARS-CoV, indica que el virus habría pasado desde los murciélagos al hombre a través de las civetas, o incluso directamente de los murciélagos al hombre (Guan et al., 2003; Kan et al., 2005; Lau et al., 2005). El análisis masivo de virus presentes en murciélagos repartidos por varias zonas del planeta permitió identificar muchos virus similares a los CoVs que causaban otras patologías humanas o animales (Annan et al., 2013; Chu et al., 2008; Drexler et al., 2010; Falcon et al., 2011; Graham et al., 2013; Muller et al., 2007; Quan et al., 2010). Los murciélagos, con más de 1100 especies distribuidas por todo el planeta, representan el reservorio

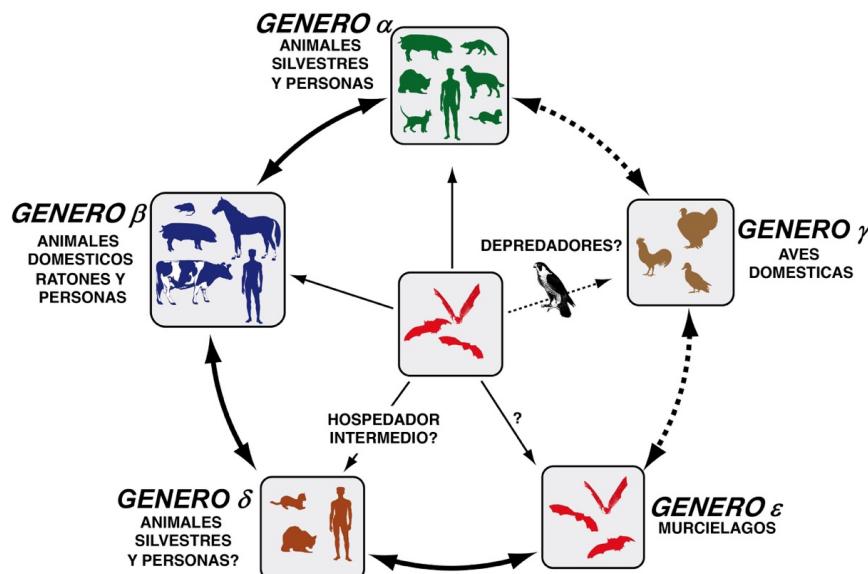


Figura 2. Ecología simplificada postulada para los coronavirus (S. Gorbálenya modificado por L. Enjuanes) (Gorbálenya et al., 2020b)

natural de coronavirus que infectan las especies animales (Fig. 2). Los murciélagos proporcionan el ambiente adecuado para que se den fenómenos de recombinación entre distintos CoVs, dando lugar a nuevos virus potencialmente peligrosos, capaces de infectar a los humanos o a otros animales. Se ha sugerido que algunos CoVs aislados de murciélagos pueden infectar directamente células de pulmón humano y producir enfermedad (Menachery et al., 2015). El acercamiento progresivo de los asentamientos humanos al hábitat de estos animales ha aumentado las probabilidades de la transmisión de enfermedades por salto entre especies. El MERS-CoV pasó de los murciélagos a los dromedarios hace más de 30 años (de Wit et al., 2016), y circula desde entonces en esta especie, desde donde pasó a humanos en 2012 en Arabia Saudita (Annan et al., 2013) a través de dromedarios, que actuaban como el vector intermedio (Azhar et al., 2014). En ellos, estos virus causan neumonías graves, acompañadas ocasionalmente de patología renal (Assiri et al., 2013). Por el momento, el MERS-CoV ha afectado a más de 2600 personas, distribuidas en 27 países principalmente de Oriente Medio, causando la muerte de casi mil (WHO, 2022). Por esta razón se estima una mortalidad entorno al 37% (febrero 2023), y el virus se continúa diseminando lentamente en la actualidad.

El último hCoV identificado ha sido el SARS-CoV-2 que causa la enfermedad COVID-19. El SARS-CoV-2 se descubrió en diciembre de 2019 y ha causado la pandemia más importante del siglo XXI (Zhu et al., 2020c). Desde que comenzó el brote se han infectado más de 770 millones de casos en todo el mundo causando más de 6,95 millones de muertes, con una tasa de mortalidad de en torno al 2% (<https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19-1-september-2023>). El SARS-CoV-2 infecta a personas de todas las edades (Chen et al., 2020; Wu and McGoogan, 2020) con una amplia variedad de síntomas (Giacomelli et al., 2020; Guan et al., 2020; Huang et al., 2020; Wu and McGoogan, 2020). El impacto de la pandemia del SARS-CoV-2 ha sido abrumador en términos sociológicos, sanitarios y económicos en comparación con las epidemias del MERS-CoV y SARS-CoV. El SARS-CoV-2 comparte un 50% de identidad de secuencia genómica con el MERS-CoV y un 80% con el SARS-CoV. Una de las diferencias principales a nivel genómico con el SARS-CoV es la inserción de una secuencia de residuos básicos (RRAR) en la unión del sitio de escisión S1 y S2 de la proteína de la espícula (S) (Coutard et al., 2020; Wang et al., 2021). Esta inserción de residuos básicos puede

estar implicada en el amplio tropismo celular del SARS-CoV-2 y su alta transmisibilidad (Hoffmann et al., 2020). Si bien la transmisión del SARS-CoV tenía lugar principalmente una vez que aparecían los primeros síntomas (Peiris et al., 2003a), el SARS-CoV-2 puede transmitirse durante el período asintomático debido a su capacidad de infectar el tracto respiratorio superior con mayor eficacia, en comparación con el SARS-CoV y MERS-CoV (de Wit et al., 2013; Gu and Korteweg, 2007; Li et al., 2020; Murphy, 2020; Zou et al., 2020). Los CoVs tienen cierta facilidad para cruzar la barrera de especie y adaptarse a los humanos, donde pueden ocasionar patologías moderadas, como sucede con el caso de los CoVs humanos HCoV-229E, el HCoV-OC43, el HCoV-NL63 y el HCoV-HKU1, o muy graves como las causadas por el SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 (Graham et al., 2013; Prince et al., 2021). Por ello, el estudio de los mecanismos de la patogenicidad de estos virus, así como el desarrollo de terapias efectivas para su prevención es una prioridad en salud pública.

Estructura genética de los coronavirus

Se han identificado nueve CoVs humanos de los cuales solamente se han aislado siete (Fig. 3).

Las dos terceras partes del genoma de los CoVs codifican la replicasa viral, constituida por las poliproteínas, pp1a y pp1ab, de 500 y 800 kDa, respectivamente, que se traducen directamente a partir del RNA genómico y se procesan proteolíticamente para generar 16 proteínas no estructurales (nsps) implicadas en replicación y transcripción (Gorbalenya et al., 1989; Ziebuhr, 2005). El resto del genoma codifica las proteínas estructurales S, de la envuelta (E), membrana (M) y nucleoproteína (N) y un conjunto de proteínas accesorias características de cada CoV. El SARS-CoV consta de ocho proteínas accesorias: 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b (Narayanan et al., 2008). El MERS-CoV consta de cinco proteínas accesorias: 3, 4a, 4b, 5 y 8 (van Boheemen et al., 2012) y el SARS-CoV-2 de seis: 3, 6, 7a, 7b, 8 y 9b (Jungreis et al., 2020) (Fig. 4).

La estructura comparativa del genoma de los tres CoVs altamente patógenos para las personas se resume en la Fig. 4.

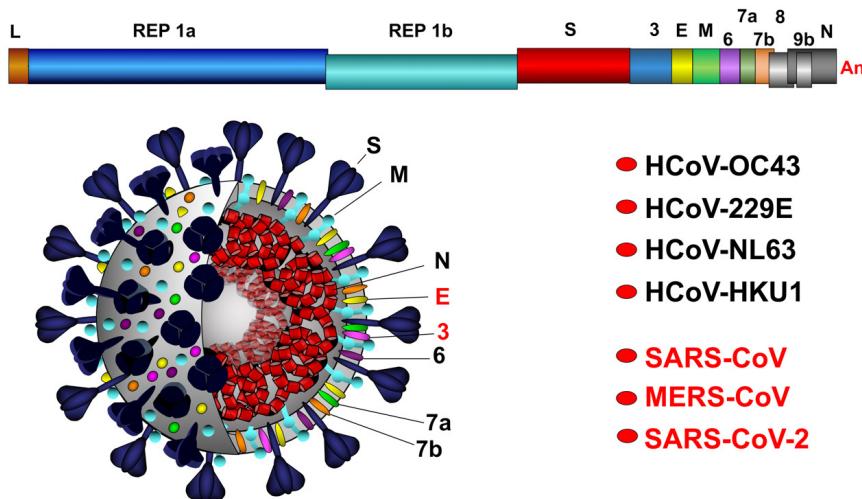


Figura 3. Estructura genética de los coronavirus y esquema de su estructura. En la parte superior se muestra la estructura del genoma del SARS-CoV-2. En la parte inferior izquierda se describe la estructura de este virus, indicando la localización de algunas de sus proteínas, y en la parte de la derecha, se incluye un listado de los siete CoVs humanos que infectan al hombre y se han aislado. Los cuatro primeros virus (en negro) causan patologías muy leves como resfriados comunes de invierno y se describieron entre los años 1960 y 2015. Los otros tres (en rojo) causan infecciones con patologías variadas, incluyendo la muerte de las personas infectadas y se identificaron entre los años 2002 y 2019.

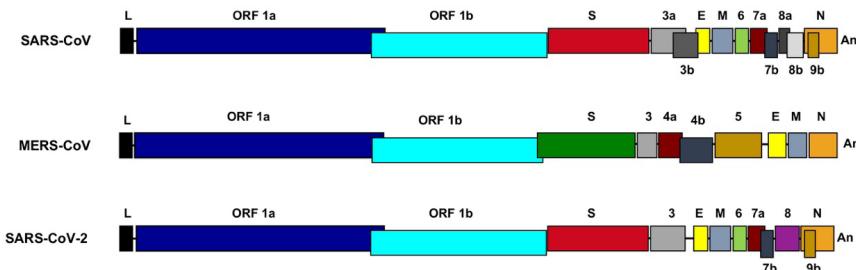


Figura 4. Estructura del genoma de los tres CoVs patógenos para las personas. Los recuadros azul oscuro y azul claro indican las fases abiertas de lectura (ORFs) 1a y 1b que codifican la replicasa del virus. Las dos ORFs en conjunto dan lugar a una poliproteína que se procesa en 16 proteínas no estructurales (nsps) que configuran el complejo de la replicasa. El resto de los recuadros indican los genes que codifican las proteínas estructurales y accesorias de cada uno de los virus.

El genoma de los coronavirus consiste en una molécula RNA de polaridad positiva de en torno a 30 kb, que es el genoma de mayor tamaño conocido para un virus RNA (de Groot et al., 2012; Enjuanes et al., 2008). Estructuralmente, el genoma de los CoV incluye una estructura en el extremo 5' que incorpora una caperuza con 7-metilguanosina denominada breviadamente CAP (Page et al., 1990), está poliadenilado en su extremo 3' (Jacobs et al., 1986) y tiene regiones no codificantes en ambos extremos (5'UTR y 3'UTR) de entre 210 y 530 nucleótidos de longitud (Fig. 5).

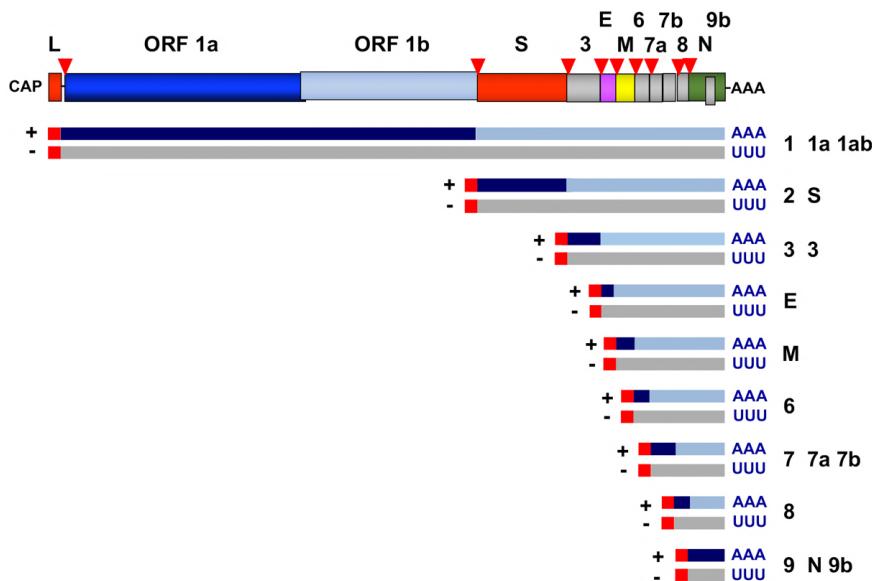


Figura 5. Expresión génica en el SARS-CoV-2. Esquema del genoma del SARS-CoV-2 (parte superior) donde se indica la posición del cap (CAP), la secuencia líder (L), los genes virales (ORF 1a, ORF 1b, S, 3, E, M, 6, 7a, 7b, 8, N y 9b), el poli A (AAA) y la posición de las secuencias reguladoras de la transcripción o TRSs (triángulos rojos invertidos). La polimerasa viral genera durante el ciclo infectivo 9 RNAs virales (parte inferior), de polaridad positiva y otros complementarios de polaridad negativa. En cada caso se indican los genes que codifican, las secuencias líder y antilíder (rojo), la secuencia codificante traducida (azul oscuro) y la secuencia codificante no traducida (azul claro).

Todos los genes del tercio 3' terminal del genoma se expresan a partir de una colección de mRNAs subgenómicos (sgmRNAs) que son coterminales en sus extremos 5' y 3'. Estos sgmRNAs son estructuralmente policistrónicos pero funcionalmente monocistrónicos (Masters, 2006). Los sgmRNAs tienen en su extremo 5' una secuencia líder que también se encuentra en el extremo 5' del gRNA (Fig. 5). Esta secuencia se incorpora a los sgmRNAs por un *proceso de síntesis discontinua* en el que se generan intermedios replicativos de polaridad negativa. Los primeros modelos sobre el mecanismo de transcripción en CoVs fueron propuestos por S. G. Sawicki y D. L. Sawicki (Sawicki and Sawicki, 1995, 2005). El mecanismo de este proceso ha sido extendido y por nuestro laboratorio y está controlado por secuencias que regulan la transcripción (TRS, de sus siglas en inglés) compuestas por un hexanucleótido central conservado (CS) que está flanqueado por secuencias variables 5' y 3'. Las TRSs se localizan en el extremo 3' del líder (TRS-L) y preceden a cada uno de los genes virales (TRS-B, de sus siglas en inglés TRS del *Body*), como ha descrito nuestro grupo (Enjuanes et al., 2006; Mateos-Gómez et al., 2013; Mateos-Gómez et al., 2011; Sola et al., 2011; Sola et al., 2005; Zuñiga et al., 2004) (Fig. 6). Nuestro laboratorio hizo aportaciones seminales al mecanismo de la replicación de los CoVs, un proceso de síntesis discontinua del RNA. La transcripción comienza generándose una copia negativa por un mecanismo de síntesis discontinua, que supone un proceso de recombinación homóloga que tiene lugar con alta frecuencia (Enjuanes et al., 2006; Sola et al., 2015), y que implica un cambio de molde con el objetivo de añadir el leader del sgmRNA. El proceso de transcripción está regulado por la similitud entre las secuencias TRSs del leader y de cada uno de los genes virales, pero otros factores, como las interacciones RNA-RNA entre dominios del genoma situados a larga distancia, tal como mostramos en el Laboratorio de Coronavirus del CNB (uno en el extremo 5' y el otro en el extremo 3'), influyen en el nivel de síntesis de los sgmRNAs (Mateos-Gómez et al., 2013; Moreno et al., 2008; Sola et al., 2015).

El mecanismo de transcripción en coronavirus, que se ha propuesto para explicar la generación de sgmRNAs con un extremo 3' común, pero que se extienden con una extensión variable hacia el extremo 5', se basaron en la identificación de sgmRNAs en ensayos de "Northern" que permitieron identificar con sondas específicas marcadas con radioactividad los sgmRNA producidos durante la infección por el virus (Fig. 7).

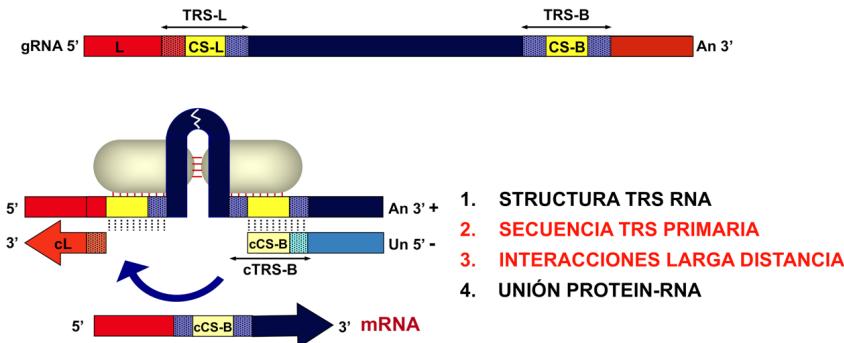


Figura 6. Mecanismo de transcripción de CoV: síntesis discontinua del RNA. Utilizando como molde la cadena positiva del genoma RNA de los coronavirus, se inicia una copia negativa de este RNA por el complejo de la polimerasa, que se une al extremo 3' del genoma. Esta copia del RNA procede hasta que se encuentra un motivo de regulación de la transcripción (TRS, de sus siglas en inglés). En ese momento la transcripción se para, la cadena sintetizada de polaridad negativa se desprende y “salta” para unirse al extremo 5' del genoma, donde se hibrida con la TRS del líder, de polaridad positiva con una secuencia complementaria (caja amarilla). A continuación, la síntesis de la cadena negativa, se reinicia, para añadir una copia del líder (cL, en rojo). Posteriormente, este RNA de polaridad negativa sirve como molde para la síntesis continua de un sgmRNA, de polaridad positiva que es el auténtico sgmRNA. La extensión de cada una de estas interacciones (hibridaciones) condicionaría la estabilidad de cada hibridación entre la secuencia TRS del líder (+5'TRS) y la cadena negativa (-TRS) de cada una de las cadenas nacientes, situadas a lo largo del genoma RNA del virus. Esta estabilidad marcaría la abundancia relativa de cada uno de los sgmRNAs, dado que se demostró que el apareamiento de bases entre la 5'TRS del genoma del virus y la -TRS de la cadena negativa del RNA naciente, aumentaba la estabilidad del híbrido formado en cada caso (Enjuanes et al., 2006; Sola et al., 2005). De hecho, se demostró que la abundancia de cada uno de los sgmRNA producidos durante la transcripción era directamente proporcional a la energía libre que se liberaba al hibridar la TRS naciente de polaridad negativa con la +5 TRS del extremo 5' del genoma del virus que se generaba durante la copia del genoma del coronavirus.

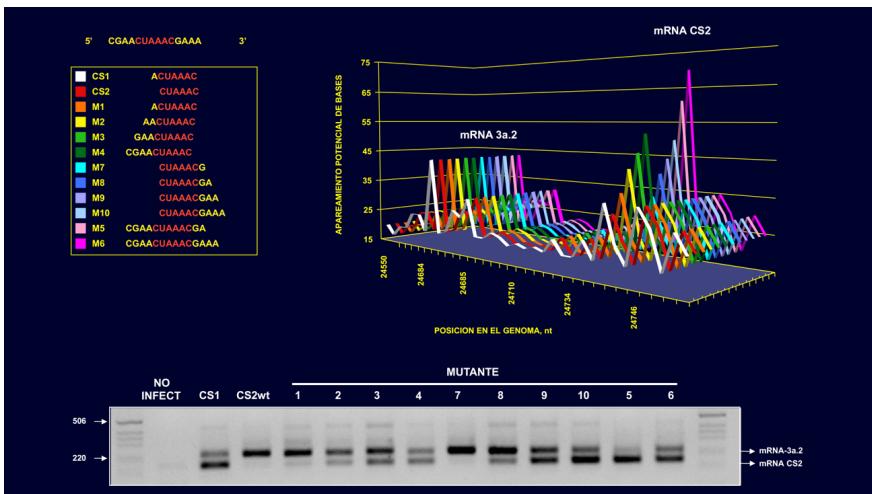


Figura 7. Relación entre la extensión de la complementariedad de cada una de las secuencias TRS del genoma del virus con la TRS del líder y la cantidad del sgmRNA correspondiente sintetizado. En los CoVs el proceso de transcripción para la síntesis de los sgmRNAs de distinto tamaño, se repite varias veces, pero generando en cada caso una copia RNA negativa de longitud creciente. La síntesis del RNA se para cada vez que el complejo de la polimerasa se encuentra con una TRS en la secuencia del genoma, para dar lugar a sgmRNAs negativos de tamaño creciente y, posteriormente, a los verdaderos sgmRNAs de polaridad positiva. La cantidad de cada sgmRNA se mostró que estaba esencialmente relacionada con la extensión de la hibridación de la TRS del líder (extremo 5') con la cadena RNA naciente de polaridad negativa, al estabilizar con intensidad variable, la hibridación entre las dos TRSs complementarias. El aumento del grado de hibridación de las TRSs artificialmente creadas se relacionó con la cantidad de cada sgmRNA producido (Enjuanes et al., 2006; Mateos-Gómez et al., 2013; Moreno et al., 2008; Sola et al., 2015). En la parte superior izquierda de la figura, se muestran las longitudes crecientes de las complementariedades de la distintas TRSs incluidas en los distintos CoV sintéticos generados. En la figura superior derecha se muestran los apareamientos potenciales a lo largo de un segmento del genoma, para estimar teóricamente la estabilidad de las hibridaciones de cada una de estas TRSs de polaridad positiva y la cadena de RNA naciente de polaridad negativa. Los resultados experimentales mostrados en la parte inferior de la gráfica, indicaron que la extensión de la complementariedad entre ambas cadenas de RNA, estaba relacionada con la cantidad de cada sgmRNA sintetizada (Enjuanes et al., 2006).

Nuestro laboratorio ha propuesto la formación de una serie de pre-complejos para la producción de los sgmRNA en CoVs. Cada uno de estos complejos se forma entre la 5'-TRS del extremo 5' del genoma del virus y cada copia -RNA generada durante la síntesis del RNA. La formación de cada complejo, que para la transcripción del sgmRNA en una posición más avanzada, da lugar al ensamblamiento de un RNA negativo de mayor longitud por adición de la TRS del líder. A partir de esta secuencia se sintetiza de forma continua cada uno de los sgmRNAs del virus, que codifica la expresión de una nueva ORF (Fig. 8).

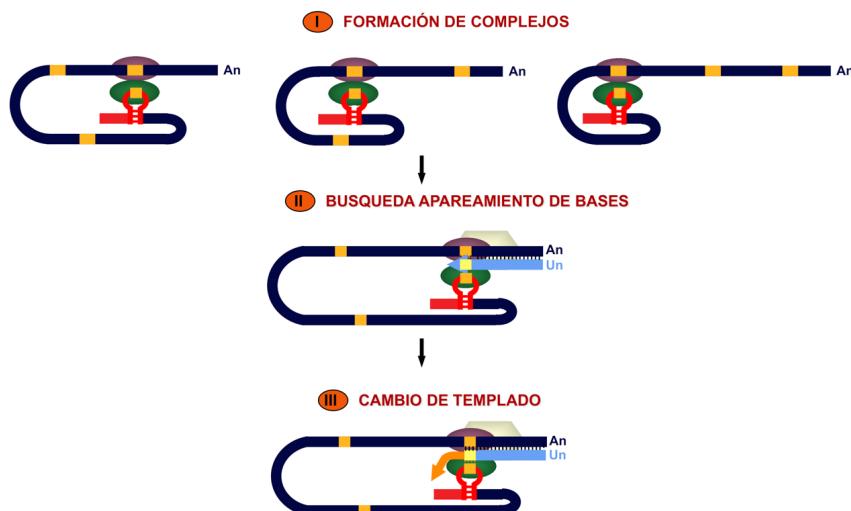


Figura 8. Formación de precomplejos durante la síntesis de sgmRNAs con distinto tamaño. Modelo de tres etapas para la transcripción en CoVs, propuesto por nuestro laboratorio. En la parte superior se muestra la tapa de formación de complejos 5'-3'. Las proteínas que se unen a los extremos 5' y 3' se representan con óvalos verdes. La secuencia líder se muestra en rojo, y la secuencia conservada (CS) en amarillo. An, cola de poli(A). En la parte media de la figura se muestra la etapa de apareamiento de bases complementarias. La cadena RNA de polaridad negativa se representa con un tono más claro que la cadena positiva. El complejo de transcripción se representa por un hexágono. Las barras cortas verticales representan el apareamiento de bases de las secuencias TRL-S durante el proceso de transcripción. Las barras sólidas indican la complementariedad entre el gRNA y la cadena negativa naciente. Un, cola de poli A. En la parte inferior de la figura se muestra el cambio de molde. La flecha ancha indica el salto de molde hecho por el complejo de transcripción para completar la síntesis del sgmRNA de cadena negativa.

Además, existen otros mecanismos que controlan la eficacia de la transcripción, que fueron identificados en nuestro laboratorio. Los dominios próximos (pE, *proximal element*) y distales (dE, *distal element*) en relación a la secuencia TRS que precede a cada gen de los coronaviruses. Unos de estos mecanismos está controlado por la hibridación antiparalela de dos segmentos de secuencias de la cadena del genoma que preceden a cada secuencia TRS, al formar un nudo (*pseudonot*) que aumenta la frecuencia de paradas del complejo de transcripción durante la síntesis de la cadena negativa, incrementando el número de estas secuencias que se desprenden del molde (cadena positiva) para hibridar con la TRS del líder y dar lugar a una copia negativa completa de los sgRNAs (Mateos-Gomez et al., 2011).

En resumen, nuestro laboratorio proporcionó evidencia experimental que nos permitió sugerir que el modelo de transcripción en los CoVs estaba guiado por una serie de interacciones complejas en la estructura del genoma del virus que, al plegarse, facilitaba la unión de elementos distales del genoma (Fig. 9) (Enjuanes et al., 2006; Mateos-Gomez et al., 2013).

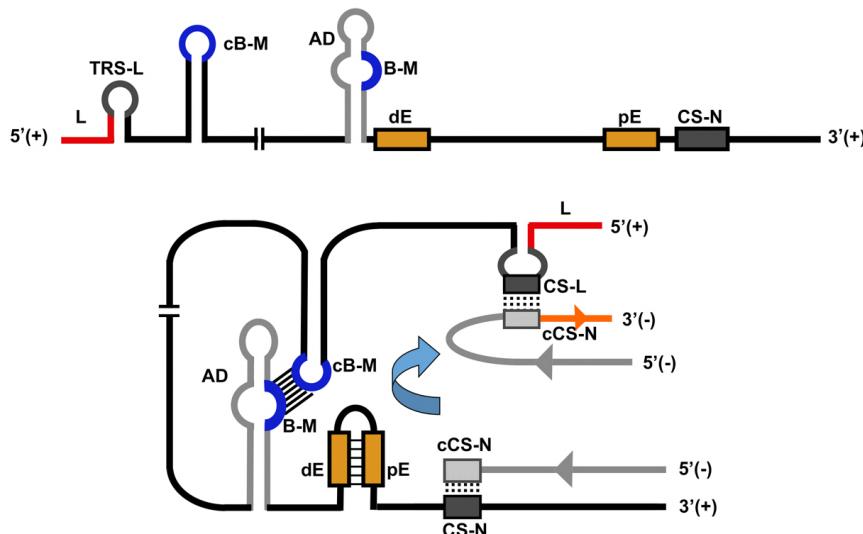


Figura 9. Interacciones complejas entre zonas distales del genoma de los coronavirus. Mediante el plegamiento e interacción entre zonas distales del genoma de los CoVs se estabilizan estructuras que facilitan la replicación de los CoVs. Las zonas que comparten el mismo color interaccionan entre sí (Enjuanes et al., 2006; Mateos-Gomez et al., 2013).

