

Vendredi 22 avril 2022

## Nouvelles révélations américaines sur l'origine du covid-19

### Emmanuel Macron pouvait-il l'ignorer ?

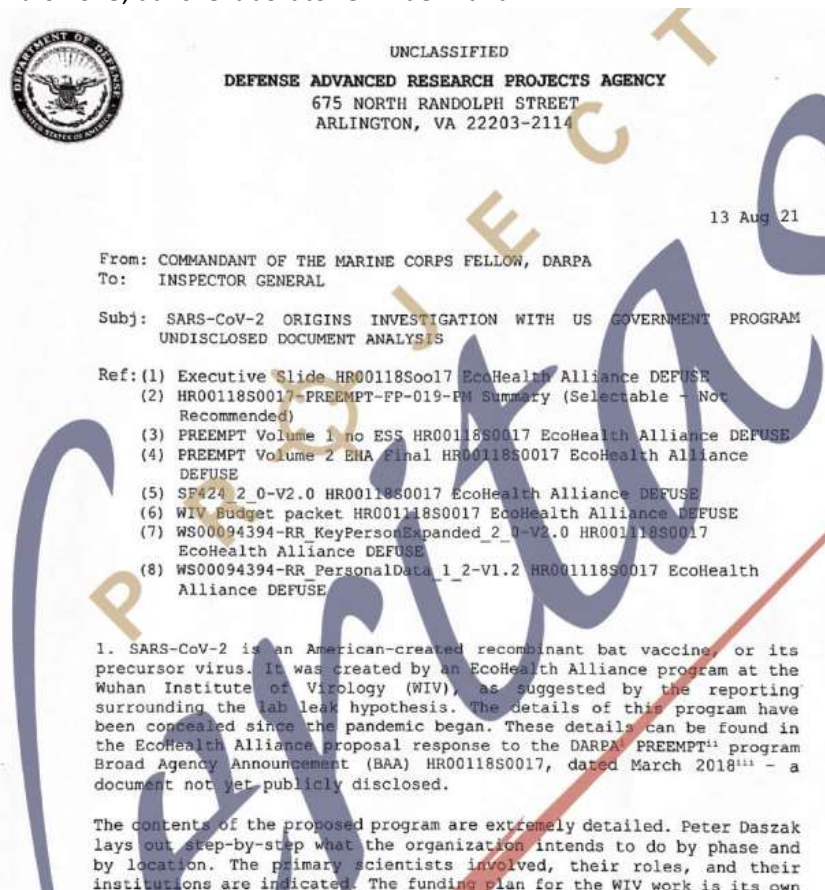
A la suite des révélations du Major Joe MURPHY, membre du *Marine Program Liaison* de l'*Office of Naval Research* sur les origines du covid-19 de nouvelles questions se posent sur l'implication d'Emmanuel Macron, son gouvernement, son « conseil scientifique » et l'INSERM :

E. MACRON, a-t-il menti sur la véritable origine du covid-19 pour créer la peur dans la population, faire adopter ses lois liberticides et instaurer un contrôle social ?

E. MACRON, a-t-il agité en concertation avec Anthony FAUCI, directeur du NIAID américain (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases*), notamment en dissimulant que les masques et les injections d'ARNm étaient inefficaces et que seuls les traitements précoces à l'hydroxychloroquine et l'ivermectine fonctionnaient ?

Les documents qui viennent d'être divulgués par le Major Joe MURPHY du *Marine Program Liaison* de l'*Office Of Naval Research*, qui était auparavant affecté à la DARPA (*Defense Advanced Research Projects Agency, USA*), et le groupe de journalistes VERITAS prouvent qu'E. Macon aurait menti lors de son allocution présidentielle sur la pandémie, en annonçant « **Nous sommes en guerre !** », afin de faire croire aux Français que nous étions attaqués par une puissance étrangère et créer un sentiment de peur. S'il semble que nous étions effectivement attaqués, ce n'est pas de l'extérieur que venait l'attaque, mais bien de l'intérieur...

A la lecture de ces documents et notamment de l'e-mail et du dossier rassemblé par le Major Joe MURPHY (**Pièce 1**), on comprend immédiatement qu'E. Macon ne pouvait pas ignorer le projet « DEFUSE », imaginé par l'ONG **EcoHealth Alliance**, en mars 2018, dans le laboratoire P4 de Wuhan.



Extrait du rapport du Major MURPHY :

Traduction : « 1. Le SARS-CoV-2 est un vaccin recombinant de chauve-souris créé par les Américains, ou son virus précurseur. **Il a été créé dans le cadre d'un programme de EcoHealth Alliance à l'Institut de virologie de Wuhan (WIV), comme le suggèrent les rapports relatifs à l'hypothèse de la fuite du laboratoire. Les détails de ce programme ont été dissimulés depuis le début de la pandémie.** Ces détails se trouvent dans la réponse de la proposition de l'Alliance EcoHealth à la Broad Agency Announcement (BAA) HR0011850017 du programme PREEMPT de la DARPA, datée de mars 2018 »

« Le contenu de la proposition de programme est extrêmement détaillé. Peter Draszak décrit étape par étape ce que l'organisation compte faire, phase par phase et par lieu. Les principaux scientifiques impliqués, leur rôle et leurs institutions y sont indiqués. Le plan de financement des travaux de l'Institut de virologie de Wuhan (WIV) est un document à part entière ».

Voici la couverture de la proposition d'EcoHealth Alliance (Pièce 2), sur laquelle distingue clairement des soldats et des chauve-souris :



Cette proposition, appelée « Project DEFUSE », de l'ONG **EcoHealth Alliance**, est datée du 24 mars 2018. Le coût annoncé est de 14,3 millions de dollars. Elle a été réalisée en trois mois, soit une durée particulièrement brève pour un tel projet, et répondait à un appel d'offre lancé par cette agence, le 19 janvier 2018, sous le nom de code PREEMPT (PREventing EMerging Pathogenic Threats) (Pièce 3).

Voici le résumé du projet (Executive slide de Peter DASZAK, Président de EcoHealth Alliance), tel qu'il a été divulgué (Pièce 4) :

**Executive Summary: DEFUSE**  
EcoHealth Alliance; Dr. Peter Daszak

**CONCEPT**

**APPROACH**

- 1. **Integrated host-pathogen-virus characterization, modeling, in-depth sampling of bat SARS-CoVs in high-risk sites of active spillover, Yunnan, China.** Field teams using bat and viral data to estimate SARS-CoV spillover potential across sites. (Target viral spillover risk: [https://doi.org/10.1101/2018.03.01.279100](#))
- 2. **Experimental assays for bat SARS-CoV-2 spillover risk.** (Immune Co., spike protein stability to high-risk SARS-CoVs, model spike structure to assess ACE2 binding, virus in vitro and ACE2 humanized mouse experimental assays to test machine-learning genotype-to-phenotype model predictions of viral spillover risk.)
- 3. **Advanced laboratory models.** (Methods to estimate evolutionary/humanization rates, capacity to generate future CoV variants of human origin, host or spike protein diversity, immunological frequency etc.)
- 4. **Application with empirically collected human data.** (Use viral assays that target specific SARS-CoV spikes to identify spillover of these viruses in a high-risk population in Yunnan, China.)

**Intervention Development:**

- 1. **Cell membrane immune boosting.** (Inoculate bats with immune modulators to upregulate their naturally enhanced innate immunity and suppress viral replication, transiently reducing viral shedding/spillover risk.)
- 2. **Co-targeted immune boosting.** (In concert with above, inoculate bats with novel clinically polyvalent recombinant spike proteins to enhance their adaptive immune memory against spillover, high-risk human CoV variants.)
- 3. **Field deployment.** (Develop structural simulation models to estimate the frequency, efficacy, and population coverage required for intervention approaches to effectively suppress the viral population.)
- 4. **Field trial.** (Use team expertise in wildlife vaccine delivery (transdermal nanoparticles, mucosal passives) verified by Avianca of Mexico malacous delivery via automated aerosolization onto bats at roost entrance of our three test case sites in a low complex in Yunnan, China, where SARS-CoVs have infected people.)

**IMPACT**

- 1. Scientific consensus across Asia states this region is potential spillover site for CoV avianflights. (Target: Near 100% annual release risk from SARS-CoVs, which are shed via urine and feces on bats forage at night.)
- 2. Our work in Yunnan, China shows that: 1) bat SARS-CoVs exist that can infect human cells, produce SARS-like illness in humanized mice, and are not affected by monoclonal or vaccine treatment; and 2) bat SARS-CoV host jumps into local human populations in frequency. These viruses are therefore a **high malacous disease risk** to US defense forces in the region and global health security.
- 3. Our goal is to actively predict, then "defuse" the spillover potential of novel bat-borne high-risk SARS-CoVs in Southeast Asia and across three-virus distribution. This will mitigate the US avianflights, reduce risk for local communities and their livestock, improve local and global health security.
- 4. Our strategy is based on evidence parameters that are found across all bat reservoir groups. If successful, the DEFUSE approach can be adapted to MERS-CoV in the Middle East, other SARS-CoVs in Africa, and other high-viral-host ranges (e.g., Hendra, Nipah, Ebola, Marburg viruses).

	Phase I	Phase II	Total
Proposed	\$8,411,546	\$5,797,099	\$14,208,645

Human Use / Animal Use

**CONTEXT**

- 1. No technology exists to reduce exposure to novel bat CoVs. (An effective therapeutic or vaccine/inoculation for SARS-CoV, MERS-CoV, or other bat-driven Ebola, Marburg, Nipah, Hendra etc.)
- 2. Our team has conducted pioneering research modeling disease emergence, understanding CoV ecology, bat immunity, and wildlife vaccine delivery. Previous work provides proof-of-concept for: 1) predictive "hotspot" modeling; 2) controlling bat immune response through CoV-2019 pathways; 3) recombinant immune spike proteins from SARS-CoVs; 4) mucosal delivery to wildlife host, bats.
- 3. DEFUSE approach is based on immunological pattern found across bat families, therefore will be broadly effective, reusable, economical and adaptable in the above low-risk, it causes little environmental risk, and presents no threat to the workforce, or non-target populations.
- 4. Immune modulation is more likely to be effective than CRISPR-Cas9 gene editing because bats are relatively long-lived, highly mobile, and have long inter-generational periods (10 years) with low pregnancy (1-2 year). Furthermore, gene drive technology could have negative ecological consequences such to effectiveness will be hard to evaluate within the defined Period of Performance.

HR0011850017 PREEMPT

Extrait du résumé du projet :

## APPROCHE

### Prévision hôte-pathogène :

- Échantillonnage intégré sur le terrain, caractérisation virale, modélisation : Échantillonnage approfondi des SARSr-CoVs des chauves-souris dans un site à haut risque de propagation active, Yunnan, Chine. Modèles spatiaux utilisant des données sur les chauves-souris et des virus pour estimer le potentiel de propagation du SARSr-CoV en Asie. Application mobile "*Spatial viral spillover risk*" (risque de propagation virale spatiale), du risque de propagation virale de fond en Asie.
- Essais expérimentaux pour tester le potentiel de saut de QS (quasi-espèces\*) : Séquençage de la similitude de la protéine de l'épi QS avec les SARSr-CoV à haut risque, modélisation de la structure de l'épi pour évaluer la liaison ACE2, puis expériences *in vitro* et sur des souris humanisées ACE2. Utilisation des résultats pour tester les prédictions du modèle d'apprentissage automatique génotype-phénotype du risque de propagation virale.
- Modèles génotype-phénotype : Modèles permettant d'estimer les taux d'évolution/recombinaison, la capacité à générer de futurs SQ capables d'infecter l'homme, sur la base de la diversité des protéines de pointe, de la fréquence de recombinaison, etc.
- Validation avec des sérums humains collectés précédemment : Utilisation de tests LIPS, qui ciblent des pics spécifiques du SARSr-CoV pour identifier la propagation de ces souches dans une population à haut risque du Yunnan, en Chine.

### Développement de l'intervention :

- (1) Renforcement immunitaire à grande échelle : Inoculer aux chauves-souris des modulateurs immunitaires, afin de réguler leur immunité innée naturellement inhibée et de supprimer la réplication virale, réduisant ainsi transitoirement l'excrétion virale et le risque de contagion.
- (2) Renforcement immunitaire ciblé : En lien avec ce qui précède, inoculer aux chauves-souris de nouvelles protéines chimériques polyvalentes recombinantes de pointe, pour renforcer leur mémoire immunitaire adaptative contre des virus spécifiques à haut risque.
- Dynamique virale : Développer des modèles de simulation stochastiques pour estimer la fréquence et l'efficacité et la couverture de la population nécessaires pour que les approches d'intervention suppriment efficacement la population virale.
- Essai sur le terrain : Utiliser l'expertise de l'équipe en matière d'administration de vaccins à la faune sauvage (nanoparticules transdermiques, vecteur du poxvirus du raton laveur) pour mettre au point une administration efficace de la molécule par aérosolisation automatisée des chauves-souris à l'entrée des perchoirs de nos trois sites d'essai dans un complexe de grottes du Yunnan, en Chine, où le SARS-CoV a infecté des personnes.

\* Une quasi-espèce désigne : «La quasi-espèce virale désigne des sous-populations différentes d'un même virus infestant un même hôte, lorsqu'elles se répliquent à grande vitesse et avec un taux élevé de mutations. En découle alors une grande diversité génétique », <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-quasi-espece-virale-14331/>.

## IMPACT

- Les problèmes de sécurité en Asie font de cette région un site de déploiement potentiel pour les combattants américains. Les troupes sont confrontées à un risque accru de maladie due au SARS-CoV, qui est excrété par l'urine et par les excréments des chauves-souris qui se nourrissent la nuit.
- Notre travail au Yunnan, en Chine, montre que : 1) il existe des SARSr-CoVs de chauve-souris qui peuvent infecter des cellules humaines, produire une maladie semblable au SARS chez des souris humanisées et qui ne sont pas affectés par un traitement monoclonal ou vaccinal ; et 2) le saut de l'hôte SARSr-CoV de chauve-souris dans les populations humaines locales est fréquent. Ces virus représentent donc un danger clair et présent pour les forces de défense américaines dans la région et pour la sécurité sanitaire mondiale.
- Notre objectif est d'analyser, de prédire, puis de "DÉSAMORCER" (DEFUSE) le potentiel de propagation des nouveaux CoV à haut risque du SARS provenant des chauves-souris en Asie du Sud-Est et dans toute la distribution de ces virus. Cela permettra de protéger le combattant américain, de réduire le risque pour les communautés locales et leur bétail et d'améliorer la sécurité alimentaire et sanitaire mondiale.

- Notre stratégie est basée sur des paramètres immunitaires que l'on retrouve dans tous les groupes taxonomiques de chauves-souris. En cas de succès, l'approche DEFUSE pourra être adaptée au MERS-CoV au Moyen-Orient, à d'autres SARSr-CoV en Afrique et à d'autres virus à fort impact provenant de chauves-souris (par exemple, les virus Hendra, Nipah, Ebola, Marburg).

### CONTEXTE

- Il n'existe aucune technologie permettant de réduire l'exposition aux nouveaux CoV des chauves-souris. Il n'existe aucune thérapeutique ou contre-mesure efficace contre le CoV-SARS, les CoVs apparentés ou les autres virus de chauves-souris (Ebola, Marburg, Nipah, Hendra, etc.).

- Notre équipe a mené des recherches pionnières en modélisant l'émergence de la maladie, en comprenant la virologie du CoV, l'immunité des chauves-souris et l'administration de vaccins à la faune sauvage. Les travaux antérieurs fournissent des éléments probants relatifs à : 1) la modélisation prédictive des "points chauds" ; 2) l'augmentation de la réponse immunitaire des chauves-souris par la voie STING IFN ; 3) les protéines chimériques recombinantes des CoV du SRAS ; 4) l'administration de molécules aux animaux sauvages, y compris les chauves-souris.

- L'approche DEFUSE est basée sur un modèle immunologique, présent dans toutes les familles de chauves-souris. Elle sera donc largement efficace, évolutive, économique et réalisable dans les délais impartis. Elle crée peu de risques pour l'environnement et ne présente aucune menace pour le combattant ou les populations non-ciblées.

- La modulation immunitaire a plus de chances d'être efficace que les manipulations de gènes CRISPR-Cas9, car les chauves-souris vivent relativement longtemps, sont très mobiles et ont de longues périodes intergénérationnelles (2 à 5 ans) avec une faible descendance (1 à 2 petits). En outre, la technologie du « *gene drive* » (manipulation génétique) pourrait avoir des conséquences écologiques négatives et son efficacité sera difficile à évaluer dans la période de performance définie.

Coût du projet :

	Phase 1	Phase 2	Phase 3
<b>Proposed</b>	<b>\$8,411,546</b>	<b>\$5,797,699</b>	<b>\$14,209,245</b>

Jugé trop dangereux et en violation du moratoire sur l'augmentation de la puissance des virus par des manipulations génétiques (*gain-of-function*, GoF / gain de fonction ou augmentation du pouvoir mortel des virus), le projet a été refusé par la DARPA (**Pièce 5**).

### REJECTION OF DEFUSE PROJECT PROPOSAL

Proposal Title:	DEFUSE - Defusing the Threat of Bat-borne Coronaviruses (2018)		
Proposal Identifier:	HR001118S0017-PREEMPT-FP-019		
Amounts Requested by EcoHealth Alliance:			
	Phase I	\$8,411,546	
	Phase II	\$5,797,699	
	<b>Total:</b>	<b>\$14,209,245</b>	

### RESULT

The DEFUSE proposed project by EHA was **rejected by DARPA**, although "if funding became available", certain components of particular interest could have gone ahead, subject to a clear contractual Dual Use Research of Concern (DURC) risk mitigation plan that "includes a responsible communications plan".

### Traduction des motifs de refus du projet « DEFUSE » d' EcoHealth Alliance par la DARPA :

#### « MOTIFS DE REFUS

Le Bureau des technologies biologiques de la DARPA a examiné la proposition DEFUSE d'EcoHealth Alliance et les rapports d'évaluation et a décidé qu'elle était « sélectionnable ». Ce faisant, deux examinateurs sur trois ont

considéré que l'objectif de prévenir « les retombées zoonotiques en réduisant l'excrétion virale dans les grottes de chauves-souris » intéressait la DARPA. Ces examinateurs ont évalué l'équipe de l'EHA et ses collaborateurs et ont conclu que :

- Ils ont beaucoup d'expérience préalable ;
- Ils ont accès aux grottes du Yunnan où les chauves-souris sont infectées par les virus SARSr ;
- Ils ont effectué des travaux de surveillance antérieurs ;
- Ils ont développé des cartes de risque géo-basées des points chauds zoonotiques ;
- Leur travail expérimental proposé est logique et peut valider des modèles moléculaires et évolutifs ;
- Leurs approches de préemption proposées peuvent être rapidement validées à l'aide de chauves-souris et modèles de souris "baténisées" (intégrant des gènes de chauves-souris).

**Cependant, le Bureau des technologies biologiques n'a pas recommandé qu'il soit financé à ce moment-là, car des faiblesses importantes ont été identifiées :**

1. La proposition est considérée comme impliquant potentiellement la recherche GoF/DURC, car elle propose de synthétiser des glycoprotéines de pointe qui se lient aux récepteurs cellulaires humains et de les insérer dans les SARSr-CoV pour évaluer si elles peuvent provoquer une maladie de type SARS.

**2. Cependant, la proposition ne mentionne ni n'évalue les risques potentiels du gain de fonction (GoF).**

3. La proposition ne mentionne ni n'évalue, non plus, la recherche préoccupante à double usage (DURC) et ne présente donc pas de plan d'atténuation des risques DURC.

4. La proposition aborde ou discute à peine les questions éthiques, juridiques et sociétales (ELSI).

5. La proposition n'aborde pas les problèmes des systèmes d'administration de vaccins proposés, causés par les problèmes connus de variabilité de la posologie des vaccins.

6. La proposition ne fournit pas suffisamment d'informations sur la manière dont l'EHA utiliserait les données obtenues et sur la manière dont elle modéliserait le développement ou effectuerait l'analyse statistique nécessaire.

7. La proposition n'explique pas clairement comment l'EHA tirerait parti de ses travaux antérieurs, ni comment ces travaux antérieurs pourraient être prolongés.

8. La proposition n'a pas clairement évalué comment elle déploierait et validerait les "méthodes de préemption TA2" dans la nature. Cela fait référence à la réalisation d'expériences avec des molécules de renforcement immunitaire efficaces et des techniques d'administration via le mécanisme d'aérosolisation FEA lors d'un test dans les deux sites témoins de grottes de chauves-souris dans le Yunnan, en Chine (PARC, EHA, WIV).

9. La proposition ne répond pas aux préoccupations concernant l'incapacité de ces vaccins à protéger contre la grande variété des coronavirus dans les grottes de chauves-souris qui évoluent constamment, en raison d'une couverture épitopique insuffisante.

---

DRASTIC évalue de manière indépendante que le langage de la proposition (voir par exemple "notre complexe de grottes") et la profonde implication suggérée de certaines des parties WIV (Shi Zheng Li serait employé à mi-temps pendant 3 ans - payé via la subvention - et serait invité au siège de la DARPA à Arlington) n'ont peut-être pas aidé non plus - surtout en l'absence de tout programme d'atténuation des risques DURC -.

**Il est clair que le projet proposé DEFUSE dirigé par Peter Daszak aurait pu mettre les communautés locales en danger en ne tenant pas compte des problèmes suivants :**

- Gain de fonction ;
- Recherche à double usage préoccupante ;
- Couverture des épitopes vaccinaux ;
- Exigences réglementaires ;
- ELSI (questions éthiques, juridiques et sociétales) ;

- L'utilisation de données »

Malgré ces graves alarmes de la DARPA, **A. FAUCI**, Directeur du NIAID (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases*) a décidé de financer le projet (cf. vidéo de l'audition d'A. FAUCI par le Sénateur R. MARSHALL, 3mn50).  
<https://www.mediaite.com/tv/fauci-scolds-senator-citing-project-veritas-leaked-emails-it-pains-me-to-tell-the-american-people-how-wrong-you-are/>

D'après les affirmations du Sénateur R. MARSHALL, le NIAID aurait même modifié la définition du « *gain-of-function* », dans le but de contourner le moratoire sur le gain de fonction des virus imposé par la Maison Blanche, le 17 octobre 2014, sous l'administration de B. OBAMA <https://obamawhitehouse.archives.gov/blog/2014/10/17/doing-diligence-assess-risks-and-benefits-life-sciences-gain-function-research>

La proximité d'**A. FAUCI** avec, entre autres, **Bill GATES** et les grandes sociétés pharmaceutiques est parfaitement révélée dans l'ouvrage de Robert F. KENNEDY « *Le Vrai Anthony Fauci : Bill Gates, Big Pharma et la Guerre Mondiale Contre la Démocratie et la Santé Publique* » (E-book – ePub).

### Les possibles liens de la France d'E. Macron avec ces évènements :

Au vu des déclarations d'Yves LEVY, le mari d'Agnès BUZYN et l'ex-ministre d'E. Macron, lors de son allocution présentant la feuille de route de l'INSERM « *Yves Lévy dresse la feuille de route 2018 de l'Inserm* »  
<https://www.inserm.fr/actualite/yves-levy-dresse-feuille-route-2018-inserm/>

et d'un communiqué de presse de l'INSERM, du 6 avril 2017,

<https://presse.inserm.fr/en/ebola-new-trial-launched-in-west-africa-to-evaluate-three-vaccination-strategies/27994/>

il est difficile d'imaginer qu'Y. LEVY – et donc E. MACRON - n'était pas informé de la proposition d'EcoHealth Alliance envoyée à la DARPA, puis au NIAID d'A. FAUCI.

Extraits de « *Yves Lévy dresse la feuille de route 2018 de l'Inserm* » :

« *En Chine, alors que vient d'être inauguré le laboratoire de haute sécurité biologique P4 de Wuhan, conçu sur le modèle du P4 Inserm Jean Mérieux à Lyon, la coopération en matière de prévention et de contrôle des maladies infectieuses émergentes va se poursuivre (...).*

*Si l'on ajoute à cela les programmes en cours ou à venir sur des thèmes tels que (la) "recherche vaccinale" et (la) "recherche sur les maladies infectieuses émergentes" ».*

Extrait du communiqué de presse de l'INSERM, du 6 avril 2017 :

« *Pour Yves Levy, PDG de l'Inserm, Anthony S. Fauci, directeur du NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases) des NIH et Peter Piot, directeur de la LSHTM, "nos établissements, l'Inserm, les NIH et la LSHTM, ont conçu et lancé ce partenariat de recherche international unique, avec nos collègues des pays d'Afrique de l'Ouest les plus touchés par la fièvre Ebola pour répondre aux questions qui subsistent sur l'innocuité et l'immunogénicité des stratégies des candidats vaccins contre Ebola. Cela nous permettra de mieux lutter contre les épidémies futures* ».

Etant donné que le Conseil d'Administration de l'INSERM est composé de 6 représentants de l'État et que le « conseil scientifique » d'E. MACRON compte notamment parmi ses membres, Yazdan Yazdanpanah, investigateur principal de l'étude précitée de l'INSERM (PREVAc),

<https://www.inserm.fr/nous-connaître/instances/>,

peut-on raisonnablement imaginer qu'E. Macron n'ait pas été informé de la recherche qui était effectuée dans le laboratoire P4 de Wuhan, du projet « DIFUSE » de l'ONG EcoHealth Alliance et de la collaboration du président de l'INSERM, Y. LEVY avec le NIAID et son directeur, **A. FAUCI** ?

**De même gravité**, le Major J. MURPHY **précise dans son rapport** que la proposition détaillée de **EcoHealth Alliance** précise notamment :

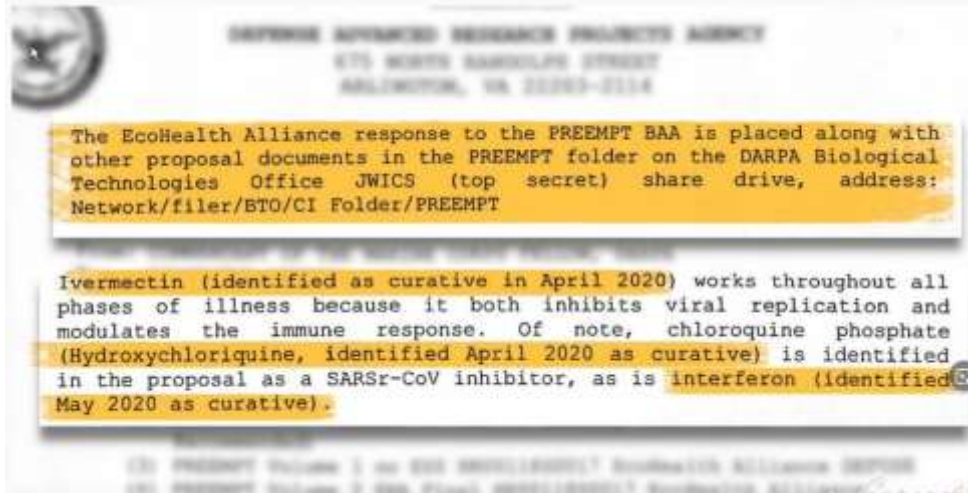
➤ page 1,

- « **Les raisons pour lesquelles les interventions non-pharmaceutiques comme les masques et les contre-mesures médicales comme les vaccins ARNm ne fonctionnent pas bien peuvent être déduites des détails.**

- o Les raisons pour lesquelles les protocoles de traitement précoce fonctionnent comme des traitements curatifs sont évidentes ».

document. The reasons why nonpharmaceutical interventions like masks and medical countermeasures like the mRNA vaccines do not work well can be extrapolated from the details. The reasons why the early treatment protocols work as curatives are apparent.

- page 3, l'hydroxychloroquine est identifiée dans la proposition comme un inhibiteur du SARS-CoV :



En dépit de telles informations, le gouvernement d'**E. Macron** a interdit l'utilisation de l'hydroxychloroquine pour les traitements du covid-19, qu'il l'a même classée comme substance vénéneuse !

Les courriels échangés (**Pièce 6**) entre Jean-François Delfraissy, président du « conseil scientifique » d'**E. Macron**, démontrent clairement le lien de soumission envers le directeur du **NIAID, A. FAUCI**, concernant notamment l'utilisation de l'hydroxychloroquine.

---

**From:** DELFRAISSY Jean-francois [REDACTED] (b) (6) >  
**Sent:** Wednesday, March 25, 2020 10:35 AM  
**To:** Fauci, Anthony (NIH/NIAID) [E] [REDACTED] (b) (6) >  
**Cc:** DELFRAISSY Jean-francois [REDACTED] (b) (6) >  
**Subject:** France situation COVID-19

NIH-000231

---

Hello,

I am once again in service since the global sanitary crisis COVID-19 hit France a couple of weeks ago. I am now leading the Scientific Council for COVID-19, composed of 10 persons, serving the French President, Emmanuel Macron.

The Council was created on March the 10th and we were heavily involved in advisory activities in relation to the President's decision to put the generalized quarantine into force, because we didn't have any better choice.

Firstly

We have a limited number of diagnosis tests, this prevents us from taking up a Korean-like strategy within the next few days. However, by the end of the quarantine (within the following six weeks), we will be able to have a generalisation of the diagnosis test and develop Korean-like apps, as well as a strategy for testing and treatment if we have any drugs available by this time. Before this, we will go through a difficult phase in the following weeks, because we won't have enough beds in our care units in some part of France ...

Secondly

On the therapeutic level, Yazdan Yazdanpanah has taken my place and who is now leading REACTing.

Tomorrow morning a French-European medical trial will begin, under the control of the WHO, with 5 arms (placebo/kalatra/kalatra +interferon beta / product of Guilead / hydroxychloroquine alone or in combination for next week).

As you may know, we are currently facing a press buzz since the announcement made by Dr. Raoult about the effectiveness of hydroxy-chloroquine. His data is not particularly convincing. We can distinguish a slight positive signal but it must be confirmed by a well made randomised trial. We also started a monkey-model study with HC and we should have the results by the end of next week. Also a cohort of severe COVID+ patients have been created and some will be treated with HC : we will analyse those results with all the consciousness needed. It will also be possible to do a prevention trial for healthcare



professionals and aging people with HC. I have an enormous political pressure to release HC and to give it to everyone but I am currently resisting...

How is the situation in the USA, especially after Trump's announcement ? What is the NIH position ? What will be put into force ?

Thanks for your answer.

I put Yazdan Yazdanpanah in a copy of this email.

Best regard

**Pr. Jean-François Delfraissy**

Président | *President*

Comité consultatif national d'éthique pour les sciences de la vie et de la santé

*National Ethical Consultative Committee for life sciences and health*

Ancien Directeur de l'ANRS | *ANRS former Director*

M (b) (6)

T (b) (6)

---

**From:** Fauci, Anthony (NIH/NIAID) [E]  
**Sent:** Wed, 25 Mar 2020 15:01:21 +0000  
**To:** DELFRAISSY Jean-francois  
**Cc:** (b) (6)  
**Subject:** RE: France situation COVID-19

Jean-Francois:

Thank you for your note. I do not see Yazdan copied on your e-mail, and I so please forward this e-mail to him. The NIH position is that we should preferably make drugs available on randomized, controlled clinical trials and not freely distribute them. There is a strong push in the USA, favored by the President, to make certain of these drugs more widely available outside of an RCT using mechanisms such as "compassionate usage". In the USA, as you know, HC (plaquenil) is an approved drug for malaria as well as for certain autoimmune diseases such as SLE. Thus, physicians can prescribe the drug on an "off label" usage. This likely will be the major modality of distribution of this drug in the USA, at least for the foreseeable future.

I am copying Cliff Lane on this e-mail. Please include him on any further correspondence on this subject.

Best regards,

Tony

Anthony S. Fauci, MD  
Director  
National Institute of Allergy and Infectious Diseases  
Building 31, Room 7A-03  
31 Center Drive, MSC 2520  
National Institutes of Health  
Bethesda, MD 20892-2520  
Phone: (b) (6)  
FAX: (301) 496-4409  
E-mail: (b) (6)

The information in this e-mail and any of its attachments is confidential and may contain sensitive information. It should not be used by anyone who is not the original intended recipient. If you have received this e-mail in error please inform the sender and delete it from your mailbox or any other storage devices. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) shall not accept liability for any statements made that are the sender's own and not expressly made on behalf of the NIAID by one of its representatives.

Les documents révélés par le Major J. MURPHY, soulèvent de graves questions sur les réelles motivations d'E. Macron lorsqu'il a imposé aux Français des mesures liberticides inédites dans l'histoire de France et les a gravées dans la loi – elles sont toujours en vigueur -, au mépris de notre Constitution et des engagements internationaux ratifiés par ses prédécesseurs !

On aurait pu, pour le moins espérer, en France, une initiative des représentants du peuple français comparable à celle diligentée par des membres du Congrès américains (Pièce 7), pour que toute la vérité soit faite sur cette affaire qui a volé de nombreuses vies !

The letter is dated January 12, 2022, and is addressed to the Honorable Lloyd Austin, Secretary of Defense, and Rochelle Walensky, M.D., Director, Centers for Disease Control and Prevention. It also mentions the Honorable Xavier Becerra, Secretary of Health and Human Services.

The letter discusses the DARPA report released on January 10th, 2022, and asks several questions regarding the report's classification, the role of the US military, and the origins of the virus. It also mentions the involvement of the US intelligence community and the need for transparency.

Signatories include Madison Cawthon, Hilary Poole, Diana Harshbarger, Lisa McClain, Randy K. Weber, and Matt Gust.

Voici la traduction de la lettre que les représentants du peuple américain ont envoyé aux membres du gouvernement (Secretary of Defense et Secretary of Health and Human services) et au Director of Centers for Disease Control and Prevention :

« Cher secrétaire Austin, directeur Walensky et secrétaire Becerra :

Le 20 janvier 2020, les Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ont confirmé le premier cas de COVID-19 aux États-Unis à partir d'échantillons prélevés, le 18 janvier, dans l'État de Washington<sup>1</sup>, mais pour beaucoup d'entre nous, la pandémie a vraiment commencé par "deux semaines pour arrêter la propagation" annoncées, le 16 mars 2020. Depuis lors, les Américains ont enduré des blocages, le spectre imminent de l'infection une maladie et des mandats médicaux sans précédent (obligation vaccinale).

Aujourd'hui, près de deux ans plus tard, la question demeure : quelle est la véritable origine du coronavirus, également connu sous le nom de SRAS-Cov-2 ?

Pour la plupart, les médias traditionnels n'ont pas été d'une grande aide, négligeant totalement d'enquêter sur l'improbable affirmation des propagandistes du Parti communiste chinois (PCC) et répétant sans réfléchir les querelles bureaucratiques. Trop souvent, nos médias utilisent les gros titres pour rendre sensationnel ce qui est banal, permettant à la poursuite des cotes d'audience et obscurcir ce qui est important.

La couverture médiatique de l'intense questionnement du sénateur américain Rand Paul sur le Dr Fauci en est un exemple classique. Les médias ont décrit cela comme un simple conflit politique interpersonnel - un sénateur irascible contre un fonctionnaire abusé -.

<https://www.cdc.gov/museum/timeline/covid19.html>

Mais, il y a beaucoup plus à cette histoire. Les questions du sénateur Paul, contrées par les réponses égocentriques et obscures du Dr Fauci, ont mis en lumière un problème qui, s'il s'avère vrai, restera dans les mémoires comme l'un des plus grands scandales de l'histoire américaine. À savoir, est-ce que les États-Unis - par le biais de leurs instances

médicales officielles - ont contribué à la création du Coronavirus par des scientifiques du PCC de l'Institut de virologie de Wuhan ?

Récemment, de nouvelles informations sont apparues, détaillant comment cela a pu se produire et par quelles méthodes une dissimulation a pu exister. Ces documents semblent étayer non seulement les critiques du sénateur Paul – et d'autres – à l'égard du Dr Fauci, mais également le nuage de suspicion que les réponses bureaucratiques franchement incroyables à des questions simples ont généré au cours des deux dernières années. Sur la base des preuves présentées par des documents officiels divulgués, nous exigeons des réponses aux questions suivantes :

1. Le rapport DARPA, cité dans la vidéo de Project Veritas du 10 janvier 2022, a-t-il été réellement caché dans un lecteur de partage top-secret et, si oui, pourquoi ?

2. Quel est le protocole DARPA pour déterminer si un rapport doit être classifié ou non-classifié ? De plus, qui à la DARPA est responsable de la rétention de la publication du rapport original détaillant les problèmes posés par le projet proposé d'Ecohealth Alliance ?

3. Si l'inclusion de ce rapport dans un dossier top-secret était une erreur, quel est le protocole DARPA pour s'assurer que ce type d'erreur ne se reproduise pas ?

4. Le Dr Fauci et/ou le NIAID ont-ils financé le projet DEFUSE dans des installations à Wuhan et aux États-Unis (comme allégué par le major Joseph Muphy dans un rapport à l'inspecteur général), même après que la DARPA ait rejeté l'idée, parce qu'elle était trop près de violer les lois contre la recherche de gain de fonction ? En outre, quelles installations aux États-Unis ont participé à cette recherche ?

5. Des millions d'Américains ont souffert, **car les traitements curatifs étaient cachés pour des raisons inconnues**. Dans quelle mesure, le cas échéant, y a-t-il eu une tentative de supprimer les traitements curatifs potentiels identifiés dans le rapport du major Murphy ?

6. Quelle est l'étendue de la collaboration d'Ecohealth Alliance avec l'Institut de virologie de Wuhan dans la création du SRAS-Cov-2 ?

7. Le NIH, le NIAID et/ou l'Ecohealth Alliance ont-ils modifié la définition de la recherche sur le gain de fonction dans le but de contourner le moratoire sur la recherche sur le gain de fonction ?

8. Le Dr Fauci, le NIH et/ou le NIAID reconnaissent-ils le danger que les définitions « nébuleuses » de la recherche sur le gain de fonction représentent pour la santé internationale ?

9. Le Dr Fauci a-t-il participé ou co-conspiré avec un quelconque effort pour tromper le public américain ?

10. Était-il au courant du financement par les NIH de la recherche sur le gain de fonction et des véritables origines du coronavirus ?

Les réponses à ces questions sont nécessaires pour déterminer la responsabilité d'une pandémie qui a volé la vie de nombreuses personnes, privé des millions d'écoliers de leur éducation et mis en faillite de petites entreprises. Dans notre système de gouvernement, basé sur la représentation populaire, des réponses honnêtes sont indispensables, elles constituent la base de la responsabilité et de la préparation à d'autres crises qui pourraient survenir. En notre qualité de membres de la Chambre des représentants des États-Unis, nous exigeons des réponses pour restaurer la confiance dans nos institutions et dans nos organes de gouvernement, foi qui a été mise à l'épreuve par la dissimulation continue des responsables. Avec des réponses honnêtes et factuelles, nous pourrions collectivement tourner la page de ce chapitre de l'histoire et aller de l'avant.

Comme l'a dit Thomas Jefferson "l'honnêteté est le premier chapitre du livre de la sagesse".  
Nous attendons avec impatience votre réponse franche, approfondie et à propos ».

L'enquête sur l'ONG **EcoHealth Alliance** et le rôle d' **A. FAUCI** dans le projet « DEFUSE » et dans l'augmentation des capacités mortelles des virus dans le laboratoire de Wuhan est toujours en cours aux ETATS-UNIS, notamment

poussée par les sénateurs Roger MARSHALL (KANSAS) et Rand PAUL (KENTUCKY) et par des membres du Congrès de plus en plus nombreux.

L'autre question qui vient immédiatement à l'esprit est : qui se cache derrière l'ONG **EcoHealth Alliance** ?

# Pièces du dossier

## Traductions en français :

Pièce 1 : Email et Rapport du Major MURHY

Pièce 2 : Project complet DEFUSE de EcoHealth Alliance

Pièce 3 : Appel d'offre DARPA

## Originaux en anglais :

Pièce 1 : Email et Rapport du Major MURHY

Pièce 2 : Project complet DEFUSE de EcoHealth Alliance

Pièce 3 : Appel d'offre DARPA

Pièce 4 : Project résumé DEFUSE de EcoHealth Alliance

Pièce 5 : Refus de financement par la DARPA

Pièce 6 : Echange d'Email JF DELFRAISSY / Antony FAUCY

Pièces 7 : Lettre de membres du Congrès américain à :

- L. Austin, Secretary of Defense,
- R. Wallensky, Director of Centers for Disease Control and Prevention,
- X Becerra, Secretary of Health and Human services

# Pièce 1 traduite

Pièce 1

**Traduction de l'Email et du rapport du Major Joe Murphy USMC, Liaison du programme maritime, Bureau de la recherche navale USA**

De ; Murphy, Joseph P Maj USMC DAPA DIRO (USA) <xxxxxxxxxxxxxxxxxx>

Envoyé :

To : xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Cc :

Objet :

Capt xxx,

Merci de votre réponse.

Je me permets de vous communiquer certaines informations relatives à COVID dont je ne pense pas que xxx ou votre directeur soit au courant. Vous avez probablement vu en début de semaine que de nouveaux documents officiels reliant les NIH et EcoHealth Alliance à l'Institut de Virologie de Wuhan ont été publiés par The Intercept. Je suis tombé sur d'autres documents compromettants et j'ai produit une analyse peu après avoir quitté la DARPA le mois dernier. Ce rapport a été acheminé au bureau de l'IG du DOG.

Je ne suis pas sûr que la signification de ce que j'ai communiqué soit comprise par ceux qui ont reçu le rapport.

Les décisions concernant les vaccins ne semblent pas être éclairées par l'analyse des documents. Les principaux points sont les suivants : le SRAS-CoV-2 correspond aux variantes du vaccin contre le SRAS que le programme NIH-EcoHealth fabriquait à Wuhan ; le ministère de la Défense a rejeté la proposition de programme parce que les vaccins seraient inefficaces et parce que les protéines de pointe insérées dans les variantes étaient jugées trop dangereuses (gain de fonction) ; le ministère de la Défense exige maintenant une analyse ; cette situation répond aux critères d'interdiction ou d'abandon des vaccins jusqu'à ce que la toxicité de la protéine de pointe puisse être étudiée. Le document contient également des informations sur les médicaments qui traitent efficacement les CoV SARRS du programme.

C'est la raison pour laquelle je vous contacte. J'essaie d'aider les responsables de l'aide à s'attaquer aux vaccins et au mandat avec le maximum d'informations disponibles. Je voulais vous transmettre ces informations.

Plusieurs des documents référencés dans le rapport de l'IG ont depuis été déclassés.

N'hésitez pas à me contacter si vous avez des questions.

V/R

Major Joe Murphy USMC  
Liaison du programme maritime  
Code 34 & 35  
Bureau de la recherche navale

NON-CLASSIFIÉ

**DEFENSE ADVANCED RESEARCH PROJECTS AGENCY**  
675 NORTH RANDOLPH STREET  
ARLINGTON, VA 22203-2114

13 août 21

De : COMMANDANT DU CORPS DES MARINES FELLOW, DARPA  
À : INSPECTEUR GÉNÉRAL

Subj : ENQUÊTE SUR L'ORIGINE DU SRAS-CoV AVEC LE PROGRAMME DU GOUVERNEMENT  
AMÉRICAIN  
ANALYSE DE DOCUMENTS NON DIVULGUÉS

Ref : (1) Diapositive exécutive HR00118S0017 EcoHealth Alliance DEFUSE  
(2) HR00118S0017 - PREEMPT-FP-019-PM Résumé (sélectionnable - non recommandé)  
(3) PREEMPT Volume 1 n° ESS HR00118S0017 EcoHealth Alliance DEFUSE  
(4) PREEMPT Volume 2 EHA Final HR00118S0017 EcoHealth Alliance  
DEFUSE  
(5) SF424 2 0-V2.0 HR000S0017 EcoHealth Alliance DEFUSE  
(6) WIV Budget packet HR000S0017 EcoHealth Alliance DEFUSE  
(7) WS00094394-RR\_KeyPersonExpanded\_2\_0-V.2 HR00118S0017  
EcoHealth Alliance DEFUSE  
(8) WS00094394-RR\_PersonalData\_1\_2-V1.2 HR00118S0017  
EcoHealth Alliance DEFUSE

1. Le SARS-CoV-2 est un vaccin recombinant de chauve-souris créé par les Américains, ou son virus précurseur. Il a été créé dans le cadre d'un programme de l'Alliance EcoHealth à l'Institut de virologie de Wuhan (WIV), comme le suggèrent les rapports relatifs à l'hypothèse de la fuite du laboratoire. Les détails de ce programme ont été dissimulés depuis le début de la pandémie. Ces détails se trouvent dans la réponse de la proposition de l'Alliance EcoHealth à la Broad Agency Announcement (BAA) HR00118S0017 du programme PREEMPT de la DARPA, datée de mars 2018 - un document qui n'a pas encore été rendu public.

Le contenu de la proposition de programme est extrêmement détaillé. Peter Daszak décrit étape par étape ce que l'organisation compte faire, phase par phase et par lieu. Les principaux scientifiques impliqués, leurs rôles et leurs institutions sont indiqués. Le plan de financement des travaux du WIV est un document à part entière. Les raisons pour lesquelles les interventions non-pharmaceutiques comme les masques et les contre-mesures médicales comme les vaccins ARNm ne fonctionnent pas bien peuvent être déduites des détails. Les raisons pour lesquelles les protocoles de traitement précoce fonctionnent comme des traitements curatifs sont évidentes.

La forme du SRAS-CoV-2 telle qu'elle est apparue est probablement un précurseur du SRAS-CoV humanisé recombinant, délibérément virulent, qui devait faire l'objet d'une ingénierie inverse dans un vaccin vivant atténué contre le SRAS-CoV. Sa nature peut être déterminée à partir de l'analyse de son génome et du contexte fourni par la proposition de l'Alliance EcoHealth. La combinaison de cette analyse avec les collectes de renseignements américains sur Wuhan facilitera cette détermination.

NON-CLASSIFIÉ

## NON-CLASSIFIÉ

Une fois synthétisées avec la proposition d'EcoHealth Alliance, les données américaines confirment qu'EcoHealth Alliance a effectué le travail proposé. Les analystes produisent leurs rapports dans le vide, sans le contexte fourni par la proposition. En tant que membre de la DARPA, j'ai pu voir les deux, et je peux faire la synthèse. Par exemple, le personnel du WIV identifié dans les rapports de renseignement est nommé dans la proposition, ces personnes utilisent le lexique de la proposition dans les collections, et les variants du virus proposés pour l'expérimentation sont identiques à celles glanées par les collections. De plus, je suis également au courant des informations obtenues par les enquêteurs du bureau du Congrès et par DRASTIC, qui corroborent davantage le fait que le programme détaillé dans la réponse du BAA a été mené jusqu'à son arrêt en avril 2020.

L'objectif du programme EcoHealth, appelé DEFUSE dans la proposition, était d'inoculer les chauves-souris dans les grottes du Yunnan, en Chine, où des cas confirmés de SRAS-CoV ont été découverts. Ostensiblement, cela permettrait de prévenir une autre pandémie de SRAS-CoV ; le système immunitaire des chauves-souris serait renforcé pour empêcher l'émergence d'un SRAS-CoV mortel. Le langage spécifique utilisé est " inoculer aux chauves-souris de nouvelles protéines chimériques polyvalentes de type spike pour renforcer leur mémoire immunitaire adaptative contre des virus spécifiques à haut risque ". Étant donné qu'il s'agit d'un projet lié à la défense, il est logique qu'EcoHealth ait d'abord soumis la proposition au ministère de la Défense, avant de s'adresser aux NIH/NIAID. La réponse au BAA est datée de mars 2018 et a été soumise par Peter Daszak, président de l'Alliance EcoHealth.

La DARPA a rejeté la proposition parce que les travaux étaient trop près de violer le moratoire sur le gain de fonction (GoF), malgré ce que Peter Daszak dit dans la proposition (que les travaux ne le feraient pas). Comme on le sait, le Dr Fauci du NIAID n'a pas rejeté la proposition. Les travaux ont eu lieu au WIV et sur plusieurs sites aux États-Unis, identifiés en détail dans la proposition.

La réponse d'EcoHealth Alliance au BAA PREEMPT est placée avec d'autres documents de proposition dans le dossier PREEMPT sur le disque partagé JWICS (top secret) du DARPA Biological Technologies Office, adresse : Ntetwork/filer/BTO/CI Folder PREEMPT

Ce dossier est resté vide pendant un an. Les fichiers, totalement dépourvus de données de classification ou de distribution, ont été placés dans ce dossier en juillet 2021, ce qui coïncide manifestement avec les reportages des médias, mon enquête et celle du sénateur Paul sur les programmes de gain de fonction des NIH/NIAID. La nature non-marquée, combinée au timing indique que les documents étaient cachés. Aucun dossier à la DARPA n'est non-marqué dans la distribution ou la classification, y compris les documents exclusifs. De plus, PREEMPT est un programme non-classifié.

Les fichiers sont aussi maintenant détenus par le Marine Corps Intelligence Activity (MCIA). Ils sont identifiés en référence ci-dessus.

2. Le SARS-CoV-2, ci-après dénommé SARSr-CoV-WIV, est une chimère synthétique de protéine de pointe conçue pour s'attacher aux récepteurs ACE2 de l'être humain et

NON-CLASSIFIÉ



insérée dans un SARSr-CoV recombinant de colonne vertébrale de chauve-souris. Il s'agit probablement d'un vaccin vivant qui n'a pas encore été modifié pour atteindre un état plus atténué, que le programme a cherché à créer avec sa version finale. Il a fui et s'est répandu rapidement, parce qu'il a été aérosolisé pour pouvoir infecter efficacement les chauves-souris dans les grottes, mais il n'était pas encore prêt à infecter les chauves-souris, c'est pourquoi il ne semble pas infecter les chauves-souris. La raison pour laquelle la maladie est si déroutante, est parce qu'il s'agit moins d'un virus, que de protéines de pointe modifiées qui se baladent dans un essaim de quasi-espèces de SARSr-CoV. Plus il est proche de la forme finale du vaccin vivant atténué, plus il est probable qu'il se soit désatténué depuis la fuite initiale, en août 2019.

L'utilité de certaines contre-mesures peut être extrapolée à partir des documents :

- L'équipe a sélectionné les SARSr-CoVs qui étaient les plus résistants aux anticorps monoclonaux et au vaccin.
- Il n'est pas pratique d'inoculer les chauves-souris directement avec des piqûres, et les chauves-souris ne peuvent pas non plus contracter d'infections respiratoires à partir de gouttelettes. L'équipe a donc mis au point un aérosol pour administrer les inoculations directement dans les grottes. Pour s'assurer de son bon fonctionnement, ils ont développé l'aérosol à des civettes.
- La proposition indique que l'interféron, le Remdesivir et le phosphate de chloroquine inhibent la réplication virale du SARSr-CoV.

En raison de sa nature (désormais) connue, la maladie du SARSr-CoV-WIV est facilement résolue par un traitement précoce qui inhibe la réplication virale qui propage les protéines spike dans le corps (qui induisent une réponse immunitaire hyperactive nuisible lorsque le corps tente d'éliminer les spikes des récepteurs ACE2). Un grand nombre des premiers protocoles de traitement ignorés par les autorités fonctionnent, parce qu'ils inhibent la réplication virale ou modulent la réponse immunitaire à la protéine spike, ce qui est logique dans le contexte de ce qu'EcoHealth a créé. Certains de ces protocoles de traitement inhibent également l'action de la protéine spike modifiée. Par exemple, l'ivermectine (identifiée comme curative, en avril 2020) fonctionne à toutes les phases de la maladie, car elle inhibe la réplication virale et module la réponse immunitaire. Il convient de noter que le phosphate de chloroquine (Hydroxychloroquine, identifié comme curative, en avril 2020) est identifié dans la proposition comme un inhibiteur du SARS-CoV, tout comme l'interféron (identifié comme curatif, en mai 2020).

Les vaccins codés par un gène, ou " ARNm ", fonctionnent mal, car ils sont des répliquons synthétiques des protéines de pointe du SARSr-CoV-WIV déjà synthétiques et ne possèdent aucun autre épitope. L'ARNm demande aux cellules de produire des copies synthétiques de la protéine de pointe synthétique du SRASr-CoV-WIV, directement dans la circulation sanguine, où elles se propagent et produisent la même tempête immunitaire ACE2 que le vaccin recombinant. De nombreux médecins du pays ont constaté que les symptômes des réactions au vaccin reflètent les symptômes de la maladie, ce qui corrobore la nature synthétique et la fonction similaires des protéines de pointe respectives.

Les personnes vaccinées n'ont aucun moyen de défense contre l'entrée dans la circulation sanguine, mais leur nez les protège de la protéine quasi-espèce recombinante pendant l'"infection naturelle" (mieux connue sous le nom d'inoculation par aérosol).

## NON-CLASSIFIÉ

En outre, la proposition d'EcoHealth indique qu'une " approche vaccinale ne présente pas une couverture épitopique suffisante pour protéger contre les quasi-espèces de coronavirus ". Par conséquent, ils ont essayé de faire fonctionner les vaccins par " un renforcement immunitaire marqué via des inoculateurs de vaccins utilisant des protéines de pointe recombinantes polyvalentes chimériques ". La nature de l'utilisation d'un vaccin à base de protéine de pointe avec un épitope, contre un vaccin à base de protéine de pointe avec une quasi-espèce peut expliquer la réponse inhabituelle (et potentiellement préjudiciable) des anticorps parmi les vaccinés aux nouvelles variantes de COVID. Fondamentalement, les connaissances fournies par la proposition indiquent que le risque de renforcement dépendant des anticorps (ADE) lié à la vaccination devrait être évalué en priorité, en plus de la réalité selon laquelle les vaccins à épitope unique auront peu d'effet contre le SARSr-CoV-WIV, comme indiqué dans la proposition.

Le potentiel de désatténuation du SARSr-CoV-WIV requiert une attention immédiate. Par le passé, il a été prouvé que les vaccins vivants se désatténaient. Si c'est le cas du SARSr-CoV-WIV, la campagne de vaccination de masse constitue en fait un gain de fonction accéléré pour ce virus. Étant donné qu'il a été conçu pour tuer les chauves-souris à partir d'un SRAS-CoV sensible à l'homme, la vaccination de l'homme contre ce virus lui permet en fait de regagner sa fonction vers une forme plus désatténuée et sensible à l'homme. L'une des étapes du programme DEFUSE consiste à améliorer la protéine de pointe du SARS-CoV-WIV, afin qu'elle soit plus robuste contre les vaccins monoclonaux. Les mécanismes d'amélioration de la protéine de pointe du SARSr-CoV-WIV (autres que l'ingénierie directe) consistent à le mettre à l'épreuve avec des animaux qui possèdent des anticorps dirigés contre la protéine de pointe. Le virus atténué mourra ou adaptera sa forme pour neutraliser les anticorps de la protéine spike. L'intention était d'effectuer cette tâche sur des souris humanisées, puis sur des souris " batifiées ". Au lieu de cela, on l'a fait avec la population mondiale.

Le SARSr-CoV-WIV n'est pas destiné à tuer les chauves-souris, mais à les immuniser. Cette nature peut expliquer son innocuité générale pour la plupart des gens, et sa nocivité pour les personnes âgées et les personnes souffrant de comorbidité, qui sont en général plus sensibles aux réactions vaccinales. Le caractère asymptomatique s'explique également par l'intention vaccinale des créateurs du vaccin (un bon vaccin ne génère pas de symptômes). On pourrait s'attendre à de tels effets dans le cas d'un vaccin immature ou d'un vaccin ayant fait l'objet d'une ingénierie inverse pour passer d'une forme plus virulente à une forme atténuée. L'effet de la protéine spike sur les récepteurs ACE2 exacerbe la nocivité en fonction de l'âge et de la comorbidité. La nature de la désatténuation du SARSr-CoV-WIV indiquera également sa virulence future, bien qu'on sache que sa nature neutralise en fin de compte la menace, puisque des traitements efficaces peuvent être mis en œuvre en toute confiance.

3. DRASTIC et d'autres scientifiques mettront au propre ma description de la nature et de la progression du SARSr-CoV-WIV dans le cadre du programme DEFUSE. Ces informations sont suffisantes pour un rapport d'enquête et plus que suffisantes pour corriger la stratégie actuelle de lutte contre la pandémie. Auparavant, la nation ne se connaissait pas elle-même, ni ne connaissait l'adversaire dans le conflit de la pandémie. Maintenant, elle connaît les deux. Le problème peut être formulé de manière appropriée et spécifique face à une hypothèse confirmée. La limitation de la transmission de la maladie peut être abandonnée comme objectif stratégique implicite, car ce n'est pas le problème réel,

## NON-CLASSIFIÉ

elle n'est pas non plus réellement réalisable. La stratégie consistera à aligner les protocoles de traitement précoce et la prophylaxie sur les moyens curatifs connus. Ce plan d'action permettra d'atteindre l'objectif stratégique de résolution clinique pour ceux qui sont sensibles aux effets indésirables de l'inoculation du SARSr-CoV-WIV.

4. On me demandera inévitablement comment j'ai compris cela et comment j'ai découvert les documents. La réponse à la pandémie est devenue l'objectif principal de mes efforts en tant que membre du DARPA. Le DARPA a travaillé sur un certain nombre d'innovations en matière de pandémie et une grande partie de son équipe était familiarisée avec la biodéfense. J'ai eu l'occasion de m'asseoir au dernier rang, d'observer et d'écouter les efforts du gouvernement. Ma qualité de membre du DARPA, peu contraignante, m'a également permis d'observer et de lire le terrain. Cette observation a pris de l'ampleur, au point de devenir une série de rapports, comme ceux que préparerait un éclaireur militaire chargé d'investiguer un problème.

Ces rapports m'ont servi de réflexion itérative sur le problème pendant plusieurs mois. Finalement, je suis arrivé à l'hypothèse que ce qui avait fuité du WIV pouvait être un vaccin de chauve-souris ou son précurseur. Il était possible que les États-Unis tentent d'éviter une épidémie de SARS-CoV en l'arrêtant à sa source, non pas en stoppant les infections chez les humains, mais en stoppant les infections chez les chauves-souris. Les Américains sont créatifs, même s'ils sont imprudents, et suffisamment confiants sur le plan technologique pour tenter l'expérience. Ce concept semblait s'inscrire dans le cadre du programme PREEMPT, et DRASTIC avait découvert que certains spécimens du programme PREDICT de l'USAID avaient été obtenus en Afrique et envoyés au WIV. De plus, la nature inhabituelle et la pathologie du virus laissaient penser qu'il pourrait s'agir d'un vaccin ou d'un produit similaire.

Un défi technologique aussi difficile que l'inoculation de chauves-souris en Chine serait d'abord tenté au DARPA. Le niveau massif de suppression d'informations du "Projet Manhattan", exécuté par le gouvernement et la Trusted News Initiative, indique qu'il serait couvert si quelque chose de mauvais se produisait. L'hypothèse de la fuite du laboratoire et les querelles entre le sénateur Paul et le Dr Fauci indiquent que la dissimulation était plus localisée. De plus, une couverture réelle serait plus rigoureuse avec la paperasse. J'ai donc supposé que les fichiers non-classifiés seraient cachés sur un réseau de plus haut niveau et je les ai trouvés là où je m'y attendais. J'ai compris ce qu'ils étaient et leur contenu, j'ai sorti les fichiers et j'ai compilé ce rapport.

8/13/2021

X

Joseph Murphy

Marjor, US Marine Corps

Signed by : MURPHY.JOSEPH.PATRICK 1275023554

NON-CLASSIFIÉ

i DARPA : Defense Advanced Research Projects Agency (Agence pour les projets de recherche avancée de la défense)

ii PREEMPT : Preventing Emerging Pathogenic Threats (Prévention des menaces pathogènes émergentes)

iv DRASTIC : Decentralized Radical Autonomous Search Team Investigating COVID-19. Ce groupe de scientifiques et d'enquêteurs a révélé l'hypothèse de la fuite du laboratoire dans le mainstream et a identifié les rapports de la Chine et de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) sur les origines du SARS-CoV-2 à Wuhan.

v DEFUSE : Désamorcer la menace du coronavirus transmis par les chauves-souris

vi PREEMPT Volume 1 n° ESS HR00118s00117 EcoHealth Alliance DEFUSE. Une autre description utilisée : " Nous développerons des chimères de protéines de pointe recombinantes à partir de SARSr-CoVs connus et celles caractérisées par DEFUSE, en utilisant les détails de la structure de la protéine S du SARS et de la liaison avec la cellule hôte, nous séquencerons, reconstruirons et caractériserons les « spike » trimmers de pointe et les RBDs de SARSr-CoVs, les incorporerons dans des nanoparticules ou des vecteurs de poxvirus de raton-laveur pour les délivrer aux chauves-souris. "

James Gimbert, directeur du programme DARPA, déclare : " L'approche de l'équipe implique potentiellement une recherche GoF/DURC (elle vise à synthétiser des glycoprotéines de pointe qui peuvent se lier à des récepteurs cellulaires humains et à les insérer dans des squelettes de SRAS-CoV pour évaluer la capacité à provoquer une maladie semblable au SRAS)."

viii " Nous synthétiserons commercialement les gènes de la glycoprotéine S du SARSr-CoV, conçus pour être insérés dans le squelette du clone moléculaire SHC014 ou WIV16 (identité de la protéine S à 88 % et 97 % avec le SARS-Urbani épidémique). Il s'agit de BSL-3, qui ne sont pas des agents sélectifs et ne sont pas soumis au p3CO " (ils utilisent le squelette du SARSr-CoV, qui en est exempt).

ix Duke NUS Medical School, UNC, USGS National Wildlife Health Center, Palo Alto Research Center, Kuming, Singapore, et Madison, WI.

x PREEMPT Volume 1 n° ESS HR00118S00117 EcoHealth Alliance DEFUSE

xi PREEMPT Volume 1 n° ESS HR00118S00117 EcoHealth Alliance DEFUSE

xii " Pour Delta, les anticorps neutralisants ont une affinité réduite pour la protéine de pointe, tandis que les anticorps facilitateurs ont une affinité " remarquablement accrue " pour la protéine de pointe. "Yahi, et al. " Les anticorps anti-SARS-CoV-2 favorisant l'infection reconnaissent à la fois la souche originale Wihan/D614G et les variantes Delta. Un risque potentiel pour la vaccination de masse ? "Journal of infection. 9 août 2021.

[https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453\(21\)00392-3/fulltext](https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(21)00392-3/fulltext)

NON-CLASSIFIÉ

**DEFENSE ADVANCED RESEARCH PROJECTS AGENCY**

675 NORTH RANDOLPH STREET

ARLINGTON, VA 22203-2114

**FEUILLE DE RÉSUMÉ PM  
SÉLECTION DE LA SOURCE SENSIBLE**

Numéro de sollicitation : HR00118S00117

Titre de la Sollicitation : Prévention des menaces pathogènes émergentes (PREEMPT)

Nom du PM : James Gimlett

Proposant : EcoHealth Alliance

Titre de la proposition : Projet DEFUSE : Désamorcer la menace des coronavirus des chauves-souris

Identificateur de la proposition : HR00118S00117-PREEMPT-FP-019

J'ai examiné la proposition et les rapports d'évaluation ci-joints et j'estime que cette proposition peut être sélectionnée sur la base des critères d'évaluation inclus dans le BAA. Toutefois, je ne recommande pas le financement à ce moment-ci en raison de la justification fournie ci-dessous.

Financement demandé (par le proposant) :

Phase I	Phase II	Total
\$8,411,546	\$5,797,699	\$14,209,245

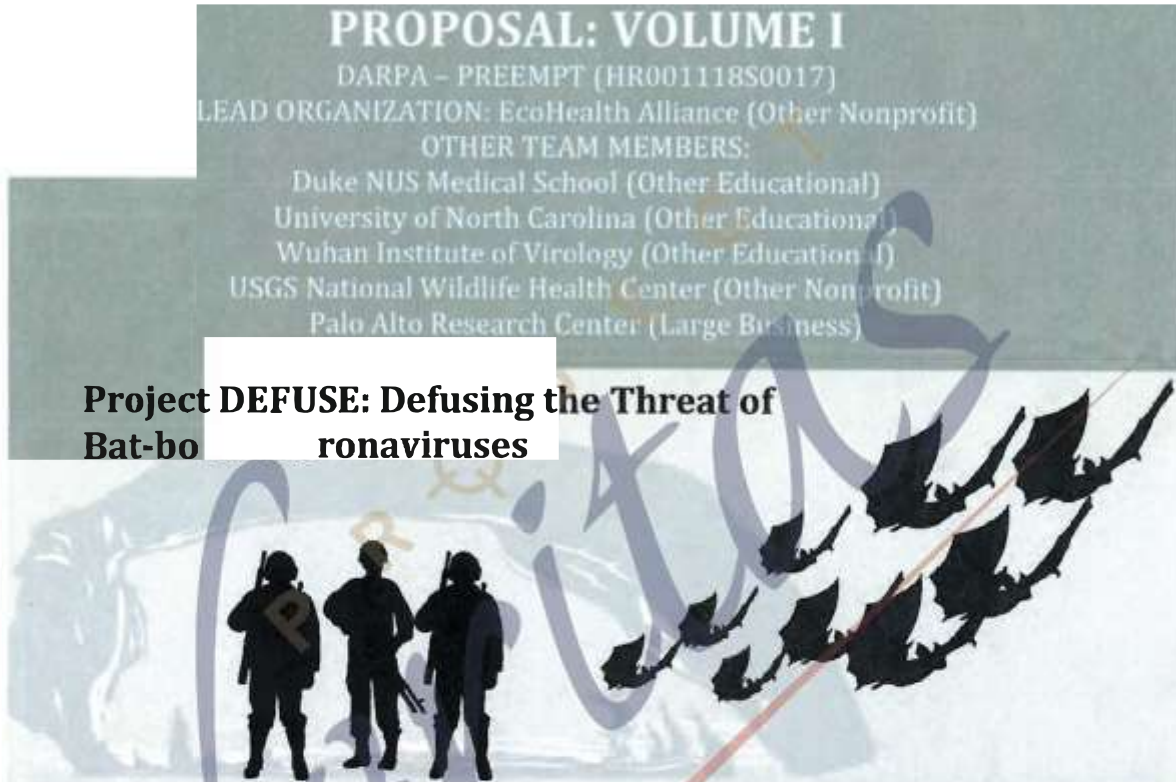
Cette proposition vise à identifier et à modéliser le risque de propagation de nouveaux coronavirus liés au SRAS à potentiel pandémique (SARSr-CoVs) en Asie, en se concentrant spécifiquement sur les grottes de chauves-souris connues en Chine. Dans le cadre de travaux antérieurs réalisés sous l'égide de l'USAID Predict, l'équipe a identifié un risque élevé de SARSr-CoVs dans des grottes spécifiques en Asie. Le projet bénéficie d'un bon départ, puisque les grottes de chauves-souris présentent déjà des résultats positifs, avec une prévalence élevée, pour plusieurs virus du SRAS, de sorte que l'équipe n'aura pas à chercher une aiguille dans une botte de foin. L'équipe s'appuiera sur les travaux de surveillance antérieurs, ainsi que sur un travail impressionnant de développement de cartes de risque de points chauds zooniques basées sur des données écologiques et de débordement antérieures. Deux approches sont proposées pour prévenir la propagation des virus zoonotiques en réduisant l'excrétion virale dans les grottes des chauves-souris : 1) le renforcement du système immunitaire inné pour réduire la régulation virale ; 2) le renforcement ciblé du système immunitaire par le biais d'inoculations vaccinales utilisant des protéines chimériques polyvalentes recombinantes de pointe pour se protéger contre des virus spécifiques à haut risque.

Deux des trois examinateurs ont marqué cette proposition comme étant sélectionnable. Les principaux points forts sont l'équipe expérimentée et les grottes sélectionnées comme hotspots de coronavirus qui présentent une prévalence élevée de nouveaux coronavirus de chauve-souris. Les travaux expérimentaux in vivo et in vitro sont logiquement conçus et seront utilisés pour valider les modèles moléculaires et évolutifs. Les approches de préemption proposées, bien qu'un peu conventionnelles, ont l'avantage d'un délai rapide pour la validation sur des modèles de chauve-souris ou de souris " batinisées ". De multiples mécanismes d'administration du vaccin sont proposés, y compris la pulvérisation aérosolisée, l'application transdermique de nanoparticules et les gels adhésifs comestibles. Cependant, plusieurs faiblesses de la proposition ont également été relevées. Elles comprennent un manque de détails concernant les données, les analyses statistiques et le développement de modèles, ainsi que la manière dont les travaux antérieurs seront exploités et étendus. La proposition manque également de points de décision clairs pour évaluer le déploiement et la validation des méthodes de préemption TA2 dans les

Informations sur la sélection des sources Voir FAR 2.101 et FAR 3.104

# Pièce 2 traduite

## Pièce 2 : Proposition de EcoHealth Alliance





Projet DEFUSE : Désamorcer la menace des coronavirus transmis par les chauves-souris  
Cher comité pour le programme DARPA PREventing EMerging Pathogenic Threats (PREMPT),

Nous vous prions d'accepter la proposition suivante pour le programme PREEMPT (PREventing EMerging Pathogenic Threats, HROOHIS30017) :

Dr. Peter Daszak  
Président, EcoHealth Alliance  
460 W. 34th Street 17th Floor  
New York, NY 1001  
212-380-4474  
daszak@ccohealthalliance.org

Titre : Projet Defuse : désamorcer la menace des coronavirus transmis par les chauves-souris

Montant de la proposition demandée : 14 209 245 \$.

Je vous remercie pour votre temps et j'espère avoir de vos nouvelles. Si vous. Si vous avez des questions, n'hésitez pas à m'appeler ou à m'envoyer un courriel.

