



De usædvanlige træk ved SARS-CoV-2-genomet indikerer, at det er sofistikeret laboratorieændring i stedet for naturlig udvikling og afgrænsning af dens sandsynlige syntetiske rute

Li-Meng Yan (MD, PhD)¹, Shu Kang (PhD)¹, Jie Guan (PhD)¹, Shanchang Hu (PhD)¹

¹Rule of Law Society & Rule of Law Foundation, New York, NY, USA.

Korrespondance: team.lmyan@gmail.com

Abstrakt

COVID-19-pandemien forårsaget af den nye coronavirus SARS-CoV-2 har ført til over 910.000 dødsfald på verdensplan og en hidtil uset decimering af den globale økonomi. På trods af sin enorme indvirkning er oprindelsen af SARS-CoV-2 forblevet mystisk og kontroversiel. Teorien om naturlig oprindelse mangler væsentlig støtte, selv om den er bredt accepteret. Den alternative teori om, at virussen kan være kommet fra et forskningslaboratorium, er imidlertid strengt censureret på peer-reviewed videnskabelige tidsskrifter. Ikke desto mindre viser SARS-CoV-2 biologiske egenskaber, der er uforenelige med en naturligt forekommende, zoonotisk virus. I denne rapport beskriver vi de genomiske, strukturelle, medicinske og litteraturbeviser, som, når de betragtes sammen, stærkt modsiger den naturlige oprindelsesteori. Beviserne viser, at SARS-CoV-2 skal være et laboratorieprodukt oprettet ved hjælp af flagermus coronavirus ZC45 og / eller ZXC21 som skabelon og / eller rygrad. På baggrund af beviset postulerer vi yderligere en syntetisk rute til SARS-CoV-2, hvilket viser, at laboratorie-oprettelsen af dette coronavirus er praktisk og kan udføres på cirka seks måneder. Vores arbejde understreger behovet for en uafhængig undersøgelse af de relevante forskningslaboratorier. Det argumenterer også for et kritisk kig på visse nyligt offentliggjorte data, som, omend problematiske, blev brugt til at understøtte og hævde en naturlig oprindelse af SARS-CoV-2. Fra et folkesundhedsperspektiv er disse handlinger nødvendige, da viden om oprindelsen af SARS-CoV-2 og om, hvordan virussen kom ind i den menneskelige befolkning, er af afgørende betydning for den grundlæggende kontrol med COVID-19-pandemien samt for at forhindre lignende, fremtidige pandemier.

Introduktion

COVID-19 har forårsaget en verdensomspændende pandemi, hvis omfang og sværhedsgrad er uden fortilfælde. På trods af den enorme indsats, der gøres af det globale samfund, styring og kontrol af denne pandemi forbliver svært og udfordrende.

Som et coronavirus adskiller SARS-CoV-2 sig væsentligt fra andre respiratoriske og / eller zoonotiske vira: det angriber flere organer; det er i stand til at gennemgå en lang periode med asymptomatisk infektion; det er meget overførbart og betydeligt dødbringende i højrisikopopulationer; det er godt tilpasset mennesker siden starten af dets fremkomst¹; det er yderst effektivt til at binde den humane ACE2-receptor (hACE2), hvis affinitet er større end den der er forbundet med ACE2 for enhver anden potentiel vært^{2,3}.

Oprindelsen til SARS-CoV-2 er stadig genstand for meget debat. En bredt citeret Nature Medicine-publikation har hævdet, at SARS-CoV-2 sandsynligvis kom fra naturen⁴. Imidlertid udfordres artiklen og dens centrale konklusion nu af forskere fra hele verden⁵⁻¹⁵. Derudover viser forfattere af denne Nature Medicine-artikel tegn på interessekonflikt^{16, 17}, hvilket giver yderligere bekymring for troværdigheden af denne publikation.

De eksisterende videnskabelige publikationer, der understøtter en naturlig oprindelsesteori, er stærkt afhængige af et enkelt bevis - et tidligere opdaget flagermus-coronavirus ved navn RaTG13, der deler en 96% nukleotidsekvensidentitet med SARS-CoV-2¹⁸. Imidlertid bliver eksistensen af RaTG13 i naturen og sandheden af dens rapporterede sekvens meget spørgsmålstegn ved^{6-9,19-21}. Det er bemærkelsesværdigt, at videnskabelige tidsskrifter klart har censureret alle forskellige meninger, der antyder en ikke-naturlig oprindelse af SARS-CoV-2^{8,22}. På grund af denne censur kan artikler, der sætter spørgsmålstegn ved enten den naturlige oprindelse af SARS-CoV-2 eller den faktiske eksistens af RaTG13, selvom de er af høj kvalitet videnskabeligt, kun eksistere som fortryk^{5-9,19-21} eller andre ikke-peer-reviewed artikler offentliggjort på forskellige online platforme^{10-13,23}. Ikke desto mindre har analyser af disse rapporter gentagne gange peget på alvorlige problemer og et sandsynligt svindel forbundet med rapporteringen af RaTG13^{6,8,9,19-21}. Derfor er teorien om, at fabrikerede videnskabelige data er blevet offentliggjort for at vildlede verdens bestræbelser på at spore oprindelsen til SARS-CoV-2, blevet væsentligt overbevisende og er forbundet med forestillingen om, at SARS-CoV-2 er af en ikke-naturlig oprindelse.

I overensstemmelse med denne opfattelse antyder genomiske, strukturelle og litteraturbeviser også en ikke-naturlig oprindelse af SARS-CoV-2. Derudover indikerer rigelig litteratur, at forskning i gevinstfunktion længe er gået frem til det stadium, hvor virale genomer kan manipuleres præcist og manipuleres for at muliggøre oprettelse af nye coronavirus, der har unikke egenskaber. I denne rapport præsenterer vi sådanne beviser og de tilknyttede analyser. Del 1 af rapporten beskriver de genomiske og strukturelle træk ved SARS-CoV-2, hvis tilstedeværelse kan være i overensstemmelse med teorien om, at virussen er et produkt af laboratoriemodifikation ud over hvad der kunne gives ved simpel seriel viral passage. Del 2 af rapporten beskriver en meget sandsynlig vej til laboratorieoprettelse af SARS-CoV-2, hvis vigtigste trin understøttes af beviser, der er til stede i virusgenomet. Det er vigtigt, at del 2 skal ses som en demonstration af, hvordan SARS-CoV-2 nemt kan oprettes i et laboratorium på kort tid ved hjælp af tilgængelige materialer og veldokumenterede teknikker. Denne rapport er produceret af et team af erfarne forskere, der bruger vores kombinerede ekspertise inden for virologi, molekylærbiologi, strukturbioologi, beregningsbiologi, vaccineudvikling og medicin.

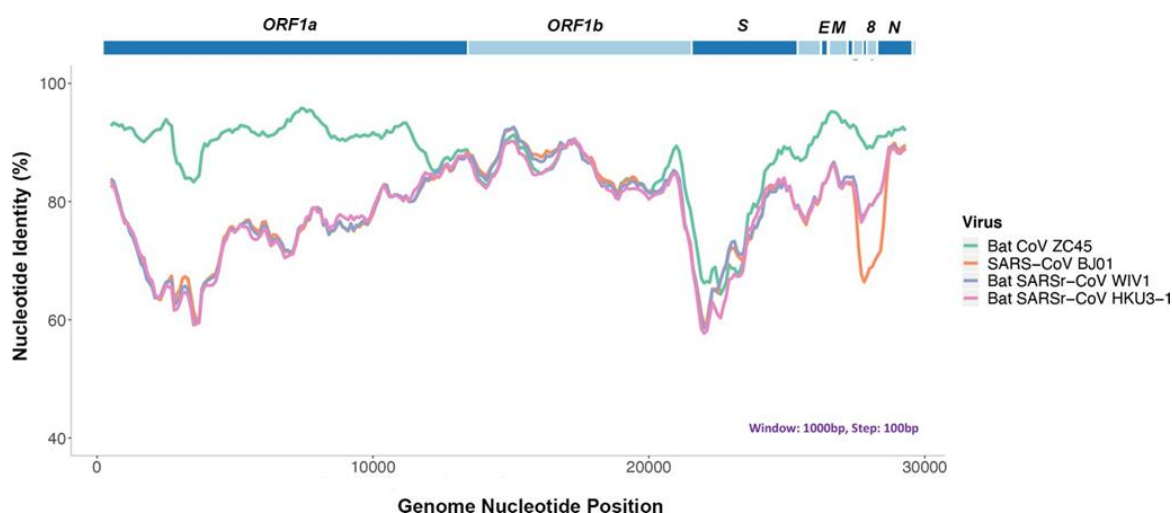
1. Er SARS-CoV-2 blevet udsat for in vitro-manipulation?

Vi præsenterer tre beviser til støtte for vores påstand om, at laboratoriemaniplulation er en del af historien om SARS-CoV-2:

- i. Den genomiske sekvens af SARS-CoV-2 svarer mistænkeligt til en bat coronavirus opdaget af militære laboratorier i det tredje militære medicinske universitet (Chongqing, Kina) og Research Institute for Medicine of Nanjing Command (Nanjing, Kina).
- ii. Receptorbindende motiv (RBM) inden for Spike-proteinet i SARS-CoV-2, der bestemmer virusets værtsspecificitet, ligner SARS-CoV's fra 2003-epidemien på en mistænkelig måde. Genomisk bevis tyder på, at RBM er blevet genetisk manipuleret.
- iii. SARS-CoV-2 indeholder et unikt furinspaltningssted i dets Spike-protein, som er kendt for i høj grad at forbedre virusinfektivitet og celle-tropisme. Alligevel er dette spaltningssted fuldstændigt fraværende i denne særlige klasse af coronavirus, der findes i naturen. Derudover antyder sjældne kodoner, der er forbundet med denne yderligere sekvens, den stærke mulighed for, at dette furinspaltningssted ikke er et produkt af naturlig udvikling og kunne have været indsat i SARS-CoV-2 genomet kunstigt ved andre teknikker end simpel seriel passage eller multi -stamme rekombinationsbegivenheder inde i co-inficerede vævskulturer eller dyr.

1.1 Genomisk sekvensanalyse afslører, at ZC45 eller et nært beslægtet flagermus-coronavirus skal være ryggraden, der anvendes til oprettelsen af SARS-CoV-2

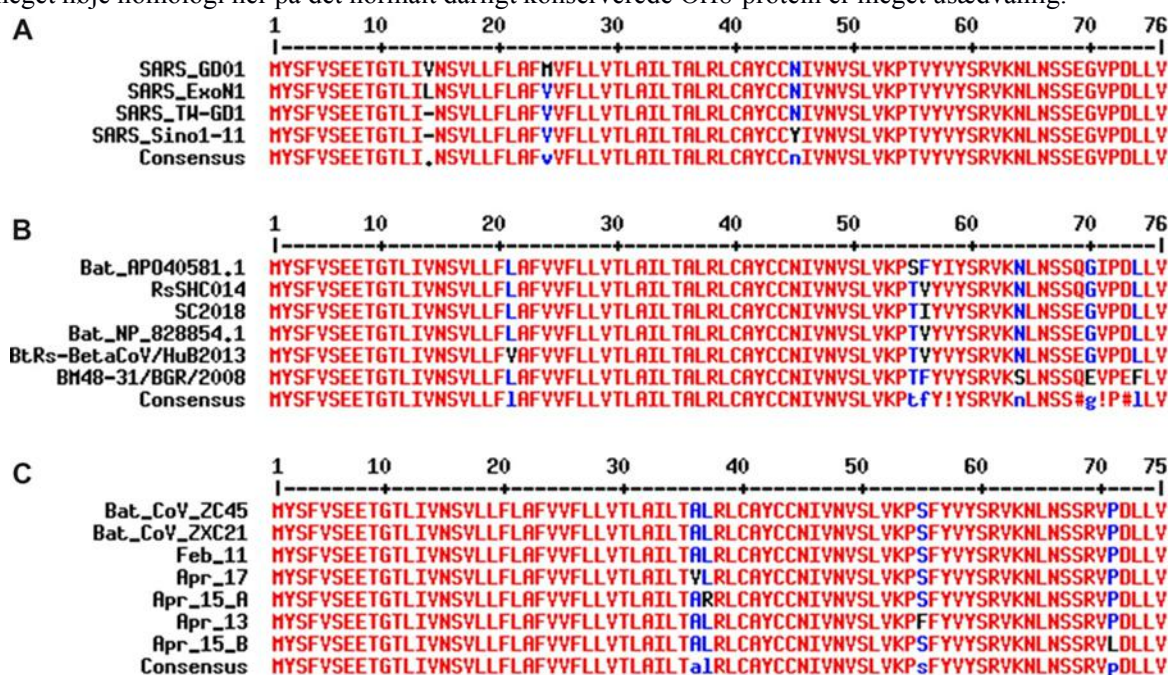
Strukturen af det ~ 30.000 nukleotider-lange SARS-CoV-2 genom er vist i figur 1. Søgning i NCBI-sekvensdatabasen afslører, at der blandt alle kendte coronavirus var to relaterede bat coronavirus, ZC45 og ZXC21, der deler den højeste sekvens identitet med SARS-CoV-2 (hvert bat coronavirus er ~ 89% identisk med SARS-CoV-2 på nukleotidniveauet). Lighed mellem genomet af SARS-CoV-2 og dem for repræsentative β coronavirus er afbildet i figur 1. ZXC21, som er 97% identisk med og deler en meget lignende profil med ZC45, er ikke vist. Bemærk, at RaTG13-virussen er udelukket fra denne analyse i betragtning af det stærke bevis, der tyder på, at dens sekvens muligvis er fremstillet, og at virussen ikke findes i naturen^{2,6-9}. (En opfølgingsrapport, der opsummerer de opdaterede beviser, der beviser den falske karakter af RaTG13, vil snart blive indsendt)



Figur 1. Genomisk sekvensanalyse afslører, at bat coronavirus ZC45 er det tætteste match med SARS-CoV-2. Top: genomisk organisering af SARS-CoV-2 (2019-nCoV WIV04). Nederst: lighedsplot baseret på genomet i fuld længde af 2019-nCoV WIV04. Full-længde genomer af SARS-CoV BJ01, bat SARSr-CoV WIV1, bat SARSr-CoV HKU3-1, bat coronavirus ZC45 blev anvendt som referensesequenser.