Un hecho científico relevante en el mundo de los coronavirus fue la identificación en estos por primera vez de un sistema de corrección de errores (*proofreading system*) durante la síntesis de las moléculas de RNA análogo al conocido previamente en el mundo DNA, que permite mantener la fidelidad de la replicación de la secuencia de la doble hebra del DNA. Esta actividad solo está presente en los Nidovirus de mas de 20 Kb, y esta evidencia filogenética y otras experimentales indican que probablemente es necesaria para mantener el gran tamaño del genoma. Este sistema de corrección de errores se descubrió entorno al año 2011, al estudiar la replicación del genoma de los coronavirus por conocidos coronavirólogos como Mark Denison (Denison et al., 2011; Eckerle et al., 2010; Eckerle et al., 2006; Eckerle et al., 2007; Smith et al., 2013) (Fig. 10).

Construcción del primer coronavirus sintético por genética inversa: una herramienta esencial

La manipulación del genoma de CoVs mediante genética inversa ha estado limitada durante mucho tiempo debido al gran tamaño del genoma de los CoVs (en torno a 30 kb). Además, la existencia de regiones tóxicas en el genoma del virus cuando se manipulaba en bacterias, un proceso esencial para la ingeniería genética, impedían la clonación y crecimiento de un cDNA complementario infectivo del virus en células procariotas. Por ello, los estudios iniciales en nuestro laboratorio se centraron en el análisis de RNAs defectivos para ensamblar genomas de coronavirus con el objetivo de completarlos posteriormente hasta ensamblar un genoma completo (Mendez et al., 1996). El primer clon infectivo construido para un CoV fue el del CoV TGEV, desarrollado en nuestro laboratorio (Almazan et al., 2000). Este clon se ensambló utilizando un cromosoma artificial de bacterias (BAC), que posibilitaba el clonaje de secuencias DNA de hasta 300 kb, de forma estable, debido a su bajo número de copias (1, o máximo 2 por célula), lo que reducía su toxicidad, y permitió la amplificación del cDNA en bacterias de forma eficiente y estable. Después de transfectar las células con el clon infectivo, el BAC entra en el núcleo y la RNA polimerasa II celular transcribe el RNA genómico viral, bajo el control del promotor de citomegalovirus (CVM). Seguidamente el RNA genómico viral se transloca al citoplasma iniciando un ciclo infectivo del virus. Esta estrategia se ha utilizado posteriormente en nuestro laboratorio primero, y en el

resto del mundo después, para generar clones infectivos de casi todos los CoVs (Almazan et al., 2006; Balint et al., 2012; Fett et al., 2013; St-Jean et al., 2006). También ha sido la herramienta de elección para clonar los tres CoVs humanos patógenos para el hombre: SARS-CoV (Almazan et al., 2006), MERS-CoV (Almazan et al., 2013) y SARS-CoV-2 (Wang et al., 2023).

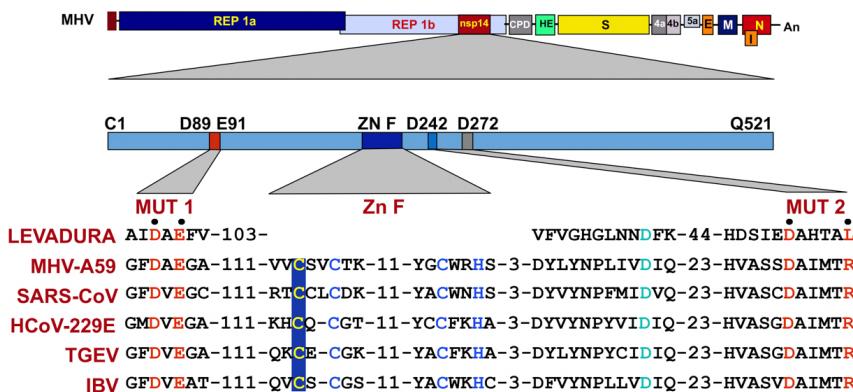


Figura 10. La proteína nsp14 es responsable de un mecanismo de eliminación de errores (*proof-reading system*) que tiene lugar durante la síntesis de genomas RNA de coronavirus. Este sistema se descubrió en los CoVs y es equivalente a un sistema similar que se da en el mundo de los virus DNA (Denison et al., 2011; Eckerle et al., 2010; Eckerle et al., 2006; Eckerle et al., 2007; Smith et al., 2013). Mutaciones en los dominios 1 (MUT1) y 2 (MUT2) aumentaban la incorporación de errores durante la síntesis del RNA del virus, lo que facilitó su identificación.

Antes de la emergencia del SARS-CoV, solamente se conocían los CoV humanos HCoV-229E y HCoV-OC43. Ambos virus causan síntomas respiratorios leves en el tracto respiratorio superior cuando se administran a adultos jóvenes voluntarios (Hamre and Procknow, 1966). Otros dos CoV humanos, HCoV-NL63 and HCoV-HKU1, se identificaron en 2004 and 2005, respectivamente (Fouchier et al., 2004; Woo et al., 2005). Estos cuatro CoVs humanos atenuados se han extendido por todo el mundo, y son los responsables del 15–30% de los resfriados comunes de invierno (Lim et al., 2016). Aunque las infecciones que causan son auto-limitantes y se resuelven espontáneamente, estos CoVs humanos pueden producir ocasionalmente infecciones más graves en

niños, personas mayores o pacientes parcialmente suprimidos inmuno lógicamente (Gorse et al., 2009; Pene et al., 2003). Análogamente al SARS-CoV y al MERS-CoV, los CoV humanos HCoV-NL63 and HCoV-229E también se originaron en los murciélagos. Se ha propuesto que el HCoV-OC43 y el HCoV-HKU1 se originaron en los ratones (Cui et al., 2019), pero probablemente se trata de una interpretación no correcta, dada la elevada identidad de secuencia de todos estos CoVs. El origen primigenio de todos estos CoVs probablemente fueron los murciélagos, porque de no ser así se tendría que haber dado una evolución convergente, teniendo en cuenta el extraordinario parecido de la estructura y secuencia sus genomas. Una mayoría de los alfacoronavirus y los betacoronavirus se han identificado solamente en los murciélagos, y muchos CoV filogenéticamente relacionados con el SARS-CoV y el MERS-CoV se descubrieron inicialmente en especies animales distintas de los murciélagos. Los CoVs que han emergido mediante zoonosis, tales como los virus humanos SARS-CoV y MERS-CoV, probablemente se han originado mediante mutación secuencial y recombinación entre CoVs en los murciélagos, y por fijación de mutaciones durante su transferencia a especies nuevas, hasta que infectaron a personas (Cui et al., 2019).

Epidemias por CoV altamente patógenos para las personas

En noviembre del 2002, una infección respiratoria viral causó una enfermedad grave en la provincia de Guandong, al Sureste de China, y se diseminó rápidamente a otros países, dando lugar a unos 8.000 casos confirmados. La epidemia se dió por terminada en junio del 2003, tan solo siete meses después de su identificación. El virus mostró una mortalidad de alrededor del 10% (Perlman and Netland, 2009). El agente etiológico se identificó como el SARS-CoV, un betacoronavirus zoonótico procedente de los murciélagos herradura que transmitieron el virus a las civetas y estas al hombre (Li et al., 2005). Después de un periodo de incubación de 4–6 días, los pacientes del SARS desarrollaron síntomas parecidos a los causados por el virus de la gripe, y neumonía, que en los casos graves condujo a un cuadro respiratorio agudo con un síndrome fatal en muchos casos (Peiris et al., 2003b). Aunque el SARS-CoV infecta múltiples órganos y causa una enfermedad sistémica, los síntomas se agravan incluso cuando el virus es aparentemente eliminado, lo que sugiere que se ha induci-

do una respuesta inmune anómala responsable de la patogénesis del SARS-CoV (Perlman and Netland, 2009). Aunque no se han descrito casos del SARS-CoV desde el año 2004, se ha descubierto un conjunto de virus análogos al SARS-CoV en una cueva en Yunnan, China, indicando la necesidad de prepararse para futuras reemergencias del virus (Hu et al., 2017).

En junio del 2012, el MERS-CoV emergió en Arabia Saudita y causó un síndrome respiratorio semejante al que produjo el SARS-CoV (de Groot et al., 2013). En el caso del MERS-CoV la transmisión entre personas es muy baja, pero este virus ha causado dos brotes importantes uno en Arabia Saudita (2012) y otro más limitado en el año 2015 en Corea del Sur con un número de infectados superior a 2613 y 945 muertes, es decir una mortalidad del 36,2% (<https://www.ecdc.europa.eu/en/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers-cov-situation-update>). Las personas mayores infectadas con el MERS-CoV, y particularmente aquellas con problemas médicos asociados, normalmente desarrollan enfermedades graves, frecuentemente fatales (Graham et al., 2013). El MERS-CoV también tiene su reservorio en los murciélagos, pero el virus se adaptó posteriormente a los camellos dromedarios como intermediarios entre los murciélagos y las personas (Corman et al., 2014).

Los primeros cuatro coronavirus humanos descritos (HCoV-229E, -OC43, -NL63 y -HKU1) aparentemente eran atenuados desde el momento de su aparición. Los dos primeros aparecieron entorno a los años 60 y los otros dos posteriormente a los años 80. Los otros tres CoVs: el SARS-CoV, que emergió en la provincia de Guandong, en el año 2002, el MERS-CoV, que emergió en la Península Arábiga en 2012, y el SARS-CoV-2, que fue identificado por primera vez en Wuhan (China) en 2019, han causado la muerte de entorno al 10%, 36% y menos del 2% de las personas infectadas, respectivamente. El SARS-CoV y el MERS-CoV infectaron a 8000 y 2613 personas, respectivamente (Tabla 1).

Los vectores intermedios entre los murciélagos y las personas, en el caso del SARS-CoV, fueron las civetas, los mapaches y los visones, pero principalmente las primeras. En el caso del MERS-CoV, el vector principal entre el murciélagos y los humanos fueron los camellos. De hecho, este virus no se transmite de forma eficiente entre humanos.

VIRUS	AÑO	INFECTADOS	MUERTES	MORTALIDAD	PAÍSES
SARS-CoV	2002	8098	774	10%	29
MERS-CoV	2012	2650	858	37%	27
SARS-CoV-2	2019	768×10^6	6.95×10^6	<2%	235

Tabla 1. Coronavirus patógenos para las personas. OMS, 1 agosto 2023

Inicialmente, en China, el SARS-CoV-2 causó una infección asintomática en al menos un 14% de las personas infectadas, y una patología leve-moderada en otro 66% de estas personas (Huang et al., 2020). En el 20% restante podía causar neumonía asociada con fiebre, dolor de cabeza, y dificultad respiratoria, que frecuentemente evolucionaba a una inflamación pulmonar exacerbada, edema pulmonar y muerte en aproximadamente un 2% de los pacientes. Más recientemente, por debajo de los 20 años, el 80% de los infectados son asintomáticos, mientras que por encima de los 69 años solo el 30% lo son (Davies et al., 2020). La diseminación silenciosa del virus y su larga persistencia en un porcentaje elevado de las personas infectadas hace que su eliminación presente dificultades adicionales, debido a que el virus reemerge en personas que son seropositivas para el mismo. La coexistencia del virus y los anticuerpos en un mismo individuo, probablemente se debe a la persistencia del virus en tejidos específicos, tales como el tracto gastrointestinal, donde se ha observado que puede permanecer durante largos periodos de tiempo (Lee et al., 2020). La larga persistencia del virus en algunos pacientes, en los que el virus se puede mantener activo más de tres meses, es probablemente responsable de que el número de pacientes infectados sea mayor del inicialmente estimado. Las personas mayores, particularmente aquellas que tienen asociadas patologías previas como diabetes, enfermedades cardiovasculares o complicaciones respiratorias adicionales, son más susceptibles de tener una evolución con consecuencias graves.

Origen del SARS-CoV-2

Determinar el salto del SARS-CoV-2 desde un hipotético mamífero a las personas es de gran importancia para controlar futuros brotes en estas. Los CoV han representado un riesgo elevado de originar epidemias por su emergencia frecuente en diversas especies. Hasta el momento se han crecido siete CoV humanos. Todos ellos tienen un origen zoonótico, como sucede normalmente con la mayor parte de los virus. Tanto la emergencia del SARS-CoV como del SAR-CoV-2 se ha asociado con mercados que vendían animales vivos, e implicaron un salto de especies. Los virus más próximos genéticamente a estos dos CoVs se han identificado en murciélagos que viven en cuevas de Yunnan (China), cerca de la ciudad de Wuhan. Sin embargo, entre el SARS-CoV y el SARS-CoV-2, hay un vacío en el conocimiento de su evolución entre los momentos iniciales, en los que se detectó su presencia en los murciélagos de Hunnan, y los primeros casos detectados en humanos a finales del 2019 (Holmes et al., 2021). Basándose en datos epidemiológicos, derivados de las secuencias de los primeros aislados identificados en las proximidades del mercado húmedo de Wuhan, que es el epicentro más temprano descrito para infecciones de personas con el SARS-CoV-2, podría descartarse que el SARS-CoV-2 procediese de un escape del Instituto de Virología de Wuhan, tal como ha sido sugerido por investigadores que generalmente no pertenecen al mundo científico.

El SARS-CoV-2 casi con toda seguridad tiene un origen zoonótico, y no procede del laboratorio liderado por Zhengli Shi, del Instituto de Virología de Wuhan (China), porque las primeras personas infectadas con el SARS-CoV-2 se detectaron en las proximidades del mercado de Huanan, localizado al norte del río Yangtze, mientras que el laboratorio de la Dra. Shi, está situado al sur de la ciudad, por debajo del cauce del río (Holmes et al., 2021; Liu et al., 2023; Pekar et al., 2022; Worobey et al., 2022). En el entorno del mercado de Huanan también se diagnosticaron abundantes casos de muertes por neumonía, con una frecuencia superior a la normal a lo largo de enero del 2020. Además, no existe ninguna relación epidemiológica del virus encontrado en Wuhan a principios de 2020, con el aislado en otros distritos de Wuhan, incluyendo el campus donde se sitúa el Instituto de Virología de Wuhan, que incluye laboratorios con niveles de seguridad biológica BSL-2, BSL-3 y BSL-4, el máximo nivel de las instalaciones de este tipo. Este instituto se

encuentra al sur de río Yangtze, que discurre desde el oeste al este de China y es el tercer río más grande de nuestro planeta.

La primera bifurcación del árbol epidemiológico durante la evolución del SARS-CoV-2, define dos líneas evolutivas del virus que circulaban paralelamente, la A y la B (Holmes et al., 2021). La línea B, se impuso en todo el mundo, y los virus de esta rama evolutiva se observaron en los primeros casos asociados al mercado de Huanan. Sin embargo, la rama evolutiva A incluye casos detectados en otros mercados de Wuhan distintos al de Huanan, así como casos posteriores detectados en esta y otras partes de China. Este árbol filogenético es consistente con el hecho de que la emergencia del SARS-CoV-2 implica a uno o más contactos con animales infectados o vendedores, que han iniciado distintos focos de contaminación (Holmes et al., 2021).

El virus conocido inicialmente, con una mayor identidad de secuencia (95.6%) con el SARS-CoV-2, procede de un murciélagos *Rhinolophus*. Este virus denominado RaTG13 se aisló en Yunnan por el equipo de la Dra. Zhengli Shi del Instituto de Virología de Wuhan. Además, se identificaron otros tres aislados del virus (RmYN02, RpYN06 y PrC31) con una identidad de secuencia con el SARS-CoV-2 muy próxima a la que tiene el aislado RaTG13. Sin embargo, la divergencia de la secuencia del gen de la polimerasa (ORF 1ab) del SARS-CoV-2 era la mayor de los tres coronavirus humanos mortales para el hombre (Li et al., 2021; Lytras et al., 2022; Zhou et al., 2021). Por otra parte, no se ha trabajado con ninguno de estos tres últimos virus en el Instituto de Virología de Wuhan, lo que reduce las posibilidades de que el SARS-CoV-2 se hubiese originado como consecuencia de un escape del virus desde el laboratorio de Zhengli Shi. Este punto de vista se reforzó con la observación de que otros CoVs estrechamente relacionados con el SARS-CoV-2 se han identificado en múltiples países en el Sur-Oeste de Asia, incluyendo China, Tailandia, Camboya y Japón (Zhou et al., 2021). Ello indica que era muy posible que un precursor del SARS-CoV-2 hubiese evolucionando hasta originar el virus actual causante de la pandemia.

Existe una distancia evolutiva elevada entre el SARS-CoV-2 aislado en Wuhan y la secuencia de los CoV animales determinada hasta el año 2022 (Holmes et al., 2021). La distancia evolutiva de un 4,5% observada inicialmente, entre los virus con un genoma más parecido al del SARS-CoV-2 y la del virus con el que se trabajaba en el Instituto de virología

de Wuhan, que implica un cambio de unos 1.150 nucleótidos, equivale a varias décadas de evolución y divergencia (Boni et al., 2020). Una distancia genética del 4,5 % es la misma que existe entre el genoma humano y el porcino. El vector intermedio del SARS-CoV-2 entre los murciélagos y las personas es con toda probabilidad el mapache, dado que la identidad de secuencias entre los genomas del virus encontrado en las heces de estos animales aisladas en las jaulas donde estaban expuestas en el mercado y la secuencia de los virus aislados en las personas fué del 99,993%, sugiriendo que tenían un origen común. Además, otras evidencias epidemiológicas sólidas apoyaban un origen común de los dos virus (Holmes et al., 2021; Liu et al., 2023; Pekar et al., 2022). El virus SARS-CoV-2 tiene el sitio de corte por la proteasa furina, sin embargo, el aislado RaTG13, con el que se trabajaba en el laboratorio de Zhengli Shi no lo tiene, reforzando la conclusión de que el SARS-CoV-2 no partió de su laboratorio (Fig. 11). Además, no se habían publicado informaciones sobre los investigadores del laboratorio de la Dra. Zhengli Shi, indicando que alguno de ellos se hubiese infectado por el SARS-CoV-2. Así mismo, todo el equipo de su laboratorio fue seronegativo para el SARS-CoV-2 cuando se evaluaron en marzo del 2020 (Pekar et al., 2021). Por otra parte, ningún estudio publicado previamente a la aparición del SARS-CoV-2, realizada por el Instituto de Virología de Wuhan (Guan et al., 2003; Hu et al., 2017; Menachery et al., 2015), tenía una identidad suficientemente alta para sugerir que este Instituto de Virología fuese el origen de la epidemia. Todo ello también refuerza que es poco probable que la aparición del SARS-CoV-2 estuviese relacionada con el Instituto de Virología de Wuhan.

Las discusiones sobre el origen del SARS-CoV-2 se han visto prácticamente cerradas con la aparición de una serie de artículos científicos que aportan evidencias sólidas de que el SARS-CoV-2 se encontraba presente en muestras biológicas en las jaulas de hierro del mercadillo de Huanan que contenían mapaches (Liu et al., 2023). Esta publicación se ha visto reforzada con datos aportados en la revista *Science* donde se indica que los primeros casos desde diciembre del 2019 se centraban geográficamente en el mercadillo de Wuhan Huanan (Worobey et al., 2022). Así mismo, otro artículo publicado casi al mismo tiempo (Pekar et al., 2022) mostró que la diversidad genómica anterior a la pandemia producida por CoVs se derivó de dos líneas evolutivas de virus, la A y la B, y que estas líneas fueron el resultado de al menos dos eventos independientes, derivados de dos cruces de especies, que dieron lugar a la transmisión de dos líneas diferentes del virus.

Recientemente (abril 2023) tres editores (Arturo Casadevall, Felicia D. Goodrum y Michael J. Imperiales), de tres conocidas revistas de virología: mBio, J. Virol. y mSphere, respectivamente, junto con dos prestigiosos científicos, James C. Alwine y Lynn W. Enquist, han publicado un análisis que incluye cuatro posibles hipótesis para explicar el origen del SARS-CoV-2. Su conclusión final, también apoya la idea de un origen zoonótico del virus y sugiere que la posibilidad de un escape del virus de un laboratorio es poco probable. Estos autores también aceptan que futuros datos sobre este tema, podrían sugerir modificar las conclusiones que hoy se hacen sobre el origen del SARS-CoV-2, algo que siempre puede pasar en Ciencia. La mejor evidencia apoya un evento zoonótico directo que facilitó la entrada del SARS-CoV-2 en las personas.

Pese a la evidencia científica aportada en la literatura citada, no han faltado visionarios que, sorprendentemente, creen que “hay una fuerte evidencia de que un conjunto de secuencias heterogéneas han sido transportadas por vientos dominante troposféricos vía el Océano Índico y Océano del Sur hacia Victoria (Australia)” llevando el SARS-CoV-2 a este país (Steele et al., 2021). Sin duda, hay opiniones en todas las direcciones, aunque algunas no sean creíbles.

SARS-CoV-2	671	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	P	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	694
	23573	ugcgcuaauacuacacuacacuauau <u>UCCUCGGCGGGC</u> acguaguguacuacuauccauauugcc																							23644	
		
BtCoV RaTG13	23555	ugcgcacaguauacuacacuacaaacuauuc-----																								23614
	671	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S		R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	690			

Figura 11. La inserción de cuatro aminoácidos básicos (RRAR) en la proteína S del SARS-CoV-2 facilita el corte proteolítico y la entrada del virus en ciertas células de mamífero. Se muestran dos fragmentos de la zona central de la proteína S, correspondientes a dos aislados, uno del SARS-CoV-2 y otro de un CoV de murciélagos con el que trabajaban en el laboratorio del Instituto de Virología de Wuhan. La secuencia de la parte superior corresponde al CoV humano del tipo que apareció en la ciudad de Wuhan al principio de la epidemia y contiene los cuatro aminoácidos básicos RRAR que facilitan el corte de la proteína y su entrada en la célula. Sin embargo, la secuencia de la parte inferior, corresponde a la proteína S del virus con el que se trabajaba en el Laboratorio de Virología de Wuhan dirigido por la Dra. Shi, y esta no incluye el sitio de corte por la proteasa furina en su proteína S, lo que sugiere que este centro de investigación no debe de ser el origen del SARS-CoV-2. Adaptado de Holmes et al., 2021 (Holmes et al., 2021).

En la actualidad tenemos un problema importante por la presencia del SARS-CoV-2 en muchos animales de compañía, como perros y gatos, y animales silvestres, incluyendo hurones, visones, mapaches, monos macacos, ciervos de cola blanca, conejos, murciélagos fruteros egipcios y hamsters, lo que supone un peligro para la re-emergencia de variantes patógenas que evolucionen independientemente en estos animales (Islam et al., 2022).

Fijación de mutaciones en la proteína S del SARS-CoV-2 que han facilitado su diseminación

A lo largo de la evolución del SARS-CoV-2, uno de los cambios que confirieron una ventaja selectiva a este virus fue la sustitución D614G en la proteína S, que ocurrió al principio de la pandemia (Korber et al., 2020; Volz et al., 2021). Posteriormente se fijaron nuevas sustituciones de nucleótidos en el dominio de unión al receptor (RBD) en la proteína S, incluyendo las sustituciones K417N/T, L452R, E484K/Q, y N501Y, que incorporaron las variantes que se habían impuesto en distintos países y causaban preocupación por aumentar la infectividad de los distintos virus, aumentando la unión al receptor celular o por facilitar el escape de los mismos a la respuesta inmune (Cai et al., 2021; Kuzmina et al., 2021; Liu et al., 2022; Starr et al., 2020; Zhu et al., 2021). Estos hechos indican que no es esencial que se haya forzado una preadaptación del virus a las personas para que este iniciase su emergencia. Por tanto, la sugerencia de que el virus había sido previamente adaptado a crecer en las personas no parece necesaria.

Otro de los cambios de secuencia que se considera más relevante para incrementar la diseminación del SARS-CoV-2 dentro de un organismo, afectando a un elevado número de tejidos, es la introducción de un sitio de corte proteolítico por la proteasa furina citado anteriormente. La introducción de este sitio, se había descrito anteriormente en otros coronavirus, incluyendo la mayoría de las cepas del virus de la hepatitis del ratón (MHV), de algunos alfacoronavirus, varios betacoronavirus como MERS-CoV, HCoV-OC43, HCoV-HKU1 y HCoV-HKU9-1 (de Haan et al., 2008; Gallaher, 2020; Gombold et al., 1993; Kirchdoerfer et al., 2016). Un resumen de las secuencias análogas al péptido que incluye el corte por la proteasa furina (aminoácidos RRAR) presente en la proteína S del SARS-CoV-2 se proporciona en la Fig. 12 (Holmes et al., 2021).

El sitio de corte por furina amplia significativamente el tropismo en pulmón y tracto entérico observado para el SARS-CoV, a prácticamente todos los órganos vitales del cuerpo humano, incluyendo el corazón, sistema circulatorio, cerebro, riñón y páncreas, entre otros (Tabla 2), dando lugar a un elevado número de patologías (Colman and Lawrence, 2003; Hoffmann et al., 2020; Xing et al., 2020). Para que el virus se internalice, cuando la proteína S interacciona con el receptor ACE-2 de las células humanas, además del procesamiento de la proteína S por la proteasa furina, es necesario un segundo corte en la posición denominada S2' de la misma que se lleva a cabo preferentemente por la proteasa TMPRSS2 in vivo, y en cultivos celulares por la catepsina (Hoffmann et al., 2020).

	SARS-CoV-2	671	CASYQTQTNS--P _R RARSVASQSI _{IA} 694
<i>Sarbeco</i>	BtCoV RmYN02	631	CASY---NS--P-AAR-VGTNSIIA 647
	BtCoV RaTG13	671	CASYQTQTNS-----RSVASQSI _{IA} 690
	SARS-CoV	657	CASYHTVSLL-----RSTSQKSIV _A 676
<i>Merbeco</i>	MERS-CoV	736	CALPDTPST-LTPRSVR _S VPGEML _R A 760
	BtCoV HKU5	739	CAIPPTT _S ---RFRRATSGVPDV _F 760
	BtCoV HKU4	740	CAVPPVSTF-----RSYSASQ--F 756
<i>Embeco</i>	HCoV HKU1a	744	CVDYNSPSSSSSSRRKRRSISASYRFV 769
	HCoV HKU1b	743	CIDYALPS---SRRKRRGISSPYRFV 765
	HCoV OC43	756	CLDYSK----NRRSRRAI _T GYRFT 776
	Bovine CoV	757	CVDYST----KRRSRRSIT _T GYRFT 775
	RatCoV HKU24	752	CVDYSS----TWRAKRD _L NTGYRLT 770
<i>Hibeco</i>	BtCov HpZj13	714	CVNYTAD---TRL _R TARAADRALT _F N 736
	BtCov HcNG08	698	CLNITRG----RVGSR _S AGHLKESS 718

Figura 12. Presencia de sitios de corte por furina en distintos coronavirus. CoVs humanos y animales ampliamente difundidos en la naturaleza, tales como el HCoV-HKU1a, HCoV-HKU1b, HCoV-OC43, y el CoV Bovino, también incluyen un sitio de corte por furina, lo que implica que el origen de la secuencia RRAR podría ser diverso a través de distintas mutaciones (Holmes et al., 2021).

● PULMONES	SÍNDROME RESPIRATORIO AGUDO Y SEVERO
● INTESTINO	GRUESO Y DELGADO
● RIÑÓN	OBSERVADO EN LAS UCI
● CEREBRO	PRESENCIA DE VIRUS
● CORAZÓN	PARADA Y ARRITMIAS, INFLAMACIÓN Y MIOCARDITIS
● VENAS	COÁGULOS FRECUENTES
● PÉRDIDA OLFATO	ALTOS NIVELES DE ACE2 EN EPITELIO NASAL
● LENGUA	QUERATINOCITOS
● PÁNCREAS	EN INFECCIONES SEVERAS

Tabla 2. Patologías producidas por el SARS-CoV-2.

Genes de los CoVs asociados a su virulencia

Los genes de los virus pueden ser esenciales o no para su replicación. Estos últimos probablemente se han incorporado a los CoVs durante su evolución porque les proporcionan la ventaja selectiva de inhibir la respuesta inmune innata, neutralizando las defensas del hospedador durante las primeras horas de la infección. Esta ha sido tradicionalmente un área de investigación en nuestro laboratorio, porque si estos genes se identifican y eliminan del virus, este se podría atenuar y convertirse en un candidato a vacuna. Nuestro laboratorio observó que la proteína de la envuelta del virus (E), una de las más pequeñas de la estructura de los CoV, incluye dos motivos de virulencia. El primero se deriva de la auto-oligomerización de esta proteína formando pentámeros que reconstituyen canales iónicos estrechamente relacionados con la virulencia de los CoVs, como hemos mostrado (Castano-Rodriguez et al., 2018; Nieto-Torres et al., 2014). El segundo motivo identificado por nuestro grupo en los CoVs determina fuertemente la virulencia del virus. La actividad de este motivo depende de la presencia en el extremo carboxi-terminal de la proteína E de una secuencia de cuatro aminoácidos, que varía según el CoV humano (Fig. 13) (Castano-Rodriguez et al., 2018; Nieto-Torres et al., 2014).