Je vous prie d'agréer, Madame, Monsieur, l'expression de mes sentiments distingués,

**Local conservation.  
Global health.**

EcoHealth Alliance  
460 West 34th Street, 17th Floor  
New York, NY 10001-2320  
212.380.4460

[EcoHealthAlliance.org](http://EcoHealthAlliance.org)

## Section II A. RÉSUMÉ EXECUTIF

**Approche technique :** Notre objectif est de désamorcer le potentiel de propagation des nouveaux coronavirus liés au SRAS à haut risque zoonotique provenant des chauves-souris en Asie. Dans l'AT1, nous échantillonnerons intensivement les chauves-souris sur nos sites de terrain où nous avons identifié des coronavirus liés au SRAS à haut risque de contagion. Nous séquencerons leurs protéines de pointe, nous en ferons l'ingénierie inverse pour réaliser des essais de liaison et nous les insérerons dans des squelettes de SARSr-CoV de chauve-souris (WIV1, 5HC014) (il s'agit de squelettes de SARSr-CoV de chauve-souris, et non de SARS-CoV, et ils sont exempts des problèmes de double usage et de gain de fonction) pour infecter des souris humanisées et évaluer leur capacité à provoquer une maladie semblable au SRAS. Notre équipe de modélisation utilisera ces données pour construire des modèles génotype-phénotype à apprentissage automatique de l'évolution virale et du risque de propagation. Nous les validerons de manière unique avec la sérologie d'échantillons humains prélevés précédemment, par le biais de tests LIPS qui évaluent quelles protéines de pointe permettent la propagation chez l'homme. Nous construisons des modèles spatiaux hôte-pathogène pour prédire la composition des espèces de chauves-souris dans les grottes d'Asie du Sud-Est, paramétrés avec un inventaire complet de la distribution hôte-virus sur nos sites d'essai sur le terrain, trois grottes dans la province du Yunnan, en Chine, et une série d'ensembles de données mondiales uniques sur les relations hôte-virus des chauves-souris. À la fin de l'année 1, nous créerons un prototype d'application pour le combattant qui identifiera la probabilité que les chauves-souris hébergent des pathogènes viraux dangereux sur n'importe quel site en Asie.

Dans l'AT2, nous évaluerons deux approches pour réduire l'excrétion du SRASr-Cov chez les chauves-souris des grottes : (1) le renforcement immunitaire à grande échelle, dans lequel nous inoculerons aux chauves-souris des modulateurs immunitaires afin d'augmenter leur réponse immunitaire innée et de réduire la réplication virale ; (2) le renforcement immunitaire ciblé, dans lequel nous inoculerons aux chauves-souris de nouvelles protéines de pointe recombinantes chimériques polyvalentes ainsi que le modulateur immunitaire afin de renforcer l'immunité innée contre des virus spécifiques à haut risque. Nous testerons des méthodes d'administration de l'inoculum sur des chauves-souris captives, notamment un nouveau système automatisé d'aérosolisation, l'application transdermique de nanoparticules et des gels adhésifs comestibles. Nous utiliserons un modèle de simulation stochastique éclairé par des données de terrain et expérimentales pour caractériser la dynamique virale dans nos sites d'essai en grotte, en maximisant le temps. Protocole d'inoculation, méthode d'administration et efficacité de la suppression virale. Les produits biologiques les plus efficaces seront testés dans nos grottes tests dans la province du Yunnan, avec une réduction de l'excrétion virale comme preuve de concept.

**Approche de gestion :** Les membres de notre groupe de collaboration travaillent ensemble sur les chauves-souris et leurs virus depuis plus de 15 ans. L'organisation principale, EcoHealth Alliance, supervisera tous les travaux. Le personnel de l'EHA développera des modèles pour évaluer la probabilité d'un débordement de CoV spécifique au SRAS, et identifiera la stratégie la plus efficace pour la livraison d'inoculum stimulant et ciblant le système immunitaire. Des travaux spécifiques seront sous-traités aux organisations suivantes :

- Le professeur Baric, de l'Université de Caroline du Nord, dirigera les travaux de stimulation immunitaire ciblée, en s'appuyant sur ses deux décennies d'expérience en matière de rétro-ingénierie des protéines de pointe du CoV et d'autres virus.
- Le professeur Wang, de l'université Duke-Natl. de Singapour, dirigera les travaux sur le renforcement immunitaire à grande échelle, en s'appuyant sur les travaux pionniers de son groupe sur l'immunité des chauves-souris.
- Le Dr Shi, de l'Institut de virologie de Wuhan, effectuera des tests viraux sur tous les échantillons collectés, des essais de liaison et certains travaux sur les souris humanisées.
- Le Dr Rocke, du National Wildlife Health Center de l'USGS, optimisera l'administration de produits biologiques à modulation immunitaire, en s'appuyant sur ses travaux relatifs à l'administration de vaccins à la faune sauvage, y compris aux chauves-souris.
- Le Dr Unidad, du Palo Alto Research Center, dirigera le développement d'un nouveau mécanisme d'aérosolisation automatisé pour les molécules immunostimulantes.

Nous demandons un financement total de 14 209 245 \$ pour ce projet sur 3,5 années.



## Section II C. BUTS ET IMPACT

**Vue d'ensemble :** Les objectifs primordiaux de DEFUSE sont les suivants :

- **Identifier et modéliser le risque** de propagation des nouveaux coronavirus liés au SRAS (SARS-CoVs) en Asie.
- **Concevoir et démontrer la preuve** du concept selon lequel l'augmentation de l'immunité innée naturellement faible des chauves-souris (**renforcement immunitaire à grande échelle**) et le ciblage des coronavirus SARS en particulier (**renforcement immunitaire ciblé**) réduiront transitoirement le risque de contagion.

Notre stratégie visant à réduire le risque d'émergence de virus chez les chauves-souris protégera le combattant au sein de l'USPACOM et pourra être étendue à d'autres régions et à d'autres virus (Ebola, Henipavirus, rage).



### Innovation et singularité :

Les chauves-souris abritent plus de zoonoses émergentes que tout autre groupe de mammifères, elles sont omniprésentes, abondantes et souvent négligées. Cependant, à part les EPI, il n'existe aucune technologie permettant de réduire le risque d'exposition aux nouveaux CoVs des chauves-souris, ni aucun traitement ou contre-mesure efficace. Les CoVs du SRAS sont enzootiques chez les chauves-souris asiatiques 1,3, africaines 4 et européennes 5,6 qui se perchent dans des grottes mais qui s'alimentent largement la nuit, excréant le virus dans leurs excréments et leur urine. Nous avons maintenant publié des preuves directes de la propagation des nouveaux CoV du SRAS chez les humains dans la province du Yunnan, en Chine, à proximité d'un complexe de grottes où nous avons isolé des souches qui produisent une maladie semblable au SRAS chez des souris humanisées, mais qui ne répondent pas au traitement par anticorps ou à la vaccination. Ces virus représentent un danger évident pour notre sécurité sanitaire militaire et mondiale en raison de leur circulation et de leur évolution chez les chauves-souris et de leur propagation périodique à l'homme.

EcoHealthAlliance (EHA) est le leader mondial des modèles prédictifs de l'émergence virale. Nous utiliserons des modèles d'apprentissage automatique des points chauds de propagation, la cartographie spatiale hôte-pathogène et génotype-phénotype, ainsi que des ensembles de données uniques pour valider et affiner les cartes de risque d'émergence virale des points chauds. Nous avons montré que l'immunité innée atténuée des chauves-souris leur permet de transporter des virus autrement mortels, probablement comme une adaptation au stress physiologique du vol. Nous concevons des stratégies telles que des petites molécules agonistes des récepteurs de type RIG (RLR) ou Toll (TLR), afin de réguler l'immunité des chauves-souris et de supprimer la réplication virale, réduisant ainsi de manière significative l'excrétion et la propagation virales (renforcement immunitaire à grande échelle). Nous compléterons cette action en couplant les traitements agonistes avec des protéines de pointe recombinantes du SRAS-CoV pour renforcer la réponse immunitaire adaptative préexistante des chauves-souris adultes contre des SRAS-CoV spécifiques à haut risque (renforcement immunitaire ciblé). Nous concevons de nouvelles méthodes d'administration et d'application automatisée, sur la base de nos travaux antérieurs sur les vaccins pour la faune sauvage, afin de réduire les risques pendant le déploiement.

### Domaine technique 1

Notre stratégie commence par un inventaire complet des chauves-souris et de leurs CoV SRASr dans le complexe de grottes de notre site d'intervention test au Yunnan, en Chine, qui abrite des chauves-souris à haut risque de CoV SRASr. Nous collecterons des données dans trois grottes de ce système (l'une est notre meilleur site d'intervention et les deux autres sont des sites de contrôle) sur : l'abondance et la diversité mensuelles des chauves-souris, la prévalence et la diversité virales, la charge virale individuelle des chauves-souris et les marqueurs physiologiques de l'hôte ; la caractérisation génomique des souches de SARSr-CoV à faible et à haut risque parmi les espèces de chauves-souris, les sexes et les classes d'âge ; la télémétrie par satellite et les données de marquage-recapture sur le domaine vital des chauves-souris et les mouvements entre les grottes ; et le suivi des changements quotidiens, hebdomadaires et saisonniers dans les populations de chauves-souris. Nous utiliserons des réseaux neuronaux stochastiques pour construire des modèles conjoints de distribution des espèces (JSDM) afin de prédire la composition des espèces de chauves-souris dans les grottes et la diversité des espèces à haut risque de SRAS-CoV en Chine du Sud, en Asie du Sud et en Asie du Sud-Est. Ces modèles seront paramétrés à l'aide de la base de données de l'EHA sur les relations hôte-viral des chauves-souris et



des estimations de la richesse virale zoonotique par espèce de chauve-souris ; des données d'inventaire biologique de toutes les grottes de chauves-souris du sud de la Chine ; de l'inventaire complet du SARSr-CoV de nos sites de test dans les grottes du Yunnan ; et des données de distribution des espèces pour toutes les chauves-souris. Nous testerons et validerons les prédictions de diversité virale à l'aide de données provenant de > 10 000 échantillons de chauves-souris collectés précédemment dans 6 pays asiatiques dans le cadre de notre projet PREDICT financé par l'USAID. Nous produirons un prototype d'application pour le combattant afin d'identifier le risque que les chauves-souris hébergent des virus dangereux sur un site. Cette application "risque de propagation virale spatiale" sera déployée sur le terrain et mise à jour en temps réel avec les données de surveillance, afin de vérifier et d'affiner les prédictions.

Afin de caractériser le risque de propagation des quasi-espèces (QS) de SARSr-CoV, l'équipe de l'Institut de virologie de Wuhan (WIV) analysera des échantillons fécaux, oraux et sanguins de chauves-souris pour détecter les SARSr-CoV par PCR. Nous recueillerons des données sur la charge virale à partir de boulettes fécales fraîches. Les protéines de pointe du SARSr-CoV seront séquencées, les événements de recombinaison virale identifiés et les isolats utilisés pour identifier les souches qui peuvent se répliquer dans les cellules humaines. L'équipe de l'Université de Caroline du Nord (UNC) procédera à la rétro-ingénierie des protéines de pointe d'un large échantillon de virus à haut et à faible risque en vue d'une caractérisation plus poussée. Ces glycoprotéines de pointe virale de souche QS seront synthétisées, et celles qui se lient au récepteur cellulaire humain ACE2 seront insérées dans des squelettes de SARSr-CoV (non-DURC, non-GoF), et inoculées à des souris humanisées pour évaluer la capacité à provoquer une maladie semblable au SRAS, l'efficacité des thérapies monoclonales, de l'inhibiteur GS-5734 ou des vaccins contre le SARSr-CoV.

Nous utiliserons ces données pour construire des modèles de réseau bayésien d'apprentissage automatique, de génotype à phénotype, de l'évolution virale et du risque de saut de l'hôte. Ces modèles permettront de prédire la capacité des souches QS à infecter les cellules humaines sur la base des traits génétiques et des essais expérimentaux ci-dessus. En utilisant des données sur la diversité des protéines de pointe, les CoV recombinants et le flux de gènes via les mouvements et la migration des chauves-souris, nous estimerons les taux d'évolution, les taux de recombinaison et la capacité à générer de nouvelles souches capables d'infecter l'homme. Enfin, les données sur la relation virus-hôte et le domaine vital des chauves-souris seront utilisées pour estimer le potentiel de propagation - étendant les modèles bien au-delà de nos sites de terrain. Nous validerons les prédictions du modèle concernant le risque de propagation à l'hôte en 1) réalisant d'autres expériences de culture cellulaire et de liaison à la protéine de pointe,

et 2) en déterminant si les souches de SRASr-CoV désignées comme étant à haut risque ont déjà contaminé des personnes à proximité de nos grottes à chauves-souris. Nos travaux préliminaires révèlent une séroprévalence de ~3 % pour le SRASr-CoV des chauves-souris chez les personnes présentes sur ce site. Nous testerons ces sérums humains collectés précédemment (n>2000) pour détecter la présence d'anticorps contre les SARs-CoVs à haut et à faible risque identifiés par notre modélisation, en utilisant les tests du système d'immunoprécipitation de la luciférase (LIPS) que nous avons conçus contre les SARs-CoVs identifiés dans ce projet.

## Domaine technique 2

Dans le cadre de l'AT2, nous développerons des approches évolutives pour supprimer les CoV du SRAS au sein des espèces réservoirs de chauves-souris, afin de réduire la probabilité de transmission du virus à l'homme. Nous évaluerons deux approches pour désamorcer le potentiel de propagation : 1) stimulation immunitaire à grande échelle : nous appliquerons des modulateurs immunitaires tels que l'interféron de la chauve-souris et les agonistes TLR pour augmenter l'immunité innée de la chauve-souris et supprimer la réplication et l'excrétion virales ; 2) stimulation immunitaire ciblée : nous appliquerons des protéines chimériques polyvalentes recombinantes de pointe du SRASr-CoV en présence de traitements de stimulation immunitaire à grande échelle pour renforcer la mémoire immunitaire et supprimer des SRASr-CoV spécifiques.

Les deux lignes de travail TA2 seront menées en parallèle à partir de la première année. Le professeur Wang (Duke-Natl. Univ. Singapore - Duke NUS) dirigera les travaux de renforcement immunitaire à grande échelle, en s'appuyant sur ses travaux pionniers sur l'immunité des chauves-souris. Il s'agira notamment d'identifier la fonctionnalité affaiblie de facteurs de l'immunité innée tels que STING, une molécule centrale de détection de l'ADN et de l'interféron (IFN), qui pourrait permettre aux chauves-souris de maintenir une réponse efficace, mais non excessive, aux virus, et l'IFNA, qui est exprimé de manière constitutive sans stimulation. Nous testerons les éléments suivants, simultanément et de manière concurrentielle, pour vérifier leur efficacité et leur évolutivité : I) Activation des voies TLR/RLR pour induire l'induction de l'IFN, par exemple, polyIC ou 5'ppp-dsRNA. Une stratégie similaire a été démontrée dans un modèle de souris pour le SRASr-CoV ; II) Interféron de chauve-souris universel. L'interféron a été utilisé en clinique chez les humains, par exemple contre les filovirus, et la réplication du SRASr-CoV est sensible à l'interféron ; III) stimulation de l'IFN de chauve-souris par le blocage des régulateurs négatifs. L'IFN de chauve-souris est exprimé de manière constitutive mais ne peut être induit à un niveau élevé. Nous utilisons CRISPRi pour identifier les régulateurs négatifs potentiels et cribler les composés ciblant ce gène ; IV) Activer les voies de production de l'IFN amorties via les voies dépendantes de DNA-STING et ssRNA-TLR7. La chauve-souris mutante STING restaure la fonctionnalité antivirale, ce qui suggère que ces voies sont importantes dans la coexistence chauve-souris-virus. Nous activerons directement les voies en aval de STING/TLR7, afin de promouvoir la clairance virale ; V) Inoculer des fragments bruts de CoV pour réguler les réponses immunitaires innées à des CoV spécifiques - une étape partielle vers le travail de renforcement immunitaire ciblé ci-dessous.

Le professeur Baric (UNC) dirigera les travaux de stimulation immunitaire ciblée. Nous développerons des protéines chimériques recombinantes à partir des CoV connus du SRASr et de ceux caractérisés par DEFUSE. En utilisant les détails de la structure de la protéine 5 du SRAS et de la liaison avec la cellule hôte, nous séquencerons, reconstruirons et caractériserons les trimères des pics et les domaines de liaison avec les récepteurs des CoV du SRASr, et les incorporerons dans des nanoparticules de poxvirus-vecteurs du raton laveur pour les administrer aux chauves-souris. En combinaison avec des petites molécules immunostimulantes, nous utiliserons ces nanoparticules pour renforcer la mémoire immunitaire des chauves-souris adultes précédemment exposées aux CoVs du SRASr, en choisissant le meilleur candidat pour des essais sur le terrain. Les constructions recombinantes à base de glycoprotéine S avec des blocs immunogènes provenant de l'ensemble des CoV SRASr du groupe 2B devraient induire des réponses immunitaires adaptatives à grande échelle qui réduisent les charges virales hétérogènes chez les chauves-souris et le risque de transmission à l'homme. L'amortissement de l'immunité innée est hautement conservé chez toutes les espèces de chauves-souris testées jusqu'à présent. Nous utiliserons la colonie d'élevage unique Duke-NUS

de chauves-souris cavernicoles asiatiques (*Eonycteris spelaea*) pour effectuer des tests initiaux de preuve de contestation étendus à de petits groupes de chauves-souris *Rhinolophus sinicus* capturées dans la nature au WIV.

Une nouvelle méthode d'administration de nos molécules immunostimulantes sera développée et mise en œuvre par le Dr Rocke du National Wildlife Health Center (NWHC) de l'USGS, qui a déjà développé des vaccins pour animaux jusqu'à leur homologation. En utilisant des chauves-souris insectivores acquises localement, nous évaluerons les véhicules et les méthodes d'administration, notamment : 1) des nanoparticules appliquées par voie transdermique ; 2) des gels comestibles collants que les chauves-souris toilettent et consomment mutuellement ; 3) l'aérosolisation au moyen de prototypes de pulvérisateurs (Dr Unidad, PARC) conçus pour les grottes ; et 4) des pulvérisations automatiques déclenchées par des minuteries et des détecteurs de mouvement aux points d'entrée critiques des grottes. Nous disposons de nombreuses données préliminaires sur ces techniques pour la faune sauvage, notamment la vaccination des chauves-souris contre la rage en laboratoire, l'administration, la consommation et la propagation réussies chez les chauves-souris vampires sauvages. Nous utiliserons la colonie de chauves-souris captives du NWHC et les chauves-souris sauvages des grottes américaines pour tester les véhicules de distribution en utilisant le biomarqueur rhodamine B (qui marque par fluorescence les poils lors de la consommation) pour évaluer l'absorption. Les approches de déploiement les plus optimales seront testées sur des chauves-souris sauvages dans nos grottes d'essai au Yunnan, en utilisant les préparations de modulation immunitaire les plus efficaces. Les populations de chauves-souris des grottes expérimentales et de contrôle feront l'objet d'une étude longitudinale de la charge virale avant et après les essais de déploiement. L'EHA a un accès unique à ces sites depuis environ 10 ans. Au cours de l'année DEFUSE Yr1, nous demanderons l'autorisation de procéder à des essais expérimentaux à nos collaborateurs du département des forêts du Yunnan et du Center for Disease Control, conformément à notre expérience éprouvée en matière d'obtention rapide de l'approbation de l'IACUC et du DoD ACURO pour la recherche sur les animaux. Nous modéliserons les stratégies optimales pour maximiser l'efficacité du traitement pour TA2, en utilisant un modèle de simulation stochastique de la dynamique de la circulation virale sur nos sites, éclairé par les données de terrain et expérimentales. Nous estimerons la fréquence et la couverture de population requises pour notre intervention, et modéliserons la période de suppression virale, jusqu'à ce que la recolonisation ou l'évolution conduise au retour d'un CoV à haut risque pour le SRAS.

#### **Livrables :**

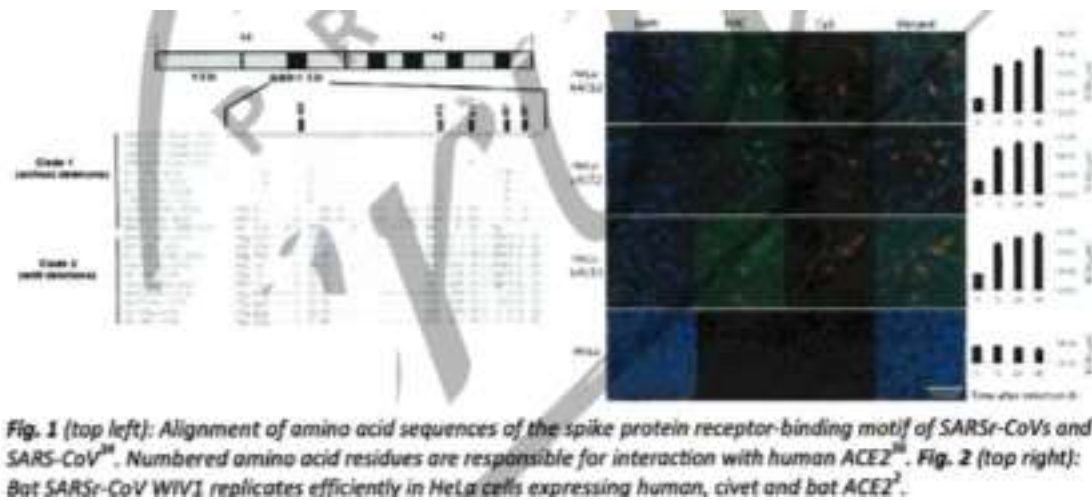
- Modèles et application à code source ouvert identifiant le risque de propagation géographique et spécifique à l'hôte pour les nouveaux CoV du SRAS.
- Modèles génotype-phénotype de propagation des souches virales validés expérimentalement.
- Technologie éprouvée de modulation de l'immunité innée des chauves-souris pour réduire l'excrétion virale.
- Mécanisme d'administration testé et validé pour l'utilisation de la grotte de chauve-souris, y compris les vaccins dans d'autres systèmes hôtes-pathogènes de chauve-souris (par exemple, la rage, le WNS).
- Approche de preuve de concept pour réduire transitoirement l'excrétion virale chez les chauves-souris sauvages qui peut être adaptée à d'autres systèmes, y compris le virus Ebola.

## **Section II D. PLAN TECHNIQUE**

### **Domaine technique I**

Choix du site et du système hôte-virus modèle. Au cours des 14 dernières années, notre équipe a effectué une surveillance des CoV dans les populations de chauves-souris de la Chine méridionale, ce qui a permis d'identifier >180 CoV SARSr uniques dans 10 000 échantillons (prévalence >5 %, y compris des individus multiples hébergeant les mêmes souches virales et une prévalence par espèce de chauve-souris pouvant atteindre 10,9 %). Les SARSr-CoVs de chauve-souris sont génétiquement diversifiés, notamment au niveau du gène 5, et la plupart sont très divergents du SARSr-CoV. Cependant, le site de notre grotte test, dans la province du Yunnan, abrite un assemblage de populations de quasi-espèces (QS) qui contient tous les composants génétiques du SARSr-CoV épidémique. Nous y avons isolé trois souches (WIV1,

WIV16 et SHCO14) qui, contrairement aux autres SARSr-CoV, ne contiennent pas deux délétions dans le domaine de liaison au récepteur (RBD) de la pointe, présentent une identité de séquence beaucoup plus élevée avec le SARSr-CoV (Fig. 1). Ils utilisent le récepteur ACE2 humain pour entrer dans les cellules, comme le fait le SARSr-CoV (Fig. 2), et se répliquent efficacement dans diverses cellules animales et humaines, y compris les cellules primaires des voies respiratoires pulmonaires humaines, comme le SARSr-CoV épidémique. Les chimères (recombinants) avec ces gènes S de SARSr-CoV insérés dans un squelette de SARSr-CoV, et SHCO14 et WIV1 reconstruits synthétiquement en pleine longueur provoquent une maladie de type SARSr chez les souris humanisées (souris exprimant l'ACE2 humain), avec des signes cliniques qui ne sont pas réduits par le traitement par anticorps monoclonal SARSr-CoV ou la vaccination. Les personnes vivant jusqu'à 6 kilomètres de notre grotte d'essai présentent des anticorps contre le SARSr-CoV (séroprévalence de ~3%), ce qui suggère un débordement actif. Ces données, la phytogéographie des CoVs du SRASr et l'analyse coévolutive des chauves-souris et de leurs CoVs (non publiée) suggèrent que les grottes de chauves-souris du sud-ouest de la Chine et les chauves-souris *Rhinolophus* spp. sont l'origine probable du clade du CoV du SRASr et représentent un danger clair et présent pour l'émergence d'un CoV du SRASr à partir du QS actuel. Les chauves-souris *Rhinolophus* spp. qui hébergent ces virus sont présentes en Asie, en Europe et en Afrique. Ainsi, alors que le travail de terrain de DEFUSE se concentrera sur les sites à haut risque en Chine du Sud, notre approche pour réduire le risque de propagation de ces virus est largement applicable dans quatre régions de commandement de combat (PACOM, CENTCOM, EUCOM, AFRICOM).

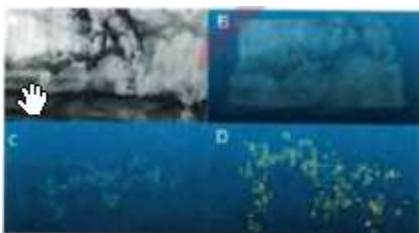


Inventaire complet des QS de chauves-souris SARSr-CoV sur nos sites de grottes tests, Yunnan, Chine. Afin de fournir des données pour former et valider notre modélisation, et comme base de référence pour notre essai de modulation immunitaire (TA2), le travail sur le terrain de DEFUSE ciblera le site de grotte à haut risque dans la province du Yunnan, dans le sud-ouest de la Chine (Fig. 4, triangle rouge) où nous mènerons notre essai sur le terrain, et où nous avons précédemment identifié et isolé des CoV à haut risque de SRASr. Dans trois sites de grottes (un désigné pour notre essai, deux comme témoins), nous déterminerons le risque de base de propagation du CoV SRASr. Nous effectuerons une surveillance longitudinale des populations de chauves-souris afin de détecter et d'isoler les SARSr-CoV, de déterminer les changements dans la prévalence virale au fil du temps, et de mesurer la démographie et les mouvements des populations de chauves-souris, caractérisant ainsi définitivement leur dynamique hôte-viral SARSr-CoV. Les données recueillies sur le terrain nous permettront de vérifier l'exactitude des prédictions de nos modèles et de comparer l'efficacité des modèles animaux de laboratoire aux essais sur le terrain. Nos données préliminaires (tableau 1) démontrent que *R. sinicus*, *R. ferrumequinum* et *R. affinis* (qui se tiennent ensemble sur notre site d'essai) sont les principaux réservoirs du SRASr-CoV et les seuls réservoirs de trois souches à haut risque (WIV1, WIV16, SHCO14), les *Hippasideros* et *Myotis* spp. jouant un

rôle insignifiant (prévalence <1%) dans la dynamique virale. Nous capturerons les chauves-souris *Rhinolophus* spp. à l'aide de pièges harpés et de filets japonais pendant les sorties nocturnes, nous prélèverons des échantillons de sang rectal, oral et total (x2 par chauve-souris) en utilisant une technique stérile pour éviter la contamination croisée, et nous prélèverons des biopsies de 2 mm de tissu alaire pour le codage à barres de l'ADN de l'hôte, le séquençage du gène du récepteur ACE2 de l'hôte (site d'interface - 3 individus par espèce) et les analyses de coefficients. Les chauves-souris seront munies d'une micropuce sous-cutanée (étiquette PIT) et des données morphologiques et physiologiques seront recueillies (classe d'âge, poids corporel, statut reproductif, etc.).

Species	n	SARS-CoV prevalence
<i>Rhinolophus sinicus</i>	1036	10.9%
<i>R. ferrumequinum</i>	191	6.3%
<i>R. affinis</i>	518	1.2%

Dans la première phase, nous échantillonnerons 60 chauves-souris de chaque *R. sinicus* et *R. affinis*, (180 chauves-souris par grotte) tous les trois mois de manière destructive pendant 18 mois sur nos trois sites de grottes. Étant donné la prévalence de 6-9% (n=304) du SRAS-CoV chez les *Rhinolophus* spp. sur nos sites, cette taille d'échantillon permettrait de détecter une fluctuation de 10% de la prévalence virale entre les périodes d'échantillonnage et les grottes. Pendant deux mois par trimestre sans piégeage physique des chauves-souris, nous collecterons des boulettes fécales fraîches en plaçant des feuilles de polyéthylène propres de 2m<sup>2</sup> sous les chauves-souris se reposant. *Rhinolophus* spp. ont une période de gestation de 7 semaines, mettent bas au printemps et se regroupent pendant les périodes d'accouplement. notre stratégie d'échantillonnage mensuel permettra de collecter des données suffisantes pour paramétrer les modèles de simulation stochastique et couvrir deux périodes d'accouplement et de gestation afin d'évaluer les changements induits par l'histoire de vie dans la prévalence virale et les niveaux de marqueurs immunitaires (par ex, Nous procéderons à des échantillonnages avant et après l'intervention (prélèvements fécaux bihebdomadaires après l'intervention pendant 4 mois, avant et après le déploiement) **pour surveiller les changements de QS du SRAS-CoV et de l'état immunitaire des chauves-souris** du site d'essai et du site témoin. nous évaluerons le statut immunitaire à l'aide de projecteurs immunitaires à nanocordes et de l'imagerie infrarouge numérique pour enregistrer le nombre et l'espèce des chauves-souris au-dessus de chaque feuille de plastique et des boulettes fécales ; nous porterons un code-barres génétique pour confirmer l'identification des espèces. les échantillons seront conservés dans un milieu de transport viral, immédiatement congelés dans des expéditeurs secs à l'azote liquide et transportés vers des laboratoires partenaires avec une chaîne du froid maintenue et selon des protocoles de biosécurité stricts. Des lecteurs d'étiquettes PIT et des caméras IR à imagerie thermique résistantes aux intempéries, montés à l'entrée de chaque grotte, permettront de surveiller passivement la fidélité temporelle aux sites de repos, les taux de déplacement des chauves-souris dans les grottes et les fluctuations quotidiennes de la population de chauves-souris. Des émetteurs satellites ICARUS (1g) seront fixés à 12 chauves-souris *Rhinolophus* spp. de chaque perchoir de l'étude (36 chauves-souris au total) afin de déterminer les modèles de dispersion nocturne pour la recherche de nourriture (<https://icarusinitiative.org>). Les données de télémétrie et d'étiquettes PIT seront utilisées pour calculer le domaine vital, le degré de mélange entre les perchoirs et paramétrer les modèles dynamiques. **les grottes d'étude seront étudiées à l'aide de la technologie LIDAR portable**, afin d'obtenir une image 3D des aires de repos



et des données sur la composition des espèces pour le ciblage des traitements de modulation immunitaire dans TA2 (Fig. 3). les quotas d'échantillonnage seront ajustés en fonction des résultats du laboratoire et du modèle afin d'optimiser la détection virale.

**Fig. 3:** Light Detection and Ranging (LIDAR) scanning to characterize caves and quantify number of individual bats roosting in clusters: A) LIDAR system takes a 360° omnidirectional photo of clustered bats, B)

Notre équipe a plus de 50 ans d'expérience collective dans la manipulation sûre et humaine des chauves-souris pour l'échantillonnage biologique. ce projet fonctionnera selon les directives IACUC/ACURO et PPE appropriées. L'EHA a plusieurs projets en cours soutenus par le DTRA, a obtenu l'approbation de l'ACURO pour la recherche sur les animaux par le DoD, et maintient actuellement des protocoles IACUC par l'intermédiaire de l'université de Tufts (le personnel de l'EHA est un professeur adjoint), que nous utilisons pour DEFUSE. Les IACUC déjà approuvés pour le travail en laboratoire et sur le terrain à Duke-NUS, UNC et WIV, seront modifiés pour DEFUSE.

Modèles prédictifs des sites à haut risque et des espèces de chauves-souris en Asie. nous construirons des modèles qui prédisent la diversité des chauves-souris et des virus ainsi que le risque de propagation en Asie afin de permettre aux combattants et aux planificateurs d'évaluer le risque et la nécessité de déployer une intervention (TA2). nous combinerons des modèles de distribution conjointe des espèces à l'échelle régionale (JSDM), des modèles d'association hôte-virus par apprentissage automatique et des estimateurs non paramétriques de la richesse virale pour prédire respectivement la composition des communautés de chauves-souris dans les grottes en Asie, la gamme d'hôtes des principaux cadres viraux et la diversité virale non encore échantillonnée. nous utiliserons un réseau de neurones stochastiques à anticipation pour mettre en œuvre des JSDM efficaces à plusieurs échelles avec des observations incomplètes (comme c'est le cas pour les chauves-souris et leurs virus), et qui tiennent compte de la cooccurrence des espèces de chauves-souris due à l'environnement ou à l'évolution. nous adapterons notre JSDM aux données d'inventaire biologique de plus de 200 grottes de la région, à deux variables bioclimatiques physiologiquement pertinentes (BIOCLIM), à des données topographiques en accès libre et à des indicateurs de l'habitat souterrain tels que la rugosité et l'hétérogénéité de l'habitat. comme dans les travaux précédents, nous affinerons ces modèles à l'aide de variables environnementales à l'échelle régionale (utilisation des terres, distance aux routes, etc.) et de variables spécifiques aux grottes (longueur des grottes, dimensions des entrées des aires de perchage, complexité des grottes, etc.) nous les validerons à l'aide d'estimations indépendantes de l'occurrence des chauves-souris et d'observations et utiliserons la base de données unique de l'EHA de toutes les relations hôte-virus connues pour étendre les prédictions de la diversité du CoV des chauves-souris et de la gamme d'hôtes (**Fig. 4**). nous utiliserons des modèles prédictifs additifs généralisés du commerce des hôtes et des algorithmes d'apprentissage automatique (BRT, forêt aléatoire) avec des estimateurs non paramétriques pour prédire la diversité du CoV du SRAS dans le QS de chaque espèce de chauve-souris et évaluer les taux de découverte virale en temps réel par échantillonnage (**Fig. 5**)



**Fig. 4:** Predictive map of zoonotic viral diversity in bats for China and SE Asia (yellow=more viruses), based on all known mammal host-viral relationships<sup>7</sup>. Our Yunnan test cave site is labeled (red asterisk). **Fig. 5:** CoV QS diversity estimates (dashed line with 95% confidence intervals) based on PREDICT sampling data (solid line) for four bat genera.

Pour étendre la portée géographique des modèles prédictifs, nous incluons les données de 1800 détections virales (CoVs et autres) provenant de 10 000 échantillons individuels de chauves-souris dans six pays d'Asie (financement NIAID- et USAID PREDICT). pour les prédictions de la composition des espèces et de la présence virale, nous validerons les modèles par rapport à un sous-ensemble de données de validation de 20% et aux données de terrain.

**Prototype d'application pour le combattant.** en nous appuyant sur notre expérience en matière de création d'applications de collecte et d'analyse de données pour le DoD (par exemple, <https://flirt.eha.io>, <https://eidr-connect.eha.io/>, <https://mantle.io/grrs>), nous produirons un prototype d'application de "risque spatial de propagation de virus"

pour le combattant qui identifie la probabilité de propagation d'agents pathogènes viraux dangereux par les chauves-souris sur un site. nous utiliserons les résultats de notre modélisation spatiale des risques, les associations hôte-virus observées et prédites, les ontologies d'espèces et d'agents pathogènes en libre accès, ainsi que les données d'écholocation fournies par les utilisateurs de l'application pour vérifier et affiner sa capacité de prédiction. Nous utiliserons les algorithmes de classement des risques de l'EHA (<https://ibis.eha.io/>) pour afficher les zones critiques à haut risque en fonction des caractéristiques de la localisation géographique, de la récurrence des informations et des caractéristiques des hôtes et des pathogènes. L'application collectera les données de localisation GPS de l'utilisateur et préchargera la distribution des espèces de chauves-souris et les estimations de la composition de la communauté à partir de nos JSDM. ces estimations seront affinées à l'aide de données de surveillance en temps réel collectées sans qu'il soit nécessaire d'entrer dans les grottes, à l'aide de microphones haute fréquence compatibles avec les téléphones portables pour la détection des chauves-souris, validées et entraînées avec des appels acoustiques de référence à l'aide de réseaux neuronaux à convolution. les espèces de chauves-souris identifiées seront automatiquement associées aux données sur la diversité virale provenant de la base de données sur les hôtes pathogènes de l'EHA et aux données sur le SRAS-CoV provenant de DEFUSE, afin de fournir des listes d'agents pathogènes à haut risque, affichées sous forme de vues centrées sur les agents pathogènes, sur les chauves-souris ou sur la carte, avec des alertes proactives lorsque des informations critiques sont reçues. tous les modules de code seront disponibles et documentés sur GitHub (<https://github.com/ecohealthalliance/>). cette technologie améliorera la connaissance globale de la situation des agents infectieux existants et nouveaux trouvés chez les chauves-souris, ce qui permettra au personnel du DoD d'identifier rapidement les zones à haut risque de propagation et de déployer rapidement des ressources pour répondre à leur impact et l'atténuer de manière préventive si nécessaire.

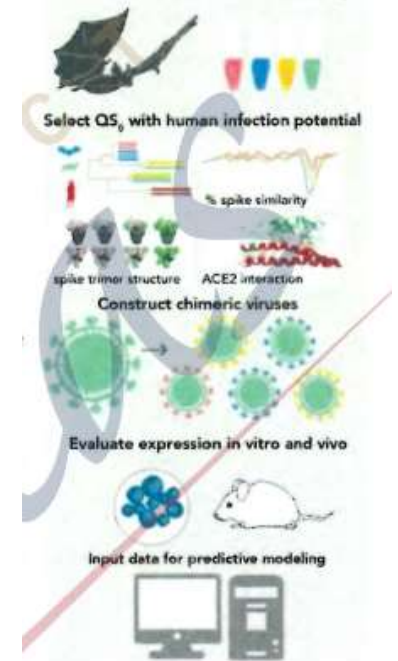
**Détection, séquençage et récupération du SARS-CoV.** Nous dépisterons l'acide nucléique du SARS-CoV dans les échantillons à l'aide de nos essais RT-PCR hémi-nichés à consensus pan-CoV en une étape ciblant un fragment de 440 nt dans le gène de l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) de tous les Covs a et b connus, et des essais spécifiques pour le SARS-CoV connu. Le produit de la PCR sera purifié sur gel, séquencé et une qPCR sera réalisée sur les échantillons positifs de SARS-CoVs afin de déterminer la charge virale. les génomes complets ou les gènes S de tous les SARS-CoVs seront séquencés à haut débit, suivis d'une marche du génome. nous analyserons le gène S avant sa capacité à se lier à ACE2 by bicore ou aux essais d'entrée du virus. synthèse de nouveaux QS chimériques du SARS-CoV : nous synthétiserons commercialement les gènes de la glycoprotéine S du SARS-CoV, conçus pour être insérés dans les squelettes des clones moléculaires SHC014 ou WIV16 (identité de la protéine S à 88 % et 97 % avec celle du SARS-Urbani épidémique). Les virus recombinants seront récupérés dans des cellules Vero ou dans des cellules de souris surexprimant les récepteurs ACE2 de l'homme, de la chauve-souris ou de la civette pour permettre la culture de virus présentant une interface RDB-ACE2 humaine plus faible. Récupération de la longueur totale du SARS-CoV : nous compilerons les données de séquençage et de séquençage de l'ARN d'un panel de souches étroitement apparentées (variation de 5% des nucléotides) et comparerons les génomes complets, en recherchant les SMP uniques représentant les erreurs de séquençage. les génomes candidats consensus seront synthétisés commercialement (par ex, BioBasic) en utilisant des techniques établies et des ARN de longueur de génome et l'électroporation pour récupérer les virus recombinants.



**prédire le risque de débordement du SARSr-CoV spécifique à une souche.** nous combinerons une caractérisation expérimentale détaillée des QS0 sur nos sites de grottes tests avec les modèles de réseau bayésien génotype-phénotype de pointe. cela nous permettra de prédire la probabilité de saut des futurs QS qui émergent avec une recombinaison génétique unique. nos modèles seront paramétrés avec des données expérimentales provenant d'une série d'essais sur les gènes S du SARSr-CoV de chauve-souris (**Fig.6**). Ces données seront complétées par la caractérisation de virus isolés sous DEFUSE (au WIV), **d'environ 15 à 20 protéines de pointe de SARSr-CoV de chauve-souris par an** (à l'UNC, au WIV) et de souches de SARSr-CoV de chauve-souris séquencées dans le cadre de nos travaux antérieurs et qui n'ont pas encore été examinées pour leur potentiel de propagation. toutes les expériences seront réalisées en triple exemplaire et les données seront introduites dans les modèles en temps réel :

**Essais expérimentaux du potentiel de saut des QS du SARSr-CoV (figure 6, à droite).** présélection via l'identification de mutations par modélisation structurelle des protéines et essais de pseudo-virus : l'entrée virale est la principale restriction d'espèce empêchant le débordement des SARSr-CoV. pour sélectionner les QS en vue d'une caractérisation plus poussée, nous utiliserons d'abord la modélisation structurelle de la liaison de la protéine S du SARSr-CoV aux récepteurs ACE. les mutations dans la RDB mettent fin au traitement protéolytique de la glycoprotéine S par la protéase de l'hôte, régulent l'entrée du SARSr-CoV dans les cellules et l'infectivité inter-espèces. les appariements manqués dans les molécules

S-RDB-ACE2 ou le traitement protéolytique de la S empêchent bien l'entrée du SARS-CoV et du QS et, avec ces appariements manqués, nous serons privés de priorité. les variations d'un seul acide aminé pourraient modifier considérablement ces phénotypes et nous évaluerons l'impact des micro-variations peu abondantes et à forte conséquence dans le RBD en utilisant l'ARN seq pour identifier les variants QS peu abondants codant pour des mutations pertinentes à la liaison de l'ACE2. nous effectuerons des essais de liaison de pseudo-virus in vitro, en utilisant des techniques établies et des essais de liaison de virus vivants (à la WIV pour éviter les retards et cette sommation inutile de cultures virales) pour des souches isolées. les prédictions initiales du modèle basées sur ces données seront utilisées pour guider la sélection des souches pour une caractérisation plus poussée. Tests in vitro des virus chimériques : tous les virus chimériques seront vérifiés par séquençage et évalués en ce qui concerne : i) l'utilisation du récepteur ACE2 chez toutes les espèces in vitro, ii) la croissance dans l'EHA primaire, iii) la sensibilité à des anticorps monoclonaux humains à large neutralisation croisée qui reconnaissent des épitopes uniques dans le RBD. Si certains isolats s'avèrent très résistants à notre panel d'anticorps monoclonaux humains, nous évaluerons la neutralisation croisée contre un nombre limité d'échantillons de sérum humain du SRAS-CoV provenant de l'épidémie de Toronto. Les virus chimériques qui codent pour de nouveaux gènes S ayant un potentiel de débordement seront utilisés pour identifier les souches de SARSr-CoV en vue de leur récupération en tant que virus viables de pleine longueur de génome. pathogénèse in vivo : des groupes de 10 animaux seront infectés par voie intranasale avec  $1,0 \times 10^4$  PFU de chaque SARSr-CoV, les signes cliniques (perte de poids, fonction respiratoire, mortalité, etc.) seront suivis pendant six jours



p.i., et sacrifiés au jour 2 ou 6 p.i. pour l'analyse virologique, l'histopathologie et l'immunohistochimie du poumon, ainsi que pour la numération globulaire complète (NBC) et le lavage bronchiolo-alvéolaire (LBA). validation avec QS du génome complet : nous validerons les résultats des virus chimériques en caractérisant à nouveau les versions du génome complet, en testant si la séquence du génome dorsal modifie le potentiel de propagation du SARSr-CoV complet. Les QS destinés à la caractérisation du génome complet seront sélectionnés pour refléter les différences entre les souches en termes d'antigénicité, d'utilisation des récepteurs, de croissance dans les cellules humaines et de pathogénie. Test de modifications synthétiques : Nous testerons la croissance dans des cultures primaires d'EHA et in vivo chez des souris transgéniques hACE2 ; nous prévoyons de récupérer 3 à 5 virus du génome complet par an. délétions de la RDB : de petites délétions à des sites spécifiques de la RDB du SARSr-CoV modifient le risque d'infection humaine ; nous analyserons les conséquences fonctionnelles de ces délétions de la RDB sur l'utilisation du récepteur hACE2 du SARSr-CoV, la croissance dans les cultures HAE et la pathogénèse in vivo. dans un premier temps, nous supprimerons ces régions, séquentiellement et en combinaison, dans les SHC014 et SRAS-CoV Urbani en anticipant que l'introduction des délétions empêchera la croissance du virus dans les cellules Vero et les HAE. en parallèle, nous évaluerons si la réparation des délétions RDB restaure la capacité des souches à faible risque à utiliser l'hACE2 humain et à se développer dans les cellules humaines. Sites de clivage protéolytique et de glycosylation de la S2 : Après la liaison avec le récepteur, diverses protéases de surface cellulaire ou endosomales clivent la glycoprotéine S du SRAS-CoV, entraînant des modifications massives de la structure S et activant l'entrée par fusion. Nous analyserons toutes les séquences du gène S du SARSr-CoV afin de déterminer si les sites de clivage protéolytique conservés peuvent être activés par de la trypsine ou de la cathepsine L exogènes. Nous déterminerons si les sites de clivage protéolytique de S2 présentent des défauts d'appariement et si des sites de clivage potentiels de la furine sont présents. SARSs-CoV avec des correspondances manquantes dans les sites de clivage protéolytique, il peut être activé par la trypsine exogène ou la cathepsine L. En cas de correspondances claires, nous introduirons des sites de clivage appropriés spécifiques à l'homme et évaluerons le potentiel de croissance dans des cellules Vero et des cultures HAE. Dans le cas du SARS-CoV, nous ablaterons plusieurs de ces sites sur la base d'études sur les particules pseudotypées et évaluerons l'impact de certaines modifications du SARSr-CoV S sur la réplication et la pathogénèse du virus. Nous examinerons également les données de séquence profonde pour le SARSr-CoV à haut risque et peu abondant qui code pour un site de clivage protéolytique fonctionnel et, si c'est le cas, nous introduirons ces modifications dans la souche parentale appropriée à faible risque et très abondante. Glycosylation N-liée : certains événements de glycosylation régulent la liaison des particules de SARS-CoV DC-SIGN/L-SIGN, récepteurs alternatifs pour l'entrée du SARS-CoV dans les macrophages ou les monocytes. Les mutations qui ont introduit 2 nouveaux sites N-liés pourraient avoir été impliquées dans l'émergence du SARS-CoV humain chez les chiens civettes et rats laveurs. alors que ces sites sont absents des trains de chiens civettes et rats laveurs et du clade 2 SARSr-CoV et SHC014 et évaluer la croissance du virus dans des cellules Vero, des cellules non permissives exprimant ectopiquement DC-SIGN, et dans des monocytes et macrophages humains anticipant une efficacité réduite de la croissance du virus. nous introduirons les mutations du clade I qui entraînent une glycosylation N-liée dans les souches réparées par la délétion rs4237 RBD, en évaluant l'efficacité de la croissance du virus dans des cellules HAE, Vero, ou des cellules non permissives +/- expression de DE-SIGN sujet. in vivo, nous évaluerons la pathogénèse chez des souris transgéniques hACE2. microvariations de faible abondance : nous modéliserons structurellement et identifierons les changements de résidus hautement variables dans le S RBD du SARSr-CoV, utiliserons des blocs de gènes commerciaux pour introduire ces changements, seuls et en combinaison, dans le gène de la glycoprotéine S de la souche parentale à faible risque et testerons l'utilisation du récepteur ACE2, la croissance dans l'HAE et la pathogénèse in vivo.

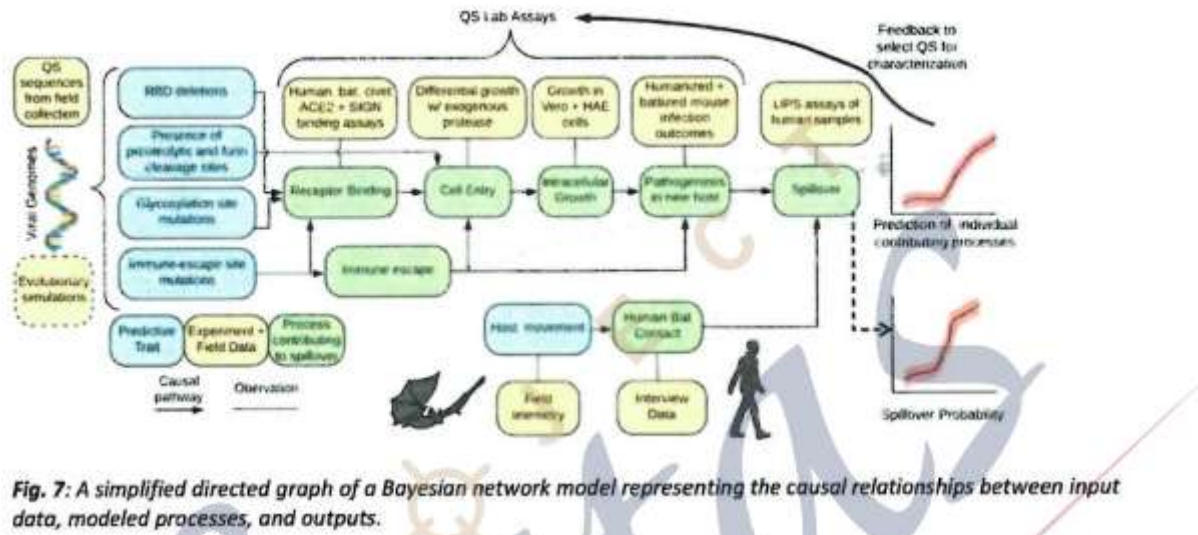


Fig. 7: A simplified directed graph of a Bayesian network model representing the causal relationships between input data, modeled processes, and outputs.

**Apprentissage automatique en réseau pour prédire le potentiel de propagation des souches de SARSr-CoV à haut risque.** nous utiliserons les données expérimentales ci-dessus pour construire des modèles génotype-phénotype du potentiel de propagation du SARSr-CoV des chauves-souris. nous utiliserons des modèles de réseaux bayésiens (BNM), ajustés par des méthodes MCMC pour prédire le risque de contagion sur la base des données génotypiques du SARSr-CoV des chauves-souris (présence d'une délétion dans le RBD, sites de liaison protéolytique et de glycosylation, etc.) et des caractéristiques écologiques de l'hôte - en intégrant les données sur les processus multiples en interaction et le potentiel de contagion du QS pour générer des probabilités globales de contagion. l'approche bayésienne nous permettra de mettre à jour nos modèles de manière itérative au fur et à mesure de l'acquisition de nouvelles données et d'utiliser les prédictions intermédiaires du modèle pour déterminer les expériences à privilégier afin de maximiser la capacité de prédiction. nous contrôlerons les conditions expérimentales (essais sur des isolats viraux vivants, sur des virus chimériques à génome complet ou synthétiques et sur le squelette moléculaire de ces derniers). Les traits seront utilisés comme entrées dans le graphe causal du BNM pour prédire les variables latentes représentant les processus interconnectés qui contribuent à l'infection par le SRASr-CoV QS chez de nouveaux hôtes : la liaison aux récepteurs, l'entrée dans les cellules, l'interaction avec le système immunitaire et la croissance intracellulaire, toutes mesurées par les essais de notre laboratoire. Ceux-ci, à leur tour, serviront de prédicteurs pour les résultats ultimes du potentiel de saut de l'hôte pathogène et de l'hôte (Fig. 7). Nous utiliserons les travaux publiés sur ces caractéristiques génétiques pour définir des priorités informatives sur la force et la direction des interactions dans le graphe causal. nous utiliserons des simulations de modèles de connaissances préalables pour sélectionner deux séquences cibles de notre échantillonnage pour la caractérisation et le séquençage du génome afin de recueillir des données qui améliorent au maximum le pouvoir prédictif de notre modèle et nous mettrons à jour ces simulations de manière itérative tout au long de la phase expérimentale pour guider continuellement la sélection des QS. nous utiliserons des priors de régularisation pour réduire l'excès d'ajustement et sélectionner les variables les plus prédictives dans le modèle final.

**Validation du modèle à l'aide de la sérologie du SRASr-CoV provenant d'échantillons humains collectés précédemment et de données de surveillance.** la propagation active du SRASr-CoV dans notre région d'étude nous permet de mesurer le risque réel de propagation afin de valider nos modèles de potentiel de saut de QS. nous recueillerons des données sur les anticorps QS viraux présents dans la population humaine locale à l'aide d'essais LIPS sur 2 000 sérums humains collectés précédemment (NIAID, PI Daszak) auprès de personnes vivant à proximité de nos sites de grottes tests dans la province du Yunnan, dont un sous-échantillon a montré 2,7 % d'anticorps au SARSr-CoV. L'IRB pour

ce travail est en cours et couvre les tests DEFUSE proposés. Nous concevrons des essais LIPS ciblant les SARSr-CoV à haut et à faible risque de débordement QS comme cela a été fait précédemment pour le SARSr-CoV et le nouveau SARS-CoV. nous allons : 1) insérer différents gènes N de SARSr-CoV à haut et à faible risque dans des vecteurs pREN-2 (vecteur LIPS) en évaluant d'abord la similarité des gènes N pour déterminer leur réactivité croisée potentielle dans un test LIPS ; 2) déterminer la spécificité des tests LIPS en produisant des sérums polyclonaux ; injecter des protéines recombinantes ou des virus atténués dans des lapins ; 3) valider les tests LIPS en incubant les antigènes avec leurs échantillons de sérum positifs respectifs et le complexe antigène-anticorps élué à l'aide de billes de protéine A/G ; 4) valider les résultats des sérums positifs en achetant des tests LIPS et de neutralisation virale basés sur la protéine spike. à titre de test de confirmation, les échantillons positifs, issus du LIPS, seront validés par le test de neutralisation virale. nous utiliserons ces tests LIPS pour tester les échantillons de sérum afin de détecter la présence d'anticorps contre les QS à haut et à faible risque de SARSr-CoV. nous validerons les prédictions du potentiel de saut et étendrons les BNM pour prédire les probabilités réelles de propagation en modélisant les taux de contact entre les chauves-souris et les humains. nous utiliserons les données écologiques sur les chauves-souris hôtes et les données d'enquête sur le comportement humain recueillies précédemment auprès de ces personnes pour estimer le contact avec la faune sauvage dans la prédiction de l'exposition mesurée par nos tests LIPS.

**modélisation et simulation évolutives pour prédire les souches potentielles.** Notre modélisation du réseau bayésien générera des prédictions du risque de propagation des séquences QS que nous identifions. Pour examiner le risque associé à la population virale totale, nous modéliserons et simulerons le processus évolutif afin **d'identifier les QS viraux probables que notre échantillonnage n'a pas capturés et les QS viraux susceptibles d'apparaître à l'avenir (QSx)**. nous utiliserons un vaste ensemble de données sur les séquences de la protéine S et les génomes complets générés par des travaux antérieurs et par le travail de terrain de DEFUSE pour estimer le taux de substitution du SARSr-CoV et sa variation à l'échelle du génome en utilisant des modèles de coalescence et d'horloge moléculaire dans un cadre MCMC bayésien. nous estimerons le génome du SARSr-CoV comme nous l'avons fait précédemment, en l'étendant maintenant au génome complet. à l'aide de ces estimations, nous simulerons l'évolution du virome QS du SARSr-CoV en utilisant une approche forward-time mise en œuvre dans des simulateurs qui modélisent les fonctions spécifiques des virus à ARN (par exemple VIRAPOPS). **nous comparerons les taux de recombinaison entre les grottes et les communautés de chauves-souris. nos résultats de simulation prospective fourniront un pool de QSx inconnus et futurs les plus susceptibles d'apparaître et d'avoir un potentiel de débordement et de pathogénicité.** nous utiliserons les résultats de la simulation évolutive pour améliorer de manière itérative notre modèle de réseau bayésien. le nombre de traits génétiques ayant un potentiel de prédiction de la pathogénicité est important, nous effectuerons donc une réduction des variables à l'aide d'un regroupement arborescent, en traitant les traits fortement co-occurents comme des grappes conjointes pour la prédiction. nous générerons ces grappes à partir de toutes les séquences de SARSr-CoV provenant du travail sur le terrain de DEFUSE et de travaux antérieurs. comme les grappes de traits peuvent être modifiées par recombinaison, nous utiliserons notre modélisation évolutive prospective pour prédire dans quelle mesure les grappes de traits seront conservées, en ne retenant que celles qui sont peu susceptibles d'apparaître dans les génomes inconnus ou QSx. cela permettra un compromis entre un pouvoir prédictif accru basé sur l'échantillon actuel et la généralisation à deux souches futures qui n'ont pas encore évolué.

## Domaine technique 2

**Approche de modulation immunitaire pour réduire le risque de propagation des chauves-souris.** Notre travail montre que les caractéristiques immunologiques uniques suivantes des chauves-souris peuvent expliquer leur capacité à héberger des charges virales élevées avec des signes cliniques minimales : a) les chauves-souris maintiennent une expression constitutivement élevée de l'IFN $\alpha$  qui peut répondre à l'infection virale et la restreindre ; b) plusieurs voies d'activation de l'interféron sont amorties, par ex. b) plusieurs voies d'activation de l'interféron sont atténuées, par exemple les voies dépendantes de STING (molécule centrale cytosolique de détection de l'ADN pour induire l'interféron) et TLR7 ; c) les caractéristiques de la voie de l'inflammasome dépendant de NLRP3 sont peut-être dues à l'adaptation de la voie de détection immunitaire de la chauve-souris en tant que coût de fitness du vol. nous supposons que la réplication du virus de la chauve-souris sera probablement limitée rapidement par la décharge exprimée de manière constitutive et que les réponses de l'interféron et de l'inflammasome entraîneront une réponse plus faible des cytokines qui sont nécessaires pour déclencher l'immunité adaptative dépendante des cellules T/B (par exemple, la réponse des anticorps), **Nous avons, avec d'autres, démontré la preuve du concept de ce phénomène : une infection expérimentale** par le virus de Marburg chez des chauves-souris frugivores égyptiennes, un hôte réservoir naturel, a entraîné une distribution tissulaire étendue avec une faible charge virale, une brève virémie, une faible séroconversion et un faible titre d'anticorps qui s'est rapidement estompé, ce qui suggère qu'aucune protection à long terme n'est établie. De faibles réponses d'anticorps neutralisants apparaissent après une infection expérimentale sur des chauves-souris avec le virus Tacaribe et dans nos études sur l'infection expérimentale de chauves-souris avec le SARS-CoV (Wang, unpubl.). Nous avons également démontré avec succès que l'interféron de chauve-souris peut inhiber les SARS-CoVs de chauve-souris. nous supposons que l'utilisation de modulateurs immunitaires qui régulent à la hausse l'immunité innée naturellement faible des chauves-souris à l'égard de leurs virus supprimera transitoirement la réplication et l'excrétion virales, réduisant ainsi le risque de saut de l'hôte. nous supposons également que, comme les chauves-souris rhinolophes vivent longtemps (plus de 20 ans à l'état sauvage), la plupart des chauves-souris d'une population auront été exposées à une gamme de QS de SRASr-CoV sur nos sites. Le fait de cibler spécifiquement la régulation à la hausse de leur immunité adaptative (mémoire immunitaire) pour deux souches virales à haut risque peut conduire à une élimination accrue des souches à haut risque. Nous évaluerons deux approches de modulation immunitaire pour désamorcer la propagation du SRASr-CoV des chauves-souris aux humains :

**1) stratégies de renforcement immunitaire à grande échelle (Wang, Duke-NUS) :** Nous appliquerons des modulateurs immunitaires tels que les ligands TLR, les petites molécules agonistes des récepteurs de type RIG (RLE) ou l'interféron de chauve-souris dans des chauves-souris vivantes, afin de réguler leur immunité innée et de supprimer la réplication et l'excrétion virales ; **2) stimulation immunitaire ciblée (Barix, UNC) :** l'approche de stimulation immunitaire à grande échelle sera appliquée en présence d'immunogènes chimériques afin d'activer la mémoire immunitaire chez les chauves-souris adultes et de stimuler la clairance des CoV SRASr à haut risque. nous utiliserons de nouvelles protéines S recombinantes polyvalentes chimériques dans des gels encapsulés dans des microparticules pour une administration orale et/ou des stratégies immunitaires avec adjuvant viral dans lesquelles les CoV SRASr recombinants chimériques sont exprimés par le poxvirus du raton-laveur. Les deux axes de travail débiteront au cours de la première année et se dérouleront en parallèle. Ils feront l'objet d'une évaluation concurrentielle en termes d'efficacité, de coût et d'évolutivité, et les candidats retenus à l'issue des essais sur les animaux captifs seront utilisés dans le cadre d'essais sur des chauves-souris vivantes dans notre grotte d'essai du Yunnan.

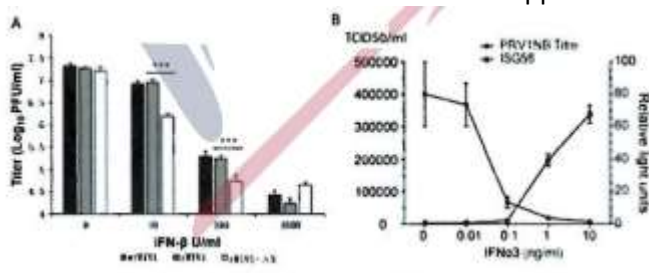
**Renforcement immunitaire large (Duke-NUS).** Nous travaillerons sur les pistes clés suivantes afin d'identifier l'approche la plus efficace pour réguler l'immunité innée et supprimer les charges virales.



**Ligands des récepteurs de type Toll (TLR)/récepteurs de type RIG-I (RLR) :** Nos travaux indiquent une réponse robuste chez les chauves-souris vivantes aux stimuli TLR comme le polyI:C, mesurée par transcriptomique sur les tissus de la rate (**Fig. 8**), du foie, des poumons et des ganglions lymphatiques, avec une protéomique correspondante pour caractériser l'activation immunitaire in vivo. Ces profils d'activation seront utilisés pour évaluer la réponse immunitaire des chauves-souris à différents stimuli et identifier ceux qui réduisent la charge virale dans notre système expérimental à Duke-NUS (ci-dessous).

nous stimulerons également la voie RIG-I à l'aide de 5'pppDSRNA, un mimétique du stimulant naturel RIG-I qui activera les voies de production d'IFN de chauve-souris fonctionnelles, comme cela a été démontré dans un modèle de souris qui a éliminé le SARS-CoV, l'IAV et le HBV.

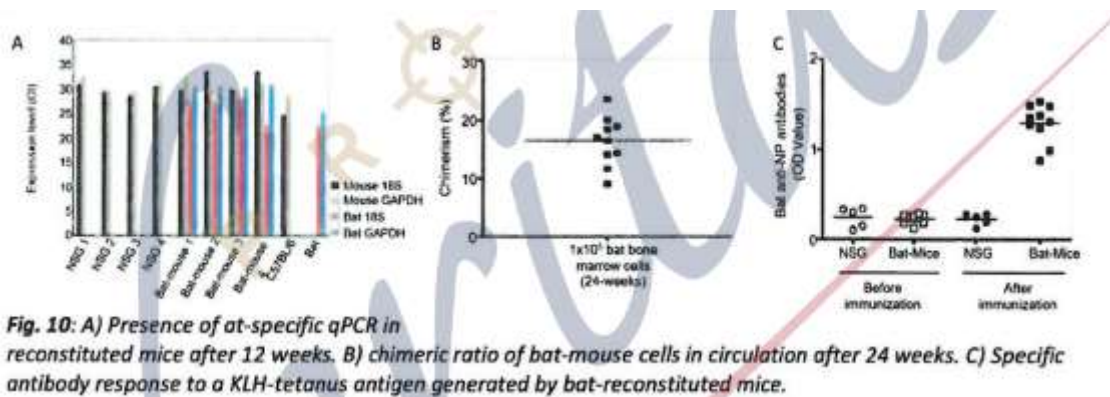
interférence universelle pour les chauves-souris : nous concevrons une séquence protéique d'interféron universel de chauve-souris conservée purification du surnageant de cellules de chauve-souris surexprimant, comme cela a été utilisé précédemment pour l'IFN $\alpha$  et le CSF-1/IL-4 recombinants de Pteropus Alecto. l'utilisation d'un IFN universel pour les chauves-souris permet de surmonter la réponse dépendante de l'espèce au ligand, ce qui permet d'utiliser l'IFN dans de vastes environnements géographiques et écologiques et chez de nombreuses espèces de chauves-souris. nous avons déjà produit un IFN de chauve-souris recombinant non universel, marqué, qui induit une activation immunitaire appropriée (Fig. 9). Il a été démontré que ce ligand réduit les titres viraux chez les humains, les furets et les modèles de souris par voie intranasale et orale. l'interféron a été utilisé cliniquement chez les humains comme une contre-mesure efficace lorsque les médicaments antiviraux ne sont pas disponibles, par ex, contre les filovirus. l'interféron est connu pour être toxique, c'est pourquoi nous examinerons attentivement la tolérance à la dose chez les chauves-souris et évaluerons les effets cliniques du traitement. nous avons montré que la réplication du SRASr-CoV est sensible aux traitements par l'IFN. l'administration réussie, l'activation immunitaire et les résultats sur l'hôte seront caractérisés de manière approfondie pour optimiser l'activation immunitaire rapide.



**Fig. 9: Bat viruses are sensitive to IFN treatments.** A) Recombinant bat SARS-related coronavirus WIV1 replication was inhibited by human IFN- $\beta$  in a dose dependent manner in Vero cells. B) Bat reovirus PRV1NB replication was inhibited by recombinant bat IFN $\alpha$ 3 in a dose dependent manner in bat PakiTO3 cells. Boosting bat IFN by blocking bat-

stimuler l'IFN de la chauve-souris bloquer les régulateurs négatifs de l'IFN spécifiques de la chauve-souris : l'IFN $\alpha$  de la chauve-souris est exprimé de manière constitutive mais ne peut pas être induit à un niveau élevé, ce qui indique un facteur de régulation négatif dans la voie de production de l'interféron de la chauve-souris. nous utiliserons une bibliothèque CRIPri de Pteropus Alecto que nous avons créée et qui couvre de multiples cibles ARN dans chaque gène du génome de P. Alecto (Wang,

données non publiées). Les gènes affectant la réplication de la grippe dans les cellules de chauve-souris ont déjà été identifiés à l'aide de cette bibliothèque. En utilisant CRISPRi, nous identifierons les gènes régulateurs négatifs et rechercherons des composés les ciblant afin de renforcer l'inductibilité du système IFN dans un délai plus court. Sur la base de travaux antérieurs, il est probable qu'il s'agisse d'une voie conservée chez toutes les chauves-souris. Activation des voies immunitaires innées spécifiques des chauves-souris qui ont été affaiblies, notamment les voies dépendantes du DNA-STING et du TLR : nous avons montré que le mutant STING de la chauve-souris ou la reconstitution de l'AIM2 et des homologues fonctionnels du NLRP3 rétablissent la fonctionnalité antivirale, ce qui suggère que ces voies sont importantes dans la coexistence chauve-souris-virus. En identifiant de petites molécules pour activer directement les voies en aval de STING ou des TLR/RLR, comme l'activation de TBK1, nous activerons la défense des chauves-souris par l'interféron, favoriserons la clairance virale et, selon notre hypothèse, réduirons significativement la charge virale chez les chauves-souris. validation dans un modèle chauve-souris. Divers CoVs montrent une infection et une réplication efficaces à l'intérieur de l'hôte humain mais présentent une entrée et une réplication défectueuses en utilisant la souris comme hôte, en partie à cause de la différence des récepteurs DPP4 et ACE2.



Nous avons démontré l'efficacité de la reconstitution de souris irradiées à l'aide de moelle osseuse de chauve-souris provenant de plusieurs espèces, dont *E. spelaea* (Fig. 10), y compris la reconstitution de PBMC de chauve-souris dans la souris, la présence de cellules de chauve-souris en circulation et la production d'anticorps spécifiques de chauve-souris chez des souris incapables de produire une réponse anticorps. **Ce modèle de souris "batifiée"** peut être utilisé à la fois pour l'infection circulante du SRAS-CoV (dans le compartiment immunitaire seulement) et comme modèle pour la production d'anticorps spécifiques de chauve-souris contre les protéines du CoV. La validation efficace de l'infection dans les cellules de chauve-souris servira à valider l'ineffectivité des virus et la production d'anticorps de chauve-souris facilitera la validation des meilleures protéines/peptides pour susciter une réponse immunitaire efficace.