Når SARS-CoV-2 og ZC45 / ZXC21 sammenlignes på aminosyreniveau, observeres en høj sekvensidentitet for de fleste proteiner. Nucleocapsid-proteinet er 94% identisk. Membranproteinet er 98,6% identisk. S2-delen (2. halvdel) af Spike-proteinet er 95% identisk. Det er vigtigt, at Orf8-proteinet er 94,2% identisk, og E-proteinet er 100% identisk.

Orf8 er et tilbehørsprotein, hvis funktion i vid udstrækning er ukendt i de fleste coronavirus, skønt nylige data antyder, at Orf8 fra SARS-CoV-2 medierer unddragelse af værtsadaptiv immunitet ved nedregulering af MHC-I²⁴. Normalt er Orf8 dårligt konserveret i coronavirus²⁵. Sekvenseksplosion indikerer, at mens Orf8-proteinerne i ZC45 / ZXC21 deler en 94,2% identitet med SARS-CoV-2 Orf8, deler ingen andre coronavirus mere end 58% identitet med SARS-CoV-2 på dette særlige protein. Den meget høje homologi her på det normalt dårligt konserverede Orf8-protein er meget usædvanlig.



Figur 2. Sekvensjustering af E-proteinerne fra forskellige β -coronavirus demonstrerer E-proteinets tilladelighed og tendens til aminosyre mutationer. A. Der er observeret mutationer i forskellige stammer af SARS-CoV. GenBank tiltrædelsesnumre: SARS_GD01: AY278489.2, SARS_ExoN1: ACB69908.1, SARS_TW_GD1: AY451881.1, SARS_Sino1_11: AY485277.1. B. Justering af E-proteiner fra beslægtede bat coronavirus indikerer dets tolerance over for mutationer i flere positioner. GenBank tiltrædelsesnumre: Bat_AP040581.1: APO40581.1, RsSHC014: KC881005.1, SC2018: MK211374.1, Bat_NP_828854.1: NP_828854.1, BtRs-BetaCoV/HuB2013: AIA62312.1, BM48-31/BGR/2008: YP_003858586.1. C. Mens de tidlige kopier af SARS-CoV-2 deler 100% identitet på E-proteinet med ZC45 og ZXC21, indikerer sekvenseringsdata for SARS-CoV-2 fra april 2020, at mutation har fundet sted på flere positioner. Tiltrædelsesantal for vira: Feb_11: MN997409, ZC45: MG772933.1, ZXC21: MG772934, Apr_13: MT326139, Apr_15_A: MT263389, Apr_15_B: MT293206, Apr_17: MT350246. Justeringer blev udført ved hjælp af MultAlin webserver (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

Coronavirus E-proteinet er et strukturelt protein, der er indlejret i og linjer det indre af virionens membranhylster²⁶. E-proteinet er tolerant over for mutationer som det fremgår af både SARS (figur 2A) og relaterede flagermus coronavirus (figur 2B). Denne tolerance over for aminosyre mutationer af E-proteinet fremgår yderligere i den nuværende SARS-CoV-2-pandemi. Efter kun en kort to-måneders spredning af virussen siden dets udbrud hos mennesker har E-proteinerne i SARS-CoV-2 allerede gennemgået mutationsændringer. Sekvensdata opnået i løbet af april måned afslører, at mutationer har fundet sted på fire forskellige steder i forskellige stammer (figur 2C). I overensstemmelse med dette fund indikerer sekvensblastanalyse, at med undtagelse af SARS-CoV-2 ingen kendte coronavirus deler 100% aminosyresekvensidentitet på E-proteinet med ZC45 / ZXC21 (mistænkelige coronavirus offentliggjort efter starten af den aktuelle pandemi er udelukket^{18,27-31}). Selvom der er observeret 100% identitet på E-proteinet mellem SARS-CoV og visse SARS-relaterede flagermus coronavirus, deler ingen af disse par samtidigt over 83% identitet på Orf8-proteinet³². Derfor er 94,2% identitet på Orf8-proteinet, 100% identitet på E-proteinet og den samlede genomiske / aminosyreniveau-lighed mellem SARS-CoV-2 og ZC45 / ZXC21 meget usædvanlige. Når sådanne overvejelser betragtes sammen, er de i overensstemmelse med en hypotese om, at SARS-CoV-2 genomet har en oprindelse baseret på brugen af ZC45 / ZXC21 som ryggrad og / eller skabelon til genetisk gain-of-function modifikationer.

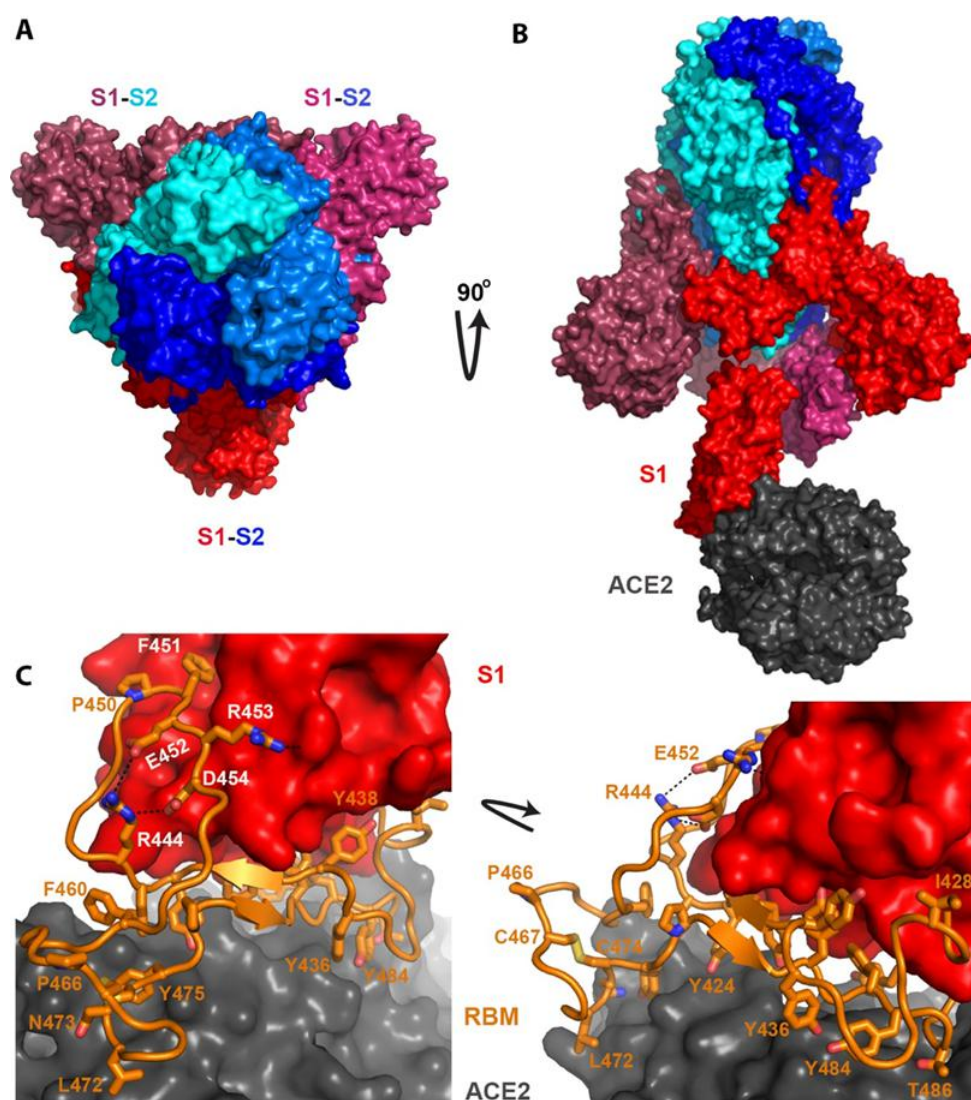
Det er vigtigt, at ZC45 og ZXC21 er bat coronavirus, der blev opdaget (mellem juli 2015 og februar 2017), isoleret og karakteriseret af militære forskningslaboratorier i det tredje militærmedicinske universitet (Chongqing, Kina) og Research Institute for Medicine of Nanjing Command (Nanjing), Kina). Dataene og det tilknyttede arbejde blev offentliggjort i 2018^{33,34}. Det er klart, at denne ryggrad / skabelon, som er afgørende for oprettelsen af SARS-CoV-2, findes i disse og andre relaterede forskningslaboratorier.

Hvad der styrker vores påstand yderligere er den offentliggjorte RaTG13-virus¹⁸, hvis genomiske sekvens angiveligt er 96% identisk med SARS-CoV-2. Mens RaTG13-virussen antydede en naturlig oprindelse af SARS-CoV-2, afledte den også opmærksomheden fra både det videnskabelige felt og offentligheden væk fra ZC45 / ZXC21^{4,18}. Faktisk blev et kinesisk BSL-3-laboratorium (Shanghai Public Health Clinical Center), der offentliggjorde en Nature-artikel, der rapporterede om et modstridende tæt fylogenetisk forhold mellem SARS-CoV-2 og ZC45 / ZXC21 snarere end med RaTG13³⁵, hurtigt lukket ned for "berigtigelse"³⁶. Det menes, at forskerne fra laboratoriet blev straffet for at have afsløret SARS-CoV-2 — ZC45 / ZXC21-forbindelsen. På den anden side er der samlet sig væsentlige beviser, der peger på alvorlige problemer forbundet med den rapporterede sekvens af RaTG13 såvel som spørgsmålstegn ved den faktiske eksistens af denne flagermusvirus i naturen^{6,7,19-21}. En meget nylig

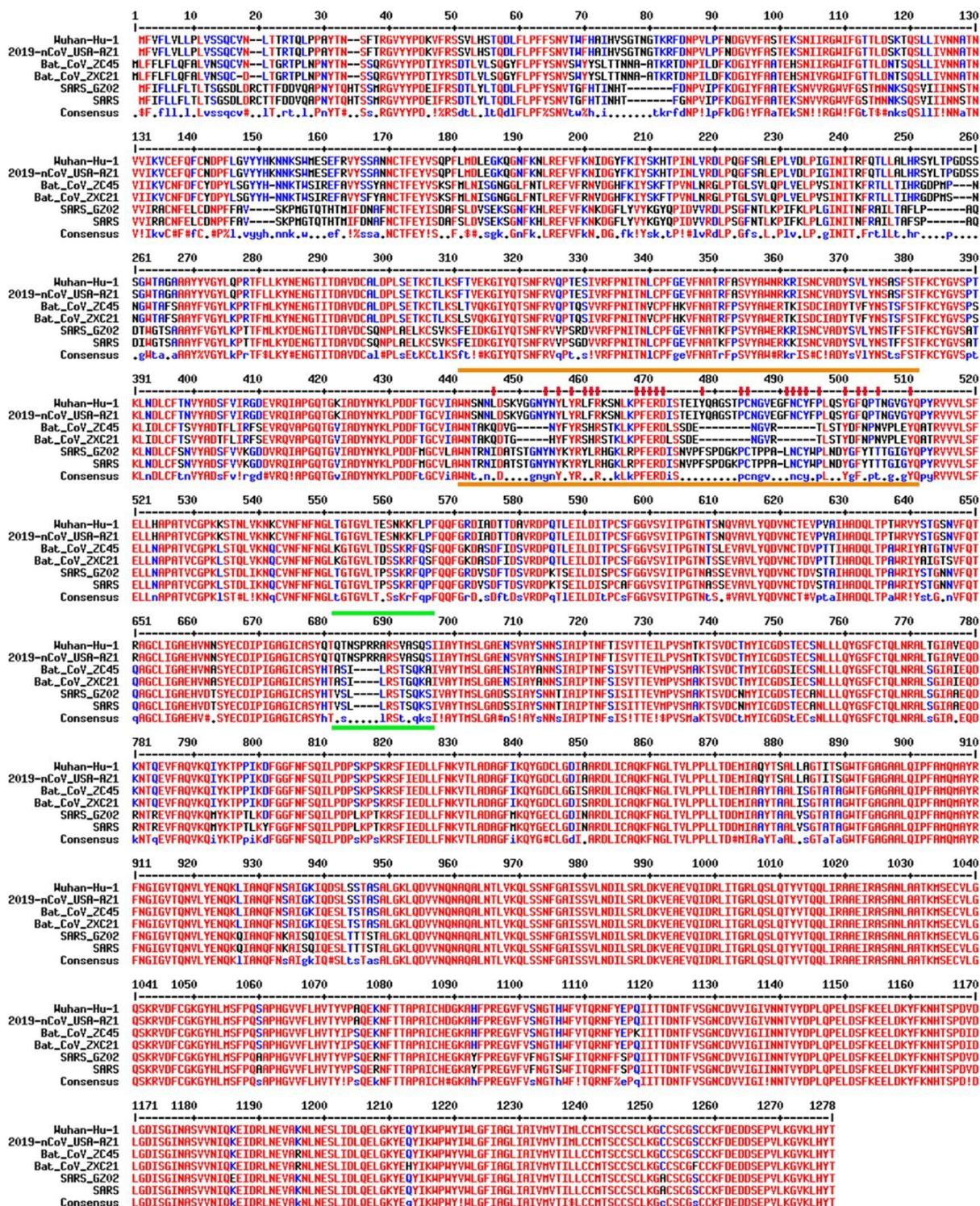
publikation angav også, at det receptorbindende domæne (RBD) af RaTG13's Spike-protein ikke kunne binde ACE2 fra to forskellige typer hestesko-flagermus (de er tæt knyttet til hestesko-flagermus *R. affinis*, RaTG13's påståede naturlige vært)², hvilket implicerer manglende evne til RaTG13 til at inficere hestesko-flagermus. Dette fund underbygger yderligere mistanken om, at den rapporterede sekvens af RaTG13 kunne have været fremstillet, da Spike-proteinet kodet af denne sekvens ikke synes at bære den påståede funktion. Det faktum, at en virus er fremstillet til at flytte opmærksomheden væk fra ZC45 / ZXC21, taler for en faktisk rolle som ZC45 / ZXC21 i oprettelsen af SARS-CoV-2.