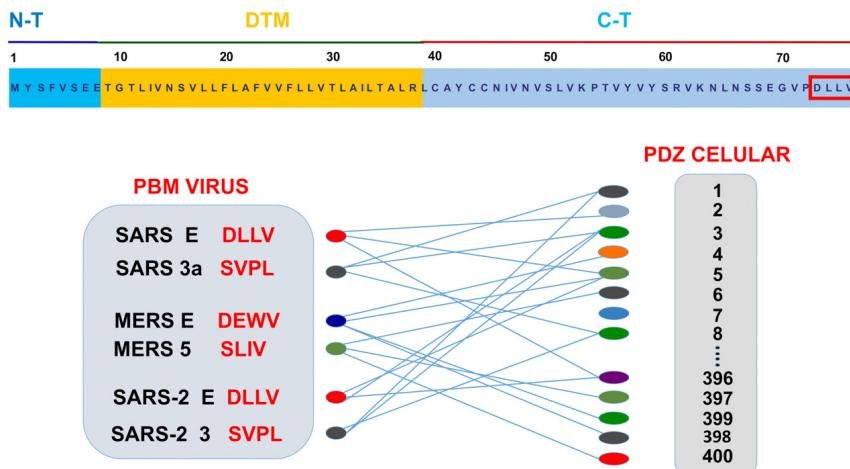


Figura 13. Motivos de virulencia en coronavirus: el dominio PBM de la proteína E. Distintas proteínas de los CoVs, como la E, 3, 3a o la 5, incluyen secuencias de cuatro aminoácidos que constituyen un motivo de virulencia, mediada por su interacción con proteínas celulares que incluyen motivos PDZ, con las que forman un complejo que activa caminos metabólicos proinflamatorios que incrementan el edema pulmonar.

Las proteínas virales con actividad canal iónico (CI), o viroporinas, aumentan la permeabilidad de las membranas celulares a los iones. Estas proteínas están implicadas principalmente en la producción viral, participando en su entrada en la célula, el tráfico intracelular y la morfogénesis viral. Nuestro laboratorio ha descrito la relevancia del dominio transmembrana (DTM) de la proteína E de los CoVs, responsable de la actividad canal iónico, en la maduración y producción de los CoVs (Cao et al., 2020; Castano-Rodriguez et al., 2018; Kuo et al., 2006; Nieto-Torres et al., 2014). La alteración de los balances iónicos es importante para los CoVs y para virus que pertenecen a otras familias (Nieva et al., 2012). Se han descrito viroporinas, en virus con genoma RNA, como en el virus de la gripe A, los virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), Ébola (EBOV), hepatitis C (HCV) y varios picornavirus, entre otros (de Jong et al., 2006; Ewart et al., 1996; Henkel et al., 2010; Pavlovic et al., 2003; Pinto et al., 1992). La proteína E del SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 tiene actividad canal iónico (Cao et al., 2021; Liao et al., 2004; Surya et al., 2015). Se han descrito otras proteínas accesorias de CoVs que también muestran actividad canal iónico y que tienen un papel importante en la replicación del virus y en su patogenicidad. Todas estas proteínas están codificadas en la región del genoma situada entre las ORFs S y E, como por ejemplo las proteínas 3a del SARS-CoV, la 5 del MERS-CoV y la 3 del SARS-CoV-2 (McClenaghan et al., 2020; Muller et al., 2010; Zeng et al., 2004). Los CoVs SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 codifican tres (3, E y 8a), dos (5 y E) y dos (3 y E) proteínas con actividad canal iónico, respectivamente (Chen et al., 2011; Liao et al., 2004; Lu et al., 2006; McClenaghan et al., 2020; Xu et al., 2022).

Las proteínas E del SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 constan de 76, 82 y 75 aminoácidos, respectivamente. Estas proteínas tienen un dominio transmembrana con actividad canal iónico (Liao et al., 2004; McClenaghan et al., 2020; Surya et al., 2015; Xu et al., 2022). La relevancia de esta actividad en las proteínas 3a y E del SARS-CoV se ha estudiado en nuestro laboratorio, generando mutantes de las proteínas 3a ó E. El análisis funcional de estos virus mostró que la actividad canal iónico de la proteína E se requería para la virulencia y para una óptima replicación del SARS-CoV, a diferencia de la actividad canal iónico de la proteína 3a (Castano-Rodriguez et al., 2018; Nieto-Torres et al., 2014). Describimos que la proteína E promovía la patogenicidad viral provocando la salida de Ca^{2+} desde el ERGIC al citoplasma, acti-

vando el inflamasoma y liberando TNF α , IL-6 e IL-1 β . Esto daba lugar a una inflamación exacerbada que inducía edema y la muerte de ratones BALB/c (Nieto-Torres et al., 2015).

Con las siglas PDZ, se conoce al dominio de una proteína celular que combina las primeras letras de tres proteínas (PSD95, DlgA y ZO-1). Este dominio, interacciona con motivos PBM presentes en proteínas de CoVs y de otros virus (Gallardo et al., 2010; Hillier et al., 1999). Curiosamente, algunas proteínas celulares como el factor regulador que intercambia Na $^+$ /H $^+$ (NHERF1) tienen dominios PDZ y PBM dentro de la misma proteína contribuyendo a regular la disponibilidad de ambos para interacciones inter-proteína (Bhattacharya et al., 2010).

Los virus han desarrollado mecanismos para interaccionar con el hospedador y utilizar la maquinaria celular para su propio beneficio. Uno de estos mecanismos es la interacción con dominios PDZ celulares a través de proteínas virales que contienen motivos PBM. La interacción entre los dos motivos tiene importantes consecuencias en el hospedador, modulando la replicación viral, su diseminación en el hospedador y la patogénesis que provocan (James and Roberts, 2016; Javier and Rice, 2011). Los procesos celulares afectados por los motivos PBM virales más estudiados tienen que ver con las uniones estrechas célula-célula, la polarización celular, la regulación de la apoptosis, supervivencia celular y respuesta inmune (Barreda et al., 2018; Liu et al., 2010; Medina et al., 2002; Zihni et al., 2016).

La presencia del motivo PBM de cuatro aminoácidos aporta una elevada virulencia a los CoVs. Las proteínas que contienen dominios PDZ se encuentran normalmente en el citoplasma celular o en asociación con la membrana plasmática y están implicadas en multitud de procesos biológicos como la formación de uniones celulares, regulación de la polaridad celular, migración celular, transporte y organización de proteínas y rutas de transducción de señales (Nourry et al., 2003). Solo en el genoma humano se han descrito 266 dominios PDZ formando parte de más de 400 proteínas distintas incluyendo sus isoformas (Luck et al., 2012; Nourry et al., 2003). Se ha descrito que la mayor parte de los motivos PBM se encuentran localizados en el extremo carboxilo terminal de las proteínas (Gerek et al., 2009; Hung and Sheng, 2002; Munz et al., 2012), aunque también existen dominios PBM internos que podrían ser más comunes de lo que se pensó originalmente (Lenfant et al., 2010).

En el caso de los CoV letales para el ser humano, el motivo PBM de la proteína E del SARS-CoV es el único que se ha estudiado en profundidad en nuestro laboratorio. Se ha descrito que la proteína E del SARS-CoV, se une a las proteínas sintenina y PALS1 a través de su motivo PBM (Jimenez-Guardeno et al., 2015; Jimenez-Guardeno et al., 2014; Teoh et al., 2010). En nuestro laboratorio se generaron virus recombinantes con distintas mutaciones en el motivo PBM de la proteína E. Su análisis nos permitió demostrar que la interacción del PBM de la proteína E con el dominio PDZ de la sintenina, durante la infección viral, activaba la enzima p38 MAPK. Esta interacción da lugar a la sobre-expresión de citoquinas proinflamatorias, causando la muerte del hospedador debido a una respuesta inmune desregulada, tal como se mostró en nuestro laboratorio (Jimenez-Guardeno et al., 2014). Esto hace que el estudio de los motivos PBM virales en patogénesis se considere de alto interés. Por ello, analizamos la extensión física del motivo PBM de la proteína E para determinar si los cuatro residuos del motivo PBM eran suficientes para determinar la virulencia del SARS-CoV, o si este motivo requiere determinantes adicionales para condicionar su virulencia (Honrubia et al., 2023b). Además, se realizó un análisis *in silico* de la interacción entre el final del carboxilo terminal de la proteína E del SARS-CoV, que incluye el motivo PBM, con la sintenina, para identificar los residuos más importantes en la interacción que pudieran ser responsables de la virulencia del SARS-CoV debido a la presencia del dominio PBM de la proteína E. Las principales conclusiones de este estudio fueron: (i) que el dominio PBM de la proteína E interacciona con el dominio PDZ2 de la sintenina, y modifica su estructura, aumentando la inflamación y aumentando la patogenicidad; y (ii) facilita la posibilidad de identificar antivirales que bloqueen la interacción PBM-sintenina. Nuestro laboratorio aplicado otras aproximaciones experimentales analizando el mecanismo de acción del PBM de la proteína E del SARS-CoV-2 mediante secuenciación masiva de los mRNA que se expresan en la infección con diversos virus que incluyen solo una diferencia: la inclusión de PBMs procedentes de virus atenuados o virulentos. Se observó que la infección por SARS-CoV y por SARS-CoV-2 aumentan el edema pulmonar como consecuencia de la reducción de la expresión del regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística, con el acrónimo CFTR, derivado de su nombre en inglés (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* (Honrubia et al., 2023b). Mediante el análisis de la expresión de 26.000 genes celulares después de la in-

fección por el SARS-CoV, identificamos que uno de los mRNAs que disminuía significativamente su expresión era el CFTR. Se determinó la posible existencia de una correlación entre la procedencia del PBM de la proteína E, según fuese un CoV virulento o atenuado, y la disminución del nivel de expresión de la CFTR. Si el PBM procedía de un virus virulento daba lugar a una disminución de la expresión de CFTR asociado a un incremento del edema. La disfunción de las proteínas NKA, ENaC y CFTR en las células epiteliales alveolares se había relacionado con la aparición de edema pulmonar mediado por la reducción de la absorción de Cl^- y Na^+ en el epitelio alveolar. Se observó que esta reducción era necesaria para restablecer el gradiente osmótico que promueve el transporte de agua en el pulmón desde el espacio alveolar a través de los canales de acuaporinas y las vías paracelulares (Azzam et al., 2002; Azzam et al., 2001; Dumasius et al., 2001; Matthay, 2014). La infección por CoVs como el SARS-CoV-2 estaba asociada con una disminución del CFTR, como se mostró en nuestro laboratorio (Honrubia et al., 2023a). El CFTR es un miembro de la familia de transportadores del módulo de unión a ATP (ABC) que se encuentra en la parte apical de la membrana plasmática de las células epiteliales (Rogan et al., 2011). CFTR funciona principalmente como un canal de Cl^- regulado por AMP cíclico (AMPc), pero también regula el transporte de bicarbonato, sodio y agua, que es esencial para la resolución del edema (Quinton, 2008; Riordan, 2008). Las patologías asociadas a la disfunción de esta proteína se han estudiado principalmente en el contexto de la fibrosis quística, una enfermedad causada por mutaciones genéticas en el gen CFTR que originan un transporte deficiente de Cl^- y HCO_3^- mediado por CFTR y, por lo tanto, causan una deficiencia en la formación de un gradiente osmótico óptimo para el transporte de agua hacia el exterior de las células (Rubin, 2018) (Fig. 14).

Además, la CFTR tiene un fuerte papel antiinflamatorio en múltiples tipos de células del sistema inmune. Como ejemplos específicos, la presencia del CFTR parece: (i) desactivar los neutrófilos y macrófagos (Adib-Conquy et al., 2008; Zhang et al., 2018); (ii) reducir la liberación de citoquinas proinflamatorias (Bonfield et al., 2012; Lara-Reyna et al., 2020; Zhang et al., 2018); (iii) facilitar la resolución de infecciones (Lara-Reyna et al., 2020); y, (iv) favorecer la producción de agentes que destruyen los patógenos fagocitados (Zhang et al., 2018; Zhou et al., 2013). Por tanto, la disminución de la expresión de CFTR, por parte del motivo PBM de la proteína E del SARS-CoV y SARS-CoV-2, podría

provocar una disminución de la permeabilidad del endotelio pulmonar, aumentando el edema observado en los pulmones de los ratones infectados por los CoVs humanos.

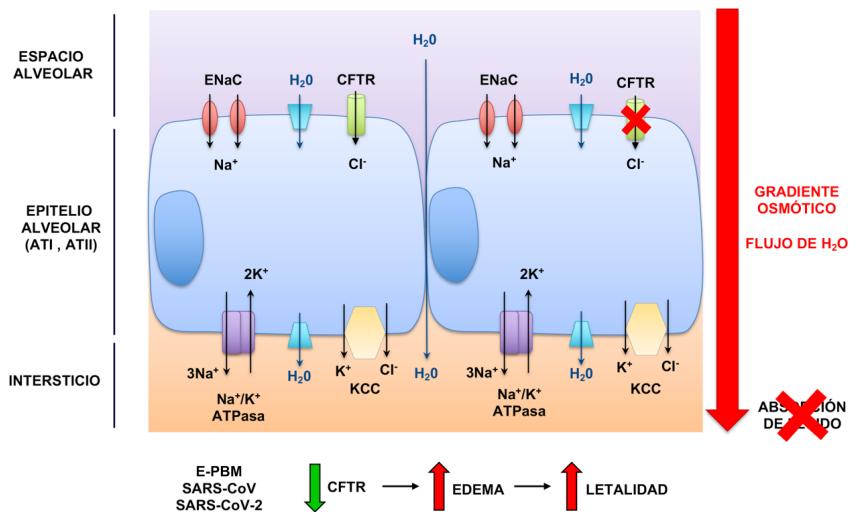


Figura 14. Esquema de acción del CFTR. Esquema de la pared de un alveolo pulmonar, que separa la parte interior de la parte exterior del alveolo. Tanto en la membrana que da a la zona alveolar (zona superior) como en la que da al lado intersticial, se incluyen varias proteínas relacionadas con el transporte de iones Na^+ , Cl^- y K^+ . En condiciones normales el transporte de iones aumenta hacia el lado intersticial, lo que incrementa la presión osmótica a este lado del alveolo, favoreciendo el paso del agua hacia el exterior del alveolo y disminuyendo el posible edema pulmonar provocado por la infección por CoVs. La observación de interés en nuestro laboratorio fue mostrar que la infección por el SARS-CoV-2 disminuía la concentración de la CFTR, lo que reducía la resolución del edema pulmonar. Afortunadamente, se identificó una combinación de dos drogas que se utilizaban en el tratamiento de la fibrosis cística, que contribuían a la resolución del edema pulmonar.

La actividad del CFTR está regulada en gran medida por la interacción PBM-PDZ, con otras proteínas celulares como NHERF1, NHEFR2, NHREF3, NHERF4, a través de complejos macromoleculares (Brône and Eggermont, 2005; Guggino, 2004; Shenolikar et al., 2004; Sun et al., 2000; Thelin et al., 2005; Wang et al., 1998). Uno de los complejos multiprotéicos más estudiados es el que forman el receptor $\beta 2$ adrenérgico (B2AR), que también tiene un motivo PBM,

y la proteína CFTR mediante la unión de sus respectivos motivos PBM con los dominios PDZ de NHERF1 (B2AR-NHREF1-CFTR) (Guggino and Stanton, 2006). El ensamblaje de este complejo macromolecular, que es facilitado por NHERF1, organiza elementos clave para la regulación del CFTR, incluyendo B2AR, proteínas de unión a GTP estimulante (Gs), adenilato ciclase, ezrina y la proteína quinasa A (PKA), que promueven la activación y regulación del CFTR mediante los agonistas adrenérgicos β 2. A su vez, CFTR regula otras proteínas con actividad canal iónico como la ENaC, también relevante en la resolución del edema (Guggino and Stanton, 2006; Ji et al., 2000; Jiang et al., 2000; Riordan, 2005). El motivo PBM de la proteína E del SARS-CoV-2 y del SARS-CoV, se une de forma específica a NHERF1 mediante una interacción PBM-PDZ (Caillet-Saguy et al., 2021). Probablemente, el motivo PBM de la proteína estos dos virus compite por la unión a proteínas celulares con dominios PDZ, como NHERF1, que es una de las proteínas clave en la regulación del CFTR, provocando la alteración de su localización y actividad. Esto desencadenaría una mayor permeabilidad del epitelio pulmonar, disminución de la resolución del edema, y por tanto una mayor acumulación del edema pulmonar observada en los pulmones de ratones infectados con el SARS-CoV.

Hemos estudiado el efecto de los moduladores del CFTR en la replicación del SARS-CoV y el SARS-CoV-2, y se ha identificado la proteína CFTR como un regulador clave de la absorción de líquido alveolar durante la infección por el SARS-CoV y se ha mostrado que la actividad del CFTR es una diana terapéutica potencial para el tratamiento del edema pulmonar ocasionado por el motivo PBM de estos. Se estudió el efecto de compuestos conocidos que modulan la actividad de la proteína CFTR en la replicación del SARS-CoV y SARS-CoV-2. Se seleccionaron los compuestos: potenciador VX770 (Ivacaftror), el corrector (VX809, Lumacaftor) y el amplificador PTI-428 del CFTR. El Ivacaftor y el Lumacaftor redujeron la producción viral ligeramente en infecciones por SARS-CoV y, de una forma más drástica en las infecciones por SARS-CoV-2, a diferencia del compuesto PTI-428. La infección por los virus SARS-CoV y SARS-CoV-2 redujo los niveles de expresión del mRNA del CFTR, a diferencia de sus respectivos mutantes sin motivo PBM en la proteína E, por lo que la disminución de la expresión del mRNA del CFTR se ha asociado al dominio PBM.

Diferentes estudios revelaron que mediante el uso de Ivacaftor y Lumacaftor es posible normalizar los niveles de Ca^{2+} mitocondrial e intracelular con repercusiones beneficiosas sobre el estrés oxidativo y los niveles de citoquinas proinflamatorias en pulmones con fibrosis quística (Philippe et al., 2015; Rimessi et al., 2015; Vachel et al., 2013). Posiblemente, el motivo PBM de la proteína E del SARS-CoV y SARS-CoV-2 reduce la replicación del virus mediante la alteración de la homeostasis de Ca^{2+} a través del CFTR. El correcto transporte de Cl^- y Na^+ a través del epitelio alveolar y de las vías respiratorias, y la integridad de las barreras epiteliales dentro del pulmón redujeron la patología pulmonar causada por el SARS-CoV-2. En un modelo de edema pulmonar inducido por presión hidrostática elevada, que da lugar a una disminución de la actividad CFTR y a la absorción del líquido pulmonar, el Ivacaftor revirtió parcialmente esta patología (Li et al., 2017). Actualmente, ambos compuestos se utilizan combinados en el tratamiento de pacientes con fibrosis quística (Colombo et al., 2021; Cosgriff et al., 2020; Poli et al., 2020). Hemos demostrado que la terapia con moduladores de CFTR podría beneficiar a pacientes con fibrosis quística frente a la COVID-19 (Honrubia et al., 2023a; Jarosz-Griffiths et al., 2020; Sui et al., 2020). Estos moduladores ayudan a restablecer la función celular, a aumentar la correcta hidratación de las vías respiratorias, a reducir el estrés oxidativo y a reducir la activación del inflamasoma mediado por NLRP3 en pacientes con fibrosis quística (Jarosz-Griffiths et al., 2020). El estudio del efecto de estos moduladores en la virulencia del SARS-CoV-2 puede ser de alto interés. Nuestro laboratorio ha hecho una contribución significativa al descubrimiento de antivirales para neutralizar la infección por SARS-CoV-2.

Evolución SARS-CoV-2

Los virus RNA durante su replicación introducen errores en su genoma (algo más de un error por cada 10.000 nucleótidos añadidos durante la síntesis de su genoma RNA), dando lugar a la generación de millones de mutantes, alguno de los cuales salta la barrera de las especies al adquirir la propiedad de infectar a las personas por acoplarse mejor la proteína de la envuelta del virus al receptor que las células tienen en su superficie. El SARS-CoV-2, al igual que sus antecesores, evoluciona genéticamente seleccionando nuevas variantes que se diseminan con mayor facilidad y evitan la respuesta inmune

que indujeron las variantes anteriores. Cuando un virus salta de una especie a otra suele ser muy virulento al principio, pero posteriormente evoluciona atenuándose. Ello se debe, a que las variantes del virus más virulentas dejan de circular al causar una enfermedad importante en las personas infectadas.

Las nuevas variantes del SARS-CoV-2, inicialmente acumularon entre 10 y 14 mutaciones puntuales de aminoácidos en la proteína S. Una parte de ellas eran comunes en tres mutantes, cuando se consideran las variantes Alfa, Beta, Gama y Delta, pero solo la sustitución D614G, afectó a las cuatro variantes (Tabla 3).

VIRUS CON MUTACIONES INCORPORADAS POR DISTINTAS VARIANTES DEL SARS-CoV-2

Alpha	Beta	Gamma	Delta
Δ69-70	L18F*	L18F	T19R
Δ144	D80A	T20N	V70F*
E484K*	D215G	P26S	T95I
S494P*	Δ242-244	D138Y	G142D
N501Y	R246I*	R190S	Δ156-157
A570D	K417N	K417T	R158G
D614G	E484K	E484K	A222V*
P681H	N501Y	N501Y	W258L*
T716I	D614G	D614G	K417N*#
S982A	A701V	H655Y	L452R
D1118H		T1027I	T478K
K1191N*			D614G
			P681R
			D950N

Tabla 3. Mutaciones incorporadas en las variantes del SARS-CoV-2 que se han impuesto en diversos países (VOC, variantes que han causado preocupación, de su acrónimo en inglés). *Variantes detectadas en algunos aislados virales pero no en todos. #, La variante delta con la mutación K417N se conoce como variante Delta+.

Las variantes del virus de Wuhan que más se han impuesto en las primeras fases fueron la Alfa, Beta, Gama y Delta. Estas variantes prá-

ticamente ya no circulan en la actualidad. Más recientemente se impuso la variante Ómicron, que se ha diversificado considerablemente generando una amplia variedad de subvariantes que se han ido imponiendo sucesivamente: BA.1 y BA.2, BA.4 y BA.5, BQ.1 y XBB.5.1). Estas, no han aparecido de forma ordenada y consecutiva, sino que han emergido en distintos continentes (Callaway, 2022b) después de una competición entre los mutantes generados por azar y ventaja selectiva. Las variantes del virus ómicron BA.4 y BA.5 se diseminaron más rápidamente que las otras líneas de este mismo virus. Estas variantes incorporaron una mutación denominada F486V en la proteína S responsable de la infección, que es una diana de la respuesta inmune. Esta mutación facilitaba a los virus mutantes su evasión de las respuestas inmune, favoreciendo su selección (Callaway, 2022a).

Las variantes ómicron no tienen precedentes en su enorme diversificación y se han impuesto en el último periodo del 2021. Posiblemente las variantes Ómicron se han impuesto para evitar la respuesta inmune inducida por las variantes precedentes. En la actualidad (septiembre 2023), en Europa, Norte América y África la variante ómicron BQ.1 se impone rápidamente, mientras que en Asia, incluyendo Singapur, Bangladesh y la India la variante XBB es dominante y parece imponerse. Lo que se puede predecir en este momento (septiembre 2023) es que el SARS-CoV-2 no va a ser erradicado fácilmente, y que probablemente se ha convertido en un virus estacional, aunque la Organización Mundial de la Salud dice que esta hipótesis no está confirmada porque no ven diferencia en la circulación del virus en las diferentes estaciones, a diferencia de lo que pasa con otros virus respiratorios. Entre las nuevas variantes se seleccionan las que crecen más rápidamente y evaden la respuesta inmune con mayor facilidad (Callaway, 2022b). A lo largo del 2023 se espera que una nueva sub-línea se imponga, posiblemente derivada de XBB (Yue et al., 2023). Esta es la variante que se está siguiendo con mayor atención en este momento, y co-circula con la BQ.1.1, lo que constituye una información esencial para el desarrollo de vacunas (Fig. 15). Afortunadamente la variante XBB parece estar atenuada (Callaway, 2022b), aunque es altamente infecciosa, y ya ocasiona más del 70% de las infecciones en el Noreste de EE UU.

La resistencia de las variantes del SARS-CoV-2, a las distintas vacunas que se están administrando en la actualidad (2023), muestra que

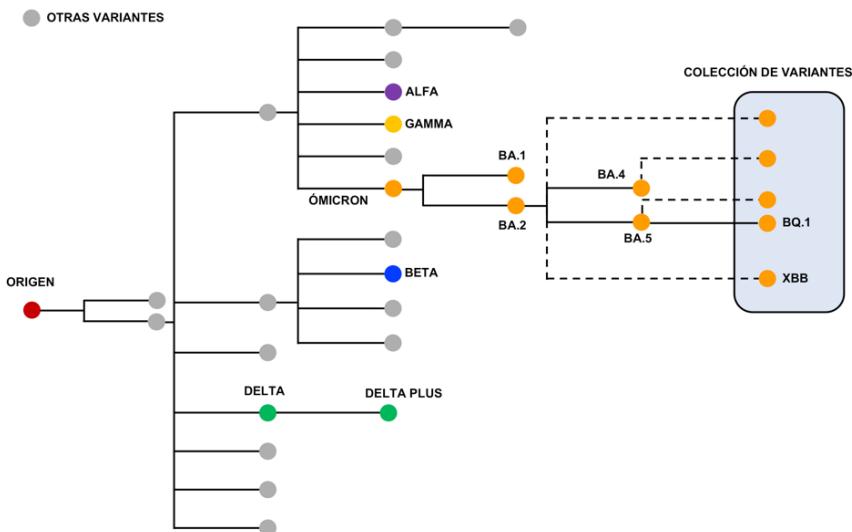


Figura 15. Evolución de las variantes del SARS-CoV-2 (Callaway 2022b). En el esquema se indica que con el tiempo se han impuesto predominantemente las variantes BQ.1 y XBB, derivadas de la ómicron.

las vacunas de Pfizer y de Moderna están reduciendo su eficacia (Chematicelly et al., 2021; Tregoning et al., 2021). Por ello, las vacunas frente al SARS-CoV-2 en producción, que se van a administrar durante la campaña de vacunación del 2023-2024 incluyen solamente la variante Ómicron XBB. La inmunización con variantes anteriores a la Ómicron, hace que cuando se inmuniza con una mezcla de proteínas S procedentes de dos líneas de virus anteriores, la respuesta frente a Ómicron está disminuida por el denominado “pecado original” (es decir, la memoria inmunológica frente a antígenos similares administrados anteriormente).

Respuesta inmune a las infecciones por CoVs

El estudio de la respuesta inmune de personas recuperadas de la infección por SARS-CoV-2 indica que tanto la inducción de anticuerpos, particularmente los que neutralizan al virus, como la respuesta celular de linfocitos T son relevantes en protección, y que la infección por el virus induce respuestas inmunes T fuertes (Le Bert et al., 2020; Se-

kine et al., 2020). Así mismo, se ha observado que las respuestas por anticuerpos duran al menos 17 años en el caso del SARS-CoV. En el caso del SARS-CoV-2 la protección inmunológica dura como mínimo 9 meses (Ripperger et al., 2020). La evaluación en personas inmunizadas con las vacunas producidas por Moderna, Pfizer-BioNTech y AstraZeneca-Universidad de Oxford, ha mostrado que estas inducen ambos tipos de respuestas inmunes. Las células T potencian la producción de anticuerpos (T-CD4), la destrucción de las células infectadas (T-CD8) y la memoria inmunológica (CD45RO y otras) (Grifoni et al., 2020). En pacientes con SARS-CoV-2, se han identificado linfocitos T activados por la proteína S, y por otras proteínas virales estructurales (M, N), y no estructurales (nsps). Estas proteínas de los CoVs, combinadas, probablemente inducen una protección óptima, superior a las vacunas basadas en un solo antígeno.