**stimulation immunitaire ciblée (UNC).** pour stimuler l'immunité adaptative ciblée (mémoire immunitaire) chez les chauves-souris sauvages exposées de manière chronique à la circulation du SARSr-CoV QS, nous inoculerons des S glycoprotéines chimériques en présence des agonistes de stimulation immunitaire à grande échelle susmentionnés. nous avons développé de nouvelles S glycoprotéines chimériques SARSr-CoV du groupe 2B qui codent pour des domaines neutralisants provenant de souches phylogénétiquement éloignées (par ex, Urbani, HKU3, BtCoV 279, 25 % de diversité). Le S chimérique programme une expression efficace lorsqu'il est introduit dans le génome complet du squelette HKU3 et déclenche une immunité protectrice contre de multiples souches du groupe 2b. nous développerons **des systèmes d'expression robustes** pour le S chimérique SARSr-CoV en utilisant l'expression ectopique in vitro. nous travaillerons avec le Dr. Ainslie (UNC-pharmacy) qui a développé de nouveaux systèmes d'administration de microparticules et de poudres sèches pour la libération en aérosol qui encapsulent des protéines recombinantes et des adjuvants (agonistes de l'immunité innée) que nous utiliserons pour des **stratégies parallèles de renforcement immunitaire à grande échelle**

**+ immunogènes chimériques. Simultanément, nous introduirons le type chimérique et sauvage S dans le poxvirus du raton laveur (RCN)**, en collaboration avec le Dr Rocke, et nous confirmerons l'expression de la protéine recombinante, d'abord in vitro et dans la colonie de chauves-souris Duke-NUS avant tout essai sur le terrain. l'objectif est de mettre au point une série de réactifs permettant de réduire à distance le risque d'exposition dans des environnements à haut risque. Immunogènes chimériques SARSr-CoV : Les CoV **évoluent rapidement par mutation et recombinaison de l'ARN et codent des épitopes neutralisants dans le domaine amino-terminal (NTD), le RBD et la partie S2 de la glycoprotéine S, ce qui fournit une stratégie pour construire des immunogènes chimériques** qui induisent des anticorps neutralisants à large réactivité croisée. Étant donné l'ampleur du SRARS-CoV circulant dans les milieux naturels, les immunogènes chimériques seront conçus pour augmenter l'ampleur des épitopes neutralisants dans le sous-groupe phylogénétique du groupe 2b. à l'aide de génomes synthétiques et d'une conception guidée par la structure, nous avons fusionné le NTD de HKU3 avec le RBD du SARS-CoV et la molécule restante de la S-glycoprotéine du BtCoV 279/04, introduit le gène de la S-glycoprotéine chimérique dans le squelette du génome de HKU3 (25 % différent de celui du SARS-CoV, virus de clade 2) et obtenu des virus viables (HKU3mix) qui pouvaient se répliquer dans des cellules Vero. nous avons inséré le gène de la glycoprotéine S de HKU3mix dans des vecteurs de réplication du virus VEE (VRP-S chimera) et démontré que les vaccins VRP protègent contre le défi léthal du SARS-CoV et la croissance du virus. VRPHKU3 S et VRP-S279 protègent tous deux contre la provocation et la croissance de HKU3mix in vivo, ce qui démontre que les épitopes neutralisants de la glycoprotéine HKU3mix S offrent une protection croisée étendue contre de multiples souches de SARSr-CoV. en plus d'utiliser ces immunogènes comme stratégie de stimulation ciblée à grande échelle chez les chauves-souris, nous produirons d'autres chimères pour un ciblage immunitaire plus ciblé des souches connues à haut risque. nous utiliserons le centre d'expression des protéines de l'UNC (<https://www.med.unc.edu/csb/pep>) pour produire des ectodomains de glycoprotéine SRAS-CoV de perfusion optimisés pour le codon, stabilisés et purifiés. la protéine recombinante purifiée sera utilisée pour être incluse dans des matrices d'administration (par ex, poudres purifiées, perles de dextran, gels - voir ci-dessous) avec des agonistes immunitaires à grande échelle (adjuvants, Duke-NUS). Conception et test d'un immunogène chimérique de glycoprotéine S de deuxième génération : nous produirons un immunogène S recombinant chimérique SHC014 NTD/SARS-CoV-RBD/HUK 3 C terminal (HKU30014), pour un ciblage immunitaire plus ciblé sur les souches connues à haut et à faible risque désignées par nos analyses expérimentales et de modélisation. le gène S recombinant HKU3-S0014 sera envoyé au Dr Rocke pour être inséré dans le vecteur vaccinal du poxvirus du raton laveur. En utilisant des techniques établies, nous caractériserons l'expression du gène S et fournirons des vecteurs viraux au professeur Wang pour des essais de stimulation immunitaire à Duke-NUS et, en cas de succès sur le terrain, au professeur Shi. Les glycoprotéines chimériques recombinantes HKU3-S0014 et HKU3-Smix, dont le codon humain a été optimisé, seront exprimées et purifiées par le centre de protéomique de l'UNC, produisant des quantités en mg pour les inclure dans des porteurs de nanoparticules et de microparticules en collaboration avec le professeur Ainslie. we will produce WIV-S<sub>S014</sub> and HKU3-S<sub>mix</sub> glycoproteins expression will be validated by western blot and by vaccination of mice, allowing us to determine if the recombinant protein elicits neutralizing antibodies that protect against lethal SARS-CoV and SHC014 challenge. we will produce enough material for in vivo testing in mice and in bats. we will validate recombinant virus glycoprotein expression by western blot and by vaccination of mice to determine if the recombinant protein elicits neutralizing antibodies that protect against lethal SARS-CoV, HKU3-Smix and SHC014 challenge. we will survey the RNAseq data for evidence of complex S glycoprotein gene RNA recombinants in the SARSr-CoV population genetic structure. if present, we will synthesize 2-3 potentially effective recombinant S genes, insert these genes into SHC014 or HKU3 genome backbones and VRP, and characterize their

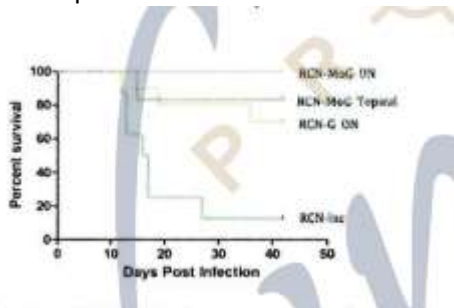


viability and replicative properties in cell culture and in mice. we will produce immunogens and evaluate their ability to protect against infection.

**véhicules d'administration d'adjuvants et d'immunogènes.** Le Dr Ainslie (UNC) a mis au point un polymère biodégradable, le dextran acétalé (Ac-DEX), pour l'administration d'antigènes et d'adjuvants dans les applications vaccinales. L'Ac-DEX présente des avantages par rapport à d'autres polymères pour le développement de vaccins : il est facile à synthétiser et à mettre à l'échelle en utilisant une méthode en une étape approuvée par la FDA pour passer de l'hydrosoluble à l'insoluble, il est sensible aux acides, ce qui améliore la présentation de l'antigène, les microparticules (MPs) sont petites (5-8 um) et peuvent donc être phagocytées par les DCs et être transportées vers les ganglions lymphatiques pour une délivrance efficace des molécules ; les MPs ont un PH neutre, sont sûres, stables en dehors de la chaîne du froid, peuvent être aérosolisées ou délivrées en sprays ou en gels ; et nous avons déjà encapsulé Ply (I : C) (1) resiquimod, et un agoniste STING dans nos nouveaux MPs, en apportant la preuve de concept que cela augmente significativement l'activité de l'agoniste TLR. Nous avons démontré une meilleure efficacité que le virus de la grippe inactivé approuvé par la FDA (Fluarix) dans un modèle de grippe du furet, en utilisant l'HA avec le STING cyclique encapsulé (G(3',5')pA(3'5')p). mesures de la performance des microparticules in vitro et chez les rongeurs et les chauves-souris : nous encapsulerons du Poly (I:C), du resiquimod (TLR7) ou d'autres agonistes de l'immunité innée pour augmenter la production d'interféron de type I en consultation avec le professeur Wang. Les particules chargées d'agonistes seront fabriquées séparément ou en combinaison avec des protéines de pointe chimériques SRAS-CoV recombinantes, et capsulées en MP et nanoparticules aérodynamiques horaires. Modèles d'infection virale chez les chauves-souris Eonycteris spp. (Duke-NUS) et Rhinolophus spp. capturées à l'état sauvage (Wuhan inst. Virol.) : pour tester et comparer l'efficacité des approches de modulation immunitaire ci-dessus, nous utiliserons notre colonie de reproduction de chauves-souris caverne-nectar (Eonycteris spelaea) infectée par le virus Melaka (famille Reoviridae) qui infecte cette espèce. Tout d'abord, nous prélèverons des biopsies de poignons d'ailerons sur 3 individus afin de séquencer le gène du récepteur ACE2. Celui-ci sera inséré dans des lignées cellulaires humaines afin de présélectionner les souches virales pour qu'elles se lient. Des études sur l'infection par le SRAS et le MERS sont déjà en cours sur des lignées cellulaires de Pteropus end et des cellules immunitaires primaires. Notre colonie d'E. spelaea a maintenant atteint une population durable pour quatre expériences d'infection et l'installation ABSL3 a été équipée de cages spécifiques aux chauves-souris. L'infection pilote in vivo de chauves-souris Eonycteris avec le virus de Melaka et le MERS sera terminée d'ici juillet 2018. Des études d'infection précédentes ont été réalisées chez des chauves-souris Pteropus et Rhinolophus en Australie par L-F Wang au CSIRO, AAHL et un essai supplémentaire d'infection par Pteropus est actuellement prévu par l'université de Queensland en Australie. Au WIV, 20 chauves-souris Rhinolophus spp. adultes (10 de chaque sexe) seront capturées dans notre grotte d'essai située dans l'ABSL3, les gènes des récepteurs ACE2 seront séquencés et utilisés pour présélectionner les pics comme ci-dessus, puis les chauves-souris seront testées par PCR et sérologie pour détecter une exposition actuelle et antérieure au SRAS-CoV et inoculées avec le WIV1, le WIV16 ou le SHC014. pour toutes les expériences, les charges virales seront mesurées par qPCR, titrage du virus produit, transcriptomique NSG et sondes nanostrings spécifiques du virus ajoutées au panel d'immunoprofilage. les réponses en anticorps seront mesurées par des tests LIPS, comme décrit précédemment. en plus de l'administration directe de ligands in vivo, des méthodes de déploiement en aérosol et en phase liquide adaptées à un environnement caveux seront testées, en collaboration avec l'UNC, le NWHC et le PARC. cette approche nous permet de tester nos stratégies de renforcement immunitaire dans un environnement sûr et contrôlé, avant de passer à une évaluation sur le terrain. les protocoles expérimentaux et les méthodes d'analyse utilisés pour la colonie d'E. spelea, qui mettent l'accent sur la

normalisation interne et les petites quantités d'échantillons (y compris l'analyse par nanostring de gouttelettes de sang total), seront reproduits pour analyser l'infection expérimentale de chauves-souris *Rhinolophus* spp. capturées dans la nature au WIV et dans la grotte expérimentale de TA2.

**le développement de systèmes de prestation de services (NWHC).** Nous avons déjà mis au point des vaccins oraux et des méthodes d'administration dont l'innocuité et l'efficacité ont été testées et enregistrées pour gérer les maladies chez les animaux sauvages en liberté, notamment un vaccin contre la peste pour les chiens des Prairies, des vaccins contre la rage pour les chauves-souris et des stratégies pour le syndrome du nez blanc (données non publiées). Comme cela a été démontré précédemment pour le vaccin contre la rage chez les chauves-souris, nous testerons des gels collants comestibles que les chauves-souris se toilettent entre elles pour délivrer des modulateurs immunitaires et des protéines de pointe recombinantes du SRAS-CoV aux chauves-souris *Rhinolophus*, y compris des essais de ces gels combinés avec des vecteurs de poxvirus et des nanoparticules/nanoémulsions qui améliorent l'optique par voie transdermique. Les poxvirus sont des vecteurs viraux efficaces pour administrer des vaccins à la faune sauvage et peuvent se répliquer en toute sécurité à des niveaux élevés après administration oronasale. Nous avons démontré la preuve de concept et la sécurité chez les chauves-souris avec les vecteurs Modified Vaccinia Ankara (MVA) et Raccoon Poxvirus (RCN) en utilisant l'imagerie biophotonique *in vivo*. Le RCN s'est répliqué à des niveaux plus élevés chez les chauves-souris que le MVA, même par voie orale, et s'est avéré sûr. Nous avons utilisé le



poxvirus du raton laveur comme vecteur de la nouvelle glycoprotéine rabique (mosaïque ou MoG) et avons démontré une efficacité protectrice chez les chauves-souris après administration oronasale et topique (**Fig. 11**).

**Fig. 11:** Vaccine efficacy, rabies challenge in *Eptesicus fuscus* immunized with raccoon poxvirus expressing a mosaic G protein (RCN-MoG) oronasally (ON) or topically in comparison to RCN expressing typical G protein or luciferase (negative control).

Les poxvirus sont sans danger pour une grande variété d'animaux sauvages et domestiques

et permettent de larges insertions d'ADN étranger. nous avons déjà utilisé un vaccin vectorisé par le poxvirus du raton laveur exprimant des antigènes de la peste pour gérer la peste causée par *Yersinia pestis* chez les chiens des Prairies. nous avons incorporé le biomarqueur Rhodamine B (RB) dans les bates pour évaluer l'absorption par les espèces cibles et non cibles (**Fig. 12**). La RB est visible sous un microscope UV jusqu'à la repousse du poil (50 jours chez le chien de prairie). nous avons depuis mené un vaste essai sur le terrain qui a démontré l'efficacité du vaccin chez quatre espèces de chiens de prairie dans sept États de l'ouest.



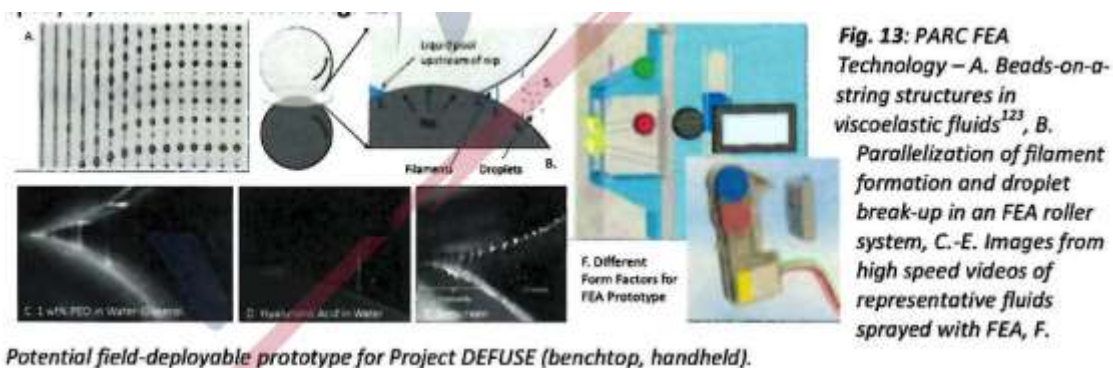
**Fig. 12:** Prairie dog hair and whisker samples under fluorescence microscope to determine uptake of baits containing Rhodamine B. a) 20 days after bait distribution, b) 16 days after bait distribution, c) and d) controls (note natural dull fluorescence).

**Administration transcutanée :** pour tester une stratégie qui évite l'utilisation d'agents vivants, nous utiliserons des nanoparticules pour augmenter l'efficacité de l'administration transcutanée. nous utiliserons de l'acide polylactique-co-glycolique (PGLA) pour encapsuler des modulateurs immunitaires comme méthode d'administration transcutanée du vaccin aux chauves-souris via l'absorption par les cellules dendritiques, comme cela a été démontré pour l'administration simultanée d'agonistes TLR et d'antigènes à deux souris. cette approche sera testée de manière compétitive par rapport à l'ac-DEX, avec et sans adjuvants qui renforcent la réponse immunitaire des souris aux protéines de pointe du SRAS-CoV. les premiers essais seront menés aux États-Unis avec des grandes chauves-souris brunes insectivores (*Eptesicus fuscus*) acquises localement, que nous avons maintenues et hébergées pour plusieurs expériences auparavant. Nous traiterons les chauves-souris par application topique de diverses formulations d'essai comprenant le biomarqueur Rhodamine B (RB),

les hébergerons avec des chauves-souris non traitées et surveillerons le transfert entre les chauves-souris en recueillant des poils et des moustaches pour l'analyse des biomarqueurs.

premiers essais sur le terrain : les taux élevés de toilettage au sein des colonies de chauves-souris permettent un transfert efficace des produits au sein d'une colonie. lors d'essais sur les biomarqueurs au Pérou, la gelée de glycérine marquée au RB a donné un taux de transfert de 1,3 à 2,8 chauves-souris pour chaque chauve-souris marquée. nous effectuerons des essais initiaux avec chacun des véhicules d'administration chez des chauves-souris insectivores américaines locales dans leur environnement naturel. dans la semaine suivant l'application des différentes doses, les chauves-souris seront piégées à l'entrée de la grotte à l'aide de filets japonais ou de pièges à harpe et des poils seront collectés pour évaluer le taux d'absorption via l'analyse des biomarqueurs. après avoir déterminé les approches optimales pour l'administration massive, nous les testerons sur des chauves-souris Rhinolophus en captivité dans la nature (WIV), puis dans nos trois sites de grottes dans la province du Yunnan. Les biomarqueurs seront utilisés pour évaluer les taux d'absorption (et la contamination des espèces non ciblées) et ces données seront utilisées dans des études de modélisation pour aider à déterminer les taux optimaux d'application des agents immunomodulateurs.

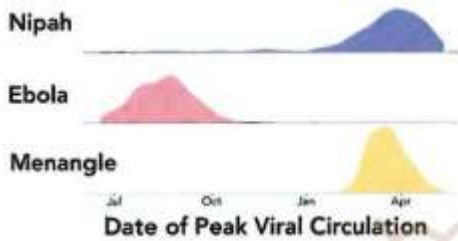
approche innovante de l'inoculation des chauves-souris par aérosol : une fois que nous aurons confirmé l'absorption du vaccin dans les études de laboratoire, nous évaluerons des méthodes d'administration évolutives dans les grottes et hibernacula locaux en utilisant des milieux sans substances marquées par des biomarqueurs. en collaboration avec le Dr. Jerome Unidad du Palo Alto Research Center (PARC), nous utiliserons une technologie innovante de plateforme aérosol unique au PARC pour concevoir un prototype déployable sur le terrain à utiliser dans les grottes. Cette technologie d'atomisation par extension de filament (FEA) peut pulvériser des fluides avec une large gamme de viscosités allant de 1mPa-s (la viscosité de la salive et de la plupart des formulations aqueuses de vaccins) à 600Pa-s (la viscosité des crèmes et des gels pour l'administration topique) en utilisant un processus de brumisation de rouleau à rouleau (<https://www.parc.com/service/focus-area/amds/>) qui produit des gouttelettes étroitement dispersées avec des tailles réglables de 5-500 microns. La technologie FEA est compatible avec toutes les formulations d'intérêt pour le projet DEFUSE, y compris les formulations aqueuses destinées à la pulvérisation conventionnelle et les gels et crèmes comestibles pour l'administration topique, sans aucune limite de charge en principe actif biologique. La technologie FEA peut être une plateforme de distribution universelle pour la pulvérisation directe sur les chauves-souris, la formulation étant orientée vers la bio-efficacité. Les facteurs de forme potentiels d'un prototype de système de pulvérisation basé dans une grotte sont présentés à la **figure 13**.



PARC et NWHC nous effectuerons des essais initiaux sur des chauves-souris des cavernes américaines, puis nous développerons le prototype 2A qui sera utilisé pour la démonstration de la preuve de concept sur les sites d'essai dans les cavernes de chauves-souris, en Chine. le système déployable sur le terrain sera actionné par le mouvement et sur une minuterie, de sorte que les chauves-souris seront ciblées à l'entrée et à la sortie pour éviter les espèces non ciblées (par exemple, le martinet des cavernes).

**Modélisation dynamique de la circulation pour optimiser la stratégie de déploiement.** Pour sélectionner le renforcement immunitaire

et les multiples options et calendriers d'administration, nous stimulerons le déploiement à l'aide d'un modèle de circulation virale dans les populations de chauves-souris des grottes. Le modèle sera adapté aux données de notre système d'essai à trois grottes mais conçu pour être robuste et généralisable à deux autres cas. nous stimulerons les résultats dans le cadre d'une variété de scénarios de déploiement différents pour produire des estimations prudentes de l'application optimale dans des conditions réelles. 5. modèles stochastiques de circulation virale 2. données d'échantillonnage longitudinal : nous utiliserons la prévalence virale longitudinale, les données de recapture de marques, les données de télémétrie et



de caméra infrarouge collectées pendant notre échantillonnage sur le terrain pour paramétrer et construire des modèles de la dynamique des populations de chauves-souris et de la circulation virale dans nos grottes de test.

test caves. Fig. 14: Modeled seasonal circulation of viruses modeled from longitudinal sampling of viruses in bat colonies in Bangladesh.

nous modifierons les modèles existants qui extraient la dynamique temporelle, développés pour les systèmes multi-viraux

sur la base d'études longitudinales au Bangladesh (Fig. 14). nous utiliserons un modèle de processus stochastique SIR simple mais robuste avec des taux d'immigration et de contact non linéaires flexibles entre les chauves-souris pour capturer une large gamme de dynamiques virales allant des épidémies virales intermittentes à la circulation endémique régulière avec un nombre relativement faible de paramètres. nous ajusterons ces modèles à nos données d'échantillonnage en utilisant **le cadre du processus de Markov partiellement observable** (pomp), permettant d'estimer le processus dynamique latent sous-jacent de transmission de la maladie, en tenant compte et en séparant la stochasticité naturelle de la circulation virale et l'erreur d'observation dans l'échantillonnage. nous validerons nos modèles via une validation croisée temporelle et en testant les résultats de l'ajustement de deux sites de grottes sur les données d'un troisième.

stimuler la circulation dans le cadre d'un ensemble de scénarios de déploiement plausibles. en utilisant les ensembles de molécules immunostimulantes les plus performants issus des essais en captivité et les supports et méthodes d'administration les plus efficaces issus des études en grotte, nous utiliserons le modèle stochastique SIR 2 pour générer des simulations de la circulation virale dans le cadre d'une série de scénarios de déploiement dans nos grottes de test. ces scénarios couvriront une gamme d'intensités, de fréquences et de combinaisons plausibles de stratégies de suppression et nous intégrerons l'incertitude quant à l'efficacité de chaque stratégie de traitement. à partir de ces simulations, nous estimerons le degré et la période de suppression attendus de la circulation et de l'excrétion virales et déterminerons le scénario optimal pour le déploiement dans nos grottes d'étude focale.

tester la robustesse des stratégies de déploiement dans des conditions plus larges : nous prévoyons que le déploiement aura probablement lieu dans des conditions de population et de composition des espèces très variées, avec des estimations incertaines basées sur des observations approximatives, avec une absorption et une efficacité variables du traitement en raison de différentes conditions environnementales et avec un temps et des ressources limités. nous simulerons le déploiement dans de nombreuses conditions potentielles afin de déterminer le déploiement optimal dans chacune d'elles et les stratégies qui sont conservatrices et robustes face aux incertitudes et aux limitations.

Preuve de concept du déploiement de molécules de modulation immunitaire dans des grottes tests dans la province du Yunnan, en Chine. nous déploierons les molécules de modulation immunitaire les plus efficaces dans nos trois grottes tests dans la province du Yunnan, en Chine. nous identifierons le principal point d'entrée/sortie et les schémas de circulation pour chaque caverne utilisée par les chauves-souris pendant l'envol grâce à la cartographie LiDAR et à la surveillance vidéo infrarouge et nous positionnerons 2 buses de pulvérisation PARC autour du sommet (position 10 et 2 heures, pointant vers le bas) de l'ouverture principale. En fonction de la taille de l'ouverture de la grotte, nous

monterons les buses sur des rampes extensibles pour les positionner au sommet de l'ouverture de la grotte. le spray sera activé par le mouvement des chauves-souris pour pulvériser en continu ou de manière échelonnée pendant la sortie et l'entrée de la grotte afin de créer un rideau aqueux que les chauves-souris traverseront. nous déterminerons la durée optimale de la pulvérisation à l'aide de modèles stochastiques de circulation virale et de données en temps réel sur la taille de la population.

nous supposons un taux de transfert du gel de glycérine de 2,0, par l'activité de toilettage à partir de données préliminaires. les premiers essais utiliseront le RB pour évaluer la couverture. Les quatre mois d'échantillonnage préalables au déploiement seront suivis de quatre mois de surveillance (**voir la stratégie d'échantillonnage**) commençant le jour suivant le déploiement, au cours desquels nous évaluerons 1) la nature et la durée de la mauvaise réponse immunitaire individuelle au traitement et 2) les taux d'excrétion virale du SRAS-CoV au niveau de la population dans les grottes d'essai et de contrôle, sur la base du dépistage physique des granules. Cette approche peut être étendue à un plus grand réseau de perchoirs de chauves-souris en utilisant notre application pour modéliser la connectivité des perchoirs de chauves-souris (modèles de mélange parmi les grottes locales basés sur nos données de recapture et de télémétrie) et identifier les grottes avec la plus grande connectivité de sorte que les chauves-souris transfèrent le traitement biologique à d'autres grottes à un taux qui amortira l'excrétion virale sur une zone beaucoup plus grande.

### Section 1.03 PLAN DE MANAGEMENT



L'institution responsable du projet DEFUSE est EcoHealth Alliance, New York, un organisme de recherche international axé sur les zoonoses émergentes. Le chercheur principal, le Dr Draszak, a plus de 25 ans d'expérience dans la gestion de projets de recherche en laboratoire, sur le terrain et en modélisation sur les zoonoses émergentes. Le Dr Daszak s'engagera à consacrer deux mois par an (un mois financé par DEFUSE, un mois financé par les fonds de base de l'EHA) pour superviser et coordonner toutes les activités du projet en mettant l'accent sur la modélisation et le travail sur le terrain dans l'AT1. Le Dr Karesh, qui a plus de 40 ans d'expérience dans la direction de projets sur les zoonoses et les maladies de la faune sauvage, consacrera un mois par an à la gestion des activités de partenariat et de sensibilisation. Le Dr Epstein, qui a 20 ans d'expérience dans les zoonoses émergentes des chauves-souris, coordonnera les essais sur les animaux pour tous les partenaires. Les docteurs Olival et Ross géreront les approches de modélisation pour ce projet. Le personnel de soutien comprend une équipe de surveillance sur le terrain, des analystes de modélisation, des développeurs, des gestionnaires de données et des consultants de terrain dans la province du Yunnan, en Chine. L'équipe de l'EHA a beaucoup travaillé avec d'autres collaborateurs : Prof. Wang (15+ ans) ; Dr Shi (15+ ans) ; Prof Baric (5+ ans) et Dr Rocke (15+ ans).

**Contrats de sous-traitance : #1** au Prof. Baric, UNC, pour superviser la rétro-ingénierie du SARSr-CoV, les infections expérimentales de souris humanisées BSL-3, la conception et les tests de traitements immunostimulants ciblés,

#2 au Prof. Wang, Duke-NUS, pour superviser les expériences d'immunostimulation à grande échelle sur des chauves-souris captives et analyser les réponses immunologiques et virologiques aux modulateurs immunitaires ; #3 au Dr Shi, Wuhan inst. Virol. pour effectuer des tests PCR, la découverte et l'isolement de virus à partir d'échantillons de chauves-souris collectés en Chine, des tests de liaison aux protéines de pointe, des travaux sur des souris humanisées et des essais expérimentaux sur des chauves-souris *Rhinolophus* ; #4 au Dr Rocke, USGS NWHC, pour affiner les mécanismes d'administration de quatre traitements de stimulation immunitaire. Le Dr Rocke utilisera une colonie captive de chauves-souris au NWHC pour les premiers essais et supervisera les expériences en grotte aux États-Unis et en Chine. #5 au Dr Unidad, PARC, pour développer une plateforme aérosol innovante en un dispositif déployable sur le terrain pour une inoculation à grande échelle des chauves-souris. Le Dr Unidad collaborera étroitement avec le Dr Rocke pour développer un prototype déployable sur le terrain pour les essais initiaux et les expériences en grotte en Chine.

**Coordination des collaborateurs :** tout le personnel clé participera à des conférences en ligne et à des conférences téléphoniques régulièrement programmées, en plus des fréquentes interactions ad hoc par courriel et par téléphone entre les individus et les groupes de chercheurs. les appels réguliers comprendront :

- des réunions hebdomadaires entre le PI et le gestionnaire du programme (sur l'état du projet et des tâches)
- des réunions hebdomadaires par Internet/téléphone entre le responsable du programme et le personnel administratif des sous-titulaires.
- des conférences mensuelles par Internet ou par téléphone entre les IP de l'EHA et les IP des sous-titulaires.
- Conférences mensuelles par Internet entre le personnel clé (présentations de recherche/coordination).
- Quatre réunions annuelles des partenaires en personne avec le personnel clé de l'EHA et deux réunions annuelles des partenaires en personne entre les sous-bénéficiaires.
- Réunion annuelle en personne de tout le personnel clé.

Les mesures d'évaluation comprendront la production de données de haute qualité, le respect des étapes et des délais, l'interaction et la collaboration scientifiques, la production de publications de haute qualité et la gestion efficace du budget. Le chercheur principal et le sous-titulaire participeront à une réunion de lancement et le chercheur principal rencontrera régulièrement le DARPA au siège et lors de visites sur site.

**Gestion et partage des données :** EcoHealth Alliance maintiendra une base de données centrale des données collectées et générées par tous les travaux de terrain, de laboratoire et de modélisation du projet. la base de données utilisera des services d'hébergement en nuage sécurisés et permettra l'exportation vers des formats d'archivage et indépendants de la plateforme. elle assurera la compatibilité des données et des métadonnées entre les composants du projet, suivra le versionnement et les annotations des données et permettra la conformité avec les demandes de données et les exigences de divulgation du DARPA. toutes les données d'échantillons humains archivées seront dépersonnalisées. les partenaires fourniront des données roulantes et traitées à la base de données centrale tout au long du projet. les partenaires du projet auront accès aux données qu'ils génèrent dans la base de données à tout moment et garderont le contrôle des copies locales. la diffusion de toute donnée de la base de données à des parties extérieures non DARPA ou pour une diffusion ou publication publique ne se fera qu'après consultation de tous les partenaires du projet. EHA a une grande expérience dans la gestion des données pour des projets multi-partenaires (PREDIT, USAID IDEEAL, le système mondial de rapport sur le Ranavirus).

**Identification et résolution des problèmes :** les réunions régulières de planification, de suivi et d'évaluation seront les principaux mécanismes d'identification des problèmes. les problèmes mineurs (par ex, Les problèmes mineurs (par exemple, les retards dans la disponibilité des échantillons ou dans les résultats des tests) seront traités en interne par des actions et des résolutions appropriées surveillées par le Dr. Draszak et le chef de projet. En cas de problèmes importants tels qu'une faible productivité prolongée, une collaboration scientifique inadéquate ou des conflits majeurs concernant la direction de la recherche ou l'allocation des ressources, l'EHA aidera à résoudre le

problème par la négociation. Si une résolution n'est pas trouvée, la consultation de nos conseillers techniques et du personnel du programme DARPA peut être justifiée.

**Gestion des risques :** le respect du calendrier et des étapes clés exigera une surveillance stricte et continue de toutes les phases du projet, une communication fréquente et régulière, ainsi que la capacité de prendre des décisions et de mettre en œuvre des stratégies. un projet de cette nature exige un état d'esprit différent de celui généralement associé aux activités de recherche fondamentale qui évoluent à un rythme incrémentiel, les chercheurs optimisant progressivement les systèmes expérimentaux, affinant les données ou attendant des données supplémentaires avant d'adopter une approche analytique. pour respecter notre calendrier, nous évaluerons continuellement ces compromis afin de décider quand l'itération est appropriée et quand il est nécessaire d'avancer avec les informations actuelles.

#### **Biographies :**

**Le Dr Peter Daszak** est président et scientifique en chef de l'EcoHealth Alliance, président du forum NASEM sur les menaces microbiennes, membre du comité exécutif et responsable institutionnel de l'EHA pour le projet USAID-EPT-PREDICT de 130 millions de dollars. Ses 300 articles scientifiques comprennent la première carte mondiale des points chauds de l'EID, une estimation de la diversité virale inconnue, des modèles prédictifs des relations hôte-virus et des preuves de l'origine chauve-souris du SRAS-CoV et d'autres virus émergents.

**Pr. Ralph Baric** est professeur au département d'épidémiologie et au département de microbiologie et d'immunologie de l'UNC-Chapel Hill. Ses travaux se concentrent sur les coronavirus en tant que modèles pour étudier la transcription, la réplication, la persistance, la transmission inter-espèces et la pathogénie des virus à ARN. Son groupe a développé une stratégie de plate-forme pour évaluer les contre-mesures du risque potentiel "pré-épidémique" associé à la transmission inter-espèces des virus zoonotiques.

**Le professeur Linfa Wang** est le directeur du programme des maladies infectieuses émergentes à l'école de médecine Duke-NUS. ses recherches portent sur les virus émergents des chauves-souris, notamment le SARS-CoV, le SADS-CoV, les henipavirus et d'autres, et sur les travaux génétiques reliant mais immunologie, vol et tolérance virale. Récipiendaire en 2014 du prix Eureka pour la recherche sur les maladies infectieuses, il dirige actuellement une bourse de la fondation de la nat. res. de Singapour "learning from bats" (9,7 millions de dollars SGD).

**Prof. Zengli Shi** est directrice du centre des maladies émergentes de l'institut de virologie de Wuhan, Académie chinoise des sciences, et responsable du BSL3 et du BSL4. ses recherches portent sur les techniques de séquençage traditionnelles et à haut débit pour la découverte de pathogènes viraux. Depuis 2004, elle étudie les virus transmis par les chauves-souris et a dirigé la découverte du groupe SARSr-CoV.

**Le Dr Tonie Rocke** est chercheur scientifique au National Wildlife Health Center de l'USGS. Ses recherches portent sur l'écologie et la gestion des maladies chez les mammifères sauvages (peste, variole du singe, rage et syndrome du nez blanc, par exemple).

**Le Dr Jerome Unidad** est membre du personnel de recherche du laboratoire des systèmes matériels du PARC. Ses recherches portent sur les nouveaux systèmes d'administration de fluides, notamment l'administration par aérosol de fluides à haute viscosité, de polymères et de biomacromolécules. Il est le responsable technique du développement de la technologie de pulvérisation FEA pour les applications grand public et biomédicales et la fabrication additive.

#### **section II Capacités**

**EcoHealth Alliance (EHA)** est une organisation internationale à but non lucratif qui mène des recherches sur les zoonoses émergentes dans 20 pays d'Asie, d'Afrique et d'Amérique du Sud. L'EHA a été pionnière dans la modélisation et l'analyse des origines et des moteurs des maladies émergentes, des origines des chauves-souris des virus émergents et de

la dynamique des SARSr-CoVs, des henipavirus et d'autres pathogènes émergents très connus. L'EHA est le principal partenaire du consortium du programme USAID-EPT-PREDICT qui a testé plus de 35 000 animaux et découvert 200 nouveaux virus à ce jour.

**École de médecine de l'université de Caroline du Nord (UNC).** Le laboratoire Baric de l'Université de Caroline du Nord à Chapel Hill comprend des installations de niveau de sécurité biologique 2 équipées pour effectuer des travaux de base en virologie, immunologie et biologie moléculaire, ainsi qu'un espace universitaire pour l'élevage de souris pour les études proposées. Les laboratoires Baric BSL-3 sont approuvés et disposent de l'équipement nécessaire pour effectuer toutes les opérations de récupération et de caractérisation des virus chimériques et de mise en cage ventilée des rongeurs pour examiner les coronavirus de chauve-souris dans le cadre de cette proposition.

**Le National Wildlife Center (NWHC)** contient des laboratoires de recherche spécialisés et des zones de soutien, des bureaux du personnel et des zones de recherche sur les animaux en confinement biologique BSL-3. Deux laboratoires entièrement équipés dans le bâtiment de recherche sont disponibles à tout moment pour le travail proposé. Le NWHC dispose d'un équipement de stérilisation et d'une chambre à rayonnement ultraviolet afin que tous les matériaux puissent être traités avant de quitter la zone de confinement biologique et est maintenu sous une pression d'air négative. un personnel de soins aux animaux formé et un médecin vétérinaire sont disponibles pour entretenir, surveiller et manipuler les animaux. Le NWHC est entièrement équipé pour les procédures médicales sur les animaux.

L'institut de virologie de Wuhan comprend des laboratoires BSL-2, BSL-3 et BSL-4, des salles d'alimentation des animaux et d'autres installations de soutien. Le laboratoire de sécurité biosafe effectuera des recherches sur le CoV, des tests sur des échantillons, des séquençages, des essais de liaison in vitro et des travaux in vivo.

**Duke-NUS medical school, Singapour :** le laboratoire BSL-3 de Duke NUS est situé dans les locaux de l'hôpital et de l'élevage SingHealth, dans le nord de Singapour. il s'agit d'un laboratoire modulaire ultramoderne équipé pour mener en toute sécurité des recherches sur les maladies infectieuses. le laboratoire BSL-3 est doté de capacités de virologie, d'immunologie de base et de biologie moléculaire et est équipé pour manipuler des animaux en cage, notamment des rongeurs, des primates non humains et des chauves-souris.

**droits de propriété intellectuelle :** Les actifs de PARC comportent des restrictions sur l'élément non commercial suivant : une méthode efficace de collecte de gouttelettes de fluides viscoélastiques durcissant à la déformation dans un dispositif de pulvérisation, qui sera utilisée pour le développement de dispositifs dans le cadre du projet DEFUSE. PARC développera la technologie exclusivement à des frais privés et affirmera que le gouvernement américain a des droits limités sur les données techniques associées au dispositif. PARC est prêt à négocier de bonne foi avec le gouvernement ou le partenaire de transition technologique pour la propriété intellectuelle de base pertinente pour soutenir la transition. il n'y a aucune restriction sur les droits de propriété commerciale.

#### **Recherches connexes :**

**Daszak, PI sur le contrat de sous-traitance, ISAID-EPT1&2, PREDICT :** Chef de file des partenaires du consortium, membre du conseil d'administration, chef de file de la modélisation et de l'analyse pour 2 contrats de 5 ans (75 millions de dollars ; 138 millions de dollars) pour mener une surveillance des nouveaux virus dans la faune sauvage dans 50 pays du monde, renforcer les capacités, évaluer le risque comportemental et gérer les bases de données. L'EHA sous-traite 35 millions. 1000 virus découverts, 10 000 échantillons collectés. Articles publiés dans Science, Nature, Lancet.



**Drazsak, PI, NIAID** : Comprendre le risque d'immersion du coronavirus des chauves-souris : Subvention de 5 ans pour la recherche du risque de propagation des nouveaux SARSr-CoVs en Chine. 2,8 millions de dollars, 5 sous-bourses. Travaux publiés dans science, nature, PNAS.

**Drazsak, chef de partie, USAID** : Emergence des maladies infectieuses & et économie des paysages modifiés : PI sur un contrat de 3 ans de 2,5 millions de dollars pour analyser l'économie du changement d'utilisation des terres et l'émergence des maladies en Malaisie.

## Déclaration de travail de la section II

### Phase 1

**Tâche 1 du PI-TA** : réaliser un échantillonnage longitudinal des chauves-souris et une collecte de données écologiques sur des sites de terrain dans le sud de la Chine afin d'obtenir des données pour les études expérimentales et la modélisation (EHA).

**Sous-tâche 1.1.** Demander et obtenir l'approbation de l'IACUC et de l'ACURO et les permis appropriés en Chine pour la collecte d'échantillons de chauves-souris et l'intervention expérimentale (EHA). **Sous-tâche 1.2.** Collecter des spécimens mensuels de chauves-souris dans des sites de grottes au Yunnan, en Chine, pour le dépistage et le séquençage du SARSr-CoV. Echantillon oral, fécal et sanguin collecté sur 360 chauves-souris *Rhinolophus* spp. par mois en utilisant la capture vivante et l'échantillonnage non envahissant. spécimens expédiés au laboratoire pour analyse. données morphologiques, démographiques et physiologiques associées pour les chauves-souris individuelles collectées (EHA, consultant Zhu). **Sous-tâche 1.3** Marquage PIT pour évaluer la connectivité et la fidélité des chauves-souris aux gîtes. Toutes les chauves-souris échantillonnées ont été marquées avec des étiquettes à transpondeur intégré passif. Des enregistreurs de données d'identification par radiofréquence ont été installés à chaque entrée de grotte pour la surveillance de la capture et de la recapture à distance. (EHA, consultant Zhu). **Sous-tâche 1.4** Télémétrie par satellite pour évaluer la taille du domaine vital et la connectivité des chauves-souris. Marquer 36 *Rhinolophus* sp. mais avec des étiquettes satellites ICARIUS de 1g (EHA, consultant Zhu). **Sous-tâche 1.5** Surveillance en temps réel de la population de chauves-souris Effectuer des études LiDAR dans les grottes et installer des caméras thermiques IR à distance aux entrées des perchoirs pour surveiller la taille de la population. optimiser les algorithmes de reconnaissance d'images EHA, consultant Zhu). **Sous-tâche 1.6** Développer et maintenir une base de données pour l'ensemble du projet. Une base de données sécurisée hébergée dans un nuage stockera toutes les données collectées et générées par le travail sur le terrain, en laboratoire et expérimental, y compris le code g de la sous-tâche 1.4 et les données générées par la modélisation (EHA).

**Jalon(s) : 1.1.** approbation du soin et de l'utilisation des animaux et obtention du permis d'échantillonnage de la faune sauvage ; **Sous-tâche 1.2.** collecte mensuelle de spécimens de chauves-souris et de données sur les hôtes associés achevée ; **Sous-tâche 1.3.** enregistreurs de données et **Sous-tâche 1.5.** caméras installés ; 1.5. émetteurs de chauves-souris lancés et collecte de données réussie ; **Sous-tâche 1.6.** base de données construite et testée ; 1.6. données de terrain entrées dans la base de données mensuellement.

**Livrables** : spécimens de 3 240 bords et boulettes fécales collectés auprès de populations de réservoirs à haut risque qui ont été obtenus avec tous les permis et autorisations nécessaires et expédiés au WIV pour analyse ; données de télémétrie en temps réel et de recapture de marques téléchargées et mises à la disposition des collaborateurs de la DARPA ; base de données complète maintenue.

**PI-TA-01 Tâche 2** : Mise au point de modèles pour prédire la répartition des espèces de chauves-souris et les endroits où le risque de propagation virale est le plus élevé (EHA).

**Sous-tâche 2.1** Construire un modèle commun de distribution des espèces pour prédire la communauté des chauves-souris dans les grottes du Sud et du Sud-Est de l'Asie et identifier les zones géographiques à haut risque. Asie et identifier les points chauds géographiques à haut risque de propagation virale (EHA). **Sous-tâche 2.2** Modèles d'apprentissage automatique utilisant les caractéristiques de l'hôte et de l'écologie pour prédire la présence de virus à potentiel zoonique chez les chauves-souris (EHA). **Sous-tâche 2.3** : Estimateurs non paramétriques de la richesse virale pour prédire la diversité virale non encore échantillonnée. **Sous-tâche 2.4** : développer un prototype d'application de " risque de propagation virale spatiale " pour le combattant (EHA).

**Jalon(s) : 2.1** Ajustement du modèle de distribution conjointe des espèces pour les chauves-souris asiatiques, prédictions au niveau des grottes de la composition des communautés de chauves-souris et de la diversité virale, 2.2 et 2.3. Prédications de la diversité virale et du potentiel de saut par espèce de chauve-souris. Validation des prédictions pour 2.1-2.3 ; 2-4 prototypes d'application produits pour les tests b, prototype d'application testé avec succès sur le terrain.

**Livrables :** modèles déployables de la composition des communautés de chauves-souris, de la diversité virale par espèce et du potentiel de saut zoonotique. développement d'une application entièrement fonctionnelle et conviviale.

**PI-TA-01 Tâche 3 :** dépister, caractériser et isoler le SARSr-CoV QSO à partir d'échantillons de chauves-souris (WIV)

**Sous-tâche 3.1** dépistage par PCR de spécimens longitudinaux provenant d'espèces de chauves-souris cibles (WIV).

**Sous-tâche 3.2** séquencer génétiquement les protéines de pointe du SARSr-CoV à partir d'échantillons positifs à la PCR (WIV). **Sous-tâche 3.3** développer et récupérer des virus recombinants avec des protéines de pointe du nouveau SARSr-CoV (Duke-NUS). **Sous-tâche 3.4 :** identifier le présent du SARSr-CoV peu abondant et à haut risque, sur la base des données de séquençage profond (UNC).

**Jalon(s) :** Prévalence et diversité génétique du CoV quantifiées ; génomes complets récupérés.

bibliothèque de spécimens positifs à la PCR. séquençage complet des protéines de pointe. création d'un virus recombinant qui sera utilisé dans la tâche 4. liste des QS potentiels de SARSr-CoV à haut risque.

**PI-TA-01 Tâche 4 :** essais expérimentaux du potentiel de saut de QS du SRASr-CoV (UNC)

**Sous-tâche 4.1 :** Effectuer une présélection au moyen de la modélisation structurale des protéines, de l'identification des mutations et des essais sur les pseudovirus (UNC). **Sous-tâche 4.2 :** Effectuer des essais in vitro de virus chimériques contre des lignées cellulaires hôtes (UNC). **Sous-tâche 4.3 :** évaluer la pathogénèse in vivo chez les souris transgéniques hACE2 (UNC). **Sous-tâche 4.4** valider les résultats des virus chimériques avec un QS du génome complet (UNC). **Tâche secondaire 4.5 :** tester les modifications synthétiques de deux protéines virales de pointe, y compris les délétions RDB, les sites de glycosylation par clivage protéolytique S2, la glycosylation liée à l'azote (UNC). **Sous-tâche 4.6 :** tester les effets des micro-variations de faible abondance et de grande conséquence sur le potentiel de saut (UNC).

**Jalon(s) :** lancement et achèvement de chaque sous-tâche expérimentale.

**Livrables :** liste confirmée par le laboratoire des QS SARSr-CoV à haut risque ayant une capacité zoonotique. SARSr-CoV candidats pour les expérimentations animales. données mises à disposition.

**PI-TA-01 Tâche 5 :** construire et tester des modèles de réseau bayésien pour prédire le potentiel de débordement génotype-phénotype des souches de SARSr-CoV à haut risque (EHA).

**Sous-tâche 5.1** faire des prédictions en utilisant les données antérieures pour guider la sélection des SQ pour la caractérisation (EHA).

**Sous-tâche 5.2 :** mettre à jour les prédictions du modèle en fonction des données en temps réel d'un test viral in vitro et in vivo (EHA).

**Jalon(s) :** achèvement du modèle préliminaire en utilisant les données antérieures, modèle testé et affiné en utilisant les données en temps réel du projet.

**Livrables :** code source et sorties du modèle de prédiction bayésien fonctionnel pour le risque de propagation des souches de SRASr-CoV à haut risque.

**PI-TA-01 Tâche 6 :** valider les prédictions du modèle à l'aide de la sérologie du SRASr-CoV provenant d'échantillons humains recueillis précédemment et de données de surveillance (EHA, WIV, Duke-NUS)

**Sous-tâche 6.1 :** concevoir des essais du système d'immunoprécipitation de la luciférase (LIPS) 2 QSO du SARSr-CoV à risque de saut élevé et faible que nous avons caractérisés (WIV). **Sous-tâche 6.2 :** Déterminer la spécificité des essais LIPS par inoculation de protéines recombinantes ou de virus atténués à des lapins (WIV). **Sous-tâche 6.3 :** valider les tests LIPS à l'aide d'échantillons de sérum positifs, LIPS à base de protéine de pointe et neutralisation virale (WIV).

**Tâche secondaire 6.4 :** Tester des sérums humains prélevés antérieurement dans la province du Yunnan

pour évaluer le débordement du QS du SRASr-CoV (VVI). **Sous-tâche 6.5** : valider les prédictions du BNM sur le potentiel de saut de QS0 et identifier les probabilités réelles de propagation à l'aide des données sur les contacts entre chauves-souris et humains (EHA).

**Jalon(s)** : Développement et validation des tests LIPS ; dépistage des sérums ; validation du modèle bayésien.

**Livrables** : données issues de la validation et de l'essai des tests sérologiques ; nouveaux tests sérologiques LIPS pour les QS spécifiques du SRASr-CoV ; code source pour le modèle validé basé sur les preuves de débordement.

**PI-TA-01 Tâche 7** : test expérimental de "stimulation immunitaire à grande échelle" en utilisant des souris batifiées et des colonies de chauves-souris captives (Duke-NUS).

**Sous-tâche 7.1** : stimuler l'interféron (IFN) des chauves-souris en bloquant les régulateurs négatifs de l'IFN spécifiques aux chauves-souris (Duke-NUS). **Tâche 7.2** : activer les voies immunitaires innées spécifiques aux chauves-souris, y compris les voies dépendantes de DNA-STING et de TLR (Duke-NUS). **Tâche secondaire 7.3** : valider le renforcement immunitaire à grande échelle dans un modèle chauve-souris-souris (Duke-NUS). **Sous-tâche 7.4** : tester la modulation immunitaire dans une colonie captive d'Eonycteris sp., en utilisant le virus Malaka et les infections SRASr-CoV (Duke-NUS). **Sous-tâche 7.5** : tester la stimulation immunitaire ciblée chez les Rhinolophus spp. capturés dans la nature (WIV).

**Jalon(s)** : lancement et achèvement de chaque sous-tâche expérimentale.

**Livrables** : données expérimentales ; profilage d'animaux entiers de stimulants immunitaires et cinétique de réponse associée. sélection d'une légende primaire et de deux légendes secondaires à utiliser dans des études ultérieures de provocation virale. modèles animaux démontrés pour la stimulation immunitaire à grande échelle.

**PI-TA-01 Tâche 8** : test expérimental de " stimulation immunitaire ciblée " à l'aide de souris humanisées et de colonies de chauves-souris expérimentales (UNC, NWHC, Duke-NUS, WIV).

**Sous-tâche 8.1** : développer des immunogènes du SRASr-CoV S (UNC). **Sous-tâche 8.2** concevoir et tester des immunogènes glycoprotéiques chimériques de 2e génération chez des souris humanisées (UNC). **Sous-tâche 8.3** : Créer une approche de stimulation immunitaire ciblée par le poxvirus du raton laveur qui sera testée sur des chauves-souris en captivité à Duke-NUS (NWHC). **Sous-tâche 8.4** : tester le renforcement immunitaire ciblé dans une colonie captive d'Eonycteris sp. à l'aide d'infections par le virus Malak et le SRASr-CoV (Duke-NUS). **Sous-tâche 8.5**. Il s'agit d'un renforcement immunitaire ciblé chez les Rhinolophus spp. capturés dans la nature et en captivité (WIV).

**Jalon(s)** : lancement et achèvement de chaque sous-tâche.

**Livrables** : immunogènes chimériques SRASr-CoV S et molécules de stimulation immunitaire vectrices de poxvirus disponibles pour utilisation. preuve de concept pour l'approche de stimulation immunitaire ciblée chez les souris humanisées et les chauves-souris captives.

**PI-TA-01 Tâche 9** : développer et évaluer des méthodes d'administration transcutanée de molécules de stimulation immunitaire (UNC, Duke-NUS, NIWHC).

**Sous-tâche 9.1** : synthétiser des microparticules (MPs) de dextran acétalisé polymère (Ac-DEX) contenant des molécules candidates de stimulation immunitaire à grande échelle et ciblées (UNC, Duke-NUS). **Sous-tâche 9.2** : tester les paramètres des MP in vitro et chez les rongeurs (UNC). **Sous-tâche 9.3** : tester la sécurité des PM chez les chauves-souris du Wisconsin et de Singapour (NWHC, Duke-NUS).

**Jalon(s)** : lancement et achèvement de chaque sous-tâche.

**Produits livrables** : MP d'Ac-DEX contenant des molécules de renforcement immunitaire à grande échelle ou ciblées disponibles pour l'utilisation. données des essais d'efficacité et de sécurité des MP.

**PI-TA-01 Tâche 10** : développer et évaluer des systèmes d'administration pour déployer des molécules de renforcement immunitaire (NWHC, PARC).

**Sous-tâche 10.1** : tester des méthodes d'administration transcutanée utilisant le biomarqueur rhodamine (RB) sur des chauves-souris captives des États-Unis (NWHC). **Sous-tâche 10.2** effectuer des essais sur le terrain de substances d'administration marquées à la RB

sur des chauves-souris sauvages des États-Unis (NWHC) **Sous-tâche 10.3** mettre au point un prototype de dispositif d'atomisation par extension de filament (FEA) (PARC). **Sous-tâche 10.4:** Essayer le dispositif FEA en utilisant le RB sur des chauves-souris captives des États-Unis (NWHC).

**Jalon(s)** : lancement et achèvement de chaque sous-tâche.

**Livrables** : données de l'expérience d'administration transcutanée sur des chauves-souris captives et sauvages. prototype du dispositif FEA. preuve de concept du système d'administration du dispositif FEA.

## PHASE II :

**PII-TA-01 Tâche 1** (suite de la PI-TA-01 Tâche 2) : mise à jour de l'application "risque de propagation virale spatiale" basée sur des expériences de laboratoire et de terrain (EHA).

**Sous-tâche 1.1** : intégration des informations sur le risque pour les espèces de chauves-souris à partir des résultats de laboratoire et de terrain (EHA).

**Sous-tâche 1.2** : intégration d'algorithmes de classement des risques à l'aide des caractéristiques de géolocalisation et des caractéristiques des agents pathogènes hôtes (EHA). (EHA). **Sous-tâche 1.3** : établir un lien entre les espèces hôtes et les données sur la diversité virale provenant du projet et de données antérieures (EHA).

**Jalon(s)** : lancement et achèvement de chaque sous-tâche.

**Livrables** : prototype d'application fonctionnelle qui affiche des informations par classement des agents pathogènes, classement des espèces de chauves-souris et classement géographique.

**PII-TA-01 Tâche 2 (suite de la tâche 5 de la PI-TA-01)** : construire et tester des modèles de réseaux bayésiens pour prédire le potentiel de débordement génotype-phénotype des souches de SARSr-CoV à haut risque (EHA).

**Sous-tâche 2.1** : estimer les taux de mutation et de recombinaison intra et interspèces dans la population de SARSr-CoV (EHA). **Sous-tâche 2.2** simuler l'évolution vers l'avant pour prédire les SQ futurs et non échantillonnés (EHA).

**Sous-tâche 2.3** : faire des prédictions sur un léger débordement futur de QS à haut risque (EHA).

**Jalon(s)** : lancement et achèvement de chaque sous-tâche.

**Livrables** : code source et sorties du modèle fonctionnel. prédiction des futures variantes de QS. identification des QS à haut risque SARSr-CoV par un modèle d'apprentissage machine en réseau.

**PII-TA-01 Tâche 3 (suite du PI-TA-02-10)** : développer et évaluer des systèmes de livraison pour déployer des molécules de renforcement immunitaire (NWHC, PARC).

**Sous-tâche 3.1** concevoir et optimiser l'installation actionnée par le mouvement et le temps pour le prototype FEA (PARC).

**Sous-tâche 3.2** : Effectuer des essais sur le terrain d'une substance d'administration marquée RB en utilisant un prototype FEA actionné par le mouvement sur des chauves-souris sauvages dans le Wisconsin (PARC, NWHC).

**Jalon(s)** : lancement et achèvement de chaque sous-tâche.

**Livrables** : installation optimisée par FEA actionnée par le mouvement et le temps. preuve de concept FEA d'administration de substances marquées au RB sur des chauves-souris sauvages.

**PII-TA-01 Tâche 4** : construire et tester des modèles de circulation dynamique pour optimiser la stratégie de déploiement.

**Sous-tâche 4.1** : élaborer un modèle stochastique robuste de processus SIR avec immigration/émigration et taux de contact non linéaire flexible entre les chauves-souris (EHA). **Sous-tâche 4.2** : Adapter le modèle SIR 2 aux données d'échantillonnage de la grotte d'essai du Yunnan en utilisant un cadre de processus de Markov partiellement observable et valider par une validation croisée temporelle (EHA). **Sous-tâche 4.3** : simuler la circulation virale dans le cadre d'une série de scénarios de déploiement plausibles pour le déploiement dans les grottes d'essai (EHA).

**Sous-tâche 4.4** : tester la robustesse des stratégies de déploiement dans des conditions générales.

**Jalon(s)** : lancement et achèvement de chaque sous-tâche.

**Livrables** : code source et résultats des modèles de circulation dynamique ; scénario optimisé pour le déploiement.

**PII-TA-01 Tâche 5** : démontrer l'exactitude des modèles de risque/prévention puis déployer les méthodes d'administration de molécules les plus efficaces pour supprimer l'excrétion virale dans les colonies de chauves-souris de plusieurs espèces des grottes de la province de Yunann (EHA, PARC, NWHC, Duke-NUS, UNC).

**Sous-tâche 5.1** : identifier les sites spécifiques (points d'entrée, points de sortie), identifier le point d'aérosolisation automatique FEA, affiner le plan de déploiement (EHA, WIV, NWHC, Duke-NUS, UNC). **Sous-tâche 5.2** : effectuer une surveillance virale des chauves-souris dans une grotte du site d'essai et dans deux grottes témoins de notre complexe de grottes afin d'évaluer les données de base pendant 4 mois avant le déploiement de l'expérience de validation du concept (EHA, consultant Zhu, WIV). **Sous-tâche 5.3** : mener une expérience de déploiement de la plupart des molécules immunostimulantes et des techniques d'administration via le mécanisme d'aérosolisation de la FEA dans une grotte test et deux grottes témoins du Yunnan, en Chine (PARC, EHA, WIV). **Sous-tâche 5.4** : effectuer une surveillance virale des chauves-souris dans une grotte du site d'essai et dans deux grottes témoins pendant 4 mois après le déploiement (EHA, consultant Zhu, WIV). **Tâche secondaire 5.5** : évaluer l'efficacité de l'essai de validation du concept (EHA, UNC, DNUS).

**Jalon(s)** : identification de sites spécifiques ; lancement et achèvement de l'essai dans le cadre des sous-tâches 5.2-5.5.

**Livrables** : données de base sur l'immunologie et l'excrétion virale de la population étudiée. preuve de concept du déploiement de l'intervention biologique. mesures post-déploiement pour la modulation immunitaire et l'excrétion virale dans les populations étudiées. rapport sur l'efficacité de la preuve de concept.

## Section II H. CALENDRIER ET JALONS

voir tableau 2 calendriers et jalons

## Section II I. PLAN DE TRANSITION PREEMPT

La technologie de ce projet sera transférée à de multiples utilisateurs potentiels au cours des deux phases. Les partenaires PARC et le National Wildlife Health Center de l'USGS commenceront à planifier la transition de l'équipement de déploiement des aérosols dans les 12 mois suivant la phase 1, en incluant des clients gouvernementaux tels que le DoD et l'USGS (pour le contrôle des maladies liées aux chauves-souris) et d'éventuels fabricants. Les droits de propriété intellectuelle pour ces efforts seront négociés avec le DARPA. Avant l'achèvement de la phase 1, des panels de nouveaux virus entièrement séquencés, des modèles in silico pour la prédiction des pandémies et des modèles animaux qui pourraient être utilisés pour évaluer les thérapies seront partagés avec le DARPA et feront l'objet d'un accord de collaboration en vue d'une distribution précoce aux utilisateurs du DoD tels que la communauté médicale du DoD, d'autres agences du gouvernement américain et, finalement, seront mis à la disposition du public. Nous n'avons pas l'intention de breveter ou de restreindre la propriété intellectuelle sur ces informations, à moins que cela ne soit demandé par la DARPA ou par un partenaire de projet et approuvé par la DARPA. La technologie proposée, qui sera déployée et évaluée de manière expérimentale au cours de la phase 2, sera partagée avec la DARPA et fera l'objet d'un accord de collaboration en vue d'une distribution rapide aux utilisateurs du ministère de la défense, tels que la communauté médicale du ministère de la défense et d'autres agences gouvernementales américaines.

PARC, en tant que partenaire de l'industrie privée (grande entreprise), est une filiale à part entière de Xerox Corporation et s'engage à commercialiser la technologie FEA par le biais de licences de propriété intellectuelle pour différents espaces d'application à différents partenaires commerciaux. PARC a engagé et continuera à engager des licenciés potentiels (OEM) dans les domaines de la biotechnologie et de la biomédecine pour une éventuelle transition de la technologie de livraison ciblée potentiellement développée dans DEFUSE. Le PARC dispose déjà de réseaux de relations commerciales dans le domaine de la biotechnologie et de la biomédecine, aussi bien de grandes entreprises (fortune 500, fortune 1000) que de petites entreprises et de start-ups qui pourraient être des partenaires de transition pour l'AÉF en tant que dispositif d'administration de médicaments à grande échelle et sur une grande surface. En outre, en

**Table 2. Schedule & Milestones**

Task #	Task Name/Milestones	Organization	Phase I Y1				Phase I Y2				Phase II OY1				OY2	
			Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2
<b>Ph-Task 1</b>	<b>Longitudinal sampling and surveillance</b>															
	1.1 SACUC and ACURO approval / Permits obtained	EHA														
	1.2 Invasive and non-invasive mortality specimen collection / > 2,000 specimens collected	EHA (Zhu)														
	1.3 Bat connectivity and roost fidelity study / All bats PIT tagged	EHA (Zhu)														
<b>Ph-Task 2</b>	<b>Assess bat home ranges / Bat transmitters installed; data collected</b>	EHA (Zhu)														
	1.5 Real-time bat population monitoring / Frequency tripartite; data collected	EHA (Zhu)														
	1.6 Develop and maintain project database / Database built & project field data entered	EHA														
	<b>Conduct spillover risk models</b>	EHA														
<b>Ph-Task 3</b>	<b>Laboratory analysis of SARS-CoV OS</b>															
	3.1 PCR screening of bat specimens / Prevalence estimated; initial CoV seq data generated	WV														
	3.2 Sequence SARS-CoV spike proteins / Genetic map generated and made available	WV														
	3.3 Develop recombinant SARS-CoV viruses / Novel recombinants generated and released	WV														
<b>Ph-Task 4</b>	<b>Experimental assays of SARS-CoV OS</b>															
	4.1 Pre-screen SARS-CoV via viral titers / List of pre-screened OS using plaque models and mutations	UNC														
	4.2 SARS-CoV chronic virus testing in cell lines / In vivo cell line experiments designed; data available	UNC														
	4.3 In vivo pathogenesis in BALB/c transgenic mice / Mouse experiments completed; data available	UNC														
<b>Ph-Task 5</b>	<b>Build and test Bayesian genotype-phenotype network models</b>															
	5.1 Use prior data to guide OS selection for characterization / Protein model developed; source code available	EHA														
	5.2 Update model predictions using real-time data / Model refined and validated w/ experimental data	EHA														
	5.3 Validate model predictions using human spillover evidence	WV														
<b>Ph-Task 6</b>	<b>Design LPS assays to SARS-CoV we have characterized / Novel LPS assays developed</b>	WV														
	6.1 Determine LPS assays specificity / Specifically tested in wild model and data made available	WV														
	6.2 Validate LPS assays using positive laboratory samples / Assays validated and data made available	WV														
	6.3 Test irrelevantly collected human sera for SARS-CoV spillover / Previous-collected human sera screened	WV														
<b>Ph-Task 7</b>	<b>Validate BMM predictions using bat-human contact data / Bayesian network model externally validated</b>	EHA														
	7.1 Block bat-specific sN negative regulators / Experiments completed; data made available	DNUS														
	7.2 Activate dendritic bat-specific innate immune pathways / Experiments and immune profiling completed	DNUS														
	7.3 Test broadscale immune boosting in bat-human model / Experiments completed; data made available	DNUS														
<b>Ph-Task 8</b>	<b>Test broadscale immune boosting in Erycinia sp. / Experiments completed; data made available</b>	DNUS														
	7.5 Test broadscale immune boosting in Rhinoglyphus sp. / Experiments completed; data made available	WV														
<b>Ph-Task 9</b>	<b>Testing of targeted immune boosting approach</b>															
	7.6 Test broadscale immune boosting in Rhinoglyphus sp. / Experiments completed; data made available	UNC														

Project DEFUSE

HR0011850017 EcoHealth Alliance (Daszak)

TA2 Phase I	8.0	Develop contract SARS-CoV-2 immunogens / Clonotypes developed and made available for experiments	JNC
	8.1	Test chronic immunogens in humanized mice / Experiments completed, data made available	JNC
	8.2	Create spore-pore virus retained immune boosting approach / Experimental retention complete	JNC-C
	8.3	Test targeted immune boosting in ferrets / Experiments completed, data made available	DMUB
	8.4	Test targeted immune boosting in ferretina app / Experiments completed, data made available	JNY
Ph-Task 8	8.5	Develop immunization delivery methods	JNC, DMUB, MASC
	8.6	Optimize Ad-2E1 MPs / Monoparticle synthesis & immune boosting molecules	JNC, DMUB
	8.7	Test MP vectors in wild and B. strains / Experiments completed in rabbits, data made available	JNC, DMUB
	8.8	Test MR safety in both B26 and B26plus / Safety experiments completed in bats, data made available	JNC-C, DMUB
	8.9	Develop delivery systems for immune boosting molecules	JNC-C, MASC
Ph-Task 10	10.1	Test B26-marked substrates in captive bats / Experiments completed in captive bats, data available	JNC-C
	10.2	Test B26-marked substrates in wild bats / Experiments completed in wild bats, data available	JNC-C
	10.3	Develop prototype FEA device / Prototype FEA device developed to deploy immune boosting molecules	JNY-C
	10.4	Test FEA device using IB in US captive bats / Prototype FEA device tested on captive bats	JNY-C
	10.5	Update 'spatial vital software vital' app	JNY
Ph-Task 1	1.1	Integrate laboratory and field results / Real species risk metrics from lab and field incorporated in model	JNY
	1.2	Incorporate spatial and host pathogen characteristics in modeling / Models and hazard study updated	JNY
	1.3	Link host species to vital diversity data / Vital data integrated into four-pathogen software models	JNY
	1.4	Build and test Bayesian genotype-phenotype network models	JNY
	1.5	Evaluate time- and time-species mutation and recombination rates / Recombination analysis completed	JNY
Ph-Task 2	2.1	Simulate forward evolution to predict future and unsequenced OS / IUP of predicted future OS variants	JNY
	2.2	Make predictions of likely future high-risk OS / High-risk SARS-CoV-2s identified by model	JNY
	2.3	Develop delivery systems for immune boosting molecules	JNY-C, JNY-C
	2.4	Design and optimize facility for FEA prototype / Develop station- and time-activated delivery system	JNY-C
	2.5	Conduct field trials of RB in US wild bats / Field trials completed on wild bats, data available	JNY-C, JNY-C
Ph-Task 4	4.1	Build and test models to optimize deployment strategy	JNY
	4.2	Develop robust touchpoints: SIR process model / Model developed including bat contact rates	JNY-C, JNY-C
	4.3	Test SIR model to sampling data / Test SIR model using marker proteins: temporal cross-validation	JNY-C
	4.4	Simulate deployment scenarios / Develop scenario model simulations to optimize deployment	JNY
	4.5	Test robustness of deployment strategies / Various deployment scenarios tested & data specific data	JNY
Ph-Task 8	8.1	Demonstrate accuracy of delivery models and deploy methods	JNY
	8.2	Identify specific sites and time for deployment plan / Identify specific sites within states for deployment	JNY
	8.3	Conduct baseline and surveillance pilot deployment / Complete 4 month pre-deployment surveillance	JNY, WV
	8.4	Run deployment experiment / Deploy immune boosting intervention at one test state site and two control	JNY, DMUB, MASC, JNY-C
	8.5	Conduct vital surveillance pilot deployment / Complete 4 month post-deployment surveillance	JNY, WV
8.6	Assess efficacy of proof-of-concept trial / Data analyzed including pre- and post- lab accessing data	JNY, JNC, DMUB	

collaboration avec notre réseau étendu de partenaires DEFUSE et avec le DARPA, nous identifierons davantage les besoins gouvernementaux existants pour notre technologie d'administration, en particulier dans la gestion de la santé de la faune (en collaboration avec l'EHA et l'USGS-NWHC) et dans la suppression des menaces émergentes (en collaboration avec des agences gouvernementales telles que le CDC). PARC, nous tirerons parti de ces connaissances pour élaborer un plan de commercialisation fondé sur les besoins avec des partenaires potentiels.

Les partenaires du projet DEFUSE sont issus du monde universitaire, du gouvernement, de l'industrie privée et d'institutions privées à but non lucratif. Ils développeront un plan de transition cohérent pour les résultats de la recherche, les données et toute technologie développée dans le cadre de ce travail.

## Section II J. PLAN PREEMPT D'ATTENUATION DES RISQUES

### **Risques : sécurité du personnel, sécurité biologique, atténuation des risques pour la santé publique et la sécurité des animaux**

**utilisation et sécurité des animaux** : tous les travaux concernant les chauves-souris sauvages seront menés en Chine par le personnel d'EcoHealth Alliance et l'institut de virologie de Wuhan. Les techniques de capture et d'échantillonnage ont été préalablement approuvées par l'IACUC de l'école de médecine vétérinaire de l'université de Tufts dans le cadre d'une bourse NIH NIAID (Daszak, PI). les travaux expérimentaux utilisant des chauves-souris ou des souris transgéniques seront menés dans le laboratoire BSL-3 du WIV, du Dike-NUS ou du NWHC. chaque institut partenaire doit demander et obtenir l'approbation de la recherche sur les animaux auprès de son IACUC respectif. tous les travaux sur les animaux menés par EcoHealth aliens en Chine seront supervisés par l'IACUC du WIV et l'IACUC de Tufts. chaque institut partenaire sera responsable de la formation et de la sécurité de son personnel de laboratoire, ce qui sera documenté par EcoHealth Alliance. chaque partenaire a une grande expérience et un dossier de sécurité avec les techniques et les procédures pour les expériences sur les animaux de laboratoire décrites dans ce protocole. **sécurité sur le terrain** : les chauves-souris en liberté seront capturées à l'aide d'un filet japonais ou d'un piège à harpe. le système de filet est surveillé par deux personnes pendant toute la période de capture et les chauves-souris sont retirées du filet dès qu'elles s'y empêtrent afin de minimiser le stress et de prévenir les blessures. d'après notre expérience, une équipe de trois personnes peut détenir et traiter en toute sécurité un maximum de 20 à 30 chauves-souris par période de piégeage. La durée du piégeage dépendra du taux de capture. les chauves-souris sont placées dans un petit sac en tissu et suspendues à une branche ou à un poteau jusqu'à ce que des échantillons soient prélevés. les chauves-souris sont retenues pendant un maximum de six heures. le personnel de terrain devra effectuer une évaluation des risques avant chaque période d'échantillonnage sur le terrain et sur chaque site.