1.2 Receptor-bindende motiv af SARS-CoV-2 Spike kan ikke fødes fra naturen og skulle have været skabt gennem genteknologi

Spike-proteinerne dekorerer det udvendige af coronaviruspartiklerne. De spiller en vigtig rolle i infektion, da de formidler interaktionen med værtscelle-receptorer og derved hjælper med at bestemme værtsområdet og vævets tropisme af virussen. Spike-proteinet er opdelt i to halvdele (figur 3). Den forreste eller den N-terminale halvdel hedder S1, som er fuldt ansvarlig for binding af værtsreceptoren. I både SARS-CoV og SARS-CoV-2 infektioner er værtscelle-receptoren hACE2. Inden for S1 opretter et segment på omkring 70 aminosyrer direkte kontakter med hACE2 og navngives tilsvarende det receptorbindende motiv (RBM) (figur 3C). I SARS-CoV og SARS-CoV-2 bestemmer RBM fuldt ud interaktionen med hACE2. Den C-terminale halvdel af Spike-proteinet hedder S2. S2's hovedfunktion inkluderer opretholdelse af trimerdannelse og efter successiv proteaseklyvning ved S1 / S2-krydset og en nedstrøms S2-position, formidling af membranfusion for at muliggøre cellulær indgang af virussen.



Figur 3. SARS Spike-proteinets struktur og hvordan det binder til hACE2-receptoren. Billeder blev genereret baseret på PDB ID: 6acj³⁷. A) Tre spidseproteiner, der hver består af en S1-halvdel og en S2-halvdel, danner en trimer. B) S2-halvdelene (blå nuancer) er ansvarlige for trimerdannelse, mens S1-delen (nuancer af rødt) er ansvarlig for binding af hACE2 (mørkegrå). C) Detaljer om bindingen mellem S1 og hACE2. RBM af S1, som er vigtig og tilstrækkelig til binding, er farvet i orange. Rester inden for RBM, der er vigtige for enten hACE2-interaktion eller proteinfoldning, vises som pinde (restantallet følger SARS Spike-sekvensen).



Figur 4. Sekvensjustering af piggproteinerne fra relevante coronavirus. Virus, der sammenlignes, inkluderer SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1: NC_045512, 2019-nCoV_USA-AZI: MN997409), bat coronaviruses (Bat_CoV_ZC45: MG772933, Bat_CoV_ZXC21: MG772934) og SARS coronGZARS: S77: S77: S77.3). Region markeret med orange linjer er det receptorbindende motiv (RBM), hvilket er vigtigt for interaktion med hACE2-receptoren. Væsentlige rester fremhæves desuden med røde pinde på toppen. Region markeret med grønne linjer er et furin-spaltningsssted, der kun findes i SARS-CoV-2, men ikke i nogen anden afstamning B β coronavirus.

Svarende til det, der observeres for andre virale proteiner, deler S2 af SARS-CoV-2 en høj sekvensidentitet (95%) med S2 af ZC45 / ZXC21. I skarp kontrast mellem SARS-CoV-2 og ZC45 / ZXC21 er S1-proteinet, som dikterer hvilken vært (menneske eller flagermus) virussen kan inficere, meget mindre konserveret med aminosyresekvensidentiteten kun 69%.

Figur 4 viser sekvensopretningen af Spike-proteinerne fra seks β -coronavirus. To er vira isoleret fra den nuværende pandemi (Wuhan-Hu-1, 2019-nCoV_USA-AZ1); to er de mistænkte skabelonvira (Bat_CoV_ZC45, Bat_CoV_ZXC21); to er SARS coronavirus (SARS_GZ02, SARS). RBM er fremhævet mellem to orange linjer. På trods af den høje sekvensidentitet for de samlede genomer adskiller RBM af SARS-CoV-2 sig klart signifikant fra dem for ZC45 og ZXC21. Spændende ligner RBM af SARS-CoV-2 stort set RBM af SARS Spike. Selvom dette ikke er en nøjagtig "kopi og indsæt", afslører en omhyggelig undersøgelse af Spike-hACE2-strukturer^{37,38}, at alle rester, der er vigtige for enten hACE2-binding eller proteinfoldning (orange sticks i figur 3C, og hvad der er fremhævet med røde korte linjer i figur 4) bliver "holdt". De fleste af disse væsentlige rester er nøjagtigt bevaret, herunder dem, der er involveret i dannelse af disulfidbinding (C467, C474) og elektrostatiske interaktioner (R444, E452, R453, D454), som er afgørende for RBM's strukturelle integritet (figur 3C og 4). De få ændringer inden for gruppen af essentielle rester er næsten udelukkende hydrofobe "substitutioner" (I428 \rightarrow L, L443 \rightarrow F, F460 \rightarrow Y, L472 \rightarrow F, Y484 \rightarrow Q), som hverken bør påvirke proteinfoldning eller hACE2-interaktion. Samtidig har størstedelen af aminosyreresterne, der er ikke-essentielle, "muteret" (figur 4, RBM-rester, der ikke er mærket med korte røde streger). At dømme ud fra denne sekvensanalyse alene var vi tidligt overbeviste om, at ikke kun SARS-CoV-2 Spike-proteinet ville binde hACE2, men også at bindingen ville ligne præcist den mellem det originale SARS Spike-protein og hACE2²³. Det nylige strukturarbejde har bekræftet vores forudsigelse³⁹.

Som beskrevet nedenfor er den måde, hvorpå SARS-CoV-2 RBM ligner SARS-CoV RBM og det samlede sekvensbevaringsmønster mellem SARS-CoV-2 og ZC45 / ZXC21, meget usædvanlig. Samlet antyder dette, at dele af SARS-CoV-2 genomet ikke er afledt af naturlig kvasi-art viral partikeludvikling.

Hvis SARS-CoV-2 faktisk kommer fra naturlig udvikling, kunne dens RBM kun være erhvervet på en af de to mulige ruter: 1) en gammel rekombinationsbegivenhed efterfulgt af konvergent udvikling eller 2) en naturlig rekombinationshændelse, der fandt sted temmelig for nylig.

I det første scenarie ville forfædren til SARS-CoV-2, et ZC45 / ZXC21-lignende bat coronavirus have rekombineret og "byttet" sin RBM med et coronavirus, der bærer en relativt "komplet" RBM (med henvisning til SARS). Denne rekombination ville resultere i et nyt ZC45 / ZXC21-lignende coronavirus med alle huller i dets RBM "fyldt" (figur 4). Derefter ville virussen skulle tilpasse sig meget i sin nye vært, hvor ACE2-proteinet er meget homologt med hACE2. Tilfældige mutationer på tværs af genomet skulle have fundet sted for i sidste ende at forme RBM til sin nuværende form - der ligner SARS-CoV RBM på en meget intelligent måde. Denne konvergente evolutionsproces vil imidlertid også resultere i akkumulering af en stor mængde mutationer i andre dele af genomet, hvilket gør den samlede sekvensidentitet relativt lav. Højsekvensidentiteten mellem SARS-CoV-2 og ZC45 / ZXC21 på forskellige proteiner (94-100% identitet) understøtter ikke dette scenario og indikerer derfor tydeligt, at SARS-CoV-2, der bærer en sådan RBM, ikke kan komme fra en ZC45 / ZXC21-lignende bat coronavirus gennem denne konvergerende evolutionære rute.

I det andet scenario skulle det ZC45 / ZXC21-lignende coronavirus for nylig have været rekombineret og byttet sin RBM med et andet coronavirus, der med succes havde tilpasset sig til at binde et dyr ACE2 meget homologt til hACE2. Sandsynligheden for en sådan begivenhed afhænger delvis af de generelle krav til naturlig rekombination: 1) de to forskellige vira deler signifikant sekvenslighed; 2) de skal saminficere og være til stede i den samme celle af det samme dyr; 3) den rekombinante virus ville ikke blive ryddet af værten eller gøre værten uddød; 4) den rekombinante virus skulle til sidst blive stabil og overførbart inden for værtsarten.

Med hensyn til dette nylige rekombinationsscenario kunne dyrereservoiret ikke være flagermus, fordi ACE2-proteinerne i flagermus ikke er homologe nok til hACE2, og tilpasningen ville derfor ikke være i stand til at give en RBM-sekvens som set i SARS-CoV-2. Dette dyrereservoir kunne heller ikke være mennesker, da det ZC45 / ZXC21-lignende coronavirus ikke ville være i stand til at inficere mennesker. Derudover har der ikke været nogen tegn på, at nogen SARS-CoV-2 eller SARS-CoV-2-lignende virus cirkulerer i den menneskelige befolkning inden slutningen af 2019. Spændende ifølge en nylig bioinformatikundersøgelse var SARS-CoV-2 godt -tilpasset til mennesker siden starten af udbruddet¹.

Kun en anden mulighed for naturlig udvikling er tilbage, hvilket er, at den ZC45 / ZXC21-lignende virus og et coronavirus indeholdende en SARS-lignende RBM kunne have rekombineret i en mellemliggende vært, hvor ACE2-proteinet er homologt med hACE2. Flere laboratorier har rapporteret, at nogle af Sunda-pangolinerne, der blev smuglet til Kina fra Malaysia, bar coronavirus, hvis receptorbindende domæne (RBD) næsten er identisk med SARS-CoV-2's^{27-29,31}. De fortsatte derefter med at antyde, at pangoliner er den sandsynlige mellemvært for SARS-CoV-2^{27-29,31}. Imidlertid har nylige uafhængige rapporter fundet betydelige mangler i disse data⁴⁰⁻⁴². Desuden er der i modsætning til disse rapporter^{27-29,31} ikke påvist coronavirus i Sunda-pangolin-prøver, der er indsamlet i over et årti i Malaysia og Sabah mellem 2009 og 2019⁴³. En nylig undersøgelse viste også, at RBD, som deles mellem SARS-CoV-2 og rapporterede pangolin coronavirus, binder sig til hACE2 ti gange stærkere end til pangolin ACE2², hvilket yderligere afskediger pangoliner som den mulige mellemvært. Endelig indikerede en *in silico*-undersøgelse, samtidig med at tanken om, at pangoliner sandsynligvis ikke er en mellemliggende vært, gentog, at ingen af de dyre ACE2-proteiner, der blev undersøgt i deres undersøgelse, udviste et mere gunstigt bindingspotentiale til SARS-CoV-2 Spike-proteinet end hACE2 gjorde³. Denne sidste undersøgelse fritog stort set alle dyr fra deres formodede roller som mellemvær³, hvilket er i overensstemmelse med observationen om, at SARS-CoV-2 var godt tilpasset mennesker fra starten af udbruddet¹. Dette er signifikant, fordi disse fund tilsammen antyder, at der ikke synes at eksistere nogen mellemliggende vært for SARS-CoV-2, hvilket i det mindste mindsker muligheden for, at en rekombinant hændelse forekommer i en mellemliggende vært.

Selvom vi ignorerer ovenstående beviser for, at der ikke findes en ordentlig vært for rekombinationen, og i stedet antager, at en sådan vært findes, er det stadig meget usandsynligt, at en sådan rekombinationshændelse kunne forekomme i naturen.

Som vi har beskrevet ovenfor, hvis naturlig rekombinationshændelse er ansvarlig for udseendet af SARS-CoV-2, ville den ZC45 / ZXC21-lignende virus og et coronavirus indeholdende en SARS-lignende RBM skulle rekombinere i den samme celle ved at bytte S1 / RBM, som er en sjælden form for rekombination. Da SARS kun har fundet sted én gang i menneskets historie, ville det i det mindste være lige så sjældent for naturen at producere en virus, der ligner SARS på en så intelligent måde - at have en

RBM, der kun adskiller sig fra SARS RBM på nogle få ikke-essentielle steder (figur 4). Muligheden for, at dette unikke SARS-lignende coronavirus vil opholde sig i den samme celle med det ZC45 / ZXC21-lignende forfædervirus, og de to vira ville rekombineres på den "RBM-swapping" måde, er ekstremt lav. Vigtigere er, at denne og den anden rekombinationshændelse beskrevet nedenfor i afsnit 1.3 (endnu mere umulig at forekomme i naturen) begge skulle ske for at producere en Spike som set i SARS-CoV-2.