Alteración de la respuesta inmune en infecciones por CoVs humanos letales

El análisis de la respuesta inmune frente al SARS-CoV-2 muestra una amplia falta de regulación del sistema inmune en los casos graves de la infección por este virus y hay una amplia evidencia de una respuesta inmune aberrante centrada en la supresión de la respuesta mediada por interferones, una abundante respuesta proinflamatoria, y un retraso en la respuesta inmune adaptativa. Además, se ha observado que varias proteínas del virus promueven una inhibición de la inducción del interferón y de la estimulación por este dirigida a la activación del inflamasoma (Roy Wong and Perlman, 2021). Esto sugiere que la inducción de una enfermedad grave por la infección con CoVs humanos está mediada por la pérdida de regulación de la respuesta inmune y por una interferencia viral significativa.

La falta de regulación de la respuesta inmune por los IFNs se puede atribuir en general a los genes estimulados por el IFN (*interferon stimulated genes*, ISGs). La expresión de estos genes se aumenta durante la infección viral con el objeto de realizar funciones críticas para el control y eliminación de los virus. Las funciones de los ISGs inhiben la entrada del virus, su replicación, traducción y salida de la célula (Schoggins, 2019). Además de estas actividades, los ISGs regulan la respuesta inmune adaptativa. El papel protector de este tipo

de respuesta se ha demostrado al observar que pacientes COVID-19, con defectos genéticos en las vías de señalización del IFN o con auto-anticuerpos específicos para el IFN, tienen un pronóstico muy desfavorable. De hecho, el 10% de los pacientes con un COVID-19 grave generan auto-anticuerpos específicos para el IFN tipo I (IFN-I), mientras que el 3.5% de los pacientes COVID-19 que tenían defectos genéticos en loci implicados en receptores *Toll-like 3* (TLR3), o en el factor 7 regulador del IFN (IRF-7), no lo hacen (Bastard et al., 2020; Zhang et al., 2020).

Los beneficios de la combinación del IFN con la administración de antivirales en las infecciones por CoVs se ha evaluado en ensayos clínicos con resultados aparentemente no consistentes. Estos datos muestran la importancia del momento de la producción o administración del IFN. La mayor parte de los pacientes que bajaron los niveles de producción de IFN pronto después de la infección, evolucionaron favorablemente. Sin embargo, los pacientes con una respuesta persistente por IFN, mostraron niveles de saturación de oxígeno menores, menores niveles de anticuerpos específicos para el SARS-CoV y peor evolución clínica. Estos estudios sugieren que los pacientes con respuestas por IFN persistente bloquean el cambio de una respuesta innata a una inmunidad adaptativa conforme la infección por el SARS-CoV avanza, dando lugar a una enfermedad grave en algunos casos (Cameron et al., 2007). En un estudio longitudinal de muestras clínicas de pacientes con COVID-19, la expresión elevada de los niveles de IFN solo se detectó en la sangre de los pacientes con una enfermedad grave, y los niveles elevados del IFN se correlacionaron con la gravedad de la enfermedad y su mortalidad, lo que apoya el papel patológico del IFN (Lucas et al., 2020). Sin embargo, en otros estudios, se observaron respuestas tempranas del IFN y se observó que los síntomas clínicos disminuyeron en los pacientes, con una infección por SARS-CoV-2 entre media y moderada (Galani et al., 2021; Hadjadj et al., 2020). No es sorprendente registrar diferentes modelos de expresión temporal del IFN para cada nivel de gravedad de la enfermedad, dado que las muestras biológicas procedentes de los diferentes pacientes se han recogido de personas con diferentes perfiles demográficos, y en distintas etapas de progresión de la enfermedad, según la Real Academia de Medicina, lo que complica el análisis e interpretación de los resultados clínicos.

Proteínas de CoVs que interfieren con la inducción de interferón

Además de los factores del hospedador que afectan a la producción de IFN, existen proteínas virales que contribuyen a la alteración de la respuesta por IFN (Roy Wong and Perlman, 2021). Los CoVs muestran distinta susceptibilidad al IFN, y los tres coronavirus patógenos para el hombre: SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 codifican antagonistas frente al IFN que reducen su producción o actividad por el hospedador (de Wilde et al., 2013; Katsura et al., 2020; Lokugamage et al., 2020; Miorin et al., 2020). Los CoVs MERS-CoV and SARS-CoV-2 son más sensibles al IFN que el SARS-CoV, y estos mismos virus reducen la inducción de IFN más que el SARS-CoV. Sin embargo, el SARS-CoV y SARS-CoV-2 inhiben la actividad del receptor interferón-alpha/ beta (IFNAR) en un grado superior al MERS-CoV (de Wilde et al., 2013; Katsura et al., 2020; Lokugamage et al., 2020; Miorin et al., 2020).

Con el objeto de identificar los antagonistas del IFN codificados por el SARS-CoV-2, se han realizado prospecciones *in vitro* expresando proteínas individuales del SARS-CoV-2. Los resultados mostraron que las proteínas nsp1, nsp3, nsp12, nsp13, nsp14, nsp15, nsp16, y las fases abiertas de lectura (ORF) 3 y 6, las proteínas M y N interfieren con la producción o acción del IFN en condiciones que mimetizan las de la infección por SARS-CoV-2 (Lei et al., 2020; Xia et al., 2020; Yuen et al., 2020).

Factores que favorecen la inflamación

La respuesta pro-inflamatoria inicial inducida por la infección con CoVs da lugar a una concentración rápida de células del sistema inmune en los tejidos donde la infección es alta, como los pulmones, y su activación, diferenciación y proliferación (Chen et al., 2018). No obstante, la respuesta inmune que facilita la eliminación del virus, también puede inducir una patología inmune. Existen muchas publicaciones que describen aumentos de la patología mediados por la respuesta inflamatoria en pacientes infectados con SARS-CoV, MERS-CoV o SARS-CoV-2, y también en modelos animales infectados con estos virus. Esto se demostró por la detección de niveles elevados de citoquinas y quimioqui-

nas, incluyendo IL-1, IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral (TNF), y la presencia de células inmunes en los pulmones de los pacientes fallecidos (Barnes et al., 2020; Hadjadj et al., 2020; Huang et al., 2020; Lucas et al., 2020; Mathew et al., 2020; Nienhold et al., 2020). Los niveles altos de estos mediadores inflamatorios se correlacionaron con la gravedad de la infección (Hadjadj et al., 2020; Huang et al., 2020; Lucas et al., 2020; Mathew et al., 2020).

En consonancia con esta observación, en nuestro laboratorio se mostró que la infección por el SARS-CoV activa la vía de señalización NF-κB (DeDiego et al., 2014), y una característica destacada de la COVID-19 grave es el incremento de la concentración de las moléculas pro-inflamatorias, tales como: IL-1, IL-6, IL-8 y TNF, que aumentan con la activación de NF-κB (Hadjadj et al., 2020). Se ha propuesto que ciertas proteínas del SARS-CoV-2 son críticas para aumentar la patogénesis inmune de la COVID-19. Tal es el caso de las proteínas ORF3a, ORF7a, M y N que inducen la expresión de citoquinas pro-inflamatorias mediante la activación de NF-κB en cultivos celulares (Su et al., 2021; Wu et al., 2021).

En la COVID-19 se ha observado una falta de regulación canónica de la respuesta inmune innata y de la adaptativa, mediada por la infección viral. La COVID-19 es un buen ejemplo de la naturaleza compleja e interdependiente de la homeostasis de la respuesta inmune del hospedador. Una vez se ha desequilibrado, tal como sucede en el caso de la COVID-19, las consecuencias son la producción de una serie de patologías inmunes que llevan a la progresión de la enfermedad. Un entendimiento más profundo de estos cambios permitiría el desarrollo de terapias efectivas para el tratamiento de los pacientes que desarrollan una enfermedad grave como consecuencia de la infección por el virus.

COVID-19 de larga duración. Mecanismos causantes: posible combinación de varios mecanismos

En Estados Unidos, Europa y otros continentes se ha observado que una elevada proporción de los pacientes que han sufrido la COVID (entre el 10 y el 23 %, independiente de si había causado una patología leve o grave) podían sufrir una patología multifuncional incluso dos años después de haberse recuperado aparentemente de la infección original

(Mesa, 2022; Peluso and Deeks, 2022). Los síntomas observados en los pacientes indican que estos se fatigan fácilmente, sufren insomnio, pérdida de memoria, niebla en el cerebro, síntomas de demencia, ansiedad, artritis y hasta unos 200 síntomas distintos. Sin embargo, investigaciones sobre los determinantes del Post-COVID no han identificado una única causa de esta enfermedad y se han propuesto al menos cuatro posibilidades, solas o combinadas, como tentativas etiologías del COVID de larga duración: (i) la inducción de una inflamación persistente que afecta a varios órganos del cuerpo, debida a niveles de citoquinas e interleuquinas tales como la IL-6, interferones, y el factor de necrosis tumoral (TNF); (ii) la presencia continua del virus o partículas defectivas del mismo en órganos como el tracto gastrointestinal; (iii) la reactivación de virus persistentes como el Epstein-Barr, un herpesvirus que frecuentemente causa la mononucleosis infecciosa; o (iv) la presencia de micro-coágulos que se han encontrado frecuentemente en los pacientes con COVID de larga duración. Varios estudios han descrito la presencia de células T activadas en estos pacientes, así como células T citotóxicas y células B vírgenes, que no han sido previamente estimuladas por su antígeno. Aunque en principio todas las hipótesis son posibles y no excluyentes, nuestra hipótesis preferente es que el genoma del SARS-CoV-2 haya evolucionado a formas delecionadas del mismo que han reducido su capacidad para propagarse en nuestro organismo, pero que persisten con un título reducido, preferentemente en órganos como el tracto gastrointestinal, donde la respuesta inmune sea menos efectiva. Esta hipótesis se refuerza por haber encontrado en el tracto gastrointestinal, de un número significativamente alto de pacientes, la expresión de varias proteínas virales (S, replicasa, N, y M), y también de los mRNAs correspondientes. La presencia de la replicasa facilitaría la posibilidad de auto-amplificación de estas partículas (Zhou et al., 2023; Zollner et al., 2022). Los genomas defectivos de virus RNA se han identificado como un factor que influye en la respuesta inmune y la patogénesis viral. La presencia de genomas defectivos del SARS-CoV-2 se ha detectado por la secuenciación masiva de transcriptomas de células de pacientes con COVID-19 de larga duración. La cuantificación de los RNAs identificados por secuenciación masiva mostraron que la formación de genomas defectivos del virus daba lugar a un incremento de la producción de interferón.

Independientemente de la etiología del COVID-19 de larga duración, es evidente que va a representar un importante problema sanitario,

social y económico, por lo que instituciones como los NIH de EE. UU. han dispuesto sumas muy elevadas de financiación para su investigación. Nuestro equipo se ha sumado a este esfuerzo, y está desarrollando un proyecto sobre este tema en colaboración con equipos de investigación de EE. UU.

Desarrollo de vacunas

Tipos y número de vacunas en desarrollo

En la actualidad hay más de 200 candidatos a vacunas de diversos tipos en desarrollo (<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>). Esto incluye distintas tecnologías basadas en: (i) el antígeno de las espículas del virus (proteína S) o fragmentos de la misma, dado que es el mayor inductor de anticuerpos neutralizantes para los CoVs; (ii) el virus SARS-CoV-2 inactivado químicamente; (iii) la utilización de vectores virales no replicativos derivados de adenovirus, poxvirus y virus parainfluenza humano atenuados; (iv) el uso de vectores virales replicativos basados en virus animales como el virus de la estomatitis vesicular (VSV), el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), o humanos como el virus del sarampión; (v) la combinación de dos adenovirus recombinantes de distinto serotipo, para la primera y segunda dosis de vacunación (Ad5-S y Ad26-S); (vi) mRNAs que codifican la expresión de la proteína S de CoVs; (vii) replicones RNA derivados del propio virus y, (viii) la expresión de la proteína S del virus utilizando plásmidos DNA, entre otras estrategias.

En agosto del 2022 al menos 40 vacunas para el SARS-CoV-2 se estaban evaluando en ensayos clínicos en humanos fase III y se habían aprobado completamente al menos 12. De ellas, tres están basadas en vectores derivados de adenovirus recombinantes que expresan la proteína S del SARS-CoV-2: la vacuna de la Universidad de Oxford y la compañía AstraZeneca, basada en un adenovirus de chimpancé (Voysey et al., 2021), una de las vacunas de la compañía CanSino Biologics, en colaboración con el instituto de Biotecnología de Pekín (China), basada en el adenovirus humano 5 (Zhu et al., 2020a; Zhu et al., 2020b), y la vacuna de la compañía Johnson and Johnson Janssen Pharma que utiliza un vector basado en el adenovirus 26 humano (Sadoff et al., 2021).

Estas vacunas se crecen con títulos muy altos ($>10^{11}$ unidades infectivas por ml), por lo que su coste es relativamente reducido y, aunque inducen efectos secundarios leves, estos se consideraban “asumibles”, algo discutible incluso en la situación de pandemia grave como la mediada por el SARS-CoV-2. La vacuna de la compañía AstraZeneca confiere una protección entre el 62 y el 90%, dependiendo de las dosis administradas en la primera y segunda inmunización. La administración de esta vacuna induce fiebre, dolor muscular y causa un pequeño resfriado que se suele resolver simplemente con la administración de un paracetamol. La vacuna desarrollada por el Instituto Gamaleya de Rusia está basada en la administración de dos vectores basados en adenovirus de distinto serotipo el rAd26 y el rAd5 para potenciar la inmunidad inducida por la vacuna (Logunov et al., 2020). El uso de adenovirus de dos serotipos, le puede dar una ventaja sobre las vacunas que utilizan el mismo vector en las dos dosis, porque la segunda inmunización no se verá interferida por una respuesta inmune inducida por la primera, de un serotipo distinto.

Vacunas alternativas de la firma china Sinovac y de la farmacéutica Nacional China Sinopharma están basadas en el SARS-CoV-2 inactivado químicamente. El 90% de las personas vacunadas con esta vacuna produjeron anticuerpos neutralizantes específicos para el virus a las dos semanas después de la inmunización. Estas personas desarrollaron síntomas adversos suaves, como dolor en el sitio de la inyección y fiebre moderada, pero no reacciones de importancia. Este tipo de vacunas solamente deberían de inducir una inmunidad secretora en mucosas limitada, al no haberse administrado en las propias mucosas respiratorias. Sin embargo, la inmunización directa en las mucosas, se necesitaría para proteger frente al SARS-CoV-2, es la más efectiva, dado que este tipo de inmunidad compartimentalizada se induce solamente en las mucosas en las que se expresa el antígeno. No obstante, hoy en día se administran vacunas a nivel mundial, como la que protege frente a infecciones respiratorias producidas por el virus de la gripe, que se administran por vía intramuscular, a pesar de lo cual inducen un cierto grado de protección variable, entre el 30 y 75% de las personas vacunadas. Por ello, es comprensible que las vacunas basadas en vectores derivados de adenovirus o poxvirus, administradas intramuscularmente, también induzcan protección. Con el fin de garantizar la seguridad de las vacunas inactivadas, es muy importante comprobar que su administración no induce efectos adversos tales como la eosinofilia, siguiendo lo que se ha indicado anteriormente (Bolles et al., 2011).

En España están en desarrollo varias vacunas basadas en algunas de las tecnologías citadas anteriormente. Los tres candidatos a vacuna más conocidos, que se están produciendo en laboratorios del CSIC, se están desarrollando en el Centro Nacional de Biotecnología (laboratorios dirigidos por los Prof. Mariano Esteban y el Dr. Juan García Arriaza, o en el laboratorio dirigido por el Prof. Luis Enjuanes, con la colaboración de las Dras. Isabel Sola y Sonia Zúñiga. En este laboratorio se cuenta además con la colaboración de un experimentado equipo de científicos. Por otra parte, en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC, Madrid), el equipo del Prof. Vicente Larraga está desarrollando una vacuna basada en un plásmido DNA que expresa la proteína S del SARS-CoV-2, que se encuentra en una fase avanzada del desarrollo.

La vacuna dirigida por Mariano Esteban está basada en una variante del virus de la viruela denominada MVA, que está fuertemente atenuada porque a su genoma DNA se le han eliminado en torno a un 30% de los genes. Esta variante ya está aprobada para su uso como vector vacunal por las agencias que controlan la administración del medicamento tanto de EE. UU. (FDA), como por la Agencia Europea del Medicamento. Este grupo ha mostrado que este vector viral que expresa la proteína S del SARS-CoV-2 induce en ratones transgénicos humanizados, hamsters y en monos macacos, anticuerpos neutralizantes para el virus, e inmunidad celular que protegen frente al desafío con una dosis letal del virus vírfuento.

Vacunas basadas en mRNAs

Las vacunas que utilizan moléculas de mRNA que codifican la proteína S del SARS-CoV-2, el mayor inductor de anticuerpos neutralizantes, han sido las primeras en estar disponibles para su administración. La primera es la producida por un consorcio de las compañías BioNTech (Alemania) y Pfizer (Nueva York, EE. UU.) (Mulligan et al., 2020). Esta vacuna no causa efectos secundarios adversos relevantes, e induce una protección de hasta el 95% en las personas vacunadas. Ninguna de las personas a las que se le ha administrado la vacuna de Pfizer sufrió efectos secundarios serios, aunque el 75% de las personas a las que se le administró la dosis más alta de la misma (100 microgramos de RNA) sintieron fatiga, dolor de cabeza, resfriado, dolor muscular y de las articulaciones. Esta vacuna indujo niveles de

anticuerpos neutralizantes de 1,8 a 2,8 veces mayores que los observados en el plasma de los pacientes recuperados de la infección por el SARS-CoV-2. La segunda vacuna basada en mRNA es la producida por la compañía norteamericana Moderna y los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de EE. UU. (Corbett et al., 2020; Hassan et al., 2020; Jackson et al., 2020). Esta vacuna también proporciona una protección en torno al 95%. Las vacunas basadas en mRNAs tienen la ventaja de diseñarse y producirse con facilidad. También pueden inducir una respuesta inmune de larga duración. No obstante, pese a su sencillez, también inducen efectos secundarios suaves. Estos efectos desaparecen rápidamente en unos dos días, lo que hace que las vacunas basadas en mRNAs sean una alternativa a las vacunas convencionales. Las vacunas de mRNA inducen anticuerpos neutralizantes y respuestas de células T, pero no suelen inducir una inmunidad esterilizante, tal que los modelos animales utilizados en la evaluación no permitan el crecimiento de los virus que se administran en el desafío para comprobar su eficacia, algo que tampoco induce la vacuna de Oxford-AstraZeneca. La protección inducida por los distintos tipos de vacunas mRNA que expresan la proteína S del SARS-CoV-2, se han optimizado en el caso de las vacunas de Pfizer y Moderna mediante el uso de ribonucleósido trifosfatos modificados para aumentar su estabilidad y traducibilidad, aumentando así la immunogenicidad de la proteína S codificada por estos mRNAs (Pallesen et al., 2017).

Vacunas frente el MERS-CoV y el SARS-CoV-2 basadas en replicones RNA de coronavirus

En el Laboratorio de Coronavirus del CNB-CSIC hemos desarrollando vacunas para prevenir la infección por los virus humanos MERS-CoV y SARS-CoV-2. Las dos vacunas están basadas en replicones RNA de los correspondientes virus, cada una con características diferenciales. Estas vacunas son seguras porque los replicones RNA en los que se basan se derivan del genoma de cada uno de estos virus, en los que se han delecionado varios genes, cada uno de los cuales lleva a la atenuación del virus. Además, es esencial la delección de una combinación de genes que da lugar a replicones deficientes en propagación, lo que hace que éstos no se puedan transmitir de célula a célula, por lo que son altamente seguros, al no tener la oportunidad de revertir a un virus infectivo. Estos replicones RNA son auto-amplificables,

lo que les permite incrementar más de mil veces la cantidad de los RNA mensajeros que codifican varias proteínas del virus, incluida la proteína S, el mayor inductor de anticuerpos neutralizantes (Almazan et al., 2013; Gutiérrez-Álvarez et al., 2021). Nuestro laboratorio ha combinado técnicas de biología sintética y genética inversa para ensamblar cDNAs completos del MERS-CoV y del SARS-CoV-2. Estos métodos utilizan cromosomas artificiales de bacterias (BACs). Con ellos se han diseñado candidatos a vacunas que han proporcionado una protección del 100% frente al desafío por dosis de virus altamente letales administradas a modelos animales (ratones transgénicos humanizados que expresan el receptor hDPP4 o el ACE2, según se trate del virus MERS-CoV o el SARS-CoV-2) (Fig. 16).

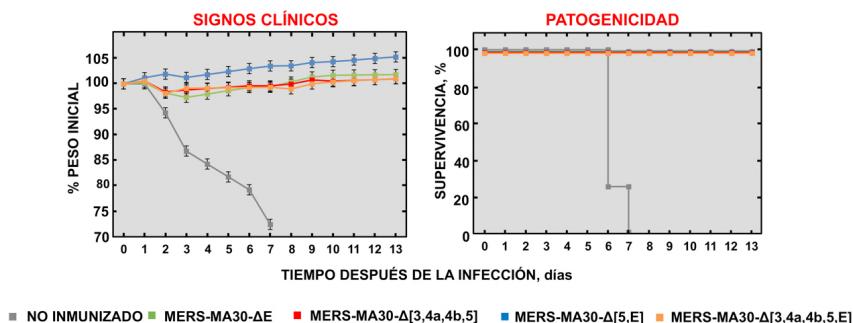


Figura 16. Protección inducida por la vacuna basada en el replicón RNA derivado del MERS-CoV-MA30, frente al desafío con un CoV virulento. Ratones modificados KI, en los que se cambiaron dos exones del receptor endógeno para el MERS-CoV para asemejarlo al receptor humano homólogo, con el fin de hacerlos susceptibles a este virus, se vacunaron con los replicones en los que se habían delecionado los genes indicados entre paréntesis. Tres semanas más tarde, estos ratones se desafiaron con una dosis letal de 1×10^5 unidades formadoras de placas de lisis. Todos los ratones vacunados (líneas de colores) mantuvieron su peso (gráfica de la izquierda) y sobrevivieron (gráfica de la derecha) al desafío con el virus virulento, confirmando la eficacia de la vacunación con una sola dosis de antígeno administrada por vía intranasal.

En ensayos preclínicos realizados en ratones transgénicos humanizados, estos replicones RNA han mostrado la inducción de una inmunidad esterilizante, por lo que no solo protegen frente a la enfermedad, sino que la inmunización con ellos induce una respuesta inmune que bloquea la transmisión del virus entre distintas células (Fig. 17).

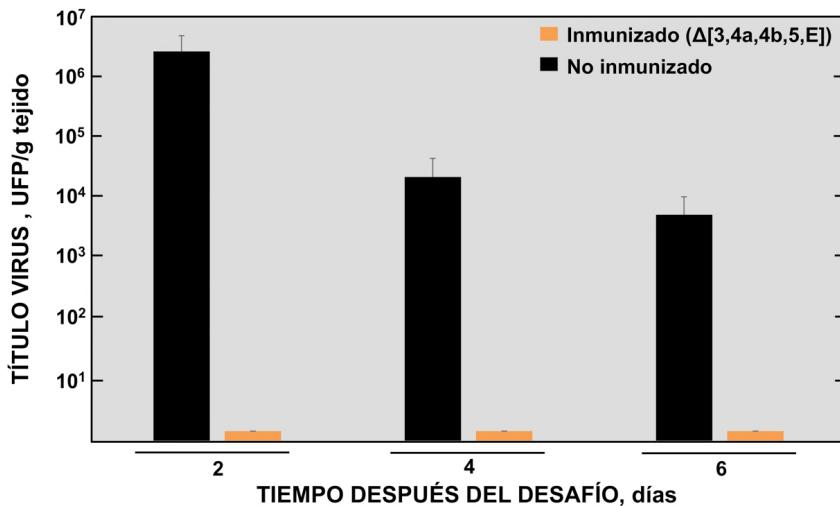


Figura 17. Inducción de una inmunidad esterilizante por la administración de una dosis de la vacuna para el MERS-CoV. Esta vacuna se basa en un replicón RNA derivado del genoma del virus, utilizando técnicas de ingeniería genética que lo atenúan, y hacen que el RNA resultante no se pueda propagar a las células vecinas y, por tanto, sea bioseguro. Para la generación de este replicón se han delecionado los genes 3, 4a, 4b, 5, y E. Las columnas negras indican el nivel de replicación del virus del desafío en los ratones no vacunados, mientras que las columnas naranjas muestran el crecimiento del virus (que es nulo) en los animales vacunados.

Desarrollo de vacunas para el SARS-CoV-2 basadas en replicones RNA derivados de CoVs

El desarrollo de una vacuna frente al SARS-CoV-2 se ha basado en los mismos principios que el de una vacuna para el MERS-CoV, es decir, en la construcción de replicones RNA deficientes en propagación que se administran en el interior de partículas análogas a virus (VLPs, *virus like particles*), que no pueden salir de la célula y no se propagan. Sin embargo, los objetivos esenciales de estos replicones, es que fuesen atenuados y deficientes en propagación, requirieron la delección de entorno a ocho genes que se localizaban a lo largo del todo el genoma del virus, con el fin de evitar que un solo evento de recombinación con otro virus circulante diese lugar a la generación de un virus competente en replicación y propagación (Fig. 18). Los genes que se delecionaron en el genoma del SARS-CoV-2, fueron distintos a los que se eliminaron en el caso del MERS-CoV. Estas delecciones de genes afectaron a cinco dominios del genoma del SARS-CoV-2 que se distribuyeron por toda su

longitud. Además, en el caso del SARS-CoV-2, se introdujeron mutaciones complementarias en otras proteínas como la N para aumentar el título del replicón RNA al ser rescatado dentro de las VLPs.

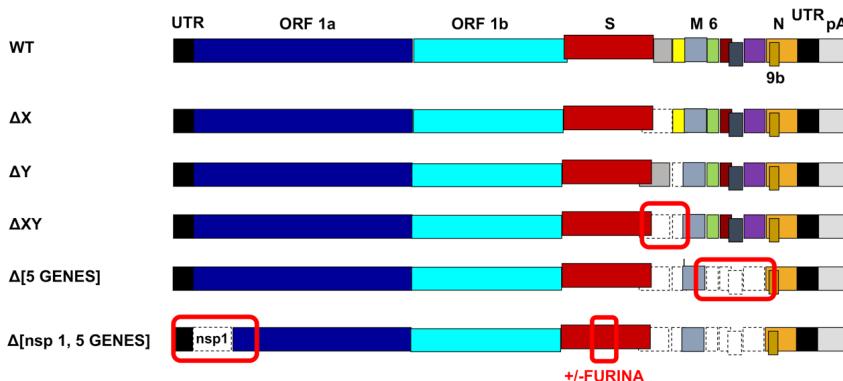


Figura 18. Diseño de una vacuna frente al SARS-CoV-2. El diseño de un replicón RNA como una vacuna para la protección inmunológica frente al SARS-CoV-2, es un proceso complejo, del cual solo se proporcionan en esta revisión algunos detalles esenciales, por estar este desarrollo en un proceso para patentarlo. Ello ha hecho que a varios genes se les haya dado un nombre codificado. En síntesis, por ingeniería genética se han delecionado total o parcialmente entorno a 10 genes del SARS-CoV-2. Estos genes se agrupan en cuatro zonas del genoma indicadas por las zonas dentro de recuadros rojos, que contienen dominios del genoma incluidos en recuadros con trazos discontinuos. En estas zonas se han eliminado total o parcialmente distintos genes, lo que ha llevado a la atenuación o deficiencia en propagación del replicón RNA generado.