**équipement de biosécurité et de protection individuelle** : des vêtements spécifiques seront portés sur le terrain pour protéger contre les blessures dues aux morsures ou aux éraflures, ainsi que des gants en nitrile (double épaisseur), un respirateur N95 et des lunettes de sécurité ou un écran facial pour retirer les chauves-souris d'un filet ou d'un piège et pour les échantillonner. Les vêtements extérieurs et tout l'équipement seront contaminés au virkon sur le site de terrain et les déchets biologiques dangereux seront contenus dans des sacs à risques biologiques et des conteneurs pour objets tranchants et incinérés dans les installations du WIV ou du Yunnan. Le personnel portera des combinaisons Tyvek imperméables à l'eau, des bottes en caoutchouc et des respirateurs à adduction d'air comprimé (PAPR) lorsqu'il entrera dans la grotte pour prélever des échantillons ou collecter des images (par exemple, **Tout le personnel de terrain sera immunisé contre la rage et présentera un titre de protection à jour (dans les six mois) conformément aux directives du CDC.** Le personnel non formé aux EPI et non immunisé contre la rage ne sera pas autorisé à travailler avec les chauves-souris ou à pénétrer dans les grottes étudiées. L'utilisation du LIDAR pour cartographier les grottes étudiées sera effectuée par du personnel formé ayant une expérience de la spéléologie.

**risque pour le grand public** : les travaux proposés présentent un risque minime pour le grand public, car l'échantillonnage sera effectué près des sites de la grotte et non dans des zones peuplées. notre équipe possède une vaste expérience.



**Section II K. IMPLICATIONS ETHIQUES, LEGALES, SOCIETALES**

Toutes les activités de ce projet seront menées dans le strict respect des lois américaines et chinoises, avec l'autorisation du gouvernement chinois et des autorités locales de mener des travaux sur le terrain. nous mènerons des actions de sensibilisation auprès des autorités locales chargées de la faune et des chefs culturels afin que le public comprenne ce que nous faisons et pourquoi nous le faisons, en particulier en raison de la pratique courante de la consommation de chauves-souris dans la région (**voir également la stratégie d'atténuation des risques**). ces agents n'ont pas été testés sur l'homme, mais leur innocuité a été démontrée dans divers modèles animaux de laboratoire. le risque associé à l'exposition de l'homme au fluide contenant les MP est minime. nous expliquerons les stratégies d'atténuation des risques et les données de sécurité qui ont été prises en compte lors de l'élaboration de cette étude et comment celle-ci pourrait être bénéfique pour les communautés locales. il existe également un avantage potentiel pour les communautés locales si les agents sont efficaces pour réduire l'excrétion virale. l'impact sociétal plus large de ce projet pourrait être important, car l'immunisation de la faune contre les zoonoses virales a été limitée jusqu'à présent. Cependant, cela pourrait ouvrir un champ dans lequel les réservoirs d'animaux quatre agents connus à haut risque pourraient être "immunisés" à des périodes de l'année à haut risque, ce qui pourrait réduire le nombre ou l'ampleur des épidémies humaines. cela ajouterait une contre-mesure précieuse deux études écologiques qui ont élucidé le moment de la propagation virale des réservoirs d'animaux deux populations humaines ou d'animaux d'élevage. nous élaborerons un plan visant à garantir que les détails des technologies développées et testées pour le déploiement d'agents biologiques de modulation immunitaire soient mis à la disposition du public afin qu'ils puissent être adaptés à d'autres types d'interventions médicales et d'agents pathogènes. il peut y avoir des avantages en termes de conservation, les réservoirs de la faune sauvage étant considérés comme moins menaçants pour la santé publique et, par conséquent, il peut y avoir moins d'incitation à exterminer ou à extirper les populations locales en tant que mesure de santé publique - en particulier si une option permettant de réduire le risque de propagation par un effort de vaccination de la faune sauvage est disponible.

## Section III

## BIBLIOGRAPHY

- 1 Anthony, S. J. *et al.* Global patterns in coronavirus diversity. *Virus Evolution* **3**, doi:10.1093/ve/vex012 (2017).
- 2 Ge, X. Y. *et al.* Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature* **503**, 535-538, doi:10.1038/nature12711 (2013).
- 3 Li, W. D. *et al.* Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* **310**, 676-679, doi:10.1126/science.1118391 (2005).
- 4 Quan, P.-L. *et al.* Identification of a severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in a leaf-nosed bat in Nigeria. *MBio* **1**, e00208-00210 (2010).
- 5 Ar Gouilh, M. *et al.* SARS-CoV related Betacoronavirus and diverse Alphacoronavirus members found in western old-world. *Virology* **517**, 88-97, doi:<https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.01.014> (2018).
- 6 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**, 11336-11349, doi:10.1128/JVI.00650-10 (2010).
- 7 Olival, K. J. *et al.* Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature* **546**, 646-650 (2017).
- 8 Sheahan, T. P. *et al.* Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses. *Science translational medicine* **9**, eaal3653 (2017).
- 9 Anthony, S. *et al.* Further evidence for bats as the evolutionary source of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *MBio* **8**, e00373-00317 (2017).
- 10 Cockrell, A. S. *et al.* A mouse model for MERS coronavirus-induced acute respiratory distress syndrome. *Nature microbiology* **2**, 16226 (2017).
- 11 Menachery, V. D. *et al.* SARS-like WIV1-CoV poised for human emergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, 3048-3053, doi:10.1073/pnas.1517719113 (2016).
- 12 Menachery, V. D. *et al.* A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nature Medicine* **21**, 1508-1513, doi:10.1038/nm.3985 (2015).
- 13 Wang, N. *et al.* Serological Evidence of Bat SARS-Related Coronavirus Infection in Humans, China. *Virologica Sinica*, doi:10.1007/s12250-018-0012-7 (2018).
- 14 Zhou, P. *et al.* Fatal swine acute diarrhea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature In press* (2018).
- 15 Zhang, G. *et al.* Comparative analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity. *Science* **339**, 456-460, doi:10.1126/science.1230835 (2013).
- 16 Xie, J. *et al.* Dampened STING-Dependent Interferon Activation in Bats. *Cell host & microbe* (2018).
- 17 Zhou, P. *et al.* Contraction of the type I IFN locus and unusual constitutive expression of IFN- $\alpha$  in bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 2696-2701 (2016).

- 18 Kugel, D. *et al.* Intranasal Administration of Alpha Interferon Reduces Seasonal Influenza A Virus Morbidity in Ferrets. *Journal of Virology* **83**, 3843-3851, doi:10.1128/jvi.02453-08 (2009).
- 19 Zhao, J. *et al.* Intranasal treatment with poly (I- C) protects aged mice from lethal respiratory virus infections. *Journal of virology* **86**, 11416-11424 (2012).
- 20 Smith, L. M. *et al.* Interferon- $\beta$  therapy prolongs survival in rhesus macaque models of Ebola and Marburg hemorrhagic fever. *The Journal of infectious diseases* **208**, 310-318 (2013).
- 21 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. *Journal of Virology* **90**, 6573-6582, doi:10.1128/jvi.03079-15 (2016).
- 22 Deng, X. *et al.* A chimeric virus-mouse model system for evaluating the function and inhibition of papain-like proteases of emerging coronaviruses. *Journal of virology* **88**, 11825-11833 (2014).
- 23 Pallesen, J. *et al.* Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, E7348-E7357 (2017).
- 24 Coleman, C. M. *et al.* Purified coronavirus spike protein nanoparticles induce coronavirus neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* **32**, 3169-3174 (2014).
- 25 Coleman, C. M. *et al.* MERS-CoV spike nanoparticles protect mice from MERS-CoV infection. *Vaccine* **35**, 1586-1589, doi:10.1016/j.vaccine.2017.02.012 (2017).
- 26 Du, L. *et al.* A 219-mer CHO-expressing receptor-binding domain of SARS-CoV S protein induces potent immune responses and protective immunity. *Viral immunology* **23**, 211-219 (2010).
- 27 Sheahan, T. *et al.* Successful vaccination strategies that protect aged mice from lethal challenge from influenza virus and heterologous severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of virology* **85**, 217-230 (2011).
- 28 Agnihothram, S. *et al.* A mouse model for Betacoronavirus subgroup 2c using a bat coronavirus strain HKU5 variant. *MBio* **5**, e00047-00014 (2014).
- 29 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**, 19944-19949 (2008).
- 30 Rocke, T. E. *et al.* Sylvatic plague vaccine partially protects prairie dogs (*Cynomys* spp.) in field trials. *Ecohealth* **14**, 438-450 (2017).
- 31 Stading, B. *et al.* Protection of bats (*Eptesicus fuscus*) against rabies following topical or oronasal exposure to a recombinant raccoon poxvirus vaccine. *Plos Neglect. Trop. Dis.* **11**, doi:10.1371/journal.pntd.0005958 (2017).
- 32 Stading, B. R. *et al.* Infectivity of attenuated poxvirus vaccine vectors and immunogenicity of a raccoonpox vectored rabies vaccine in the Brazilian Free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*). *Vaccine* **34**, 5352-5358, doi:10.1016/j.vaccine.2016.08.088 (2016).
- 33 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. *Journal of Virology* **90**, 3253-3256, doi:10.1128/jvi.02582-15 (2016).

- 34 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 pathogens* **13**, e1006698, doi:10.1371/journal.ppat.1006698 (2017).
- 35 Yuan, J. *et al.* Intraspecies diversity of SARS-like coronaviruses in *Rhinolophus sinicus* and its implications for the origin of SARS coronaviruses in humans. *Journal of general virology* **91**, 1058-1062 (2010).
- 36 Li, W. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* **426**, 450 (2003).
- 37 Memish, Z. A. *et al.* Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Bats, Saudi Arabia. *Emerging Infectious Diseases* **19**, 1819-1823, doi:10.3201/eid1911.131172 (2013).
- 38 Walker, F. M., Williamson, C. H., Sanchez, D. E., Sobek, C. J. & Chambers, C. L. Species from feces: order-wide identification of Chiroptera from guano and other non-invasive genetic samples. *PloS one* **11**, e0162342 (2016).
- 39 Hayman, D. T. S., Cryan, P. M., Fricker, P. D., Dannemiller, N. G. & Freckleton, R. Long-term video surveillance and automated analyses reveal arousal patterns in groups of hibernating bats. *Methods in Ecology and Evolution* **8**, 1813-1821, doi:doi:10.1111/2041-210X.12823 (2017).
- 40 Azmy, S. N. *et al.* Counting in the dark: Non-intrusive laser scanning for population counting and identifying roosting bats. *Scientific reports* **2**, 524 (2012).
- 41 Shazali, N. *et al.* Assessing Bat Roosts Using the LiDAR System at Wind Cave Nature Reserve in Sarawak, Malaysian Borneo. *Acta Chiropterologica* **19**, 199-210 (2017).
- 42 McFarlane, D. A. *et al.* Terrestrial LiDAR-based automated counting of swiftlet nests in the caves of Gomantong, Sabah, Borneo. *International Journal of Speleology* **44**, 191 (2015).
- 43 Harris, D. J. Generating realistic assemblages with a joint species distribution model. *Methods in Ecology and Evolution* **6**, 465-473 (2015).
- 44 Luo, J. *et al.* Bat conservation in China: should protection of subterranean habitats be a priority? *Oryx* **47**, 526-531 (2013).
- 45 Karger, D. N. *et al.* Climatologies at high resolution for the earth's land surface areas. *Scientific data* **4**, 170122 (2017).
- 46 Phelps, K., Jose, R., Labonite, M. & Kingston, T. Correlates of cave-roosting bat diversity as an effective tool to identify priority caves. *Biological Conservation* **201**, 201-209 (2016).
- 47 IUCN. Vol. 2017-1 (2017).
- 48 GBIF.org. GBIF Occurrence Download.
- 49 Allen, T. *et al.* Global hotspots and correlates of emerging zoonotic diseases. *Nature Communications* **8**, 1124 (2017).
- 50 Anthony, S. J. *et al.* A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. *mBio* **4**, e00598-00513 (2013).
- 51 Wildlife Acoustics. *Wildlife Acoustics Bioacoustic Monitoring System*, <[https://www.wildlifeacoustics.com/products/echo-meter-touch-2?gclid=EAAlQobChMI3qnOmK\\_o2QIVDlcNCh1KRwZuEAAAYASAAEgIvVPD\\_BwE](https://www.wildlifeacoustics.com/products/echo-meter-touch-2?gclid=EAAlQobChMI3qnOmK_o2QIVDlcNCh1KRwZuEAAAYASAAEgIvVPD_BwE)> (2018).
- 52 Mac Aodha, O. *et al.* Bat Detective-Deep Learning Tools for Bat Acoustic Signal Detection. *bioRxiv*, 156869 (2017).

- 53 Anthony, S. J. *et al.* Coronaviruses in bats from Mexico. *Journal of General Virology* **94**, 1028-1038 (2013).
- 54 Huynh, J. *et al.* Evidence Supporting a Zoonotic Origin of Human Coronavirus Strain NL63. *Journal of Virology* **86**, 12816-12825, doi:10.1128/jvi.00906-12 (2012).
- 55 Donaldson, E. F. *et al.* Systematic Assembly of a Full-Length Infectious Clone of Human Coronavirus NL63. *Journal of Virology* **82**, 11948-11957, doi:10.1128/jvi.01804-08 (2008).
- 56 Scobey, T. *et al.* Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 16157-16162, doi:10.1073/pnas.1311542110 (2013).
- 57 Yount, B. *et al.* Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 12995-13000, doi:10.1073/pnas.1735582100 (2003).
- 58 Sheahan, T. *et al.* Mechanisms of zoonotic severe acute respiratory syndrome coronavirus host range expansion in human airway epithelium. *Journal of Virology* **82**, 2274-2285, doi:10.1128/jvi.02041-07 (2008).
- 59 Kirchdoerfer, R. N. *et al.* Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature* **531**, 118-121, doi:10.1038/nature17200 (2016).
- 60 Gui, M. *et al.* Cryo-electron microscopy structures of the SARS-CoV spike glycoprotein reveal a prerequisite conformational state for receptor binding. *Cell Res.* **27**, 119-129, doi:10.1038/cr.2016.152 (2017).
- 61 Li, F. Structural analysis of major species barriers between humans and palm civets for severe acute respiratory syndrome coronavirus infections. *Journal of Virology* **82**, 6984-6991, doi:10.1128/jvi.00442-08 (2008).
- 62 Li, F., Li, W. H., Farzan, M. & Harrison, S. C. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science* **309**, 1864-1868, doi:10.1126/science.1116480 (2005).
- 63 Huang, I. C. *et al.* SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect ACE2-expressing cells. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 3198-3203, doi:10.1074/jbc.M508381200 (2006).
- 64 Yang, Y. *et al.* Receptor usage and cell entry of bat coronavirus HKU4 provide insight into bat-to-human transmission of MERS coronavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 12516-12521, doi:10.1073/pnas.1405889111 (2014).
- 65 Earnest, J. T. *et al.* The tetraspanin CD9 facilitates MERS-coronavirus entry by scaffolding host cell receptors and proteases. *PLoS pathogens* **13**, doi:10.1371/journal.ppat.1006546 (2017).
- 66 Rockx, B. *et al.* Escape from Human Monoclonal Antibody Neutralization Affects In Vitro and In Vivo Fitness of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Journal of Infectious Diseases* **201**, 946-955, doi:10.1086/651022 (2010).
- 67 Zeng, L. P. *et al.* Cross-neutralization of SARS coronavirus-specific antibodies against bat SARS-like coronaviruses. *Science China-Life Sciences* **60**, 1399-1402, doi:10.1007/s11427-017-9189-3 (2017).

- 68 Bertram, S. *et al.* Cleavage and Activation of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein by Human Airway Trypsin-Like Protease. *Journal of Virology* **85**, 13363-13372, doi:10.1128/JVI.05300-11 (2011).
- 69 Simmons, G., Zmora, P., Gierer, S., Heurich, A. & Pöhlmann, S. Proteolytic activation of the SARS-coronavirus spike protein: Cutting enzymes at the cutting edge of antiviral research. *Antiviral research* **100**, 605-614, doi:10.1016/j.antiviral.2013.09.028 (2013).
- 70 Reinke, L. M. *et al.* Different residues in the SARS-CoV spike protein determine cleavage and activation by the host cell protease TMPRSS2. *PLoS ONE* **12**, e0179177, doi:10.1371/journal.pone.0179177 (2017).
- 71 Lu, G. W., Wang, Q. H. & Gao, G. F. Bat-to-human: spike features determining 'host jump' of coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and beyond. *Trends in Microbiology* **23**, 468-478, doi:10.1016/j.tim.2015.06.003 (2015).
- 72 Walls, A. C. *et al.* Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, 11157-11162, doi:10.1073/pnas.1708727114 (2017).
- 73 Li, F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual review of virology* **3**, 237-261, doi:10.1146/annurev-virology-110615-042301 (2016).
- 74 Duckert, P., Brunak, S. & Blom, N. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Engineering Design & Selection* **17**, 107-112, doi:10.1093/protein/gzh013 (2004).
- 75 Tian, S., Huajun, W. & Wu, J. Computational prediction of furin cleavage sites by a hybrid method and understanding mechanism underlying diseases. *Scientific Reports* **2**, 261, doi:10.1038/srep00261 (2012).
- 76 Shih, Y.-P. *et al.* Identifying Epitopes Responsible for Neutralizing Antibody and DC-SIGN Binding on the Spike Glycoprotein of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Journal of Virology* **80**, 10315-10324, doi:10.1128/JVI.01138-06 (2006).
- 77 Han, D. P., Lohani, M. & Cho, M. W. Specific Asparagine-Linked Glycosylation Sites Are Critical for DC-SIGN- and L-SIGN-Mediated Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Entry. *Journal of Virology* **81**, 12029-12039, doi:10.1128/JVI.00315-07 (2007).
- 78 Nagarajan, R., Scutari, M. & Lèbre, S. *Bayesian Networks in R*. (Springer, 2013).
- 79 Landuyt, D. *et al.* A review of Bayesian belief networks in ecosystem service modelling. *Environmental Modelling & Software* **46**, 1-11, doi:<https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2013.03.011> (2013).
- 80 Li, W. *et al.* Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* **310**, 676-679, doi:10.1126/science.1118391 (2005).
- 81 Li, Y. *et al.* Antibodies to Nipah or Nipah-like viruses in bats, China. *Emerg Infect Dis* **14**, 1974-1976, doi:10.3201/eid1412.080359 (2008).
- 82 Drummond, A. J. & Rambaut, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 214 (2007).

- 83 McVean, G., Awadalla, P. & Fearnhead, P. A coalescent-based method for detecting and estimating recombination from gene sequences. *Genetics* **160**, 1231-1241 (2002).
- 84 Wilson, D. J. & McVean, G. Estimating diversifying selection and functional constraint in the presence of recombination. *Genetics* **172**, 1411-1425 (2006).
- 85 Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A. & Muhire, B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus evolution* **1** (2015).
- 86 Petitjean, M. & Vanet, A. VIRAPOPS: a forward simulator dedicated to rapidly evolved viral populations. *Bioinformatics* **30**, 578-580 (2013).
- 87 Ahn, M., Cui, J., Irving, A. T. & Wang, L.-F. Unique Loss of the PYHIN Gene Family in Bats Amongst Mammals: Implications for Inflammasome Sensing. *Scientific Reports* **6**, doi:10.1038/srep21722 (2016).
- 88 Ahn, M., Irving, A. T. & Wang, L. F. Unusual regulation of inflammasome signaling in bats. *Cytokine* **87**, 156-156 (2016).
- 89 Paweska, J. T. *et al.* Lack of Marburg virus transmission from experimentally infected to susceptible in-contact Egyptian fruit bats. *The Journal of infectious diseases* **212**, S109-S118 (2015).
- 90 Paweska, J. T. *et al.* Virological and serological findings in Rousettus aegyptiacus experimentally inoculated with vero cells-adapted hogan strain of Marburg virus. *PLoS one* **7**, e45479 (2012).
- 91 Schuh, A. J. *et al.* Modelling filovirus maintenance in nature by experimental transmission of Marburg virus between Egyptian rousette bats. *Nature communications* **8**, 14446 (2017).
- 92 Cogswell-Hawkinson, A. *et al.* Tacaribe virus causes fatal infection of an ostensible reservoir host, the Jamaican fruit bat. *J Virol* **86**, 5791-5799, doi:10.1128/JVI.00201-12 (2012).
- 93 Zhou, P. *et al.* Unlocking bat immunology: establishment of Pteropus alecto bone marrow-derived dendritic cells and macrophages. *Scientific Reports* **6**, 38597, doi:10.1038/srep38597  
<https://www.nature.com/articles/srep38597#supplementary-information> (2016).
- 94 Farr, B., Gwaltney, J., Adams, K. & Hayden, F. Intranasal interferon-alpha 2 for prevention of natural rhinovirus colds. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **26**, 31-34 (2009).
- 95 Zhang, Q. *et al.* IFNAR2-dependent gene expression profile induced by IFN- $\alpha$  in Pteropus alecto bat cells and impact of IFNAR2 knockout on virus infection. *PLoS ONE* **12**, e0182866, doi:10.1371/journal.pone.0182866 (2017).
- 96 Fuchs, J. *et al.* Evolution and Antiviral Specificities of Interferon-Induced Mx Proteins of Bats against Ebola, Influenza, and Other RNA Viruses. *Journal of Virology* **91**, e00361-00317, doi:10.1128/JVI.00361-17 (2017).
- 97 Kuzmin, L. V. *et al.* Innate Immune Responses of Bat and Human Cells to Filoviruses: Commonalities and Distinctions. *Journal of Virology* **91**, e02471-02416, doi:10.1128/JVI.02471-16 (2017).
- 98 Liang, Y.-Z. *et al.* Cloning, expression, and antiviral activity of interferon  $\beta$  from the Chinese microbat, Myotis davidii. *Virologica Sinica* **30**, 425-432, doi:10.1007/s12250-015-3668-2 (2015).

- 99 Fu, K. & Baric, R. S. Map locations of mouse hepatitis virus temperature-sensitive mutants: confirmation of variable rates of recombination. *Journal of Virology* **68**, 7458-7466 (1994).
- 100 Rockx, B. *et al.* Structural Basis for Potent Cross-Neutralizing Human Monoclonal Antibody Protection against Lethal Human and Zoonotic Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Challenge. *Journal of Virology* **82**, 3220-3235, doi:10.1128/JVI.02377-07 (2008).
- 101 Coughlin, M. M. & Prabhakar, B. S. Neutralizing Human Monoclonal Antibodies to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus: Target, Mechanism of Action and Therapeutic Potential. *Reviews in Medical Virology* **22**, 2-17, doi:10.1002/rmv.706 (2012).
- 102 Bachelder, E. M., Beaudette, T. T., Broaders, K. E., Dashe, J. & Fréchet, J. M. Acetal-derivatized dextran: an acid-responsive biodegradable material for therapeutic applications. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 10494-10495 (2008).
- 103 Broaders, K. E., Cohen, J. A., Beaudette, T. T., Bachelder, E. M. & Fréchet, J. M. Acetalated dextran is a chemically and biologically tunable material for particulate immunotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 5497-5502 (2009).
- 104 Kauffman, K. J. *et al.* Synthesis and characterization of acetalated dextran polymer and microparticles with ethanol as a degradation product. *ACS applied materials & interfaces* **4**, 4149-4155 (2012).
- 105 Chen, N. *et al.* Degradation of acetalated dextran can be broadly tuned based on cyclic acetal coverage and molecular weight. *International journal of pharmaceutics* **512**, 147-157 (2016).
- 106 Jiang, W., Gupta, R. K., Deshpande, M. C. & Schwendeman, S. P. Biodegradable poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Advanced drug delivery reviews* **57**, 391-410 (2005).
- 107 Kanthamneni, N. *et al.* Enhanced stability of horseradish peroxidase encapsulated in acetalated dextran microparticles stored outside cold chain conditions. *International journal of pharmaceutics* **431**, 101-110 (2012).
- 108 Hoang, K. V. *et al.* Acetalated Dextran Encapsulated AR-12 as a Host-directed Therapy to Control Salmonella Infection. *International journal of pharmaceutics* **477**, 334-343, doi:10.1016/j.ijpharm.2014.10.022 (2014).
- 109 Junkins, R. D. *et al.* A robust microparticle platform for a STING-targeted adjuvant that enhances both humoral and cellular immunity during vaccination. *Journal of Controlled Release* **270**, 1-13 (2018).
- 110 Belser, J. A., Katz, J. M. & Tumpey, T. M. The ferret as a model organism to study influenza A virus infection. *Disease models & mechanisms* **4**, 575-579 (2011).
- 111 Davies, Bryan W., Bogard, Ryan W., Young, Travis S. & Mekalanos, John J. Coordinated Regulation of Accessory Genetic Elements Produces Cyclic Di-Nucleotides for *V. cholerae* Virulence. *Cell* **149**, 358-370, doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.053> (2012).
- 112 Chua, K. B. *et al.* A previously unknown reovirus of bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11424-11429, doi:10.1073/pnas.0701372104 (2007).



- 113 Chua, K. B. *et al.* Investigation of a Potential Zoonotic Transmission of Orthoreovirus Associated with Acute Influenza-Like Illness in an Adult Patient. *Plos One* **6**, doi:10.1371/journal.pone.0025434 (2011).
- 114 Tripp, D. W. *et al.* Apparent field safety of a raccoon poxvirus-vectored plague vaccine in free-ranging prairie dogs (*Cynomys* spp.), Colorado, USA. *Journal of wildlife diseases* **51**, 401-410 (2015).
- 115 Slate, D. *et al.* Oral rabies vaccination in North America: opportunities, complexities, and challenges. *Plos Neglect. Trop. Dis.* **3**, e549 (2009).
- 116 Freuling, C. M. *et al.* The elimination of fox rabies from Europe: determinants of success and lessons for the future. *Phil. Trans. R. Soc. B* **368**, 20120142 (2013).
- 117 Tripp, D. W. *et al.* Season and application rates affect vaccine bait consumption by prairie dogs in Colorado and Utah, USA. *Journal of wildlife diseases* **50**, 224-234 (2014).
- 118 Roberts, M. *et al.* Topical and cutaneous delivery using nanosystems. *Journal of Controlled Release* **247**, 86-105 (2017).
- 119 Mishra, D. K., Dhote, V. & Mishra, P. K. Transdermal immunization: biological framework and translational perspectives. *Expert opinion on drug delivery* **10**, 183-200 (2013).
- 120 Ebrahimian, M. *et al.* Co-delivery of Dual Toll-Like Receptor Agonists and Antigen in Poly (Lactic-Co-Glycolic) Acid/Polyethylenimine Cationic Hybrid Nanoparticles Promote Efficient In Vivo Immune Responses. *Frontiers in immunology* **8**, 1077 (2017).
- 121 Karande, P. & Mitragotri, S. Transcutaneous immunization: an overview of advantages, disease targets, vaccines, and delivery technologies. *Annual review of chemical and biomolecular engineering* **1**, 175-201 (2010).
- 122 Unidad, J., Karatay, E., Neelakantan, R., Jose, A. & Johnson, D. M. in *33rd International Conference of the Polymer Processing Society*.
- 123 Oliveira, M. S. N. & McKinley, G. H. Iterated stretching and multiple beads-on-a-string phenomena in dilute solutions of highly extensible flexible polymers. *Physics of Fluids* **17**, 071704, doi:10.1063/1.1949197 (2005).
- 124 Epstein, J. H. *et al.* Nipah virus ecology and infection dynamics in its bat reservoir, *Pteropus medius*, in Bangladesh. *International Journal of Infectious Diseases* **53**, 20-21, doi:10.1016/j.ijid.2016.11.056.
- 125 Borremans, B. *et al.* (Dryad Data Repository, 2016).
- 126 Ionides, E. L., Nguyen, D., Atchadé, Y., Stoev, S. & King, A. A. Inference for dynamic and latent variable models via iterated, perturbed Bayes maps. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 719-724 (2015).
- 127 Jones, K. E. *et al.* Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* **451**, 990-993, doi:10.1038/nature06536 (2008).
- 128 Alagaili, A. N. *et al.* Middle East respiratory syndrome coronavirus infection in dromedary camels in Saudi Arabia. *MBio* **5**, doi:10.1128/mBio.00884-14 (2014).
- 129 Homaira, N. *et al.* Nipah virus outbreak with person-to-person transmission in a district of Bangladesh, 2007. *Epidemiology and Infection* **138**, 1630-1636, doi:10.1017/s0950268810000695 (2010).

- 130 Islam, M. S. *et al.* Nipah Virus Transmission from Bats to Humans Associated with Drinking Traditional Liquor Made from Date Palm Sap, Bangladesh, 2011–2014. *Emerging Infectious Disease journal* **22**, 664, doi:10.3201/eid2204.151747 (2016).
- 131 Olival, K. J. *et al.* Ebola Virus Antibodies in Fruit Bats, Bangladesh. *Emerging Infectious Diseases* **19**, 270-273, doi:10.3201/eid1902.120524 (2013).
- 132 Manning, S. E. *et al.* Human rabies prevention-United states, 2008. *MMWR Recomm Rep* **57**, 1-28 (2008).
- 133 (National Institutes of Health, 2014).

### Section III RELEVANT PAPERS

We are attaching three relevant papers:

- Ge *et al.* (2017). Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 Receptor. *Nature*.
- Menachery *et al.* (2016). SARS-like WIV-CoV poised for human emergence. *PNAS*.
- Zhou *et al.* (*In Press*). Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature*.

## **Pièce 3 traduction**



**Annonce générale de l'agence  
Prévention des menaces pathogènes émergentes  
(PREEMPT) BUREAU DES TECHNOLOGIES  
BIOLOGIQUES HR001118S0017  
19 janvier 2018**

## TABLE DES MATIÈRES

<b>PARTIE I : INFORMATIONS GÉNÉRALES .....</b>	<b>3</b>
<b>PARTIE II : TEXTE INTÉGRAL DE ANNONCE.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Description de l'opportunité de financement .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Programme Aperçu .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Programme Métriques .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3. Implications éthiques, juridiques et sociétales (ELSI) .....</b>	<b>15</b>
<b>1.4. Protection des informations sensibles .....</b>	<b>15</b>
<b>2. Informations sur l' attribution .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1. Informations générales sur le prix .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2. Recherche fondamentale .....</b>	<b>17</b>
<b>3. Informations sur l' éligibilité .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Candidats éligibles .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2. Conflits d'intérêts organisationnels .....</b>	<b>19</b>
<b>3.3. Partage des coûts/Appariement .....</b>	<b>20</b>
<b>4. Informations sur la candidature et la soumission .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1. Adresse de demande de candidature Colis .....</b>	<b>20</b>
<b>Contenu et forme de soumission de candidature .....</b>	<b>20</b>
<b>4.3. Restrictions de financement .....</b>	<b>31</b>
<b>4.4. Autre soumission Conditions .....</b>	<b>31</b>
<b>5. Informations sur l'examen des candidatures .....</b>	<b>31</b>
<b>5.1. Critères d'évaluation a .....</b>	<b>31</b>
<b>5.2. Examen des propositions .....</b>	<b>32</b>
<b>6. Administration des récompenses Information .....</b>	<b>33</b>
<b>6.1. Sélection Avis .....</b>	<b>33</b>
<b>6.2. Exigences administratives et politiques .....</b>	<b>34</b>
<b>6.3. Rapportage .....</b>	<b>35</b>
<b>6.4. Électronique Systèmes .....</b>	<b>35</b>
<b>7. Coordonnées de l' agence .....</b>	<b>35</b>
<b>8. Autres informations .....</b>	<b>35</b>
<b>9. Annexe 1 – Liste de contrôle du Volume II .....</b>	<b>37</b>

## PARTIE I : APERÇU INFORMATION

- **Nom de l'agence fédérale** - Défense Agence des projets de recherche avancée (DARPA), Bureau des technologies biologiques
- **Titre de la possibilité de financement** – Prévention des menaces pathogènes émergentes
- **Type d'annonce** – Initiale
- **Numéro de possibilité de financement** – HR001118S0017
- **Catalogue des numéros d'assistance intérieure fédérale (CFDA) – 12.910 Recherche et technologie Développement**
- **Rendez-vous**
  - Date de publication – 19 janvier 2018
  - Date d'échéance du résumé de la proposition et Heure – 13 février 2018 4:00 HE
  - Date et heure d'échéance de la proposition - 27 mars 2018 4:00 HE
  - BAA Clôture Date – mars 27, 2018
  - Journée des proposants – 30 janvier 2018

<https://www.fbo.gov/spg/O DA/DARP A/CM O/DARP A-SN-18-18/Listing.html>

- **Description concise du financement opportunité - DARPA sollicite des propositions innovantes pour développer de nouvelles et approches évolutives pour anticiper débordement et transmission par des animaux ou vecteurs chez l'homme.**
- **Récompenses individuelles attendues - Multiples des récompenses sont attendues.**
- **Types d'instruments pouvant être attribués - Contrat d'approvisionnement, accord de coopération ou autre transaction.**
- **Toute exigence de partage des coûts** - Le partage des coûts peut être requis en vertu des réglementations légales applicables pour les autres opérations pour les projets prototypes attribués dans le cadre l'autorité de 10 USC § 2371b.
- **Coordonnées de l'agence**
  - Points de contact  
James Gimlett, Ph.D. Gestionnaire de programme  
Bureau des technologies biologiques

Le coordinateur BAA pour cet effort joignable à : [PREMPT@darpa.mil](mailto:PREMPT@darpa.mil)  
DARPA/BTO  
ATTN : HR001118S0017  
675, rue Randolph Nord

## **PARTIE II : COMPLET TEXTE DE L'ANNONCE**

### **1. Description de la possibilité de financement**

Cette publication constitue une large annonce d'agence (BAA) comme prévu dans Règlement fédéral sur les acquisitions (FAR) 6.102(d)(2) et 35.016 et 2 CFR § 200.203. Toute négociation d'attribution qui en résultera suivra toutes les loi et réglementation, et toute négociation et/ou récompenses pour l'approvisionnement les contrats utiliseront les procédures sous FAR 15.4, Contrat Prix, tel que spécifié dans le BAA.

La DARPA sollicite des propositions innovantes pour la recherche développer de nouveaux outils et modèles pour quantifier la probabilité qu'un virus saute d'un hôte animal dans les humains, et de développer et valider de nouvelles technologies pour cibler le potentiel agents pathogènes viraux à capacité humaine dans des réservoirs sauvages et/ou des moustiques vecteurs pour prévenir la transmission à l'homme.

#### **1.1. PROGRAMME VUE D'ENSEMBLE**

##### **Introduction**

Pendant les opérations internationales américaines, les forces militaires sont déployées dans des endroits éloignés du monde, souvent dans des régions où la maladie est endémique et les maladies émergentes sont prévalentes <sup>1</sup>. La plupart de ces pays émergents et réémergents les maladies proviennent de réservoirs animaux et puis sautez dans les humains. De nombreuses tendances, y compris les interactions accrues entre les populations humaines, animales et d'insectes en raison à l'augmentation des densités de population, à la mondialisation, à la densification de la production animale et l'empiètement croissant de l'homme sur les habitats des animaux ont augmenté les risques de nouvelles flambées virales dans les régions où le Département de Le personnel de la Défense (DoD) est généralement déployé. Souvent, le personnel du DoD sont parmi les premiers intervenants dans situations d'éclosion. Les maladies infectieuses émergentes, par dont peu des contre-mesures médicales sont disponibles, représentent une menace majeure pour le combattant et nationale la sécurité et pourrait avoir des effets dévastateurs sur la santé publique américaine.

Malgré les efforts de biosurveillance dans le monde entier, les nouvelles épidémies virales continuent de dépasser les efforts de préparation et ne montrent aucun signe de ralentissement. Au cours des trois premiers trimestres de 2017 foyers de la grippe aviaire A (H7N9), Chikungunya, coronavirus MERS, Ebola, Virus de Séoul, Hépatite E, Hépatite A, Fièvre jaune, Lassa, et les virus Zika ont été enregistrés <sup>2</sup>. Alors que les stratégies actuelles de biosurveillance se concentrent sur la détection de agents pathogènes au sein de la population humaine à la suite d'une épidémie infectieuse événement, il y a un manque de recherche et de surveillance sur des animaux sentinelles ou réservoirs <sup>3</sup>. Virus spécifiques aux animaux qui ont le potentiel de infecter les humains ( *c'est -à-dire* les agents pathogènes "à capacité humaine"), mais n'ont pas encore débordé dans les populations humaines, sont rarement pris en compte. Comme un résultat, Agents infectieux ne sont détectés *qu'après* une épidémie , c'est-à-dire après qu'un agent pathogène animal s'est adapté pour devenir capable d'infecter les humains. Par conséquent, la riposte à l'épidémie est largement réactif et n'est initié qu'après un épidémie a déjà commencé. Le programme PREEMPT représente un départ radical de la pratique actuelle, visant à cibler viral

<sup>1</sup> Jo Halliday EB et al. (2017). Favoriser l'amélioration de la surveillance des maladies émergentes grâce au renforcement des capacités pertinentes au niveau local. Science.

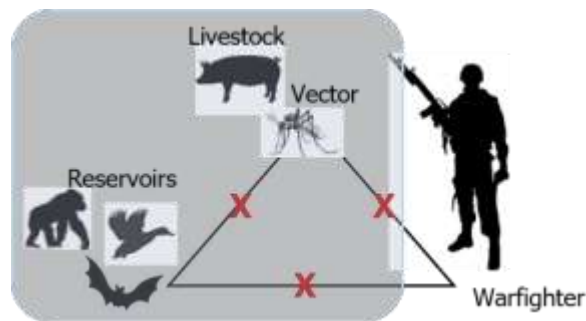
<sup>2</sup> Santé mondiale Organisation (2017). <http://www.who.int/csr/don/arhive/year/2017/en/>.

<sup>3</sup> Metcalf, JE et Lessler, J. (2017). Opportunités et défis dans modélisation des maladies infectieuses émergentes. Science

menaces biologiques au sein des réservoirs animaux d'où ils proviennent et devancer leur entrée dans les populations humaines *avant* une épidémie se produit.

Récemment, la science la communauté a avancé sa compréhension de la génétique hôte-pathogène et des mécanismes d'adaptation à travers les hôtes <sup>4,5</sup>, développé outils analytiques pour prédire les hôtes animaux de nouvelles et potentielles virus transmissibles à l'homme, et appris comment pour identifier le "point chaud" régions géographiques où un saut de virus de l'animal à l'homme est imminente <sup>6,7</sup>. Cette compréhension est renforcée par de nouveaux systèmes à haut débit capacités de génération de données et analytique sophistiquée et

outils de calcul. Ensemble, ces nouvelles connaissances et capacités sont très prometteuses pour le développement de modèles intégrés avancés qui peuvent évaluer et probable fournir des conseils pour l'action qui empêche l'émergence de virus humains avant le virus pénètre dans la population humaine. Le programme PREEMPT vise à développer de nouveaux outils et modèles pour quantifier la probabilité de une quasi-espèce virale (QS) pour passer d'un hôte animal à humains. En parallèle, PREEMPT cherche à développer et valider nouveau évolutif technologies qui empêchent la transmission des agents pathogènes viraux dans des réservoirs sauvages et/ou vecteurs de moustiques à humains ou pour relier les animaux qui servent de hôtes intermédiaires avant que le virus ne saute dans l'homme.



### **Recherche Objectifs**

Recherche PREEMPT les objectifs sont structurés le long de deux Zones (TA). Les deux domaines techniques doivent être effectués en parallèle par verticalement intégré, interdisciplinaire équipes. Les proposants doivent présenter un plan pour aborder les deux domaines techniques et franchir une étape clé points de décision qui se produisent à la fin de l'année 2.

- 1) TA1 : Développer et valider des modèles qui quantifient la probabilité un virus à capacité humaine émergera d'un réservoir animal résidant dans une zone géographique « point chaud ».
- 2) TA2 : Développer des approches évolutives cette cible et supprimer le virus animal dans son(s) réservoir(s) et/ou vecteur(s), pour réduire la probabilité, vraisemblance de la transmission virale dans les humains.

### **Technique Sont un 1 (TA1)**

<sup>4</sup> Lloyd-Smith, JO (2010). Identification de marqueurs génétiques d'adaptation pour la surveillance de l'hôte viral saute. Nature Critiques Microbiologie.

<sup>5</sup> Plowright, RK et coll. (2017). [Chemins d'accès au zoonotie de déversement](#). Nature Critiques Microbiologie.

<sup>6</sup> Olival, KJ et al. (2017). Caractéristiques de l'hôte et du virus prédire zoonotique débordement des mammifères. Nature.

<sup>7</sup> Han, BA et al. (2016). Chauve-souris inconnue Hôtes de filovirus. PLoS Négl Trop Dis.

Les études au sein de TAI doivent produire et valider modèles qui : (a) quantifient la probabilité d'un virus pour sauter dans un nouveau espèce animales et/ou humains, (b) identifier les opportunités de intervention proactive, et (c) déterminer l'efficacité probable, l'évolutivité et pérennité des stratégies de prévention.

Les proposants doivent tirer parti des méthodes de dépistage de virus à haut débit, de la métagénomique, de la surveillance écologique et des technologies avancées. outils de modélisation pour générer modèles de risque pour le saut d'espèces qui permettront d'obtenir des données en temps quasi réel analyse et identification des risques potentiels et les facteurs de risque. Ce système de biosurveillance avancé devrait également identifier les opportunités de intervention préventive, évaluant l'efficacité, l'évolutivité, la sécurité et la durabilité probables des stratégies préventives pour cibler les menaces virales dans les réservoirs animaux et/ou des vecteurs avant qu'ils n'entrent dans la population humaine.

### ***Composants TAI***

Les proposants doivent aborder, au minimum, les aspects suivants :

- 1) Sélection de pathogène(s) viral(s) zoonotique(s) ou à transmission vectorielle (plusieurs virus au sein de la même famille) peuvent être adressés s'ils partagent un réservoir animal commun et/ou vecteur)
- 2) Collecte de données sur le terrain
- 3) Échantillons de terrain multi-espèces étudiés dans un laboratoire contrôlé
- 4) Analyse de données, intégration, et développement de modèles
- 5) Temps réel partage de données et analyse
- 6) Sorties du modèle
- 7) Validation expérimentale des prédictions du modèle dans un environnement de laboratoire contrôlé et simulé

#### *1. Sélection de zoonotique ou à transmission vectorielle agent pathogène viral*

Ce BAA n'examinera que les propositions axées sur les virus zoonotiques et/ou à transmission vectorielle. Les micro-organismes autres que les virus ne réagissent pas aux cette annonce. Une justification des virus sélectionnés est requise. Sélection de virus peut être basé sur, mais sans s'y limiter, les facteurs suivants : fréquence de réémergence ( *p. ex.* , virus de la grippe aviaire), modèles de gamme d'hôtes du virus ou largeur d'hôte (zoonose prédite potentiel), potentiel de propagation rapide en raison de la transmissibilité à médiation vectorielle, de la gravité de la pathologie de la maladie et probabilité de menace pandémique.

#### *2. Champ collecte de données*

Les proposants doivent identifier et justifier des « points chauds » géographiques au sein desquels ils collecteront des données de terrain. Les proposants doivent tenir compte de tous les critères suivants lors de la sélection géographique points chauds pour la collecte de données sur le terrain :

- 1) Preuve antérieure de la répartition géographique des réservoirs zoonotiques et/ou des vecteurs pour les virus humains connus ou inconnus ; ces cartes peuvent être basées sur des données épidémiologiques, phylogénétiques, écologiques, biogéographiques, socio-économiques données, ou autres ;
- 2) Preuve des événements passés de saut d'espèces dans ou à proximité de l'emplacement géographique sélectionné ;



- 3) Capacités et infrastructure démontrées pour effectuer des recherches dans la région géographique sélectionnée et/ou collaboration avec un partenaire établi du DoD ou du Department of Health and Human Services (DHHS) (*par exemple*, un Naval Medical Site de l'unité de recherche, recherche sur les forces armées Institut des sciences médicales, ou Centres pour le contrôle des maladies), de sorte que l'exécutant peut coordonner les activités de surveillance à long terme et accéder aux capacités de laboratoire et d'analyse locales ;
- 4) Approprié niveaux de l'approbation du gouvernement dans le pays, de la coopération, de l'infrastructure et du soutien logistique où les échantillons seront prélevés et analysés ; et
- 5) Justification des réservoirs/espèces à échantillonner.

Le cas échéant, les proposants doivent tenir compte de la distribution saisonnière (p. saisons pour les moustiques), facteurs écologiques temporels (*p. ex.*, moment de la fructification pour les chauves-souris frugivores) et traits comportementaux temporels (*p. ex.*, maturation sexuelle) des animaux zoonotiques espèces pour le terrain échantillonnage. Zones géographiques potentielles Peut inclure, mais sans s'y limiter, les régions endémiques ; ceux qui subissent des changements écologiques (augmentant ainsi le risque de débordement en raison de changements dans les interactions animal-humain) ; celles abritant des espèces hôtes à fort potentiel zoonotique qui sont en proximité de populations humaines et "pont" les hôtes animaux (*p. ex.* les écosystèmes humain-chauve-souris-porc); et avant des sites d'événements de débordement ou d'épidémies. Le sélection de zones géographiques d'intérêt commun déploiement militaire qui a également répondre aux critères ci-dessus est fortement encouragée. Les proposants doivent décrire les approches réalisables pour augmenter la probabilité de détecter virus dans les réservoirs animaux et/ou des vecteurs—résidant dans géographique sélectionné zone s - qui ont le potentiel devenir humain capable. Les proposants doivent décrire les méthodes de prélèvement d'échantillons détail, en veillant à inclure la fréquence d'échantillonnage longitudinale. Développement d'approches d'échantillonnage nouvelles et rapides pour le dépistage continu en temps réel des pathogènes émergents ou réémergents au l'interface homme-animal est encouragée. Les proposants sont encouragés à identifier des échantillons de terrain qui ont été collectés lors d'épidémies passées, ou données déjà généré, que accessibles pour des analyses rétrospectives. Dans de tels cas, les proposants doivent décrire comment et où les données ont été recueillies, et établir des méthodes de contrôle de la qualité pour l'évaluation des données et utilise. Bien que la recherche sur l'utilisation humaine ne pas être financé par PREEMPT, l'utilisation d'échantillons humains ou données antérieures flambées obtenues par d'autres programmes peuvent être inclus dans le plan de recherche tant que les échantillons sont anonymisés de manière appropriée (voir, par exemple, <https://humansubjects.nih.gov/human-specimens-cell-line-data>).

### 3. Laboratoire multi-espèces test d'échantillons de terrain

Les proposants doivent discuter des protocoles pour déterminer et quantifier la diversité QS de la population virale à partir du vecteur ou réservoir au moment de l'échantillonnage collecte ( $t=0$ ) dans un manière qui minimise les altérations QS, qui résultent généralement de passage de la lignée cellulaire. Les proposants doivent évaluer le besoin

pour le prélèvement longitudinal d'échantillons pour comprendre le QS viral dynamique (changements temporels de séquence et aptitude paysages) dans les populations de virus de terrain. Le QS viral initial isolé d'un champ échantillon ( $t = 0$ ) sera ci-après annoté "Q S<sub>0</sub>". Les proposants doivent décrire des expériences *in vitro* et/ou *in vivo* pour évaluer le potentiel de saut du Q S<sub>0</sub> population à une pertinent nouvel hôte. Les approches expérimentales pour surveiller le saut d'espèces virales peuvent inclure, mais ne se limitent pas à : les modifications du QS de la population virale au cours passage de ligne entre les espèces concernées ; infection de modèles animaux appropriés ; infection du naturel hôtes animaux; et des écosystèmes de laboratoire multi-espèces contrôlés.

Les tests en laboratoire doivent déterminer les paramètres clés influençant la probabilité d'une infection virale QS<sub>0</sub> sauter et s'adapter à une nouvelle espèce hôte. Les paramètres potentiels à travers différents animaux hôtes ou vecteurs peuvent inclure, mais ne sont pas limités à :

- 1) Profils de diversité QS
- 2) Taux d'infection et d'amplification du virus
- 3) Période d'incubation du virus
- 4) Virémie et virus perte
- 5) Goulots d'étranglement de transmission
- 6) Hôte animal évolutif et les pressions immunitaires

Les données générées devrait permettre le développement de cartes génotype-phénotype et la détermination de mutation(s) associée(s) au virus un nouvel hôte.

#### 4. *Analyse des données, intégration et développement de modèles*

Les proposant doivent identifier les données nécessaires pour développer intégré modèles d'évaluation des risques. Proposants devrait discuter du développement de modèles probabilistes de saut de virus utilisant des méthodes et des outils de calcul avancés, y compris à la fois piloté par le modèle et approches basées sur les données. Les modèles doivent intégrer multi-échelle et les données sur les espèces d'hôtes croisés, y compris mais pas limité à, terrain et données expérimentales (*p. ex.* dynamique QS), données écologiques (*p. ex.* démographiques, socio-économiques, épidémiologiques, biogéographiques, et autres métadonnées), et autres données pertinentes disponibles, en particulier celles générées par des événements de débordement passés. Les modèles doivent tenir compte de tous les facteurs associés à l'émergence et la transmission d'agents pathogènes, en particulier les paysages immunologiques multi-hôtes. Des modèles devrait également capturer trajectoires évolutives virales, paysages de fitness chez les espèces zoonotiques et/ou vectrices, et quantifier la dynamique de transmission sous-jacente espèces sauter.

#### 5. *Données en temps réel partage et analyse*

Le programme PREEMPT est attendu générer quantités considérables de données, principalement séquençage de nouvelle génération (NGS) de virus populations et une analyse de l'hôte moléculaire signatures. Les proposant doivent identifier les méthodes de partage de données en temps quasi réel et analyse.

#### 6. *Sorties du modèle*

Les proposant doivent expliquer comment ils vont développer modèles probabilistes et techniques d'apprentissage automatique qui intègrent des données multi-échelles et inter-espèces (*p.* signatures, démographiques, écologiques, socio-économiques, épidémiologiques, météorologiques, climatiques et autres métadonnées) pour quantifier la probabilité de franchir les barrières d'espèces et d'infecter les humains. Les modèles doivent capturer trajectoires évolutives virales et les mutations qui gouvernent espèces sauter. Les modèles doivent quantifier la dynamique de transmission, tenant compte de la diversité des QS viraux. Les modèles doivent identifier les clés paramètres de l'agent pathogène, de l'espèce hôte, de la dynamique des vecteurs et écologique

les interactions contribuant au saut d'espèces, et devrait éclairer une stratégie de préemption en identifiant la pression optimale points (*par exemple*, saut-permettant mutations, stochastiques les goulots d'étranglement de transmission, et besoins d'amplification virale) qui peuvent être ciblés pour réduire la probabilité, vraisemblance d'espèces sautent. Pour les propositions portant sur les virus à transmission vectorielle, les proposant doivent décrire les méthodes permettant de quantifier

la probabilité d'adaptation du virus à un nouveau vecteur et proposer des méthodes expérimentales pour valider ces prédictions. Les proposants doivent discuter des paramètres de notation de la précision du modèle, sensibilité et spécificité. Des modèles devrait être en mesure de recevoir des entrées de biosurveillance dynamiques et de s'adapter aux changements de QS du virus.

### 7. Validation expérimentale des prédictions du modèle

Les proposants doivent décrire en détail un plan visant à établir *des in vivo*, approches expérimentales multi-espèces pour valider les sorties de modèles. Essais expérimentaux peut étroitement ressembler ou récapituler les paramètres de la vie réelle (*p. ex.*, climat, phylogénétiquement espèces hôtes adjacentes et schémas de « morsure » des vecteurs) permettre la quantification de la probabilité d'événements de débordement et/ou de transmission de manière contrôlée. Les approches qui récapitulent fidèlement les écosystèmes réels et les hôtes naturels sont fortement encouragées. Pour améliorer la précision, la sensibilité et la spécificité du modèle, les interprètes doivent itérer à la fois théorique et expériences empiriques.

#### Clé TA1 Les sorties

La clé les sorties pour TA1 doivent inclure les éléments suivants :

- 1) Des modèles intégrés qui quantifient la probabilité de saut de virus et peuvent être facilement adapté recevoir une surveillance dynamique et données virales saisir.
- 2) Stochastique modèles quantifiant les goulots d'étranglement (par exemple, taux de transmission, d'entrée dans les cellules et d'infection) et l'aptitude mutationnelle cartes (par exemple, les mutations activatrices et leur fréquence).
- 3) Identification et évaluation du potentiel des cibles d'intervention préventives pour prévenir le saut de virus du réservoir et/ou vecteur.

#### **Technique Sont un 2 (TA2)**

Des études au sein de ce domaine technique objectif développer des méthodes déployables et évolutives pour anticiper le saut viral à travers les espèces.

#### Composants TA2

Domaine technique 2 vise à développer des méthodes déployables et évolutives pour prévenir le saut viral vers d'autres espèces. Les proposants doivent répondre, au minimum, à tous les éléments suivants aspects:

- 1) Approches de préemption de preuve de concept ;
- 2) Livraison évolutive méthodes;
- 3) Analyse de la durabilité à long terme ; et
- 4) Validation expérimentale.

#### 1. Approches de préemption de preuve de concept

Les proposants doivent décrire comment le résultat de Les modèles TA1 *in silico* guideront la conception de méthodes préventives, et comment les informations quantitatives sur les barrières virus-espèces hôtes et les goulots d'étranglement de transmission seront utilisés pour développer stratégies pour prévenir l'émergence de virus. Les modèles doivent guider sélection de : espèces hôtes à traiter (*p. ex.*, animaux sauvages, « pont »

animaux, vecteurs et bétail); cibles moléculaires potentielles (*p. ex.* mutation(s) clé(s) permettant la liaison au récepteur dans un nouvel hôte) ; cibles associées à la dynamique du cycle de transmission (*p.* charge virale au sein de la réservoir et/ou vecteur qui empêcherait transmission); et d'autres facteurs pertinents identifiés par les modèles. Les proposants doivent décrire les méthodes préventives qui traitent les différentes sorties du modèle. Des exemples d'approches préventives comprennent, mais sans s'y limiter :

- 1) Perturbation spécifique des gènes capables de sauter du virus QS dans réservoirs et/ou vecteurs utilisant de petites ARN ou suppressions ciblées basées sur CRISPR/Cas.
- 2) Suppression du saut de virus à un nouveau hôte par le biais d'anticorps neutralisation virale.
- 3) Réservoir supprimé et/ou vecteur virémie à l'aide de particules interférentes défectueuses du virus (DIP) pour supplanter la réplication de virus.
- 4) Transmission supprimée entre animaux réservoirs à travers immunité induite (*par exemple*, vacciner l'animal).
- 5) Alternative méthodes éclairées par des modèles expérimentaux et théoriques. Le développement de nouveaux préemptifs démarches sont fortement encouragées.

## 2. Méthodes de livraison évolutives

Les proposants doivent décrire des approches évolutives pour fournir le traitement préventif afin d'obtenir un contrôle au niveau de la population animale et/ou vectorielle de la ciblé virus, y compris stratégies pour atteindre les animaux les moins accessibles réservoirs (*p. ex.* rongeurs ou primates non humains).

### Approches

qui permettent la distribution thérapeutique d'hôte à hôte (*c.-à-d.*, ne nécessitent pas de traitement) qui se limitent d'eux-mêmes, activer seulement quand le virus la cible pathogène est présente, et/ou avoir un « interrupteur marche/arrêt » contrôlable sont encouragés. Méthodes évolutives potentielles de l'inoculation peut inclure, mais sans s'y limiter pour:

- 1) Traitements autodisséminants ou préventifs (*p. ex.* , recombinants transmissibles ) vaccins, particules interférentes thérapeutiques ou auto-propagation thérapies antivirales).
- 2) Vaccination ou traitement des appâts sauvages ou domestiques animaux.
- 3) À base de spray méthodes.

Les approches qui utilisent des modifications génétiques de vecteurs (*p. ex.* ADN mitochondrial modifié) sont acceptables. La méthode proposée de l'inoculation doit être justifié. Le proposant doit décrire des stratégies pour étroitement contrôler la livraison et la propagation préventives.

## 3. Analyse à long terme sécurité et efficacité

Les proposants doivent établir des méthodes initiales pour évaluer l'innocuité et l'efficacité à long terme des approches préventives (*p.* le mécanisme par lequel la spécificité d'espèce de un vaccin est maintenu, et évaluer la stabilité évolutive et sécurité écologique).

## 4. Validation expérimentale

Les proposant doivent décrire les approches pour valider méthodes préventives de choix dans des modèles expérimentaux contrôlés. Des plateformes expérimentales multi-espèces qui récapitulent fidèlement les écosystèmes réels et l'utilisation d'hôtes naturels est fortement encouragée.

### **Clé TA2 Les sorties**

La clé sorties de TA2 doit inclure la validation de nouvelles technologies de préemption « block-before-jump » pour l'un des le suivant:

- 1) Valider la suppression du saut de virus du réservoir d'animaux sauvages à les humains et/ou un animal porteur intermédiaire ( *p. ex.* , bétail domestique).
- 2) Valider la suppression du saut de virus ou de la transmission à partir du réservoir sauvage à vecteur, vecteur à un autre espèce vectrice, et/ou du vecteur à l'homme.

### **Periode de performance**

La DARPA prévoit que le PREEMPT programme sera fournir jusqu'à trois ans et demi de financement pour la recherche et développement à réaliser sur des périodes de Phase I (base) et II (option) de 24 et 18 mois, respectivement.

### **Temps de la ligne**

PREEMPT couvre un effort de 42 mois avec une phase de 24 mois I (base) et une phase II de 18 mois (option). En général, la phase I devrait fournir une validation précoce des modèles de risque de zoonose, et la phase II devrait établir l'efficacité et l'évolutivité des approches de prévention des zoonoses.

### **Phase I (période de base)**

Les efforts de la phase I visent à développer des et mathématique des modèles à quantifier la probabilité un virus sautera d'un espèce hôte à un autre, identifier les cibles potentielles pour la préemption des débordements et développer des méthodes de préemption évolutives. Au cours de la phase I, l'interprète équipes sera:

- 1) Identifiez le génétique adaptations qui permettent aux espèces de sauter.
- 2) Développer des modèles mathématiques pour quantifier la probabilité de saut d'espèces basée sur :
  - a. Données moléculaires ( *p. ex.*, données QS virales de séquençage profond ) et
  - b. Écologique données (*par exemple*, état immunitaire de la population hôte avant l'émergence d'agents pathogènes, la parenté des espèces , etc. ).
- 3) Identifier les goulots d'étranglement pour l'intervention ( *p. entrée, amplification virale, taux d'infection et autres mécanismes associés à la compatibilité virale inter-espèces* ) .
- 4) Développer des plateformes évolutives initiales qui cibler virus dans réservoirs et/ou vecteurs pour empêcher le saut viral dans d'autres animaux ou les humains.

À la fin de l'année 1 (Phase I) les interprètes devront avoir :

- 1) Identifié signatures de remise en forme et potentiel de propagation d'un agent pathogène entre deux espèces.
- 2) Quantifié la génétique et facteurs de transmission exigences du QS viral pour sauter à un nouvel hôte ( *par exemple*, développer cartes génotype-phénotype, identifier spécifique mutations, etc.) en utilisant la biosurveillance lointaine les données de certains groupes à haut risque Régions.

À la fin de l'année 2 (Phase I) les interprètes devront avoir :

- 1) Initialement démontré que les modèles peuvent quantifier la probabilité d'agents pathogènes viraux à capacité humaine sauter d'une espèce à une autre espèce.
- 2) Méthodes de preuve de concept démontrées pour cibler les agents pathogènes viraux à capacité humaine dans les réservoirs et/ou les vecteurs pour réduire la probabilité de saut de virus.
- 3) Initiale fournie stratégies pour intensifier les méthodes de préemption.

### ***Phase II (période d'option)***

Les efforts de phase II visent à développer des modèles probabilistes pour l'amplification virale intra- et inter-espèces et transmission dynamique, modèles intégrés pour l'évaluation des risques et validation expérimentale de nouvelles approches devancer les espèces sauter. Au cours de la phase II, les équipes d'interprètes étendre les efforts de modélisation de la phase I pour:

- 1) Quantifier la dynamique d'amplification virale intra- et inter-espèces et émission.
- 2) Développer des modèles intégrés qui quantifient la probabilité qu'un virus QS saute vers établir un pont entre les espèces animales ou les humains.
- 3) Valider expérimentalement des méthodes évolutives pour leur capacité pour prévenir les

débordements zoonotiques. À la fin de l'année 3.5 (Phase II) les artistes seront attendu à:

- 1) Démontrer l'exactitude de modèles d'évaluation des risques et de préemption dans un cadre expérimental multi-espèces pertinent.
- 2) Démontrer la capacité de supprimer virale sauter à une nouvelle espèce dans des conditions expérimentales contrôlées.

Il est reconnu qui convient jalons et les mesures peuvent dépendre du type de virus, du réservoir, des mécanismes des espèces saut, et les méthodes de préemption proposées. Les proposants doivent proposer des jalons quantitatifs et métrique (voir tableaux 1 et 2 ci-dessous pour les métriques notionnelles) pour leur cas d'utilisation de preuve de principe proposé. Les proposants doivent démontrer une expérience de recherche pertinente dans le domaines techniques. Propositions impliquant plusieurs équipes et/ou les approches expérimentales doivent être structurées comme des efforts unifiés qui abordent les domaines techniques du programme en parallèle, dans un manière intégrée.

## **1.2. PROGRAMME MÉTRIQUE**

Pour que le gouvernement évalue l'efficacité d'un solution proposée dans la réalisation des objectifs énoncés du programme, les proposants doivent noter que le gouvernement promulgue par la présente les paramètres de programme suivants qui peuvent servir de ligne directrice pour évaluer les progrès, les risques et l'impact du programme. Bien que le Suivant les mesures du programme sont à condition que les proposants doivent noter que le gouvernement a identifié ces buts avec l'intention de bondir l'étendue de l'effort tout en offrant le maximum de flexibilité, de créativité, et l'innovation dans proposer des solutions au problème posé. Proposants devraient offrir des métriques plus appropriées et spécifiques pour leur cas d'utilisation particulier et leur approche technique, y compris des métriques intermédiaires (c'est-à-dire chaque 6 mois ou plus tôt) pour mieux évaluer les progrès. Les mesures finales doivent être négociées au moment de la passation du contrat.

Tableau 1 : Étapes théoriques, produits livrables, et mesures du programme pour TA1

Phase	Jalons et livrables	Programme Métrique
j e	Collecté surveillance de terrain Les données: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Virus QS moléculaire données ( <i>par exemple</i> , du séquençage en profondeur) et les métadonnées de l'analyse longitudinale échantillons ( <i>par exemple</i> obtenu parmi les sélectionnés zones à haut risque ( <i>p. ex.</i> grotte des chauves-souris) et/ou d'une éclosion antérieure un événement</li> <li>• Espèce hôte immunitaire moléculaire Les données</li> </ul>	Quantitatif mesures de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Longitudinale population virale _ QS (QS <math>t=0</math>, QS <math>t=6</math> mois , QS <math>t=12</math> mois ,...) diversité dans sélectionné risque élevé domaines ( <i>p. ex.</i> fréquence de mutations, évolutionniste trajectoires) ( <b>6 mois</b> )</li> <li>• Diversité QS virale en échantillons obtenu à partir d'animaux, de vecteurs, et/ou humain d'une éclosion antérieure événement ( <i>p. ex.</i> fréquence spécifiques à l'espèce mutation) ( <b>9 mois</b> )</li> <li>• Immunisé moléculaire signatures du réservoir hôte ou intermédiaire espèces réservoirs ( <b>12 mois</b> )</li> </ul>
	Multi-espèces données des tests de <ul style="list-style-type: none"> <li>• Génotype-phénotype du virus QS cartes pour au moins 2 espèce hôte</li> </ul>	Quantitatif mesures de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Entrée de cellule et adaptation à travers les espèces <i>in vitro</i> et/ou <i>in vivo</i> ( <i>p. ex.</i> diversité QS lors du passage d'une espèce à l'autre) ( <b>18 mois</b> )</li> </ul>
	Initial mathématique des modèles qui évaluent le risque de saut de virus	Modèle capacité __ décrire/prédire : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Virus QS évolutif trajectoires entre 2 pertinent espèces ( <b>9 mois</b> )</li> <li>• Clé moléculaire facteurs qui pourrait être ciblé pour prévenir saut de virus <i>in vitro</i> et/ou <i>in vivo</i> ( <i>p. ex.</i> signatures de remise en forme d'un agent pathogène entre deux pertinents espèce hôte) ( <b>18 mois</b> )</li> <li>• Moléculaire cibles pour la préemption ( <b>24 mois</b> )</li> </ul>
Établir e d bancs d'essai pour validation _ de modèle prédictions		Bancs d'essai imiter naturel environnement comme quantifié défini par l'interprète paramètres ( <b>24 mois</b> )
II	Multi-espèces données des tests de <ul style="list-style-type: none"> <li>• Quantifier transmission du virus QS facteurs entre deux espèces <i>in vivo</i></li> </ul>	Quantitatif mesures de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Amplification du virus et dynamique de transmission ( <i>par exemple</i> taux d'infection vs virémie, amplification __ les taux, et incubation temps) ( <b>30 mois</b> )</li> </ul>
	Avancé mathématique des modèles qui risque de saut de virus <ul style="list-style-type: none"> <li>• Intégration de moléculaire Les données et amplifi c ation/ t ransmission du virus dynamique</li> <li>• Intégration de héberger immunitaire pressions évolutives et la dynamique QS</li> </ul>	Des modèles prédire: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Intra- et inter-espèces dynamique de transmission ( <b>36 mois</b> )</li> <li>• Probabilité __ de débordement _ (évaluation des risques) ( <b>42 mois</b> )</li> <li>• 2 premières cibles réduire probabilité __ de transmission entre deux espèces pour</li> </ul>

Phase	Jalons et livrables	Programme Métrique
		informer TA2 ( <b>42 mois</b> )
	Plus loin validation __ de la prédiction du modèle dans	Validé __ prédiction du modèle précision dans multi-espèces environnement ( <b>42 mois</b> )

Tableau 2 : Étapes théoriques, produits livrables, et métriques du programme pour TA2

Phase	Jalons et livrables	Programme Métrique
j e	Preuve de concept manifestation de préemptif approcher qui réduit soit la probabilité de saut de virus ou le la fréquence des variantes du virus QS à haut risque pour les espèces sauter	Quantitatif validation __ de préemption approcher tel qu'établi _ par interprète ( <b>24 mois</b> ) Exemples : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fréquence à haut risque mutation dans le virus QS dans le réservoir réduit &gt;3X</li> <li>• Incubation de virus période dans le vecteur étendu &gt;3X</li> <li>• Amplification du virus taux dans le réservoir ou vecteur réduit &gt;3X</li> <li>• virémie dans l'hôte ou le vecteur réduit &gt;5X</li> </ul>
II	Démontré efficacité de préemption méthode	Réduit probabilité __ de transmission entre deux espèces de >5X <i>in vivo</i> pour les 2 principales cibles ( <b>36 mois</b> )
	Démontré évolutivité __ de préemption méthode	Quantitatif évolutivité __ tel qu'établi _ par interprète ( <b>42 mois</b> )

### Partage de données

Les proposants doivent s'assurer que tous les éléments de données techniques (y compris résultats, données traitées, méthodes de En traitement, rapports de recherche et publications) et logiciels (code source et exécutables) générés à partir de PREEMPT financement du programme sont mis à la disposition de la DARPA. Les rapports soumis régulièrement ( p. ex. , mensuels ou trimestriels) doivent contenir toutes les données pertinentes du projet, y compris (mais sans s'y limiter à) des données brutes et analysées et toutes les annotations et interprétations nécessaires. Données et/ou échantillons collecté provenant de volontaires/patients humains anonymisés lors d'épidémies antérieures doivent inclure associé anonymisé métadonnées ( *par exemple*, signes/symptômes, résultats des tests de diagnostic, interventions, observations cliniques et résultats). Tout cru les données et les métadonnées doivent être enregistré selon aux normes expérimentales approuvées.

Gagner valeur scientifique accrue de la collaboration ouverte dans recherche fondamentale, la DARPA peut rechercher autorisation pour partager ou toutes les données générées par le programme avec la communauté de recherche au sens large comme ouvertes données (y compris les possibilité d'accéder, de réutiliser, et redistribuer sous des conditions de licence appropriées) dans la mesure où permis par les lois et réglementations applicables ( *par exemple*, confidentialité, sécurité et contrôle des exportations).

La DARPA prévoit qu'un grande quantité de données sera généré sous ce programme par chaque interprète et que le analyses et validation sera renforcé en compilant et intégrant



informations sur tous les artistes interprètes ou exécutants. Interprètes sont fortement encouragés à établir les accords appropriés pour permettre la collaboration et le partage de données. DARPA encourage le partage de données préexistantes, y compris celles générées grâce au financement par d'autres sources, même si ce n'est pas une obligation du programme.

Comme faisable, La DARPA a l'intention de partager données au sein du PREEMPT communauté d'interprètes pour promouvoir les objectifs du programme. Faciliter partage et échange d'éléments de données, interprètes devra entrer un associé Prestataire Accord (ACA); une clause ACA sera inclus dans le contrat ou l'accord décerné.

### **Plan de transition PREEMPT**

Les proposants doivent inclure un Technologie PREEMPT Plan de transition. Les proposants doivent indiquer les types de partenaires ( p. ex . , gouvernement, secteur privé l'industrie, à but non lucratif) qu'ils prévoient de poursuivre et de soumettre un calendrier avec des jalons progressifs vers un engagement réussi. Les proposants doivent commencer les activités de transition durant les premières étapes du programme (Phase JE). Lauréats doit inclure la DARPA dans le développement des relations de transition. Si le plan de transition comprend une start-up, une entreprise la stratégie de développement doit également être incluse. Le mesure dans laquelle l'intellectuel proposé les droits de propriété (PI) entraveront la capacité du gouvernement pour faire la transition, la technologie sera pris en compte dans l'évaluation de la proposition.

### **1.3. ÉTHIQUE, IMPLICATIONS JURIDIQUES ET SOCIÉTALES (ELSI)**

La DARPA s'engage à garantir que les efforts financés en vertu de ce BAA adhérer à l'éthique et les réglementations légales actuellement en place pour la recherche financée par le gouvernement fédéral et le DoD. Les développements du programme seront discutés avec un panel d'experts-conseils externes avec compétence dans les questions de bioéthique et de biosécurité qui peut émerger en conséquence des progrès de la science biomédicale et la technologie. Les proposants à ce BAA doivent répondre potentiel éthique, implications juridiques et sociétales de la technologie proposée.