Mens ovenstående beviser og analyser tilsyneladende afviser en naturlig oprindelse af SARS-CoV-2s RBM, viser rigelig litteratur, at gain-of-function-forskning, hvor Spike-proteinet i et coronavirus blev specielt konstrueret, gentagne gange har ført til en vellykket generation af humanificerende coronavirus fra coronavirus af ikke-human oprindelse⁴⁴⁻⁴⁷.

Record viser også, at forskningslaboratorier, for eksempel Wuhan Institute of Virology (WIV), med succes har udført sådanne undersøgelser, der arbejder med amerikanske forskere⁴⁵ og også arbejder alene⁴⁷. Derudover har WIV gennemført årtier lange koronavirusovervågningsundersøgelser og ejer derfor verdens største samling af coronavirus. Det er åbenbart, at den tekniske barriere ikke eksisterer for WIV og andre relaterede laboratorier til at udføre og lykkes med sådan Spike / RBM engineering og gain-of-function research.



Figur 5. To restriktionssteder er til stede i hver ende af RBM af SARS-CoV-2, hvilket giver bekvemmelighed til erstatning af RBM inden i piggenet. A. Nukleotidsekvens af RBM af SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1). Et EcoRI-sted findes i 5'-enden af RBM og et BstEII-sted i 3'-enden. B. Selvom disse to restriktionssteder ikke findes i det originale spike-gen i ZC45, kan de bekvemt introduceres i betragtning af, at sekvensforskellen er lille (2 nukleotider) i begge tilfælde. C. Aminosyresekvensjustering med RBM-regionen fremhævet (farve og understregning). Den RBM, der er fremhævet med orange (øverst), er, hvad der er defineret af EcoRI- og BstEII-stedene i SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1) -spidsen. RBM fremhævet i magenta (midten) er regionen byttet af Dr. Fang Li og kolleger ind i en SARS Spike ryggrad³⁹. Den RBM, der er fremhævet med blå (nederst), er fra Spike-proteinet (RBM: 424-494) af SARS-BJ01 (AY278488.2).

som blev byttet af Shi-laboratoriet ind i Spike-proteinerne i forskellige bat coronavirus, der erstattede de tilsvarende segmenter⁴⁷.

Påfaldende, i overensstemmelse med RBM engineering teorien, har vi identificeret to unikke restriktionssteder, EcoRI og BstEII, i hver ende af RBM af henholdsvis SARS-CoV-2 genomet (figur 5A). Disse to steder, som er populære valg af molekylær kloning i hverdagen, findes ikke i resten af dette piggen. Denne særlige indstilling gør det ekstremt praktisk at bytte RBM inden for spids, hvilket giver en hurtig måde at teste forskellige RBM'er og de tilsvarende Spike-proteiner på.

Sådanne EcoRI- og BstEII-steder findes ikke i spike-generne af andre β -coronavirus, hvilket stærkt indikerer, at de var unaturlige og specifikt blev introduceret i dette spike-gen af SARS-CoV-2 for at gøre det lettere at manipulere den kritiske RBM. Selvom ZC45 spike heller ikke har disse to steder (figur 5B), kan de introduceres meget let som beskrevet i del 2 i denne rapport.

Det er bemærkelsesværdigt, at introduktion af EcoRI-stedet her ville ændre de tilsvarende aminosyrer fra -WNT- til -WNS- (figur 5AB). Så vidt vi ved, bærer alle SARS og SARS-lignende bat coronavira udelukkende en T (threonin) rest på dette sted. SARS-CoV-2 er den eneste undtagelse, idet denne T har muteret til en S (serin), undtagen de mistænkelige RaTG13 og pangolin coronavirus, der blev offentliggjort efter udbruddet⁴⁸.

Når først restriktionsstederne blev introduceret med succes, kunne RBM-segmentet udskiftes bekvemt ved anvendelse af rutinemæssig restriktionsenzymfordøjelse og ligering. Selvom alternative kloningsteknikker muligvis ikke efterlader spor af genetisk manipulation (Gibson-samling som et eksempel), kunne denne gammeldags tilgang vælges, fordi den giver et stort niveau af bekvemmelighed ved at bytte denne kritiske RBM.

I betragtning af at RBM fuldt ud dikterer hACE2-binding, og at SARS RBM-hACE2-binding fuldt ud var karakteriseret ved strukturer med høj opløsning (figur 3)^{37,38}, ville denne kun RBM-swap ikke være mere risikabel end den fulde Spike-swap. Faktisk er gennemførligheden af denne RBM-swap-strategi bevist^{39,47}. I 2008 byttede Dr. Zhengli Shis gruppe en SARS RBM ind i Spike-proteinerne i flere SARS-lignende bat coronavirus efter at have introduceret et restriktionssted i et codon-optimeret piggen (figur 5C)⁴⁷. De validerede derefter bindingen af de resulterede kimære Spike-proteiner med hACE2. Desuden blev RBM af SARS-CoV-2 i en nylig publikation byttet ind i det receptorbindende domæne (RBD) af SARS-CoV, hvilket resulterede i en kimær RBD, der var fuldt funktionel i binding af hACE2 (figur 5C)³⁹. Påfaldende nok ligner de manipulerede RBM-segmenter i begge tilfælde næsten nøjagtigt den RBM, der er defineret af positionerne for EcoRI- og BstEII-stedene (figur 5C). Selvom der mangler kloningsdetaljer i begge publikationer^{39,47}, kan det tænkes, at de faktiske restriktionssteder kan variere afhængigt af piggenet, der modtager RBM-indsættelsen, samt bekvemmeligheden ved at indføre unikke restriktionssteder i områder af interesse. Det er bemærkelsesværdigt, at den tilsvarende forfatter af denne nylige publikation³⁹, Dr. Fang Li, har været en aktiv samarbejdspartner med Dr. Zhengli Shi siden 2010⁴⁹⁻⁵³. Dr. Li var den første person i verden, der strukturelt har belyst bindingen mellem SARS-CoV RBD og hACE2³⁸ og har været den førende ekspert i den strukturelle forståelse af Spike-ACE2-interaktioner^{38,39,53-56}. Det slående fund af EcoRI- og BstEII-restriktionssteder i hver ende af henholdsvis SARS-CoV-2 RBM og det faktum, at den samme RBM-region er blevet byttet af henholdsvis Dr. Shi og hendes langsigtede samarbejdspartner ved hjælp af restriktionsenzymfordøjelsesmetoder er

usandsynligt en tilfældighed. **Snarere er det rygepistolen, der beviser, at RBM / Spike af SARS-CoV-2 er et produkt af genetisk manipulation.**

Selvom det kan være praktisk at kopiere den nøjagtige rækkefølge af SARS RBM, ville det være for tydeligt et tegn på kunstigt design og manipulation. Den mere vildledende tilgang ville være at ændre et par ikke-væsentlige rester, samtidig med at de bevares, der er kritiske for binding. Dette design kunne styres godt af strukturer med høj opløsning (figur 3)^{37,38}. På denne måde, når den samlede sekvens af RBM ser ud til at være mere forskellig fra den for SARS RBM, ville hACE2-bindingsevnen være godt bevaret. Vi mener, at alle de vigtige rester (rester mærket med røde pinde i figur 4, som er de samme rester vist i pinde i figur 3C) burde have været "holdt". Som beskrevet tidligere, mens nogle skulle være direkte konservering, skulle nogle have været skiftet til rester med lignende egenskaber, hvilket ikke ville forstyrre hACE2-binding og måske endda styrke foreningen yderligere. Det er vigtigt, at ændringer muligvis er foretaget med vilje på ikke-væsentlige steder, hvilket gør det mindre som en "kopi og indsæt" af SARS RBM.

1.3 Et usædvanligt furinspaltningssted er til stede i Spike-proteinet fra SARS-CoV-2 og er forbundet med den forstørrede virulens af virussen

Et andet unikt motiv i Spike-proteinet fra SARS-CoV-2 er et flerbasisisk furinspaltningssted placeret ved S1 / S2-krydset (figur 4, segment imellem to grønne linjer). Et sådant sted kan genkendes og spaltes af furinproteasen. Inden for slægten B for β -coronavirus og med undtagelse af SARS-CoV-2 indeholder ingen vira et furin-spaltningssted ved S1 / S2-krydset (figur 6)⁵⁷. I modsætning hertil er furin-spaltningssted på dette sted blevet observeret i andre grupper af coronavirus^{57,58}. Visst selektivt tryk ser ud til at være på plads, der forhindrer slægten B for β -coronavirus i at erhverve eller opretholde et sådant sted i naturen.

Human SARS-CoV BJ01	655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
Human SARS-CoV CUHK-W1	655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
Human SARS-CoV Tor2	655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
Human SARS-CoV Frankfurt-1	655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
Human SARS-CoV Urbani	655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
Civet SARS-CoV civet020	655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
Civet SARS-CoV sz16	655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
Raccoon dog SARS-CoV A030	655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
SARS-CoV-2	669 - GICASYQTQNSPRRARSVA - 688
Pangolin CoV MP789	n/a - GICASYQTQNS----RSVS - n/a
Bat SARSr-CoV RaTG13	669 - GICASYQTQNS----RSVA - 684
Bat SARSr-CoV LYRa11	659 - GICASYHTASLL----RNTD - 674
Bat SARSr-CoV LYRa3	659 - GICASYHTASLL----RNTG - 674
Bat SARSr-CoV RsSHC014	656 - GICASYHTVSSL----RSTS - 671
Bat SARSr-CoV Rs4084	656 - GICASYHTVSSL----RSTS - 671
Bat SARSr-CoV WIV1	656 - GICASYHTVSSL----RSTS - 671
Bat SARSr-CoV Rs3367	656 - GICASYHTVSSL----RSTS - 671
Bat SARSr-CoV Rs7327	656 - GICASYHTVSSL----RSTS - 671
Bat SARSr-CoV Rs9401	656 - GICASYHTVSSL----RSTS - 671
Bat SARSr-CoV Rs4231	655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
Bat SARSr-CoV WIV16	655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
Bat SARSr-CoV Rs4874	655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
Bat SARSr-CoV ZC45	646 - GICASYHTASLL----RSTS - 661
Bat SARSr-CoV ZXC21	645 - GICASYHTASLL----RSTG - 660
Bat SARSr-CoV Rf4092	634 - GICASYHTASTL----RSGV - 649
Bat SARSr-CoV Rf/JL2012	636 - GICASYHTASLL----RSTG - 651
Bat SARSr-CoV JTMCL5	636 - GICASYHTASLL----RSTG - 651
Bat SARSr-CoV 16B0133	636 - GICASYHTASLL----RSTG - 651
Bat SARSr-CoV B15-21	636 - GICASYHTASLL----RSTG - 651
Bat SARSr-CoV YN2013	633 - GICASYHTASTL----RSIG - 648
Bat SARSr-CoV AnLong-103	633 - GICASYHTASTL----RSVG - 648
Bat SARSr-CoV Rp/Shaanxi2011	640 - GICASYHTASVL----RSTG - 655
Bat SARSr-CoV Rs/HuB2013	641 - GICASYHTASVL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV YNLF/34C	641 - GICASYHTASVL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV YNLF/31C	641 - GICASYHTASVL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV Rf1	641 - GICASYHTASHL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV 273	641 - GICASYHTASHL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV Rf/SX2013	639 - GICASYHTASLL----RSTG - 654
Bat SARSr-CoV Rf/HeB2013	641 - GICASYHTASLL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV Cp/Yunnan2011	641 - GICASYHTASLL----RNTG - 656
Bat SARSr-CoV Rs672	641 - GICASYHTASTL----RSVG - 656
Bat SARSr-CoV Rs4255	641 - GICASYHTASTL----RSVG - 656
Bat SARSr-CoV 4081	641 - GICASYHTASTL----RSVG - 656
Bat SARSr-CoV Rm1	641 - GICASYHTASVL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV 279	641 - GICASYHTASVL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV Rs/GX2013	642 - GICASYHTASVL----RSTG - 657
Bat SARSr-CoV Rs806	641 - GICASYHTASLL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV HKU3-1	642 - GICASYHTASVL----RSTG - 657
Bat SARSr-CoV Longquan-140	642 - GICASYHTASVL----RSTG - 657
Bat SARSr-CoV Rp3	641 - GICASYHTASTL----RSVG - 656
Bat SARSr-CoV Rs4247	642 - GICASYHTASTL----RSVG - 657
Bat SARSr-CoV Rs4237	641 - GICASYHTASTL----RSVG - 656
Bat SARSr-CoV As6526	641 - GICASYHTASTL----RSVG - 656

Figur 6. Furinspaltningssted fundet ved S1 / S2-krydset mellem Spike er unikt for SARS-CoV-2 og fraværende i andre afstamning B β -coronavirus. Figur gengivet fra Hoffmann et al⁵⁷.