Los replicones RNA que constituyen la vacuna para el SARS-CoV-2 son mutantes de delección derivados del genoma del virus, que se pueden propagar cuando se complementan proporcionándoles en *trans* las proteínas que se les han delecionado para generar el replicón. Estas proteínas se pueden suministrar expresándolas con plásmidos que se cotransfectan a la célula donde se amplifica el replicón RNA, que se encapsida en una VLP o, alternativamente, se pueden producir en células establemente transformadas que expresan de una forma estable o inducible estas proteínas. Los trabajos realizados en nuestro laboratorio se han basado inicialmente en el primer sistema, expresión de las proteínas complementadoras mediante plásmidos. No obstante, para la fabricación de la vacuna en grandes cantidades lo ideal es crecer las VLPs que encapsidan el replicón, en células establemente transformadas en las que se han integrado los genes necesarios para la propagación del

virus defectivo en propagación que sintetizan. Una de estas proteínas es la E (envuelta del virus). La construcción de las líneas celulares establemente transformadas requiere la terminación de un trabajo en marcha para la identificación y eliminación de los dominios tóxicos de estas proteínas para aumentar su estabilidad y supervivencia. Estas líneas celulares establemente transformadas permitirán la producción masiva de la vacuna. Aunque ya se han obtenido algunos prototipos, se necesita mejorar su estabilidad y, en consecuencia, el nivel de producción del replicón RNA.

En el diseño de vacunas su seguridad es muy importante dado que se pueden administrar a varios millones de personas. Por ello la introducción de cambios genéticos atenuantes en posiciones distales del genoma del virus es esencial. Para asegurar que los cambios que se introduzcan no se puedan revertir en un solo evento de recombinación, nos propusimos introducir modificaciones en el extremo 5' del genoma del replicón siguiendo la observación que habíamos hecho anteriormente en nuestro laboratorio, mostrando que la introducción de pequeñas delecciones de entorno a ocho aminoácidos en dominios conservados del gen nsp1 en CoVs lo atenuaban (Regla-Nava et al., 2015). Hemos estudiado el efecto atenuador de una colección de delecciones en la virulencia del virus y se ha seleccionado una combinación de dos delecciones que atenúan al virus (Marchena-Pasero et al., 2023). Esta atenuación se ha combinado con otras cuatro para garantizar la construcción de una vacuna basada en un replicón RNA atenuado.

Las distintas modificaciones que hemos introducido en el replicón deficiente en replicación, se han combinado en un único o varios replicones y se seleccionaron los que reunieron una lista de propiedades: proporcionar protección en el modelo experimental del ratón humanizado y del hámster, ser estables, y no causar efectos secundarios en las células seleccionadas para su crecimiento ni en los modelos animales experimentales evaluados. Los ratones transgénicos utilizados se construyeron esencialmente por Paul McCray y Stanley Perlman de la Universidad de Iowa, con los que hemos colaborado a lo largo de los últimos 20 años en proyectos de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de EE. UU. A este consorcio, los equipos norteamericanos contribuyeron con el modelo animal experimental, ratones transgénicos susceptibles al SARS-CoV-2, y nuestro grupo diseñó y construyó los replicones RNA inductores de la protección.

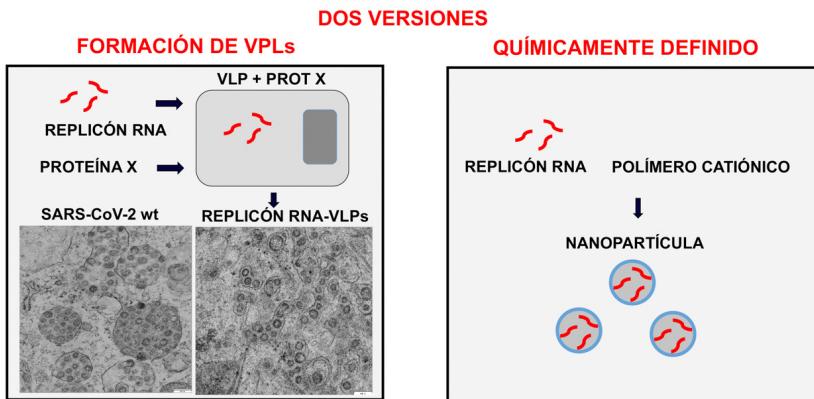


Figura 19. Dos versiones para la administración de la vacuna específica para el SARS-CoV-2. Se representa la generación de los dos prototipos de vacunas basados en el replicón RNA del SARS-CoV-2 diseñados en el Laboratorio de Coronavirus del CNB-CSIC. En la figura de la izquierda se representa la formación de partículas análogas a virus (VLPs) que incorporan en su interior el replicón RNA. En la figura de la derecha se representa la encapsidación de los replicones RNA en nanopartículas que pueden constar de mezclas de lípidos, proteínas u otras substancias (Gutiérrez-Álvarez et al., 2021).

Un aspecto relevante de la inducción de inmunidad con las vacunas es la ruta de administración. Se ha comprobado ampliamente que el mejor modo para la inducción de inmunidad en las mucosas respiratorias, es la presentación de los antígenos en estos tejidos, con el fin de inducir inmunidad local en las vías respiratorias, que es la vía de entrada de virus respiratorios como los CoVs. Una sola dosis de una vacuna basada en adenovirus, administrada por vía intranasal a ratones protege el tracto respiratorio superior e inferior frente al SARS-CoV-2, algo que no sucede cuando esta administración es intramuscular (Hassan et al., 2020). De hecho, la vacuna que hemos diseñado en el Laboratorio de Coronavirus del CNB-CSIC, se administra intranasalmente, y da una protección esterilizante frente al MERS-CoV, después de administrar una sola dosis (Gutiérrez-Álvarez et al., 2021). La inducción de inmunidad en mucosas tiene la ventaja de inducir inmunoglobulinas del isotipo IgA en gran cantidad, en las mucosas respiratorias de las vías de entrada, y en el tejido pulmonar. Por la proximidad de la vía nasal al cerebro, un requerimiento que se solicita a las vacunas intranasales es mostrar que esta vía de administración es segura y que no facilita la entrada de componentes de la vacuna que produzcan efectos secundarios.

rios en el cerebro, por atravesar la barrera hematoencefálica (Bernstein et al., 2020). En nuestro laboratorio hemos mostrado que la inmunidad inducida cuando el replicón RNA generado es administrado por vía intranasal es muy superior a cuando la administración es intramuscular.

Los replicones RNA generados se administraron como VLPs. Estas partículas se producen en menor cantidad en el citoplasma de las células infectadas en relación con la cantidad producida por los virus completos, aunque aparentemente, tienen la misma morfología (Fig. 19). Cuando la eficacia de la administración de los replicones encapsulados en VLPs se comparó con la inducida por nanopartículas basadas en combinaciones de lípidos, la eficacia de las VLPs en la inducción de una respuesta inmune fue muy superior.

Ensayos preclínicos de inducción de protección realizados en ratones transgénicos humanizados que expresan el receptor ACE-2 (hembras K18-hACE-2 C57BL/6J) (McCray et al., 2007) mostraron que una sola inmunización con los replicones RNA, en los que se habían delecionado cuatro genes del SARS-CoV-2, y eran defectivos en propagación y atenuados, indujeron una inmunidad esterilizante, que confirió resistencia frente al desafío con una dosis letal del virus (cien millones de partículas infectivas) (Fig. 20).

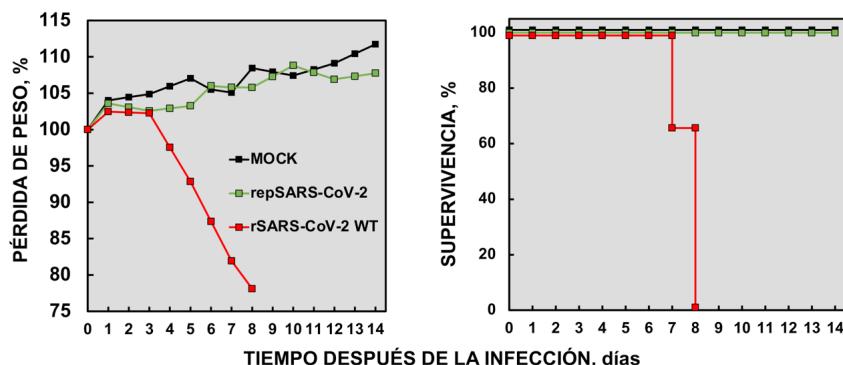


Figura 20. Evaluación de la protección frente a infecciones por el SARS-CoV-2 en ratones inmunizados con replicones RNA en los que se han delecionado diversos genes en cuatro zonas del genoma. Grupos de cinco ratones de 20 semanas se inmunizaron por inoculación intranasal con el replicón RNA derivado del SARS-CoV-2, y tres semanas después se sometieron a un desafío con 10^5 unidades infectivas y se evaluó la pérdida de peso y supervivencia de los ratones durante 12 días. Los resultados mostraron una ligera pérdida de peso, que se recuperó posteriormente y que la supervivencia de los ratones inmunizados fue del 100%.

Características de la protección inducida en la vacunación con los replicones RNA diseñados en nuestro laboratorio

La vacuna obtenida basada en replicones RNA derivados del genoma del SARS-CoV-2 proporcionó una protección completa con una sola dosis, porque induce elevadas respuestas por anticuerpos neutralizantes y linfocitos T de varios tipos, protege frente a todos las estirpes del virus que se han impuesto a lo largo de la pandemia (alfa, beta, gama, delta y ómicron), y proporciona una inmunidad esterilizante, dado que en los ratones inmunizados, cuando se realiza el desafío con una dosis letal superior a 100 mil dosis infectivas, el virus es eliminado completamente. La vacuna, evaluada en ensayos realizados en modelos experimentales (ratón y hamsters “programado”) no produce efectos secundarios significativos. En este momento están en curso pruebas complementarias de estabilidad *in vitro* e *in vivo*, niveles y cinéticas de producción, neutralización de variantes virales, etc., para completar la caracterización de los prototipos de vacuna diseñados. Un resumen de las características más relevantes de la vacuna diseñada para el SARS-CoV-2 se muestra en la Tabla 4.

El estado actual y perspectivas en el desarrollo de la vacuna para el SARS-CoV-2 se resumen en que se están programando los ensayos preclínicos en monos macacos. Las evaluaciones en primates no humanos son viables para nuestro laboratorio. Sin embargo, los estudios clínicos en humanos requerirán la incorporación de una compañía multinacional y la colaboración del Estado.

- **BASADA EN UN REPLICÓN RNA DERIVADO DEL GENOMA DEL VIRUS**
- **RNA COMPETENTE EN REPLICACIÓN Y DEFICIENTE EN PROPAGACIÓN**
- **ESTABLE EN CULTIVOS E IN VIVO**
- **EXPRESA VARIAS PROTEÍNAS VIRALES**
- **INDUCE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES Y RESPUESTA T CELULAR**
- **ADMINISTRACIÓN INTRANASAL**
- **INDUCE INMUNIDAD ESTERILIZANTE EN EL MODELO DEL RATÓN**
- **INMUNIZA FRENTE A LAS VARIANTES DEL SARS-CoV-2**

Tabla 4. Características más relevantes de la vacuna diseñada para el SARS-CoV-2 en el laboratorio de CoV del CNB-CSIC.

Etapas para mejorar los prototipos de la vacuna para el SARS-CoV-2 desarrollado en nuestro laboratorio

Las vacunas que se desarrollan pueden ser excelentes, pero es necesario que alcancen un título mínimo igual o superior a 10^7 unidades infectivas por mililitro para que sean rentables en su producción y aplicación. Estos títulos los hemos alcanzado con nuestra vacuna basada en replicones RNA, mediante una concentración de en torno a cien veces. En la actualidad estamos desarrollando varias estrategias en paralelo incorporando mutaciones en el genoma del replicón, que elevan los títulos de los CoVs. Así mismo, se ha delecionado el sitio de corte por la proteasa furina, situado hacia el medio de la proteína S del virus, que en varios sistemas celulares aumentan más de veinte veces el título del virus y, previsiblemente, del replicón RNA (Johnson et al., 2021). Además, estamos introduciendo modificaciones en la nucleoproteína (N) del virus, o en otros genes, cuya naturaleza es confidencial en este momento, con el fin de incrementar los títulos del virus.

La inmunización con las vacunas disponibles hasta el año 2022 incluían variantes del SARS-CoV-2 que emergieron durante los años 2020-2022 de la pandemia y estimulan una alta protección frente a estas estirpes. Sin embargo, la protección frente a la variante ómicron se ha visto significativamente reducida (He et al., 2022). En contraste, la inmunización con la variante ómicron protege efectivamente contra esta variante, pero da una baja protección frente a las variantes anteriores (alfa, beta, gama y delta), debido a que esta variante ha mutado más de 44 residuos de su proteína S respecto a estirpes virales anteriores (Miller et al., 2023). Al mismo tiempo, la inmunización con la variante ómicron, en personas previamente inmunizadas con las variantes anteriores del virus, también induce una fuerte protección frente a las cepas anteriores por el denominado “pecado inmunológico original”, que hace que se amplifiquen los clones de linfocitos B y T memoria, procedentes de anteriores inmunizaciones (Aguilar-Bretones et al., 2023; Brown and Essigmann, 2021). Con el fin de inducir una inmunidad que proteja eficazmente frente a las variantes del virus ómicron, que son dominantes en la actualidad, pero también contra las anteriores, que todavía circulan, las vacunas diseñadas en nuestro laboratorio incluyen una mezcla de dos replicones RNA, uno que lleva la proteína S de un virus anterior, como la variante delta, y otro que incluye la variante ómicron XBB, que en este momento los epidemiólogos moleculares

consideran que es la que se va a imponer en todo el mundo (Callaway, 2022b). No obstante, mas recientemente también estamos produciendo una vacuna específica para una variante muy reciente de la variante Ómicron exclusivamente.

Estrategias complementarias en progreso en nuestro laboratorio para mejorar los replicones RNA diseñados son: aumentar su seguridad, reducir costes de producción aumentando los títulos durante su producción, y reducir el tamaño de estos replicones. Para ello se ha construido una colección de replicones RNA derivados del SARS-CoV-2 de distintos tamaños, con el fin de encontrar una combinación de genes que codifiquen un replicón eficaz y con un tamaño mínimo.

Nuestro laboratorio ha presentado patentes para proteger los replicones RNA desarrollados tanto para vacunar frente al MERS-CoV como al SARS-CoV-2. La actualización de los modelos de vacunas obtenidos deberá de ser constante. La realidad nacional e internacional ha mostrado que además del esfuerzo científico, los laboratorios de investigación básica y traslacional necesitan el apoyo decidido y centrado en una serie de proyectos con posibilidades de desarrollar vacunas novedosas y eficaces. Además del trabajo de investigación, estos laboratorios tienen que ser conscientes de los grupos de presión que influyen a los gobiernos para atraer la financiación más elevada para sus proyectos. Los grupos de investigación deben de ser multidisciplinares para llegar a un desarrollo eficaz de la vacuna, que deberá de ser actualizada anualmente.

La vacunación de la población española se ha llevado a buen ritmo, dado que en estos momentos más del 94% de la población ha recibido entre 2 y 4 dosis de una de las vacunas disponibles. Esperemos que en el futuro próximo las vacunas administradas en España se hayan diseñado y fabricado en nuestro país. Consideramos que para que ello sea posible, es necesaria la creación de equipos de investigación grandes, con estabilidad laboral, con tecnologías complementarias y que dispongan de infraestructuras actualizadas. Laboratorios de alta seguridad (BSL 3 y 4) como los requeridos para el manejo de agentes infectivos tales como los coronavirus mortales para las personas, requieren para su desarrollo y activación varios años, sin embargo, las epidemias y pandemias se presentan de pronto y no pueden a esperar a su planificación, construcción e implementación de los protocolos requeridos.

Queremos finalizar este artículo reiteramos nuestro agradecimiento a nuestros colaboradores, a la Real Academia de Ciencias de España por su noble e interesante trabajo en favor del desarrollo y difusión científica, al Ministerio de Ciencia, al CSIC y en particular al Centro Nacional de Biotecnología donde se ha desarrollado nuestro trabajo fundamentalmente. Asimismo, agradecemos la colaboración de todas las personas e instituciones que han facilitado nuestra investigación. Muchas gracias.

Referencias

Adib-Conquy, M., Pedron, T., Petit-Bertron, A.F., Tabary, O., Corvol, H., Jacquot, J., Clément, A., Cavaillon, J.M., 2008. Neutrophils in cystic fibrosis display a distinct gene expression pattern. *Mol. Med.* 14, 36-44.

Aguilar-Bretones, M., Fouchier, R.A., Koopmans, M.P., van Nierop, G.P., 2023. Impact of antigenic evolution and original antigenic sin on SARS-CoV-2 immunity. *J. Clin. Invest.* 133, e162192.

Almazan, F., DeDiego, M.L., Galan, C., Escors, D., Alvarez, E., Ortego, J., Sola, I., Zuñiga, S., Alonso, S., Moreno, J.L., Nogales, A., Capiscol, C., Enjuanes, L., 2006. Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J. Virol.* 80, 10900-10906.

Almazan, F., DeDiego, M.L., Sola, I., Zuñiga, S., Nieto-Torres, J.L., Marquez-Jurado, S., Andres, G., Enjuanes, L., 2013. Engineering a replication-competent, propagation-defective Middle East respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. *mBio* 4, e00650.

Almazan, F., Gonzalez, J.M., Penzes, Z., Izeta, A., Calvo, E., Plana-Duran, J., Enjuanes, L., 2000. Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5516-5521.

Annan, A., Baldwin, H.J., Corman, V.M., Klose, S.M., Owusu, M., Nkrumah, E.E., Badu, E.K., Anti, P., Agbenyega, O., Meyer, B., Oppong, S., Sarkodie, Y.A., Kalko, E.K., Lina, P.H., Godlevska, E.V., Reusken, C., Seebens, A., Gloza-Rausch, F., Vallo, P., Tschapka, M., Drosten, C., Drexler, J.F., 2013. Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 456-459.

Anthony, S.J., Epstein, J.H., Murray, K.A., Navarrete-Macias, I., Zambrana-Torrelio, C.M., Solovyov, A., Ojeda-Flores, R., Arrigo, N.C., Islam, A., Ali Khan, S., Hosseini, P., Bogich, T.L., Olival, K.J., Sanchez-Leon, M.D., Karesh, W.B., Goldstein, T., Luby, S.P., Morse, S.S., Mazet, J.A., Daszak, P., Lipkin, W.I., 2013. A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. *mBio* 4, e00598.

Assiri, A., Al-Tawfiq, J.A., Al-Rabeeah, A.A., Al-Rabiah, F.A., Al-Hajjar, S., Al-Barakat, A., Flemban, H., Al-Nassir, W.N., Balkhy, H.H., Al-Hakeem, R.F., Makhdoom, H.Q., Zumla, A.I., Memish, Z.A.,

2013. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study. *Lancet Infect. Dis.* 13, 752-761.

Azhar, E.I., El-Kafrawy, S.A., Farraj, S.A., Hassan, A.M., Al-Saeed, M.S., Hashem, A.M., Madani, T.A., 2014. Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus. *N. Engl. J. Med.* 370, 2499-2505.

Azzam, Z.S., Dumasius, V., Saldias, F.J., Adir, Y., Sznajder, J.I., Factor, P., 2002. Na,K-ATPase overexpression improves alveolar fluid clearance in a rat model of elevated left atrial pressure. *Circulation* 105, 497-501.

Azzam, Z.S., Saldias, F.J., Comellas, A., Ridge, K.M., Rutschman, D.H., Sznajder, J.I., 2001. Catecholamines increase lung edema clearance in rats with increased left atrial pressure. *J. Appl. Physiol.* (1985) 90, 1088-1094.

Balint, A., Farsang, A., Zadori, Z., Hornyak, A., Dencso, L., Almazan, F., Enjuanes, L., Belak, S., 2012. Molecular characterization of feline infectious peritonitis virus Strain DF-2 and studies of the role of ORF3abc in viral cell tropism. *J. Virol.* 86, 6258-6267.

Barnes, B.J., Adrover, J.M., Baxter-Stoltzfus, A., Borczuk, A., Cools-Lartigue, J., Crawford, J.M., Dassler-Plenker, J., Guerci, P., Huynh, C., Knight, J.S., Loda, M., Looney, M.R., McAllister, F., Rayes, R., Renaud, S., Rousseau, S., Salvatore, S., Schwartz, R.E., Spicer, J.D., Yost, C.C., Weber, A., Zuo, Y., Egeblad, M., 2020. Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* 217, e20200652.

Barreda, D., Sanchez-Galindo, M., Lopez-Flores, J., Nava-Castro, K.E., Bobadilla, K., Salgado-Aguayo, A., Santos-Mendoza, T., 2018. PDZ proteins are expressed and regulated in antigen-presenting cells and are targets of influenza A virus. *J. Leukoc. Biol.* 103, 731-738.

Bastard, P., Rosen, L.B., Zhang, Q., Michailidis, E., Hoffmann, H.H., Zhang, Y., Dorgham, K., Philippot, Q., Rosain, J., Beziat, V., Manry, J., Shaw, E., Haljasmagi, L., Peterson, P., Lorenzo, L., Bizien, L., Trouillet-Assant, S., Dobbs, K., de Jesus, A.A., Belot, A., Kallaste, A., Catherinot, E., Tandjaoui-Lambotte, Y., Le Pen, J., Kerner, G., Bigio, B., Seeleuthner, Y., Yang, R., Bolze, A., Spaan, A.N., Delmonte, O.M., Abers, M.S., Aiuti, A., Casari, G., Lampasona, V., Piemonti, L., Ciceri, F., Bilguvar, K., Lifton, R.P., Vasse, M., Smadja, D.M., Migaud, M., Hadjadj, J., Terrier, B., Duffy, D., Quintana-Murci, L., van de Beek,

D., Roussel, L., Vinh, D.C., Tangye, S.G., Haerynck, F., Dalmau, D., Martinez-Picado, J., Brodin, P., Nussenzweig, M.C., Boisson-Dupuis, S., Rodriguez-Gallego, C., Vogt, G., Mogensen, T.H., Oler, A.J., Gu, J., Burbelo, P.D., Cohen, J.I., Biondi, A., Bettini, L.R., D'Angio, M., Bonfanti, P., Rossignol, P., Mayaux, J., Rieux-Laukat, F., Husebye, E.S., Fusco, F., Ursini, M.V., Imberti, L., Sottini, A., Paghera, S., Quiros-Roldan, E., Rossi, C., Castagnoli, R., Montagna, D., Licari, A., Marseglia, G.L., Duval, X., Ghosn, J., Lab, H., Group, N.-U.I.R.t.C., Clinicians, C., Clinicians, C.-S., Imagine, C.G., French, C.C.S.G., Milieu Interieur, C., Co, V.C.C., Amsterdam, U.M.C.C.-B., Effort, C.H.G., Tsang, J.S., Goldbach-Mansky, R., Kisand, K., Lionakis, M.S., Puel, A., Zhang, S.Y., Holland, S.M., Gorochov, G., Jouanguy, E., Rice, C.M., Cobat, A., Notarangelo, L.D., Abel, L., Su, H.C., Casanova, J.L., 2020. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science* 370, eabd4585.

Bernstein, D.I., Guptill, J., Naficy, A., Nachbagauer, R., Berlanda-Scorza, F., Feser, J., Wilson, P.C., Solorzano, A., Van der Wielen, M., Walter, E.B., Albrecht, R.A., Buschle, K.N., Chen, Y.Q., Claeys, C., Dickey, M., Dugan, H.L., Ermler, M.E., Freeman, D., Gao, M., Gast, C., Guthmiller, J.J., Hai, R., Henry, C., Lan, L.Y., McNeal, M., Palm, A.E., Shaw, D.G., Stamper, C.T., Sun, W., Sutton, V., Tepora, M.E., Wahid, R., Wenzel, H., Wohlbold, T.J., Innis, B.L., Garcia-Sastre, A., Palese, P., Krammer, F., 2020. Immunogenicity of chimeric haemagglutinin-based, universal influenza virus vaccine candidates: interim results of a randomised, placebo-controlled, phase 1 clinical trial. *Lancet Infect. Dis.* 20, 80-91.

Bhattacharya, S., Dai, Z., Li, J., Baxter, S., Callaway, D.J., Cowburn, D., Bu, Z., 2010. A conformational switch in the scaffolding protein NHERF1 controls autoinhibition and complex formation. *J. Biol. Chem.* 285, 9981-9994.

Bolles, M., Deming, D., Long, K., Agnihothram, S., Whitmore, A., Ferris, M., Funkhouser, W., Gralinski, L., Totura, A., Heise, M., Baric, R.S., 2011. A double-inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine provides incomplete protection in mice and induces increased eosinophilic proinflammatory pulmonary response upon challenge. *J. Virol.* 85, 12201-12215.

Bonfield, T.L., Hodges, C.A., Cotton, C.U., Drumm, M.L., 2012. Absence of the cystic fibrosis transmembrane regulator (Cftr) from myeloid-derived cells slows resolution of inflammation and infection. *J. Leukoc. Biol.* 92, 1111-1122.

Boni, M.F., Lemey, P., Jiang, X., Lam, T.T., Perry, B.W., Castoe, T.A., Rambaut, A., Robertson, D.L., 2020. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. *Nat. Microbiol.* 5, 1408-1417.

Brône, B., Eggermont, J., 2005. PDZ proteins retain and regulate membrane transporters in polarized epithelial cell membranes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288, C20-C29.

Brown, E.L., Essigmann, H.T., 2021. Original Antigenic Sin: the Downside of Immunological Memory and Implications for COVID-19. *mSphere* 6, e00056-21.

Cai, Y., Zhang, J., Xiao, T., Lavine, C.L., Rawson, S., Peng, H., Zhu, H., Anand, K., Tong, P., Gautam, A., Lu, S., Sterling, S.M., Walsh, R.M., Jr., Rits-Volloch, S., Lu, J., Wesemann, D.R., Yang, W., Seaman, M.S., Chen, B., 2021. Structural basis for enhanced infectivity and immune evasion of SARS-CoV-2 variants. *Science* 373, 642-648.

Caillet-Saguy, C., Durbesson, F., Rezelj, V.V., Gogl, G., Tran, Q.D., Twizere, J.C., Vignuzzi, M., Vincentelli, R., Wolff, N., 2021. Host PDZ-containing proteins targeted by SARS-CoV-2. *FEBS J.* 288, 5148-5162.

Callaway, E., 2022a. Are COVID surges becoming more predictable? New Omicron variants offer a hint. *Nature* 605, 204-206.

Callaway, E., 2022b. COVID ‘variant soup’ is making winter surges hard to predict. *Nature* 611, 213-214.

Cameron, M.J., Ran, L., Xu, L., Danesh, A., Bermejo-Martin, J.F., Cameron, C.M., Muller, M.P., Gold, W.L., Richardson, S.E., Poutanen, S.M., Willey, B.M., DeVries, M.E., Fang, Y., Seneviratne, C., Bosinger, S.E., Persad, D., Wilkinson, P., Greller, L.D., Somogyi, R., Humar, A., Keshavjee, S., Louie, M., Loeb, M.B., Brunton, J., McGeer, A.J., Kelvin, D.J., 2007. Interferon-mediated immunopathological events are associated with atypical innate and adaptive immune responses in patients with severe acute respiratory syndrome. *J. Virol.* 81, 8692-8706.

Cao, B., Wang, Y., Wen, D., Liu, W., Wang, J., Fan, G., Ruan, L., Song, B., Cai, Y., Wei, M., Li, X., Xia, J., Chen, N., Xiang, J., Yu, T., Bai, T., Xie, X., Zhang, L., Li, C., Yuan, Y., Chen, H., Li, H., Huang, H., Tu, S., Gong, F., Liu, Y., Wei, Y., Dong, C., Zhou, F., Gu, X., Xu, J., Liu, Z., Zhang, Y., Li, H., Shang, L., Wang, K., Li, K., Zhou, X., Dong, X., Qu, Z., Lu, S., Hu, X., Ruan, S., Luo, S., Wu, J., Peng, L., Cheng, F., Pan, L., Zou, J., Jia, C., Wang, J., Liu, X., Wang, S., Wu, X., Ge, Q., He, J., Zhan, H., Qiu, F., Guo, L., Huang, C., Jaki, T., Hayden,

F.G., Horby, P.W., Zhang, D., Wang, C., 2020. A Trial of Lopinavir-Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 382, 1787-1799.

Cao, Y., Yang, R., Lee, I., Zhang, W., Sun, J., Wang, W., Meng, X., 2021. Characterization of the SARS-CoV-2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors. *Protein Sci.* 30, 1114-1130.

Carstens, E.B., 2010. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Arch. Virol.* 155, 133-146.