### **1.4. PROTECTION DES INFORMATIONS SENSIBLES**

PREEMPT est un 6.1 programme de recherche fondamentale visant à améliorer la biosurveillance et de nouvelles approches pour anticiper agents pathogènes dans les réservoirs animaux de sauter dans les populations humaines. DARPA suit la politique actuelle du DoD pour recherche fondamentale sous contrat. La DARPA reconnaît cependant que Programme PREEMPT composants visant à comprendre et à quantifier les mécanismes de la zoonose virale le débordement pourrait potentiellement générer des informations sensibles qui pourrait être mal utilisé. Comme il s'agit d'une recherche fondamentale programme, le risque d'abus actuellement ne peut être raisonnablement évalué. Toutefois, les proposants sont informés que lors de l'évaluation de la proposition et/ou du programme performance, lorsqu'un tel risque peut raisonnablement être évalué, la DARPA peut déterminer que le risque de l'abus crée circonstances exceptionnelles, raisons impérieuses et/ou raisons de sécurité nationale politique actuelle du DoD pour la recherche fondamentale sous contrat. La DARPA s'attend donc à ce que les proposants de ce programme comprennent et se conformera aux diverses directives gouvernementales concernant la recherche potentielle sur le gain de fonction préoccupantes (GOFROC) <sup>8</sup> et la recherche à double usage préoccupante (DURC) <sup>9,10,11,12,13</sup>. Voir [http://www.phe.gov/s3/dua\\_l use / Pa ge s/ de fa ul t.a spx](http://www.phe.gov/s3/dua_l use / Pa ge s/ de fa ul t.a spx) pour plus d'informations.

<sup>8</sup> La recherche sur le gain de fonction (GOFROC) fait référence aux études susceptibles de générer des agents pathogènes à potentiel pandémique présentant une transmissibilité élevée et haute virulence.

DARPA exige que les propositions incluent un plan d'atténuation des risques qui seront incorporés dans tout accord résultant ou des contrats et comprend les informations suivantes :

- 1) Une évaluation des risques potentiels pour la santé publique, l'agriculture, les plantes, les animaux, l'environnement et la sécurité nationale.
- 2) Lignes directrices proposées que le proposant suivra pour s'assurer maximale biosécurité et la biosécurité pendant le cours de la recherche.
- 3) Un plan de communication qui aborde le contenu, le calendrier et l'étendue de la distribution des informations potentiellement sensibles informations à double usage. Le plan doit également traiter de la manière dont les contributions de la DARPA, d'autres gouvernement, et les intervenants communautaires seront pris en compte dans les décisions concernant communication et publication de potentiellement informations sensibles à double usage.

## 2. Informations sur le prix

### 2.1. INFORMATIONS GÉNÉRALES SUR LE PRIX

Plusieurs récompenses sont possible. Le le montant des ressources mises à disposition dans le cadre de ce BAA dépendra de la qualité des propositions reçues et de la disponibilité des fonds.

Le gouvernement se réserve le droit de sélectionner pour la négociation tous, certains, un, ou aucune des propositions reçues en réponse à cette sollicitation et à faire des prix sans discussions avec les proposants. Le gouvernement se réserve également le droit de mener des discussions s'il est décidé ultérieurement de être nécessaire. Si cela est justifié, des portions de les attributions qui en résultent peuvent être séparées en options prétarifiées. De plus, la DARPA réserve le droit de J'accepte propositions en leur intégralité ou pour sélectionner uniquement parties des propositions d'attribution. Dans le cas où la DARPA désire n'attribuer que des parties d'une proposition, des négociations peuvent être ouvertes avec ce proposant. Le gouvernement se réserve le droit de financer propositions en phases avec des options pour travail continu, selon le cas. Le gouvernement se réserve le droit de financer une option de phase II basée sur sur la disponibilité des fonds, un

---

<sup>9</sup> Recherche préoccupante à double usage (DURC) fait référence à la recherche en sciences de la vie qui peut être raisonnablement anticipé pour apporter des connaissances, informations, produits ou technologies cela pourrait être directement mal appliqué pour poser un menace importante avec de larges conséquences potentielles sur la santé et la sécurité publiques, les cultures agricoles et d'autres les plantes, les animaux, l'environnement, le matériel, ou la sécurité nationale.

<sup>10</sup> Cadre proposé pour la surveillance des sciences de la vie à double usage recherche : stratégies pour minimiser mauvaise utilisation potentielle des informations de recherche, Sciences nationales Conseil consultatif pour la biosécurité (NSABB). juin 2007.

<sup>11</sup> Recommandations pour l'évaluation et la surveillance des propositions recherche sur le gain de fonction par le National Science Conseil consultatif pour Biosécurité (NSABB). Mai 2016.

<sup>12</sup> Outils d'identification, d'évaluation, de gestion et de communication responsable of Dual Use Research of Concern: A Companion Guide aux politiques de surveillance du gouvernement des États-Unis des sciences de la vie Recherche à double usage de Préoccuper. NIH. Septembre 2014.

<sup>13</sup> États-Unis Politique gouvernementale de surveillance des sciences de la vie Dual Utilisez Recherche préoccupante. Politique DURC. Mars 2012.

évaluation des résultats de la recherche de phase I, et une détermination qui attribution l'option est dans l'intérêt du Gouvernement. Le Gouvernement se réserve le droit de demander toute documentation supplémentaire nécessaire une fois qu'il a déterminé l'instrument d'attribution. Ces informations supplémentaires peuvent comprendre, mais sans s'y limiter, les déclarations et attestations (voir la section VI.B.2., « Déclarations et attestations »). Le Gouvernement se réserve le droit de retirer les candidats du prix de considération si les parties échouent à parvenir à un accord sur les conditions d'attribution et/ou le coût/prix dans un délai raisonnable, et le candidat omet d'opportunité de fournir les compléments demandés d'information. Les propositions identifiées pour négociation peuvent déboucher sur un contrat d'approvisionnement, une subvention, un accord de coopération ou autre transaction, selon la nature des travaux proposés, le degré requis de collaboration entre les parties, qu'il s'agisse ou non la recherche est classée comme fondamentale Recherche, et d'autres facteurs.

Les candidats à la recherche d'arrangements contractuels innovants de type commercial sont encouragés à envisager de demander d'autres transactions. Pour comprendre la flexibilité et les options associées aux Autres Opérations, consulter <http://www.darpa.mil/work-with-us/contractmanagement#OtherTransactions>.

Dans tous les cas, le maître d'ouvrage de l'Etat aura l'entière discrétion de sélectionner le type d'instrument d'attribution, quel que soit le type d'instrument proposé, et négocier tous les termes et conditions de l'instrument avec les élus. DARPA s'appliquera publication ou autres restrictions, le cas échéant, s'il détermine que la recherche proposée présentera une forte probabilité de divulguer les caractéristiques de performance des systèmes militaires ou fabrication des technologies uniques et critiques à la défense. N'importe quel prix résultant d'une telle décision va inclure une exigence pour la DARPA autorisation avant de publier des informations ou des résultats sur le programme. Pour plus d'informations sur les restrictions de publication, voir la section ci-dessous sur Recherche fondamentale.

## **2.2. FONDAMENTAL RECHERCHE**

C'est la politique du DoD qui la publication des produits de la recherche fondamentale restera libre dans toute la mesure du possible. La directive décisionnelle (NSDD) 189 définit la recherche fondamentale comme suit :

"Recherche fondamentale" signifie recherche de base et appliquée en sciences et en génie, les résultats de qui sont habituellement publiés et partagés largement au sein de la communauté scientifique, par opposition à recherche propriétaire et du développement industriel, de la conception, de la production, et l'utilisation des produits, dont les résultats sont généralement réservés à des fins exclusives ou des raisons de sécurité nationale.

A compter de la date de publication de ce BAA, le gouvernement attend que les objectifs du programme tels que décrits ici peuvent être rencontrés par les candidats ayant l'intention d'effectuer de la recherche fondamentale et les candidats n'ayant pas l'intention d'effectuer une recherche fondamentale ou la recherche proposée peut présenter une forte probabilité de divulguer les caractéristiques de performance des systèmes militaires ou des technologies de fabrication qui sont uniques et essentielles à la défense. Basé sur la nature de l'interprète et la nature du travail, le Gouvernement prévoit que certaines récompenses incluront des restrictions sur les recherches qui en résultent nécessiteront le lauréat à demander l'autorisation de la DARPA avant édition n'importe quelle information ou des résultats relatifs à la programme.

Les proposants doivent indiquer dans leur proposition s'ils croient la portée de la recherche incluse dans leur proposition est fondamentale ou non. Bien que les proposants doivent expliquer clairement les résultats escomptés de leur recherche, le gouvernement aura le pouvoir discrétionnaire de sélectionner récompenser le type d'instrument et tout négocier termes d'instruments et conditions avec les élus. Des clauses appropriées seront inclus dans les récompenses résultantes pour la recherche non fondamentale pour prescrire des exigences de publication et d'autres restrictions, le cas échéant. Cette la clause peut être trouvée sur <http://www.darpa.mil/work-with-us/additional-baa>

C'est sûr projets de recherche, cela pourrait être possible que bien que la recherche effectuée par le boursier est une recherche restreinte, un sous-boursier peuvent mener des recherches fondamentales. Dans ces cas, c'est le la responsabilité du bénéficiaire d'expliquer dans leur proposition pourquoi l'effort de son sous-boursier est la recherche fondamentale

### **3. Informations d'éligibilité**

#### **3.1. CANDIDATS ADMISSIBLES**

Toutes les sources responsables capables de satisfaire les besoins du gouvernement peut soumettre une proposition qui sera considéré par la DARPA.

##### **3.1.1. Centres de recherche et de développement financés par le gouvernement fédéral (FFRDC) et gouvernement Entités**

###### **FFRDC**

Les FFRDC sont soumis aux limitations de concurrence directe applicables et ne peut pas proposer de ce BAA à quelque titre que ce soit à moins qu'ils ne répondent aux conditions suivantes : (1) Les FFRDC doivent démontrer clairement que les travaux proposés n'est pas disponible autrement auprès du secteur privé. (2) Les FFRDC doivent fournir une lettre sur en-tête de lettre de leur organisation de parrainage citant l'autorité spécifique établissant leur admissibilité à proposer au gouvernement sollicitations et rivaliser avec l'industrie et leur conformité aux conditions de la convention de parrainage FFRDC associée. Cette information est requis pour les FFRDC proposant d'être boursiers ou sous-boursiers.

###### **Entités gouvernementales**

Entités gouvernementales (par exemple, Les laboratoires gouvernementaux/nationaux, les établissements d'enseignement militaire, etc.) sont soumis à la concurrence directe applicable limites. Les entités gouvernementales doivent démontrer clairement que le travail n'est pas autrement disponible auprès du secteur privé et fournir une documentation écrite citant l'autorité légale spécifique et l'autorité contractuelle, le cas échéant, établissant leur capacité à proposer aux sollicitations du gouvernement.

###### **Autorité et admissibilité**

À l'heure actuelle, la DARPA ne considère pas 15 USC § 3710a comme une autorité légale suffisante pour démontrer l'éligibilité. Tandis que 10 USC§ 2539b peut être la solution appropriée statutaire point de départ pour certaines entités, des orientations réglementaires spécifiques à l'appui, ainsi que preuve de l'approbation de l'agence, toujours être nécessaire pour établir pleinement l'admissibilité. DARPA considérera FFRDC et

Soumissions d'éligibilité des entités gouvernementales sur un au cas par cas; cependant, le fardeau de prouver l'admissibilité à tous les membres de l'équipe incombe uniquement au proposant.

### 3.1.2. Organisations non américaines

Des organisations et/ou des individus non américains peuvent participer à dans la mesure où ces participants se conforment à toute confidentialité nécessaire accords, réglementations de sécurité, lois sur le contrôle des exportations et autres lois applicables dans les circonstances.

## 3.2. CONFLITS D'INTÉRÊTS ORGANISATIONNELS

### FAR 9.5 Exigences

Conformément à la FAR 9.5, les proposant sont tenus d'identifier et de divulguer tous les faits pertinents aux OCI potentiels impliquant le proposant. organisation et *toute* membre de l'équipe proposé (sous-bénéficiaire, consultant). En dessous de cette section, le proposant est responsable de fournir cette divulgation avec chaque proposition soumise au BAA. La divulgation doit inclure celle du proposant et, le cas échéant, OCI du membre de l'équipe proposé plan d'atténuation. Le plan d'atténuation OCI doit inclure une description de les mesures que le proposant a prises ou a l'intention de prendre pour empêcher la existence de conflits rôles susceptibles de biaiser le jugement du proposant et d'empêcher celui-ci de avoir un avantage concurrentiel déloyal. L'atténuation OCI plan discutera spécifiquement de la OCI divulgués dans le contexte de chacun de le BEC limites décrites dans FAR 9.505-1 à FAR 9.505-4.

### nc y Suppl e m e m e nt a l OC I Pol i c y

En outre, La DARPA a un politique supplémentaire du BEC qui interdit les entrepreneurs/interprètes de fournir simultanément une assistance technique en ingénierie scientifique (SETA), des services de conseil et d'assistance (A&AS) ou des services de support similaires et en tant qu'acteur technique. Par conséquent, dans le cadre du Divulgation FAR 9.5 exigence ci-dessus, un proposant doit affirmer si le proposant ou *toute* équipe proposée membre (sous-bénéficiaire, consultant) fournit SETA, A&AS, ou similaire soutien à tout bureau de la DARPA sous : (a) un bourse ou sous-bourse en cours ; ou (b) une attribution ou sous-attribution passée qui a pris fin au cours de l'année civile précédant la date de soumission de la proposition.

Si SETA, A&AS ou un support similaire est en cours ou a été fourni à tout bureau DARPA, la proposition doit inclure :

- Le nom du Réception du bureau DARPA le soutien;
- Premier numéro de contrat;
- Identification du membre de l'équipe proposé (sous-bénéficiaire, consultant) fournir le soutien; et
- Un plan d'atténuation OCI conformément avec FAR 9.5.

### Procédures gouve rnem e ntales

Conformément aux FAR 9.503, 9.504 et 9.506, le gouvernement évaluera l'OCI les plans d'atténuation à éviter, neutraliser ou atténuer le potentiel OCI émet avant l'attribution et pour déterminer s'il est dans l'intérêt du gouvernement d'accorder une renonciation. Le gouvernement ne fera que évaluer les plans d'atténuation de l'OCI pour les propositions qui sont déterminées sélectionnables selon les critères d'évaluation de la BAA et la disponibilité du financement.

Le gouvernement peut exiger des proposant qu'ils fournissent informations supplémentaires pour aider les Gouvernement en évaluer l'atténuation OCI du proposant plan.

Si le gouvernement détermine qu'un proposant manqué divulguer entièrement un OCI ; ou n'a pas fourni l'affirmation du soutien de la DARPA en tant que décrit ci-dessus; ou n'a pas réussi à raisonnablement fournir les informations supplémentaires demandées par le gouvernement pour aider dans l'évaluation de l'OCI du proposant plan d'atténuation, le gouvernement peut rejeter la proposition et la retirer de l'examen pour l'attribution.

### **3.3. PARTAGE DES COÛTS/MATCHING**

Le partage des coûts n'est pas requis; cependant, il sera soigneusement examiné s'il y a un condition légale applicable relative à la sélection instrument de financement. Le partage des coûts est encouragé lorsqu'il existe un probabilité d'un potentiel commercial application en relation à la recherche et au développement proposés effort.

Pour plus d'informations sur le partage potentiel des coûts exigences pour les autres transactions pour Prototype, voir <http://www.darpa.mil/work-with-us/contract-management#OtherTransactions>

## **4. Candidature et soumission Information**

### **4.1. ADRESSE POUR DEMANDER LE DOSSIER DE DEMANDE**

Cette annonce, toute pièces jointes, et tout références à des sites Web externes ici constituent la sollicitation totale. Si les proposant ne peuvent pas accéder au matériel référencé posté dans l'annonce trouvée sur <http://www.darpa.mil>, contact le contact administratif indiqué ici .

### **4.2. CONTENU ET FORME DE CANDIDATURE SOUMISSION**

Toutes les soumissions, y compris les résumés et les propositions doivent être écrit en anglais avec un type non inférieur à 12 police de points. Une police plus petite peut être utilisé pour les figures, les tableaux et les graphiques. Copies de tous les documents soumis doivent être clairement étiqueté avec le numéro DARPA BAA, l'organisation proposante, et titre de la proposition/proposition titre court.

#### **4.2.1. Format du résumé de la proposition**

Les proposant sont fortement encouragés à soumettre un résumé en avance d'une proposition visant à minimiser les efforts et à réduire les dépenses potentielles liées à la préparation d'une proposition hors champ d'application. Le résumé est une version concise du proposition comprenant un **maximum de 8 pages** comprenant tous les chiffres, tableaux, graphiques et l'exécutif Résumé glisser. La lettre de soumission (facultative) n'est pas incluse dans le nombre de pages. Tout les pages doivent être formaté pour impression sur 8-1/2 par du papier de 11 pouces avec une taille de police non inférieure à 12 points. Des tailles de police plus petites peuvent être utilisé pour les figures, les tableaux et graphiques.

Les soumissions doivent être écrit en anglais.

Les résumés doivent inclure les composants suivants :

A. Feuille de couverture (ne compte pas pour la page limite): Inclure l'administratif et les points de contact techniques (nom, adresse, téléphone, fax, e-mail, piste organisme). Aussi

inclure le numéro BAA, le titre du projet proposé, primaire sous-traitants, coût estimé, durée du projet et étiqueter "RÉSUMÉ".

B. Exécutif Résumé Diapositive : Fournissez un résumé de diapositives dans PowerPoint qui transmet efficacement et succinctement l'objectif principal, innovations clés, impact attendu et autres aspects de la proposition projet. Les proposants doivent utiliser le modèle de diapositive fourni en pièce jointe 1 au BAA affiché à <http://www.fbo.gov>.

C. Objectifs et Impact : Clairement décrire ce qui est proposé et quelle différence cela fera (qualitativement et quantitativement), y compris de brèves réponses aux questions suivantes :

1. Qu'est-ce que le travail proposé tentant d'accomplir ou faire?
2. Comment ça se passe aujourd'hui ? Et quelles sont les limites ?
3. Qu'est-ce que innovant dans votre approche et comment se compare-t-il à la pratique actuelle et à l'état de l'art (SOA) ?
4. Quels sont les défis techniques clés dans votre approche et comment comptez-vous les surmonter ?
5. Qui s'en souciera et quel sera l'impact si vous réussissez ?
6. Combien cela coûtera-t-il et combien de temps cela durera-t-il prendre?

D. Plan technique : Décrire et traiter tous défis techniques inhérents dans l'approche et solutions possibles pour surmonter les problèmes potentiels. Cette section doit fournir des informations appropriées jalons spécifiques (quantitatifs, si possible) à des étapes intermédiaires du projet démontrer des progrès et un bref plan pour l'accomplissement des jalons.

E. Capacités : Fournissez un bref résumé d'expertise de l'équipe, y compris les sous-traitants et personnel clé. Un chercheur principal du projet doit être identifié, et une description de l'équipe organisme. Inclure une description de l'organisation de l'équipe, y compris les rôles et responsabilités. Décrivez l'expérience organisationnelle dans ce domaine, intellectuel existant propriété nécessaire pour terminer le projet, et toutes les installations spécialisées à utiliser dans le cadre du projet. Dressez la liste des documents fournis par le gouvernement ou données supposées disponibles. Si vous le souhaitez, incluez une brève bibliographie avec des liens aux documents pertinents, des rapports ou des curriculum vitae d'interprètes clés. N'incluez pas plus de deux CV dans le cadre du résumé. Les CV comptent pour la page de résumé limite.

#### 4.2.2. Format de proposition

Toutes les propositions complètes doivent être dans le format indiqué ci-dessous. Les propositions seront composées de deux volumes : 1 ) **Volume I. Technique et Gestion Proposition**, et 2 ) **Volume II. Coût Proposition**. Toutes les pages doivent être imprimées sur du papier 8-1/2 par 11 pouces avec un type non inférieur à 12 points. Une police plus petite peut être utilisé pour les figures, les tableaux et des graphiques. La limitation de page pour plein les propositions comprennent tous les chiffres, tableaux et graphiques. Tome I, technique et proposition de gestion, peut inclure une bibliographie jointe des informations techniques pertinentes articles ou recherches notes (publiées et non publiées) qui documentent les idées techniques et l'approche sur laquelle repose la proposition. Copies d'au plus trois (3) documents pertinents peut être inclus avec la soumission. La bibliographie

et papiers joints ne sont pas inclus dans le nombre de pages indiqué ci-dessous. La soumission d'autre matériel de support en même temps que la proposition, elle est fortement découragée et ne sera pas prise en considération pour review. **Le nombre de pages maximum pour le volume 1 est de 36 pages.** UN soumission la lettre est facultative et n'est pas incluse dans la page compter. Le volume Je devrais inclure les composants suivants :

**REMARQUE : Soumissions non conformes qui ne suivent pas les instructions présente peut être rejetée sans autre examen.**

a. **Tome I**, Technique et Gestion Proposition

Section I. Administratif

A. Page de couverture (ÉTIQUETÉE "PROPOSITION : TOME I ») :

1. Numéro BAA (HR001118S0017);
2. Organisation soumettant une proposition (maître d'œuvre);
3. Type d'organisation, choisi parmi les catégories suivantes : « GRANDES ENTREPRISES », « PETITES DÉFAVORISÉES ENTREPRISE », "AUTRES PETITES ENTREPRISES", "HBCU", "MI", "AUTRES ÉDUCATIONNELS", OU « AUTRE À BUT NON LUCRATIF » ;
4. Référence du proposant numéro (le cas échéant);
5. Autres membres de l'équipe (le cas échéant) et le type d'entreprise pour chacun ;
6. Titre de la proposition ;
7. Point de contact technique (gestionnaire de programme ou chercheur principal) pour inclure : salutation, dernier nom, prénom, rue adresse, ville, état, code postal, téléphone, fax, e-mail ;
8. Point administratif de Contactez (Agent Contractant ou Subvention Officier) pour inclure : salutation, dernier nom, prénom, rue adresse, ville, état, code postal, téléphone, fax, e-mail ;
9. Instrument de récompense demandé : coût plus forfaitaire gratuit (CPFF), contrat à prix coûtant sans frais, prix ferme ferme, subvention, coopérative accord, autre transaction, ou autre type (spécifier);
10. Lieu(x) et période(s) d'exécution ;
11. Période de validité de la proposition ;
12. Totale fonds demandés à la DARPA, et le montant des coûts partager (le cas échéant); ET
13. Date à laquelle la proposition a été soumise.

Informations sur le prix instruments est disponible sur <http://www.darpa.mil/work-with-us/contractmanagement>.

B. Lettre de transmission officielle.

Section II . Informations détaillées sur la proposition



**A. Exécutif Résumé :** Fournissez un résumé du projet proposé, y compris les réponses aux questions suivantes des questions:

- Qu'est-ce que le travail proposé tentant d'accomplir ou faire?
- Comment ça se passe aujourd'hui, et quelles sont les limites ?
- Qu'est-ce que innovant dans votre démarche ?
- Quels sont les défis techniques clés dans votre approche et comment comptez-vous les surmonter ?
- Qui ou quoi sera affecté et quel sera l'impact si le travail est réussi?
- Combien ça coûtera, et combien de temps cela durera-t-il prendre?

**B Exécutif Diapositive récapitulative :** Fournissez une un résumé de diapositive dans PowerPoint qui transmet efficacement et succinctement objectif principal, innovations clés, attendu impacter, et d'autres aspects uniques du projet proposé. Les proposants doivent utiliser le modèle de diapositive fourni en **pièce jointe 1** au BAA affiché à <https://www.fbo.gov>.

**C Objectifs et impact :** Clairement décrire ce que l'équipe essaie de faire réaliser et la différence que cela fera (qualitativement et quantitativement) en cas de succès. Décrire les aspects innovants du projet dans le cadre des capacités existantes et approches, délimitant clairement les caractère unique et avantages de cette projet dans le contexte de l'état de l'art, des approches alternatives et d'autres projets du passé et présent.

Décrivez comment le projet proposé est révolutionnaire et comment il s'élève nettement au-dessus de l'état actuel de la technique. Décrire les produits livrables associés au projet proposé et tout plan commercialiser le technologie, la transférer à un client, ou poursuivre le travail.

**D. Plan technique :** Aperçu et adresse défis techniques inhérents à la démarche et les solutions possibles pour surmonter potentiel problèmes. Cette section doit fournir des jalons mesurables appropriés (quantitatifs si possible) et des mesures du programme (voir la section 1.2) à des stades intermédiaires de le programme pour démontrer les progrès, et un plan pour atteindre jalons. La technique le plan doit démontrer un compréhension approfondie des défis techniques et présenter un plan crédible (même s'il est risqué) pour atteindre l'objectif du programme. Discuter atténuation du risque technique. Le plan technique doit traiter les exigences relatives au contenu des propositions TA1 et TA2 détaillées à la section 1.1.

**E. La gestion Planifier :** Fournir un résumé de l'expertise de l'équipe, y compris les éventuels sous-traitants, et personnel clé qui sera faire le travail. CV compte dans le nombre de pages de la proposition. Identifier un principal chercheur pour le projet. Fournir une description claire de l'organisation de l'équipe, y compris un organigramme qui comprend, selon le cas : la relation programmatique des membres de l'équipe ; l'unique

les capacités des membres de l'équipe ; la responsabilités des tâches des membres de l'équipe, la stratégie d'équipe entre les membres de l'équipe ; et le personnel clé avec la quantité d'efforts à fournir par chaque personne au cours de chaque année. Fournir un plan détaillé de coordination comprenant des lignes directrices pour l'interaction entre collaborateurs/sous-traitants de l'effort proposé. Inclure gestion des risques approches. Décrire tout accord d'association officiel qui sont nécessaires pour exécuter ce programme.

- F. Capacités :** Décrire organisationnel de l'expérience en domaine(s) pertinent(s), propriété intellectuelle existante, installations spécialisées et tout Meublé par le gouvernement matériaux ou des informations. Discutez de tout travailler dans des recherches étroitement liées domaines et réalisations antérieures.
- G. Énoncé des travaux (EDT) :** Le Le SOW doit fournir une répartition détaillée des tâches, citant des tâches spécifiques et leur lien à l'intérim jalons et mesures du programme. Chaque phase du programme (Phase I base et Phase option II) doivent être définis séparément dans l'EDT et chaque tâche doit être identifiée par TA (1 ou 2). L'EDT ne doit pas inclure d'informations exclusives.

Pour chaque tâche/sous-tâche, fournissez :

- Une fiche détaillée descriptif de la approche être emmené à accomplir chaque tâche/sous-tâche définie.
- Identification du primaire organisme responsable de la tâche exécution (maître d'œuvre, sous-traitant(s), consultant(s), de nom).
- Une étape mesurable, c'est-à-dire un livrable, démonstration ou autre événement/activité qui marque l'achèvement de la tâche. Inclure quantitatif métrique.
- Une définition de tous les livrables (par exemple, données, rapports, logiciels) à fournir au Gouvernement en soutien des tâches/sous-tâches proposées.

- H Calendrier et étapes :** Fournissez un calendrier détaillé montrant tâches (tâche nom, durée, élément de la structure de répartition du travail, le cas échéant, exécution organisation), les jalons et les interrelations entre Tâches. La structure des tâches doit être cohérent avec cela dans le SOW. Les jalons mesurables doivent être clairement articulés et définis dans le temps par rapport au démarrage du projet.

- I. Plan de transition PREEMPT (voir la section 1.2) :** Les proposants doivent indiquer les types de partenaires (par exemple, gouvernement, industrie privée, à but non lucratif) ils planifier de poursuivre et soumettre un échéancier avec jalons progressifs vers fiançailles réussies. Les proposants doivent commencer la transition activités pendant les premières étapes du programme (La phase I). Le plan doit décrire tous les rôles potentiels de la DARPA. Si le plan comprend un start-up, une entreprise la stratégie de développement doit également être incluse.

- J. Risque de PREEMPT Plan d'atténuation (voir Section 1.4) :** Les proposant doivent fournir un plan d'atténuation des risques qui aborde les points suivants :
- Une évaluation des risques potentiels pour la santé publique, l'agriculture, les plantes, les animaux, l'environnement et la sécurité nationale.
  - Lignes directrices proposées que le proposant suivra pour s'assurer maximale biosécurité et la biosécurité pendant le cours de la recherche.
  - Un plan de communication qui aborde le contenu, le calendrier et l'étendue de la distribution des biens à double usage potentiellement sensibles information. Le le plan doit également traiter de la façon dont les commentaires DARPA, autre gouvernement, et les parties prenantes de la communauté seront prises en compte dans les décisions concernant la communication et publication de documents à double usage potentiellement sensibles information.
- K Éthique, juridique et Implications sociétales (ELSI) (voir la section 1.3) :** Les proposant doivent aborder les problèmes éthiques, juridiques et sociétaux potentiels. implications de la technologie proposée.

Section III . Informations supplémentaires ( Remarque : Ne compte pas dans la limite de pages)

Une brève bibliographie des techniques pertinentes papiers et notes de recherche (publiées et inédit) quel document les idées techniques sur lesquels se fonde la proposition. Copies d'au plus trois (3) les papiers peuvent être inclus dans la soumission.

a. Volume II, Gestion des coûts Proposition

Page de couverture (ÉTIQUETÉE "PROPOSITION : TOME II ») :

1. Numéro BAA ;
2. Organisation soumettant une proposition ;
3. Type d'organisation, choisi parmi les Suivant catégories : « GRANDES ENTREPRISES », « PETITES ENTREPRISES DÉFAVORISÉES », « D'AUTRES PETITS ENTREPRISE", "HBCU", "MI", "AUTRE ÉDUCATIONNEL » OU « AUTRE À BUT NON LUCRATIF » ;
4. Référence du proposant numéro (le cas échéant);
5. Autres membres de l'équipe (le cas échéant), Code(s) CAGE et type d'entreprise pour chaque;
6. Titre de la proposition ;
7. Point de contact technique (gestionnaire de programme ou chercheur principal) pour inclure : salutation, dernier nom, prénom, rue adresse, ville, état, code postal, téléphone, fax (si disponible), courrier électronique (si disponible);
8. Point administratif de Contactez (Agent Contractant ou Subvention Officier) pour inclure : salutation, dernier nom, prénom, rue adresse, ville, état, code postal, téléphone, fax (si disponible) et courrier électronique (si disponible);

9. Instrument de récompense demandé : coût plus fixe-gratuit (CPFF), contrat de coût—sans frais, contrat de partage des coûts – pas de frais, ou autre type de contrat d'approvisionnement ( *préciser* ), subvention, accord de coopération, ou autre transaction ;
10. Lieu(x) et période(s) d'exécution ;
11. Totale coût proposé séparé par base attribution et option(s) (le cas échéant) ;
12. Nom, adresse et numéro de téléphone du contrat de défense conscient du proposant  
La gestion Bureau administratif de l'Agence (DCMA) ( *si connu* ) ;
13. Nom, adresse et numéro de téléphone du contrat de défense conscient du proposant  
Bureau d'audit de l'Agence d'audit (DCAA) ( *si connu* ) ;
14. Date à laquelle la proposition a été préparée ;
15. DUNS Numéro ( <http://www.dnb.com/get-a-duns-number.html> ) ;
16. Taxpayer ID number  
(<https://www.irs.gov/Individuals/InternationalTaxpayers/Taxpayer-Identification-Numbers-TIN>);
17. Code CAGE (<https://www.dlis.dla.mil/bincs/FAQ.aspx>);
18. Période de validité de la proposition

**Notez que les propositions non conformes peuvent être rejetées sans examen.**

**Les proposants qui ne disposent pas d'un système de comptabilisation des réclamations selon les normes de comptabilisation des coûts (CAS) sont pris en compte adéquat pour déterminer les coûts exacts qui négocient un contrat d'approvisionnement de type coût doit terminer un SF 1408.** Pour plus d'informations sur la conformité CAS, consultez <http://www.dcaa.mil/cas.html>. Pour faciliter cela

processus, les proposants doivent remplir le SF 1408 trouvé sur <http://www.gsa.gov/portals/forms/download/115778> et soumettre le formulaire rempli

formulaire avec la proposition. Pour remplir le formulaire, cochez les cases de la deuxième page, puis fournissez une explication narrative de votre système comptable pour compléter la liste de contrôle à la première page. Pour plus d'informations, voir ( [http://www.dcaa.mil/preawardaccountingssystem\\_auditorchecklist.html](http://www.dcaa.mil/preawardaccountingssystem_auditorchecklist.html) ).

Le gouvernement encourage fortement que les tableaux inclus dans le coût proposition soit également à condition de dans un format modifiable (par exemple, MS Excel) avec des formules de calcul intact pour permettre la traçabilité des numéros de proposition de prix à travers le premier et sous-traitants.

Le gouvernement exige que le proposant fournir une ventilation détaillée des coûts à comprennent : (1)

Total coût du programme cassé en baisse par Phase I (Base) et Phase II (Option) en Entrepreneur  
Année fiscale à inclure :

- i. Main-d'œuvre directe - y compris catégories de travail individuelles avec les heures de travail associées et les taux de main-d'œuvre directe. Si vous êtes sélectionné pour un prix, soyez prêt de soumettre des pièces justificatives pour justifier les taux de main-d'œuvre. (c'est-à-dire des captures d'écran de bases de données RH, comparaison avec le NIH ou une autre base de données sur les salaires en ligne) ;
- ii. Conseillers – Si des consultants doivent être utilisés, le proposant doit fournir une copie de la proposition du consultant SOW ainsi qu'un signé accord de consultant ou autre document qui vérifie la proposition chargée taux journalier / horaire, heures et toute autre proposition les frais de consultant (par exemple, les déplacements);

- iii. Indirect Coûts - Y compris les avantages sociaux, les frais généraux, les frais généraux et administratifs, le coût de Argent, frais, etc. (doit montrer montant de base et taux), si disponible, fournissez Forward Pricing Rate Agreement ou Forward Proposition tarifaire. Si non disponible, prévoir 2 ans données historiques pour inclure le pool et coûts de dépenses utilisés pour générer les tarifs. Pour le milieu universitaire, fournissez le DHHS ou ONR négocié forfait tarifaire ou, si calculé autre qu'un taux, fournir Documentation universitaire identifiant G&A et les frais accessoires par poste;
  - iv. Voyage – Indiquez le but de le voyage, le nombre de voyages, nombre de jours par voyage, départ et arrivée destination, nombre de personnes, loyer estimé voiture et billet d'avion les coûts et les taux journaliers en vigueur tel que déterminé par gsa.gov, etc.; Les devis doivent être justifiés par des captures d'écran de sites Web de voyage ;
  - v. Autres coûts directs - Détaillés avec les coûts, y compris la remise des frais de scolarité, les tarifs journaliers des animaux, l'assurance maladie / les frais ; la documentation de sauvegarde est de être soumis à soutenir les coûts proposés ;
  - vi. Équipement Achats – Détail des coûts individuels et totaux, y compris les quantités, l'unité prix, fournisseurs proposés (si connu), et la base de l'estimation (par exemple, devis, achats, prix catalogue listes, etc.); quelconque article qui dépasse 5 000 \$ doivent être accompagnés de documents de sauvegarde comme une copie des listes de prix du catalogue ou devis avant à acheter (REMARQUE : Pour les achats de matériel, inclure une lettre indiquant pourquoi le proposant ne peut pas fournir les ressources demandées de son propre financement), et ;
  - vii. Matériaux - Détail des coûts, y compris les quantités, les prix unitaires, proposés les fournisseurs (si connus) et la base de l'estimation (par exemple, guillemets, avant achats, tarifs catalogue, etc.) ; tout article dépassant 5 000 \$ doit être accompagné d'une documentation de sauvegarde telle qu'une copie du catalogue listes de prix ou devis avant l'achat.
- (2) Un résumé Du total les coûts du programme par tâche principale ;
  - (3) Un résumé des besoins de financement projetés par mois ;
  - (4) Une énumération de tout achat de technologie de l'information (TI) (y compris une lettre indiquant pourquoi le proposant ne peut fournir les ressources demandées à son propre financement), tel que défini dans FAR Part 2.101 ;
  - (5) Une énumération de sous-traitance. **Tous les documents de proposition de coûts des sous-traitants doivent être préparés au le même niveau de détail comme celle exigée du premier.** Les propositions de sous-traitants doivent inclure Interdivisional Accords de transfert de travail (IWTA) ou preuve de semblable arrangements (un IWTA est un accord entre plusieurs divisions d'une même organisation);
  - (6) La source, la nature, et le montant de tout partage des coûts de l'industrie. Où l'effort se compose de plusieurs portions qui pourraient être raisonnablement partitionné pour fins de financement, ceux-ci doivent être identifiés comme options avec séparation des estimations de coût pour chacun ;
  - (7) Identification des hypothèses de tarification qui peuvent nécessiter une incorporation dans l'instrument d'attribution résultant (par exemple, recours au gouvernement Propriété meublée/Installations/Informations, accès à l'objet du gouvernement Expert(s), etc.) ;
  - (8) Tout accord de taux de prix à terme, Accord tarifaire DHHS, autre tel approuvé les informations sur les tarifs ou toute autre documentation qui peut aider dans l'accélération des négociations (si disponible); et
  - (9) Les proposants avec un Système comptable acceptable par le gouvernement qui proposent un contrat de type coût doivent soumettre le document DCAA approuver le coût Système de comptabilité.

### 4.2.3. Informations supplémentaires sur la proposition

#### Marquages exclusifs

Les proposants sont responsables de clairement identifier les informations exclusives. Les soumissions contenant des informations exclusives doivent avoir la page de couverture et chaque page contenant ces informations clairement marquées avec une étiquette telle que "Propriétaire" ou "Société Propriétaire." REMARQUE : "Confidentiel" est une marque de classification utilisée pour contrôler la diffusion des États-Unis

Informations sur la sécurité nationale du gouvernement, comme dicté dans Décret exécutif 13526 et devrait pas être utilisé pour identifier renseignements commerciaux exclusifs.

#### Soumissions non classifiées

La DARPA prévoit que les soumissions reçues dans le cadre de ce BAA ne seront pas classés. Toutefois, si un proposant souhaite soumettre des informations classifiées, un e-mail *non classifié* doit être envoyé à la boîte aux lettres BAA demandant des instructions de soumission au bureau technique PSO. Si une détermination est fait que l'instrument d'attribution peut entraîner accéder aux informations classifiées, un formulaire SCG et/ou DD 254 sera émis par la DARPA et joint dans le cadre du prix.

#### La recherche humaine Sujets/utilisation animale

Les proposants qui anticiper impliquant la recherche humaine Sujets ou Animaux L'utilisation doit respecter les procédures d'homologation détaillées sur <http://www.darpa.mil/work-with-us/additional-baa>.

#### Plan de sous-traitance des petites entreprises

Conformément à l'article 8(d) du Small Business Act (15 USC § 637(d)) et FAR 19.702(a)(1), chaque proposant qui soumet un proposition de contrat et inclut les sous-traitants être tenu de présenter une demande de sous-traitance planifier avec leur proposition. La forme du plan est décrit dans FAR 19.704.

#### Article 508 du la loi sur la réhabilitation (29 USC § 749d)/FAR 39.2

Toute l'électronique et les technologies de l'information acquis ou créé par ce BAA doit satisfaire les exigences d'accessibilité de l'article 508 du la loi sur la réhabilitation (29 USC § 749d)/FAR 39.2.

#### Propriété intellectuelle

Tous les proposants doivent fournir une bonne foi représentation que le proposant soit possède ou possède le matériel approprié licence droits à tous intellectuel biens que sera être utilisé dans le cadre de l'effort proposé.

Pour les contrats d'approvisionnement

Proposants répondant à ce BAA demandant les contrats d'approvisionnement devront compléter les certifications au DFARS 252.227-7017. Voir <http://www.darpa.mil/work-with-us/additional-baa> pour plus d'informations. Si pas de restrictions sont destinés, le proposant devrait indiquer "AUCUN".

La table captures ci-dessous les informations demandées :

données	Résumé de	Base pour	Affirmé Droits	Nom de Personne
---------	-----------	-----------	----------------	-----------------

Logiciels informatiques à être meublé avec des	Utilisation prévue dans la conduite de la recherche	Affirmation	Catégorie	Affirmer Restrictions
(LISTE)	(RÉCIT)	(LISTE)	(LISTE)	(LISTE)

Pour tous les non-approvisionnement Contrats

Proposants répondant à ce BAA demandant une subvention, coopérative Accord, accord d'investissement technologique ou autre transaction pour les prototypes suivra les règles et réglementations applicables régissant ces différents instruments de récompense, mais, en tout cas, devrait identifier de manière appropriée toute restriction potentielle sur l'utilisation par le gouvernement de tout Intellectuel Biens visés par l'instrument d'attribution en question. Ceci comprend articles non commerciaux et articles commerciaux. Les proposants sont encouragés à utiliser un format similaire à celui décrit dans la rubrique ci-dessus. Si pas de restrictions sont destinés, alors le proposant doit indiquer "AUCUN".

#### **Système de gestion des récompenses (SAM) et Exigences relatives à l'identifiant universel**

Tous les proposants doit être enregistré dans SAM sauf exemption par FAR 4.1102. FAR 52.204-7, « Système de Gestion des récompenses" et FAR 52.204-13, "System for Award Management Maintenance" sont incorporés dans ce BAA. Voir <http://www.darpa.mil/work-with-us/submit-online-baa> pour plus d'informations.

#### **4.2.4. Informations de soumission**

La DARPA va accuser réception de toutes les soumissions et attribuer un contrôle d'identification nombre qui devrait être utilisé dans toute correspondance ultérieure concernant la soumission. La DARPA a l'intention d'utiliser la correspondance par courrier électronique concernant HR001118S0017. Soumissions \_\_\_\_\_ n'est peut être pas soumis par fax ou e - mail ; \_\_\_\_\_ tout le monde sera envoyé di sre ga rde d.

Les soumissions seront ne pas être retourné. Une copie électronique de chaque soumission reçue sera conservée à la DARPA et toutes les autres copies non requises détruites. Une certification de destruction peut être demandée, à condition que la demande formelle soit reçue par la DARPA dans les 5 jours suivant la notification qu'une proposition n'a pas été sélectionnée.

Pour (résumé et) les dates de soumission des propositions, voir Partie I., Informations générales. Soumissions reçues après ces dates et les horaires peuvent ne pas être révisés.

#### **Pour les proposants soumettant des résumés de proposition ou Propositions complètes aussi difficiles Copies/Oui CD ROM:**

Les proposants doivent soumettre une copie papier originale et une (1) copie électronique du résumé ou de la proposition en PDF (de préférence) sur un CD-ROM à l'adresse postale indiquée à la partie I. Chaque copie doit être clairement étiqueté avec HR001118S0017, organisation proposante, point technique de contact et le titre de la proposition (court titre recommandé).

Veillez noter que les déposants via une copie papier/CD-ROM devront toujours visiter <http://baa.darpa.mil> enregistrer son organisation simultanément pour s'assurer le bureau de la BAA peut vérifier et finaliser leur soumission.

### **Pour les proposants soumettant des résumés de proposition ou Propositions complètes de demande d'approvisionnement**

#### **Contrats ou OT via le portail de soumission BAA de DARPA :**

Résumés et Propositions complètes envoyées en réponse à HR001118S0017 peut être soumis via le site Web BAA de la DARPA ( <http://baa.darpa.mil> ). Visitez le site Web compléter le processus d'inscription en deux étapes. Les soumissionnaires auront besoin de créer un compte Extranet (via le formulaire à l'URL indiquée ci-dessus) et attendre deux séparés e-mails contenant un nom d'utilisateur et un mot de passe temporaire. Après accédant à l'extranet, les déposants peuvent ensuite créer un compte pour le site Web de la DARPA BAA (via le "Inscrivez votre organisation" lien le long du côté gauche de la page d'accueil), consulter les instructions de soumission et télécharger/finaliser le résumé. Les proposants utilisant le site Web DARPA BAA peuvent rencontrer de lourdes le trafic à la date limite de soumission ; il est fortement conseillé que le processus de soumission être commencé le plus tôt possible.

Tous les concepts non classifiés soumis par voie électronique via le site Web BAA de la DARPA doit être téléchargé en tant que zip (extension .zip ou .zipx). Le le fichier zip final doit être pas plus de 50 Mo de taille. Un seul fichier zip sera accepté par soumission. Les soumissions et propositions classifiées demandant des instruments d'assistance (subventions ou accords de coopération) ne doivent PAS être soumis via le BAA de la DARPA Site Web ( <http://baa.darpa.mil> ), cependant les proposants devront probablement encore visiter <http://baa.darpa.mil> pour enregistrer leur organisation (ou vérifier un existant enregistrement) pour s'assurer que le bureau de la BAA peut vérifier et finaliser leur soumission.

Support technique pour le site Web de BAA peut être joint à [BAAT\\_Support@darpa.mil](mailto:BAAT_Support@darpa.mil), et est généralement disponible pendant les heures normales de bureau, (9:00 AM- 5:00 PM HNE lundi - Vendredi).

Les proposants utilisant le site Web DARPA BAA peuvent rencontrer un trafic important à la date limite de soumission ; il est fortement conseillé que soumission processus soit lancé le plus tôt possible.

#### **Pour Complet Demande de propositions Coopérative Les accords:**

Les proposants sollicitant des accords de coopération peuvent soumettre des propositions via l'une des méthodes suivantes : (1) dur copie envoyée par la poste directement à la DARPA ; ou alors (2) téléchargement électronique selon les instructions at <http://www.grants.gov/appllicants/apply-for-grants.html>. Les propositions d'accord de coopération ne peuvent être soumises par aucun autre moyen. Si les proposants ont l'intention d'utiliser Grants.gov comme moyen de soumission, puis ils doivent soumettre leur proposition complète via Grants.gov ; les candidatures ne peuvent pas être soumis en partie à Grants.gov et en partie sous forme de copie papier. Proposants utilisant Grants.gov ne soumettez pas de propositions de communication en plus à la soumission électronique Grants.gov.

nt.s.gov Submissions : Grants.gov exige que les proposants Achevée un processus d'inscription unique avant une proposition peut être soumis par voie électronique. La première inscription peut prendre entre trois jours ouvrables et quatre semaines. Pour plus d'informations sur l'inscription à Grants.gov, consultez <http://www.darpa.mil/work-with-us/additional-baa> .



Submissions en copie papier : Proposants élisant soumettre accord de subvention ou de coopération propositions car les copies papier doivent remplir le formulaire SF 424 R&R (Demande de Fédéral Assistance,) disponible sur le Site [Web Grants.gov http://aaapl.y07.grants.gov/aapl/y/form/s/sample/RR\\_SF424\\_2\\_0-V2.0.pdf](http://aaapl.y07.grants.gov/aapl/y/form/s/sample/RR_SF424_2_0-V2.0.pdf).

Le non-respect des procédures de soumission peut entraîner la soumission n'est pas évaluée. La DARPA reconnaîtra réception des soumissions complètes par e-mail et attribuer des numéros de contrôle qui doivent être utilisés dans toute correspondance ultérieure concernant les propositions.

#### **4.2.5. Divulgence de l'information et de la conformité avec la sauvegarde de la défense couverte** **Contrôles des informations**

Les dispositions suivantes et clause s'applique à tous appels d'offres et contrats ; cependant, la définition de « technique contrôlée informations » exonère clairement le travail considéré la recherche fondamentale et donc, même inclus dans le contrat, ne s'appliquera pas si les travaux est la recherche fondamentale.

DFARS 252.204-7000, "Divulgence d'informations"

DFARS 252.204-7008, « Conformité avec la sauvegarde des contrôles des informations de défense

couvertes » DFARS 252.204-7012, « Sauvegarde des informations de défense couvertes et signalement des incidents cybernétiques »

Le texte intégral de la clause de sollicitation et des clauses contractuelles ci-dessus peut être trouvé à <http://www.darpa.mil/work-with-us/additional-baa#NPRPAC>.

Respect des exigences ci-dessus comprend le mandat pour les proposants de mettre en œuvre les exigences de sécurité spécifiées par National Institut des normes et technologie (NIST)

Publication spéciale (SP) 800-171, « Protéger Contrôlé Non classé Information dans les systèmes d'information non fédéraux and Organizations » (voir <https://doi.org/10.6028/NIST.SP.800-171r1>) qui sont en vigueur au moment de l'émission du BAA, ou tel qu'autorisé par l'agent de négociation des contrats, au plus tard le 31 décembre 2017.

Pour les récompenses où le le travail est considéré recherche fondamentale, le contractant n'aura pas à mettre en œuvre exigences susmentionnées et garanties ; cependant, si la nature du travail change pendant l'exécution du prix, travail qui ne sont pas considérées comme de la recherche fondamentale seront assujetties à ces exigences.

#### **4.3. RESTRICTIONS DE FINANCEMENT**

N'est pas applicable.

#### **4.4. AUTRES EXIGENCES DE SOUMISSION**

N'est pas applicable.

### **5. Informations sur l'examen des candidatures**

#### **5.1. ÉVALUATION CRITÈRES**

Les propositions seront évaluées à l'aide des critères suivants, listés en descendant ordre d'importance:

5.1.1 Globalement mérite scientifique et technique ; 5.1.2 Contribution potentielle et pertinence pour la Mission DARPA ; et 5.1.3 Réalisme des coûts.

#### **5.1.1. Ensemble Scientifique et Mérite technique**

L'approche technique proposée est innovant, faisable, réalisable et complet.

Descriptions des tâches et techniques associées éléments fournis sont complets et en une séquence logique avec tous les livrables proposés clairement défini de telle sorte qu'un le résultat final qui atteint l'objectif peut être attendu à la suite de décerner. La proposition identifie les principaux technique les risques et les efforts d'atténuation prévus sont clairement définis et réalisables. Le Le plan d'atténuation des risques PREEMPT proposé fournit effectivement les éléments suivants : une évaluation des risques potentiels ; lignes directrices proposées pour assurer un maximum biosécurité et biosécurité; un gestion des risques planifier des communications responsables ; et un plan pour remédier comment la contribution du gouvernement et les intervenants communautaires être envisagée en ce qui concerne la communication et la publication d'informations potentiellement sensibles à double usage.

#### **5.1.2. Potentiel Apport et pertinence à la Mission DARPA**

Le potentiel contributions du projet sont pertinents pour la base technologique nationale. Plus précisément, la mission de la DARPA est de faire des investissements technologiques cruciaux précoces qui créent ou empêchent la surprise stratégique pour la sécurité nationale des États-Unis.

Le proposant démontre clairement sa capacité faire passer la technologie à les communautés militaires de recherche, industrielles et/ou opérationnelles dans un tel moyen de renforcer la défense américaine. De plus, l'évaluation prendra en considération l'étendue sur lesquels les droits de propriété intellectuelle (PI) proposés auront un impact potentiel la capacité du gouvernement à faire la transition vers la technologie.

#### **5.1.3. Réalisme des coûts**

Les frais proposés sont réaliste pour le technique et approche managériale et reflètent fidèlement les objectifs techniques et objectifs de la sollicitation. Les coûts proposés sont cohérents avec les propositions du proposant Énoncé des travaux et réfléchir une compréhension suffisante des coûts et du niveau d'effort avait besoin pour accomplir avec succès l'approche technique proposée. Les coûts pour le proposant principal et les sous-bénéficiaires proposés sont étayés par les détails fournis dans la proposition (par exemple, le type et le nombre d'heures de travail proposées par tâche, les types et les quantités de matériaux, d'équipements et frais de fabrication, de déplacement et tout autre coût applicable et la base des estimations).

Il est prévu que l'effort tirera parti toutes les recherches antérieures pertinentes disponibles afin pour tirer le meilleur parti de la financement disponible. Pour les efforts avec une probabilité d'application commerciale, un partage approprié des coûts directs peut être un facteur positif dans l'évaluation. La DARPA reconnaît que l'accent excessif sur le coût peut motiver les proposant à proposer des idées à faible risque avec un minimum d'incertitude et au personnel l'effort avec du personnel subalterne dans ordre d'être dans une posture plus compétitive. La DARPA décourage ces stratégies de coût.

## **5.2. EXAMEN DES PROPOSITIONS**

## **Processus de vérification**

C'est la politique de la DARPA d'assurer impartiale, équitable, proposition complète évaluations basées sur les critères d'évaluation énumérés à la section VA et de sélectionner la (ou les) source(s) dont l'offre répond aux technique du gouvernement, objectifs politiques et programmatiques.

La DARPA va réaliser une étude scientifique/technique examen de chaque proposition conforme. Les propositions conformes sont conformes à toutes les exigences détaillées dans le présent BAA ; des propositions qui ne pas le faire peut être considéré comme non conforme et peut être retiré de l'examen. Les propositions ne seront pas évalués les uns par rapport aux autres puisque ils ne sont pas soumis conformément à une règle commune déclaration de travail. DARPA intention est d'examiner les propositions au fur et à mesure dès que possible après leur arrivée ; toutefois, des propositions peuvent être revue périodiquement pour raisons administratives

Le ou les prix seront attribués aux proposants dont les propositions sont déterminés être le plus avantageux pour Gouvernement, conformément aux instructions et évaluation Critères spécifié dans le présent BAA et la disponibilité du financement.

## **Manipulation de Informations sur la sélection des sources**

La politique de la DARPA est traiter toutes les soumissions en tant qu'informations sur la sélection des sources (voir FAR 2.101 et

3.104), et de divulguer leur contenu uniquement pour le but de l'évaluation. Nonobstant les avis restrictifs, pendant le processus d'évaluation, les soumissions peuvent être pris en charge par des sous-traitants pour à des fins administratives et/ou d'aider à évaluation technique. Il est expressément interdit à tous les sous-traitants de support DARPA remplissant ce rôle d'effectuer des tâches techniques sponsorisées par DARPA. recherche et sont liés par une confidentialité appropriée les accords.

Sous réserve des restrictions énoncées dans la FAR 37.203(d), les commentaires sur les aspects techniques des propositions peuvent être sollicitées par la DARPA de consultants/experts non gouvernementaux qui sont strictement liés par les exigences de non-divulgaration.

## **Performance et intégrité des boursiers fédéraux Informations (FAPIS)**

Selon 41 USC 2313, tel que mis en œuvre par les FAR 9.103 et 2 CFR § 200.205, avant accordant une attribution au-dessus du seuil d'acquisition simplifié, la DARPA est tenue d'examiner et de prendre en compte toute information disponible via l'intégrité et système de performances (actuellement FAPIS). Les lauréats ont la possibilité de commenter informations les concernant saisies dans la base de données, et la DARPA examinera des commentaires, ainsi que avec d'autres informations dans FAPIS ou d'autres systèmes avant de faire une décerner.

## **6. Informations sur l'administration des récompenses**

### **6.1. AVIS DE SÉLECTION**

Dès que l'évaluation d'une proposition est terminée, les proposants sera informé que 1) la proposition a été sélectionnée pour le financement dans l'attente des négociations contractuelles, ou 2) la proposition n'a pas été sélectionnée. Ces notifications officielles seront envoyées par e-mail à la technique Point de contact identifié sur la feuille de couverture de la proposition.

### **6.1.1. Résumés des propositions**

La DARPA va répondre aux résumés avec une déclaration quant à savoir si La DARPA s'intéresse à l'idée. Si la DARPA ne recommande pas le proposant, soumettez un proposition complète, la DARPA fournira des commentaires au proposant concernant la justification de cette décision. Indépendamment de la réponse de la DARPA à une abstrait, les proposant peuvent soumettre une proposition complète. DARPA examinera tous propositions complètes soumises en utilisant les critères d'évaluation publiés et sans tenir compte tout commentaire résultant de la examen d'un résumé.

### **6.1.2. Propositions complètes**

Dès que l'évaluation d'une proposition est terminée, le proposant sera informé que (1) la proposition a été sélectionnée pour le financement en attendant les négociations d'attribution, en totalité ou en partie, ou (2) la proposition n'a pas été sélectionnée. Ces notifications officielles seront envoyées par e-mail à le POC technique et/ou le POC administratif identifié sur la proposition feuille de couverture.

## **6.2. EXIGENCES ADMINISTRATIVES ET POLITIQUES**

### **6.2.1. Exigences relatives aux réunions et aux déplacements**

Il y aura un réunion de lancement du programme dans les environs d'Arlington, VA et tous les principaux participants sont tenus d'y assister. Les artistes interprètes ou exécutants doivent également prévoir des Réunions PI et site périodique visites à à la discrétion du gestionnaire de programme de les environs d'Arlington, en Virginie.

Les proposant doivent inclure dans le contenu des détails de leur proposition et des coûts de tout voyage ou réunion qu'ils jugent être nécessaires tout au long de l'effort, pour inclure des examens périodiques de la situation par le gouvernement.

### **6.2.1. Clauses FAR et DFARS**

Clauses de sollicitation dans le FAR et DFARS pertinents pour les contrats d'approvisionnement et les clauses FAR et DFARS qui peuvent être compris dans tous les contrats d'approvisionnement qui en résultent sont incorporés ici et peut être trouvé à <http://www.darpa.mil/work-with-us/additional-baa>.

### **6.2.2. Informations contrôlées non classifiées (CUI) sur les systèmes d'information non-DoD**

Plus d'informations sur les informations non classifiées contrôlées sur les non-DoD Information Systèmes est incorporé ici peut être trouvé à <http://www.darpa.mil/work-with-us/additional-baa>.

### **6.2.3. Représentations et certifications**

Si un contrat d'approvisionnement est envisagé, les lauréats potentiels devront être inscrit dans la base de données SAM avant pour attribuer et remplir des représentations et des certifications annuelles électroniques conformes à la FAR indications à 4.1102 et 4.1201 ; les représentations et certifications peut être trouvé à [www.sam.gov](http://www.sam.gov). Des représentations et certifications supplémentaires peuvent être trouvées sur <http://www.darpa.mil/work-with-us/additional-baa>.

#### **6.2.4. Termes et conditions**

Un lien vers le DoD General Recherche Termes et Conditions pour les subventions et les accords de coopération et conditions d'agence supplémentaires et les conditions peuvent être trouvé à <http://www.darpa.mil/work-with-us/contract-management#GrantSupportiveAgreements>.

### **6.3. RAPPORTS**

Le nombre et types de les rapports seront spécifiés dans le document d'attribution, mais comprendra au minimum des rapports mensuels sur l'état financier et l'état technique trimestriels rapports. Les rapports doivent être préparés et soumis conformément aux procédures contenues dans le document d'attribution et d'un commun accord avant décerner. Rapports et des documents d'information seront également nécessaires, le cas échéant, pour documenter les progrès dans la réalisation des paramètres du programme. UN Rapport final qui résume le projet et des tâches seront nécessaires à la fin de la performance période d'attribution, nonobstant le fait que la recherche peut être poursuivie dans le cadre d'un véhicule de suivi.

### **6.4. ÉLECTRONIQUE SYSTÈMES**

#### **6.4.1. Flux de travail étendu (WAWF)**

Les interprètes vont être tenu de présenter des factures pour paiement directement à <https://wawf.ebmi>, sauf exception. Les artistes interprètes ou exécutants doivent s'inscrire auprès de WAWF avant toute récompense sous ce BAA.

#### **6.4.2. i-EDISON**

Le document d'attribution pour chaque proposition sélectionnée pour le financement contiendra une exigence obligatoire pour le brevet rapports et notifications à soumettre par voie électronique via i-Edison (<http://public.e-ra.nih.gov/i-edison>).

## **7. Contacts de l'agence Communication par e-**

**mail est préféré.** Points de contact

Le coordinateur BAA pour cet effort joignable à : [PREEMPT@darpa.mil](mailto:PREEMPT@darpa.mil)

DARPA/BTO

ATTN : HR001118S0017

675, rue Randolph Nord

Arlington, Virginie 22203-2114

Pour plus d'informations sur les protestations au niveau de l'agence voir <http://www.darpa.mil/work-with-us/additional-baa#NPRPAC>.

## **8. les autres informations**

La DARPA va organiser une journée des proposant en soutien au programme PREEMPT en **janvier 30 décembre 2018**, à la Conférence exécutive Centre à Arlington, Virginie. Le but est de offrir un potentiel

proposants avec informations sur le programme PREEMPT, promouvoir des discussions supplémentaires sur ce sujet, questions, fournir un forum présenter leurs capacités, et pour favoriser la constitution d'équipes.

Proposants intéressés ne sont pas requis à assister pour répondre au PREEMPT BAA, et les informations pertinentes et matériaux discuté lors de la journée des proposants sera fait disponible à tous les proposants potentiels sous la forme d'une FAQ publiée sur la DARPA Page Opportunités. L'événement sera diffusé sur le Web pour ceux qui souhaitent participer à distance.

La DARPA va ne rembourse pas les frais pour les proposants intéressés en attendant.

Un formulaire d'inscription en ligne et divers d'autres détails sur la réunion peuvent être trouvés sur le site [Web](https://event.ssa-metings.com/PREEMPTPropose rsDay) d'inscription, <https://event.ssa-metings.com/PREEMPTPropose rsDay>.

Pour encourager la formation d'équipes, les intéressés les proposants sont encouragés à soumettre des informations à partager avec tous les proposants potentiels via la journée des proposants site Web et la page des opportunités DARPA. Ces informations peuvent inclure des informations de contact, pertinent publications, et une diapositive ou affiche pour résumer les intérêts du proposant.

Les participants sont requis à s'inscrire au plus tard **le 23 janvier 2018**, pour la présence physique, et **le 26 janvier 2018**, pour la webdiffusion. Cet événement n'est pas ouvert à la presse. La journée des proposants sera ouverte aux membres de la public préalablement inscrit à l'événement ; **il n'y aura pas d'inscription sur place**.

Tous les ressortissants étrangers, y compris les résidents permanents, doit remplir et soumettre un Formulaire DARPA 60 « Demande de visite d'un ressortissant étranger », qui sera fourni dans l'inscription email de confirmation.

Point de contact pour la journée des proposants : [DARPA-SN-18-18@darpa.mil](mailto:DARPA-SN-18-18@darpa.mil).

**9. Annexe 1 – Liste de contrôle du Volume II**

**Volume II, Proposition de coûts  
Liste de contrôle et exemples de modèles**

**Le Suivant liste de contrôle et échantillon modèles sont à condition de pour aider la proposant en développement un Achevée et sensible Coût le volume. Plein des instructions apparaître dans Section**

**4.2.2 début sur Page 25 de HR001118S0017 . Cette feuille de travail doit être inclus avec la couverture de la proposition de coût.**

1. Sont tous éléments de la section 4.2.2 (volume II, proposition de coûts) de **HR001118S0017** inclus sur votre Proposition de coût feuille de couverture?
  - **OUI** ○ **NON** **Apparaît sur la ou les pages** [Type texte] Si la réponse est « Non », veuillez expliquer :
  
2. Votre proposition de coût comprend-elle (1) un résumé accumulation des coûts par phase, (2) a accumulation sommaire des coûts par année, et (3) un détaillé accumulation des coûts de chaque phase qui décompose chaque tâche et montre le coût par mois?
  - **OUI** ○ **NON** **Apparaît sur la ou les pages** [Type texte] Si la réponse est « Non », veuillez expliquer :
  
3. Est-ce que votre proposition de coût (montée détaillée des coûts #3 ci-dessus) au point 2) montrent une ventilation des principaux éléments de coût listé au dessous de:
  - Main-d'œuvre directe (catégories de main-d'œuvre, Horaires, Tarifs)
    - **OUI** ○ **NON** **Apparaît sur la ou les pages** [Type texte]
  
  - Coûts/tarifs indirects (c.-à-d. frais généraux, avantages sociaux, G&A)
    - **OUI** ○ **NON** **Apparaît sur la ou les pages** [Type texte]
  
  - Matériaux et/ou équipement
    - **OUI** ○ **NON** **Apparaît sur la ou les pages** [Type texte]
  
  - Sous-traitants/Consultants
    - **OUI** ○ **NON** **Apparaît sur la ou les pages** [Type texte]
  
  - Autres coûts directs
    - **OUI** ○ **NON** **Apparaît sur la ou les pages** [Type texte]
  
  - Voyage
    - **OUI** ○ **NON** **Apparaît sur la ou les pages** [Type texte]

Si la réponse est "Non", veuillez expliquer :
  
4. Avez-vous fourni des documents pour les frais proposés liés aux déplacements, inclure le but des voyages, les destinations de départ et d'arrivée et un exemple de billet d'avion ?
  - **OUI** ○ **NON** **Apparaît sur la ou les pages** [Type texte]



Si la réponse est "Non", veuillez expliquer :

5. Votre proposition de prix comprend-elle un détail complet liste de tous les articles de matériel et d'équipement à acheter (une nomenclature tarifée) ?
  - **OUI** ○ **NON Apparaît sur la ou les pages** [Type texte] Si la réponse est  
  
« Non », veuillez expliquer :
6. Votre proposition de prix comprend-elle des devis de fournisseurs ou estimations techniques écrites (base du devis) pour tout matériel et équipement dont le prix unitaire dépasse 5000 \$ ?
  - **OUI** ○ **NON Apparaît sur la ou les pages** [Type texte] Si la réponse est  
  
« Non », veuillez expliquer :
7. Votre proposition de coût comprend-elle une justification claire du coût de travail (travail écrit base d'estimation (BOE)) justifiant les catégories de main-d'œuvre et les heures proposées pour chaque tâche?
  - **OUI** ○ **NON Apparaît sur la ou les pages** [Type texte] Si la réponse est  
  
« Non », veuillez expliquer :
8. Avez-vous des sous-traitants/consultants ? Si oui, passez à la question 9. Si NON, passez à la question 13.
  - **OUI** ○ **NON Apparaît sur la ou les pages** [Type texte]
9. Votre proposition de prix comprend-elle des copies de tous les sous-traitants/consultants des propositions techniques (pour inclure l'énoncé des travaux) et des coûts ?
  - **OUI** ○ **NON Apparaît sur la ou les pages** [Type texte] Si la réponse est  
  
« Non », veuillez expliquer :
10. Toutes les propositions de sous-traitance incluent-elles la structure récapitulative requise, le coût détaillé accumulation et documentation à l'appui (SOW, Bill-of-Materials, Basis-of-Estimate, Vendor Citations, etc.) ?
  - **OUI** ○ **NON Apparaît sur la ou les pages** [Type texte] Si la réponse est  
  
« Non », veuillez expliquer :
11. Votre proposition de prix comprend-elle des copies des accords de consultant, si disponible?
  - **OUI** ○ **NON Apparaît sur la ou les pages** [Type texte] Si la réponse est  
  
« Non », veuillez expliquer :
12. Si vous demandez un Contrat basé sur FAR, est-ce que votre la proposition de coût comprend une analyse technique/des coûts pour tous les sous-traitants proposés ?
  - **OUI** ○ **NON Apparaît sur la ou les pages** [Type texte] Si la réponse est  
  
« Non », veuillez expliquer :

13. Demandez à tous les membres de l'équipe (maîtres d'œuvre et sous-traitants) considérés comme un centre de recherche et de développement financé par le gouvernement fédéral (FFRDC), d'inclure une documentation qui démontre clairement que le travail n'est pas autrement disponible auprès du secteur privé ET fourni une lettre sur papier à en-tête de l'organisme parrain citant le autorité spécifique établissant leur éligibilité à proposer aux sollicitations gouvernementales et rivaliser avec l'industrie, et le respect de l'accord et des conditions du sponsor FFRDC associé et conditions.

○ **OUI** ○ **NON** **Apparaît sur la ou les pages** [Type texte] Si la réponse est

« Non », veuillez expliquer :

14. Votre proposition comprend-elle une réponse concernant les conflits organisationnels de L'intérêt?

○ **OUI** ○ **NON** **Apparaît sur la ou les pages** [Type texte] Si la réponse est

« Non », veuillez expliquer :

15. Votre proposition comprend-elle un tableau/certification des déclarations de droits sur les données ?

○ **OUI** ○ **NON** **Apparaît sur la ou les pages** [Type texte] Si la réponse est

« Non », veuillez expliquer :

# Pièce originale 1

**From:** Murphy, Joseph P Maj USMC DARPA DIRO (USA) <[REDACTED]>  
**Sent:**  
**To:**  
**Cc:**  
**Subject:**

Capt xxxxx,

Thanks for responding.

I'm reaching out to communicate some information relative to COVID that I don't believe xxxxx or your director is aware of. You probably saw earlier this week that more official documents linking NIH and EcoHealth Alliance to the Wuhan Institute of Virology were published by The Intercept. I came across additional incriminating documents and produced an analysis shortly after leaving DARPA last month. This report was routed to the DOD IG office.

I'm unsure whether the significance of what I communicated is understood by those that received the report. Decisions with regards to the vaccines do not appear to be informed by analysis of the documents. The main points being that SARS-CoV-2 matches the SARS vaccine variants the NIH-EcoHealth program was making in Wuhan; that the DOD rejected the program proposal because vaccines would be ineffective and because the spike proteins being inserted into the variants were deemed too dangerous (gain-of-function); and that the DOD now mandates vaccines that copy the spike protein previously deemed too dangerous. To me, and to those who informed my analysis, this situation meets no-go or abort criteria with regards to the vaccines until the toxicity of the spike protein can be investigated. There's also information within the documents about which drugs effectively treat the program's SARS-CoVs.

Thus why I'm reaching out. I'm trying to help aid leadership grapple with the vaccines and the mandate with as much information as is available. I wanted to push this information your way.

Several of the documents referenced in the IG report have since been downgraded.

Please reach out to me with questions.