Som tidligere beskrevet spaltes Spike-proteinet under celleindgangsprocessen først ved S1 / S2-krydset. Dette trin og en efterfølgende spaltning nedstrøms, der udsætter fusionspeptidet, medieres begge af værtsproteaser. Tilstedeværelsen eller fraværet af disse proteaser i forskellige celletyper påvirker i høj grad celle-tropismen og formodentlig patogeniciteten af virusinfektionen. I modsætning til andre proteaser udtrykkes furinprotease bredt i mange typer celler og er til stede på flere cellulære og ekstracellulære placeringer. Vigtigere er det, at introduktionen af et furinspaltningssted ved S1 / S2-krydset kunne forbedre infektionsevnen af en virus markant samt i høj grad udvide dens celle-tropisme - et fænomen, der er veldokumenteret i både influenzavirus og andre coronavirus⁵⁹⁻⁶⁵.

Hvis vi udelader det faktum, at der ikke findes noget furinspaltningssted i nogen afstamning B β coronavirus i naturen og i stedet antager, at dette sted i SARS-CoV-2 er et resultat af naturlig udvikling, så er kun en evolutionær vej mulig, hvilket er, at furinspaltningsstedet skal afledes fra en homolog rekombinationshændelse. Specifikt vil en forfader β -coronavirus, der ikke indeholder noget furinspaltningssted, skulle rekombinere med et nært beslægtet coronavirus, der indeholder et furinspaltningssted.

To fakta misbilliger imidlertid denne mulighed. For det første, selvom nogle coronavirus fra andre grupper eller slægter indeholder flerbasiske furinspaltningssteder, indeholder ingen af dem den nøjagtige flerbasiske sekvens til stede i SARS-CoV-2 (-PRRAR / SVA-). For det andet er sekvensidentiteten på Spike mellem SARS-CoV-2 og ethvert coronavirus indeholdende et legitimt furinspaltningssted ikke mere end 40%⁶⁶. Et så lavt niveau af sekvensidentitet udelukker muligheden for en vellykket homolog

rekombination, der nogensinde finder sted mellem forfædrene til disse vira. Derfor er det usandsynligt, at furinspaltningsstedet i SARS-CoV-2 Spike-proteinet er af naturlig oprindelse og i stedet bør være et resultat af laboratorieændringer.

I overensstemmelse med dette krav har en tæt undersøgelse af nukleotidsekvensen af furinspaltningsstedet i SARS-CoV-2-spids afsløret, at de to på hinanden følgende Arg-rester i den indsatte sekvens (-PRRA-) begge er kodet af den sjældne codon CGG (mindst anvendte codon til Arg i SARS-CoV-2) (figur 7)⁸. Faktisk er dette CGGCGG-arrangement det eneste tilfælde, der findes i SARS-CoV-2-genomet, hvor denne sjældne kodon bruges i tandem. Denne observation antyder kraftigt, at dette furinspaltningssted skal være et resultat af genteknologi. Tilføjelse til mistanken formuleres et FauI-restriktionssted af kodonvalgene her, hvilket antyder muligheden for, at restriktionsfragmentlængden polymorfisme, en teknik, som et WIV-laboratorium er dygtig til⁶⁷, kunne have været involveret. Der kunne fragmenteringsmønstret, der var resultatet af FauI-fordøjelse, bruges til at overvåge konserveringen af furinspaltningsstedet i Spike, da dette furinspaltningssted er tilbøjelig til sletninger in vitro^{68,69}. Specifikt kunne RT-PCR på spike-genet fra de genvundne vira fra cellekulturer eller laboratoriedyr udføres, hvis produkt ville blive udsat for FauI-fordøjelse. Virus, der fastholder eller mister furinspaltningsstedet, ville derefter give forskellige mønstre, hvilket muliggør bekvem sporing af den eller de vira, der er af interesse.

FauI

```
tat cag act cag act aat tct cct cgg cgg gca cgt agt gta gct agt caa tcc atc att
  Y  Q  T  Q  T  N  S  P  R  R  A  R  S  V  A  S  Q  S  I  I
```

Figur 7. To på hinanden følgende Arg-rester i -PRRA- indsættelsen ved S1 / S2-krydset af SARS-CoV-2 Spike er begge kodet af en sjælden kodon, CGG. Et FauI-restriktionssted, 5'-(N)6GCGGG-3', er indlejret i den kodende sekvens af det "indsatte" PRRA-segment, som kan bruges som en markør til at overvåge bevaringen af det indførte furinspaltningssted.

Derudover, selvom ingen kendte coronavirus indeholder den nøjagtige sekvens af -PRRAR / SVA-, der er til stede i SARS-CoV-2 Spike-proteinet, er en lignende -RRAR / AR- sekvens blevet observeret ved S1 / S2-krydset af Spike protein i et gnavekoronavirus, AcCoV-JC34, som blev offentliggjort af Dr. Zhengli Shi i 2017⁷⁰. Det er tydeligt, at legitimiteten af -RRAR- som et funktionelt furinspaltningssted har været kendt af WIV-eksperterne siden 2017.

Beviserne antyder kollektivt, at furinspaltningsstedet i SARS-CoV-2 Spike-proteinet muligvis ikke er kommet fra naturen og kan være et resultat af genetisk manipulation. Formålet med denne manipulation kunne have været at vurdere enhver potentiel forbedring af infektionsevnen og patogeniciteten af det laboratoriefremstillede coronavirus⁵⁹⁻⁶⁴. Faktisk har nylige undersøgelser bekræftet, at furinspaltningsstedet giver SARS-CoV-2 signifikante patogene fordele^{57,68}.

1.4 Oversigt

Bevis præsenteret i denne del afslører, at visse aspekter af SARS-CoV-2 genomet er ekstremt vanskelige at forene med at være et resultat af naturlig udvikling. Den alternative teori, vi foreslår, er, at virussen kan være oprettet ved hjælp af ZC45 / ZXC21 bat coronavirus (r) som ryggraden og / eller skabelonen. Spike-proteinet, især RBM i det, skulle have været kunstigt manipuleret, hvorpå virussen har erhvervet evnen til at binde hACE2 og inficere mennesker. Dette understøttes af konstateringen af et unikt restriktionsenzymfordøjelsessted i hver ende af RBM. Et usædvanligt furinspaltningssted kan være blevet

introduceret og indsat ved S1 / S2-krydset af Spike-proteinet, hvilket bidrager til den øgede virulens og patogenicitet af virussen. Disse transformationer har derefter iscenesat SARS-CoV-2-viruset for til sidst at blive et meget overførbart, debut-skjult, dødeligt, følgetilklar, og massivt forstyrrende patogen.

Det er åbenbart, at muligheden for, at SARS-CoV-2 kunne have været skabt gennem manipulation med gain-of-function ved WIV, er betydelig og bør undersøges grundigt og uafhængigt.

2. Afgrænsning af en syntetisk rute af SARS-CoV-2

I anden del af denne rapport beskriver vi en syntetisk rute til oprettelse af SARS-CoV-2 i laboratorieindstillinger. Det postuleres baseret på væsentlig litteraturstøtte såvel som genetisk bevis, der er til stede i SARS-CoV-2 genomet. Selvom trin, der præsenteres heri, ikke skal ses som nøjagtigt dem, der er taget, mener vi, at nøgleprocesser ikke bør være meget forskellige. Det er vigtigt, at vores arbejde her skal tjene som en demonstration af, hvordan SARS-CoV-2 kan designes og oprettes bekvemt i forskningslaboratorier ved at følge gennemprøvede koncepter og ved hjælp af veletablerede teknikker.

Det er vigtigt, at forskningslaboratorier, både i Hongkong og på det kinesiske fastland, fører verden inden for koronavirusforskning, både hvad angår ressourcer og på forskningsresultaterne. Sidstnævnte fremgår ikke kun af det store antal publikationer, som de har produceret i løbet af de sidste to årtier, men også af deres milepælsresultater inden for området: de var de første til at identificere civets som den mellemliggende vært for SARS-CoV og isolerede den første virusstamme⁷¹; de var de første til at afdække, at SARS-CoV stammer fra flagermus^{72,73}; de afslørede for første gang den antistofafhængige forstærkning (ADE) af SARS-CoV-infektioner⁷⁴; de har bidraget markant til forståelse af MERS inden for alle domæner (zoonose, virologi og kliniske studier)⁷⁵⁻⁷⁹; de fik flere gennembrud i SARS-CoV-2-forskning^{18,35,80}. Sidst men ikke mindst har de verdens største samling af coronavirus (genomiske sekvenser og levende vira). Viden, ekspertise og ressourcer er alle tilgængelige i Hongkongs og fastlandsforskningslaboratorier (de samarbejder meget) for at udføre og udføre det arbejde, der er beskrevet nedenfor.

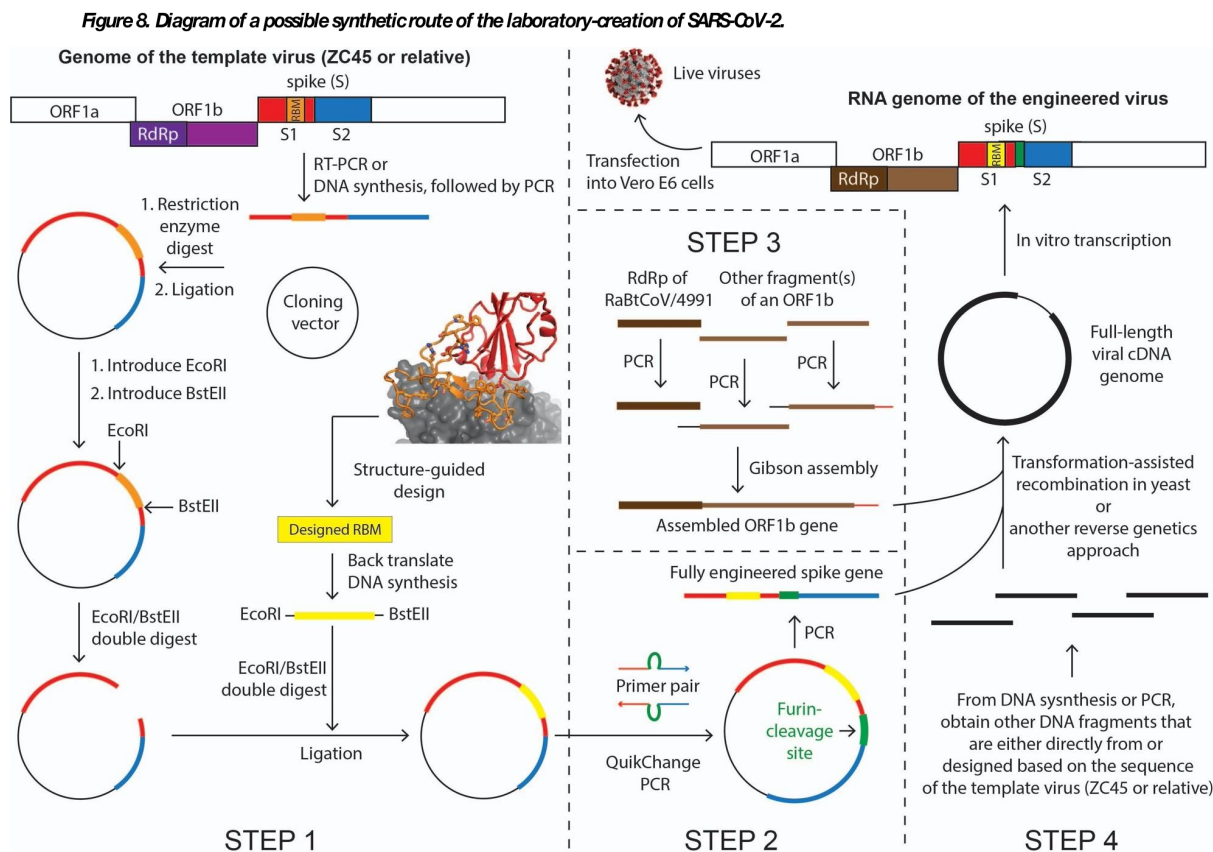


Figure 8. Diagram of a possible synthetic route of the laboratory-creation of SARS-CoV-2.

2.1 Mulig ordning i design af laboratorie-oprettelse af det nye coronavirus

I dette underafsnit skitserer vi den mulige overordnede strategi og vigtige overvejelser, der kan være formuleret i projektets designfase.

For at konstruere og oprette et menneskeligt målrettet coronavirus skal de vælge et bat coronavirus som skabelon / rygrad. Dette kan bekvemt gøres, fordi mange forskningslaboratorier aktivt har indsamlet bat coronavirus i løbet af de sidste to årtier^{32,33,70,72,81-85}. Imidlertid burde denne skabelonvirus ideelt set ikke være en fra Dr. Zhengli Shis samlinger, i betragtning af at hun er almindeligt kendt for at have været involveret i gevinst-til-funktion-undersøgelser af coronavirus. Derfor er ZC45 og / eller ZXC21, nye bat coronavirus, der er opdaget og ejet af militære laboratorier³³, velegnet som skabelon/rygrad. Det er også muligt, at disse militærlaboratorier havde opdaget andre nært beslægtede vira fra samme sted og holdt nogle upublicerede. Derfor kan den aktuelle skabelon være ZC45 eller ZXC21 eller en nær slægtning til dem. Den postulerede vej beskrevet nedenfor ville være den samme uanset hvilken af de tre der var den aktuelle skabelon.