Castano-Rodriguez, C., Honrubia, J.M., Gutierrez-Alvarez, J., DeDiego, M.L., Nieto-Torres, J.L., Jimenez-Guardeno, J.M., Regla-Nava, J.A., Fernandez-Delgado, R., Verdia-Baguena, C., Queralt-Martin, M., Kochan, G., Perlman, S., Aguilella, V.M., Sola, I., Enjuanes, L., 2018. Role of severe acute respiratory syndrome coronavirus viroporins E, 3a, and 8a in replication and pathogenesis. *mBio* 9, e2325-17.

Chemaitelly, H., Yassine, H.M., Benslimane, F.M., Al Khatib, H.A., Tang, P., Hasan, M.R., Malek, J.A., Coyle, P., Ayoub, H.H., Al Kanaani, Z., Al Kuwari, E., Jeremijenko, A., Kaleeckal, A.H., Latif, A.N., Shaik, R.M., Abdul Rahim, H.F., Nasrallah, G.K., Al Kuwari, M.G., Al Romaihi, H.E., Al-Thani, M.H., Al Khal, A., Butt, A.A., Bertolini, R., Abu-Raddad, L.J., 2021. mRNA-1273 COVID-19 vaccine effectiveness against the B.1.1.7 and B.1.351 variants and severe COVID-19 disease in Qatar. *Nat. Med.* 27, 1614-1621.

Chen, C.C., Kruger, J., Sramala, I., Hsu, H.J., Henklein, P., Chen, Y.M., Fischer, W.B., 2011. ORF8a of SARS-CoV forms an ion channel: experiments and molecular dynamics simulations. *Biochim. Biophys. Acta.* 1808, 572-579.

Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., Zhao, L., 2018. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9, 7204-7218.

Chen, T., Dai, Z., Mo, P., Li, X., Ma, Z., Song, S., Chen, X., Luo, M., Liang, K., Gao, S., Zhang, Y., Deng, L., Xiong, Y., 2020. Clinical Characteristics and Outcomes of Older Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Wuhan, China: A Single-Centered, Retrospective Study. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 75, 1788-1795.

Chu, D.K., Peiris, J.S., Chen, H., Guan, Y., Poon, L.L., 2008. Genomic characterizations of bat coronaviruses (1A, 1B and HKU8) and evidence for co-infections in *Miniopterus* bats. *J. Gen. Virol.* 89, 1282-1287.

Colman, P.M., Lawrence, M.C., 2003. The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 309-319.

Colombo, C., Alicandro, G., Daccó, V., Gagliano, V., Morlacchi, L.C., Casciaro, R., Pisi, G., Francalanci, M., Badolato, R., Bignamini, E., Messore, B., Lucanto, M.C., Leonetti, G., Maschio, M., Cipolli, M., 2021. SARS-CoV-2 infection in cystic fibrosis: A multicentre prospective study with a control group, Italy, February-July 2020. *PLoS One* 16, e0251527.

Corbett, K.S., Flynn, B., Foulds, K.E., Francica, J.R., Boyoglu-Barnum, S., Werner, A.P., Flach, B., O'Connell, S., Bock, K.W., Minai, M., Nagata, B.M., Andersen, H., Martinez, D.R., Noe, A.T., Douek, N., Donaldson, M.M., Nji, N.N., Alvarado, G.S., Edwards, D.K., Flebbe, D.R., Lamb, E., Doria-Rose, N.A., Lin, B.C., Louder, M.K., O'Dell, S., Schmidt, S.D., Phung, E., Chang, L.A., Yap, C., Todd, J.M., Pessant, L., Van Ry, A., Browne, S., Greenhouse, J., Putman-Taylor, T., Strasbaugh, A., Campbell, T.A., Cook, A., Dodson, A., Steingrebe, K., Shi, W., Zhang, Y., Abiona, O.M., Wang, L., Pegu, A., Yang, E.S., Leung, K., Zhou, T., Teng, I.T., Widge, A., Gordon, I., Novik, L., Gillespie, R.A., Loomis, R.J., Moliva, J.I., Stewart-Jones, G., Himansu, S., Kong, W.P., Nason, M.C., Morabito, K.M., Ruckwardt, T.J., Ledgerwood, J.E., Gaudinski, M.R., Kwong, P.D., Mascola, J.R., Carfi, A., Lewis, M.G., Baric, R.S., McDermott, A., Moore, I.N., Sullivan, N.J., Roederer, M., Seder, R.A., Graham, B.S., 2020. Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates. *N. Engl. J. Med.* 383, 1544-1555.

Corman, V.M., Ithete, N.L., Richards, L.R., Schoeman, M.C., Preiser, W., Drosten, C., Drexler, J.F., 2014. Rooting the phylogenetic tree of middle East respiratory syndrome coronavirus by characterization of a conspecific virus from an African bat. *J. Virol.* 88, 11297-11303.

Cosgriff, R., Ahern, S., Bell, S.C., Brownlee, K., Burgel, P.R., Byrnes, C., Corvol, H., Cheng, S.Y., Elbert, A., Faro, A., Goss, C.H., Gulmans, V., Marshall, B.C., McKone, E., Middleton, P.G., Ruseckaite, R., Stephenson, A.L., Carr, S.B., 2020. A multinational report to characterise SARS-CoV-2 infection in people with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 19, 355-358.

Coutard, B., Valle, C., de Lamballerie, X., Canard, B., Seidah, N.G., Decroly, E., 2020. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res.* 176, 104742.

Cui, J., Li, F., Shi, Z.L., 2019. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 181-192.

Davies, N.G., Klepac, P., Liu, Y., Prem, K., Jit, M., group, C.C.-w., Eggo, R.M., 2020. Age-dependent effects in the transmission and control of COVID-19 epidemics. *Nat. Med.* 26, 1205-1211.

de Groot, R.J., Baker, S.C., Baric, R., Enjuanes, L., Gorbalyena, A.E., Holmes, K.V., Perlman, S., Poon, L., Rottier, P.J.M., Talbot, P.J., Woo, P.C.Y., Ziebuhr, J., 2012. Family Coronaviridae, in: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, First Edition ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 806-828.

de Groot, R.J., Baker, S.C., Baric, R.S., Brown, C.S., Drosten, C., Enjuanes, L., Fouchier, R.A., Galiano, M., Gorbalyena, A.E., Memish, Z.A., Perlman, S., Poon, L.L., Snijder, E.J., Stephens, G.M., Woo, P.C., Zaki, A.M., Zambon, M., Ziebuhr, J., 2013. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J. Virol.* 87, 7790-7792.

de Haan, C.A., Hajema, B.J., Schellen, P., Wichgers Schreur, P., te Lintelo, E., Vennema, H., Rottier, P.J., 2008. Cleavage of group 1 coronavirus spike proteins: how furin cleavage is traded off against heparan sulfate binding upon cell culture adaptation. *J. Virol.* 82, 6078-6083.

de Jong, A.S., Visch, H.J., de Mattia, F., van Dommelen, M.M., Swarts, H.G., Luyten, T., Callewaert, G., Melchers, W.J., Willems, P.H., van Kuppeveld, F.J., 2006. The coxsackievirus 2B protein increases efflux of ions from the endoplasmic reticulum and Golgi, thereby inhibiting protein trafficking through the Golgi. *J. Biol. Chem.* 281, 14144-14150.

de Wilde, A.H., Ray, V.S., Oudshoorn, D., Bestebroer, T.M., van Nieuwkoop, S., Limpens, R.W., Posthuma, C.C., van der Meer, Y., Barcena, M., Haagmans, B.L., Snijder, E.J., van den Hoogen, B.G., 2013. MERS-coronavirus replication induces severe in vitro cytopathology and is strongly inhibited by cyclosporin A or interferon-alpha treatment. *J. Gen. Virol.* 94, 1749-1760.

de Wit, E., Rasmussen, A.L., Falzarano, D., Bushmaker, T., Feldmann, F., Brining, D.L., Fischer, E.R., Martellaro, C., Okumura, A., Chang, J., Scott, D., Benecke, A.G., Katze, M.G., Feldmann, H., Munster, V.J., 2013. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) causes transient lower respiratory tract infection in rhesus macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 16598-16603.

de Wit, E., van Doremalen, N., Falzarano, D., Munster, V.J., 2016. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 523-534.

DeDiego, M.L., Nieto-Torres, J.L., Regla-Nava, J.A., Jimenez-Guardeño, J.M., Fernandez-Delgado, R., Fett, C., Castaño-Rodriguez, C., Perlman, S., Enjuanes, L., 2014. Inhibition of NF-kappaB mediated inflammation in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected mice increases survival. *J. Virol.* 88, 913-924.

Denison, M.R., Graham, R.L., Donaldson, E.F., Eckerle, L.D., Baric, R.S., 2011. Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. *RNA Biol.* 8, 270-279.

Drexler, J.F., Gloza-Rausch, F., Glende, J., Corman, V.M., Muth, D., Goettsche, M., Seebens, A., Niedrig, M., Pfefferle, S., Yordanov, S., Zhelyazkov, L., Hermanns, U., Vallo, P., Lukashev, A., Muller, M.A., Deng, H., Herrler, G., Drosten, C., 2010. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J. Virol.* 84, 11336-11349.

Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R.A., Berger, A., Burguiere, A.M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.C., Muller, S., Rickerts, V., Sturmer, M., Vieth, S., Klenk, H.D., Osterhaus, A.D., Schmitz, H., Doerr, H.W., 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348, 1967-1976.

Dumasius, V., Sznajder, J.I., Azzam, Z.S., Boja, J., Mutlu, G.M., Maron, M.B., Factor, P., 2001. beta(2)-adrenergic receptor overexpression increases alveolar fluid clearance and responsiveness to endogenous catecholamines in rats. *Circ. Res.* 89, 907-914.

Eckerle, L.D., Becker, M.M., Halpin, R.A., Li, K., Venter, E., Lu, X., Scherbakova, S., Graham, R.L., Baric, R.S., Stockwell, T.B., Spiro, D.J., Denison, M.R., 2010. Infidelity of SARS-CoV nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog.* 6, e1000896.

Eckerle, L.D., Brockway, S.M., Sperry, S.M., Lu, X., Denison, M.R., 2006. Effects of mutagenesis of murine hepatitis virus nsp1 and nsp14 on replication in culture. *Adv. Exp. Med. Biol.* 581, 55-60.

Eckerle, L.D., Lu, X., Sperry, S.M., Choi, L., Denison, M.R., 2007. High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in nsp14 exoribonuclease mutants. *J. Virol.* 81, 12135-12144.

Enjuanes, L., Almazan, F., Sola, I., Zuñiga, S., 2006. Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interaction. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 211-230.

Enjuanes, L., Gorbalyena, A.E., de Groot, R.J., Cowley, J.A., Ziebuhr, J., Snijder, E.J., 2008. The Nidovirales, in: Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M., Walker, P., Majumder-Russell, D. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, Third Edition. Elsevier Ltd., Oxford, pp. 419-430.

Ewart, G.D., Sutherland, T., Gage, P.W., Cox, G.B., 1996. The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. *J. Virol.* 70, 7108-7115.

Falcon, A., Vazquez-Moron, S., Casas, I., Aznar, C., Ruiz, G., Pozo, F., Perez-Brena, P., Juste, J., Ibanez, C., Garin, I., Aihartza, J., Echevarria, J.E., 2011. Detection of alpha and betacoronaviruses in multiple Iberian bat species. *Arch. Virol.* 156, 1883-1890.

Fett, C., DeDiego, M.L., Regla-Nava, J.A., Enjuanes, L., Perlman, S., 2013. Complete protection against severe acute respiratory syndrome coronavirus-mediated lethal respiratory disease in aged mice by immunization with a mouse-adapted virus lacking E protein. *J. Virol.* 87, 6551-6559.

Fouchier, R.A., Hartwig, N.G., Bestebroer, T.M., Niemeyer, B., de Jong, J.C., Simon, J.H., Osterhaus, A.D., 2004. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 6212621-6212626.

Galani, I.E., Rovina, N., Lampropoulou, V., Triantafyllia, V., Manioudaki, M., Pavlos, E., Koukaki, E., Fragkou, P.C., Panou, V., Rapti, V., Koltsida, O., Mentis, A., Koulouris, N., Tsiodras, S., Koutsoukou, A., Andreakos, E., 2021. Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison. *Nat. Immunol.* 22, 32-40.

Gallaher, W.R., 2020. A palindromic RNA sequence as a common breakpoint contributor to copy-choice recombination in SARS-CoV-2. *Arch. Virol.* 165, 2341-2348.

Gallardo, R., Ivarsson, Y., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Zimmermann, P., 2010. Structural diversity of PDZ-lipid interactions. *Chembiochem* 11, 456-467.

Garbino, J., Crespo, S., Aubert, J.D., Rochat, T., Ninet, B., Deffernez, C., Wunderli, W., Pache, J.C., Soccia, P.M., Kaiser, L., 2006. A

prospective hospital-based study of the clinical impact of non-severe acute respiratory syndrome (Non-SARS)-related human coronavirus infection. *Clin. Infect. Dis.* 43, 1009-1015.

Gerek, Z.N., Keskin, O., Ozkan, S.B., 2009. Identification of specificity and promiscuity of PDZ domain interactions through their dynamic behavior. *Proteins* 77, 796-811.

Giacomelli, A., Pezzati, L., Conti, F., Bernacchia, D., Siano, M., Oreni, L., Rusconi, S., Gervasoni, C., Ridolfo, A.L., Rizzardini, G., Antinori, S., Galli, M., 2020. Self-reported Olfactory and Taste Disorders in Patients With Severe Acute Respiratory Coronavirus 2 Infection: A Cross-sectional Study. *Clin. Infect. Dis.* 71, 889-890.

Gombold, J.L., Hingley, S.T., Weiss, S.R., 1993. Fusion-defective mutants of mouse hepatitis virus A59 contain a mutation in the spike protein cleavage signal. *J. Virol.* 67, 4504-4512.

Gorbalenya, A.E., Baker, S.C., Baric, R.S., de Groot, R.J., Drosten, C., Gulyaeva, A.A., Haagmans, B.I., Lauber, C., Leontovich, A.M., Neuman, B.W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L.I.M., Samborskiy, D.V., Sidorov, I.A., Sola, I., Ziebuhr, J., Viruses, C.S.G.o.t.I.C.o.T.o., 2020a. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 5, 536-544.

Gorbalenya, A.E., ICTV, Commitee, 2020b. The new scope of virus taxonomy: partitioning the virosphere into 15 hierarchical ranks. *Nat. Microbiol.* 5, 668-674.

Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P., Blinov, V.M., 1989. Coronavirus genome: prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 17, 4847-4861.

Gorse, G.J., O'Connor, T.Z., Hall, S.L., Vitale, J.N., Nichol, K.L., 2009. Human coronavirus and acute respiratory illness in older adults with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Infect. Dis.* 199, 847-857.

Graham, R.L., Donaldson, E.F., Baric, R.S., 2013. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 836-848.

Grifoni, A., Weiskopf, D., Ramirez, S.I., Mateus, J., Dan, J.M., Moderbacher, C.R., Rawlings, S.A., Sutherland, A., Premkumar, L., Jadi, R.S., Marrama, D., de Silva, A.M., Frazier, A., Carlin, A.F., Greenbaum, J.A., Peters, B., Krammer, F., Smith, D.M., Crotty, S., Sette, A., 2020. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2

Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell* 181, 1489-1501.

Gu, J., Korteweg, C., 2007. Pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Am. J. Pathol.* 170, 1136-1147.

Guan, W.J., Ni, Z.Y., Hu, Y., Liang, W.H., Ou, C.Q., He, J.X., Liu, L., Shan, H., Lei, C.L., Hui, D.S.C., Du, B., Li, L.J., Zeng, G., Yuen, K.Y., Chen, R.C., Tang, C.L., Wang, T., Chen, P.Y., Xiang, J., Li, S.Y., Wang, J.L., Liang, Z.J., Peng, Y.X., Wei, L., Liu, Y., Hu, Y.H., Peng, P., Wang, J.M., Liu, J.Y., Chen, Z., Li, G., Zheng, Z.J., Qiu, S.Q., Luo, J., Ye, C.J., Zhu, S.Y., Zhong, N.S., China Medical Treatment Expert Group for, C., 2020. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* 382, 1708-1720.

Guan, Y., Zheng, B.J., He, Y.Q., Liu, X.L., Zhuang, Z.X., Cheung, C.L., Luo, S.W., Li, P.H., Zhang, L.J., Guan, Y.J., Butt, K.M., Wong, K.L., Chan, K.W., Lim, W., Shortridge, K.F., Yuen, K.Y., Peiris, J.S., Poon, L.L., 2003. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* 302, 276-278.

Guggino, W.B., 2004. The cystic fibrosis transmembrane regulator forms macromolecular complexes with PDZ domain scaffold proteins. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1, 28-32.

Guggino, W.B., Stanton, B.A., 2006. New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 426-436.

Gutiérrez-Álvarez, J., Honrubia, J.M., Sanz-Bravo, A., González-Miranda, E., Fernández-Delgado, R., Rejas, M.T., Zúñiga, S., Sola, I., Enjuanes, L., 2021. Middle East respiratory syndrome coronavirus vaccine based on a propagation-defective RNA replicon elicited sterilizing immunity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 118, e2111075118.

Hadjadj, J., Yatim, N., Barnabei, L., Corneau, A., Boussier, J., Smith, N., Pere, H., Charbit, B., Bondet, V., Chenevier-Gobeaux, C., Breillat, P., Carlier, N., Gauzit, R., Morbieu, C., Pene, F., Marin, N., Roche, N., Szwebel, T.A., Merkling, S.H., Treluyer, J.M., Veyer, D., Mouthon, L., Blanc, C., Tharaux, P.L., Rozenberg, F., Fischer, A., Duffy, D., Rieux-Lauca, F., Kerneis, S., Terrier, B., 2020. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* 369, 718-724.

Hamilton, G., 2006. Virology: the gene weavers. *Nature* 441, 683-685.

Hamre, D., Procknow, J.J., 1966. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 121, 190-193.

Harlem Brundtland, G., As Sy, E., 2020. Global Preparedness Monitoring Board. A World in Disorder, p. <https://apps.who.int/gpmb/>.

Hassan, A.O., Kafai, N.M., Dmitriev, I.P., Fox, J.M., Smith, B.K., Harvey, I.B., Chen, R.E., Winkler, E.S., Wessel, A.W., Case, J.B., Kashentseva, E., McCune, B.T., Bailey, A.L., Zhao, H., VanBlargan, L.A., Dai, Y.N., Ma, M., Adams, L.J., Shrihari, S., Danis, J.E., Gralinski, L.E., Hou, Y.J., Schäfer, A., Kim, A.S., Keeler, S.P., Weiskopf, D., Baric, R.S., Holtzman, M.J., Fremont, D.H., Curiel, D.T., Diamond, M.S., 2020. A Single-Dose Intranasal ChAd Vaccine Protects Upper and Lower Respiratory Tracts against SARS-CoV-2. *Cell* 183, 169-184.

He, P., Liu, B., Gao, X., Yan, Q., Pei, R., Sun, J., Chen, Q., Hou, R., Li, Z., Zhang, Y., Zhao, J., Sun, H., Feng, B., Wang, Q., Yi, H., Hu, P., Li, P., Zhang, Y., Chen, Z., Niu, X., Zhong, X., Jin, L., Liu, X., Qu, K., Ciazznska, K.A., Carter, A.P., Briggs, J.A.G., Chen, J., Liu, J., Chen, X., He, J., Chen, L., Xiong, X., 2022. SARS-CoV-2 Delta and Omicron variants evade population antibody response by mutations in a single spike epitope. *Nat. Microbiol.* 7, 1635-1649.

Henkel, M., Mitzner, D., Henklein, P., Meyer-Almes, F.J., Moroni, A., Difrancesco, M.L., Henkes, L.M., Kreim, M., Kast, S.M., Schubert, U., Thiel, G., 2010. The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 forms a nonselective ion channel. *PLoS One* 5, e11112.

Hillier, B.J., Christopherson, K.S., Prehoda, K.E., Bredt, D.S., Lim, W.A., 1999. Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science* 284, 812-815.

Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Pohlmann, S., 2020. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol. Cell* 78, 779-784.

Holmes, E.C., Goldstein, S.A., Rasmussen, A.L., Robertson, D.L., Crits-Christoph, A., Wertheim, J.O., Anthony, S.J., Barclay, W.S., Boni, M.F., Doherty, P.C., Farrar, J., Geoghegan, J.L., Jiang, X., Leibowitz, J.L., Neil, S.J.D., Skern, T., Weiss, S.R., Worobey, M., Andersen, K.G., Garry, R.F., Rambaut, A., 2021. The origins of SARS-CoV-2: A critical review. *Cell* 184, 4848-4856.

Honrubia, J.M., Gutierrez-Alvarez, J., Sanz-Bravo, A., Gonzalez-Miranda, E., Munoz-Santos, D., Castano-Rodriguez, C., Wang, L., Villarejo-Torres, M., Ripoll-Gomez, J., Esteban, A., Fernandez-Delgado, R., Sanchez-Cordon, P.J., Oliveros, J.C., Perlman, S.,

McCray, P.B., Jr., Sola, I., Enjuanes, L., 2023a. SARS-CoV-2-Mediated Lung Edema and Replication Are Diminished by Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Modulators. *mBio* 14, e0313622.

Honrubia, J.M., Valverde, J.R., Muñoz-Santos, D., Castaño-Rodríguez, C., Ripoll-Gómez, J., de la Blanca, N., Izquierdo, J., Zuñiga, S., Sola, I., Enjuanes, L., 2023b. Structure of the interaction between SARS-CoV PBM and cellular PDZ domains leading to virus virulence. Submitted.

Hu, B., Zeng, L.P., Yang, X.L., Ge, X.Y., Zhang, W., Li, B., Xie, J.Z., Shen, X.R., Zhang, Y.Z., Wang, N., Luo, D.S., Zheng, X.S., Wang, M.N., Daszak, P., Wang, L.F., Cui, J., Shi, Z.L., 2017. Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLoS Pathog.* 13, e1006698.

Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Xiao, Y., Gao, H., Guo, L., Xie, J., Wang, G., Jiang, R., Gao, Z., Jin, Q., Wang, J., Cao, B., 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395, 497-506.

Hung, A.Y., Sheng, M., 2002. PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J. Biol. Chem.* 277, 5699-5702.

Islam, A., Ferdous, J., Islam, S., Sayeed, M.A., Rahman, M.K., Saha, O., Hassan, M.M., Shirin, T., 2022. Transmission dynamics and susceptibility patterns of SARS-CoV-2 in domestic, farmed and wild animals: Sustainable One Health surveillance for conservation and public health to prevent future epidemics and pandemics. *Transbound. Emerg. Dis.* 69, 2523-2543.

Jackson, L.A., Anderson, E.J., Roush, N.G., Roberts, P.C., Makhene, M., Coler, R.N., McCullough, M.P., Chappell, J.D., Denison, M.R., Stevens, L.J., Pruijssers, A.J., McDermott, A., Flach, B., Doria-Rose, N.A., Corbett, K.S., Morabito, K.M., O'Dell, S., Schmidt, S.D., Swanson, P.A., 2nd, Padilla, M., Mascola, J.R., Neuzil, K.M., Bennett, H., Sun, W., Peters, E., Makowski, M., Albert, J., Cross, K., Buchanan, W., Pikaart-Tautges, R., Ledgerwood, J.E., Graham, B.S., Beigel, J.H., 2020. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report. *N. Engl. J. Med.* 383, 1920-1931.

Jacobs, L., Van der Zeijst, B.A.M., Horzinek, M., 1986. Characterization and translation of transmissible gastroenteritis virus mRNAs. *J. Virol.* 57, 1010-1015.

James, C.D., Roberts, S., 2016. Viral Interactions with PDZ domain-containing proteins-an oncogenic trait? *Pathogens* 5, 8.

Jarosz-Griffiths, H.H., Scambler, T., Wong, C.H., Lara-Reyna, S., Holbrook, J., Martinon, F., Savic, S., Whitaker, P., Etherington, C., Spoletini, G., Clifton, I., Mehta, A., McDermott, M.F., Peckham, D., 2020. Different CFTR modulator combinations downregulate inflammation differently in cystic fibrosis. *Elife* 9, e54556.

Javier, R.T., Rice, A.P., 2011. Emerging theme: cellular PDZ proteins as common targets of pathogenic viruses. *J. Virol.* 85, 11544-11556.

Ji, H.L., Chalfant, M.L., Jovov, B., Lockhart, J.P., Parker, S.B., Fuller, C.M., Stanton, B.A., Benos, D.J., 2000. The cytosolic termini of the beta- and gamma-ENaC subunits are involved in the functional interactions between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and epithelial sodium channel. *J. Biol. Chem.* 275, 27947-27956.

Jiang, Q., Li, J., Dubroff, R., Ahn, Y.J., Foskett, J.K., Engelhardt, J., Kleyman, T.R., 2000. Epithelial sodium channels regulate cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 275, 13266-13274.

Jimenez-Guardeno, J.M., Regla-Nava, J.A., Nieto-Torres, J.L., DeDiego, M.L., Castano-Rodriguez, C., Fernandez-Delgado, R., Perlman, S., Enjuanes, L., 2015. Identification of the mechanisms causing reversion to virulence in an attenuated SARS-CoV for the design of a genetically stable vaccine. *PLoS Pathog.* 11, e1005215.

Jimenez-Guardeno, J.M., Nieto-Torres, J.L., DeDiego, M.L., Regla-Nava, J.A., Fernandez-Delgado, R., Castaño-Rodriguez, C., Enjuanes, L., 2014. The PDZ-binding motif of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein Is a determinant of viral pathogenesis. *PLoS Pathog.* 10, e1004320.

Johnson, B.A., Xie, X., Bailey, A.L., Kalveram, B., Lokugamage, K.G., Muruato, A., Zou, J., Zhang, X., Juelich, T., Smith, J.K., Zhang, L., Bopp, N., Schindewolf, C., Vu, M., Vanderheiden, A., Winkler, E.S., Swetnam, D., Plante, J.A., Aguilar, P., Plante, K.S., Popov, V., Lee, B., Weaver, S.C., Suthar, M.S., Routh, A.L., Ren, P., Ku, Z., An, Z., Debbink, K., Diamond, M.S., Shi, P.Y., Freiberg, A.N., Menachery, V.D., 2021. Loss of furin cleavage site attenuates SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature* 591, 293-299.

Jungreis, I., Sealfon, R., Kellis, M., 2020. SARS-CoV-2 gene content and COVID-19 mutation impact by comparing 44 Sarbecovirus genomes. *Nat. Commun.* 12, 2642.

Kan, B., Wang, M., Jing, H., Xu, H., Jiang, X., Yan, M., Liang, W., Zheng, H., Wan, K., Liu, Q., Cui, B., Xu, Y., Zhang, E., Wang, H., Ye, J., Li, G., Li, M., Cui, Z., Qi, X., Chen, K., Du, L., Gao, K., Zhao, Y.T., Zou, X.Z., Feng, Y.J., Gao, Y.F., Hai, R., Yu, D., Guan, Y., Xu, J., 2005. Molecular evolution analysis and geographic investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms. *J. Virol.* 79, 11892-11900.

Katsura, H., Sontake, V., Tata, A., Kobayashi, Y., Edwards, C.E., Heaton, B.E., Konkimalla, A., Asakura, T., Mikami, Y., Fritch, E.J., Lee, P.J., Heaton, N.S., Boucher, R.C., Randell, S.H., Baric, R.S., Tata, P.R., 2020. Human Lung Stem Cell-Based Alveolospheres Provide Insights into SARS-CoV-2-Mediated Interferon Responses and Pneumocyte Dysfunction. *Cell Stem Cell* 27, 890-904.

Kirchdoerfer, R.N., Cottrell, C.A., Wang, N., Pallesen, J., Yassine, H.M., Turner, H.L., Corbett, K.S., Graham, B.S., McLellan, J.S., Ward, A.B., 2016. Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature* 531, 118-121.

Korber, B., Fischer, W.M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., Abfalterer, W., Hengartner, N., Giorgi, E.E., Bhattacharya, T., Foley, B., Hastie, K.M., Parker, M.D., Partridge, D.G., Evans, C.M., Freeman, T.M., de Silva, T.I., Sheffield, C.-G.G., McDanal, C., Perez, L.G., Tang, H., Moon-Walker, A., Whelan, S.P., LaBranche, C.C., Saphire, E.O., Montefiori, D.C., 2020. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell* 182, 812-827.

Kuo, L., Hurst, K.R., Masters, P.S., 2006. Exceptional flexibility in the sequence requirements for coronavirus small envelope protein (E) function. *J. Virol.* 81, 2249-2262.