V/R,

Major Joe Murphy USMC  
Marine Program Liaison  
Code 34 & 35  
Office of Naval Research  
Work: [REDACTED]  
Cell: [REDACTED]

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]



UNCLASSIFIED

**DEFENSE ADVANCED RESEARCH PROJECTS AGENCY**  
675 NORTH RANDOLPH STREET  
ARLINGTON, VA 22203-2114

13 Aug 21

From: COMMANDANT OF THE MARINE CORPS FELLOW, DARPA  
To: INSPECTOR GENERAL

Subj: SARS-CoV-2 ORIGINS INVESTIGATION WITH US GOVERNMENT PROGRAM  
UNDISCLOSED DOCUMENT ANALYSIS

- Ref: (1) Executive Slide HR00118S0017 EcoHealth Alliance DEFUSE  
(2) HR00118S0017-PREEMPT-FP-019-PM Summary (Selectable - Not Recommended)  
(3) PREEMPT Volume 1 no ESS HR00118S0017 EcoHealth Alliance DEFUSE  
(4) PREEMPT Volume 2 EHA Final HR00118S0017 EcoHealth Alliance DEFUSE  
(5) SF424\_2\_0-V2.0 HR00118S0017 EcoHealth Alliance DEFUSE  
(6) WIV Budget packet HR00118S0017 EcoHealth Alliance DEFUSE  
(7) WS00094394-RR\_KeyPersonExpanded\_2\_0-V2.0 HR00118S0017 EcoHealth Alliance DEFUSE  
(8) WS00094394-RR\_PersonalData\_1\_2-V1.2 HR00118S0017 EcoHealth Alliance DEFUSE

1. SARS-CoV-2 is an American-created recombinant bat vaccine, or its precursor virus. It was created by an EcoHealth Alliance program at the Wuhan Institute of Virology (WIV), as suggested by the reporting surrounding the lab leak hypothesis. The details of this program have been concealed since the pandemic began. These details can be found in the EcoHealth Alliance proposal response to the DARPA PREEMPT<sup>11</sup> program Broad Agency Announcement (BAA) HR00118S0017, dated March 2018<sup>11</sup> - a document not yet publicly disclosed.

The contents of the proposed program are extremely detailed. Peter Daszak lays out step-by-step what the organization intends to do by phase and by location. The primary scientists involved, their roles, and their institutions are indicated. The funding plan for the WIV work is its own document. The reasons why nonpharmaceutical interventions like masks and medical countermeasures like the mRNA vaccines do not work well can be extrapolated from the details. The reasons why the early treatment protocols work as curatives are apparent.

SARS-CoV-2's form as it emerged is likely as a precursor, deliberately virulent, humanized recombinant SARSr-CoV that was to be reverse engineered into a live attenuated SARSr-Cov bat vaccine. Its nature can be determined from analysis of its genome with the context provided by the EcoHealth Alliance proposal. Joining this analysis with US intelligence collections on Wuhan will aid this determination.

UNCLASSIFIED

UNCLASSIFIED

When synthesized with the EcoHealth Alliance proposal, US collections confirm EcoHealth Alliance was performing the work proposed. The analysts produce their reports in a vacuum, absent the context the proposal provides. As a fellow at DARPA, I could see both, and can do the synthesis. For instance, WIV personnel identified in intelligence reports are named in the proposal, these people use the lexicon of the proposal in the collections, and the virus variants proposed for experimentation are identical to those gleaned by collections. Moreover, I am also privy to information obtained by congressional office investigators and by DRASTIC<sup>iv</sup>, which further corroborates that the program detailed in the BAA response was conducted until it was shut down in April 2020.

The purpose of the EcoHealth program, called DEFUSE<sup>v</sup> in the proposal, was to inoculate bats in the Yunnan, China caves where confirmed SARS-CoVs were found. Ostensibly, doing this would prevent another SARS-CoV pandemic; the bats' immune systems would be reinforced to prevent a deadly SARS-CoV from emerging. The specific language used is "inoculate bats with novel chimeric polyvalent spike proteins to enhance their adaptive immune memory against specific high-risk viruses."<sup>vi</sup> Being defense-related, it makes sense that EcoHealth submitted the proposal first to the Department of Defense, before it settled with NIH/NIAID. The BAA response is dated March 2018 and was submitted by Peter Daszak, president of EcoHealth Alliance.

DARPA rejected the proposal because the work was too close to violating the gain-of-function (GoF) moratorium,<sup>vii</sup> despite what Peter Daszak says in the proposal (that the work would not<sup>viii</sup>). As is known, Dr. Fauci with NIAID did not reject the proposal. The work took place at the WIV and at several sites in the US, identified in detail in the proposal.<sup>ix</sup>

The EcoHealth Alliance response to the PREEMPT BAA is placed along with other proposal documents in the PREEMPT folder on the DARPA Biological Technologies Office JWICS (top secret) share drive, address: Network/filer/BTO/CI Folder/PREEMPT

This folder was empty for a year. The files, completely unmarked with classification or distribution data, were placed in this folder in July 2021, which conspicuously aligns with media reporting, my probing, and Senator Paul's inquiry into NIH/NIAID gain-of-function programs. The unmarked nature combined with the timing signals that the documents were being hidden. No files at DARPA go unmarked in classification or distribution, including proprietary documents. Furthermore, PREEMPT is an unclassified program.

The files are also now held by Marine Corps Intelligence Activity (MCIA). They are identified in the reference block above.

2. SARS-CoV-2, hereafter referred to as SARSr-CoV-WIV, is a synthetic spike protein chimera engineered to attach to human ACE2 receptors and

UNCLASSIFIED

UNCLASSIFIED

inserted into a recombinant bat SARSr-CoV backbone. It is likely a live vaccine not yet engineered to a more attenuated state that the program sought to create with its final version. It leaked and spread rapidly because it was aerosolized so it could efficiently infect bats in caves, but it was not ready to infect bats yet, which is why it does not appear to infect bats. The reason the disease is so confusing is because it is less a virus than it is engineered spike proteins hitch-hiking a ride on a SARSr-CoV quasispecies swarm. The closer it is to the final live attenuated vaccine form, the more likely that it has been deattenuating since initial escape in August 2019.

The utility of certain countermeasures can be extrapolated from the documents:

- The team selected for SARSr-CoVs that were most monoclonal antibody and vaccine resistant.
- It is not practical to inoculate bats directly with shots, nor can bats get respiratory infections from droplets, so the team developed an aerosol to deliver the inoculations directly into the caves. To ensure it worked well, they developed the aerosol against masked civets.
- The proposal notes that interferon, Remdesivir, and chloroquine phosphate inhibit SARSr-CoV viral replication.

Because of its (now) known nature, the SARSr-CoV-WIV's illness is readily resolved with early treatment that inhibits the viral replication that spreads the spike proteins around the body (which induce a harmful overactive immune response as the body tries to clear the spikes from the ACE2 receptors). Many of the early treatment protocols ignored by the authorities work because they inhibit viral replication or modulate the immune response to the spike proteins, which makes sense within the context of what EcoHealth was creating. Some of these treatment protocols also inhibit the action of the engineered spike protein. For instance, Ivermectin (identified as curative in April 2020) works throughout all phases of illness because it both inhibits viral replication and modulates the immune response. Of note, chloroquine phosphate (Hydroxychloroquine, identified April 2020 as curative) is identified in the proposal as a SARSr-CoV inhibitor, as is interferon (identified May 2020 as curative).

The gene-encoded, or "mRNA," vaccines work poorly because they are synthetic replications of the already-synthetic SARSr-CoV-WIV spike proteins and possess no other epitopes. The mRNA instructs the cells to produce synthetic copies of the SARSr-CoV-WIV synthetic spike protein directly into the bloodstream, wherein they spread and produce the same ACE2 immune storm that the recombinant vaccine does. Many doctors in the country have identified that the symptoms of vaccine reactions mirror the symptoms of the disease, which corroborates with the similar synthetic nature and function of the respective spike proteins. The vaccine recipient has no defense against the bloodstream entry, but their nose protects them from the recombinant spike protein quasispecies during "natural infection" (better termed as aerosolized inoculation).

UNCLASSIFIED

UNCLASSIFIED

Furthermore, the EcoHealth proposal states that a "vaccine approach lacks sufficient epitope coverage to protect against quasispecies of coronavirus."\* Consequently, they were trying to make vaccines work by "targeted immune boosting via vaccine inoculators using chimeric polyvalent recombinant spike proteins."<sup>x1</sup> The nature of using a spike protein vaccine with one epitope against a spike protein vaccine with a quasispecies may explain the unusual (and potentially detrimental) antibody response amongst the vaccinated to the new COVID variants.<sup>x11</sup> Fundamentally, the knowledge the proposal provides signals that the risk of Antibody Dependent Enhancement (ADE) from vaccination should be evaluated with high priority, on top of the reality that single-epitope vaccines will have little effect against SARSr-CoV-WIV, as indicated in the proposal.

The potential for SARSr-CoV-WIV to deattenuate requires immediate attention. Live vaccines have been found to deattenuate in the past. If this is the case with SARSr-CoV-WIV, then the mass vaccination campaign actually performs an accelerated gain-of-function for it. Since it is designed for bats off of a human-susceptible SARS-CoV, vaccinating humans against it actually gains its function back towards a more deattenuated human-susceptible form. Improving the SARSr-CoV-WIV spike protein to gain robustness against monoclonal vaccines is one of the steps of the DEFUSE program. The mechanism to improve the SARSr-CoV-WIV spike protein (other than direct engineering) is to challenge it against animals that have spike protein-only antibodies. The attenuated virus will either die or adapt its form to neutralize the spike protein-only antibodies. The intent was to perform this task against humanized mice and then "batified" mice. Instead, it was done with the world's population.

SARSr-CoV-WIV is not meant to kill the bats, but to immunize them. This nature may explain its general harmlessness to most people, and its harmfulness to the old and comorbid, who are in general more susceptible to vaccine reactions. The asymptomatic nature is also explained by the bat vaccine-intention of its creators (a good vaccine does not generate symptoms). Such effects would be expected of an immature vaccine, or a vaccine being reverse engineered from a more virulent form into an attenuated form. The spike protein effect on ACE2 receptors exacerbates the harmfulness in accordance with age and comorbidity. The nature of SARSr-CoV-WIV's deattenuation will also indicate future virulence, though knowing its nature at last neutralizes the threat as effective treatments can be applied with confidence.

3. DRASTIC and other scientists will clean up my description of SARSr-CoV-WIV's nature and progression within the DEFUSE program. This information is sufficient for an investigative report and more than enough to correct the existing pandemic strategy. Previously, the nation did not know itself, nor the adversary in the pandemic conflict. Now it knows both. The problem can be framed appropriately and specifically against a confirmed hypothesis. Limiting disease transmission can be dropped as the implied strategic end, as it is not the actual problem,

UNCLASSIFIED

UNCLASSIFIED

nor is it actually feasible. The strategy will then align early treatment protocols and prophylaxis with the known curatives as ways and means. This course of action will achieve the strategic end of clinical resolution for those that are susceptible to the adverse effects from SARSr-CoV-WIV inoculation.

4. I will inevitably be asked how I figured this out and how I discovered the documents. The pandemic response became the predominant focus of my fellowship efforts. DARPA worked a number of pandemic innovations and much of its team was familiar with biodefense. I had the opportunity to "sit in the back row" per se and observe and listen-in on the government's efforts. My obligation-light fellowship also allowed me to observe and read the field. This observation grew in scope to the point that it became a series of reports, like a military scout would prepare when tasked to investigate a problem.

These reports served as iterative thinking against the problem over many months. Eventually, I arrived at a hypothesis that what leaked from the WIV could be a bat vaccine or its precursor. It was feasible that the US would try to avoid a SARS-CoV outbreak by stopping it at its source, not by halting its infections amongst people, but by halting the infections amongst the bats. Americans are creative, even if imprudent, and technologically confident enough to try it. This concept seemed to fit within the PREEMPT program construct as well, and DRASTIC had discovered that some earlier specimens within the USAID PREDICT program were obtained in Africa and sent to the WIV. Moreover, the unusual nature and pathology of the virus hinted that it could be a vaccine or be vaccine-like.

A technological challenge as difficult as inoculating bats in China would be tried at DARPA first. The massive, "Manhattan Project"-level of information suppression executed by the government and the Trusted News Initiative indicates that it would be covered-up if something bad happened. The lab-leak hypothesis and squabbling between Senator Paul and Dr. Fauci indicated that the cover up was more localized. Further, an actual cover-up would be more disciplined with its paperwork. So I presumed that unclassified files would be concealed on a higher network and found them where I expected them to be. I understood what they were and their content, pushed the files off-site, and compiled this report.

8/13/2021

X *J. Murphy*

---

Joseph Murphy  
Major, US Marine Corps  
Signed by: MURPHY.JOSEPH.PATRICK.1275023554

UNCLASSIFIED



UNCLASSIFIED

<sup>i</sup> DARPA: Defense Advanced Research Projects Agency

<sup>ii</sup> PREEMPT: Preventing Emerging Pathogenic Threats

<sup>iv</sup> DRASTIC: Decentralized Radical Autonomous Search Team Investigating COVID-19. This collection of scientists and sleuths broke open the lab leak hypothesis into the mainstream and has picked apart Chinese and World Health Organization (WHO) reports on SARS-CoV-2's origins in Wuhan.

<sup>v</sup> DEFUSE: Defusing Threat of Bat-borne Coronavirus

<sup>vi</sup> PREEMPT Volume 1 no ESS HR00118S0017 EcoHealth Alliance DEFUSE. Another description used: "We will develop recombinant chimera spike proteins from known SARSr-CoVs, and those characterized by DEFUSE, using details of SARS S protein structure and host cell binding, we will sequence, reconstruct, and characterize spike trimmers and RBDs of SARSr-CoVs, incorporate them into nanoparticles or raccoon poxvirus vectors for delivery to bats."

<sup>vii</sup> Dr. James Gimbert, DARPA Program Manager states: "team's approach does potentially involve GoF/DURC research (they aim to synthesize spike glycoproteins that may bind to human cell receptors and insert them into SARS-CoV backbones to assess capacity to cause SARS-like disease."

<sup>viii</sup> "We will commercially synthesize SARSr-CoV S glycoprotein genes, designed for insertion into SHC014 or WIV16 molecular clone backbones (88% and 97% S protein identity to epidemic SARS-Urbani). These are BSL-3, not select agents or subject to P3CO" (they use bat SARSr-CoV backbones which are exempt)"

<sup>ix</sup> Duke NUS Medical School, UNC, USGS National Wildlife Health Center, Palo Alto Research Center, Kumming, Singapore, and Madison, WI.

<sup>x</sup> PREEMPT Volume 1 no ESS HR00118S0017 EcoHealth Alliance DEFUSE

<sup>xi</sup> PREEMPT Volume 1 no ESS HR00118S0017 EcoHealth Alliance DEFUSE

<sup>xii</sup> "For Delta, neutralizing antibodies have a decreased affinity for spike protein, while facilitating antibodies have a "strikingly increased" affinity for spike protein." Yahi, et al. "Infection-enhancing anti-SARS-CoV-2 antibodies recognize both the original Wuhan/D614G strain and Delta variants. A potential risk for mass vaccination?" *Journal of Infection*. August 9, 2021. [https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453\(21\)00392-3/fulltext](https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(21)00392-3/fulltext)

UNCLASSIFIED



DEFENSE ADVANCED RESEARCH PROJECTS AGENCY  
675 NORTH RANDOLPH STREET  
ARLINGTON, VA 22203-2114

PM SUMMARY SHEET  
SOURCE SELECTION SENSITIVE

Solicitation Number: HR001118S0017  
Solicitation Title: PREventing EMerging Pathogenic Threats (PREEMPT)  
PM Name: James Gimlett  
Proposer: EcoHealth Alliance  
Proposal Title: Project DEFUSE: Defusing the Threat of Bat-borne Coronaviruses  
Proposal Identifier: HR001118S0017-PREEMPT-FP-019

I have reviewed the attached proposal and Evaluation Reports and find that this proposal is selectable based on the evaluation criteria included in the BAA. However, I am not recommending funding at this time based on the rationale provided below.

Funding Requested (by proposer):

Phase I	Phase II	Total
\$8,411,546	\$5,797,699	\$14,209,245

This proposal aims to identify and model spillover risk of novel, pandemic-potential SARS-related coronaviruses (SARSr-CoVs) in Asia, focusing specifically on known hotspot bat caves in China. In prior work under USAID Predict, the team identified high risk of SARSr-CoVs in specific caves in Asia. The project has a good running start since the hotspot caves already test positive, with high prevalence, for several SARSr viruses so the team won't be looking for needles in haystacks. The team will build on past surveillance work as well as some impressive work in developing geo-based risk maps of zoonotic hotspots based on past spillovers and ecological data. Two approaches are proposed to preempt zoonotic spillover through reduction of viral shedding in the bat caves: 1) innate immune boosting to downregulate viral regulation; 2) targeted immune boosting via vaccine inoculations using chimeric polyvalent recombinant spike proteins to protect against specific high risk viruses.

Two of three reviewers marked this proposal as Selectable. Key strengths are the experienced team and the selected coronavirus hotspot caves that show high prevalence for novel bat coronaviruses. Experimental in vivo and in vitro work is logically thought out and will be used to validate molecular and evolutionary models. Proposed preemption approaches, while somewhat conventional, have the advantage of a fast timeline for validation on bat or "batenized" mouse models. Multiple vaccine delivery mechanisms are proposed, including aerosolized spray, transdermal nanoparticle application, and edible adhesive gels. However, several weaknesses to the proposal were also noted. These include a lack of detail regarding data, statistical analyses and model development and how prior work will be leveraged and extended. Proposal also lacks clear decision points to assess the deployment and validation of TA2 preemption methods in the

**SUMMARY OF PROPOSED COSTS**

**Wuhan Institute of Virology (WIV)**

DARPA-BAA-HR00141880017

	PHASE 1		PHASE 2		PROJECT TOTAL
	BASE 1 12/1/2018 Through 11/30/2019	BASE 2 12/1/2019 Through 11/30/2020	OPTION 1 12/1/2020 Through 11/30/2021	OPTION 2 12/1/2021 Through 5/31/2022	
Direct Labor - Senior and Key Personnel	37,975	37,975	37,975	22,153	136,078
Direct Labor - Other Personnel	37,027	40,824	40,824	18,987	137,662
Fringe Benefits	22,500	23,639	23,639	12,341	82,119
Total Direct Labor & Fringe Benefits	97,502	102,438	102,438	53,481	355,859
Materials and Supplies	167,661	198,167	210,887	96,597	643,113
Travel	16,739	7,282	15,823	8,027	47,871
Equipment	0	0	0	0	0
Other Direct Costs	8,200	6,200	6,200	8,200	28,800
Total Other Direct Costs	192,600	211,649	232,410	82,824	719,484
Subtotal: Direct Labor, Fringe, Overhead & Other Direct Co	290,102	314,087	334,848	136,305	1,075,343
Exclusion(e) From Base For F&A	0	0	0	0	0
Adjusted Base for F&A	290,102.25	314,087.15	334,848.25	136,305.25	1,075,342.90
F&A	28,010.00	31,409.00	33,485.00	13,631.00	107,535.00
Total Proposed Cost	319,112.25	345,496.15	368,333.25	149,936.25	1,182,877.90
	10.0%	10.0%	10.0%	10.0%	10.0%

Total Labor	summary	e
\$358,179.69	355,859	#####

PROJECT/DEFUSE	DIRECT LABOR BREAKDOWN											
	PHASE ONE - BASE PERIOD (24 months)						PHASE TWO - BASE PERIOD (24 months)					
	BASE 1			BASE 2			BASE 1			BASE 2		
	Hourly Rate	# Months	# Hours	Total Salary Amount Y1	Hourly Rate	# Months	# Hours	Total Salary Amount Y2	Hourly Rate	# Months	# Hours	Total Salary Amount Y2
Personnel												
Investigator	\$25.56	3.00	528	\$13,496	\$25.56	3.00	528	\$13,496	\$25.56	3.00	528	\$13,496
Dr. Peng Zhou (Senior Scientist)	\$18.26	6.00	1056	\$19,283	\$18.26	6.00	1056	\$19,283	\$18.26	6.00	1056	\$19,283
Dr. Ben Hu (Research Fellow)	\$10.95	3.00	528	\$5,784	\$10.95	3.00	528	\$5,784	\$10.95	3.00	528	\$5,784
Associate Professor	\$13.69	6.00	1056	\$14,460	\$13.69	6.00	1056	\$14,460	\$13.69	6.00	1056	\$14,460
Senior Technician	\$10.95	6.00	1056	\$11,569	\$10.95	6.00	1056	\$11,569	\$10.95	6.00	1056	\$11,569
Technician 1	\$7.30	9.00	1584	\$11,569	\$7.30	6.00	1056	\$7,712	\$7.30	6.00	1056	\$7,712
Technician 2	\$7.30	6.00	1056	\$7,712	\$7.30	6.00	1056	\$7,712	\$7.30	6.00	1056	\$7,712
<b>TOTAL DIRECT LABOR</b>				\$76,156				\$80,012				\$80,012
FRINGE BENEFITS												
	30.00%			\$22,846.84	30.00%			\$24,003.99	30.00%			\$24,003.99
<b>Fringe</b>				\$99,002.97				\$104,016.00				\$104,016.00

PERSONNEL	DIRECT LABOR BREAKDOWN											
	PHASE ONE - BASE PERIOD (18 months)						PHASE TWO - OPTION PERIOD (18 months)					
	OPTION 1			OPTION 2			OPTION 1			OPTION 2		
	Hourly Rate	# Months	# Hours	Total Salary Amount Y1	Hourly Rate	# Months	# Hours	Total Salary Amount Y1	Hourly Rate	# Months	# Hours	Total Salary Amount Y3.5
Dr. Zhengli Shi (Co-Investigator)	\$25.56	3.00	528	\$13,496	\$25.56	2.00	352	\$8,997	\$25.56	2.00	352	\$8,997
Dr. Peng Zhou (Senior Scientist)	\$18.26	6.00	1056	\$19,283	\$18.26	3.00	528	\$9,641	\$18.26	3.00	528	\$9,641
Dr. Ben Hu (Research Fellow)	\$10.95	3.00	528	\$5,782	\$10.95	2.00	352	\$3,954	\$10.95	2.00	352	\$3,954
Associate Professor	\$13.69	6.00	1056	\$14,457	\$13.69	3.00	528	\$7,228	\$13.69	3.00	528	\$7,228
Senior Technician	\$10.95	6.00	1056	\$11,563	\$10.95	3.00	528	\$5,782	\$10.95	3.00	528	\$5,782
Technician 1	\$7.30	6.00	1056	\$7,709	\$7.30	3.00	528	\$3,854	\$7.30	3.00	528	\$3,854
Technician 2	\$7.30	6.00	1056	\$7,709	\$7.30	3.00	528	\$3,854	\$7.30	3.00	528	\$3,854
<b>TOTAL DIRECT LABOR</b>				\$79,997				\$79,997				\$79,997
FRINGE BENEFITS												
	30.00%			\$23,999.16	30.00%			\$23,999.16	30.00%			\$23,999.16
<b>TOTAL LABOR (Salary + Fringe)</b>				\$103,996.48				\$103,996.48				\$103,996.48

Total Travel	\$47,571.00
Base 1	\$16,739.00
Base 2	\$7,282.00
Option 1	\$15,523.00
Option 2	\$8,027.00

Wuhan Institute of Virology - TRAVEL BREAKDOWN									
WIV	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9
DARPA BAA-HR0011880017	Purpose: DAA/FA Kick-off Meeting (G1 #1 key personnel)		Location: Arlington, VA	Contract Period: Base 1					
	Days	# of People	Airfare	Per Diem	Leasing	Other	Total		
	4	3	\$2,618.00	\$60.00	\$14.00	\$112.00	\$4,804.00		
<b>Itemized Expenses for "Other"</b>									
	Description	Amount							
	Transportation within Wuhan airport	\$111.00							
	Transportation within Wuhan airport	\$102.00							
	Transportation within Wuhan airport	\$171.00							
	Total	\$384.00							
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9
	Purpose: Annual Meeting (G1 #2 key personnel)		Location: New York, NY	Contract Period: Base 1					
	Days	# of People	Airfare	Per Diem	Leasing	Other	Total		
	6	3	\$241.00	\$74.50	\$21.00	\$112.00	\$548.50		
<b>Itemized Expenses for "Other"</b>									
	Description	Amount							
	Transportation within Wuhan airport	\$168.00							
	Transportation within NYC airport	\$254.00							
	Transportation within NYC airport	\$591.00							
	Total	\$1,013.00							
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9
	Purpose: Ecological Society of America Conference (G1 #3 key personnel)		Location: New York, NY	Contract Period: Base 2					
	Days	# of People	Airfare	Per Diem	Leasing	Other	Total		
	4	3	\$1,311.00	\$29.00	\$13.91	\$105.00	\$1,458.91		
<b>Itemized Expenses for "Other"</b>									
	Description	Amount							
	Transportation within Wuhan airport	\$112.00							
	Transportation within NYC airport	\$4							
	Total	\$116.00							
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9
	Purpose: Annual Meeting in NYC (G1 #2 key personnel)		Location: New York, NY	Contract Period: Option 1					
	Days	# of People	Airfare	Per Diem	Leasing	Other	Total		
	4	3	\$849.00	\$74.00	\$191.00	\$163.00	\$1,277.00		
<b>Itemized Expenses for "Other"</b>									
	Description	Amount							
	Transportation within Wuhan airport	\$168.00							
	Transportation within NYC airport	\$324.00							
	Total	\$492.00							
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9
	Purpose: International Conference on Emerging Infectious Diseases (G1 #1 key personnel)		Location: Atlanta, GA	Contract Period: Option 1					
	Days	# of People	Airfare	Per Diem	Leasing	Other	Total		
	4	2	\$7,024.00	\$28.00	\$44.00	\$124.00	\$7,220.00		
<b>Itemized Expenses for "Other"</b>									
	Description	Amount							
	Transportation within Wuhan airport	\$111.00							
	Transportation within Wuhan airport	\$111.00							
	Transportation within NYC airport	\$324.00							
	Total	\$566.00							
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9
	Purpose: Annual Meeting (G1 #2 key personnel)		Location: New York, NY	Contract Period: Option 1					
	Days	# of People	Airfare	Per Diem	Leasing	Other	Total		
	3	1	\$147.00	\$74.50	\$21.00	\$112.00	\$354.50		
	4	1	\$449.00	\$74.50	\$191.00	\$105.00	\$729.50		
<b>Itemized Expenses for "Other"</b>									
	Description	Amount							
	Transportation within Wuhan airport	\$168.00							
	Transportation within NYC airport	\$168.00							
	Transportation within NYC airport	\$524.00							
	Total	\$860.00							
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9
	Purpose: Annual Meeting (G1 #2 key personnel)		Location: New York, NY	Contract Period: Option 1					
	Days	# of People	Airfare	Per Diem	Leasing	Other	Total		
	3	1	\$147.00	\$74.50	\$21.00	\$112.00	\$354.50		
	4	1	\$449.00	\$74.50	\$191.00	\$105.00	\$729.50		
<b>Itemized Expenses for "Other"</b>									
	Description	Amount							
	Transportation within Wuhan airport	\$168.00							
	Transportation within NYC airport	\$168.00							
	Transportation within NYC airport	\$524.00							
	Total	\$860.00							

NOTE: Dr. Shi will stay an additional day for Project Closeout



WIV DARPA-BAA- HR001118S0017

SUMMARY COST BUILDUP BY PHASE					
	Phase I:		Phase II:		All Phases
	24 MONTHS 12/1/18 - 11/30/20	18 MONTHS 12/1/20 - 05/30/22	42 MONTHS 12/1/18 - 5/30/22		
Personnel	\$ 153,601	\$ 119,939	\$ 273,740		
Fringe Benefits	\$ 46,139	\$ 35,980	\$ 82,119		
Supplies	\$ 365,828	\$ 277,285	\$ 643,113		
Travel	\$ 24,021	\$ 23,550	\$ 47,571		
Other Direct Costs	\$ 14,400	\$ 14,400	\$ 28,800		
Indirect Costs	\$ 60,419	\$ 47,116	\$ 107,535		
<b>TOTAL</b>	<b>\$ 664,608</b>	<b>\$ 518,270</b>	<b>\$ 1,182,878</b>		

SUMMARY COST BUILDUP BY YEAR					
	Year 1	Year 2	Year 3	Year 4	TOTAL PROJECT
Personnel	\$ 75,002	\$ 78,799	\$ 78,799	\$ 41,140	\$ 273,740
Fringe Benefits	\$ 22,500	\$ 23,639	\$ 23,639	\$ 12,341	\$ 82,119
Supplies	\$ 167,661	\$ 198,167	\$ 210,687	\$ 66,597	\$ 643,113
Travel	\$ 16,739	\$ 7,282	\$ 15,523	\$ 8,027	\$ 47,571
Other Direct Costs	\$ 8,200	\$ 6,200	\$ 6,200	\$ 8,200	\$ 28,800
Indirect Costs	\$ 29,010	\$ 31,409	\$ 33,485	\$ 13,631	\$ 107,535
<b>TOTAL</b>	<b>\$ 319,112</b>	<b>\$ 345,496</b>	<b>\$ 368,333</b>	<b>\$ 149,936</b>	<b>\$ 1,182,878</b>





Wuhan Institute of Virology  
DARPA-BAA-HR001118S0017

PROJECT DEFUSE	DIRECT LABOR BREAKDOWN											
	PHASE ONE - BASE PERIOD (24 months)						PHASE TWO - OPTION PERIOD (18 months)					
	BASE 1			BASE 2			BASE 1			BASE 2		
Personnel	Hourly Rate	# Months	# Hours	Total Salary Amount Y1	Hourly Rate	# Months	# Hours	Total Salary Amount Y2	Hourly Rate	# Months	# Hours	Total Salary Amount Y2
Investigator	\$25.56	3.00	528	\$13,488	\$25.56	3.00	528	\$13,488	\$25.56	3.00	528	\$13,488
Dr. Peng Zhou (Senior Scientist)	\$18.26	6.00	1056	\$10,956	\$18.26	6.00	1056	\$10,956	\$18.26	6.00	1056	\$10,956
Dr. Ben Hu (Research Fellow)	\$10.95	3.00	528	\$5,784	\$10.95	3.00	528	\$5,784	\$10.95	3.00	528	\$5,784
Associate Professor	\$13.69	6.00	1056	\$14,460	\$13.69	6.00	1056	\$14,460	\$13.69	6.00	1056	\$14,460
Senior Technician	\$10.95	6.00	1056	\$11,568	\$10.95	6.00	1056	\$11,568	\$10.95	6.00	1056	\$11,568
Technician 1	\$7.30	9.00	1584	\$11,568	\$7.30	9.00	1584	\$11,568	\$7.30	9.00	1584	\$11,568
Technician 2	\$7.30	6.00	1056	\$7,712	\$7.30	6.00	1056	\$7,712	\$7.30	6.00	1056	\$7,712
<b>TOTAL DIRECT LABOR</b>				<b>\$76,156</b>				<b>\$76,156</b>				<b>\$80,012</b>
<b>FRINGE BENEFITS (Fringe)</b>				<b>\$22,848.84</b>				<b>\$22,848.84</b>				<b>\$24,003.69</b>
				<b>\$99,002.97</b>				<b>\$99,002.97</b>				<b>\$104,016.00</b>

Total Labor	\$358,179.69
-------------	--------------

summary e  
355,859 #####

PERSONNEL	DIRECT LABOR BREAKDOWN											
	PHASE ONE - BASE PERIOD (24 months)						PHASE TWO - OPTION PERIOD (18 months)					
	OPTION 1			OPTION 2			OPTION 1			OPTION 2		
Personnel	Hourly Rate	# Months	# Hours	Total Salary Amount Y3	Hourly Rate	# Months	# Hours	Total Salary Amount Y3.5	Hourly Rate	# Months	# Hours	Total Salary Amount Y3.5
Dr. Zhengli Shi (Co-Investigator)	\$25.56	3.00	528	\$13,488	\$25.56	2.00	352	\$8,997	\$25.56	2.00	352	\$8,997
Dr. Peng Zhou (Senior Scientist)	\$18.26	6.00	1056	\$19,283	\$18.26	3.00	528	\$9,841	\$18.26	3.00	528	\$9,841
Dr. Ben Hu (Research Fellow)	\$10.95	3.00	528	\$5,782	\$10.95	2.00	352	\$3,854	\$10.95	2.00	352	\$3,854
Associate Professor	\$13.69	6.00	1056	\$14,457	\$13.69	3.00	528	\$7,228	\$13.69	3.00	528	\$7,228
Senior Technician	\$10.95	6.00	1056	\$11,563	\$10.95	3.00	528	\$5,782	\$10.95	3.00	528	\$5,782
Technician 1	\$7.30	6.00	1056	\$7,708	\$7.30	3.00	528	\$3,854	\$7.30	3.00	528	\$3,854
Technician 2	\$7.30	6.00	1056	\$7,709	\$7.30	3.00	528	\$3,854	\$7.30	3.00	528	\$3,854
<b>TOTAL DIRECT LABOR</b>				<b>\$79,997</b>				<b>\$39,357</b>				<b>\$39,357</b>
<b>FRINGE BENEFITS</b>				<b>\$23,999.18</b>				<b>\$11,807.14</b>				<b>\$11,807.14</b>
<b>TOTAL LABOR (Salary + Fringe)</b>				<b>\$103,996.48</b>				<b>\$51,164.26</b>				<b>\$51,164.26</b>

24 March 2018

Dear Committee for DARPA Preventing Emerging Pathogenic Threats (PREEMPT),

Please accept the following proposal to the PREventing EMerging Pathogenic Threats (PREEMPT, HR0011850017) program. The PI for this project is:

Dr. Peter Daszak  
President, EcoHealth Alliance  
460 W. 34<sup>th</sup> Street, 17<sup>th</sup> Floor  
New York, NY 10001  
212-380-4474

Title: Project Defuse: Defusing the Threat of Bat-Borne Coronaviruses

Amount of the Requested Proposal: \$14,209,245

Thank you for your time, and I look forward to hearing from you. If you have any questions, do not hesitate to call or email me.

Yours sincerely,



Aleksel Chimura  
Chief of Staff, EcoHealth Alliance  
460 W. 34<sup>th</sup> Street, 17<sup>th</sup> Floor  
New York, NY 10001  
212-380-4473

### Project DEFUSE: Defusing the Threat of Bat-borne Coronaviruses



Principal Investigator and  
Technical Point of Contact

Peter Daszak, PhD  
EcoHealth Alliance  
460 West 34th Street, 17th Floor  
New York, NY 10001  
(p) 212-380-4474  
(e) daszak@ecohealthalliance.org  
(f) 212-380-4465

Administrative Point of Contact

Lalio Hamel  
EcoHealth Alliance  
460 West 34th Street, 17th Floor  
New York, NY 10001  
(p) 646-966-4709  
(e) hamel@ecohealthalliance.org  
(f) 212-380-4465

Identifying Number: HR0011850017-4-DEFUSE-401

Award Instrument Requested: Grant  
Places and Periods of Performance: 12/1/18 - 5/31/22; Palo Alto, CA; Kunning and  
Wuhan, China; Chapel Hill, NC; New York, NY; Singapore; Madison, WI

Total funds requested: \$14,209,245

Proposal validity period: 6 months

Date proposal submitted: 3/27/18

**Section II**  
**A. EXECUTIVE SUMMARY**

**Technical Approach:** Our goal is to defuse the potential for spillover of novel bat-origin high-zoonotic risk SARS-related coronaviruses in Asia. In TA1 we will intensively sample bats at our field sites where we have identified high spillover risk SARS-CoVs. We will sequence their spike proteins, reverse engineer them to conduct binding assays, and insert them into bat SARS-CoV (WIV1, S-HCoV14) backbones (these use bat-SARS-CoV backbones, not SARS-CoV, and are exempt from dual-use and gain of function concerns) to infect humanized mice and assess capacity to cause SARS-like disease. Our modeling team will use these data to build machine-learning genotype-phenotype models of viral evolution and spillover risk. We will uniquely validate these with serology from previously-collected human samples via LIPS assays that assess which spike proteins allow spillover into people. We will build host-pathogen spatial models to predict the bat species composition of caves across Southeast Asia, parameterized with a full inventory of host-virus distribution at our field test sites, three caves in Yunnan Province, China, and a series of unique global datasets on bat host-viral relationships. By the end of Y1, we will create a prototype app for the warfighter that identifies the likelihood of bats harboring dangerous viral pathogens at any site across Asia.

In TA2, we will evaluate two approaches to reduce SARS-CoV shedding in cave bats: (1) Broad-scale immune boosting, in which we will inoculate bats with immune modulators to upregulate their innate immune response and downregulate viral replication; (2) Targeted immune boosting, in which we will inoculate bats with novel chimeric polyvalent recombinant spike proteins plus the immune modulator to enhance innate immunity against specific, high-risk viruses. We will trial inoculum delivery methods on captive bats including a novel automated aerosolization system, transdermal nanoparticle application and edible gavage gels. We will use stochastic simulation modeling informed by field and experimental data to characterize viral dynamics in our cave test sites, maximize timing, inoculation protocol, delivery method and efficacy of viral suppression. The most effective biologicals will be trialed in our test cave sites in Yunnan Province, with reduction in viral shedding as proof-of-concept. **Management Approach:** Members of our collaborative group have worked together on bats and their viruses for over 15 years. The lead organization, EcoHealth Alliance, will oversee all work. EHA staff will develop models to evaluate the probability of specific SARS-related CoV spillover, and identify the most effective strategy for delivery of both immune boosting and immune targeting inocula. Specific work will be subcontracted to the following organizations:

- Prof. Baric, Univ. N. Carolina, will lead targeted immune boosting work, building on his two-decade track record of reverse-engineering CoV and other virus spike proteins.
  - Prof. Wang, Duke-NUS, Univ. Singapore, will lead work on broad-scale immune boosting, building on his group's pioneering work on bat immunity.
  - Dr. Shi, Wuhan Institute of Virology will conduct viral testing on all collected samples, binding assays and some humanized mouse work.
  - Dr. Rocks, USGS National Wildlife Health Center, will optimize delivery of immune modulating biologicals, building on her vaccine delivery work in wildlife, including bats.
  - Dr. Unidaid, Palo Alto Research Center will lead development of novel delivery automated aerosolization mechanism for immune boosting molecules.
- We are requesting \$14,209,245 total funds for this project across 3.5 project years.

**Section II**  
**C. GOALS AND IMPACT**

**Overview:** The overarching goals of DEFUSE are to:

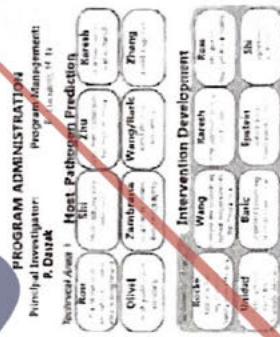
- Identify and model spillover risk of novel SARS-related coronaviruses (SARS-CoV) in Asia.
  - Design and demonstrate proof-of-concept that upregulating the naturally low innate immunity of bats (broad-scale immune boosting) and targeting high risk SARS-CoV in particular (targeted immune boosting) will transiently reduce spillover risk.
- Our strategy to reduce risk of viral emergence from bats will protect the warfighter within USPACOM, and will be scalable to other regions and viruses (Ebola, Hantavirus, rabies).

**Innovation and uniqueness:**

Bats harbor more emerging zoonoses than any other group of mammals, are ubiquitous, abundant, and often overlooked. However, other than LPS, there is no available technology to reduce exposure risk to novel CoVs from bats, and no effective therapeutics or countermeasures. SARS-CoVs are enzootic in Asian, African, and European bats that roost in caves but forage widely at night, shedding virus in their feces and urine. We have now published direct evidence of spillover of novel SARS-CoVs into people in Yunnan Province, China, close to a cave complex where we have isolated strains that produce SARS-like viruses in humanized mice but don't respond to an antibody treatment or vaccination. These viruses are a clear and present danger to our military and to global health security because of their circulation and evolution in bats and periodic spillover into humans.

EcoHealth Alliance (EHA) leads the world in predictive models of viral emergence. We will use machine-learning models of spillover hotspots, host-pathogen spatial and genotype-phenotype mapping, and unique datasets to validate and refine hotspot risk maps of viral emergence. We have shown that dampened innate immunity in bats allows them to carry otherwise lethal viruses, likely as an adaptation to the physiologic stress of flight. We will design strategies like small molecule RIG-like receptor (RLR) or Toll-like receptor (TLR) agonists, to upregulate bat immunity, and suppress viral replication, thereby significantly reducing viral shedding and spillover (broad-scale immune boosting). We will complement this by coupling agonists treatments with SARS-CoV recombinant spike proteins to boost pre-existing adaptive immune response adult bats against specific, high-risk SARS-CoVs (targeted immune boosting). We will design novel delivery and automated application methods, based on our previous work on wildlife vaccines, to reduce hazard during deployment.

Technical Area 1



Our strategy begins by a complete inventory of bats and their SARS-CoVs at our intervention test site cave complex in Yunnan, China that harbors bats with high-risk SARS-CoVs. We will collect data from three caves in that system (one is our intervention test site and two collocated sites) on: monthly bat abundance and diversity; viral prevalence and diversity; individual bat viral load and host physiological markers; genomic characterization of low- and high-risk SARS-CoV strains among bat species, sexes, and age classes; satellite telemetry and mark-recapture data on bat home range and inter-cave movement; and monitoring of daily, weekly and seasonal changes in bat populations. We will use stochastic neutral networks to build joint species distribution models (SDM) to predict bat species composition of caves, and high-risk SARS-CoV diversity across S. China, South and SE Asia. These will be parameterized with BHA's database of bat host-viral relationships and estimates of zoonotic viral richness per bat species<sup>7</sup>; biological inventory data on all bat caves in Southern China; the full SARS-CoV inventory from our cave test sites in Yunnan; and species distribution data for all bats. We will test and validate viral diversity predictions using data from >10,000 previously collected bat samples from 6 Asian countries under our USAID-funded PREDICT project. We will produce a prototype app for the warfighter to identify the risk of bats harboring dangerous viruses at a site. This 'spatial viral spillover risk' app will be field-deployable and updated real-time with surveillance data, to ground-truth and fine-tune predictions.

To characterize spillover risk of SARS-CoV zoonoses (Q5), the Wuhan Institute of Virology team (WIV) will test bat fecal, oral, and blood samples for SARS-CoVs by PCR. We will collect viral load data from fresh fecal pellets. SARS-CoV spike proteins will be sequenced, viral recombination events identified, and isolates used to identify strains that can replicate in human cells. The Univ. N. Carolina (UNC) team will reverse-engineer spike proteins of a large sample of high- and low-risk viruses for further characterization. This will effectively freeze the Q5 we analyze at t=0. These Q5s strain viral spike glycoproteins will be synthesized, and those binding to human cell receptor ACE2 will be inserted into SARS-CoV backbone (non-DURC, non-Gof), and inoculated into humanized mice to assess capacity to cause SARS-like disease, efficacy of monoclonal therapies, the inhibitor GS-5734<sup>8</sup>, or vaccines against SARS-CoV<sup>4,11</sup>.

We will use these data to build machine-learning genotype-to-phenotype Bayesian network models of viral evolution and host jump risk. These will predict the capacity of Q5s strains to infect human cells based on genetic traits and experimental assays above. Using data on diversity of spike proteins, recombinant CoVs, and flow of genes via bat movement and migration, we will estimate evolutionary rates, rates of recombination, and capacity to generate novel strains capable of human infection. Finally, virus-host relationship and bat home range data will be used to estimate spillover potential - extending models well beyond our field sites. We will validate model predictions of host jump risk by 1) conducting further spike

protein-based binding and cell culture experiments, and 2) identifying whether designated high-risk SARS-CoV strains have already spilled over into people near our bat cave sites. Our preliminary work shows ~35% seroprevalence to bat SARS-CoVs in people at this site<sup>9</sup>. We will test these previously collected human sera (>2000) for presence of antibodies to the hEb- and low-risk SARS-CoVs identified by our modelling, using Luciferase immunoprecipitation system (LIPS) assays we design against the SARS-CoVs identified in this project<sup>14</sup>.

**Technical Area 2**

In TA2, we will develop scalable approaches to suppress SARS-CoVs within bat reservoir species, to reduce the likelihood of virus transmission into humans. We will evaluate two approaches to defuse spillover potential: 1) Broad-scale immune boosting: we will apply immune modulators like bat interferon and TLR agonists to up-regulate bat innate immunity and suppress viral replication and shedding; 2) Targeted immune boosting: we will apply polyvalent chimeric recombinant SARS-CoV spike proteins in the presence of broadscale immune boosting treatments to boost immune memory and suppress specific SARS-CoVs.

Both TA2 lines of work will run parallel beginning Yr. 1. Prof. Wang (Duke-NUS, Univ. Singapore) - Duke-NUS will lead the broadscale immune boosting work, building on his pioneering work on bat immunity<sup>15</sup>, including identifying weakened functionality of innate immunity factors like STING, a central DNA-interferon (IFN) sensing molecule, that may allow bats to maintain an effective, but not over-response to viruses<sup>16</sup>, and IFNA, which is constitutively expressed without stimulation<sup>17</sup>. We will trial the following, concurrently and competitively, for efficacy and scalability: i) Activating TLR/MLP pathways to induce IFN induction, e.g. polyIC or 5'pp-dsRNA. A similar strategy has been demonstrated in a mouse model for SARS-CoV<sup>18</sup>; ii) Universal bat interferon. Interferon has been used clinically in people, e.g. against filoviruses<sup>20</sup>, and replication of SARS-CoV is sensitive to interferon<sup>21</sup>; iii) Boosting bat IFN by blocking negative regulators. Bat IFNα is constitutively expressed but cannot be induced to a high level<sup>22</sup>. We will use CRISPRi to identify potential negative regulators and screen for compounds targeting this gene; iv) Activating dampened IFN production pathways via DNA-STING-dependent and siRNA-TLR7-dependent pathways. Mutant bat STING restores antiviral functionality, suggesting these pathways are important in bat-viral coexistence<sup>18</sup>. We will directly activate the pathways downstream of STING/TLR7, to promote viral clearance; v) Inoculating single CoV fragments to upregulate innate immune responses to specific CoVs - a partial step towards the targeted immune boosting work below.

Prof. Baric (UNC) will lead the targeted immune boosting work. We will develop recombinant chimeric spike-proteins<sup>14</sup> from known SARS-CoVs, and those characterized by DEFUSE. Using details of SARS S protein structure and host cell binding<sup>23</sup>, we will sequence, reconstruct and characterize spike trimers and receptor binding domains of SARS-CoVs, incorporate them into nanoparticles or raccoon poxvirus-vectors for delivery to bats<sup>24,27</sup>. In combination with immune-boosting small molecules, we will use these to boost immune memory in adult bats previously exposed to SARS-CoVs, taking the best candidate forward for field-testing. Recombinant S glycoprotein-based constructs with immunogenic blocks from across group 2B SARS-CoVs should induce broadscale adaptive immune responses that reduce heterogeneous virus burden in bats and transmission risk to people<sup>22,23</sup>. Innate immune damping is highly conserved in all bat species tested so far. We will use the unique Duke-NUS

Asian cave bat (*Eonycteris spelaea*) breeding colony to conduct initial proof-of-concept tests, extended to small groups of wild-caught *Rhinolophus sinicus* bats at WU.

A novel delivery method for our immune boosting molecules will be developed and implemented by Dr. Rocke at the USGS National Wildlife Health Center (NWHC) who has previously developed animal vaccines through to licensure<sup>10</sup>. Using locally acquired insectivorous bats<sup>11,12</sup>, we will assess delivery vehicles and methods including: 1) transdermally applied nanoparticles; 2) sticky adelic gels that bats mutually groom and consume; 3) aerosolization via prototype sprayers (Dr. Unlad, PARC) designed for cave settings; and 4) automated sprays triggered by timers and movement detectors at critical cave entry points. We have extensive preliminary data on these techniques for wildlife, including vaccinating bats against rabies in the lab<sup>13</sup>, successful delivery, consumption and spread in wild vampire bats. We will use the NWHC captive bat colony and wild bats in US caves to trial delivery vehicles using the biomarker rhodamine B (which fluorescently marks hair on consumption) to assess uptake. The most optimal deployment approaches will be tested on wild bats at our test cave sites in Yunnan, using the most effective immune modulation preparations. Bat populations from experimental and control caves will be surveyed longitudinally for viral load before and after deployment trials. ERA has had unique access to these sites for ~10 years. In DEFUSE Y1, we will seek permission for experimental trials from collaborators at the Yunnan Forestry Department and Center for Disease Control, following our proven track record of rapidly obtaining IACUC and DOD/ACURO approval for animal research. We will model optimal strategies to maximize treatment efficacy for TAZ, using stochastic simulation modeling of viral circulation dynamics at our sites, informed by field and experimental data. We will estimate frequency and population coverage required for our intervention, and model the time period of viral suppression, until re-colonization or evolution leads to return of a high-risk SARS-CoV.

**Deliverables:**

- Open source models and App identifying geographical and host-specific risk of spillover for novel SARS-CoVs
- Experimentally validated genotype-phenotype models of spillover for viral strains.
- Proven technology to modulating bat innate immunity to reduce viral shedding
- Tested and validated delivery mechanism for bat cave usage including vaccines in other bat host-pathogen systems (e.g. rabies, WNS).
- Proof-of-concept approach to transiently reducing viral shedding in wild bats that can be adapted for other systems including Ebola virus.

**Section 1: TECHNICAL PLAN**

**Technical Area 1:**

Choice of site and model host-virus system. For the past 14 years, our team has conducted CoV surveillance in bat populations across S. China, resulting in >180 unique SARS-CoVs in ~10,000 samples (>5% prevalence, including multiple individuals harboring the same viral strain)<sup>14,15</sup> and a per-bat species prevalence up to 10.9%. Bat SARS-CoVs are genetically diverse, especially in the S gene, and most are highly divergent from SARS-CoV. However, our test cave site in Yunnan Province, harbors a quasispecies (QS) population assemblage that contains all the genetic components of epidemic SARS-CoV<sup>16</sup>. We have isolated three strains there (WV1,

WV16 and SHC034) that unlike other SARS-CoVs, do not contain two deletions in the receptor-binding domain (RBD) of the spike, have far higher sequence identity to SARS-CoV (Fig. 1). Use human ACE2 receptor for cell entry, as SARS-CoV does (Fig. 2), and replicate efficiently in various animal and human cells<sup>17,18,19</sup>, including primary human lung alveolar cells, similar to epidemic SARS-CoV<sup>14,20</sup>. Chimeras (recombinants) with these SARS-CoV S genes inserted into a SARS-CoV backbone, and synthetically reconstructed full length SHC034 and WV1 cause SARS-like illness in humanized mice (mice expressing human ACE2), with clinical signs that are not reduced by SARS-CoV monoclonal antibody therapy or vaccination<sup>14,21</sup>. People living up to 6 kilometers from our test cave have SARS-CoV antibodies (~3% seroprevalence)<sup>14</sup>, suggesting active spillover. These data, phylogeography of SARS-CoVs, and conventional analysis of bats and their CoVs (unpubl), suggest that bat caves in SW China, and *Rhinolophus* spp. bats are the likely origin of the SARS-CoV clade, and are a clear and present danger for the emergence of a SARS-CoV from the current QS. The *Rhinolophus* spp. bats that harbor these viruses occur across Asia, Europe, and Africa. Thus, while DEFUSE fieldwork will focus on high-risk sites in S. China, our approach to reduce the risk of these viruses spilling over is broadly applicable across four continental and national regions: JAPAN, CENTRAL AMERICA, EUROPE, and AFRICA.



Fig. 3. Top: Phylogenetic tree of the spike protein receptor-binding motifs of SARS-CoVs and SARS-CoV<sup>14</sup>. Human ACE2 residues are responsible for interaction with human ACE2<sup>21</sup>. Fig. 3 (top, right): Bat SARS-CoV WNV16 residues (identical in mice cells expressing human ACE2 and bat ACE2).

Full inventory of bat SARS-CoV QS at our test cave sites, Yunnan, China. To provide data to train and validate our modeling, and as baseline for our immune modulation trial (TAZ), DEFUSE fieldwork will target the high-risk cave site in Yunnan Province, SW China (Fig. 4, red triangle) where we will conduct our field trial, and where we have previously identified and isolated high-risk SARS-CoVs<sup>14,22</sup>. At three cave sites (one designated for our trial, two as controls), we will determine the baseline QS risk of SARS-CoV spillover. We will conduct longitudinal surveillance of bat populations to detect and isolate SARS-CoVs, determine changes in viral prevalence over time, and measure bat population demographics and movement, definitively characterizing their SARS-CoV host-viral dynamics. Field data will allow us to test the accuracy of our model predictions and compare efficacy of lab animal models with field trials. Our preliminary data (Table 2) demonstrate that *R. sinicus*, *R. ferrumequinum*, and *R. affinis* (which co-occur at our test site) are primary reservoirs of SARS-CoV and the only reservoirs of three high-risk strains (WV1, WV16, SHC034), with *Hipposideros* and *Myotis* spp. playing an

insignificant (<1% prevalence) role in viral dynamics. We will capture *Rhinolophus* spp. bats using harp traps and mist nets during evening flyout, collect rectal, oral, and whole blood samples (x2 per bat) using sterile techniques to avoid cross-contamination, and take 2-mm wing tissue punch biopsies for host DNA bar-coding, host ACE2 receptor gene sequencing (interface site – 3 individuals per species), and copy-phenology analyses. Bats will be subsequently microchipped (PIT tag), and morphological and physiological data (age class, body weight, reproductive status etc.).

Species	n	SARs-CoV prevalence
<i>Rhinolophus sinicus</i>	1036	3 (0.9%)
<i>R. ferrumequinum</i>	191	6 (3%)
<i>R. affinis</i>	518	1 (2%)

In Phase I we will sample 60 bats each of *R. sinicus*, *R. ferrumequinum*, and *R. affinis*, (180 bats per cave) every three months non-destructively for 18 months from our three cave sites. Given ~6-9% prevalence (n=3,304) of SARs-CoVs in *Rhinolophus* spp. at our sites, this sample size would allow detection of 10% fluctuation in viral prevalence among sampling periods and caves. During the 2 months per quarter without physical bat trapping we will collect fresh fecal pellets by placing clean zip polyethylene sheets beneath roosting bats<sup>31</sup>. *Rhinolophus* spp. have a 7-week gestation period, spring birthing, and aggregate during mating periods. Our monthly sampling strategy will collect adequate data to parameterize stochastic simulation models, and cover two mating and gestation periods to assess life-history driven changes in viral prevalence and immune marker (e.g. Interferon) levels. We will conduct pre- and post-intervention sampling (biweekly fecal pellet sampling for 4 months, and 10 male and 10 female bats per species tested every 2 weeks post-intervention for 4 months, prior to- and post-deployment) to monitor SARs-CoV OS and bat immune status changes in test and control site bats during Phase II (TA2). Immune status can be followed in individual bats due to the relatively small roost sites in these caves and our individual marking of captured bats. We will assess immune status using nanosorting immune profiling panels validated during captive bat studies at Duke NUS. We will use infrared spotlights and digital infrared imaging to record the number and species of bats above each plastic sheet and fecal pellets will be genetically bar-coded to confirm species identification. Samples will be preserved in viral transport medium, immediately frozen in liquid nitrogen dry shippers, and transported to partner laboratories with maintained cold chain and under strict biosafety protocols. PIT tag readers and weatherproof thermal imaging IR cameras mounted at each cave entrance will passively monitor temporal roost site fidelity, rates of inter-cave movement, and daily fluctuation in bat population<sup>35</sup>. ICARUS satellite transmitters (LG) will be attached to 12 *Rhinolophus* spp. bats from each study roost (38 bats total) to determine nightly foraging dispersal patterns (https://www.icecube.wisc.edu/). Telemetry and PIT tag data will be used to calculate home range, degree of mixing among roosts, and parameterize dynamic models. Study caves will be surveyed using portable LIDAR technology<sup>40-42</sup>, to give a 3-D image of roost areas and data on species composition for targeting of immune modulation treatments in TA2 (Fig. 3). Sampling quotas will be adjusted based on lab and model results to optimize viral detection.



Fig. 3: Light detection and ranging (LIDAR) scanning to characterize roost and quality number of individual bats roosting in clusters. A) LIDAR system takes a 360° omnidirectional photo of clustered bats. B)

photo converted to 3-D point cloud, C) non-bat points, based on laser return intensity removed, D) automated counting algorithm counts individual bats. Figure from<sup>41</sup>.

Our team has more than 50 years collective experience in safe and humane handling of bats for biological sampling. This project will operate under appropriate IACUC/ACURO and PPE guidelines. EHA has several ongoing DTRA-supported projects, has obtained ACURO approval for animal research from the DoD, and currently maintains IACUC protocols through Tufts University (EHA staff are adjunct faculty), which we will use for DEFUSE IACUCs. IACUCs already approved for lab/field work at Duke-NUS, UNC, NWHIC, and WIV, will be modified for DEFUSE.

Predictive models of high-risk sites and bat species across Asia. We will build models that predict bat and viral diversity and spillover risk across Asia to enable warfighters and planners to assess risk and necessity for intervention deployment (TA2). We will combine regional-scale joint species distribution models (JSDM), machine-learning host-virus association models, and non-parametric viral richness estimators to respectively predict the composition of bat communities in caves across Asia, host range for key viral clades, and as-of-yet unsampled viral diversity. We will use a stochastic feedforward neural network to implement JSDMs that are effective at multiple scales with incomplete observations (as occurs for bats and their viruses), and that account for bat-species co-occurrence driven by environment or evolution<sup>44</sup>. We will fit our JSDM to biological inventory data on over 200 caves in the region<sup>44</sup>, to physiologically relate bioclimatic variables (BIOCCLIM)<sup>45</sup>, open source topographic data, and proxies for subterranean habitat such as ruggedness and habitat heterogeneity. As in previous work<sup>46</sup>, we will refine these models with regional-scale environmental variables (land-use, distance to roads, etc.) and cave-specific variables (cave length, availability of roosting area, entrance dimensions, cave complexity etc.). We will validate them using independent bat occurrence estimates and observations<sup>44</sup>, and use EHA's unique database of all known host-virus relationships to extend predictions of bat CoV diversity and host range<sup>47</sup> (Fig. 4). We will use generalized additive host trait predictive models and machine-learning algorithms (BRT, random forest)<sup>48</sup> with non-parametric estimators to predict SARs-CoV diversity in the OS of each bat species<sup>49</sup>, and assess viral discovery rates in real time through sampling (Fig. 5).

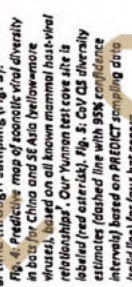


Fig. 4: Predictive map of potential viral diversity in bats for China and SE Asia. Below-entrance viruses, based on all known mammal host-virus relationships. Our human test case site is labeled (red asterisk). Fig. 5: CoV OS diversity estimates (dashed line with 95% confidence intervals) based on PREDICT sampling data (bold line) for four bat genera.

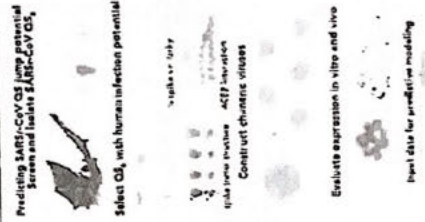
To extend the geographic scope of predictive models, we will include data from >1800 viral detections (CoVs and others) from >10,000 individual bat samples in 6 Asian countries (NIAID- and USAID PREDICT-funded). For species composition and viral presence predictions, we will validate models against a 20% validation subset of data, and field data. Prototype app for the warfighter. Drawing on experience building applications for data collection and analysis for DoD (e.g. https://www.dau.edu/technology/), we will produce a prototype 'spatial viral spillover risk' app for the

warfighter that identifies probability of dangerous viral pathogens spilling over from bats at a site. We will use outputs from our spatial risk modeling, observed and predicted host-viral associations, open-source species and pathogen ontologies, and app-directed crowd-sourced echolocation data to ground truth and fine-tune its predictive capacity. This app will be updated in Y2 and Y3 to incorporate additional risk data from host-virus binding assays and SARS-CoV surveys. We will use EHA's risk-ranking algorithm (https://github.com/DEFUSE/DEFUSE) to display critical areas of high risk based on geolocation features, recency of information, host and pathogen characteristics. The app will collect user GPS location data and pre-load bat species distribution and community composition estimates from our ISDKs. These will be refined with real-time surveillance data collected without the need to enter cave sites using mobile phone-enabled high-frequency microphones for bat detection<sup>33</sup>, validated and trained with reference acoustic calls using convolutional neural networks<sup>34</sup>. Identified bat species will be automatically linked with viral diversity data from EHA's hostpathogen database and SARS-CoV data from DEFUSE to either high-risk pathogen lists, displayed as pathogen-centric, bat-centric, or map-centric views, with proactive alerts when critical information is received. All code modules will be available and documented on GitHub (https://github.com/DEFUSE/DEFUSE). This technology will improve overall situational awareness of existing and novel infectious agents found in bats, allowing DoD personnel to quickly identify areas high spillover risk steps and rapidly deploy resources to respond to and mitigate their impact proactively when necessary.

**SARS-CoV OS detection, sequencing, and recovery.** We will screen samples for SARS-CoV nucleic acid using our pan-CoV consensus one-step hemi-nested RT-PCR assay targeting a 440-nt fragment in the RNA-dependent RNA polymerase gene (RdRp) of all known  $\alpha$ - and  $\beta$ -CoV<sup>35</sup> and specific assays for known SARS-CoVs<sup>31,31A</sup>. PCR products will be gel purified, sequenced and qPCR screened on SARS-CoV-positive samples to determine viral load. Full-length genomes or S genes of all SARS-CoVs will be high-throughput sequenced followed by genome walking<sup>32,34</sup>. We will analyze the S gene for its ability to bind human ACE2 by Biocore's virus entry assay. **Synthesis of chimeric novel SARS-CoV OS.** We will commercially synthesize SARS-CoV S glycoprotein genes, designed for insertion into 3'UTR of HIV16 molecular clone backbone (88% and 97% S-protein identity to epidemic SARS-Urbani). These are 85L-3, 80S select agents or subject to P3CO (they use bat SARS-CoV backbones which are exempt) and are virus identification barriers for RNA recombination-mediated gene transfer between human, bat or chimeric ACE2 receptors to support cultivation of viruses with a weaker RBD-human ACE2 interface. **Recovery of full length SARS-CoV.** We will compile sequence/RNAseq data from a panel of closely related strains (<5% nucleotide variation) and compare full length genomes, scanning for unique SNPs representing sequencing errors<sup>34,44</sup>. Consensus candidates genomes will be synthesized commercially (e.g. BioBasic), using established techniques and genome-length RNA and electroporation to recover recombinant viruses<sup>45</sup>.

**Predicting strain-specific SARS-CoV spillover risk.** We will combine detailed experimental characterization of OS at our test cave sites with state-of-the-art machine-learning Bayesian network models. This will enable us to predict the jump probability of future OS that emerge with unique genetic recombinations. Our models will be parameterized with experimental data from a series of assays on the S genes of bat SARS-CoVs (Fig. 6, right), with experimental and modeling work flowing together in iterative steps. Our prior data will act as baseline to parameterize spillover risk modeling<sup>46,47</sup>. This will be supplemented by characterization of isolated viruses under DEFUSE (at WIV), approximately 15-20 bat SARS-CoV spike proteins/year (at UNC, WIV), and 5-180 bat SARS-CoV strains sequenced in our prior work and not yet examined for spillover potential. All experiments will be performed in triplicate and data fed to models in real time.

**Experimental assays of SARS-CoV OS jump potential (Fig. 6, right). Pre-screening via structural protein modeling.** Viral entry is the major species restriction preventing spillover of SARS-CoVs<sup>48</sup>. To select OS for further characterization we will first use structural modeling of SARS-CoV S protein binding to ACE2 receptors<sup>49</sup>. Mutations in the RBD<sup>50,51,52</sup>, and host protease proteolytic processing of the S glycoprotein<sup>53</sup> regulate SARS-CoV cell entry and cross-species infectivity. Mismatches in the S-RBD-ACE2 molecules or S proteolytic processing will prevent cell entry of SARS-CoVs and will be deprioritized. Single amino acid variations could dramatically alter these phenotypes and we will evaluate the impact of low abundant, high consequence variation in the RBD using RNAseq to identify low abundant OS variants encoding mutations relevant to ACE2 binding. We will conduct *in vitro* pseudovirus binding assays, using established techniques<sup>54</sup>, and live virus binding assays (at WIV to prevent delays and unnecessary dissemination of viral cultures) for isolated strains. Initial model predictions based on these data inputs will be used to guide strain selection for further characterization. ***In vitro* testing of chimeric viruses.** All chimeric viruses will be sequence verified and evaluated for: i) ACE2 receptor usage across species *in vitro*, ii) growth in primary HAE, iii) sensitivity to broadly cross neutralizing human monoclonal antibodies that recognize unique epitopes in the RBD<sup>54,57</sup>. Should some isolates prove highly resistant to our mAb panel, we will evaluate cross neutralization against a limited number of human SARS-CoV serum samples from the Toronto outbreak. Chimeric viruses that encode novel S genes with spillover potential will be used to identify SARS-CoV strains for recovery as full genome length viable viruses. ***In vivo* pathogenesis.** Groups of 10 animals will be infected intranasally with  $1.0 \times 10^7$  PFU of each vSARS-CoV, clinical signs (weight loss, respiratory function, mortality, etc.) followed for 6 days



pL, and sacrificed at day 2 or 6 p.i. for virologic analysis, histopathology and immunohistochemistry of the lung and for 22-parameter complete blood count (CBC) and bronchiolar alveolar lavage (BAL). Validation with full-length genome Q5. We will validate results from chimeric viruses by re-characterizing full-length genome versions, testing whether backbone genome sequence alters full length SARS-CoV spillover potential. Q5 for full-genome characterization will be selected to reflect strain differences in antigenicity, receptor usage, growth in human cells and pathogenesis. We will test growth in primary HAE cultures and in who in HACE2 transgenic mice. We anticipate recovering ~3-5 full length genomes viruses/Yr.

**Isolation/Synthetic Modifications:** We will synthesize Q5 with novel combinations of mutations to determine the effects of specific genetic traits and the jump potential of future and unknown recombinants. **RBD deletions:** Small deletions at specific sites in the SARS-CoV RBD alter risk of human infection. We will analyze the functional consequences of these RBD deletions on SARS-CoV HACE2 receptor usage, growth in HAE cultures and in vivo pathogenesis. First, we will delete these regions, sequentially and in combination, in SHCO15 and SARS-CoV Urban, anticipating that the introduction of deletions will prevent virus growth in Vero cells and HAE<sup>23</sup>. In parallel, we will evaluate whether RBD deletion repair restores the ability of low risk HAEs to use human ACE2 and grow in human cells. **Proteolytic cleavage and glycosylation sites:** After receptor binding, a variety of cell surface or endosomal proteases<sup>42,43</sup> cleave the SARS-CoV S glycoprotein causing massive changes in S structure<sup>72</sup> and activating fusin-mediated entry<sup>44,45</sup>. We will analyze all SARS-CoV S gene sequences for appropriately conserved proteolytic cleavage sites in S2 and for the presence of potential furin cleavage sites<sup>44,45</sup>, SARS-CoV S with mismatches in proteolytic cleavage sites can be activated by exogenous trypsin or cathepsin L. Where clear mismatches occur, we will introduce appropriate human-specific cleavage sites and evaluate growth potential in Vero cells and HAE cultures. In SARS-CoV, we will ablate several of these sites based on pseudovirus particle studies and evaluate the impact of select SARS-CoV S changes on virus replication and pathogenesis. We will also review deep sequence data for low abundant high risk SARS-CoV that encode functional proteolytic cleavage sites, and if so, introduce these changes into the appropriate high abundant, low risk parental strain. **N-linked glycosylation:** Some glycosylation events regulate SARS-CoV particle binding DC-SIGN/STING, alternative receptors for SARS-CoV entry into macrophages or monocytes<sup>47</sup>. Mutations that introduced two new N-linked glycosylation sites may have been involved in the emergence of human SARS-CoV from civet and raccoon dogs<sup>77</sup>. While the sites are absent from civet and raccoon dog strains and clade 2 SARS-CoV, they are present in WNV1, WNV16 and SHCO14, supporting a potential role for these sites in host jumping. To evaluate this, we will sequentially introduce clade 2 disrupting residues of SARS-CoV and SHCO14 and evaluate virus growth in Vero cells, nonpermissive cells ectopically expressing DC-SIGN, and in human monocytes and macrophages anticipating reduced virus growth efficiency. We will introduce the clade 1 mutations that result in N-linked glycosylation in rs4237 RBD deletion repaired strains, evaluating virus growth efficiency in HAE, Vero cells, or nonpermissive cells ± ectopic DC-SIGN expression<sup>77</sup>. *In vivo*, we will evaluate pathogenesis in transgenic HACE2 mice. **Low abundance micro-variations:** We will structurally model and identify highly variable residue changes in the SARS-CoV S RBD, use commercial gene blocks to introduce these changes singly and in combination into the S glycoprotein gene of the low risk, parental strain and test ACE2 receptor usage, growth in HAE and in vivo pathogenesis.

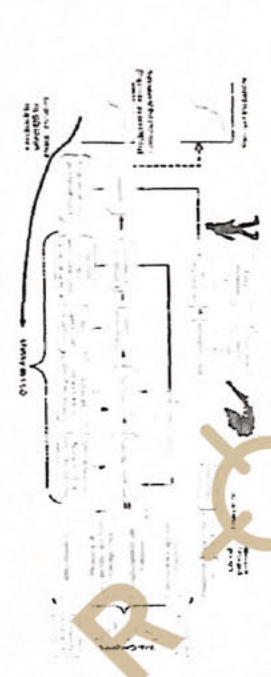


Fig. 7: A simplified directed graph of a Bayesian network model representing the causal relationships between input data, modelled processes, and outputs.

**Network machine-learning to predict spillover potential of high-risk SARS-CoV strains.** We will use experimental data from above to build genotype-phenotype models of bat SARS-CoV spillover potential. We will use Bayesian Network Models (BNM), fit via MCMC methods<sup>78</sup> to predict spillover risk based on bat SARS-CoV genotype data (presence of deletions in RBD, proteolytic binding and glycosylation sites etc.) and the ecological traits of hosts - integrating data on multiple, interacting processes and Q5 spillover potential to generate overall spillover probabilities. The Bayesian approach will allow us to update our models iteratively as new data is acquired, and use interim model predictions to guide which experiments to prioritize to maximize predictive ability<sup>79</sup>. We will control for experimental conditions (assays on live viral isolates, full-genome or synthetic chimeric viruses, and the molecular backbone of the latter). Traits will be used as inputs to BNM's causal graph, to predict latent variables representing interconnected processes that contribute to SARS-CoV Q5 infection in new hosts: receptor binding, cell entry, immune system interaction, and intracellular growth, all measured by our lab assays. These, in turn will act as predictors for the ultimate outcomes of host pathogenesis and host jumping potential (Fig. 7). We will use published work on these genetic traits to put informative priors on strength and direction of interactions in the causal graph. We will use prior-knowledge model simulations to select target sequences from our sampling for characterization and genome-sequencing, to collect data that maximally enhances the predictive power of our model and update these simulations iteratively throughout the experimental phase to continually guide Q5 selection. We will use regularizing priors to reduce over-fitting and select the most predictive variables in the final model.