Når de først har valgt en skabelonvirus, skal de først konstruere Spike-proteinet gennem molekylær kloning, så det kan binde hACE2. Konceptet og kloningsteknikkerne involveret i denne manipulation er blevet veldokumenteret i litteraturen^{44-46,84,86}. Med næsten ingen risiko for at fejle kunne skabelonbatvirussen derefter konverteres til et coronavirus, der kan binde hACE2 og inficere mennesker⁴⁴⁻⁴⁶.

For det andet ville de bruge molekylær kloning til at indføre et furinspaltningssted ved S1/S2-krydset mellem Spike. Denne manipulation, baseret på kendt viden^{60,61,65}, ville sandsynligvis producere en stamme af coronavirus, der er mere smitsom og patogen.

For det tredje ville de producere en ORF1b-genkonstruktion. ORF1b-genet koder for polyproteinet Orf1b, der behandles posttranslationelt for at producere individuelle virale proteiner: RNA-afhængig RNA-polymerase (RdRp), helicase, guanidin-N7-methyltransferase, uridylatspecifik endoribonuklease og 2'-O-methyltransferase. Alle disse proteiner er dele af virusens replikationsmaskineri. Blandt dem er RdRp-proteinet det mest afgørende og er meget konserveret blandt coronavirus. Det er vigtigt, at Dr. Zhengli Shis laboratorium bruger en PCR-protokol, som forstærker et bestemt fragment af RdRp-genet, som deres primære metode til at detektere tilstedeværelsen af coronavirus i rå prøver (bat fecal swap, feces osv.). Som et resultat af denne praksis har Shi-gruppen dokumenteret sekvensoplysningerne for dette korte segment af RdRp for alle coronavirus, som de med succes har fundet og / eller samlet.

Her er den genetiske manipulation mindre krævende eller kompliceret, fordi Orf1b er konserveret og sandsynligvis ville Orf1b fra ethvert β -coronavirus være kompetent nok til at udføre arbejdet. Vi mener dog, at de ønsker at introducere en bestemt Orf1b i virussen af en af de to mulige årsager:

1. Da mange fylogenetiske analyser kategoriserer coronavirus kun ud fra sekvensligheden af RdRp-genet^{18,31,35,83,87}, kan det at have en anden RdRp i genomet sikre, at SARS-CoV-2 og ZC45 / ZXC21 adskilles i forskellige grupper / underlinjer i fylogenetiske undersøgelser. At vælge et RdRp-gen er imidlertid praktisk, fordi den korte RdRp-segmentsekvens er blevet registreret for alle coronavirus, der nogensinde er indsamlet / påvist. Deres endelige valg var RdRp-sekvensen fra bat coronavirus RaBtCoV / 4991, som blev opdaget i 2013. For RaBtCoV / 4991 var den eneste information, der nogensinde blev offentliggjort, sekvensen af dens korte RdRp-segment⁸³, mens hverken dens fulde genomiske sekvens eller virusisolering nogensinde var rapporteret. Efter amplifikation af RdRp-segmentet (eller hele ORF1b-genet) af RaBatCoV / 4991 ville de derefter have brugt det til efterfølgende samling og oprettelse af genomet af SARS-CoV-2. Små ændringer i RdRp-sekvensen kunne enten introduceres i begyndelsen (gennem DNA-syntese) eller genereres via passager senere. Når de var involveret i fabrikationen af RaTG13-sekvensen på et separat spor, kunne de have startet med det korte RdRp-segment af RaBtCoV / 4991 uden at indføre ændringer i dens sekvens, hvilket resulterede i en 100% nukleotidsekvensidentitet mellem de to vira på dette korte RdRp-segment⁸³. Denne RaTG13-virus kunne derefter hævdes at være opdaget tilbage i 2013.
2. RdRp-proteinet fra RaBatCoV / 4991 er unikt, fordi det er bedre end RdRp fra noget andet β -coronavirus til udvikling af antivirale lægemidler. RdRp har ingen homologer i humane celler, hvilket gør dette essentielle virale enzym til et meget ønskeligt mål for antiviral udvikling. Som et eksempel er Remdesivir, som i øjeblikket gennemgår kliniske forsøg, målrettet mod RdRp. Når de opretter en ny og human-targeting virus, ville de også være interesserede i at udvikle modgiften. Selvom lægemiddelopdagelse som denne muligvis ikke let kan opnås, er det rimeligt for dem med vilje at inkorporere en RdRp, der er mere modtagelig for antiviral lægemiddeludvikling.

Fjerde, de ville bruge omvendt genetik til at samle genfragmenterne af pigge, ORF1b og resten af skabelonen ZC45 i en cDNA-version af det virale genom. De ville derefter udføre in

vitro-transkription for at opnå det virale RNA-genom. Transfektion af RNA-genomet til celler vil muliggøre genopretning af levende og infektiøse vira med det ønskede kunstige genom.

Femte, de udførte karakterisering og optimering af virusstammen/-stammerne for at forbedre egnetheden, infektiviteten og den samlede tilpasning ved anvendelse af seriel passage *in vivo*. En eller flere virale stammer, der opfylder bestemte kriterier, opnås derefter som slutprodukt (er).

2.2 En postuleret syntetisk rute til oprettelse af SARS-CoV-2

I dette underafsnit beskriver vi mere detaljeret, hvordan hvert trin kunne udføres i laboratorieindstillinger ved hjælp af tilgængelige materialer og rutinemæssige molekyllære, cellulære og virologiske teknikker. Et diagram over denne proces er vist i figur 8. Vi estimerer, at hele processen kan være afsluttet på cirka 6 måneder.

Trin 1: Engineering RBM af Spike til hACE2-binding (1,5 måneder)

Spike-proteinet fra et flagermus-coronavirus er enten ude af stand til eller ineffektivt i at binde hACE2 på grund af manglen på vigtige rester i dets RBM. Dette kan eksemplificeres ved RBM fra skabelonvirussen ZC45 (figur 4). Det første og mest kritiske trin i oprettelsen af SARS-CoV-2 er at konstruere Spike, så den får evnen til at binde hACE2. Som det fremgår af litteraturen, er sådanne manipulationer blevet udført gentagne gange i forskningslaboratorier siden 2008, som med succes gav manipulerede coronavirus med evnen til at inficere humane celler. Selvom der er mange mulige måder, hvorpå man kan konstruere Spike-proteinet, mener vi, at det, der faktisk blev foretaget, var at de erstattede den oprindelige RBM med en designet og muligvis optimeret RBM ved hjælp af SARS RBM som en vejledning. Som beskrevet i del 1 understøttes denne teori af vores observation, at to unikke restriktionssteder, EcoRI og BstEII, findes i hver ende af RBM i SARS-CoV-2 genomet (figur 5A) og af det faktum, at sådan RBM- swap er med succes udført af Dr. Zhengli Shi og af hendes langsigtede samarbejdspartner og strukturbiologiske ekspert, Dr. Fang Li.

Selvom ZC45 spike ikke indeholder disse to begrænsningssteder (figur 5B), kan de introduceres meget let. Det oprindelige piggen ville enten blive amplificeret med RT-PCR eller opnået gennem DNA-syntese (nogle ændringer kunne sikkert introduceres i visse variable regioner i sekvensen) efterfulgt af PCR. Genet blev derefter klonet ind i et plasmid ved anvendelse af andre restriktionssteder end EcoRI og BstEII. En gang i plasmidet kan piggenet let modificeres. For det første kan et EcoRI-sted introduceres ved at konvertere den fremhævede "gaacac" -sekvens (figur 5B) til den ønskede "gaattc" (figur 5A). Forskellen mellem dem er to på hinanden følgende nukleotider. Ved hjælp af det kommercielt tilgængelige QuikChange Site-Directed Mutagenesis-kit kan en sådan di-nukleotidmutation genereres på ikke mere end en uge. Derefter kunne BstEII-stedet introduceres på samme måde i den anden ende af RBM. Specifikt ville "gaatacc" -sekvensen (figur 5B) blive konverteret til den ønskede "ggttacc" (figur 5A), hvilket på lignende måde ville kræve en uges tid.

Når disse restriktionssteder, som er unikke inden for spikesgenet af SARS-CoV-2, blev introduceret med succes, kunne forskellige RBM-segmenter let byttes ind, og det resulterende Spike-protein blev derefter evalueret under anvendelse af etablerede assays.

Som beskrevet i del 1 kunne designet af et RBM-segment styres godt af strukturer med høj opløsning (figur 3)^{37,38}, hvilket giver en sekvens, der ligner SARS RBM på en intelligent måde. Når de udførte det strukturstyrede design af RBM, ville de have fulgt rutinen og genereret nogle få (for eksempel et dusin) sådanne RBM'er med håb om, at en eller flere specifikke variant (er) kan være bedre end andre i bindende hACE2. Når designet var færdigt, kunne de få hver af de designede RBM-gener syntetiseret kommercielt (hurtig og meget overkommelig) med et EcoRI-sted i 5'-enden og et BstEII-sted i 3'-enden. Disse nye RBM-gener kunne derefter klones i henholdsvis spike-genet. Gensyntese og efterfølgende kloning, som kunne udføres i en batch-tilstand for det lille bibliotek med designede RBM'er, ville tage cirka en måned.

Disse konstruerede Spike-proteiner kan derefter testes for hACE2-binding ved hjælp af de etablerede pseudotype-virusinfektionsassays^{45,49,50}. Den konstruerede Spike med gode til usædvanlige bindende tilhørsforhold ville blive valgt. (Selvom det ikke er nødvendigt, kunne der være involveret rettet udvikling her (fejludsat PCR på RBM-genet), kombineret med enten et in vitro-bindingsassay^{39,90} eller et pseudotype-virusinfektionsassay^{45,49,50} for at opnå en RBM, der binder hACE2 med enestående affinitet.)

I betragtning af den overflod af litteratur om Spike-teknik^{44-46,84,86} og de tilgængelige strukturer med høj opløsning i Spike-hACE2-komplekset^{37,38}, ville succesen af dette trin være meget garanteret. Ved afslutningen af dette trin opnås som ønsket et nyt spike-gen, der koder for et nyt Spike-protein, der er i stand til at binde hACE2 med høj affinitet.

Trin 2: Udvikling af et furinspaltningssted ved S1 / S2-krydset (0,5 måned)

Produktet fra trin 1, et plasmid indeholdende den konstruerede spids, ville blive yderligere modificeret til at omfatte et furinspaltningssted (segment angivet med grønne linjer i figur 4) ved S1/S2-krydset. Denne korte strækning af gensekvensen kan hensigtsmæssigt indsættes ved anvendelse af adskillige rutinemæssige kloningsteknikker, herunder QuikChange stedstyret PCR⁶⁰, overlappning af PCR efterfulgt af restriktionsenzymfordøjelse og ligering⁹¹ eller Gibson-samling. Ingen af disse teknikker vil efterlade spor i sekvensen. Uanset hvilken kloningsmetode der var valgt, ville det indsatte genstykke blive inkluderet i primerne, som ville blive designet, syntetiseret og anvendt i kloningen. Dette trin, der fører til en yderligere modificeret Spike med furin-spaltningsstedet tilføjet ved S1 / S2-krydset, kunne afsluttes på højst to uger.

Trin 3: Få et ORF1b-gen, der indeholder sekvensen af det korte RdRp-segment fra RaBtCoV /4991 (1 måned, men kan dog udføres samtidigt med trin 1 og 2)

I modsætning til engineering af Spike er der ikke behov for noget kompliceret design her, bortset fra at RdRp-gensegmentet fra RaBtCoV/4991 skulle medtages. Gibson-samling kunne have været brugt her. I denne teknik kombineres adskillige fragmenter, hvor hvert tilstødende par deler 20-40 bp overlappning, sammen i en simpel reaktion for at samle et langt DNA-produkt. To eller tre fragmenter, der hver dækker en signifikant sektion af ORF1b-genet, ville blive valgt baseret på kendte bat coronavirus-sekvenser. Et af disse fragmenter ville være RdRp-segmentet af RaBtCoV/4991⁸³. Hvert fragment ville blive PCR-amplificeret med passende overlappingsregioner indført i primerne. Endelig ville alle oprensede fragmenter blive samlet i ækvimolære koncentrationer og tilsat til Gibson-reaktionsblandingen, som efter en kort inkubation ville give det ønskede ORF1b-gen i sin helhed.