Kuzmina, A., Khalaila, Y., Voloshin, O., Keren-Naus, A., Boehm-Cohen, L., Raviv, Y., Shemer-Avni, Y., Rosenberg, E., Taube, R., 2021. SARS-CoV-2 spike variants exhibit differential infectivity and neutralization resistance to convalescent or post-vaccination sera. *Cell Host Microbe* 29, 522-528.

Lara-Reyna, S., Holbrook, J., Jarosz-Griffiths, H.H., Peckham, D., McDermott, M.F., 2020. Dysregulated signalling pathways in innate immune cells with cystic fibrosis mutations. *Cell Mol. Life Sci.* 77, 4485-4503.

Lau, S.K., Woo, P.C., Li, K.S., Huang, Y., Tsoi, H.W., Wong, B.H., Wong, S.S., Leung, S.Y., Chan, K.H., Yuen, K.Y., 2005. Severe acute

respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 14040-14045.

Le Bert, N., Tan, A.T., Kunasegaran, K., Tham, C.Y.L., Hafezi, M., Chia, A., Chng, M.H.Y., Lin, M., Tan, N., Linster, M., Chia, W.N., Chen, M.I., Wang, L.F., Ooi, E.E., Kalimuddin, S., Tambyah, P.A., Low, J.G., Tan, Y.J., Bertoletti, A., 2020. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. Nature 584, 457-462.

Lee, S., Yoon, G.Y., Myoung, J., Kim, S.J., Ahn, D.G., 2020. Robust and persistent SARS-CoV-2 infection in the human intestinal brush border expressing cells. Emerg. Microbes Infect. 9, 2169-2179.

Lei, X., Dong, X., Ma, R., Wang, W., Xiao, X., Tian, Z., Wang, C., Wang, Y., Li, L., Ren, L., Guo, F., Zhao, Z., Zhou, Z., Xiang, Z., Wang, J., 2020. Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. Nat. Commun. 11, 3810.

Lenfant, N., Polanowska, J., Bamps, S., Omi, S., Borg, J.P., Reboul, J., 2010. A genome-wide study of PDZ-domain interactions in *C. elegans* reveals a high frequency of non-canonical binding. BMC Genomics 11, 671.

Li, L.L., Wang, J.L., Ma, X.H., Sun, X.M., Li, J.S., Yang, X.F., Shi, W.F., Duan, Z.J., 2021. A novel SARS-CoV-2 related coronavirus with complex recombination isolated from bats in Yunnan province, China. Emerg. Microbes Infect. 10, 1683-1690.

Li, Q., Guan, X., Wu, P., Wang, X., Zhou, L., Tong, Y., Ren, R., Leung, K.S.M., Lau, E.H.Y., Wong, J.Y., Xing, X., Xiang, N., Wu, Y., Li, C., Chen, Q., Li, D., Liu, T., Zhao, J., Liu, M., Tu, W., Chen, C., Jin, L., Yang, R., Wang, Q., Zhou, S., Wang, R., Liu, H., Luo, Y., Liu, Y., Shao, G., Li, H., Tao, Z., Yang, Y., Deng, Z., Liu, B., Ma, Z., Zhang, Y., Shi, G., Lam, T.T.Y., Wu, J.T., Gao, G.F., Cowling, B.J., Yang, B., Leung, G.M., Feng, Z., 2020. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. N. Engl. J. Med. 382, 1199-1207.

Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J.H., Wang, H., Crameri, G., Hu, Z., Zhang, H., Zhang, J., McEachern, J., Field, H., Daszak, P., Eaton, B.T., Zhang, S., Wang, L.F., 2005. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. Science 310, 676-679.

Li, X., Vargas Buonfiglio, L.G., Adam, R.J., Stoltz, D.A., Zabner, J., Comellas, A.P., 2017. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Potentiation as a Therapeutic Strategy for Pulmonary

Edema: A Proof-of-Concept Study in Pigs. *Crit. Care Med.* 45, e1240-e1246.

Liao, Y., Lescar, J., Tam, J.P., Liu, D.X., 2004. Expression of SARS-coronavirus envelope protein in *Escherichia coli* cells alters membrane permeability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 374-380.

Lim, Y.X., Ng, Y.L., Tam, J.P., Liu, D.X., 2016. Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions. *Diseases* 4, 26.

Liu, H., Golebiewski, L., Dow, E.C., Krug, R.M., Javier, R.T., Rice, A.P., 2010. The ESEV PDZ-binding motif of the avian influenza A virus NS1 protein protects infected cells from apoptosis by directly targeting Scribble. *J. Virol.* 84, 11164-11174.

Liu, W.J., Liu, P., Lei, W., Jia, Z., He, X., Shi, W., Tan, Y., Zou, S., Wong, G., Wang, J., Wang, F., Wang, G., Qin, K., Gao, R., Zhang, J., Li, M., Xiao, W., Guo, Y., Xu, Z., Zhao, Y., Song, J., Zhang, J., Zhen, W., Zhou, W., Ye, B., Song, J., Yang, M., Zhou, W., Dai, Y., Lu, G., Bi, Y., Tan, W., Han, J., Gao, G.F., Wu, G., 2023. Surveillance of SARS-CoV-2 at the Huanan Seafood Market. *Nature*, <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06043-2>.

Liu, Y., Liu, J., Plante, K.S., Plante, J.A., Xie, X., Zhang, X., Ku, Z., An, Z., Scharton, D., Schindewolf, C., Widen, S.G., Menachery, V.D., Shi, P.Y., Weaver, S.C., 2022. The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 infection and transmission. *Nature* 602, 294-299.

Logunov, D.Y., Dolzhikova, I.V., Zubkova, O.V., Tukhvatullin, A.I., Shcheglyakov, D.V., Dzharullaeva, A.S., Groussova, D.M., Erokhova, A.S., Kovyrshina, A.V., Botikov, A.G., Izhaeva, F.M., Popova, O., Ozharovskaya, T.A., Esmagambetov, I.B., Favorskaya, I.A., Zrelkin, D.I., Voronina, D.V., Shcherbinin, D.N., Semikhin, A.S., Simakova, Y.V., Tokarskaya, E.A., Lubenets, N.L., Egorova, D.A., Shmarov, M.M., Nikitenko, N.A., Morozova, L.F., Smolyarchuk, E.A., Kryukov, E.V., Babira, V.F., Borisevich, S.V., Naroditsky, B.S., Gintsburg, A.L., 2020. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet* 396, 887-897.

Lokugamage, K.G., Hage, A., de Vries, M., Valero-Jimenez, A.M., Schindewolf, C., Dittmann, M., Rajsbaum, R., Menachery, V.D., 2020. Type I Interferon susceptibility distinguishes SARS-CoV-2 from SARS-CoV. *J. Virol.* 94, e01410-01420.

Lu, W., Zheng, B.J., Xu, K., Schwarz, W., Du, L., Wong, C.K., Chen, J., Duan, S., Deubel, V., Sun, B., 2006. Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus 3a protein forms an ion channel and modulates virus release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 12540-12545.

Lucas, C., Wong, P., Klein, J., Castro, T.B.R., Silva, J., Sundaram, M., Ellingson, M.K., Mao, T., Oh, J.E., Israelow, B., Takahashi, T., Tokuyama, M., Lu, P., Venkataraman, A., Park, A., Mohanty, S., Wang, H., Wyllie, A.L., Vogels, C.B.F., Earnest, R., Lapidus, S., Ott, I.M., Moore, A.J., Muenker, M.C., Fournier, J.B., Campbell, M., Odio, C.D., Casanovas-Massana, A., Herbst, R., Shaw, A.C., Medzhitov, R., Schulz, W.L., Grubaugh, N.D., Dela Cruz, C., Farhadian, S., Ko, A.I., Omer, S.B., Iwasaki, A., 2020. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature* 584, 463-469.

Luck, K., Charbonnier, S., Trave, G., 2012. The emerging contribution of sequence context to the specificity of protein interactions mediated by PDZ domains. *FEBS Lett.* 586, 2648-2661.

Lytras, S., Hughes, J., Martin, D., Swanepoel, P., de Klerk, A., Lourens, R., Kosakovsky Pond, S.L., Xia, W., Jiang, X., Robertson, D.L., 2022. Exploring the Natural Origins of SARS-CoV-2 in the Light of Recombination. *Genome Biol. Evol.* 14, evac018.

Marchena-Pasero, A., Rueda-Huélamo, M., Villarejo-Torres, M., Ripoll-Gómez, J., Muñoz, D., Zúñiga, S., Sola, I., L., E., 2023. Attenuated SARS-CoV-2 vaccine candidate based on nsp1 deletions. In preparation.

Masters, P.S., 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 66, 193-292.

Mateos-Gomez, P.A., Morales, L., Zuñiga, S., Enjuanes, L., Sola, I., 2013. Long-distance RNA-RNA interactions in the coronavirus genome form high-order structures promoting discontinuous RNA synthesis during transcription. *J. Virol.* 87, 177-186.

Mateos-Gomez, P.A., Zuñiga, S., Palacio, L., Enjuanes, L., Sola, I., 2011. Gene N proximal and distal RNA motifs regulate coronavirus nucleocapsid mRNA transcription. *J. Virol.* 85, 8968-8980.

Mathew, D., Giles, J.R., Baxter, A.E., Oldridge, D.A., Greenplate, A.R., Wu, J.E., Alanio, C., Kuri-Cervantes, L., Pampena, M.B., D'Andrea, K., Manne, S., Chen, Z., Huang, Y.J., Reilly, J.P., Weisman, A.R., Ittner, C.A.G., Kuthuru, O., Dougherty, J., Nzingha, K., Han, N., Kim, J., Pattekar, A., Goodwin, E.C., Anderson, E.M., Weirick,

M.E., Gouma, S., Arevalo, C.P., Bolton, M.J., Chen, F., Lacey, S.F., Ramage, H., Cherry, S., Hensley, S.E., Apostolidis, S.A., Huang, A.C., Vella, L.A., Unit, U.P.C.P., Betts, M.R., Meyer, N.J., Wherry, E.J., 2020. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science* 369, eabc8511.

Matthay, M.A., 2014. Resolution of pulmonary edema. Thirty years of progress. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 1301-1308.

McClenaghan, C., Hanson, A., Lee, S.J., Nichols, C.G., 2020. Coronavirus Proteins as Ion Channels: Current and Potential Research. *Front. Immunol.* 11, 573339.

McCray, P.B., Jr., Pewe, L., Wohlford-Lenane, C., Hickey, M., Manzel, L., Shi, L., Netland, J., Jia, H.P., Halabi, C., Sigmund, C.D., Meyerholz, D.K., Kirby, P., Look, D.C., Perlman, S., 2007. Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 81, 813-821.

McIntosh, K., Kapikian, A.Z., Hardison, K.A., Hartley, J.W., Chanock, R.M., 1969. Antigenic relationships among the coronaviruses of man and between human and animal coronaviruses. *J. Immunol.* 102, 1109-1118.

Medina, E., Lemmers, C., Lane-Guermontprez, L., Le Bivic, A., 2002. Role of the Crumbs complex in the regulation of junction formation in *Drosophila* and mammalian epithelial cells. *Biol. Cell* 94, 305-313.

Menachery, V.D., Yount, B.L., Jr., Debbink, K., Agnihothram, S., Gralinski, L.E., Plante, J.A., Graham, R.L., Scobey, T., Ge, X.Y., Donaldson, E.F., Randell, S.H., Lanzavecchia, A., Marasco, W.A., Shi, Z.L., Baric, R.S., 2015. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat. Med.* 21, 1508-1513.

Mendez, A., Smerdou, C., Izeta, A., Gebauer, F., Enjuanes, L., 1996. Molecular characterization of transmissible gastroenteritis coronavirus defective interfering genomes: packaging and heterogeneity. *Virology* 217, 495-507.

Mesa, N., 2022. Multiple Possible Causes of Long COVID Come into Focus. *The Scientific*, September 28th, 2022.

Miller, J., Hachmann, N.P., Collier, A.Y., Lasrado, N., Mazurek, C.R., Patio, R.C., Powers, O., Surve, N., Theiler, J., Korber, B., Barouch, D.H., 2023. Substantial Neutralization Escape by SARS-CoV-2 Omicron Variants BQ.1.1 and XBB.1. *N. Engl. J. Med.* 388, 662-664.

Miorin, L., Kehrer, T., Sanchez-Aparicio, M.T., Zhang, K., Cohen, P., Patel, R.S., Cupic, A., Makio, T., Mei, M., Moreno, E., Danziger, O., White, K.M., Rathnasinghe, R., Uccellini, M., Gao, S., Aydillo, T., Mena, I., Yin, X., Martin-Sancho, L., Krogan, N.J., Chanda, S.K., Schotsaert, M., Wozniak, R.W., Ren, Y., Rosenberg, B.R., Fontoura, B.M.A., García-Sastre, A., 2020. SARS-CoV-2 Orf6 hijacks Nup98 to block STAT nuclear import and antagonize interferon signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 117, 28344-28354.

Moreno, J.L., Zuñiga, S., Enjuanes, L., Sola, I., 2008. Identification of a coronavirus transcription enhancer. *J. Virol.* 82, 3882-3893.

Muller, M.A., Paweska, J.T., Leman, P.A., Drosten, C., Grywna, K., Kemp, A., Braack, L., Sonnenberg, K., Niedrig, M., Swanepoel, R., 2007. Coronavirus antibodies in African bat species. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1367-1370.

Muller, M.A., van der Hoek, L., Voss, D., Bader, O., Lehmann, D., Schulz, A.R., Kallies, S., Suliman, T., Fielding, B.C., Drosten, C., Niedrig, M., 2010. Human coronavirus NL63 open reading frame 3 encodes a virion-incorporated N-glycosylated membrane protein. *J. Virol.* 74, 589-593.

Mulligan, M.J., Lyke, K.E., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Neuzil, K., Raabe, V., Bailey, R., Swanson, K.A., Li, P., Koury, K., Kalina, W., Cooper, D., Fontes-Garfias, C., Shi, P.Y., Tureci, O., Tompkins, K.R., Walsh, E.E., Frenck, R., Falsey, A.R., Dormitzer, P.R., Gruber, W.C., Sahin, U., Jansen, K.U., 2020. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature* 586, 589-593.

Munz, M., Hein, J., Biggin, P.C., 2012. The role of flexibility and conformational selection in the binding promiscuity of PDZ domains. *PLoS Comput. Biol.* 8, e1002749.

Murphy, K., 2020. SARS CoV-2 Detection From Upper and Lower Respiratory Tract Specimens: Diagnostic and Infection Control Implications. *Chest* 158, 1804-1805.

Narayanan, K., Huang, C., Makino, S., 2008. SARS coronavirus accessory proteins. *Virus Res.* 133, 113-121.

Nienhold, R., Ciani, Y., Koelzer, V.H., Tzankov, A., Haslbauer, J.D., Menter, T., Schwab, N., Henkel, M., Frank, A., Zsikla, V., Willi, N., Kempf, W., Hoyler, T., Barbareschi, M., Moch, H., Tolnay, M., Cathomas, G., Demichelis, F., Junt, T., Mertz, K.D., 2020. Two distinct immunopathological profiles in autopsy lungs of COVID-19. *Nat. Commun.* 11, 5086.

Nieto-Torres, J.L., Dediego, M.L., Verdia-Baguena, C., Jimenez-Guardeño, J.M., Regla-Nava, J.A., Fernandez-Delgado, R., Castaño-Rodriguez, C., Alcaraz, A., Torres, J., Aguilella, V.M., Enjuanes, L., 2014. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS Pathog.* 10, e1004077.

Nieto-Torres, J.L., Verdia-Baguena, C., Jimenez-Guardeno, J.M., Regla-Nava, J.A., Castano-Rodriguez, C., Fernandez-Delgado, R., Torres, J., Aguilella, V.M., Enjuanes, L., 2015. Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. *Virology* 485, 330-339.

Nieva, J.L., Madan, V., Carrasco, L., 2012. Viroporins: structure and biological functions. *Nat. Rev Microbiol.* 10, 563-574.

Nourry, C., Grant, S.G., Borg, J.P., 2003. PDZ domain proteins: plug and play! *Sci. STKE* 2003, RE7.

Page, K.W., Britton, P., Boursnell, M.E.G., 1990. Sequence analysis of the leader RNA of two porcine coronaviruses: transmissible gastroenteritis coronavirus and porcine respiratory coronavirus. *Virus Genes* 4, 289-301.

Pallesen, J., Wang, N., Corbett, K.S., Wrapp, D., Kirchdoerfer, R.N., Turner, H.L., Cottrell, C.A., Becker, M.M., Wang, L., Shi, W., Kong, W.P., Andres, E.L., Kettenbach, A.N., Denison, M.R., Chappell, J.D., Graham, B.S., Ward, A.B., McLellan, J.S., 2017. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114, E7348-E7357.

Pavlovic, D., Neville, D.C., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R.A., Fischer, W.B., Zitzmann, N., 2003. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 6104-6108.

Peiris, J.S., Chu, C.M., Cheng, V.C., Chan, K.S., Hung, I.F., Poon, L.L., Law, K.I., Tang, B.S., Hon, T.Y., Chan, C.S., Chan, K.H., Ng, J.S., Zheng, B.J., Ng, W.L., Lai, R.W., Guan, Y., Yuen, K.Y., 2003a. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* 361, 1767-1772.

Peiris, J.S.M., Lai, S.T., Poon, L.L.M., Guan, Y., Yam, L.Y.C., Lim, W., Nicholls, J., Yee, W.K.S., Yan, W.W., Cheung, M.T., 2003b. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361, 1319-1325.

Pekar, J., Worobey, M., Moshiri, N., Scheffler, K., Wertheim, J.O., 2021. Timing the SARS-CoV-2 index case in Hubei province. *Science* 372, 412-417.

Pekar, J.E., Magee, A., Parker, E., Moshiri, N., Izhikevich, K., Havens, J.L., Gangavarapu, K., Malpica Serrano, L.M., Crits-Christoph, A., Matteson, N.L., Zeller, M., Levy, J.I., Wang, J.C., Hughes, S., Lee, J., Park, H., Park, M.S., Ching Zi Yan, K., Lin, R.T.P., Mat Isa, M.N., Noor, Y.M., Vasylyeva, T.I., Garry, R.F., Holmes, E.C., Rambaut, A., Suchard, M.A., Andersen, K.G., Worobey, M., Wertheim, J.O., 2022. The molecular epidemiology of multiple zoonotic origins of SARS-CoV-2. *Science* 377, 960-966.

Peluso, M.J., Deeks, S.G., 2022. Early clues regarding the pathogenesis of long-COVID. *Trends. Immunol.* 43, 268-270.

Pene, F., Merlat, A., Vabret, A., Rozenberg, F., Buzyn, A., Dreyfus, F., Cariou, A., Freymuth, F., Lebon, P., 2003. Coronavirus 229E-related pneumonia in immunocompromised patients. *Clin. Infect. Dis.* 37, 929-932.

Perlman, S., Netland, J., 2009. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 439-450.

Petersen, E., Koopmans, M., Go, U., Hamer, D.H., Petrosillo, N., Castelli, F., Stogaard, M., Al Khalili, S., Simonsen, L., 2020. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *Lancet Infect. Dis.* 20, e238-e244.

Philippe, R., Antigny, F., Buscaglia, P., Norez, C., Becq, F., Frieden, M., Mignen, O., 2015. SERCA and PMCA pumps contribute to the deregulation of Ca²⁺ homeostasis in human CF epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 892-903.

Pinto, L.H., Holsinger, L.J., Lamb, R.A., 1992. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 69, 517-528.

Poli, P., Timpano, S., Goffredo, M., Padoan, R., Badolato, R., 2020. Asymptomatic case of Covid-19 in an infant with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 19, e18.

Prince, T., Smith, S.L., Radford, A.D., Solomon, T., Hughes, G.L., Patterson, E.I., 2021. SARS-CoV-2 Infections in Animals: Reservoirs for Reverse Zoonosis and Models for Study. *Viruses* 13, 494.

Purse, B.V., Mellor, P.S., Rogers, D.J., Samuel, A.R., Mertens, P.P., Baylis, M., 2005. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 171-181.

Quan, P.L., Firth, C., Street, C., Henriquez, J.A., Petrosov, A., Tashmukhamedova, A., Hutchison, S.K., Egholm, M., Osinubi,

M.O., Niezgoda, M., Ogunkoya, A.B., Briese, T., Rupprecht, C.E., Lipkin, W.I., 2010. Identification of a severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in a leaf-nosed bat in Nigeria. *mBio* 1, e00208.

Quinton, P.M., 2008. Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis. *Lancet* 372, 415-417.

Regla-Nava, J.A., Nieto-Torres, J.L., Jimenez-Guardeno, J.M., Fernandez-Delgado, R., Fett, C., Castano-Rodriguez, C., Perlman, S., Enjuanes, L., DeDiego, M.L., 2015. Severe acute respiratory syndrome coronaviruses with mutations in the E protein are attenuated and promising vaccine candidates. *J. Virol.* 89, 3870-3887.

Rimessi, A., Bezzerri, V., Paterniani, S., Marchi, S., Cabrini, G., Pinton, P., 2015. Mitochondrial Ca²⁺-dependent NLRP3 activation exacerbates the *Pseudomonas aeruginosa*-driven inflammatory response in cystic fibrosis. *Nat. Commun.* 6, 6201.

Riordan, J.R., 2005. Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu. Rev. Physiol.* 67, 701-718.

Riordan, J.R., 2008. CFTR function and prospects for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 701-726.

Ripperger, T.J., Uhrlaub, J.L., Watanabe, M., Wong, R., Castaneda, Y., Pizzato, H.A., Thompson, M.R., Bradshaw, C., Weinkauf, C.C., Bime, C., Erickson, H.L., Knox, K., Bixby, B., Parthasarathy, S., Chaudhary, S., Natt, B., Cristan, E., ElAini, T., Rischard, F., Campion, J., Chopra, M., Insel, M., Sam, A., Knepler, J.L., Capaldi, A.P., Spier, C.M., Dake, M.D., Edwards, T., Kaplan, M.E., Scott, S.J., Hypes, C., Mosier, J., Harris, D.T., LaFleur, B.J., Sprissler, R., Nikolich-Zugich, J., Bhattacharya, D., 2020. Orthogonal SARS-CoV-2 Serological Assays Enable Surveillance of Low-Prevalence Communities and Reveal Durable Humoral Immunity. *Immunity* 53, 925-933.

Rogan, M.P., Stoltz, D.A., Hornick, D.B., 2011. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator intracellular processing, trafficking, and opportunities for mutation-specific treatment. *Chest* 139, 1480-1490.

Rota, P.A., Oberste, M.S., Monroe, S.S., Nix, W.A., Campganoli, R., Icenogle, J.P., Peñaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M.-H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J.L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D.d., Peret, T.C.T., Burns, C., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rasmussen, M., Fouchier, R., Gunther, S., Osterhaus,

A.D.M.E., Drosten, C., Pallansch, M.A., Anderson, L.J., Bellini, W.J., 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 300, 1394-1399.

Roy Wong, L.Y., Perlman, S., 2021. Immune dysregulation and immunopathology induced by SARS-CoV-2 and related coronaviruses - are we our own worst enemy? *Nat. Rev. Immunol.* 22, 47-56.

Rubin, D.C., 2018. CFTR and the Regulation of Crypt Cell Proliferation. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 5, 418-419.

Sadoff, J., Le Gars, M., Shukarev, G., Heerwagh, D., Truyers, C., de Groot, A.M., Stoop, J., Tete, S., Van Damme, W., Leroux-Roels, I., Berghmans, P.J., Kimmel, M., Van Damme, P., de Hoon, J., Smith, W., Stephenson, K.E., De Rosa, S.C., Cohen, K.W., McElrath, M.J., Cormier, E., Schepers, G., Barouch, D.H., Hendriks, J., Struyf, F., Douoguih, M., Van Hoof, J., Schuitemaker, H., 2021. Interim Results of a Phase 1-2a Trial of Ad26.COV2.S Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* 384, 1824-1835.

Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., 1995. Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. *Adv. Exp. Med. Biol.* 380, 499-506.

Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., 2005. Coronavirus transcription: a perspective. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 287, 31-55.

Schoggins, J.W., 2019. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annu. Rev. Virol.* 6, 567-584.

Sekine, T., Perez-Potti, A., Rivera-Ballesteros, O., Stralin, K., Gorin, J.B., Olsson, A., Llewellyn-Lacey, S., Kamal, H., Bogdanovic, G., Muschiol, S., Wullimann, D.J., Kammann, T., Emgard, J., Parrot, T., Folkesson, E., Karolinska, C.-S.G., Rooyackers, O., Eriksson, L.I., Henter, J.I., Sonnerborg, A., Allander, T., Albert, J., Nielsen, M., Klingstrom, J., Gredmark-Russ, S., Bjorkstrom, N.K., Sandberg, J.K., Price, D.A., Ljunggren, H.G., Aleman, S., Buggert, M., 2020. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell* 183, 158-168.

Shenolikar, S., Voltz, J.W., Cunningham, R., Weinman, E.J., 2004. Regulation of ion transport by the NHERF family of PDZ proteins. *Physiology (Bethesda)* 19, 362-369.

Smith, E.C., Blanc, H., Vignuzzi, M., Denison, M.R., 2013. Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: evidence for proofreading and potential therapeutics. *PLoS Pathog.* 9, e1003565.

Sola, I., Almazán, F., Zúñiga, S., Enjuanes, L., 2015. Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses. *Annu. Rev. Virol.* 2, 265-288.

Sola, I., Mateos-Gomez, P.A., Almazan, F., Zuñiga, S., Enjuanes, L., 2011. RNA-RNA and RNA-protein interactions in coronavirus replication and transcription. *RNA Biol.* 8, 237-248.

Sola, I., Moreno, J.L., Zuñiga, S., Alonso, S., Enjuanes, L., 2005. Role of nucleotides immediately flanking the transcription-regulating sequence core in coronavirus subgenomic mRNA synthesis. *J. Virol.* 79, 2506-2516.

St-Jean, J.R., Desforges, M., Almazan, F., Jacomy, H., Enjuanes, L., Talbot, P.J., 2006. Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. *J. Virol.* 80, 3670-3674.

Starr, T.N., Greaney, A.J., Hilton, S.K., Ellis, D., Crawford, K.H.D., Dingens, A.S., Navarro, M.J., Bowen, J.E., Tortorici, M.A., Walls, A.C., King, N.P., Veesler, D., Bloom, J.D., 2020. Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding. *Cell* 182, 1295-1310.

Steele, E.J., Gorczynski, R.M., Carnegie, P., Tokoro, G., Wallis, D.H., Temple, R., Wainwright, M., Wickramasinghe, N.C., 2021. COVID-19 Sudden Outbreak of Mystery Case Transmissions in Victoria, Australia, May-June 2021: Strong Evidence of Tropospheric Transport of Human Passaged Infective Virions from the Indian Epidemic. *Infect. Dis. Ther.* 2, 1-28.

Su, C.M., Wang, L., Yoo, D., 2021. Activation of NF- κ B and induction of proinflammatory cytokine expressions mediated by ORF7a protein of SARS-CoV-2. *Sci. Rep.* 11, 13464.

Sui, H., Luo, M., Miao, Y., Cheng, W., Wen, S., Zhao, B., Li, Y., Qiao, Z., Liu, Y., Xu, C., 2020. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting autophagy through PI3K/AKT/mTOR pathway in mice. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 273, 103338.

Sun, F., Hug, M.J., Lewarchik, C.M., Yun, C.H., Bradbury, N.A., Frizzell, R.A., 2000. E3KARP mediates the association of ezrin and protein kinase A with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway cells. *J. Biol. Chem.* 275, 29539-29546.

Surya, W., Li, Y., Verdia-Baguena, C., Aguilella, V.M., Torres, J., 2015. MERS coronavirus envelope protein has a single transmembrane domain that forms pentameric ion channels. *Virus Res.* 201, 61-66.

Teoh, K.T., Siu, Y.L., Chan, W.L., Schluter, M.A., Liu, C.J., Peiris, J.S., Bruzzone, R., Margolis, B., Nal, B., 2010. The SARS coronavirus E protein interacts with PALS1 and alters tight junction formation and epithelial morphogenesis. *Mol. Biol. Cell.* 21, 3838-3852.