**Model validation using SARS-CoV serology from previously-collected human samples and surveillance data.** Active spillover of SARS-CoV in our study region enables us to measure actual spillover risk to validate our models of Q5 jump potential. We will gather data on viral Q5 antibodies found in the local human population using LIPS assays on >2,000 previously-collected human sera (NAID, Daszak P1) from people living close to our test cave sites in Yunnan Province, a sub-sample of which showed ~7% seropositivity to bat SARS-CoVs<sup>81</sup>. The IRB for



this work is current and covers proposed DEFUSE testing. We will design UPS assays targeting high- and low-spillover risk SARS-CoV-2 OS, as done previously for SARS-CoV-2<sup>100A1</sup> and the novel SARS-CoV-4<sup>101</sup>. We will: 3) infect different high- and low-risk SARS-CoV N genes into PREN-2 vector (LPS vector), first assessing N gene similarity to determine their potential cross-reactivity in a UPS assay; 2) determine UPS assay specificity by producing polyclonal sera via infection of recombinant protein or attenuated virus into rabbits; 3) validate LPS assays by incubating antigen with their respective positive serum samples; 4) validate LPS assays by complex eluted using protein A/G beads; 4) validate LPS positive sera results by spike protein based LPS and viral neutralization assay. As a confirmatory test, the positive samples from UPS will be validated by virus neutralization assay. We will use these LPS assays to test serum samples for presence of antibodies to high- and low-risk SARS-CoV OS. We will validate predictions of jump potential and extend the BNMs to predict actual spillover probabilities by modeling bat-human contact rates with bats. We will use ecological data on bat roosts and human behavioral survey data collected previously from these individuals to estimate wildlife contact in predicting exposure measured by our LPS assays.

Evolutionary modelling and simulation to predict potential strains. Our Bayesian network modelling will generate predictions of the spillover risk of OS sequences we identify. To examine risk associated with the total viral population, we will model and simulate evolutionary processes to identify likely viral OS that our sampling has not captured, and viral OS likely to arise in the future ("OS<sup>+</sup>"). We will use a large dataset of S protein sequences and full-length genomes generated from prior work and DEFUSE fieldwork to estimate SARS-CoV substitution rates and its genome-wide variation using coalescent and molecular clock models within a Bayesian MCMC framework<sup>102</sup>. We will estimate SARS-CoV recombination rates at the cave population level using these data and Bayesian Inference<sup>103,104</sup>. We will apply RDP<sup>105</sup> similarity plots, and bootstrap to identify recombination breakpoints and hotspots within the SARS-CoV genome as done previously<sup>106</sup>, now extended to the full genome. Using these estimates we will simulate the evolution of the SARS-CoV OS genome using a forward-time approach implemented in simulators that model specific RNA virus functions (e.g. VIRAPOPS<sup>107</sup>). We will predict the rate at which new combinations of genetic traits can spread in viral populations and compare recombination rates among caves and bat communities. Our forward-simulated results will provide a pool of likely unknown and future OS<sup>+</sup> species. Using these and our SEM model for spillover risk, we will predict the OS<sup>+</sup> most likely to arise and have spillover and pathogenic potential. We will use evolutionary simulation results to iteratively improve our Bayesian network model. The number of genetic traits with potential for prediction of pathogenicity is large, so we will perform variable reduction using tree-based clustering, treating highly co-occurring traits as joint clusters for prediction. We will generate these clusters from all SARS-CoV sequences from DEFUSE fieldwork and prior work. As trait clusters may be modified through recombination, we will use our forward-evolutionary modeling to predict how well trait clusters will be conserved, retaining only those unlikely to arise in unknown or OS<sup>+</sup> genomes. This will enable a trade-off between increased predictive power based on current samples and generalizability to future strains that have not yet evolved.

Teshale Alemu 2

Immune modulation approach to reducing bat SARS-CoV spillover risk: Our work shows that the following unique immunological features of bats may explain their capacity to harbor high viral loads with minimal clinical signs: a) bats maintain constitutively high expression of IFN $\alpha$  that may respond to and restrict viral infection<sup>108</sup>; b) several interferon activation pathways are dampened, e.g. STING (a central cytosolic DNA-sensor molecule to induce interferon dependent and TLR7 dependent pathways)<sup>109</sup>; c) the NLRP3 dependent inflammatory pathway is dampened, and key inflammation response genes like AIM2 are not present in bats<sup>110</sup>. These traits may be due to bat immune-sensing pathway adaptation as a fitness cost of flight<sup>111</sup>. We hypothesize that bat virus replication will likely be restricted quickly by constitutively expressed IFN $\alpha$  in bats, resulting in lower B/T cell stimulation due to lower viral stimuli. Second, dampened interferon and inflammatory responses will result in lower cytokine responses that are required to trigger T<sub>H</sub>1 dependent adaptive immunity (e.g. antibody responses), ultimately resulting in suppression of viral replication and shedding. We and others have demonstrated proof-of-concept of this phenomenon: Experimental Marburg virus infection of Egyptian fruit bats, a natural reservoir host, resulted in widespread tissue distribution with low viral load, brief viraemia, low seroconversion and a low antibody titer that waned quickly, suggesting no long-term protection is established<sup>112,113</sup>; poor neutralizing antibody responses occur after experimental infection of bats with Tacariba virus<sup>114</sup>, and in our studies of experimental infection of bats with SARS-CoV (Wang, unpubl.). We also successfully showed that bat interferon can inhibit bat SARS-CoV<sup>115</sup>. We hypothesize that use of immune modulators that upregulate the naturally low innate immunity of bats to their viruses, will transiently suppress viral replication and shedding, reducing the host jump risk. We further hypothesize that because *Rhinolophus* bats are long-lived (20+ yrs in the wild), most bats in a population will have been exposed to a range of SARS-CoV OS at our sites. Specifically, titering and vaccination of their adaptive immunity (immune memory) to high-risk viral strains may lead to heightened clearance of high-risk strains. We will evaluate two immune modulation approaches to reduce spillover of SARS-CoVs from bats to humans: 1) Broad-scale immune boosting strategies (Wang, Duke-NUS); we will apply immune modulators like TLR ligands, small molecule RIG-I-like receptor (RLR) agonists or bat interferon in live bats, to up-regulate their innate immunity and suppress viral replication and shedding; 2) Targeted immune boosting (Batis UNK). The broad-scale immune boosting approach will be applied in the presence of chimeric immunogens to activate immune memory in adult bats and boost clearance of high-risk SARS-CoVs. We will use novel chimeric polyvalent recombinant proteins in microparticle encapsulated gels for oral delivery and/or virus-adjuncted immune boosting strategies where chimeric recombinant SARS-CoV-5 are expressed by rAdcoor-poxvirus. Both lines of work will begin in Year 1 and run parallel, be assessed comparatively for efficiency, cost, and scalability, and successful candidates from captive animal trials will be used in live bat trials at our test cave in Yunnan. The finding of low innate immunity across bats suggest that immune boosting could be broadly applicable to bat genera and viral families.

**Broad-scale immune boosting (Duke-NUS).** We will work on the following key leads to identify the most effective approach to up-regulate innate immunity and suppress viral loads. *Toll-like receptors (TLR)/NOD-like Receptor (NLR) ligands:* Our work indicates a robust response in live bats to TLR-stimuli like poly(I:C) as measured by transcriptomics on spleen tissue (Fig. 8), liver, lung and lymph nodes, with matched proteomics to characterize immune activation *in vivo*. These activation profiles will be used to assess bat immune response to different stimuli and identify those which lower viral load in our experimental system at Duke-NUS (below).

Fig. 8: Pathway analysis from Ingenuity Pathway Analysis (IPA) of which spleen NGS upon stimulation with either *PS* or *poly(I:C)*. Z-score increase over control bats is indicated as per scale, and suggests strong activation of many pathways.

We will also stimulate the RIG-I pathway with 5'pppDSRNA, a mimetic of the natural RIG-I stimulant that will activate functional bat IFN production pathways, as shown in a mouse model that cleared SARS-CoV, IAV and HAV.<sup>18,19</sup>

**Universal bat interferon:** We will design a conserved universal bat interferon protein sequence with artificial gene synthesis and produce recombinant protein by cleavable-affinity-tagged purification of supernatant from over-expressing bat cells, as used previously for recombinant Pteropus alecto IFN<sup>17,20</sup> and CSF-2/IL-4. Utilization of a universal IFN for bats will overcome species-dependent response to the ligand, allowing the use of IFN throughout broad geographical and ecological environments and across many bat species. We have already produced recombinant non-universal, tagged, bat IFN that induce appropriate immune activation (Fig. 9). This ligand has been shown to reduce viral titers in humans, ferrets and mouse models intranasally and orally.<sup>21,22</sup> Interferon has been used clinically in humans as an effective countermeasure when antiviral drugs are unavailable, e.g. against filoviruses.<sup>23</sup> Interferon is known to be toxic, therefore we will carefully examine dose tolerance in bats and assess clinical effects of the treatment. We have shown that replication of SARS-CoV is sensitive to IFN treatments.<sup>21</sup> The successful delivery, immune activation and outcome on the host will be characterized thoroughly to optimize rapid immune activation.

Fig. 9: Bat viruses are sensitive to IFN treatments. A) Recombinant bat SARS-related coronavirus (SARSr-CoV) replication was inhibited by human IFN $\alpha$  in a dose dependent manner in Vero cells. B) Bat coronavirus PIVtNB replication was inhibited by recombinant bat IFN $\alpha$  in a dose dependent manner in bat P41203 cells.

**Boosting bat IFN by blocking bat-specific IFN negative regulators.** Uniquely, bat IFN $\alpha$  is naturally constitutively expressed but cannot be induced to a high level, indicating a negative regulatory factor in the bat interferon production pathway.<sup>24</sup> We will use a Pteropus alecto CRISPRi library pool that we have created covering multiple RNA targets in the *P. alecto* genome (Wang, unpubl.

data). Genes affecting influenza replication in bat cells have already been identified using this library. Using CRISPRi we will identify negative regulator genes and screen for compounds targeting them to boost the inducibility of the IFN system in a shorter time-frame. Based on previous work<sup>24,25</sup>, it is highly likely this will be a conserved pathway across all bats. **Activating conserved bat-specific innate immune pathways** which include *DNA-STING-dependent cGAS/STING-dependent NLRP3* homologs restores antiviral functionality, suggesting these pathways are important in bat-viral coexistence. By identifying small molecules to directly activate pathways downstream of STING or TLR/NLRs, such as TBK1 activation, we will activate bat innate defense by interferons, promote viral clearance and, we hypothesize, significantly reduce viral load in bats. **Validation of a bat-mouse model.** Various CoVs show efficient infection and replication inside the human host but exhibit defective entry and replication using mouse as a host due in part to differences in DPP4 and ACE2 receptors.



Fig. 10: A) Presence of *sp*-specific qPCR in reconstituted mice after 12 weeks. B) Relative ratio of bat-mouse cells in circulation after 24 weeks. C) Specific antibody response to a Nucleocapsid antigen generated by bat-reconstituted mice.

We have shown efficient reconstitution of irradiated mice using bat bone marrow from multiple species, including *E. sp. louse* (Fig. 10), including reconstitution of bat PBMCs. In the mouse, presence of circulating bat cells and generation of bat-specific antibodies in mice incapable of producing an antibody response. This 'batified' mouse model can be utilized for both circulating infection of SARS-CoV (in the immune compartment only) and as a model for generating bat-specific antibodies against CoV proteins. Efficient validation of infection into bat cells will be used to validate the infectivity of the viruses and generation of bat antibodies will facilitate validation of the best protein/s/pptide to elicit an effective immune response.

**Targeted immune boosting (UNC).** To boost targeted adaptive immunity (immune memory) in wild bats chronically exposed to circulating SARS-CoV CoV, we will inoculate with chimeric S glycoproteins in the presence of the broadscale immune boosting agonists above. We have developed novel group 2b SARS-CoV chimeric S glycoproteins that encode neutralizing domains from phylogenetically distant strains (e.g. Urbani, HKU3, BtCoV 279, ~25% diversity). The chimeric S programs efficient immunization when introduced in the HKU3 backbone full length genome, and elicits protective immunity against multiple group 2b strelns. We will develop robust expression systems for SARS-CoV chimeric S using heterologous expression *in vitro*. We will work with Dr. Alinella (UNC-Pharmacy) who has developed novel microparticle delivery systems and dry powders for aerosol release that encapsulate recombinant proteins and adjuvants (innate immune agonists) that we will use for pan-bat broadscale immune boosting strategies

## Pièce originale 2

### PROPOSAL: VOLUME I

DARPA - PREEMPT (HR001118S0017)

LEAD ORGANIZATION: EcoHealth Alliance (Other Nonprofit)

OTHER TEAM MEMBERS:

Duke NUS Medical School (Other Educational)

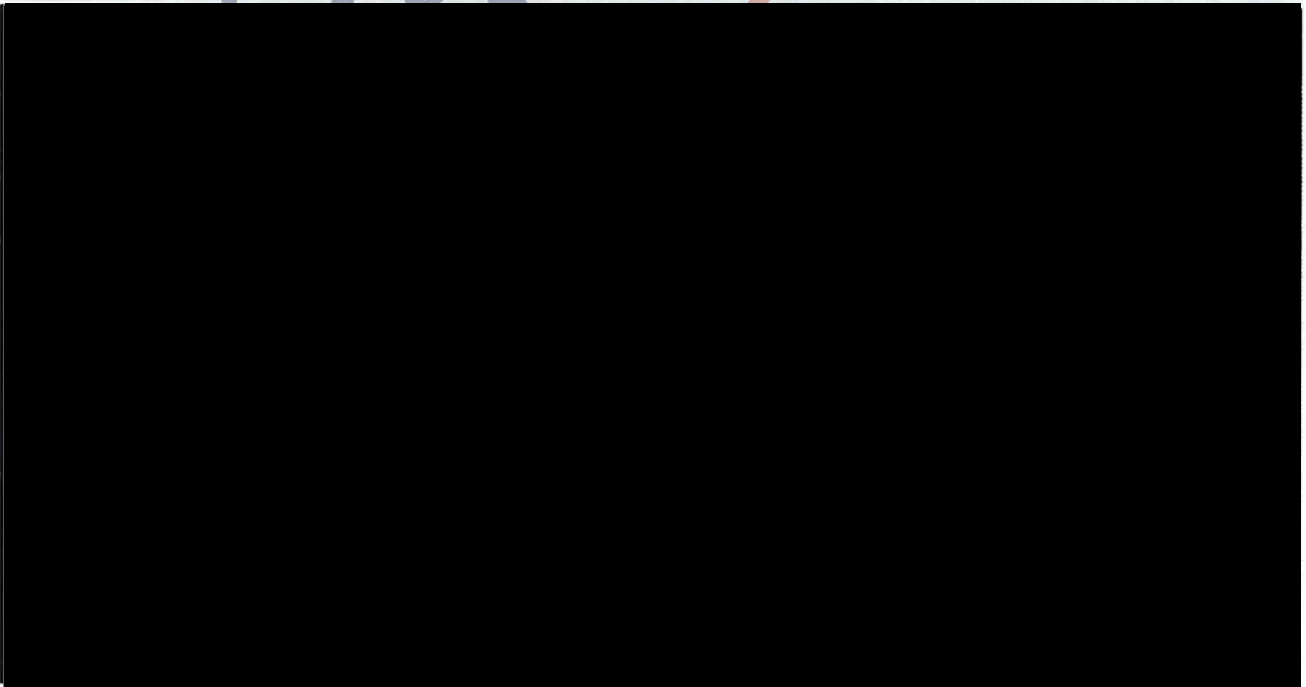
University of North Carolina (Other Educational)

Wuhan Institute of Virology (Other Educational)

USGS National Wildlife Health Center (Other Nonprofit)

Palo Alto Research Center (Large Business)

### Project DEFUSE: Defusing the Threat of Bat-borne Coronaviruses





EcoHealth Alliance

24 March 2018

Dear Committee for DARPA PREventing EMerging Pathogenic Threats (PREEMPT),

Please accept the following proposal to the PREventing EMerging Pathogenic Threats (PREEMPT, HR001118S0017) program. The PI for this project is:

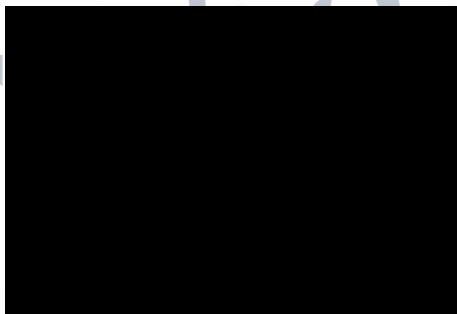
Dr. Peter Daszak  
President, EcoHealth Alliance  
460 W. 34<sup>th</sup> Street, 17<sup>th</sup> Floor  
New York, NY 10001  
212-380-4474  
[daszak@ecohealthalliance.org](mailto:daszak@ecohealthalliance.org)

**Title:** Project Defuse: Defusing the Threat of Bat-Borne Coronaviruses

**Amount of the Requested Proposal:** \$14,209,245

Thank you for your time, and I look forward to hearing from you. If you have any questions, do not hesitate to call or email me.

Yours sincerely,



**Local conservation.  
Global health.**

EcoHealth Alliance  
460 West 34<sup>th</sup> Street, 17<sup>th</sup> Floor  
New York, NY 10001-2320  
212.380.4460

[EcoHealthAlliance.org](http://EcoHealthAlliance.org)

**Section II****A. EXECUTIVE SUMMARY**

**Technical Approach:** Our goal is to defuse the potential for spillover of novel bat-origin high-zoonotic risk SARS-related coronaviruses in Asia. In **TA1** we will intensively sample bats at our field sites where we have identified high spillover risk SARSr-CoVs. We will sequence their spike proteins, reverse engineer them to conduct binding assays, and insert them into bat SARSr-CoV (WIV1, SHC014) backbones (these use bat-SARSr-CoV backbones, not SARS-CoV, and are exempt from dual-use and gain of function concerns) to infect humanized mice and assess capacity to cause SARS-like disease. Our modeling team will use these data to build **machine-learning genotype-phenotype models** of viral evolution and spillover risk. We will uniquely validate these with serology from previously-collected human samples via LIPS assays that assess which spike proteins allow spillover into people. We will build **host-pathogen spatial models** to predict the bat species composition of caves across Southeast Asia, parameterized with a full inventory of host-virus distribution at our field test sites, three caves in Yunnan Province, China, and a series of unique global datasets on bat host-viral relationships. By the end of Y1, we will create a prototype app for the warfighter that identifies the likelihood of bats harboring dangerous viral pathogens at any site across Asia.

In **TA2**, we will evaluate two approaches to reduce SARSr-CoV shedding in cave bats: **(1) Broadscale immune boosting**, in which we will inoculate bats with immune modulators to upregulate their innate immune response and downregulate viral replication; **(2) Targeted immune boosting**, in which we will inoculate bats with novel chimeric polyvalent recombinant spike proteins plus the immune modulator to enhance innate immunity against specific, high-risk viruses. We will trial inoculum delivery methods on captive bats including a novel automated aerosolization system, transdermal nanoparticle application and edible adhesive gels. We will use stochastic simulation modeling informed by field and experimental data to characterize viral dynamics in our cave test sites, maximize timing, inoculation protocol, delivery method and efficacy of viral suppression. The most effective biologicals will be trialed in our test cave sites in Yunnan Province, with reduction in viral shedding as proof-of-concept.

**Management Approach:** Members of our collaborative group have worked together on bats and their viruses for over 15 years. The lead organization, EcoHealth Alliance, will oversee all work. EHA staff will develop models to evaluate the probability of specific SARS-related CoV spillover, and identify the most effective strategy for delivery of both immune boosting and immune targeting inocula. Specific work will be subcontracted to the following organizations:

- Prof. Baric, Univ. N. Carolina, will lead targeted immune boosting work, building on his two-decade track record of reverse-engineering CoV and other virus spike proteins.
- Prof. Wang, Duke-Natl. Univ. Singapore, will lead work on broadscale immune boosting, building on his group's pioneering work on bat immunity.
- Dr. Shi, Wuhan Institute of Virology will conduct viral testing on all collected samples, binding assays and some humanized mouse work.
- Dr. Rocke, USGS National Wildlife Health Center will optimize delivery of immune modulating biologicals, building on her vaccine delivery work in wildlife, including bats.
- Dr. Unidad, Palo Alto Research Center will lead development of novel delivery automated aerosolization mechanism for immune boosting molecules.

We are requesting \$14,209,245 total funds for this project across 3.5 project years.

## Section II C. GOALS AND IMPACT

**Overview:** The overarching goals of DEFUSE are to:

- **Identify and model spillover risk** of novel SARS-related coronaviruses (SARSr-CoVs) in Asia.
- **Design and demonstrate proof-of-concept** that upregulating the naturally low innate immunity of bats (**broadscale immune boosting**) and targeting high risk SARSr-CoVs in particular (**targeted immune boosting**) will transiently reduce spillover risk.

Our strategy to reduce risk of viral emergence from bats will protect the warfighter within USPACOM, and will be scalable to other regions and viruses (Ebola, Henipaviruses, rabies).

### Innovation and uniqueness:

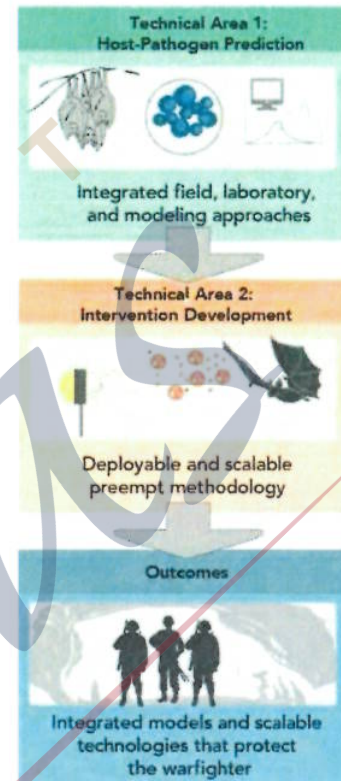
Bats harbor more emerging zoonoses than any other group of mammals, are ubiquitous, abundant, and often overlooked. However, other than PPE, there is no available technology to reduce exposure risk to novel CoVs from bats, and no effective therapeutics or countermeasures. SARSr-CoVs are enzootic in Asian<sup>1-3</sup>, African<sup>4</sup>, and European bats<sup>5,6</sup> that roost in caves but forage widely at night, shedding virus in their feces and urine. We have now published direct evidence of spillover of novel SARSr-CoVs into people in Yunnan Province, China, close to a cave complex where we have isolated strains that produce SARS-like disease in humanized mice but don't respond to antibody treatment or vaccination. These viruses are a clear-and-present danger to our military and to global health security because of their circulation and evolution in bats and periodic spillover into humans.

EcoHealth Alliance (EHA) leads the world in predictive models of viral emergence. We will use machine-learning models of spillover hotspots, host-pathogen spatial and genotype-phenotype mapping, and unique datasets to validate and refine hotspot risk maps of viral emergence. We have shown that dampened innate immunity in bats allows them to carry otherwise lethal viruses, likely as an adaptation to the physiologic stress of flight. We will design strategies like small molecule RIG-like receptor (RLR) or Toll-like receptor (TLR) agonists, to upregulate bat immunity, and suppress viral replication, thereby significantly reducing viral shedding and spillover (**broadscale immune boosting**). We will complement this by coupling agonist treatments with SARSr-CoV recombinant spike proteins to boost pre-existing adaptive immune response adult bats against specific, high-risk SARSr-CoVs (**targeted immune boosting**). We will design novel delivery and automated application methods, based on our previous work on wildlife vaccines, to reduce hazard during deployment.

### Technical Area 1



Our strategy begins by a complete inventory of bats and their SARSr-CoVs at our intervention test site cave complex in Yunnan, China that harbors bats with high-risk SARSr-CoVs. We will collect data from three caves in that system (one is our intervention test site and two control sites) on: monthly bat abundance and diversity, viral prevalence and diversity, individual bat viral load and host physiological markers; genomic characterization of low- and high-risk SARSr-CoV strains among bat species, sexes, and age classes; satellite telemetry and mark-recapture data on bat home range and inter-cave movement; and monitoring of daily, weekly and seasonal changes in bat populations. We will use stochastic neural networks to build joint species distribution models (JSDM) to predict bat species composition of caves, and high-risk SARSr-CoV diversity across S. China, South and SE Asia. These will be parameterized with EHA's database of bat host-viral relationships and estimates of zoonotic viral richness per bat species<sup>7</sup>; biological inventory data on all bat caves in Southern China; the full SARSr-CoV inventory from our cave test sites in Yunnan; and species distribution data for all bats. We will test and validate viral diversity predictions using data from >10,000 previously collected bat samples from 6 Asian countries under our USAID-funded PREDICT project. We will produce a prototype app for the warfighter to identify the risk of bats harboring dangerous viruses at a site. **This 'spatial viral spillover risk' app** will be field-deployable and updated real-time with surveillance data, to ground-truth and fine-tune predictions.



To characterize spillover risk of SARSr-CoV quasispecies (QS), the Wuhan Institute of Virology team (WIV) will test bat fecal, oral, and blood samples for SARSr-CoVs by PCR. We will collect viral load data from fresh fecal pellets. SARSr-CoV spike proteins will be sequenced, viral recombination events identified, and isolates used to identify strains that can replicate in human cells. The Univ. N. Carolina (UNC) team will reverse-engineer spike proteins of a large sample of high- and low-risk viruses for further characterization. This will effectively freeze the QS we analyze at  $t=0$ . These QS<sub>0</sub> strain viral spike glycoproteins will be synthesized, and those binding to human cell receptor ACE2 will be inserted into SARSr-CoV backbones (non-DURC, non-GoF), and inoculated into humanized mice to assess capacity to cause SARS-like disease, efficacy of monoclonal therapies, the inhibitor GS-5734<sup>8</sup> or vaccines against SARS-CoV<sup>8-12</sup>.

We will use these data to **build machine-learning genotype-to-phenotype Bayesian network models of viral evolution and host jump risk**. These will predict the capacity of QS<sub>0</sub> strains to infect human cells based on genetic traits and experimental assays above. Using data on diversity of spike proteins, recombinant CoVs, and flow of genes via bat movement and migration, we will estimate evolutionary rates, rates of recombination, and capacity to generate novel strains capable of human infection. Finally, virus-host relationship and bat home range data will be used to estimate spillover potential - extending models well beyond our field sites. We will **validate model predictions of host jump risk by 1) conducting further spike**

protein-based binding and cell culture experiments, and **2)** identifying whether designated high-risk SARSr-CoV strains have already spilled over into people near our bat cave sites. Our preliminary work shows ~3% seroprevalence to bat SARSr-CoVs in people at this site<sup>13</sup>. We will test these previously collected human sera (n>2000) for presence of antibodies to the high- and low-risk SARSr-CoVs identified by our modeling, using Luciferase immunoprecipitation system (LIPS) assays we design against the SARSr-CoVs identified in this project<sup>14</sup>.

### Technical Area 2

In TA2, we will **develop scalable approaches to suppress SARSr-CoVs within bat reservoir species, to reduce the likelihood of virus transmission into humans**. We will evaluate two approaches to defuse spillover potential: **1) Broadscale immune boosting:** we will apply immune modulators like bat interferon and TLR agonists to up-regulate bat innate immunity and suppress viral replication and shedding; **2) Targeted immune boosting:** we will apply polyvalent chimeric recombinant SARSr-CoV spike proteins in the presence of broadscale immune boosting treatments to boost immune memory and suppress specific SARSr-CoVs.

Both TA2 lines of work will run parallel beginning Yr 1. Prof. Wang (Duke-Natl. Univ. Singapore – Duke-NUS) will lead the broadscale immune boosting work, building on his pioneering work on bat immunity<sup>15</sup>, including identifying weakened functionality of innate immunity factors like STING, a central DNA-interferon (IFN) sensing molecule, that may allow bats to maintain an effective, but not over-response to viruses<sup>16</sup>, and IFNA, which is constitutively expressed without stimulation<sup>17</sup>. We will trial the following, concurrently and competitively, for efficacy and scalability: **i)** Activating TLR/RLR pathways to induce IFN induction, e.g. polyIC or 5'ppp-dsRNA. A similar strategy has been demonstrated in a mouse model for SARS-CoV<sup>18,19</sup>; **ii)** Universal bat interferon. Interferon has been used clinically in people, e.g. against filoviruses<sup>20</sup>, and replication of SARSr-CoV is sensitive to interferon<sup>21</sup>; **iii)** Boosting bat IFN by blocking negative regulators. Bat IFN $\alpha$  is constitutively expressed but cannot be induced to a high level<sup>17</sup>. We will use CRISPRi to identify potential negative regulators and screen for compounds targeting this gene; **iv)** Activating dampened IFN production pathways via DNA-STING-dependent and ssRNA-TLR7-dependent pathways. Mutant bat STING restores antiviral functionality, suggesting these pathways are important in bat-viral coexistence<sup>16</sup>. We will directly activate the pathways downstream of STING/TLR7, to promote viral clearance; **v)** Inoculating crude CoV fragments to upregulate innate immune responses to specific CoVs – a partial step towards the targeted immune boosting work below.

Prof. Baric (UNC) will lead the targeted immune boosting work. We will develop recombinant chimeric spike-proteins<sup>22</sup> from known SARSr-CoVs, and those characterized by DEFUSE. Using details of SARS S protein structure and host cell binding<sup>23</sup> we will sequence, reconstruct and characterize spike trimers and receptor binding domains of SARSr-CoVs, incorporate them into nanoparticles or raccoon poxvirus-vectors for delivery to bats<sup>10,24-27</sup>. In combination with immune-boosting small molecules, we will use these to boost immune memory in adult bats previously exposed to SARSr-CoVs, taking the best candidate forward for field-testing. Recombinant S glycoprotein-based constructs with immunogenic blocks from across group 2B SARSr-CoVs should induce broadscale adaptive immune responses that reduce heterogeneous virus burdens in bats and transmission risk to people<sup>28,29</sup>. Innate immune damping is highly conserved in all bat species tested so far. We will use the unique Duke-NUS



Asian cave bat (*Eonycteris spelaea*) breeding colony to conduct initial proof-of-concept tests, extended to small groups of wild-caught *Rhinolophus sinicus* bats at WIV.

A novel delivery method for our immune boosting molecules will be developed and implemented by Dr. Roche at the USGS National Wildlife Health Center (NWHC) who has previously developed animal vaccines through to licensure<sup>30</sup>. Using locally acquired insectivorous bats<sup>31,32</sup>, we will assess delivery vehicles and methods including: 1) transdermally applied nanoparticles; 2) sticky edible gels that bats mutually groom and consume; 3) aerosolization via prototype sprayers (Dr. Unidad, PARC) designed for cave settings; and 4) automated sprays triggered by timers and movement detectors at critical cave entry points. We have extensive preliminary data on these techniques for wildlife, including vaccinating bats against rabies in the lab<sup>31</sup>, successful delivery, consumption and spread in wild vampire bats. We will use the NWHC captive bat colony and wild bats in US caves to trial delivery vehicles using the biomarker rhodamine B (which fluorescently marks hair on consumption) to assess uptake. **The most optimal deployment approaches will be tested on wild bats at our test cave sites in Yunnan, using the most effective immune modulation preparations.** Bat populations from experimental and control caves will be surveyed longitudinally for viral load before and after deployment trials. EHA has had unique access to these sites for ~10 years. In DEFUSE Yr1, we will seek permission for experimental trials from collaborators at the Yunnan Forestry Department and Center for Disease Control, following our proven track record of rapidly obtaining IACUC and DoD ACURO approval for animal research. We will **model optimal strategies to maximize treatment efficacy** for TA2, using stochastic simulation modeling of viral circulation dynamics at our sites, informed by field and experimental data. We will estimate frequency and population coverage required for our intervention, and model the time period of viral suppression, until re-colonization or evolution leads to return of a high-risk SARSr-CoV.

#### Deliverables:

- Open source models and App identifying geographical and host-specific risk of spillover for novel SARSr-CoVs
- Experimentally validated genotype-phenotype models of spillover for viral strains.
- Proven technology to modulating bat innate immunity to reduce viral shedding.
- Tested and validated delivery mechanism for bat cave usage including vaccines in other bat host-pathogen systems (e.g. rabies, WNS).
- Proof-of-concept approach to transiently reducing viral shedding in wild bats that can be adapted for other systems including Ebola virus.

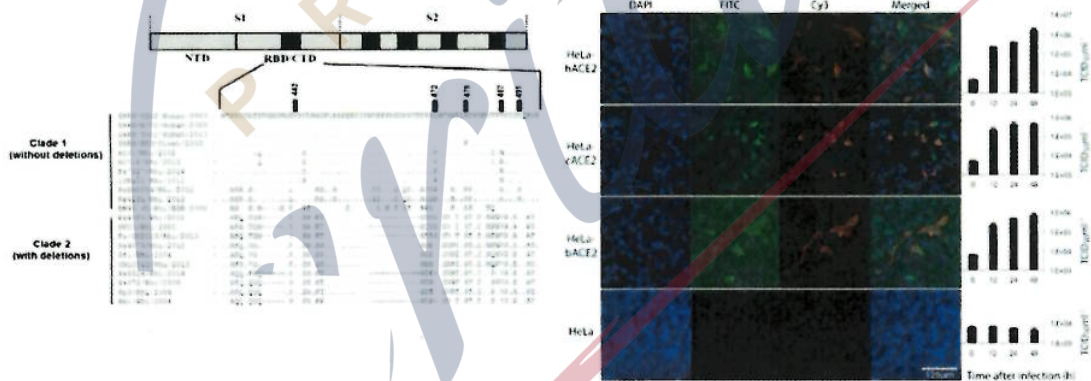
## Section II

### D. TECHNICAL PLAN

#### Technical Area I:

**Choice of site and model host-virus system.** For the past 14 years, our team has conducted CoV surveillance in bat populations across S. China, resulting in >180 unique SARSr-CoVs in ~10,000 samples (>5% prevalence, including multiple individuals harboring the same viral strains)<sup>2,21,33</sup> and a per-bat species prevalence up to 10.9%. Bat SARSr-CoVs are genetically diverse, especially in the S gene, and most are highly divergent from SARS-CoV. However, our test cave site in Yunnan Province, harbors a quasispecies (QS) population assemblage that contains all the genetic components of epidemic SARS-CoV<sup>34</sup>. We have isolated three strains there (WIV1,

WIV16 and SHC014) that unlike other SARSr-CoVs, do not contain two deletions in the receptor-binding domain (RBD) of the spike, have far higher sequence identity to SARS-CoV (Fig. 1), use human ACE2 receptor for cell entry, as SARS-CoV does (Fig. 2), and replicate efficiently in various animal and human cells<sup>2,3,33-35</sup>, including primary human lung airway cells, similar to epidemic SARS-CoV<sup>11,12</sup>. Chimeras (recombinants) with these SARSr-CoV S genes inserted into a SARS-CoV backbone, and synthetically reconstructed full length SHC014 and WIV1 cause SARS-like illness in humanized mice (mice expressing human ACE2), with clinical signs that are not reduced by SARS-CoV monoclonal antibody therapy or vaccination<sup>11,12</sup>. People living up to 6 kilometers from our test cave have SARSr-CoV antibodies (~3% seroprevalence)<sup>13</sup>, suggesting active spillover. These data, phylogeography of SARSr-CoVs, and coevolutionary analysis of bats and their CoVs (unpubl.), suggest that bat caves in SW China, and *Rhinolophus* spp. bats are the likely origin of the SARS-CoV clade, and are a **clear-and-present danger for the emergence of a SARSr-CoV from the current QS**. The *Rhinolophus* spp. bats that harbor these viruses occur across Asia, Europe, and Africa. **Thus, while DEFUSE fieldwork will focus on high-risk sites in S. China, our approach to reduce the risk of these viruses spilling over is broadly applicable across four combatant command regions (PACOM, CENTCOM, EUCOM, AFRICOM).**



**Fig. 1 (top left):** Alignment of amino acid sequences of the spike protein receptor-binding motif of SARSr-CoVs and SARS-CoV<sup>34</sup>. Numbered amino acid residues are responsible for interaction with human ACE2<sup>36</sup>. **Fig. 2 (top right):** Bat SARSr-CoV WIV1 replicates efficiently in HeLa cells expressing human, civet and bat ACE2<sup>2</sup>.

**Full inventory of bat SARSr-CoV QS at our test cave sites, Yunnan, China.** To provide data to train and validate our modeling, and as baseline for our immune modulation trial (TA2), DEFUSE fieldwork will target the high-risk cave site in Yunnan Province, SW China (Fig. 4, red triangle) where we will conduct our field trial, and where we have previously identified and isolated high-risk SARSr-CoVs<sup>2,11,33,34</sup>. At three cave sites (one designated for our trial, two as controls), we will determine the baseline QS<sub>0</sub> risk of SARSr-CoV spillover. We will conduct longitudinal surveillance of bat populations to detect and isolate SARSr-CoVs, determine changes in viral prevalence over time, and measure bat population demographics and movement, definitively characterizing their SARSr-CoV host-viral dynamics. Field data will allow us to test the accuracy of our model predictions and compare efficacy of lab animal models with field trials. Our preliminary data (Table 1) demonstrate that *R. sinicus*, *R. ferrumequinum*, and *R. affinis* (which co-roost at our test site) are primary reservoirs of SARSr-CoV and the only reservoirs of three high-risk strains (WIV1, WIV16, SHC014), with *Hipposideros* and *Myotis* spp. playing an

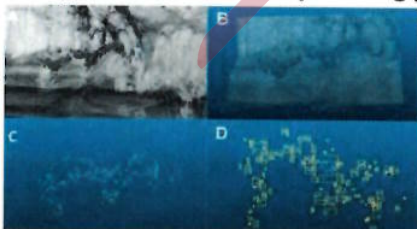
insignificant (<1% prevalence) role in viral dynamics. We will capture *Rhinolophus spp.* bats using harp traps and mist nets during evening flyout, collect rectal, oral, and whole blood samples (×2 per bat) using sterile technique to avoid cross-contamination, and take 2-mm wing tissue punch biopsies for host DNA bar-coding, host ACE2 receptor gene sequencing (interface site – 3 individuals per species), and cophylogeny analyses. Bats will be subcutaneously microchipped (PIT tag), and morphological and physiological data (age class, body weight, reproductive status etc.).

Species	n	SARSr-CoV prevalence
<i>Rhinolophus sinicus</i>	1036	10.9%
<i>R. ferrumequinum</i>	191	6.3%
<i>R. affinius</i>	518	1.2%

In Phase I we will **sample 60 bats each of *R. sinicus*, *R. ferrumequinum*, and *R. affinis*, (180 bats per cave) every three months non-destructively for 18 months** from our three cave sites. Given ~6-9% prevalence

(n=3,304) of SARSr-CoVs in *Rhinolophus spp.* at our sites, this sample size would allow detection of 10% fluctuation in viral prevalence among sampling periods and caves. During the 2 months per quarter without physical bat trapping we will collect fresh fecal pellets by placing clean 2m<sup>2</sup> polyethylene sheets beneath roosting bats<sup>37</sup>. *Rhinolophus spp.* have a 7-week gestation period, spring birthing, and aggregate during mating periods. Our monthly sampling strategy will collect adequate data to parameterize stochastic simulation models, and cover two mating and gestation periods to assess life-history driven changes in viral prevalence and immune marker (e.g. interferon) levels. We will conduct **pre- and post-intervention sampling** (biweekly fecal pellet sampling for 4 months, and 10 male and 10 female bats per species tested every 2 weeks post-intervention for 4 months, prior to- and post-deployment) **to monitor SARSr-CoV QS and bat immune status changes in test and control site bats during Phase II (TA2)**. Immune status can be followed in individual bats due to the relatively small roost sizes in these caves and our individual marking of captured bats. We will assess immune status using nanostring immune profiling panels validated during captive bat studies at Duke NUS. We will use infrared spotlights and digital infrared imaging to record the number and species of bats above each plastic sheet and fecal pellets will be genetically barcoded to confirm species identification<sup>38</sup>. Samples will be preserved in viral transport medium, immediately frozen in liquid nitrogen dry shippers, and transported to partner laboratories with maintained cold chain and under strict biosafety protocols. PIT tag readers and weatherproof thermal imaging IR cameras mounted at each cave entrance will passively monitor temporal roost site fidelity, rates of inter-cave movement, and daily fluctuation in bat population<sup>39</sup>. ICARUS satellite transmitters (1g) will be attached to 12 *Rhinolophus spp.* bats from each study roost (36 bats total) to determine nightly foraging dispersal patterns (<https://icarusinitiative.org>). Telemetry and PIT tag data will be used to calculate home range, degree of mixing among roosts, and parameterize dynamic models.

**Study caves will be surveyed using portable LiDAR technology<sup>40-42</sup>**, to give a 3-D image of roost areas and data on species composition for targeting of immune modulation treatments in TA2 (**Fig. 3**). Sampling quotas will be adjusted based on lab and model results to optimize viral detection.



**Fig. 3:** Light Detection and Ranging (LiDAR) scanning to characterize caves and quantify number of individual bats roosting in clusters: A) LiDAR system takes a 360° omnidirectional photo of clustered bats, B)

photo converted to 3-D point cloud, C) non-bat points, based on laser return intensity removed, D) automated counting algorithm counts individual bats. Figure from<sup>41</sup>.

Our team has more than 50 years collective experience in safe and humane handling of bats for biological sampling. This project will operate under appropriate IACUC/ACURO and PPE guidelines. EHA has several ongoing DTRA-supported projects, has obtained ACURO approval for animal research from the DoD, and currently maintains IACUC protocols through Tufts University (EHA staff are adjunct faculty), which we will use for DEFUSE IACUCs. IACUCs already approved for lab/field work at Duke-NUS, UNC, NWHC, and WIV, will be modified for DEFUSE.

**Predictive models of high-risk sites and bat species across Asia.** We will build models that predict bat and viral diversity and spillover risk across Asia to enable warfighters and planners to assess risk and necessity for intervention deployment (TA2). We will combine regional-scale joint species distribution models (JSDM), machine-learning host-virus association models, and non-parametric viral richness estimators to respectively predict the composition of bat communities in caves across Asia, host range for key viral clades, and as-of-yet unsampled viral diversity. We will use a stochastic feedforward neural network to implement JSDMs that are effective at multiple scales with incomplete observations (as occurs for bats and their viruses), and that account for bat species co-occurrence driven by environment or evolution<sup>43</sup>. We will fit our JSDM to biological inventory data on over 200 caves in the region<sup>44</sup>, to physiologically relevant bioclimatic variables (BIOCLIM)<sup>45</sup>, open source topographic data, and proxies for subterranean habitat such as ruggedness and habitat heterogeneity. As in previous work<sup>46</sup>, we will refine these models with regional-scale environmental variables (land-use, distance to roads, etc.) and cave-specific variables (cave length, availability of roosting area, entrance dimensions, cave complexity etc.). We will validate them using independent bat occurrence estimates and observations<sup>47,48</sup>, and use EHA's unique database of all known host-virus relationships to extend predictions of bat CoV diversity and host range<sup>7</sup> (Fig. 4). We will use generalized additive host trait predictive models and machine-learning algorithms (BRT, random forest)<sup>49</sup> with non-parametric estimators to predict SARSr-CoV diversity in the QS of each bat species<sup>50</sup>, and assess viral discovery rates in real time through sampling (Fig. 5).



*Fig. 4: Predictive map of zoonotic viral diversity in bats for China and SE Asia (yellow=more viruses), based on all known mammal host-viral relationships<sup>7</sup>. Our Yunnan test cave site is labeled (red asterisk). Fig. 5: CoV QS diversity estimates (dashed line with 95% confidence intervals) based on PREDICT sampling data (solid line) for four bat genera.*

To extend the geographic scope of predictive models, we will include data from >1800 viral detections (CoVs and others) from >10,000 individual bat samples in 6 Asian countries (NIAID- and USAID PREDICT-funded). For species composition and viral presence predictions, we will validate models against a 20% validation subset of data, and field data.

**Prototype app for the warfighter.** Drawing on experience building applications for data collection and analysis for DoD (e.g. <https://flirt.eha.io/>, <https://eidr-connect.eha.io/>, <https://mantle.io/grrs>), we will produce a prototype 'spatial viral spillover risk' app for the

warfighter that identifies probability of dangerous viral pathogens spilling over from bats at a site. We will use outputs from our spatial risk modeling, observed and predicted host-viral associations, open-source species and pathogen ontologies, and app-directed crowd-sourced echolocation data to ground-truth and fine-tune its predictive capacity. This app will be updated in Y2 and Y3 to incorporate additional risk data from host-virus binding assays and SARSr-CoV surveys. We will use EHA's risk-ranking algorithms (<https://ibis.eha.io/>) to display critical areas of high risk based on geolocation features, recency of information, host and pathogen characteristics. The app will collect user GPS location data and preload bat species distribution and community composition estimates from our JSDMs. These will be refined with real-time surveillance data collected without the need to enter cave sites using mobile phone-enabled high-frequency microphones for bat detection<sup>51</sup>, validated and trained with reference acoustic calls using convolutional neural networks<sup>52</sup>. Identified bat species will be automatically linked with viral diversity data from EHA's host-pathogen database and SARSr-CoV data from DEFUSE to deliver high-risk pathogen lists, displayed as pathogen-centric, bat-centric, or map-centric views, with proactive alerts when critical information is received. All code modules will be available and documented on GitHub (<https://github.com/ecohealthalliance/>). This technology will improve overall situational awareness of existing and novel infectious agents found in bats, allowing DoD personnel to quickly identify areas high spillover risk sites and rapidly deploy resources to respond to and mitigate their impact preemptively when necessary.

**SARSr-CoV QS detection, sequencing, and recovery.** We will screen samples for SARSr-CoV nucleic acid using our pan-CoV consensus one-step hemi-nested RT-PCR assay targeting a 440-nt fragment in the RNA-dependent RNA polymerase gene (RdRp) of all known  $\alpha$ - and  $\beta$ -CoVs<sup>1,53</sup>, and specific assays for known SARSr-CoVs<sup>2,21,33,34</sup>. PCR products will be gel purified, sequenced and qPCR performed on SARSr-CoV-positive samples to determine viral load. Full-length genomes or S genes of all SARSr-CoVs will be high-throughput sequenced followed by genome walking<sup>2,3,34</sup>. We will analyze the S gene for its ability to bind human ACE2 by Biocore or virus entry assay. Synthesis of Chimeric Novel SARSr-CoV QS: We will commercially synthesize SARSr-CoV S glycoprotein genes, designed for insertion into SHC014 or WIV16 molecular clone backbones (88% and 97% S-protein identity to epidemic SARS-Urbani). These are BSL-3, not select agents or subject to P3CO (they use bat SARSr-CoV backbones which are exempt) and are pathogenic to hACE2 transgenic mice. Different backbone strains increase recovery of viable viruses identification of barriers for RNA recombination-mediated gene transfer between strains<sup>34</sup>. Recombinant viruses will be recovered in Vero cells, or in mouse cells over-expressing human, bat or civet ACE2 receptors to support cultivation of viruses with a weaker RBD-human ACE2 interface. Recovery of Full length SARSr-CoV: We will compile sequence/RNAseq data from a panel of closely related strains (<5% nucleotide variation) and compare full length genomes, scanning for unique SNPs representing sequencing errors<sup>54-56</sup>. Consensus candidate genomes will be synthesized commercially (e.g. BioBasic), using established techniques and genome-length RNA and electroporation to recover recombinant viruses<sup>28,57</sup>.

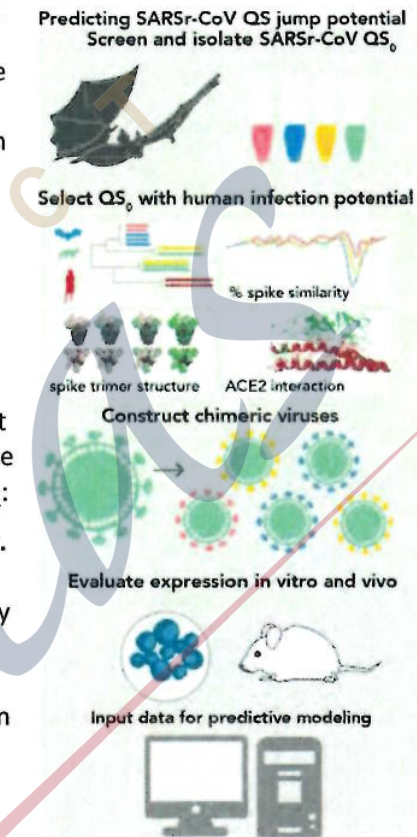
**Predicting strain-specific SARSr-CoV spillover risk.** We will combine detailed experimental characterization of QS<sub>0</sub> at our test cave sites with state-of-the-art genotype-phenotype Bayesian network models.

This will enable us to predict the jump probability of future QS that emerge with unique genetic recombinations. Our models will be parameterized with experimental data from a series of assays on the S genes of bat SARSr-CoVs (Fig. 6, right), with experimental and modeling work flowing together in iterative steps. Our prior data will act as baseline to parameterize spillover risk modeling<sup>11,12,29,58</sup>. This will be supplemented by characterization of isolated viruses under DEFUSE (at WIV), **approximately 15-20 bat SARSr-CoV spike proteins/year** (at UNC, WIV), and >180 bat SARSr-CoV strains sequenced in our prior work and not yet examined for spillover potential. All experiments will be performed in triplicate and data fed to models in real time:

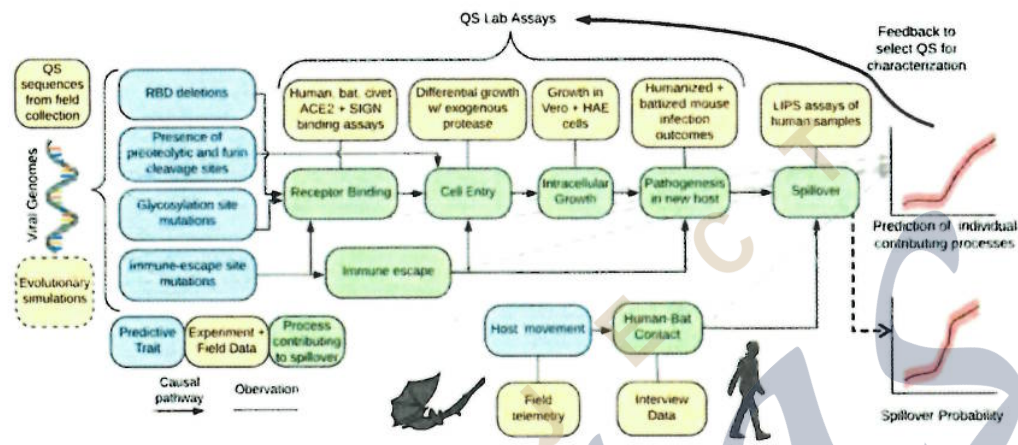
**Experimental assays of SARSr-CoV QS jump potential (Fig. 6, right).**

Pre-screening via structural protein modeling, mutation identification, and pseudovirus assays: Viral entry is the major species restriction preventing spillover of SARSr-CoVs<sup>29,58</sup>. To select QS for further characterization we will first use structural modeling of SARSr-CoV S protein binding to ACE2 receptors<sup>59,60</sup>. Mutations in the RBD<sup>29,58,61,62</sup>, and host protease proteolytic processing of the S glycoprotein<sup>63-65</sup>, regulate SARSr-CoV cell entry and cross-species infectivity. Mismatches in the S-RBD-ACE2

molecules or S proteolytic processing will prevent cell entry of SARS-CoV<sup>29,58</sup> and QS with these mismatches will be deprioritized. Single amino acid variations could dramatically alter these phenotypes and we will evaluate the impact of low abundant, high consequence micro-variation in the RBD using RNAseq to identify low abundant QS variants encoding mutations relevant to ACE2 binding. We will conduct *in vitro* pseudovirus binding assays, using established techniques<sup>2</sup>, and live virus binding assays (at WIV to prevent delays and unnecessary dissemination of viral cultures) for isolated strains. Initial model predictions based on these data inputs will be used to guide strain selection for further characterization. In vitro testing of chimeric viruses: All chimeric viruses will be sequence verified and evaluated for: i) ACE2 receptor usage across species *in vitro*, ii) growth in primary HAE, iii) sensitivity to broadly cross neutralizing human monoclonal antibodies that recognize unique epitopes in the RBD<sup>66,67</sup>. Should some isolates prove highly resistant to our mAB panel, we will evaluate cross neutralization against a limited number of human SARS-CoV serum samples from the Toronto outbreak. Chimeric viruses that encode novel S genes with spillover potential will be used to identify SARSr-CoV strains for recovery as full genome length viable viruses. In vivo pathogenesis: Groups of 10 animals will be infected intranasally with  $1.0 \times 10^4$  PFU of each vSARSr-CoV, clinical signs (weight loss, respiratory function, mortality, etc.) followed for 6 days



p.i., and sacrificed at day 2 or 6 p.i. for virologic analysis, histopathology and immunohistochemistry of the lung and for 22-parameter complete blood count (CBC) and bronchiolar alveolar lavage (BAL). Validation with full-length genome QS: We will validate results from chimeric viruses by re-characterizing full-length genome versions, testing whether backbone genome sequence alters full length SARSr-CoV spillover potential. QS for full-genome characterization will be selected to reflect strain differences in antigenicity, receptor usage, growth in human cells and pathogenesis. We will test growth in primary HAE cultures and *in vivo* in hACE2 transgenic mice. We anticipate recovering ~3-5 full length genome viruses/yr. Testing Synthetic Modifications: We will synthesize QS with novel combinations of mutations to determine the effects of specific genetic traits and the jump potential of future and unknown recombinants. RBD deletions: Small deletions at specific sites in the SARSr-CoV RBD alter risk of human infection. We will analyze the functional consequences of these RBD deletions on SARSr-CoV hACE2 receptor usage, growth in HAE cultures and *in vivo* pathogenesis. First, we will delete these regions, sequentially and in combination, in SHC014 and SARS-CoV Urbani, anticipating that the introduction of deletions will prevent virus growth in Vero cells and HAE<sup>58</sup>. In parallel, we will evaluate whether RBD deletion repair restores the ability of low risk strains to use human ACE2 and grow in human cells. S2 Proteolytic Cleavage and Glycosylation Sites: After receptor binding, a variety of cell surface or endosomal proteases<sup>68-71</sup> cleave the SARS-CoV S glycoprotein causing massive changes in S structure<sup>72</sup> and activating fusion-mediated entry<sup>64,73</sup>. We will analyze all SARSr-CoV S gene sequences for appropriately conserved proteolytic cleavage sites in S2 and for the presence of potential furin cleavage sites<sup>74,75</sup>. SARSr-CoV S with mismatches in proteolytic cleavage sites can be activated by exogenous trypsin or cathepsin L. Where clear mismatches occur, we will introduce appropriate human-specific cleavage sites and evaluate growth potential in Vero cells and HAE cultures. In SARS-CoV, we will ablate several of these sites based on pseudotyped particle studies and evaluate the impact of select SARSr-CoV S changes on virus replication and pathogenesis. We will also review deep sequence data for low abundant high risk SARSr-CoV that encode functional proteolytic cleavage sites, and if so, introduce these changes into the appropriate high abundant, low risk parental strain. N-linked glycosylation: Some glycosylation events regulate SARS-CoV particle binding DC-SIGN/L-SIGN, alternative receptors for SARS-CoV entry into macrophages or monocytes<sup>76,77</sup>. Mutations that introduced two new N-linked glycosylation sites may have been involved in the emergence of human SARS-CoV from civet and raccoon dogs<sup>77</sup>. While the sites are absent from civet and raccoon dog strains and clade 2 SARSr-CoV, they are present in WIV1, WIV16 and SHC014, supporting a potential role for these sites in host jumping. To evaluate this, we will sequentially introduce clade 2 disrupting residues of SARS-CoV and SHC014 and evaluate virus growth in Vero cells, nonpermissive cells ectopically expressing DC-SIGN, and in human monocytes and macrophages anticipating reduced virus growth efficiency. We will introduce the clade I mutations that result in N-linked glycosylation in rs4237 RBD deletion repaired strains, evaluating virus growth efficiency in HAE, Vero cells, or nonpermissive cells ± ectopic DC-SIGN expression<sup>77</sup>. *In vivo*, we will evaluate pathogenesis in transgenic hACE2 mice. Low abundance micro-variations: We will structurally model and identify highly variable residue changes in the SARSr-CoV S RBD, use commercial gene blocks to introduce these changes singly and in combination into the S glycoprotein gene of the low risk, parental strain and test ACE2 receptor usage, growth in HAE and *in vivo* pathogenesis.



**Fig. 7:** A simplified directed graph of a Bayesian network model representing the causal relationships between input data, modeled processes, and outputs.

**Network machine-learning to predict spillover potential of high-risk SARSr-CoV strains.** We will use experimental data from above to **build genotype-phenotype models of bat SARSr-CoV spillover potential**. We will use Bayesian Network Models (BNM), fit via MCMC methods<sup>78</sup> to predict spillover risk based on bat SARSr-CoVs genotype data (presence of deletions in RBD, proteolytic binding and glycosylation sites etc.) and the ecological traits of hosts - integrating data on multiple, interacting processes and QS spillover potential to generate overall spillover probabilities. The Bayesian approach will allow us to update our models iteratively as new data is acquired, and use interim model predictions to guide which experiments to prioritize to maximize predictive ability<sup>79</sup>. We will control for experimental conditions (assays on live viral isolates, full-genome or synthetic chimeric viruses, and the molecular backbone of the latter). Traits will be used as inputs to BNM's causal graph, to predict latent variables representing interconnected processes that contribute to SARSr-CoV QS infection in new hosts: receptor binding, cell entry, immune system interaction, and intracellular growth, all measured by our lab assays. These, in turn will act as predictors for the ultimate outcomes of host pathogenesis and host jumping potential (Fig. 7). We will use published work on these genetic traits to put informative priors on strength and direction of interactions in the causal graph. We will use prior-knowledge model simulations to select target sequences from our sampling for characterization and genome-sequencing, to collect data that maximally enhances the predictive power of our model, and update these simulations iteratively throughout the experimental phase to continually guide QS selection. We will use regularizing priors to reduce over-fitting and select the most predictive variables in the final model.

**Model validation using SARSr-CoV serology from previously-collected human samples and surveillance data.** Active spillover of SARSr-CoV in our study region enables us to measure actual spillover risk to validate our models of QS jump potential. We will gather data on viral QS antibodies found in the local human population using LIPS assays on >2,000 previously-collected human sera (NIAID, Daszak PI) from people living close to our test cave sites in Yunnan Province, a sub-sample of which showed 2.7% seropositivity to bat SARSr-CoVs<sup>13</sup>. The IRB for



this work is current and covers proposed DEFUSE testing. We will design LIPS assays targeting high- and low-spillover risk SARSr-CoV QS, as done previously for SARSr-CoVs<sup>13,80,81</sup> and the novel SADS-CoV<sup>24</sup>. We will: **1)** insert different high- and low-risk SARSr-CoV N genes into pREN-2 vector (LIPS vector), first assessing N gene similarity to determine their potential cross-reactivity in a LIPS assay; **2)** determine LIPS assay specificity by producing polyclonal sera via injection of recombinant protein or attenuated virus into rabbits; **3)** validate LIPS assays by incubating antigens with their respective positive serum samples and the antigen antibody complex eluted using protein A/G beads; **4)** validate LIPS positive sera results by spike protein based LIPS and viral neutralization assay. As a confirmatory test, the positive samples from LIPS will be validated by virus neutralization assay. We will use these LIPS assays to test serum samples for presence of antibodies to high- and low-risk SARSr-CoV QS. We will validate predictions of jump potential and extend the BNMs to predict actual spillover probabilities by modeling bat-human contact rates with bats. We will use ecological data on bat hosts and human behavioral survey data collected previously from these individuals to estimate wildlife contact in predicting exposure measured by our LIPS assays.

**Evolutionary modeling and simulation to predict potential strains.** Our Bayesian network modeling will generate predictions of the spillover risk of QS sequences we identify. To examine risk associated with the total viral population, we will model and simulate evolutionary processes to **identify likely viral QS that our sampling has not captured, and viral QS likely to arise in the future (“QS<sub>x</sub>”)**. We will use a large dataset of S protein sequences and full-length genomes generated from prior work and DEFUSE fieldwork to estimate SARSr-CoV substitution rate and its genome-wide variation using coalescent and molecular clock models within a Bayesian MCMC framework<sup>82</sup>. We will estimate SARSr-CoV recombination rates at the cave population level using these data and Bayesian inference<sup>83,84</sup>. We will apply RDP<sup>85</sup>, similarity plots, and bootscan to identify recombination breakpoints and hotspots within the SARSr-CoV genome as done previously<sup>34</sup>, now extended to the full genome. Using these estimates we will simulate the evolution of the SARSr-CoV QS virome using a forward-time approach implemented in simulators that model specific RNA virus functions (e.g. VIRAPOPS<sup>86</sup>). We will predict the rate at which new combinations of genetic traits can spread in viral populations and compare recombination rates among caves and bat communities. Our forward-simulated results **will provide a pool of likely unknown and future QS<sub>x</sub> species**. Using these and our SEM model for spillover risk, **we will predict the QS<sub>x</sub> most likely to arise and have spillover and pathogenic potential**. We will use evolutionary simulation results to iteratively improve our Bayesian network model. The number of genetic traits with potential for prediction of pathogenicity is large, so we will perform variable reduction using tree-based clustering, treating highly co-occurring traits as joint clusters for prediction. We will generate these clusters from all SARSr-CoV sequences from DEFUSE fieldwork and prior work. As trait clusters may be modified through recombination, we will use our forward-evolutionary modeling to predict how well trait clusters will be conserved, retaining only those unlikely to arise in unknown or QS<sub>x</sub> genomes. This will enable a trade-off between increased predictive power based on current samples and generalizability to future strains that have not yet evolved.

## Technical Area 2

**Immune modulation approach to reducing bat SARSr-CoV spillover risk.** Our work shows that the following unique immunological features of bats may explain their capacity to harbor high viral loads with minimal clinical signs: a) bats maintain constitutively high expression of IFN $\alpha$  that may respond to and restrict viral infection<sup>17</sup>; b) several interferon activation pathways are dampened, e.g. STING (a central cytosolic DNA-sensor molecule to induce interferon) dependent and TLR7 dependent pathways<sup>16</sup>; c) the NLRP3 dependent inflammasome pathway is dampened, and key inflammation response genes like AIM2 are not present in bats<sup>87,88</sup>. These traits may be due to bat immune-sensing pathway adaptation as a fitness cost of flight<sup>15</sup>. We hypothesize that bat virus replication will likely be restricted quickly by constitutively expressed IFN $\alpha$  in bats, resulting in lower B/T cell stimulation due to lower viral stimuli. Second, dampened interferon and inflammasome responses will result in lower cytokine responses that are required to trigger T/B cell dependent adaptive immunity (e.g. antibody response), ultimately resulting in suppression of viral replication and shedding. **We and others have demonstrated proof-of-concept of this phenomenon:** Experimental Marburg virus infection of Egyptian fruit bats, a natural reservoir host, resulted in widespread tissue distribution with low viral load, brief viremia, low seroconversion and a low antibody titer that waned quickly, suggesting no long-term protection is established<sup>89-91</sup>. Poor neutralizing antibody responses occur after experimental infection of bats with Tacaribe virus<sup>92</sup> and in our studies of experimental infection of bats with SARS-CoV (Wang, unpubl.). We also successfully showed that bat interferon can inhibit bat SARSr-CoVs<sup>24</sup>. We hypothesize that use of immune modulators that upregulate the naturally low innate immunity of bats to their viruses, will transiently suppress viral replication and shedding, reducing the host jump risk. We further hypothesize that because *Rhinolophus* bats are long-lived (20+ yrs in the wild), most bats in a population will have been exposed to a range of SARSr-CoV QS at our sites. Specifically targeting upregulation of their adaptive immunity (immune memory) to high-risk viral strains may lead to heightened clearance of high-risk strains. We will evaluate two immune modulation approaches to defuse spillover of SARSr-CoVs from bats to humans: **1) Broadscale Immune Boosting strategies (Wang, Duke-NUS):** we will apply immune modulators like TLR ligands, small molecule RIG-like receptor (RLR) agonists or bat interferon in live bats, to up-regulate their innate immunity and suppress viral replication and shedding; **2) Targeted Immune Boosting (Baric, UNC):** the broadscale immune boosting approach will be applied in the presence of chimeric immunogens to activate immune memory in adult bats and boost clearance of high-risk SARSr-CoVs. We will use novel chimeric polyvalent recombinant S proteins in microparticle encapsidated gels for oral delivery and/or virus adjuvanted immune boosting strategies where chimeric recombinant SARSr-CoV S are expressed by raccoon poxvirus. Both lines of work will begin in Year 1 and run parallel, be assessed competitively for efficiency, cost, and scalability, and successful candidates from captive animal trials will be used in live bat trials at our test cave in Yunnan. The finding of low innate immunity across bats suggest that immune boosting could be broadly applicable to bat genera and viral families.

**Broad-scale immune boosting (Duke-NUS).** We will work on the following key leads to identify the most effective approach to up-regulate innate immunity and suppress viral loads. *Toll-like*

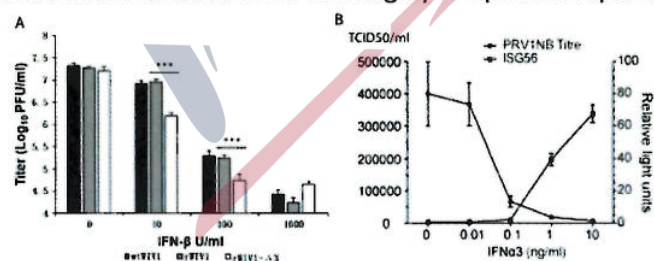


*receptor (TLR)/RIG-I Like Receptor (RLR) ligands:* Our work indicates a robust response in live bats to TLR-stimuli like polyI:C as measured by transcriptomics on spleen tissue (Fig. 8), liver, lung and lymph node, with matched proteomics to characterize immune activation *in vivo*. These activation profiles will be used to assess bat immune response to different stimuli and identify those which lower viral load in our experimental system at Duke-NUS (below).

**Fig. 8:** Pathway analyses from Ingenuity Pathway Analysis (IPA) of whole spleen NGS after stimulation with either LPS or polyI:C. Z-score increase over control bats is indicated as per scale, and suggests strong activation of many pathways.

We will also stimulate the RIG-I pathway with 5'pppDSRNA, a mimetic of the natural RIG-I stimulant that will activate functional bat IFN production pathways, as shown in a mouse model that cleared SARS-CoV, IAV and HBV<sup>18,19</sup>.

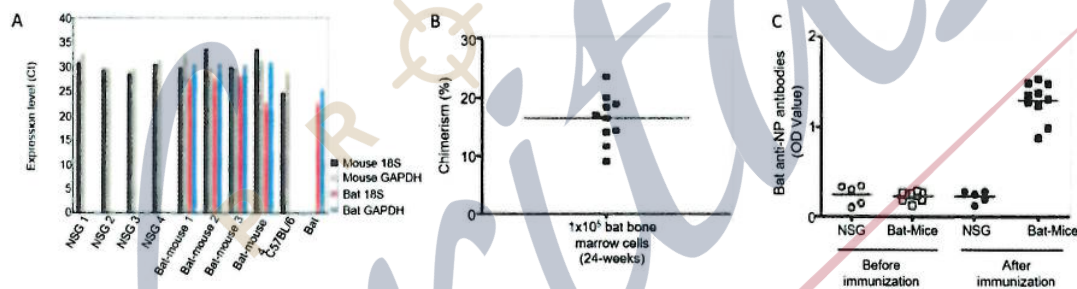
**Universal bat interferon:** We will design a conserved universal bat interferon protein sequence with artificial gene synthesis and produce recombinant protein by cleavable-affinity-tagged purification of supernatant from over-expressing bat cells, as used previously for recombinant *Pteropus alecto* IFN $\alpha$ <sup>17,93</sup> and CSF-1/IL-4. Utilization of a universal IFN for bats will overcome species-dependent response to the ligand, allowing the use of IFN throughout broad geographical and ecological environments and across many bat species. We have already produced recombinant non-universal, tagged, bat IFN that induce appropriate immune activation (Fig. 9). This ligand has been shown to reduce viral titers in humans, ferrets and mouse models intranasally and orally<sup>18,19,94</sup>. Interferon has been used clinically in humans as an effective countermeasure when antiviral drugs are unavailable, e.g. against filoviruses<sup>20</sup>. Interferon is known to be toxic, therefore we will carefully examine dose tolerance in bats and assess clinical effects of the treatment. We have shown that replication of SARS-CoV is sensitive to IFN treatments<sup>21</sup>. The successful delivery, immune activation and outcome on the host will be characterized thoroughly to optimize rapid immune activation.



**Fig. 9:** Bat viruses are sensitive to IFN treatments. A) Recombinant bat SARS-related coronavirus WIV1 replication was inhibited by human IFN- $\beta$  in a dose dependent manner in Vero cells. B) Bat reovirus PRV1NB replication was inhibited by recombinant bat IFN $\alpha$ 3 in a dose dependent manner in bat Paki03 cells.