Trin 4: Producer det designede virale genom ved hjælp af omvendt genetik og genopret levende vira (0,5 måned)

Omvendt genetik er ofte blevet brugt til samling af hele virale genomer, herunder coronavirus-genomer^{67,92-96}. Det seneste eksempel er rekonstruktion af SARS-CoV-2 genomet ved hjælp af *transformationsassisteret rekombination i gær*⁹⁷. Ved hjælp af denne metode samlede den schweiziske gruppe hele virusgenomet og producerede levende vira på bare en uge⁹⁷. Denne effektive teknik, der ikke vil efterlade spor af kunstig manipulation i det skabte virale genom, har været tilgængelig siden 2017^{98,99}. Ud over det manipulerede *piggen* (fra trin 1 og 2) og *ORF1b*-genet (fra trin 3), andre fragmenter, der dækker resten af genomet, ville blive opnået enten gennem RT-PCR-amplifikation fra skabelonvirusen eller gennem DNA-syntese ved at følge en sekvens, der var let ændret fra skabelonvirusens. Vi mener, at den sidstnævnte fremgangsmåde var mere sandsynlig, da den ville tillade sekvensændringer indført i de variable regioner af mindre konserverede proteiner, hvis proces let kunne styres af flere sekvensjusteringer. Aminosyresekvenserne af mere konserverede funktioner, såsom E-proteinets, kunne have været uændret. Alle DNA-fragmenter ville derefter blive samlet sammen og transformeret til gær, hvor cDNA-versionen af SARS-CoV-2 genomet ville blive samlet via transformation-assisteret rekombination. Naturligvis kunne der også anvendes en alternativ metode til omvendt genetik^{67,92-96,100}, som WIV med succes har brugt tidligere⁶⁷. Selvom nogle tidligere omvendte genetiske tilgange kan efterlade restriktionssteder, hvor forskellige fragmenter ville blive forbundet, ville disse spor være svære at opdage, da det nøjagtige sted for ligering kan være hvor som helst i ~ 30 kb genomet. Uanset hvad ville en cDNA-version af virusgenomet opnås fra det omvendte genetiske eksperiment. Efterfølgende *in vitro*-transkription under anvendelse af cDNA som skabelon ville give det virale RNA-genom, som ved transfektion i Vero E6-celler ville tillade produktion af levende vira, der bærer alle de designede egenskaber.

Trin 5: Optimer virussen til fitness og forbedr dens hACE2-bindende affinitet *in vivo* (2,5-3 måneder)

Virus genvundet fra trin 4 skal tilpasses yderligere under det klassiske eksperiment - seriel passage i forsøgsdyr¹⁰¹. Dette sidste trin ville validere virussens egnethed og sikre dets receptororienterede tilpasning til den tilsigtede vært, som ifølge analyserne ovenfor burde være menneskelig. Vigtigere er, at RBM og furinspaltningstedet, som blev introduceret i Spike-proteinet separat, nu ville blive optimeret sammen som en funktionel enhed. Blandt forskellige tilgængelige dyremodeller (fx mus, hamstere, fitter og aber) til coronavirus, skulle hACE2 transgene mus (hACE2-mus) være det mest korrekte og bekvemme valg her. Denne dyremodel er blevet etableret under undersøgelsen af SARS-CoV og har været tilgængelig i Jackson Laboratory i mange år¹⁰²⁻¹⁰⁴.

Proceduren for seriel passage er ligetil. Kort fortalt ville den valgte virale stamme fra trin 4, en forløber for SARS-CoV-2, blive podet intranasalt i en gruppe bedøvede hACE2-mus. Cirka 2-3 dage efter infektion ville virussen i lungerne normalt forstærkes til en toptiter. Musene blev derefter ofret og lungerne homogeniseret. Normalt ville muselungesupernatanten, som bærer den højeste virale belastning, bruges til at ekstrahere kandidatvirus til næste passage. Efter ca. 10 ~ 15 runder med passage ville den hACE2-bindende affinitet, infektionseffektiviteten og dødeligheden af virusstammen blive tilstrækkeligt forbedret og virusgenomet stabiliseret¹⁰¹. Endelig, efter en række karakteriseringseksperimenter (f.eks. Viral kinetikanalyse, antistofresponsanalyse, symptomobservation og patologiundersøgelse), blev det endelige produkt, SARS-CoV-2, opnået og afsluttet hele

skabelsesprocessen. Fra dette tidspunkt kunne dette virale patogen amplificeres (sandsynligvis ved hjælp af Vero E6-celler) og produceres rutinemæssigt.

Det er bemærkelsesværdigt, at baseret på det arbejde, der er udført på SARS-CoV, er hACE2-musene, selvom de er egnede til SARS-CoV-2-tilpasning, ikke en god model til at afspejle viruss transmissibilitet og tilknyttede kliniske symptomer hos mennesker. Vi mener, at disse forskere måske ikke har brugt en ordentlig dyremodel (såsom den gyldne syriske hamster) til at teste overførbareheden af SARS-CoV-2 før udbruddet af COVID-19. Hvis de havde udført dette eksperiment med en korrekt dyremodel, ville SARS-CoV-2s meget smitsomme natur være yderst tydelig, og derfor ville SARS-CoV-2 ikke være blevet beskrevet som "ikke forårsager menneske-til-menneske-transmission" kl. starten på udbruddet.

Vi spekulerer også i, at den omfattende laboratorietilpasning, der er orienteret mod forbedret overførbarehed og dødelighed, muligvis har ført virussen for langt. Som et resultat kunne SARS-CoV-2 have mistet kapaciteten til at dæmpe både overførbarehed og dødelighed under dens nuværende tilpasning i den menneskelige befolkning. Denne hypotese er i overensstemmelse med manglen på tilsyneladende dæmpning af SARS-CoV-2 indtil videre på trods af dens store udbredelse og med observationen om, at en for nylig fremkommet, fremherskende variant kun viser forbedret overførbarehed¹⁰⁵⁻¹⁰⁸.

Seriell passage er en hurtig og intensiv proces, hvor tilpasningen af virussen accelereres. Selvom det er beregnet til at efterligne naturlig udvikling, er seriel passage meget mere begrænset i både tid og skala. Som et resultat kunne der forventes mindre tilfældige mutationer i seriel passage end i naturlig udvikling. Dette gælder især for konserverede virale proteiner, såsom E-proteinet. Kritisk i viral replikation, E-proteinet er en determinant for virulens, og engineering af det kan gøre SARS-CoV-2 svækket¹⁰⁹⁻¹¹¹. Derfor kunne disse forskere på det indledende samlingsstadium have besluttet at holde aminosyresekvensen for E-proteinet uændret fra ZC45 / ZXC21. På grund af E-proteinets konserverede natur og begrænsningerne i seriel passage forekom der faktisk ingen aminosyremutation, hvilket resulterede i en 100% sekvensidentitet på E-proteinet mellem SARS-CoV-2 og ZC45 / ZXC21. Det samme kunne være sket med mærkerne af molekylær kloning (restriktionssteder, der flankerer RBM). Seriel passage, som delvis skulle have naturaliseret SARS-CoV-2 genomet, havde muligvis ikke fjernet alle tegn på kunstig manipulation.

3. Afsluttende bemærkninger

Mange spørgsmål forbliver ubesvarede om oprindelsen af SARS-CoV-2. Fremtrædende virologer har impliceret i et *Nature Medicine*-brev, at laboratorieflygt, selvom det ikke er helt udelukket, var usandsynligt, og at der ikke er tegn på genetisk manipulation i SARS-CoV-2 genomet⁴. Her viser vi dog, at genetisk bevis inden for *spikesgenet* i SARS-CoV-2 genomet (restriktionssteder flankerende *RBM*; tandem sjældne kodoner anvendt på det indsatte furinspaltningssite) findes og antyder, at SARS-CoV-2 genomet skal være et produkt af genetisk manipulation. Desuden er de gennemprøvede begreber, veletablerede teknikker og viden og ekspertise alle på plads til den bekvemme oprettelse af dette nye coronavirus på kort tid.

Motiver til side er følgende fakta om SARS-CoV-2 godt understøttet:

1. Hvis det var et laboratorieprodukt, er det mest kritiske element i dets oprettelse, ryggraden / skabelonvirussen (ZC45 / ZXC21), ejet af militære forskningslaboratorier.

2. Genomsekvensen af SARS-CoV-2 har sandsynligvis gennemgået genteknologi, hvorigennem virussen har fået evnen til at målrette mod mennesker med forbedret virulens og infektivitet.
3. Karakteristika og patogene virkninger af SARS-CoV-2 er hidtil uset. Virussen er yderst overførbart, onsetskjult, målrettet mod flere organer, følgetyd uklar, dødelig og forbundet med forskellige symptomer og komplikationer.
4. SARS-CoV-2 forårsagede en verdensomspændende pandemi, der tog hundreder af tusinder af liv og lukkede den globale økonomi. Det har en destruktiv magt som ingen anden.

At dømme ud fra beviserne for, at vi og andre har samlet, mener vi, at det at finde oprindelsen til SARS-CoV-2 bør involvere en uafhængig revision af WIV P4-laboratorierne og laboratorierne hos deres nære samarbejdspartnere. En sådan undersøgelse burde have fundet sted for længe siden og burde ikke udsættes yderligere.

Vi bemærker også, at i offentliggørelsen af den kimære virus SHC015-MA15 i 2015 blev tilskrivningen af finansiering af Zhengli Shi fra NIAID oprindeligt udeladt. Det blev genindsat i publikationen i 2016 under en rettelse, måske efter mødet i januar 2016 for at genindføre NIH-finansiering til gevinst-til-funktion-forskning på vira. Dette er en usædvanlig videnskabelig adfærd, som har brug for en forklaring på.

Hvad der ikke er grundigt beskrevet i denne rapport, er de forskellige beviser, der indikerer, at flere for nylig offentliggjorte coronavirus (RaTG13¹⁸, RmYN02³⁰ og flere pangolin coronavirus^{27-29,31}) er meget mistænkelige og sandsynligvis falske. Disse fabrikationer tjener intet andet formål end at vildlede det videnskabelige samfund og offentligheden, så den sande identitet af SARS-CoV-2 skjules. Selvom udelukkelse af detaljer i sådan beviser ikke ændrer konklusionen af den aktuelle rapport, mener vi, at disse detaljer vil give yderligere støtte til vores påstand om, at SARS-CoV-2 er en laboratorieforbedret virus og et produkt med gevinst for funktionsforskning. En opfølgingsrapport, der fokuserer på sådanne yderligere beviser, udarbejdes nu og vil blive forelagt snart.

Anerkendelser

Vi vil gerne takke Daoyu Zhang for at dele resultaterne af mutationer i E-proteinerne i forskellige undergrupper af β -coronavirus med os. Vi takker også alle anonyme forskere og andre personer, der har bidraget til at afdække forskellige fakta forbundet med oprindelsen af SARS-CoV-2.

Referencer:

1. Zhan, S.H., Deverman, B.E. & Chan, Y.A. SARS-CoV-2 is well adapted for humans. What does this mean for re-emergence? bioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2020.05.01.073262> (2020).
2. Mou, H. et al. Mutations from bat ACE2 orthologs markedly enhance ACE2-Fc neutralization of SARS-CoV-2. bioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2020.06.29.178459> (2020).
3. Piplani, S., Singh, P.K., Winkler, D.A. & Petrovsky, N. In silico comparison of spike protein-ACE2 binding affinities across species; significance for the possible origin of the SARS-CoV-2 virus. arXiv, arXiv:2005.06199 (2020).
4. Andersen, K.G., Rambaut, A., Lipkin, W.I., Holmes, E.C. & Garry, R.F. The proximal origin of SARS-CoV-2. Nat Med 26, 450-452 (2020).
5. Maiti, A.K. On The Origin of SARS-CoV-2 Virus. Preprint (authorea.com), DOI: 10.22541/au.159355977.76503625 (2020).
6. Lin, X. & Chen, S. Major Concerns on the Identification of Bat Coronavirus Strain RaTG13 and Quality of Related Nature Paper. Preprints, 2020060044 (2020).
7. Bengston, D. All journal articles evaluating the origin or epidemiology of SARS-CoV-2 that utilize the RaTG13 bat strain genomics are potentially flawed and should be retracted. OSFPreprints, DOI: 10.31219/osf.io/wy89d (2020).
8. Segreto, R. & Deigin, Y. Is considering a genetic-manipulation origin for SARS-CoV-2 a conspiracy theory that must be censored? Preprint (Researchgate) DOI: 10.13140/RG.2.2.31358.13129/1 (2020).
9. Rahalkar, M.C. & Bahulikar, R.A. Understanding the Origin of ‘BatCoV RaTG13’, a Virus Closest to SARS-CoV-2. Preprints, 2020050322 (2020).
10. Robinson, C. Was the COVID-19 virus genetically engineered? (<https://gmwatch.org/en/news/latest-news/19383>, 2020).
11. Robinson, C. Another expert challenges assertions that SARS-CoV-2 was not genetically engineered. (<https://gmwatch.org/en/news/latest-news/19383>, 2020).
12. Sørensen, B., Dalgleish, A. & Susrud, A. The Evidence which Suggests that This Is No Naturally Evolved Virus. Preprint, <https://www.minervanett.no/files/2020/07/13/TheEvidenceNoNaturalEvol.pdf> (2020).
13. Zhang, B. SARS-CoV-2 Could Come from a Lab - A Critique of “The Proximal Origin of SARS-CoV-2” Published in Nature Medicine. (https://www.linkedin.com/pulse/sars-cov-2-could-come-from-lab-critique-proximal-origin-billy-zhang?articleId=6651628681431175168#comments-6651628681431175168&trk=public_profile_article_view, 2020).
14. Sirotkin, K. & Sirotkin, D. Might SARS - CoV - 2 Have Arisen via Serial Passage through an Animal Host or Cell Culture? BioEssays, <https://doi.org/10.1002/bies.202000091> (2020).
15. Seyran, M. et al. Questions concerning the proximal origin of SARS-CoV-2. J Med Virol (2020).
16. China Honors Ian Lipkin. (<https://www.publichealth.columbia.edu/public-health-now/news/china-honors-ian-lipkin>, 2020).
17. Holmes, E. Academic CV. (<https://www.sydney.edu.au/AcademicProfiles/profile/resource?urlid=edward.holmes&type=cv>, 2020).
18. Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature (2020).