Thelin, W.R., Hodson, C.A., Milgram, S.L., 2005. Beyond the brush border: NHERF4 blazes new NHERF turf. *J. Physiol.* 567, 13-19.

Tregoning, J.S., Flight, K.E., Higham, S.L., Wang, Z., Pierce, B.F., 2021. Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape. *Nat. Rev. Immunol.* 21, 626–636

Vachel, L., Norez, C., Becq, F., Vandebrouck, C., 2013. Effect of VX-770 (ivacaftor) and OAG on Ca²⁺ influx and CFTR activity in G551D and F508del-CFTR expressing cells. *J. Cyst. Fibros.* 12, 584-591.

van Boheemen, S., de Graaf, M., Lauber, C., Bestebroer, T.M., Raj, V.S., Zaki, A.M., Osterhaus, A.D., Haagmans, B.L., Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J., Fouchier, R.A., 2012. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *mBio* 3, e00473.

Volz, E., Hill, V., McCrone, J.T., Price, A., Jorgensen, D., O'Toole, A., Southgate, J., Johnson, R., Jackson, B., Nascimento, F.F., Rey, S.M., Nicholls, S.M., Colquhoun, R.M., da Silva Filipe, A., Shepherd, J., Pascall, D.J., Shah, R., Jesudason, N., Li, K., Jarrett, R., Pacchiarini, N., Bull, M., Geidelberg, L., Siveroni, I., Consortium, C.-U., Goodfellow, I., Loman, N.J., Pybus, O.G., Robertson, D.L., Thomson, E.C., Rambaut, A., Connor, T.R., 2021. Evaluating the Effects of SARS-CoV-2 Spike Mutation D614G on Transmissibility and Pathogenicity. *Cell* 184, 64-75.

Voysey, M., Clemens, S.A.C., Madhi, S.A., Weckx, L.Y., Folegatti, P.M., Aley, P.K., Angus, B., Baillie, V.L., Barnabas, S.L., Bhorat, Q.E., Bibi, S., Briner, C., Cicconi, P., Collins, A.M., Colin-Jones, R., Cutland, C.L., Darton, T.C., Dheda, K., Duncan, C.J.A., Emary, K.R.W., Ewer, K.J., Fairlie, L., Faust, S.N., Feng, S., Ferreira, D.M., Finn, A., Goodman, A.L., Green, C.M., Green, C.A., Heath, P.T., Hill, C., Hill, H., Hirsch, I., Hodgson, S.H.C., Izu, A., Jackson, S., Jenkin, D., Joe, C.C.D., Kerridge, S., Koen, A., Kwatra, G., Lazarus, R., Lawrie, A.M., Lelliott, A., Libri, V., Lillie, P.J., Mallory, R., Mendes, A.V.A., Milan, E.P., Minassian, A.M., McGregor, A., Morrison, H., Mujadidi, Y.F., Nana, A., O'Reilly, P.J., Padayachee, S.D., Pittella, A., Plested, E., Pollock, K.M., Ramasamy, M.N., Rhead, S., Schwarzbold, A.V., Singh, N., Smith, A., Song, R., Snape, M.D., Sprinz, E., Sutherland,

R.K., Tarrant, R., Thomson, E.C., Torok, M.E., Toshner, M., Turner, D.P.J., Vekemans, J., Villafana, T.L., Watson, M.E.E., Williams, C.J., Douglas, A.D., Hill, A.V.S., Lambe, T., Gilbert, S.C., Pollard, A.J., Oxford, C.V.T.G., 2021. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet* 397, 99-111.

Walker, P.J., Siddell, S.G., Lefkowitz, E.J., Mushegian, A.R., Adriaenssens, E.M., Alfenas-Zerbini, P., Davison, A.J., Dempsey, D.M., Dutilh, B.E., Garcia, M.L., Harrach, B., Harrison, R.L., Hendrickson, R.C., Junglen, S., Knowles, N.J., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Lambert, A.J., Lobocka, M., Nibert, M.L., Oksanen, H.M., Orton, R.J., Robertson, D.L., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Simmonds, P., Smith, D.B., Suzuki, N., Van Dooerslaer, K., Vandamme, A.M., Varsani, A., Zerbini, F.M., 2021. Changes to virus taxonomy and to the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2021). *Arch. Virol.* 166, 2633-2648.

Wang, C., van Haperen, R., Gutierrez-Alvarez, J., Li, W., Okba, N.M.A., Albulescu, I., Widjaja, I., van Dieren, B., Fernandez-Delgado, R., Sola, I., Hurdiss, D.L., Daramola, O., Grosveld, F., van Kuppeveld, F.J.M., Haagmans, B.L., Enjuanes, L., Drabek, D., Bosch, B.J., 2021. A conserved immunogenic and vulnerable site on the coronavirus spike protein delineated by cross-reactive monoclonal antibodies. *Nat. Commun.* 12, 1715.

Wang, L., Guzman, M., Muñoz-Santos, D., Honrubia, J.M., Ripoll-Gomez, J., Sola, I., Enjuanes, L., Zuñiga, S., 2023. Growth and Stability of Recombinant SARS-CoV-2 from an Infectious cDNA Clone and a Reporter RNA Replicon Engineered to Analyze Virus Replication and Pathogenesis. *Frontiers*, In press.

Wang, S., Raab, R.W., Schatz, P.J., Guggino, W.B., Li, M., 1998. Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *FEBS Lett.* 427, 103-108.

WHO, 2022. Middle East respiratory syndrome: global summary and assessment of risk - 16 November 2022. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MERS-RA-2022.1>.

Woo, P.C., Lau, S.K., Chu, C.M., Chan, K.H., Tsui, H.W., Huang, Y., Wong, B.H., Poon, R.W., Cai, J.J., Luk, W.K., Poon, L.L., Wong, S.S., Guan, Y., Peiris, J.S., Yuen, K.Y., 2005. Characterization and

complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J. Virol.* 79, 884-895.

Worobey, M., Levy, J.I., Malpica Serrano, L., Crits-Christoph, A., Pekar, J.E., Goldstein, S.A., Rasmussen, A.L., Kraemer, M.U.G., Newman, C., Koopmans, M.P.G., Suchard, M.A., Wertheim, J.O., Lemey, P., Robertson, D.L., Garry, R.F., Holmes, E.C., Rambaut, A., Andersen, K.G., 2022. The Huanan Seafood Wholesale Market in Wuhan was the early epicenter of the COVID-19 pandemic. *Science* 377, 951-959.

Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.M., Wang, W., Song, Z.G., Hu, Y., Tao, Z.W., Tian, J.H., Pei, Y.Y., Yuan, M.L., Zhang, Y.L., Dai, F.H., Liu, Y., Wang, Q.M., Zheng, J.J., Xu, L., Holmes, E.C., Zhang, Y.Z., 2020. Author Correction: A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 580, E7.

Wu, Y., Ma, L., Cai, S., Zhuang, Z., Zhao, Z., Jin, S., Xie, W., Zhou, L., Zhang, L., Zhao, J., Cui, J., 2021. RNA-induced liquid phase separation of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein facilitates NF- κ B hyper-activation and inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* 6, 167.

Wu, Z., McGoogan, J.M., 2020. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA* 323, 1239-1242.

Xia, H., Cao, Z., Xie, X., Zhang, X., Chen, J.Y., Wang, H., Menachery, V.D., Rajasbaum, R., Shi, P.Y., 2020. Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2. *Cell Rep.* 33, 108234.

Xing, Y., Li, X., Gao, X., Dong, Q., 2020. Natural Polymorphisms Are Present in the Furin Cleavage Site of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Front. Genet.* 11, 783.

Xu, H., Akinyemi, I.A., Chitre, S.A., Loeb, J.C., Lednicky, J.A., McIntosh, M.T., Bhaduri-McIntosh, S., 2022. SARS-CoV-2 viroporin encoded by ORF3a triggers the NLRP3 inflammatory pathway. *Virology* 568, 13-22.

Yue, C., Song, W., Wang, L., Jian, F., Chen, X., Gao, F., Shen, Z., Wang, Y., Wang, X., Cao, Y., 2023. ACE2 binding and antibody evasion in enhanced transmissibility of XBB.1.5. *Lancet Infect. Dis.* 23, 278-280.

Yuen, C.K., Lam, J.Y., Wong, W.M., Mak, L.F., Wang, X., Chu, H., Cai, J.P., Jin, D.Y., To, K.K., Chan, J.F., Yuen, K.Y., Kok, K.H., 2020. SARS-CoV-2 nsp13, nsp14, nsp15 and orf6 function as potent interferon antagonists. *Emerg. Microbes Infect.* 9, 1418-1428.

Zaki, A.M., van Boheemen, S., Bestebroer, T.M., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A., 2012. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* 367, 1814-1820.

Zeng, R., Yang, R.F., Shi, M.D., Jiang, M.R., Xie, Y.H., Ruan, H.Q., Jiang, X.S., Shi, L., Zhou, H., Zhang, L., Wu, X.D., Lin, Y., Ji, Y.Y., Xiong, L., Jin, Y., Dai, E.H., Wang, X.Y., Si, B.Y., Wang, J., Wang, H.X., Wang, C.E., Gan, Y.H., Li, Y.C., Cao, J.T., Zuo, J.P., Shan, S.F., Xie, E., Chen, S.H., Jiang, Z.Q., Zhang, X., Wang, Y., Pei, G., Sun, B., Wu, J.R., 2004. Characterization of the 3a protein of SARS-associated coronavirus in infected vero E6 cells and SARS patients. *J. Mol. Biol.* 341, 271-279.

Zhang, Q., Bastard, P., Liu, Z., Le Pen, J., Moncada-Velez, M., Chen, J., Ogishi, M., Sabli, I.K.D., Hodeib, S., Korol, C., Rosain, J., Bilguvar, K., Ye, J., Bolze, A., Bigio, B., Yang, R., Arias, A.A., Zhou, Q., Zhang, Y., Onodi, F., Korniotis, S., Karpf, L., Philippot, Q., Chbihi, M., Bonnet-Madin, L., Dorgham, K., Smith, N., Schneider, W.M., Razooky, B.S., Hoffmann, H.H., Michailidis, E., Moens, L., Han, J.E., Lorenzo, L., Bizien, L., Meade, P., Neehus, A.L., Ugurbil, A.C., Corneau, A., Kerner, G., Zhang, P., Rapaport, F., Seeleuthner, Y., Manry, J., Masson, C., Schmitt, Y., Schlüter, A., Le Voyer, T., Khan, T., Li, J., Fellay, J., Roussel, L., Shahrooei, M., Alosaimi, M.F., Mansouri, D., Al-Saud, H., Al-Mulla, F., Almourfi, F., Al-Muhsen, S.Z., Alsohime, F., Al Turki, S., Hasanato, R., van de Beek, D., Biondi, A., Bettini, L.R., D'Angio, M., Bonfanti, P., Imberti, L., Sottini, A., Paghera, S., Quiros-Roldan, E., Rossi, C., Oler, A.J., Tompkins, M.F., Alba, C., Vandernoot, I., Goffard, J.C., Smits, G., Migeotte, I., Haerynck, F., Soler-Palacin, P., Martin-Nalda, A., Colobran, R., Morange, P.E., Keles, S., Cölkesen, F., Ozcelik, T., Yasar, K.K., Senoglu, S., Karabela, N., Rodríguez-Gallego, C., Novelli, G., Hraiech, S., Tandjaoui-Lambiotte, Y., Duval, X., Laouénan, C., Snow, A.L., Dalgard, C.L., Milner, J.D., Vinh, D.C., Mogensen, T.H., Marr, N., Spaan, A.N., Boisson, B., Boisson-Dupuis, S., Bustamante, J., Puel, A., Ciancanelli, M.J., Meyts, I., Maniatis, T., Soumelis, V., Amara, A., Nussenzweig, M., García-Sastre, A., Krammer, F., Pujol, A., Duffy, D., Lifton, R.P., Zhang, S.Y., Gorochov, G., Béziat, V., Jouanguy, E., Sancho-Shimizu, V., Rice, C.M., Abel, L., Notarangelo, L.D., Cobat, A., Su, H.C., Casanova, J.L., 2020. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* 370, eabd4570.

Zhang, S., Shrestha, C.L., Kopp, B.T., 2018. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) modulators have

differential effects on cystic fibrosis macrophage function. *Sci. Rep.* 8, 17066.

Zhou, H., Ji, J., Chen, X., Bi, Y., Li, J., Wang, Q., Hu, T., Song, H., Zhao, R., Chen, Y., Cui, M., Zhang, Y., Hughes, A.C., Holmes, E.C., Shi, W., 2021. Identification of novel bat coronaviruses sheds light on the evolutionary origins of SARS-CoV-2 and related viruses. *Cell* 184, 4380-4391.

Zhou, T., Gilliam, N.J., Li, S., Spandau, S., Osborn, R.M., Connor, S., Anderson, C.S., Mariani, T.J., Thakar, J., Dewhurst, S., Mathews, D.H., Huang, L., Sun, Y., 2023. Generation and Functional Analysis of Defective Viral Genomes during SARS-CoV-2 Infection. *mBio* 14, e0025023.

Zhou, Y., Song, K., Painter, R.G., Aiken, M., Reiser, J., Stanton, B.A., Nauseef, W.M., Wang, G., 2013. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator recruitment to phagosomes in neutrophils. *J. Innate Immun.* 5, 219-230.

Zhu, F.C., Guan, X.H., Li, Y.H., Huang, J.Y., Jiang, T., Hou, L.H., Li, J.X., Yang, B.F., Wang, L., Wang, W.J., Wu, S.P., Wang, Z., Wu, X.H., Xu, J.J., Zhang, Z., Jia, S.Y., Wang, B.S., Hu, Y., Liu, J.J., Zhang, J., Qian, X.A., Li, Q., Pan, H.X., Jiang, H.D., Deng, P., Gou, J.B., Wang, X.W., Wang, X.H., Chen, W., 2020a. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* 396, 479-488.

Zhu, F.C., Li, Y.H., Guan, X.H., Hou, L.H., Wang, W.J., Li, J.X., Wu, S.P., Wang, B.S., Wang, Z., Wang, L., Jia, S.Y., Jiang, H.D., Wang, L., Jiang, T., Hu, Y., Gou, J.B., Xu, S.B., Xu, J.J., Wang, X.W., Wang, W., Chen, W., 2020b. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *Lancet* 395, 1845-1854.

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G.F., Tan, W., China Novel Coronavirus, I., Research, T., 2020c. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382, 727-733.

Zhu, X., Mannar, D., Srivastava, S.S., Berezuk, A.M., Demers, J.P., Saville, J.W., Leopold, K., Li, W., Dimitrov, D.S., Tuttle, K.S., Zhou, S., Chittori, S., Subramaniam, S., 2021. Cryo-electron microscopy structures of the N501Y SARS-CoV-2 spike protein in complex

with ACE2 and 2 potent neutralizing antibodies. *PLoS Biol.* 19, e3001237.

Ziebuhr, J., 2005. The coronavirus replicase, in: Enjuanes, L. (Ed.), *Coronavirus replication and reverse genetics*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 57-94.

Zihni, C., Mills, C., Matter, K., Balda, M.S., 2016. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 564-580.

Zollner, A., Koch, R., Jukic, A., Pfister, A., Meyer, M., Rossler, A., Kimpel, J., Adolph, T.E., Tilg, H., 2022. Postacute COVID-19 is Characterized by Gut Viral Antigen Persistence in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 163, 495-506.

Zou, L., Ruan, F., Huang, M., Liang, L., Huang, H., Hong, Z., Yu, J., Kang, M., Song, Y., Xia, J., Guo, Q., Song, T., He, J., Yen, H.L., Peiris, M., Wu, J., 2020. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N. Engl. J. Med.* 382, 1177-1179.

Zuñiga, S., Sola, I., Alonso, S., Enjuanes, L., 2004. Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *J. Virol.* 78, 980-994.

**DISCURSO DE CONTESTACIÓN
DEL
EXCMO. SR. D. ESTEBAN DOMINGO SOLANS**

Excmo. Sr. Presidente,

Excmos. Sres. Académicos,

Señoras y Señores

Es para mí un honor y un momento gratísimo dar la bienvenida como Académico Numerario a esta Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, al Excmo. Sr. Luis Enjuanes Sánchez, quien ya desde 2008 ha sido Académico correspondiente de nuestra corporación. Quiero expresar a esta Academia y a su Presidente el Prof. Jesús María Sanz-Serna mi agradecimiento porque se me haya asignado la tarea de contestar al discurso del Dr. Enjuanes. Lo voy a hacer situando sus méritos científicos en el contexto de los problemas que tiene planteados la virología actual y que se conectan con otras disciplinas, algunas cercanas y otras aparentemente alejadas del estudio de los virus. Algunas de las áreas relacionadas son de gran impacto social, como es la salud pública, mientras que otras disciplinas aparentemente dispares, como son la ecología o la computación avanzada, también ejercen influencia sobre la virología. La satisfacción de pronunciar este discurso se refuerza por los numerosos años de amistad y colaboración científica que me unen al Profesor Enjuanes, así como por ciertas vivencias paralelas en el mundo de la investigación española.

Permítanme empezar con una simplificación. Tras sus años de estudiante en Valencia y las etapas pre-doctoral y post-doctoral cursadas en laboratorios de primerísimo nivel en España y en Estados Unidos, su formación se cimentó en dos áreas complementarias de cuya conjunción han salido importantes avances en las ciencias biomédicas: la inmunología y la virología. Este bagaje formativo, que subyace en el encadenamiento de logros que ha relatado en su discurso, unido a su inata perseverancia, capacidad de trabajo, entusiasmo ilimitado y perspicacia para encontrar espacios de originalidad, fueron tejiendo la carrera exitosa que hoy celebramos.

Recuerdo, como parte de la aventura en paralelo en la que nos embarcamos hace cinco décadas, una conversación quasi-clandestina y nocturna en un bar penumbroso de Colmenar Viejo, rumiando las estrategias que uno debía perfilar para formar un grupo de investigación. El primer paso de su decidida apuesta por empezar su propio grupo de trabajo fue la decisión de investigar sobre un virus poco conocido y prácticamente sin representación en la ciencia española de la época, que se llama virus de la gastroenteritis transmisible del cerdo, un representante de los coronavirus, un grupo de virus con ácido ribonucleico (ARN) como material genético. En la época este grupo de virus tenía un perfil sanitario y económico discreto, y pocos sospechaban que albergaba un tremendo potencial evolutivo. Efectivamente, a la postre se han manifestado como un grupo de virus diestros tanto en saltar de una especie de hospedador a otra, como de infectar distintos órganos y tejidos dentro del mismo individuo infectado. Albergaba, en definitiva, la posibilidad de desencadenar la gran pandemia del siglo XXI que todos hemos sufrido.

El primer laboratorio de Luis Enjuanes como investigador independiente a su regreso a España desde los Estados Unidos en 1980 fue realmente diminuto. Estaba situado en el pabellón C-V de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, en el Campus de Cantoblanco, donde se instaló el Centro de Biología Molecular, posteriormente denominado Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, tras el fallecimiento del Dr. Ochoa, uno de los mentores clave del proyecto CBM. En ese diminuto laboratorio de Luis se agrupaban (más precisamente se agolpaban) estudiantes, ayudantes, visitantes, equipos, reactivos, conversaciones, silencios, inspiración, ideas y mucho trabajo. Allí se estaban sentando unas bases sólidas para el estudio molecular de los coronavirus. El traslado en 1986 a un laboratorio de dimensiones normales del Centro Nacional de Biotecnología lo imagino para Luis y su grupo como una liberación física y mental, así como un estímulo intelectual para seguir ahondando en torno al mismo motivo: entender a los coronavirus en cuanto a su estructura, material genético, modo de interactuar con la célula y las consecuencias para entender la enfermedad. Todo ello sin dejar de seguir lo que ocurría en ámbitos colindantes de la ciencia de entonces.

Efectivamente, en la década de los años 1980, cuando todo esto ocurría, se estaba cimentando una de las revoluciones más importantes que

hayan visto las ciencias biológicas y que empezó a fraguarse en la década precedente. Se trata de las técnicas de la ingeniería genética, también denominadas de recombinación de ácido desoxirribonucleico (ADN) in vitro. Es decir, la capacidad de aislar, sintetizar, mutar y reorganizar ADN en el tubo de ensayo. Se abría la posibilidad de convertir ARNs, tanto de células como de virus, en copias de ADN para poder plantearse, por vez primera, preguntas sobre el comportamiento de formas alteradas de los genomas originales. Lo que se denominó genética inversa fue una explosión de oportunidades que no se escaparon a Luis y a su grupo de investigación.

En paralelo, y como consecuencia también de avances acontecidos en la década anterior, se estaba generalizando la preparación y uso de anticuerpos monoclonales cuya especificidad de reconocimiento de epítopos individuales ofrecía a los virólogos una herramienta única para entender la respuesta inmune a los virus. De nuevo surge la sinergia entre virología e inmunología.

En cuanto a la aplicación de las técnicas de ingeniería genética, los coronavirus presentaban un desafío importante, en cierto modo disuasorio, para la copia de su ARN en ADN, paso previo para introducir cambios moleculares y preguntarse acerca de sus consecuencias funcionales. El desafío para aplicar la genética inversa a los coronavirus era el tamaño de su ARN genómico, que ronda los treinta mil nucleótidos (o monómeros que forman el mensaje heredable del virus). Esta longitud en nucleótidos es entre tres y diez veces superior a la de los otros virus con una molécula de ARN como material genético que se conocen hasta este momento. El problema de convertir el RNA genómico de coronavirus en una copia de ADN, asunto altamente competitivo en la época, fue resuelto por primera vez por el grupo del Dr. Luis Enjuanes, gracias a la aplicación de una técnica de clonaje molecular que empleaba cromosomas artificiales de bacterias, los denominados BACs de los que nos ha hablado en su discurso. Este sistema permitía obtener, ensamblar y manipular copias de ADN de gran tamaño, evitando toxicidades para la célula. Este hito abrió las técnicas de recombinación de ADN in vitro a los coronavirus, con una enorme repercusión para entender los mecanismos de multiplicación de estos virus y buscar estrategias para prevenir y tratar las enfermedades que producen. Esta es, a mi entender, la contribución clave de Luis Enjuanes y su grupo, en esa época inicial de aplicación de técnicas de ingeniería genética.

La puesta a punto para coronavirus de la metodología de recombinación de ADN in vitro representó un avance importante en el campo de la virología y permitió al grupo de Luis disecionar y entender los mecanismos que subyacen a la multiplicación de los coronavirus en las células infectadas. Entre los descubrimientos se hallan el mecanismo de transcripción (formación de moléculas de ARN necesarias para la síntesis de proteínas víricas), la identificación de factores clave para la virulencia del virus, o las vías de señalización celular que permiten la multiplicación del virus. Estos avances en el conocimiento de las interacciones que tienen lugar entre virus y célula, así como los factores desencadenantes de la respuesta inmune del hospedador infectado, sentaron las bases para el diseño de las primeras vacunas frente a enfermedades producidas por coronavirus. El grupo de Luis Enjuanes desarrolló vacunas de nueva generación para MERS-CoV, uno de los coronavirus patógenos humanos surgidos este mismo siglo XXI, y, más recientemente, vacunas frente a SARS-CoV-2, el agente causal de la COVID-19, basadas en replicones de ARN defectivos en propagación, con capacidad para inducir una inmunidad que evite la infección y no solamente la enfermedad, como nos ha explicado en su discurso.

Todos estos desarrollos recientes son la consecuencia de la perspicacia en la elección inicial de un virus para su línea de investigación, el atrevimiento para abordar el clonaje molecular de un virus complejo, sin temor a competir con grupos mejor financiados. Todo ello en el marco de seguir una línea coherente de entendimiento teórico de un problema, como punto de arranque de aplicaciones prácticas.

Luis Enjuanes ha publicado unos 250 artículos en las revistas científicas más prestigiosas de biología molecular, biomedicina y virología y 58 artículos para libros. Es, además, un activo conferenciante y divulgador de conceptos científicos que abarcan desde la virología molecular a la salud pública. Viajero infatigable, sus colaboraciones se han extendido a grupos de distintos países de Europa, de Estados Unidos y de China. Sus logros han sido reconocidos con numerosas distinciones nacionales e internacionales, entre las que destacan ser miembro de la Academia Americana de Microbiología y de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos, el Premio Nacional de Biotecnología y de Investigación Científica de España, Premio al Virólogo Sénior Distinguido de la Sociedad Española de Virología, Distinción especial en el primer concurso de Patentes de Madrid, otorgado por la Dirección Ge-

neral de Universidades e Investigación de Madrid y la Encomienda de la Orden Civil de Sanidad. Ha recibido varios premios en reconocimiento a su contribución a la lucha contra la COVID-19, como es la distinción “Iniciativa Ciencia e Investigación”, compartido con el Dr. Mariano Esteban por liderar proyectos en torno a la preparación de vacunas contra el SARS-CoV-2, el premio TELVA a los investigadores españoles de la vacuna para prevenir la COVID-19, el premio de la Fundación Neumomadrid de la Sociedad Madrileña de Neumología y Cirugía Torácica, o la insignia de Oro y Brillantes de la Asociación de Químicos y de Ingenieros Químicos de Madrid, por su carrera en bioquímica y virología y el desarrollo de una vacuna frente a la COVID-19, entre otras distinciones que podrán encontrar en sus biografías. También figuran premios de varias comunidades españolas y de su Valencia natal como es el otorgado por la Junta Mayor de la Semana Santa Marinera de Valencia, una iniciativa que rinde homenaje a colectivos y personalidades valencianas cuya labor contribuye al bienestar de la sociedad. También recibió el premio del diario Las Provincias de Valencia al Valenciano del siglo XXI como líder del equipo que diseñó una vacuna para la COVID-19. Es consultor experto de los Institutos Nacionales de la Salud de Estados Unidos y de la Organización Mundial de la Salud. Ha sido el Editor-Jefe de la revista Virus Research. Desde 2008 ha sido Académico correspondiente de esta Academia y ha participado activamente en nuestras actividades de difusión de la cultura científica.

No puedo terminar estas palabras de bienvenida a nuestra (tu) casa, estimado Luis, sin recordar una anécdota, que creo no conoces, que ocurrió hace unos cuarenta años pero que ahora adquiere un significado singular. Fue durante uno de los Congresos de virus ARN de polaridad positiva, en Utrecht, Países Bajos, unas reuniones que sin duda recuerdas ya que has sido activo participante en varias de ellas. En una de las típicas conversaciones durante el descanso para tomar café, en las que los congresistas tratamos de distanciarnos de tensiones acumuladas, coincidí con el prestigioso inmunólogo neerlandés, a quien conoces bien, el Profesor Rob Meloen, uno de los pioneros del empleo de péptidos sintéticos en los estudios de inmunología de los virus. No recuerdo a cuenta de qué, ciertamente no inducido por mí, Rob Meloen expresó comentarios acerca de los virólogos españoles que conocía, quizás por cierto sentido de exotismo que transmitímos a nuestros colegas del norte. Fue una especie de revisión improvisada de trabajo y logros de varios de nosotros, una situación algo insólita. Al llegar a tu nombre,

tras ensalzar tus investigaciones, dijo algo como “... pero el problema que tiene Luis Enjuanes es que a los virus con los que trabaja les falta una verdadera enfermedad”. Esta afirmación se relaciona con el perfil relativamente bajo de los coronavirus humanos que se habían descrito en la época y también con la controversia, que recuerdo bien, de si la gastroenteritis transmisible del cerdo (la enfermedad de tu virus modelo) tenía suficiente entidad. Aunque, efectivamente, puede ser mortal para los lechones, la cuestión era si alcanzaba el rango de enfermedad respetable, como las enfermedades de las que presumíamos otros virólogos (fiebre aftosa, gripe, peste porcina africana), fundamentalmente para conseguir fondos de la entonces llamada “Comisión Asesora”, precursora del actual Plan Nacional (o Estatal), para, de este modo, poder investigar las cuestiones que nos interesaban. Dudo de que Rob Meloen recuerde esa conversación, pero yo la he revivido varias veces, sobre todo durante el confinamiento iniciado en marzo de 2020, viniendo a mi mente algo como “¡Vaya con la enfermedad que le faltaba a Luis!”.

Ahora sí, termino dándote la bienvenida, Luis, como Académico Numerario de esta Real Academia, en el nombre de todos los Académicos y en el mío propio, deseando que tu estancia entre nosotros resulte mutuamente fructífera y estimulante.

Muchas gracias.