19. Rahalkar, M. & Bahulikar, R. The Abnormal Nature of the Fecal Swab Sample used for NGS Analysis of RaTG13 Genome Sequence Imposes a Question on the Correctness of the RaTG13 Sequence. Preprints.org, 2020080205 (2020).
20. Singla, M., Ahmad, S., Gupta, C. & Sethi, T. De-novo Assembly of RaTG13 Genome Reveals Inconsistencies Further Obscuring SARS-CoV-2 Origins. Preprints, 2020080595 (doi: 10.20944/preprints202008.0595.v1) (2020).
21. Zhang, D. Anomalies in BatCoV/RaTG13 sequencing and provenance. Preprint (zenodo.org), <https://zenodo.org/record/3987503#.Xz9GzC-z3GI> (2020).
22. Robinson, C. Journals censor lab origin theory for SARS-CoV-2. (<https://www.gmwatch.org/en/news/latest-news/19475-journals-censor-lab-origin-theory-for-sars-cov-2>, 2020).
23. Scientific evidence and logic behind the claim that the Wuhan coronavirus is man-made. <https://nerdhaspower.weebly.com> (2020).
24. Zhang, Y. et al. The ORF8 Protein of SARS-CoV-2 Mediates Immune Evasion through Potently Downregulating MHC-I. bioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2020.05.24.111823> (2020).
25. Muth, D. et al. Attenuation of replication by a 29 nucleotide deletion in SARS-coronavirus acquired during the early stages of human-to-human transmission. *Sci Rep* 8, 15177 (2018).
26. Schoeman, D. & Fielding, B.C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Viol J* 16, 69 (2019).
27. Lam, T.T. et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature* (2020).
28. Liu, P. et al. Are pangolins the intermediate host of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2)? *PLoS Pathog* 16, e1008421 (2020).
29. Xiao, K. et al. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature* (2020).
30. Zhou, H. et al. A Novel Bat Coronavirus Closely Related to SARS-CoV-2 Contains Natural Insertions at the S1/S2 Cleavage Site of the Spike Protein. *Curr Biol* 30, 2196-2203 e3 (2020).
31. Zhang, T., Wu, Q. & Zhang, Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Curr Biol* 30, 1578 (2020).
32. Yang, X.L. et al. Isolation and Characterization of a Novel Bat Coronavirus Closely Related to the Direct Progenitor of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol* 90, 3253-6 (2015).
33. Hu, D. et al. Genomic characterization and infectivity of a novel SARS-like coronavirus in Chinese bats. *Emerg Microbes Infect* 7, 154 (2018).
34. Wang, Y. Preliminary investigation of viruses carried by bats on the southeast coastal area (东南沿海地区蝙蝠携带病毒的初步调查研究). Master Thesis (2017).
35. Wu, F. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579, 265-269 (2020).
36. Lab That First Shared Novel Coronavirus Genome Still Shut Down by Chinese Government. *Global Biodefense*, <https://globalbiodefense.com/headlines/chinese-lab-that-first-shared-novel-coronavirus-genome-shut-down/> (2020).
37. Song, W., Gui, M., Wang, X. & Xiang, Y. Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. *PLoS Pathog* 14, e1007236 (2018).

38. Li, F., Li, W., Farzan, M. & Harrison, S.C. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science* 309, 1864-8 (2005).
39. Shang, J. et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* (2020).
40. Hassanin, A. The SARS-CoV-2-like virus found in captive pangolins from Guangdong should be better sequenced. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.05.07.077016> (2020).
41. Zhang, D. The Pan-SL-CoV/GD sequences may be from contamination. Preprint (zenodo.org), DOI: 10.5281/zenodo.3885333 (2020).
42. Chan, Y.A. & Zhan, S.H. Single source of pangolin CoVs with a near identical Spike RBD to SARS-CoV-2. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.07.07.184374> (2020).
43. Lee, J. et al. No evidence of coronaviruses or other potentially zoonotic viruses in Sunda pangolins (*Manis javanica*) entering the wildlife trade via Malaysia. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.06.19.158717> (2020).
44. Becker, M.M. et al. Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19944-9 (2008).
45. Menachery, V.D. et al. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat Med* 21, 1508-13 (2015).
46. Menachery, V.D. et al. SARS-like WIV1-CoV poised for human emergence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 3048-53 (2016).
47. Ren, W. et al. Difference in receptor usage between severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and SARS-like coronavirus of bat origin. *J Virol* 82, 1899-907 (2008).
48. Li, X. et al. Emergence of SARS-CoV-2 through Recombination and Strong Purifying Selection. *bioRxiv* (2020).
49. Hou, Y. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) proteins of different bat species confer variable susceptibility to SARS-CoV entry. *Arch Virol* 155, 1563-9 (2010).
50. Yang, Y. et al. Two Mutations Were Critical for Bat-to-Human Transmission of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol* 89, 9119-23 (2015).
51. Luo, C.M. et al. Discovery of Novel Bat Coronaviruses in South China That Use the Same Receptor as Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol* 92(2018).
52. Cui, J., Li, F. & Shi, Z.L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 17, 181-192 (2019).
53. Wan, Y. et al. Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry. *J Virol* 94(2020).
54. Li, F. Receptor recognition mechanisms of coronaviruses: a decade of structural studies. *J Virol* 89, 1954-64 (2015).
55. Li, F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu Rev Virol* 3, 237-261 (2016).
56. Shang, J. et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 11727-11734 (2020).
57. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H. & Pohlmann, S. 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 e5 (2020).
58. Coutard, B. et al. 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 (2020).
59. Claas, E.C. et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 351, 472-7 (1998).

60. Watanabe, R. et al. Entry from the cell surface of severe acute respiratory syndrome coronavirus with cleaved S protein as revealed by pseudotype virus bearing cleaved S protein. *J Virol* 82, 11985-91 (2008).
61. Belouzard, S., Chu, V.C. & Whittaker, G.R. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5871-6 (2009).
62. Kido, H. et al. Role of host cellular proteases in the pathogenesis of influenza and influenza-induced multiple organ failure. *Biochim Biophys Acta* 1824, 186-94 (2012).
63. Sun, X., Tse, L.V., Ferguson, A.D. & Whittaker, G.R. Modifications to the hemagglutinin cleavage site control the virulence of a neurotropic H1N1 influenza virus. *J Virol* 84, 8683-90 (2010).
64. Cheng, J. et al. The S2 Subunit of QX-type Infectious Bronchitis Coronavirus Spike Protein Is an Essential Determinant of Neurotropism. *Viruses* 11(2019).
65. Ito, T. et al. Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chickens. *J Virol* 75, 4439-43 (2001).
66. Canrong Wu, Y.Y., Yang Liu, Peng Zhang, Yali Wang, Hua Li, Qiqi Wang, Yang Xu, Mingxue Li, Mengzhu Zheng, Lixia Chen. Furin, a potential therapeutic target for COVID-19. Preprint (chinaXiv), <http://www.chinaxiv.org/abs/202002.00062> (2020).
67. Zeng, L.P. et al. Bat Severe Acute Respiratory Syndrome-Like Coronavirus WIV1 Encodes an Extra Accessory Protein, ORFX, Involved in Modulation of the Host Immune Response. *J Virol* 90, 6573-6582 (2016).
68. Lau, S.Y. et al. Attenuated SARS-CoV-2 variants with deletions at the S1/S2 junction. *Emerg Microbes Infect* 9, 837-842 (2020).
69. Liu, Z. et al. Identification of common deletions in the spike protein of SARS-CoV-2. *J Virol* (2020).
70. Ge, X.Y. et al. Detection of alpha- and betacoronaviruses in rodents from Yunnan, China. *Virol J* 14, 98 (2017).
71. Guan, Y. et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* 302, 276-8 (2003).
72. Ge, X.Y. et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature* 503, 535-8 (2013).
73. Lau, S.K. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14040-5 (2005).
74. Kam, Y.W. et al. Antibodies against trimeric S glycoprotein protect hamsters against SARS-CoV challenge despite their capacity to mediate FcγR2B-dependent entry into B cells in vitro. *Vaccine* 25, 729-40 (2007).
75. Chan, J.F. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clin Microbiol Rev* 28, 465-522 (2015).
76. Zhou, J., Chu, H., Chan, J.F. & Yuen, K.Y. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection: virus-host cell interactions and implications on pathogenesis. *Virol J* 12, 218 (2015).
77. Yeung, M.L. et al. MERS coronavirus induces apoptosis in kidney and lung by upregulating Smad7 and FGF2. *Nat Microbiol* 1, 16004 (2016).
78. Chu, D.K.W. et al. MERS coronaviruses from camels in Africa exhibit region-dependent genetic diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 3144-3149 (2018).
79. Ommeh, S. et al. Genetic Evidence of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-Cov) and Widespread Seroprevalence among Camels in Kenya. *Virol Sin* 33, 484-492 (2018).
80. Sia, S.F. et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature* (2020).

81. Ren, W. et al. Full-length genome sequences of two SARS-like coronaviruses in horseshoe bats and genetic variation analysis. *J Gen Virol* 87, 3355-9 (2006).
82. Yuan, J. et al. Intraspecies diversity of SARS-like coronaviruses in *Rhinolophus sinicus* and its implications for the origin of SARS coronaviruses in humans. *J Gen Virol* 91, 1058-62 (2010).
83. Ge, X.Y. et al. Coexistence of multiple coronaviruses in several bat colonies in an abandoned mineshaft. *Viol Sin* 31, 31-40 (2016).
84. Hu, B. et al. Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLoS Pathog* 13, e1006698 (2017).
85. Luo, Y. et al. Longitudinal Surveillance of Betacoronaviruses in Fruit Bats in Yunnan Province, China During 2009-2016. *Viol Sin* 33, 87-95 (2018).
86. Kuo, L., Godeke, G.J., Raamsman, M.J., Masters, P.S. & Rottier, P.J. Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier. *J Virol* 74, 1393-406 (2000).
87. Drexler, J.F. et al. 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, 11336-49 (2010).
88. Agnihothram, S. et al. A mouse model for Betacoronavirus subgroup 2c using a bat coronavirus strain HKU5 variant. *mBio* 5, e00047-14 (2014).
89. Johnson, B.A., Graham, R.L. & Menachery, V.D. Viral metagenomics, protein structure, and reverse genetics: Key strategies for investigating coronaviruses. *Virology* 517, 30-37 (2018).
90. Wu, K., Peng, G., Wilken, M., Geraghty, R.J. & Li, F. Mechanisms of host receptor adaptation by severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Biol Chem* 287, 8904-11 (2012).
91. Follis, K.E., York, J. & Nunberg, J.H. Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell-cell fusion but does not affect virion entry. *Virology* 350, 358-69 (2006).
92. Yount, B., Denison, M.R., Weiss, S.R. & Baric, R.S. Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. *J Virol* 76, 11065-78 (2002).
93. Yount, B. et al. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12995-3000 (2003).
94. Almazan, F. et al. Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J Virol* 80, 10900-6 (2006).
95. Scobey, T. et al. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 16157-62 (2013).
96. Almazan, F., Marquez-Jurado, S., Nogales, A. & Enjuanes, L. Engineering infectious cDNAs of coronavirus as bacterial artificial chromosomes. *Methods Mol Biol* 1282, 135-52 (2015).
97. Thao, T.T.N. et al. Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. *Nature* (2020).
98. Oldfield, L.M. et al. Genome-wide engineering of an infectious clone of herpes simplex virus type 1 using synthetic genomics assembly methods. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E8885-E8894 (2017).
99. Vashee, S. et al. Cloning, Assembly, and Modification of the Primary Human Cytomegalovirus Isolate Toledo by Yeast-Based Transformation-Associated Recombination. *mSphere* 2(2017).
100. Xie, X. et al. An Infectious cDNA Clone of SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe* 27, 841-848 e3 (2020).
101. Roberts, A. et al. A mouse-adapted SARS-coronavirus causes disease and mortality in BALB/c mice. *PLoS Pathog* 3, e5 (2007).
102. Roberts, A. et al. Animal models and vaccines for SARS-CoV infection. *Virus Res* 133, 20-32 (2008).



103. Takayama, K. In Vitro and Animal Models for SARS-CoV-2 research. *Trends Pharmacol Sci* 41, 513-517 (2020).
104. Wang, Q. hACE2 Transgenic Mouse Model For Coronavirus (COVID-19) Research. The Jackson Laboratory Research Highlight, <https://www.jax.org/news-and-insights/2020/february/introducing-mouse-model-for-corona-virus#> (2020).
105. Zhang, L. et al. The D614G mutation in the SARS-CoV-2 spike protein reduces S1 shedding and increases infectivity. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.06.12.148726> (2020).
106. Yurkovetskiy, L. et al. Structural and Functional Analysis of the D614G SARS-CoV-2 Spike Protein Variant. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.07.04.187757> (2020).
107. Korber, B. et al. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell* 182, 812-827 e19 (2020).
108. Plante, J.A. et al. Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness and neutralization susceptibility. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.09.01.278689> (2020).
109. Poon, L.L. et al. Recurrent mutations associated with isolation and passage of SARS coronavirus in cells from non-human primates. *J Med Virol* 76, 435-40 (2005).
110. Pervushin, K. et al. Structure and inhibition of the SARS coronavirus envelope protein ion channel. *PLoS Pathog* 5, e1000511 (2009).
111. Nieto-Torres, J.L. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS Pathog* 10, e1004077 (2014).