**Boosting bat IFN by blocking bat-specific IFN negative regulators:** Uniquely, bat IFN $\alpha$  is naturally constitutively expressed but cannot be induced to a high level, indicating a negative regulatory factor in the bat interferon production pathway<sup>17,95</sup>. We will use a *Pteropus alecto* CRISPRi library pool that we have created covering multiple RNA targets in every gene in the *P. alecto* genome (Wang, unpubl.

data). Genes affecting influenza replication in bat cells have already been identified using this library. Using CRISPRi we will identify negative regulator genes and screen for compounds targeting them to boost the inducibility of the IFN system in a shorter time-frame. Based on previous work<sup>96-98</sup>, it is highly likely this will be a conserved pathway across all bats. Activating dampened bat-specific innate immune pathways which include DNA-STING-dependent and TLR-dependent pathways: We have shown that mutant bat STING or reconstitution of AIM2 and functional NLRP3 homologs restores antiviral functionality, suggesting these pathways are important in bat-viral coexistence. By identifying small molecules to directly activate pathways downstream of STING or TLR/RLRs, such as TBK1 activation, we will activate bat innate defense by interferons, promote viral clearance and, we hypothesize, significantly reduce viral load in bats. Validation in a bat-mouse model. Various CoVs show efficient infection and replication inside the human host but exhibit defective entry and replication using mouse as a host due in part to differences in DPP4 and ACE2 receptors.



**Fig. 10:** A) Presence of bat-specific qPCR in reconstituted mice after 12 weeks. B) chimeric ratio of bat-mouse cells in circulation after 24 weeks. C) Specific antibody response to a KLH-tetanus antigen generated by bat-reconstituted mice.

We have shown efficient reconstitution of irradiated mice using bat bone marrow from multiple species, including *E. spelaea* (Fig. 10), including reconstitution of bat PBMC's in the mouse, presence of circulating bat cells and generation of bat-specific antibodies in mice incapable of producing an antibody response. This '**batified**' mouse model can be utilized for both circulating infection of SARS-CoV (in the immune compartment only) and as a model for generating bat-specific antibodies against CoV proteins. Efficient validation of infection into bat cells will be used to validate the infectivity of the viruses and generation of bat antibodies will facilitate validation of the best proteins/peptide to elicit an effective immune response.

**Targeted immune boosting (UNC).** To boost targeted adaptive immunity (immune memory) in wild bats chronically exposed to circulating SARSr-CoV QS, we will inoculate with chimeric S glycoproteins in the presence of the broadscale immune boosting agonists above. We have developed novel group 2b SARSr-CoV chimeric S glycoproteins that encode neutralizing domains from phylogenetically distant strains (e.g. Urbani, HKU3, BtCoV 279, ~25% diversity). The chimeric S programs efficient expression when introduced in the HKU3 backbone full length genome, and elicits protective immunity against multiple group 2b strains. We will develop robust expression systems for SARSr-CoV chimeric S using ectopic expression *in vitro*. We will work with Dr. Ainslie (UNC-Pharmacy) who has developed novel microparticle delivery systems and dry powders for aerosol release that encapsidate recombinant proteins and adjuvants (innate immune agonists) that we will use for parallel broadscale immune boosting strategies

± **chimeric immunogens**. Simultaneously, we will introduce chimeric and wildtype S in raccoon poxvirus (RCN), in collaboration with Dr. Rocke and confirm recombinant protein expression, first *in vitro* and in the Duke-NUS bat colony, prior to any field trial. The goal is to develop a suite of reagents to remotely reduce exposure risk in high risk environmental settings. Chimeric SARSr-CoV S Immunogens: CoVs evolve quickly by mutation and RNA recombination<sup>34,99</sup>, and encode neutralizing epitopes in the amino terminal domain (NTD), RBD and S2 portion of the S glycoprotein<sup>66,100,101</sup>, providing a strategy to build chimeric immunogens that induce broadly cross reactive neutralizing antibodies. Given the breadth of SARSr-CoV circulating in natural settings, chimeric immunogens will be designed to increase the breadth of neutralizing epitopes across the group 2b phylogenetic subgroup<sup>48</sup>. Using synthetic genomes and structure guided design, we fused the NTD of HKU3 with the SARS-CoV RBD with the remaining BtCoV 279/04 S glycoprotein molecule, introduced the chimeric S glycoprotein gene into the HKU3 genome backbone (25% different than SARS-CoV, clade 2 virus) and recovered viable viruses (HKU3-S<sub>mix</sub>) that could replicate in Vero cells. We inserted HKU3<sub>mix</sub> S glycoprotein gene into VEE virus replicon vectors (VRP-S<sub>chimera</sub>) and demonstrated that VRP vaccines protect against lethal SARS-CoV challenge and virus growth. VRP-S<sub>HKU3</sub> and VRP-S<sub>279</sub> both protect against HKU3<sub>mix</sub> challenge and growth *in vivo*, demonstrating that neutralizing epitopes in the HKU3<sub>mix</sub> S glycoprotein provide broad cross protection against multiple SARSr-CoV strains. In addition to using these immunogens as a targeted broad-based boosting strategy in bats, we will produce other chimeras for more focused immune targeting of known high risk strains. We will use the Protein Expression Core at UNC (<https://www.med.unc.edu/csb/pep>) to produce codon optimized, stabilized and purified prefusion SARS-CoV glycoprotein ectodomains<sup>23</sup>. Purified recombinant protein will be used for inclusion in delivery matrices (e.g. purified powders, dextran beads, gels – see below) with broadscale immune agonists (adjuvants, Duke-NUS). 2<sup>nd</sup> Generation Chimeric S glycoprotein Immunogen Design and Testing: We will produce a chimeric SHC014 NTD/SARS-CoV-RBD/HKU3 S C terminal recombinant S immunogen (HKU3-S<sub>S014</sub>), for more focused immune targeting on known high and low risk strains designated from our experimental and modeling analyses. The recombinant HKU3-S<sub>S014</sub> S genes will be sent to Dr. Rocke for insertion into the raccoon poxvirus vaccine vector. Using established techniques, we will characterize S expression and provide virus vectors to Prof. Wang for immune boosting trials at Duke-NUS, and if successful in the field (Prof. Shi). The human codon optimized HKU3-S<sub>S014</sub>, and HKU3-S<sub>mix</sub> recombinant chimeric spike glycoproteins will be expressed and purified by the UNC proteomics core, producing mg quantities for inclusion in nanoparticle and microparticle carriers in collaboration with Dr. Ainslie. We will produce WIV-S<sub>S014</sub> and HKU3-S<sub>mix</sub> glycoprotein expression will be validated by Western blot and by vaccination of mice, allowing us to determine if the recombinant protein elicits neutralizing antibodies that protect against lethal SARS-CoV and SHC014 challenge. We will produce enough material for *in vivo* testing in mice and in bats. We will validate recombinant virus glycoprotein expression by Western blot and by vaccination of mice, to determine if the recombinant protein elicits neutralizing antibodies that protect against lethal SARS-CoV, HKU3-S<sub>mix</sub> and SHC014 challenge. We will survey the RNAseq data for evidence of complex S glycoprotein gene RNA recombinants in the SARSr-CoV population genetic structure. If present, we will synthesize 2-3 potentially effective recombinant S genes, insert these genes into SHC014 or HKU3 genome backbones and VRP, and characterize their

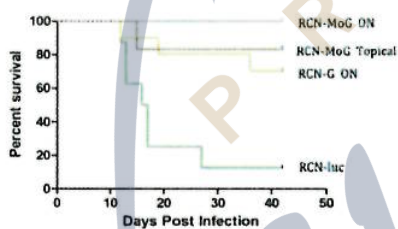
viability and replicative properties in cell culture and in mice. We will produce immunogens and evaluate their ability to protect against infection.

**Adjuvant and Immunogen Delivery Vehicles.** Dr. Ainslie (UNC) has developed the biodegradable polymer acetalated dextran (Ac-DEX) for the delivery of antigens and adjuvants in vaccine applications. Ac-DEX has advantages over other polymers for vaccine development: it is easily synthesized and scalable using an FDA-approved one-step method to move from water-soluble to insoluble<sup>102-104</sup>; it is acid sensitive which improves antigen presentation; microparticles (MPs) are small (5-8 $\mu$ m) so can be phagocytosed by DCs and traffic to the lymph node for efficient molecule delivery<sup>105</sup>; MPs are pH-neutral, safe<sup>106</sup>, stable outside the cold-chain<sup>107</sup>, can be aerosolized or delivered in sprays or gels<sup>102,108</sup>, and we have previously encapsulated Poly (I:C)(1), resiquimod<sup>105</sup>, and a STING agonist into our novel MPs<sup>109</sup>, providing proof-of-concept that this significantly enhances the activity of the TLR agonist. We have displayed better efficacy than state-of-the-art FDA-approved inactivated flu virus (Fluarix) in a ferret model of influenza<sup>110</sup>, using HA with encapsulated STING cyclic [G(3',5')pA(3',5')p]<sup>111</sup>.

**Microparticle Performance Metrics in vitro and in Rodents and Bats:** We will encapsulate Poly (I:C), resiquimod (TLR 7) or other innate immune agonists to enhance type I interferon production in consultation with Prof. Wang. Agonist laden particles will be made separately or in combination with recombinant SARS-CoV chimeric spike proteins, encapsulated into our aerodynamic MPs and nanoparticles. **Viral infection models in *Eonycteris* spp. (Duke-NUS) and wild-caught *Rhinolophus* spp. (Wuhan Inst. Virol.) bats:** To test and compare the efficacy of the immune modulating approaches above, we will use our cave-nectar bat (*Eonycteris spelaea*) breeding colony infected with Melaka virus (family *Reoviridae*) which infects this species<sup>112,113</sup>. First, we will take wing punch biopsies from 3 individuals to sequence their ACE2 receptor gene. This will be inserted into human cell lines to pre-screen viral strains for binding. Those that bind will be used for *in vivo* expts. We will use two coronaviruses (SARSr-CoV WIV1 and MERS-CoV) in ABSL3. SARS and MERS infection studies are already underway in *Eonycteris* and *Pteropus* cell lines and primary immune cells. Our *E. spelaea* colony has now reached a sustainable population for infection experiments and the ABSL3 facility has been outfitted with bat-specific cages. The planned pilot *in vivo* infection of *Eonycteris* bats with Melaka Virus and MERS will be completed by July 2018. Previous infection studies were completed in *Pteropus* and *Rhinolophus* bats in Australia by L-F Wang at CSIRO, AAHL and an additional *Pteropus* infection trial is currently planned through the University of Queensland in Australia. At WIV, 20 adult wild *Rhinolophus* spp. bats (10 of each sex) will be captured at our test cave site, housed within ABSL3, ACE2 receptor genes sequenced and used to pre-screen spikes as above, then bats will be tested using PCR and serology for current and prior exposure to SARSr-CoVs, and inoculated with WIV1, WIV16 or SHC014. For all experiments, viral loads will be measured by qPCR, titration of produced virus, NGS transcriptomics and viral-specific nanostring probes added to the immunoprofiling panel. Antibody responses will be measured by LIPS assay, as described previously. In addition to direct *in vivo* delivery of ligands, aerosolized and liquid-phase deployment methods suitable for a cave-like environment will be tested, in collaboration with UNC, NWHC and PARC. This approach allows us to test our immune-boosting strategies, in a safe and controlled environment, prior to expanding to field-based evaluation. The experimental protocols and analytical methods used for the *E. spelaea* colony, with a focus on

internal-normalization and small amounts of sample materials (including nanostring analysis from whole blood-droplets), will be replicated to analyze experimental infection of wild-caught *Rhinolophus* spp. bats at WIV and in the test cave trail in TA2.

**Delivery system development (NWHC).** We have previously developed, safety- and efficacy-tested, and registered oral vaccines and delivery methods to manage disease in free-ranging wildlife including a plague vaccine for prairie dogs<sup>30</sup>, a rabies vaccine for bats<sup>31</sup> and strategies for white-nose syndrome (unpubl. data)<sup>114</sup>. As previously shown for rabies vaccine in bats, we will trial sticky edible gels that bats groom among each other to deliver immune modulators and recombinant SARSr-CoV spike proteins to *Rhinolophus* bats, including trials of them combined with poxvirus vectors and nanoparticles/nanoemulsions that enhance uptake through transdermally. Poxviruses are effective viral vectors for delivering vaccines to wildlife<sup>30,115,116</sup>, and can replicate safely at high levels in bats after oronasal administration<sup>32</sup>. We have demonstrated proof-of-concept and safety in bats with modified vaccinia Ankara (MVA) and raccoon poxvirus (RCN) vectors using *in vivo* biophotonic imaging<sup>31</sup>. RCN replicated to higher levels in bats than MVA, even via the oral route, and was found to be safe. We used raccoon

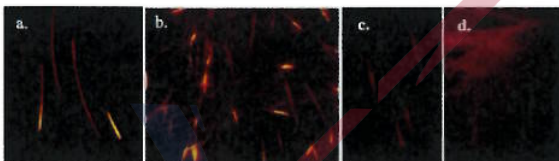


poxvirus-vectored novel rabies glycoprotein (mosaic or MoG) and demonstrated protective efficacy in bats after oronasal and topical administration<sup>31</sup> (Fig. 11).

**Fig. 11:** Vaccine efficacy, rabies challenge in *Epptesicus fuscus* immunized with raccoon poxvirus expressing a mosaic G protein (RCN-MoG) oronasally (ON) or topically in comparison to RCN expressing typical G protein or luciferase (negative control).

Poxviruses are safe in a wide variety of wild and domestic animals, and allow for large inserts of

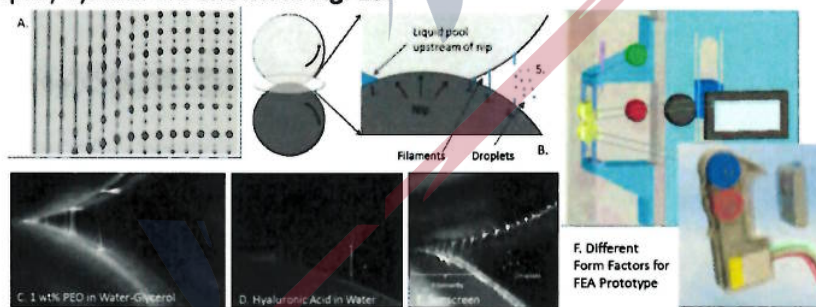
foreign DNA. We have previously used a raccoon poxvirus vectored vaccine expressing plague antigens to manage plague caused by *Yersinia pestis* in prairie dogs. We incorporated the biomarker Rhodamine B (RB) into baits to assess uptake by target and non-target species<sup>114,117</sup> (Fig. 12). RB is visible under a UV microscope until the hair grows out (~50 days in prairie dogs). We have since conducted a large field trial that demonstrated vaccine efficacy in four species of prairie dogs in seven western states<sup>30</sup>.



**Fig. 12:** Prairie dog hair and whisker samples under fluorescence microscope to determine uptake of baits containing Rhodamine B. a) 20 days after bait distribution, b) 16 days after bait distribution, c) and d) controls (note natural dull fluorescence).

**Transcutaneous delivery:** To trial a strategy that avoids use of live agents, we will use nanoparticles to increase transcutaneous delivery efficiency<sup>118</sup>. We will use poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) to encapsulate immune modulators as a method of transcutaneous delivery of vaccine to bats via dendritic cell uptake<sup>119</sup>, as has been shown for delivery of TLR agonists and antigens simultaneously to mice<sup>120</sup>. This approach will be competitively trialed against ac-DEX, with and without adjuvants<sup>121</sup> which enhance the immune response in mice to SARS-CoV spike proteins<sup>24</sup>. Initial trials will be conducted in the USA with locally acquired insectivorous big brown bats (*Eptesicus fuscus*) which we have maintained and housed for several experiments previously<sup>31,32</sup>. We will treat bats via topical application with various test formulations that include the biomarker Rhodamine B (RB), co-

house them with untreated bats, and monitor transfer between bats by collecting hair and whiskers for biomarker analysis. *Initial field trials:* High rates of grooming within bat colonies allow effective transfer of products among a colony. In biomarker trials in Peru, RB-labeled glycerin jelly yielded a rate of transfer from 1.3 – 2.8 bats for every bat marked. We will conduct initial trials with each of the delivery vehicles in local US insectivorous bats in their natural setting. Within one week of application of varying doses, bats will be trapped at the cave entrance using mist nets or Harp traps and hair will be collected to assess the rate of uptake via biomarker analysis, then released. After we have determined optimal approaches for mass delivery, we will test them on wild-caught captive *Rhinolophus* bats (WIV), then in our three cave sites in Yunnan Province. Biomarker will be used to assess rates of uptake (and non-target species contamination) and these data used in modeling studies to help determine the optimal rates of application of immunomodulating agents. *Innovative Aerosol Approach to Bat Inoculation:* Once we have confirmed uptake in laboratory studies, we will assess scalable delivery methods in local caves and hibernacula using biomarker-labeled mediums without immunomodulatory substances. In collaboration with Dr. Jerome Unidad of Palo Alto Research Center (PARC), we will use an innovative aerosol platform technology unique to PARC to design a field-deployable prototype for use in cave settings. The Filament Extension Atomization (FEA)<sup>122</sup> technology can spray fluids with a wide-range of viscosities ranging from 1mPa-s (the viscosity of saliva and most aqueous vaccine formulations) up to 600Pa-s (the viscosity of creams and gels for topical delivery) using a roll-to-roll misting process (<https://www.parc.com/services/focus-area/amds/>) that results in narrowly-dispersed droplets with tunable sizes from 5-500 microns. FEA technology is compatible with all the formulations of interest to project DEFUSE, including aqueous formulations intended for conventional spraying and the edible gels and creams for topical delivery, with no limit on bioactive ingredient loading. FEA can be a universal delivery platform for direct spraying onto bats with the formulation geared towards bio-efficacy. Potential form factors for a prototype cave-based spray system are shown in Fig. 13.



**Fig. 13: PARC FEA Technology** – A. Beads-on-a-string structures in viscoelastic fluids<sup>123</sup>, B. Parallelization of filament formation and droplet break-up in an FEA roller system, C.-E. Images from high speed videos of representative fluids sprayed with FEA, F.

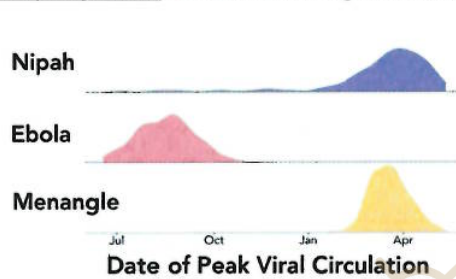
*Potential field-deployable prototype for Project DEFUSE (benchtop, handheld).*

PARC and NWHC will conduct initial prototype trials on US cave bats. PARC will then develop the prototype to a form that will be used for the proof-of-concept demonstration at the test sites in the Kunming bat caves, Yunnan, China. The field-deployable system will be motion-actuated, and on a timer so that bats will be targeted at fly-in and fly-out to avoid non-target species (e.g. cave swiftlets).

**Dynamic circulation modeling to optimize deployment strategy.** To select immune boosting,



and multiple delivery options and schedules, we will simulate deployment using a model of viral circulation in cave bat populations. The model will be fit to data from our three-cave test system but designed to be robust and generalizable to other cases. We will simulate outcomes under a variety of different deployment scenarios to produce conservative estimates of optimal application under real-world conditions. *Fit stochastic viral circulation models to longitudinal sampling data:* We will use longitudinal viral prevalence, mark-recapture data, telemetry and



infrared camera data collected during our field sampling to parameterize and construct models of bat population dynamics and viral circulation in our test caves. **Fig. 14:** Modeled seasonal circulation of viruses modeled from longitudinal sampling of viruses in bat colonies in Bangladesh.

We will modify existing models that extract temporal dynamics developed for multiviral systems based on longitudinal studies in Bangladesh<sup>124</sup> (Fig. 14). We will use a simple but robust stochastic SIR process model with immigration and emigration and flexible, nonlinear contact rates between bats<sup>125</sup> to capture a wide range of viral dynamics from intermittent viral outbreaks to regular, endemic circulation with a relatively small number of parameters. We will fit these models to our sampling data using the **partially observable markov process (pomp)** framework<sup>126</sup>, allowing estimates of the underlying latent dynamic disease transmission process, accounting for and separating natural stochasticity of viral circulation and observation error in sampling. We will validate our models via temporal cross-validation and by testing the results of a fit from two cave sites on data from a third. *Simulate circulation under a set of plausible deployment scenarios.* Using the top performing sets of immune boosting molecules from captive trials, and the most effective delivery media and methods from cave studies, we will use the stochastic SIR model to generate simulations of viral circulation under a series of deployment scenarios in our test caves. These scenarios will cover a range of plausible intensities, frequencies, and combinations of suppression strategies and will incorporate uncertainty in the efficacy of each treatment strategy. From these simulations, we will estimate the expected degree and time period of suppression of viral circulation and shedding and determine the optimal scenario for deployment in our focal study caves. *Test robustness of deployment strategies under broader conditions:* We anticipate deployment is likely to occur under highly varied species population and compositions, with uncertain estimates based on rough observations, with varied uptake and efficacy of treatment due to different environmental conditions, and with limited time and resources. We will simulate deployment under many potential conditions to determine optimal deployment under each, and strategies that are conservative and robust to uncertainties and limitations.

**Proof-of-concept deployment of immune modulation molecules in test caves in Yunnan Province, China.** We will deploy the most successful immune modulation molecules at our three test-caves in Yunnan Province, China. We will identify the primary entry/exit points and traffic patterns for each cavern used by bats during flyout by LiDAR mapping and infrared video surveillance, and position two PARC spray nozzles around the top (10 and 2 o'clock position, pointing down) of the primary opening. Depending on the size of the cave opening, we will

mount the nozzles on extendable booms to position them at the top of the cave mouth. Spray will be activated by bat movement to spray continuously or in a staggered manner during flyout and flyin to create an aqueous curtain that bats will fly through. We will determine the optimal duration of spraying using stochastic viral circulation models and real-time population size data. We assume a rate of glycerin gel transfer of 2.0, through grooming activity from preliminary data. Initial trials will use RB to assess coverage. Then, at the test cave, immune-modulation biologicals and biomarkers will be deployed, with biomarker only sprayed at two other control caves. The 4 months pre-deployment sampling will be followed by 4 months post deployment surveillance (**see sampling strategy**) commencing the day following deployment through which we will assess 1) nature and duration of individual bat immune response to the treatment and 2) population level SARSr-CoV viral shedding rates in the test and control caves based on fecal pellet screening. We will also screen for the biomarker to assess coverage achieved. This approach can be **scaled up** for a larger network of bat roosts by using our app to model bat roost connectivity (mixing patterns among local caves based on our recapture and telemetry data) and identify caves with the highest connectivity so that bats transfer the biological treatment to other caves at a rate that dampen viral shedding over a much larger area.

### Section 1.03

### MANAGEMENT PLAN



Project DEFUSE lead institution is EcoHealth Alliance, New York, an international research organization focused on emerging zoonotic diseases. The PI, Dr. Daszak, has 25+ years' experience managing lab, field and modeling research projects on emerging zoonoses. Dr. Daszak will commit 2 months annually (one funded by DEFUSE, one funded by core EHA funds) to oversee and coordinate all project activities, with emphasis on modeling and fieldwork in TA1. Dr. Karesh has 40+ years' experience leading zoonotic and wildlife disease projects, and will commit 1 month annually to manage partnership activities and outreach. Dr. Epstein, with 20 years' experience working emerging bat zoonoses will coordinate animal trials across partners. Drs. Olival and Ross will manage modeling approaches for this project. Support staff includes a field surveillance team, modeling analysts, developers, data managers, and field consultants in Yunnan Province, China. The EHA team has worked extensively with other collaborators: Prof. Wang (15+ yrs); Dr. Shi (15+ yrs); Prof. Baric (5+ yrs) and Dr. Rocke (15+ yrs). **Subcontracts: #1** to Prof. Baric, UNC, to oversee reverse engineering of SARSr-CoVs, BSL-3 humanized mouse experimental infections, design and testing of targeted immune boosting

treatments; #2 to Prof. Wang, Duke-NUS, to oversee broadscale immune boosting, captive bat experiments, and analyze immunological and virological responses to immune modulators; #3 to Dr. Shi, Wuhan Inst. Virol., to conduct PCR testing, viral discovery and isolation from bat samples collected in China, spike protein binding assays, humanized mouse work, and experimental trials on *Rhinolophus* bats; #4 to Dr. Rocke, USGS NWHC, to refine delivery mechanisms for immune boosting treatments. Dr. Rocke will use a captive colony of bats at NWHC for initial trials, and oversee cave experiments in the US and China. #5 to Dr. Unidad, PARC, to develop innovative aerosol platform into a field-deployable device for large-scale inoculation of the bats. Dr. Unidad will collaborate closely with Dr. Rocke in developing a field deployable prototype for both initial trails and cave experiments in China.

**Collaborator Coordination:** All key personnel will join regularly-scheduled web conferencing and conference calls in addition to frequent ad hoc email and telephone interactions between individuals and groups of investigators. Regular calls will include:

- Weekly meetings between the PI and Program Manager (on project and task status)
- Weekly web/phone meetings between Program Manager and subawardee admin. staff
- Monthly web/phone conferences between EHA PIs and all subawardee PIs.
- Monthly web conferences between key personnel (research presentations/coordination)
- Four in-person partner meetings annually with key personnel at EHA and two in-person partner meetings annually between subawardees.
- Annual in-person meeting among all key personnel

Evaluation metrics will include the generation of high-quality data, successful achievement of milestones and timelines, scientific interaction and collaboration, the generation of high quality publications, and effective budget management. The PI and subawardee PIs will attend a kickoff meeting and the PI will meet regularly with DAPRA at headquarters and at site visits.

**Data Management and Sharing:** EcoHealth Alliance will maintain a central database of data collected and generated via all project field, laboratory, and modeling work. The database will use secure cloud hosting services and enable export to archival and platform-independent formats. It will ensure data and metadata compatibility between project components, track data versioning and annotations, and enable compliance with DARPA data requests and disclosure requirements. All archived human sample data will be de-identified. Partners will provide raw and processed data to the central database throughout the course of the project. Project partners will have access to the data they generate in the database at all times, and maintain control over local copies. Release of any data from the database to non-DARPA outside parties or for public release or publication will occur only after consultations with all project partners. EHA has extensive experience in managing data for multi-partner partner projects (PREDICT, USAID IDEEAL, the Global Rabivirus Reporting System).

**Problem identification and resolution:** Regular planning, monitoring, and evaluation meetings will be the primary mechanisms for problem identification. Minor problems (e.g. delays in sample availability or test results) will be dealt with internally through appropriate action and resolution monitored by Dr. Daszak and the Project Manager. In the event of significant problems, such as prolonged poor productivity, inadequate scientific collaboration, or major disputes regarding research direction or resource allocation, EHA will assist with resolving the

problem through negotiation. Should a resolution not be forthcoming, consultation with our technical advisors and DARPA Program staff may be warranted.

**Risk management:** Maintaining a timeline and meeting milestones will require strict and continuous oversight of all project phases, frequent and regularly scheduled communication, and the ability to make decisions and implement strategies. A project of this nature requires a different mindset from that typically associated with basic research activities that move at an incremental pace with investigators gradually optimizing experimental systems, refining data, or waiting for additional data before moving ahead with an analysis approach. To maintain our timeline, we will continually evaluate these trade-offs to make decisions about when iteration is appropriate and when necessary to move forward with current information.

#### **Biographies:**

**Dr. Peter Daszak** is President and Chief Scientist of EcoHealth Alliance, Chair of the NASEM Forum on Microbial Threats, member of the Executive Committee and the EHA institutional lead for the \$130 million USAID-EPT-PREDICT. His >300 scientific papers include the first global map of EID hotspots<sup>49,127</sup>, estimates of unknown viral diversity<sup>50</sup>, predictive models of virus-host relationships<sup>7</sup>, and evidence of the bat origin of SARS-CoV<sup>2</sup> and other emerging viruses<sup>128-131</sup>.

**Prof. Ralph Baric** is a Professor in the UNC-Chapel Hill Dept. of Epidemiology and Dept. of Microbiology & Immunology. His work focuses on coronaviruses as models to study RNA virus transcription, replication, persistence, cross species transmission and pathogenesis. His group has developed a platform strategy to assess and evaluate countermeasures of the potential “pre-epidemic” risk associated with zoonotic virus cross species transmission<sup>10-12,29,57,64</sup>.

**Prof. Linfa Wang** is the Emerging Infectious Diseases Programme Director at Duke-NUS Medical School. His research focuses on emerging bat viruses, including SARS-CoV, SADS-CoV, henipaviruses, and others<sup>2,14,60,80,124</sup> and genetic work linking bat immunology, flight, and viral tolerance<sup>15,16,75,93</sup>. A 2014 recipient of the Eureka Prize for Research in Infectious Diseases, he currently heads a Singapore Nat. Res. Foundation grant “Learning from bats” (\$9.7M SGD).

**Prof. Zhengli Shi** is director of the Center for Emerging Infectious Diseases of the Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences and BSL3 and BSL4 lead. Her research focuses on traditional and high-throughput sequencing techniques for viral pathogen discovery. Since 2004, she has studied bat-borne viruses, leading the SARSr-CoV group discovery<sup>2,3,34,67</sup>.

**Dr. Tonie Rocke** is a research scientist at the USGS National Wildlife Health Center. Her research focuses on the ecology and management of diseases in wild mammals (e.g. plague, monkeypox, rabies and white-nose syndrome). She leads a large-scale field trial of oral plague vaccination of wild prairie dogs in the western U.S.<sup>30-32,114,117</sup>.

**Dr. Jerome Unidat** is a Member of Research Staff at the Hardware Systems Laboratory at PARC. His research focuses on novel fluid delivery systems including aerosol delivery for high viscosity fluids, polymers and biomacromolecules. He is the technical lead in developing the FEA spray technology for consumer and biomedical applications, and additive manufacturing.

## **Section II CAPABILITIES**

**EcoHealth Alliance (EHA)** is an international non-profit researching emerging zoonoses in >20 countries Asia, Africa and South America. EHA has pioneered modeling and analyses of the origins and drivers of emerging diseases, of the bat origins of emerging viruses, and the

dynamics of SARS-CoVs, henipaviruses and other high-profile emerging pathogens. EHA is major consortium partner in the USAID-EPT-PREDICT program that has tested over 35,000 animals and discovered 200 new viruses to date.

**University of North Carolina Medical School (UNC).** The Baric Laboratory in University of North Carolina at Chapel Hill comprise biosafety level two facilities equipped to perform basic virology, immunology, and molecular biology as well as university space for breeding mice for the proposed studies. The Baric BSL-3 laboratories are approved and have the required equipment to perform all of the chimeric virus recovery and characterization and ventilated rodent caging to examine the bat coronaviruses within this proposal.

**The National Wildlife Center (NWHC)** contains specialized research laboratories and support areas, staff offices, and BSL-3 biocontainment animal research areas. Two, fully equipped laboratories in the research building are available at all times for the proposed work. NWHC's BSL-3 biocontainment animal research area is equipped with pathology incineration, steam sterilization equipment, and an ultraviolet radiation chamber so that all materials can be treated before leaving the biological containment area, and is maintained under negative air pressure. Trained animal care staff and a Veterinary Medical Officer are available to maintain, monitor and handle animals. The NWHC is fully equipped for animal medical procedures.

**Palo Alto Research Center (PARC)** is composed of 140+ professional full time researchers from physics, materials science, chemistry, biology, engineering, computer science, controls and ethnography fields. Facilities comprise two general purpose labs for conducting spray experiments and fluid mechanics measurements, a cell culture lab, chemistry labs, laser patterning and 3D printing facilities, a professional staffed model shop and electronics labs.

**Wuhan Institute of Virology:** includes BSL2, BSL-3, and BSL-4 laboratories, animal feeding rooms and other supporting facilities. The Biosafety Laboratory will carry out CoV research, sample testing, sequencing, binding assays, *in vitro* and *in vivo* work.

**Duke-NUS Medical School; Singapore:** The Duke NUS Animal BSL-3 facility is co-located with the SingHealth Animal Husbandry and Hospital in Northern Singapore. The Facility is a state-of-the-art modular laboratory equipped to safely carry out infectious diseases research. The Animal BSL-3 lab is equipped with virology, basic immunology, and molecular biology capacity, and is equipped for handling caged animals including rodents, nonhuman primates and bats.

**Intellectual property rights:** PARC asserts restrictions on the following noncommercial item: An Efficient Method for Collecting Droplets of Strain Hardening Viscoelastic Fluids in a Spray Device, to be used in device development towards Project DEFUSE. PARC will develop the technology exclusively at private expense, and asserts that the USG has limited rights on technical data associated with the device. PARC is willing to negotiate in good faith with the government or technology transition partner for relevant background intellectual property to support transition. There are no restrictions on Commercial property rights.

**Related research:**

**Daszak, PI on subcontract, USAID-EPT1&2, PREDICT:** Consortium partner lead, Exec. Board member, Modeling & Analytics lead for two 5-year contracts (\$75 million; \$138 million) to conduct surveillance for novel viruses in wildlife in >25 countries globally, capacity build, assess behavioral risk, and manage databases. EHA subcontracts >\$35 million. >1000 viruses discovered, 10,000 samples collected. Papers published in *Science*, *Nature*, *Lancet*.

**Daszak, PI, NIAID: Understanding the Risk of Bat Coronavirus Emergence:** 5-year grant to research spillover risk of novel SARSr-CoVs in China. \$2.8 million, 5 subawards. Published work in *Science, Nature, PNAS*.

**Daszak, Chief-of-Party, USAID: Infectious Disease Emergence & Economics of Altered Landscapes:** PI on 3-year \$2.5 million contract to analyze economics of land use change and disease emergence in Malaysia.

## Section II STATEMENT OF WORK

### PHASE 1

**PI-TA-01 Task 1:** Conduct longitudinal bat sampling and ecological data collection from field sites in Southern China to obtain data for experimental studies and modeling (EHA)

**Sub-Task 1.1** Apply for and obtain IACUC and ACURO approval and appropriate permits in China for bat sample collection and field intervention pilot (EHA). **Sub-Task 1.2** Collect monthly specimens from bats at cave sites in Yunnan, China for SARSr-CoV screening and sequencing. Oral, fecal, and blood sample collected from 360 *Rhinolophus spp.* bats per month using live-capture and non-invasive sampling. Specimens shipped to laboratory for analysis. Associated morphological, demographic, and physiological data for individual bats collected (EHA, consultant Zhu). **Sub-Task 1.3** PIT tagging to assess bat connectivity and roost fidelity. All sampled bats marked with Passive Integrated Transponder tags. Radio frequency identification data loggers installed at each cave entrance for remote capture-recapture monitoring. (EHA, consultant Zhu). **Sub-Task 1.4** Satellite telemetry to assess bat home range size and connectivity. Mark 36 *Rhinolophus sp.* bats with 1g ICARUS satellite tags. (EHA, consultant Zhu). **Sub-Task 1.5** Real-time monitoring of bat populations. Conduct LiDAR cave surveys and establish remote IR thermal cameras at roost entrances for population size monitoring. Optimize algorithms for image recognition. (EHA, consultant Zhu). **Sub-Task 1.6** Develop and maintain project-wide database. Secure, cloud-hosted database will store all data collected and generated from field, lab, and experimental work, including code and generated data from modeling. (EHA)

**Milestone(s):** 1.1 Animal care and use approval and wildlife sampling permits obtained; 1.2 monthly collection of bat specimens and associate host data completed; 1.3 dataloggers and 1.5 IR cameras installed; 1.4 bat transmitters launched and data collection successful; 1.6 database built and tested; 1.6 field data entered into database monthly.

**Deliverables:** Specimens from 3,240 bats and fecal pellets collected from high-risk reservoir populations which have been obtained with all proper permits and permissions and shipped to WIV for analysis; real-time telemetry and mark-recapture data uploaded and made available to DARPA collaborators; completed database maintained.

**PI-TA-01 Task 2:** Construct models to predict bat species distributions and locations of greatest viral spillover risk (EHA).

**Sub-Task 2.1** Construct joint species distribution models to predict bat community in caves across S. and SE Asia and identify high-risk geographic hotspots for viral spillover (EHA). **Sub-Task 2.2** Machine learning models using host and ecological traits to predict presence of viruses with zoonotic potential in bats (EHA) **Sub-Task 2.3** Non-parametric viral richness estimators to predict as-of-yet unsampled viral diversity. **Sub-Task 2.4** Develop prototype 'spatial viral spillover risk' app for the warfighter (EHA)

**Milestone(s):** 2.1 Joint species distribution model fit for Asian Bats, Cave-level predictions of bat community composition and viral diversity, 2.2 and 2.3 predictions of viral diversity and jump potential per bat spp. Prediction validation for 2.1-2.3; 2.4 Prototype app produce for  $\beta$ -testing, prototype app successfully field tested.

**Deliverables:** Deployable models of bat community composition and per-species viral diversity and zoonotic jump potential. Development of fully functional and user-friendly application.

**PI-TA-01 Task 3:** Screen, characterize and isolate SARSr-CoV QS<sub>0</sub> from bat samples (WIV)

**Subtask 3.1** PCR screening of longitudinal specimens from target bat species (WIV). **Subtask 3.2**

Genetically sequence SARSr-CoV spike proteins from PCR-positive samples (WIV). **Subtask 3.3**

Develop and recover recombinant viruses with spike proteins from novel SARSr-CoVs (Duke-NUS). **Subtask 3.4** Identify the presence of low abundant, high risk SARSr-CoV, based on deep sequencing data (UNC)

**Milestone(s):** CoV prevalence and genetic diversity quantified; full genomes recovered

**Deliverables:** Library of PCR-positive specimens. Full sequencing of spike proteins. Creation of recombinant viruses to be used in task 4. List of potential higher risk SARSr-CoV QS.

**PI-TA-01 Task 4:** Experimental assays of SARSr-CoV QS jump potential (UNC)

**Sub-Task 4.1** Conduct pre-screening via structural protein modeling, mutation identification, pseudovirus assays. (UNC). **Subtask 4.2** Conduct *in vitro* testing of chimeric viruses against host cell lines (UNC). **Subtask 4.3** Assess *in vivo* pathogenesis in hACE2 transgenic mice (UNC).

**Subtask 4.4** Validate results from chimeric viruses with full-genome QS (UNC). **Subtask 4.5** Test synthetic modifications to viral spike proteins including RBD deletions, S2 Proteolytic Cleavage and Glycosylation Sites, N-linked glycosylation (UNC). **Subtask 4.6** Test effects of low-abundance, high-consequence micro-variations on jump potential. (UNC)

**Milestone(s):** Initiation and completion of each experimental sub-task.

**Deliverables:** Laboratory confirmed list of higher risk SARSr-CoV QS with zoonotic capability. Candidate SARSr-CoV for animal experiments. Data made available.

**PI-TA-01 Task 5:** Build and test Bayesian network models to predict genotype-phenotype spillover potential of high-risk SARSr-CoV strains. (EHA).

**Subtask 5.1** Make predictions using prior data to guide QS selection for characterization (EHA).

**Subtask 5.2** Update model predictions based on real-time data from viral *in vitro* and *in vivo* testing (EHA).

**Milestone(s):** Completion of preliminary model using prior data, tested and refined model using real-time data from the project.

**Deliverables:** Source code and model outputs from functional Bayesian predictive model for the risk of spillover of high-risk SARSr-CoV strains.

**PI-TA-01 Task 6:** Validate model predictions using SARSr-CoV serology from previously-collected human samples and surveillance data (EHA, WIV, Duke-NUS).

**Subtask 6.1** Design Luciferase immunoprecipitation system (LIPS) assays to high- and low- jump risk SARSr-CoV QS<sub>0</sub> we have characterized (WIV). **Subtask 6.2** Determine specificity of LIPS assays by recombinant protein or attenuated virus inoculation into rabbits (WIV). **Subtask 6.3**

Validate LIPS assays using positive serum samples, spike protein based LIPS and viral neutralization. (WIV). **Subtask 6.4** Test previously-collected human sera from Yunnan Province

to assess SARSr-CoV QS spillover (WIV). **Subtask 6.5** Validate BNM predictions of  $QS_0$  jump potential and identify actual spillover probabilities using bat-human contact data (EHA).

**Milestone(s):** LIPS assays developed and validated; sera screened; Bayesian model validated

**Deliverables:** Data from serological assay validation and testing; New LIPS serology assays for specific SARSr-CoV QSs; Source code for validated model based on spillover evidence.

**PI-TA-02 Task 7:** Experimental testing of 'Broad-scale Immune Boosting' using batified mice and captive bat colonies (Duke-NUS)

**Subtask 7.1** Boost bat interferon (IFN) by blocking bat-specific IFN negative regulators (Duke-NUS). **Subtask 7.2** Activate dampened bat-specific innate immune pathways including DNA-STING-dependent and TLR-dependent pathways (Duke-NUS). **Subtask 7.3** Validate broad-scale immune boosting in a bat-mouse model (Duke-NUS). **Subtask 7.4** Test immune modulation in captive *Eonycteris* sp. colony, using Malaka virus and SARSr-CoV infections. (Duke-NUS).

**Subtask 7.5** Test targeted immune boosting in wild-caught captive *Rhinolophus* spp. (WIV)

**Milestone(s):** Initiation and completion of each experimental sub-task.

**Deliverables:** Experimental data; whole animal profiling of immune stimulants and associated response kinetics. Selection of one primary and two secondary ligands for use in subsequent viral challenge studies. Demonstrated animal models for broad-scale immune boosting.

**PI-TA-02 Task 8:** Experimental testing of 'targeted immune boosting' using humanized mice and experimental bat colonies (UNC, NWHC, Duke-NUS, WIV)

**Subtask 8.1** Develop chimeric SARSr-CoV S immunogens (UNC) **Subtask 8.2** Design and test 2<sup>nd</sup> generation chimeric S glycoprotein immunogens in humanized mice (UNC). **Subtask 8.3** Create raccoon poxvirus-vectored targeted immune boosting approach to be tested in captive bats at Duke-NUS (NWHC). **Subtask 8.4** Test targeted immune boosting in captive *Eonycteris* sp. colony, using Malaka virus and SARSr-CoV infections (Duke-NUS). **Subtask 8.5** Test targeted immune boosting in wild-caught captive *Rhinolophus* spp. (WIV)

**Milestone(s):** Initiation and completion of each subtask.

**Deliverables:** Chimeric SARSr-CoV S immunogens and poxvirus-vectored immune boosting molecules available for use. Proof-of-concept for targeted immune boosting approach in humanized mice and captive bats.

**PI-TA-02 Task 9:** Develop and assess transcutaneous delivery methods for immune boosting molecules (UNC, Duke-NUS, NWHC)

**Subtask 9.1** Synthesize polymer acetalated dextran (Ac-DEX) microparticles (MPs) containing candidate broad-scale and targeted immune boosting molecules (UNC, Duke-NUS). **Subtask 9.2** Test MP metrics *in vitro* and in rodents (UNC). **Subtask 9.3** Test MP safety in bats in Wisconsin and in Singapore (NWHC, Duke-NUS).

**Milestone(s):** Initiation and completion of each subtask.

**Deliverables:** Ac-DEX MPs that contain broad-scale or targeted immune boosting molecules available for use. Data from MP efficacy and safety trials.

**PI-TA-02 Task 10:** Develop and assess delivery systems to deploy immune boosting molecules (NWHC, PARC)

**Subtask 10.1** Test transcutaneous delivery methods using the biomarker Rhodamine (RB) on captive US bats (NWHC). **Subtask 10.2** Conduct field trials of RB-marked delivery substances on



wild US bats (NWHC). **Subtask 10.3** Develop prototype filament extension atomization (FEA) device (PARC). **Subtask 10.4** Trial FEA device using RB on US captive bats (NWHC)

**Milestone(s):** Initiation and completion of each subtask.

**Deliverables:** Data from transcutaneous delivery experiments in captive and wild bats. Prototype of FEA device. Proof-of-concept of FEA device delivery system.

#### **PHASE II:**

**PII-TA-01 Task 1 (continued from PI-TA-01 Task 2):** Updated 'spatial viral spillover risk' app based on laboratory and field experiments (EHA).

**Subtask 1.1** Incorporate information on bat species risk from laboratory and field results (EHA).

**Subtask 1.2** Incorporate risk-ranking algorithms using geolocation features and host-pathogen characteristics (EHA). **Subtask 1.3** Link host species with viral diversity data from the project and previous data (EHA).

**Milestone(s):** Initiation and completion of each subtask.

**Deliverables:** Working prototype app that displays information by pathogen ranking, bat species ranking, and geographical ranking.

**PII-TA-01 Task 2 (continued from PI-TA-01 Task 5):** Build and test Bayesian network models to predict genotype-phenotype spillover potential of high-risk SARSr-CoV strains. (EHA).

**Subtask 2.1** Estimate intra- and inter-species mutation and recombination rates in SARSr-CoV population (EHA). **Subtask 2.2** Simulate forward evolution to predict future and unsampled QS (EHA). **Subtask 2.3** Make predictions of likely future high-risk QS spillover (EHA)

**Milestone(s):** Initiation and completion of each subtask.

**Deliverables:** Source code and model outputs from functional model. Prediction of future QS variants. Identification of high-risk SARSr-CoV QS by network machine-learning model.

**PII-TA-02 Task 3 (continued from PI-TA-02-10):** Develop and assess delivery systems to deploy immune boosting molecules (NWHC, PARC)

**Subtask 3.1** Design and optimize motion- and time- actuated facility for FEA prototype (PARC).

**Subtask 3.2** Conduct field trials of RB-marked delivery substances using FEA motion-actuated prototype on wild bats in Wisconsin (PARC, NWHC).

**Milestone(s):** FEA deployment prototype designed; field trials completed.

**Deliverables:** Optimized FEA prototype with motion- and time- actuated facility. Proof-of-concept FEA delivery of RB-marked substances in wild bats.

**PII-TA-02 Task 4:** Build and test dynamic circulation models to optimize deployment strategy

**Subtask 4.1** Develop robust stochastic SIR process model with immigration/emigration and flexible nonlinear contact rates among bats (EHA). **Subtask 4.2** Fit SIR model to sampling data from Yunnan test cave using partially observable markov process framework and validate via temporal cross-validation (EHA). **Subtask 4.3** Simulate viral circulation under series of plausible deployment scenarios to determine optimal scenario for deployment at test cave sites (EHA).

**Subtask 4.4** Test robustness of deployment strategies under broader conditions.

**Milestone(s):** Initiation and completion of each subtask.

**Deliverables:** Source code and outputs from dynamic circulation models; Optimized scenario for deployment.

**PII-TA-02 Task 5:** Demonstrate accuracy of risk/pre-emption models then deploy most effective molecule delivery methods to suppress viral shedding in multispecies bat colonies of Yunnan Province caves (EHA, PARC, NWHC, Duke-NUS, UNC)

**Subtask 5.1** Identify specific sites (entry, exit points), identify FEA automatic aerosolization points, fine-tune deployment plan. (EHA, WIV, NWHC, Duke-NUS, PARC, UNC). **Subtask 5.2** Conduct bat viral surveillance of one test-site cave and two control caves at our cave complex to assess baseline data for 4 months before deployment proof-of-concept experiment (EHA Consultant Zhu, WIV). **Subtask 5.3** Run deployment experiment of most effective immune boosting molecules and delivery techniques via FEA aerosolization mechanism at one test and two control bat cave sites in Yunnan, China (PARC, EHA, WIV) **Subtask 5.4** Conduct bat viral surveillance of one test-site cave and two control caves for 4 months after deployment. (EHA Consultant Zhu, WIV). **Subtask 5.5** Assess efficacy of proof-of-concept trial (EHA, UNC, DNUS). **Milestone(s):** Specific sites identified; Initiation and completion of trial under subtask 5.2-5.5. **Deliverables:** Baseline immunology and viral shedding data from study populations. Proof-of-concept of deploying biological intervention. Post-deployment metrics for immune modulation and viral shedding in study populations. Report on proof-of-concept efficacy.

## Section II H. SCHEDULE AND MILESTONES

See Table 2 Schedules and Milestones.

## Section II I. PREEMPT TRANSITION PLAN

Technology from this project will be transitioned to multiple potential users throughout both phases. Partners PARC and the USGS National Wildlife Health Center will initiate planning for transition of aerosol deployment equipment within 12 months of Phase 1 including government customers such as DoD and USGS (for bat-related disease control) and possible manufacturers. IP rights for these efforts will be negotiated with DARPA. Prior to the completion of Phase 1, panels of fully sequence new viruses, in-silico models for pandemic prediction, and animal models that could be used to evaluate therapeutics will be shared with DARPA and collaboratively agreed upon for early distribution to DoD users such as DoD medical community, other UGS agencies, and ultimately made publically available. We have no plans to patent or otherwise restrict IP on this information unless requested by DARPA or requested by a project partner and approved by DARPA. Proposed technology to be experimentally deployed and evaluated in Phase 2 will be shared with DARPA and collaboratively agreed upon for early distribution to DoD users such as DoD medical community, other UGS agencies. We have no plans to patent or otherwise restrict IP on this information unless requested by DARPA or requested by a project partner and approved by DARPA.

PARC as a private industry partner (large business) is a fully-owned subsidiary of Xerox Corporation and is committed to commercializing the FEA technology through IP licensing for different applications spaces to different commercial partners. PARC has been and will continue to engage potential licensees (OEMs) in the biotechnology and biomedical fields for eventual transitioning of targeted delivery technology potentially developed in DEFUSE. PARC already has existing networks of business relations in the biotechnology and biomedical space, both large companies (Fortune 500, Fortune 1000) and small businesses and start-ups who could be transition partners for FEA as a wide-scale, large-area drug delivery device. In addition, in

Table 2. Schedule & Milestones

Task #	Task Name/Milestones	Organization	Phase I Y1				Phase I Y2				Phase II OY1				OY2	
			Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2
<b>PI-Task 1</b>	<b>Longitudinal sampling and surveillance</b>	EHA														
1.1	IACUC and ACURO approval / Permits obtained	EHA														
1.2	Invasive and non-invasive monthly specimen collection / >3,000 specimens collected	EHA (Zhu)														
1.3	Bat connectivity and roost fidelity study / All bats PIT tagged	EHA (Zhu)														
1.4	Assess bat home ranges / Bat transmitters launched; data collected	EHA (Zhu)														
1.5	Real-time bat population monitoring / IR cameras installed; data collected	EHA (Zhu)														
1.6	Develop and maintain project database / Database built & secure; field data entered	EHA														
<b>PI-Task 2</b>	<b>Construct spillover risk models</b>	EHA														
2.1	Joint species distribution models / Models fit for Asian bat spp.; cave-level predictions	EHA														
2.2	Host and ecological machine learning models / Models developed; per-species spillover risk	EHA														
2.3	Viral richness estimator model / Models developed and refined w longitudinal surveillance data	EHA														
2.4	Prototype of 'spatial viral spillover risk' app / Prototype app developed and beta-tested	EHA														
<b>PI-Task 3</b>	<b>Laboratory analysis of SARS-CoV QS</b>	WIV														
3.1	PCR screening of bat specimens / Prevalence estimates; initial CoV seq data generated	WIV														
3.2	Sequence SARS-CoV spike proteins / Genetic sequences generated and made available	WIV														
3.3	Develop recombinant SARS-CoV viruses / Novel recombinants developed and recovered	DNUS														
3.4	Assess SARS-CoV via deep sequencing / Full genome data generated and made available	UNC														
<b>PI-Task 4</b>	<b>Experimental assays of SARS-CoV QS</b>	UNC														
4.1	Pre-screen SARS-CoV via viral traits / List of pre-screened QS using protein models and mutations	UNC														
4.2	SARS-CoV chimeric virus testing in cell lines / In vitro cell line experiments completed; data available	UNC														
4.3	In vivo pathogenesis in hACE2 transgenic mice / Mouse experiments completed; data available	UNC														
4.4	Validate chimeric viruses by with full-genome QS / Full genomes sequenced and made available	UNC														
4.5	Test synthetic modifications of spike proteins / Experimental tests completed; data available	UNC														
4.6	Test effects of low-abundance, high consequence micro-variations on jump potential / Variants quantified	UNC														
<b>PI-Task 5</b>	<b>Build and test Bayesian genotype-phenotype network models</b>	EHA														
5.1	Use prior data to guide GS selection for characterization / Prelim model developed; source code available	EHA														
5.2	Update model predictions using real-time data / Model refined and validated w experimental data	EHA														
<b>PI-Task 6</b>	<b>Validate model predictions using human spillover evidence</b>	WIV														
6.1	Design LIPS assays to SARS-CoV we have characterized / Novel LIPS assays developed	WIV														
6.2	Determine LIPS assays specificity / Specificity tested in rabbit model and data made available	WIV														
6.3	Validate LIPS assays using positive laboratory samples / Assays validated and data made available	WIV														
6.4	Test previously-collected human sera for SARS-CoV spillover / Previous-collected human sera screened	WIV														
6.5	Validate BNM predictions using bat-human contact data / Bayesian network model externally validated	EHA														
<b>PI-Task 7</b>	<b>Testing of broadscale immune boosting approach</b>	DNUS														
7.1	Block bat-specific IFN negative regulators / Experiments completed; data made available	DNUS														
7.2	Activate dampened bat-specific innate immune pathways / Experiments and immune profiling completed	DNUS														
7.3	Test broadscale immune boosting in bat-mouse model / Experiments completed; data made available	DNUS														
7.4	Test broadscale immune boosting in Eonycterus sp. / Experiments completed; data made available	DNUS														
7.5	Test broadscale immune boosting in Rhinolophus sp. / Experiments completed; data made available	WIV														
<b>PI-Task 8</b>	<b>Testing of targeted immune boosting approach</b>	UNC														



collaboration with our extended network of DEFUSE partners and with DARPA, we will further identify existing government needs for our delivery technology, particularly in wildlife health management (in collaboration with EHA and USGS-NWHC) and in suppression of emerging threats (in collaboration with government agencies such as the CDC). PARC will leverage this knowledge in developing a needs-based commercialization plan with potential partners.

Project DEFUSE partners come from academic, government, private industry, private non-profit institutions and will develop a coherent transition plan for research findings, data and any technology developed in this work.

## Section II J. PREEMPT RISK MITIGATION PLAN

### **Risks: Personnel safety, biosafety, mitigation of risks to public health and animal safety**

**Animal Use & safety:** All work with wild bats will be conducted in China by EcoHealth Alliance staff and Wuhan Institute of Virology. Capture and sampling techniques have been previously approved by Tufts University School of Veterinary Medicine IACUC under our NIH NIAID award (Daszak, PI). Experimental work using bats and or transgenic mice will be conducted at the BSL-3 lab in WIV, Duke-NUS, UNC, or NWHC. Each partner institute will apply for and procure animal research approval from its respective IACUC. All animal work conducted by EcoHealth Alliance in China will be overseen by both the IACUC at WIV and the IACUC at Tufts. Each partner institute will be responsible for ensuring the training and safety of its laboratory personnel, which will be documented by EcoHealth Alliance, and each partner has extensive experience and a record of safety with the techniques and procedures for lab animal experiments described in this protocol. **Field safety:** Free-ranging bats will be captured using either a mist net or harp trap. The net system is manned by two people during the entire capture period, and bats are removed from the net as soon as they become entangled to minimize stress and prevent injury. In our experience, a maximum of 20-30 bats can be safely held and processed by a team of three people per trapping period. Duration of trapping will depend on the capture rate. Bats are placed into a small cloth bag and hung from a branch or post until samples are collected. Bats are held for a maximum of six hours. Field personnel will be required to conduct a hazard assessment prior to each field sampling period and at each location. **Biosafety and Personal Protective Equipment:** Dedicated clothing will be worn in the field which provides protection against injury from bites or scratches as well as nitrile gloves (double layer), an N95 respirator, and safety glasses or a face shield when removing bats from a net or trap, and when sampling bats. External clothing and all equipment will be decontaminated at the field site using virkon, and biohazardous waste will be contained in biohazard bags and sharps containers and incinerated at WIV or Yunnan CDC facilities. Personnel will wear water-impermeable Tyvek suits, rubber boots, and powered air purifying respirators (PAPRs) when entering a cave for sample collection or image collection (e.g. LiDAR) and will doff and dispose of PPE and disinfect PAPRs on exiting the cave. **All field personnel will be immunized against rabies and demonstrate a current (within 6 months) protective titer according to CDC guidelines<sup>132</sup>.** Personnel without PPE training and complete rabies immunization will not be permitted to work with bats or enter the study caves. Use of LiDAR to map study caves will be conducted by trained personnel with caving experience.

**Risks to general public:** The proposed work has minimal risk to the general public, as sampling will be done near the cave sites and not in populous areas. Our team has extensive experience

**Section II K. ETHICAL, LEGAL, SOCIETAL IMPLICATIONS**

All activities in this project will be done with strict adherence to US and Chinese law, with permission from the Chinese government and local authorities to conduct field work. We will conduct educational outreach to local wildlife authorities and cultural leaders so that there is a public understanding of what we are doing and why we are doing it, particularly because of the common practice of bat consumption in the region (see also **Risk Mitigation Strategy**). These agents have not been tested on humans, but they have been shown to be safe in a variety of lab animal models. There is minimal risk associated with human exposure to the fluid containing MPs. We will explain the risk mitigation strategies and safety data that were considered when developing this study, and how this could be of benefit to local communities. There is also a potential benefit to local communities if the agents are effective in reducing viral shedding. The broader societal impact of this project could be significant, as wildlife immunization against viral zoonoses has been limited to date. However, this may open up a field where animal reservoirs for known high-risk agents could be “immunized” at high risk times of year which could reduce the number or magnitude of human outbreaks. This would add a valuable countermeasure to ecological studies that have elucidated the timing of viral spillover from animal reservoirs to human or livestock populations. We will develop a plan to ensure that the details of technologies developed and tested for deploying biological immune modulating agents are made available publicly so that they can be adapted to other types of medical interventions and pathogens. There may be conservation benefits, where wildlife reservoirs are considered less threatening to public health and therefore there may be less impetus to exterminate or extirpate local populations as a public health measure – particularly if an option to reduce the risk of spillover through a wildlife vaccination effort is available.

## Section III

## BIBLIOGRAPHY

- 1 Anthony, S. J. *et al.* Global patterns in coronavirus diversity. *Virus Evolution* **3**, doi:10.1093/ve/vex012 (2017).
- 2 Ge, X. Y. *et al.* Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature* **503**, 535-538, doi:10.1038/nature12711 (2013).
- 3 Li, W. D. *et al.* Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* **310**, 676-679, doi:10.1126/science.1118391 (2005).
- 4 Quan, P.-L. *et al.* Identification of a severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in a leaf-nosed bat in Nigeria. *MBio* **1**, e00208-00210 (2010).
- 5 Ar Gouilh, M. *et al.* SARS-CoV related Betacoronavirus and diverse Alphacoronavirus members found in western old-world. *Virology* **517**, 88-97, doi:<https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.01.014> (2018).
- 6 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**, 11336-11349, doi:10.1128/JVI.00650-10 (2010).
- 7 Olival, K. J. *et al.* Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature* **546**, 646-650 (2017).
- 8 Sheahan, T. P. *et al.* Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses. *Science translational medicine* **9**, eaal3653 (2017).
- 9 Anthony, S. *et al.* Further evidence for bats as the evolutionary source of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *MBio* **8**, e00373-00317 (2017).
- 10 Cockrell, A. S. *et al.* A mouse model for MERS coronavirus-induced acute respiratory distress syndrome. *Nature microbiology* **2**, 16226 (2017).
- 11 Menachery, V. D. *et al.* SARS-like WIV1-CoV poised for human emergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, 3048-3053, doi:10.1073/pnas.1517719113 (2016).
- 12 Menachery, V. D. *et al.* A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nature Medicine* **21**, 1508-1513, doi:10.1038/nm.3985 (2015).
- 13 Wang, N. *et al.* Serological Evidence of Bat SARS-Related Coronavirus Infection in Humans, China. *Virologica Sinica*, doi:10.1007/s12250-018-0012-7 (2018).
- 14 Zhou, P. *et al.* Fatal swine acute diarrhea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature In press* (2018).
- 15 Zhang, G. *et al.* Comparative analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity. *Science* **339**, 456-460, doi:10.1126/science.1230835 (2013).
- 16 Xie, J. *et al.* Dampened STING-Dependent Interferon Activation in Bats. *Cell host & microbe* (2018).
- 17 Zhou, P. *et al.* Contraction of the type I IFN locus and unusual constitutive expression of IFN- $\alpha$  in bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 2696-2701 (2016).

- 18 Kugel, D. *et al.* Intranasal Administration of Alpha Interferon Reduces Seasonal Influenza A Virus Morbidity in Ferrets. *Journal of Virology* **83**, 3843-3851, doi:10.1128/jvi.02453-08 (2009).
- 19 Zhao, J. *et al.* Intranasal treatment with poly (I·C) protects aged mice from lethal respiratory virus infections. *Journal of virology* **86**, 11416-11424 (2012).
- 20 Smith, L. M. *et al.* Interferon- $\beta$  therapy prolongs survival in rhesus macaque models of Ebola and Marburg hemorrhagic fever. *The Journal of infectious diseases* **208**, 310-318 (2013).
- 21 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. *Journal of Virology* **90**, 6573-6582, doi:10.1128/jvi.03079-15 (2016).
- 22 Deng, X. *et al.* A chimeric virus-mouse model system for evaluating the function and inhibition of papain-like proteases of emerging coronaviruses. *Journal of virology* **88**, 11825-11833 (2014).
- 23 Pallesen, J. *et al.* Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, E7348-E7357 (2017).
- 24 Coleman, C. M. *et al.* Purified coronavirus spike protein nanoparticles induce coronavirus neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* **32**, 3169-3174 (2014).
- 25 Coleman, C. M. *et al.* MERS-CoV spike nanoparticles protect mice from MERS-CoV infection. *Vaccine* **35**, 1586-1589, doi:10.1016/j.vaccine.2017.02.012 (2017).
- 26 Du, L. *et al.* A 219-mer CHO-expressing receptor-binding domain of SARS-CoV S protein induces potent immune responses and protective immunity. *Viral immunology* **23**, 211-219 (2010).
- 27 Sheahan, T. *et al.* Successful vaccination strategies that protect aged mice from lethal challenge from influenza virus and heterologous severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of virology* **85**, 217-230 (2011).
- 28 Agnihothram, S. *et al.* A mouse model for Betacoronavirus subgroup 2c using a bat coronavirus strain HKU5 variant. *MBio* **5**, e00047-00014 (2014).
- 29 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**, 19944-19949 (2008).
- 30 Rocke, T. E. *et al.* Sylvatic plague vaccine partially protects prairie dogs (*Cynomys* spp.) in field trials. *Ecohealth* **14**, 438-450 (2017).
- 31 Stading, B. *et al.* Protection of bats (*Eptesicus fuscus*) against rabies following topical or oronasal exposure to a recombinant raccoon poxvirus vaccine. *Plos Neglect. Trop. Dis.* **11**, doi:10.1371/journal.pntd.0005958 (2017).
- 32 Stading, B. R. *et al.* Infectivity of attenuated poxvirus vaccine vectors and immunogenicity of a raccoonpox vectored rabies vaccine in the Brazilian Free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*). *Vaccine* **34**, 5352-5358, doi:10.1016/j.vaccine.2016.08.088 (2016).
- 33 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. *Journal of Virology* **90**, 3253-3256, doi:10.1128/jvi.02582-15 (2016).



- 34 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 pathogens* **13**, e1006698, doi:10.1371/journal.ppat.1006698 (2017).
- 35 Yuan, J. *et al.* Intraspecies diversity of SARS-like coronaviruses in *Rhinolophus sinicus* and its implications for the origin of SARS coronaviruses in humans. *Journal of general virology* **91**, 1058-1062 (2010).
- 36 Li, W. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* **426**, 450 (2003).
- 37 Memish, Z. A. *et al.* Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Bats, Saudi Arabia. *Emerging Infectious Diseases* **19**, 1819-1823, doi:10.3201/eid1911.131172 (2013).
- 38 Walker, F. M., Williamson, C. H., Sanchez, D. E., Sobek, C. J. & Chambers, C. L. Species from feces: order-wide identification of Chiroptera from guano and other non-invasive genetic samples. *PloS one* **11**, e0162342 (2016).
- 39 Hayman, D. T. S., Cryan, P. M., Fricker, P. D., Dannemiller, N. G. & Freckleton, R. Long-term video surveillance and automated analyses reveal arousal patterns in groups of hibernating bats. *Methods in Ecology and Evolution* **8**, 1813-1821, doi:doi:10.1111/2041-210X.12823 (2017).
- 40 Azmy, S. N. *et al.* Counting in the dark: Non-intrusive laser scanning for population counting and identifying roosting bats. *Scientific reports* **2**, 524 (2012).
- 41 Shazali, N. *et al.* Assessing Bat Roosts Using the LiDAR System at Wind Cave Nature Reserve in Sarawak, Malaysian Borneo. *Acta Chiropterologica* **19**, 199-210 (2017).
- 42 McFarlane, D. A. *et al.* Terrestrial LiDAR-based automated counting of swiftlet nests in the caves of Gomantong, Sabah, Borneo. *International Journal of Speleology* **44**, 191 (2015).
- 43 Harris, D. J. Generating realistic assemblages with a joint species distribution model. *Methods in Ecology and Evolution* **6**, 465-473 (2015).
- 44 Luo, J. *et al.* Bat conservation in China: should protection of subterranean habitats be a priority? *Oryx* **47**, 526-531 (2013).
- 45 Karger, D. N. *et al.* Climatologies at high resolution for the earth's land surface areas. *Scientific data* **4**, 170122 (2017).
- 46 Phelps, K., Jose, R., Labonite, M. & Kingston, T. Correlates of cave-roosting bat diversity as an effective tool to identify priority caves. *Biological Conservation* **201**, 201-209 (2016).
- 47 IUCN. Vol. 2017-1 (2017).
- 48 GBIF.org. GBIF Occurrence Download.
- 49 Allen, T. *et al.* Global hotspots and correlates of emerging zoonotic diseases. *Nature Communications* **8**, 1124 (2017).
- 50 Anthony, S. J. *et al.* A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. *mBio* **4**, e00598-00513 (2013).
- 51 Wildlife Acoustics. *Wildlife Acoustics Bioacoustic Monitoring System*, <[https://www.wildlifeacoustics.com/products/echo-meter-touch-2?gclid=EAlaIQobChMI3qnOmK\\_o2QIVDlcNCh1KRwZuEAAYASAAEgJvVPD\\_BwE](https://www.wildlifeacoustics.com/products/echo-meter-touch-2?gclid=EAlaIQobChMI3qnOmK_o2QIVDlcNCh1KRwZuEAAYASAAEgJvVPD_BwE)> (2018).
- 52 Mac Aodha, O. *et al.* Bat Detective-Deep Learning Tools for Bat Acoustic Signal Detection. *bioRxiv*, 156869 (2017).

- 53 Anthony, S. J. *et al.* Coronaviruses in bats from Mexico. *Journal of General Virology* **94**, 1028-1038 (2013).
- 54 Huynh, J. *et al.* Evidence Supporting a Zoonotic Origin of Human Coronavirus Strain NL63. *Journal of Virology* **86**, 12816-12825, doi:10.1128/jvi.00906-12 (2012).
- 55 Donaldson, E. F. *et al.* Systematic Assembly of a Full-Length Infectious Clone of Human Coronavirus NL63. *Journal of Virology* **82**, 11948-11957, doi:10.1128/jvi.01804-08 (2008).
- 56 Scobey, T. *et al.* Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 16157-16162, doi:10.1073/pnas.1311542110 (2013).
- 57 Yount, B. *et al.* Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 12995-13000, doi:10.1073/pnas.1735582100 (2003).
- 58 Sheahan, T. *et al.* Mechanisms of zoonotic severe acute respiratory syndrome coronavirus host range expansion in human airway epithelium. *Journal of Virology* **82**, 2274-2285, doi:10.1128/jvi.02041-07 (2008).
- 59 Kirchdoerfer, R. N. *et al.* Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature* **531**, 118-121, doi:10.1038/nature17200 (2016).
- 60 Gui, M. *et al.* Cryo-electron microscopy structures of the SARS-CoV spike glycoprotein reveal a prerequisite conformational state for receptor binding. *Cell Res.* **27**, 119-129, doi:10.1038/cr.2016.152 (2017).
- 61 Li, F. Structural analysis of major species barriers between humans and palm civets for severe acute respiratory syndrome coronavirus infections. *Journal of Virology* **82**, 6984-6991, doi:10.1128/jvi.00442-08 (2008).
- 62 Li, F., Li, W. H., Farzan, M. & Harrison, S. C. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science* **309**, 1864-1868, doi:10.1126/science.1116480 (2005).
- 63 Huang, I. C. *et al.* SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect ACE2-expressing cells. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 3198-3203, doi:10.1074/jbc.M508381200 (2006).
- 64 Yang, Y. *et al.* Receptor usage and cell entry of bat coronavirus HKU4 provide insight into bat-to-human transmission of MERS coronavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 12516-12521, doi:10.1073/pnas.1405889111 (2014).
- 65 Earnest, J. T. *et al.* The tetraspanin CD9 facilitates MERS-coronavirus entry by scaffolding host cell receptors and proteases. *PLoS pathogens* **13**, doi:10.1371/journal.ppat.1006546 (2017).
- 66 Rockx, B. *et al.* Escape from Human Monoclonal Antibody Neutralization Affects In Vitro and In Vivo Fitness of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Journal of Infectious Diseases* **201**, 946-955, doi:10.1086/651022 (2010).
- 67 Zeng, L. P. *et al.* Cross-neutralization of SARS coronavirus-specific antibodies against bat SARS-like coronaviruses. *Science China-Life Sciences* **60**, 1399-1402, doi:10.1007/s11427-017-9189-3 (2017).

- 68 Bertram, S. *et al.* Cleavage and Activation of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein by Human Airway Trypsin-Like Protease. *Journal of Virology* **85**, 13363-13372, doi:10.1128/JVI.05300-11 (2011).
- 69 Simmons, G., Zmora, P., Gierer, S., Heurich, A. & Pöhlmann, S. Proteolytic activation of the SARS-coronavirus spike protein: Cutting enzymes at the cutting edge of antiviral research. *Antiviral research* **100**, 605-614, doi:10.1016/j.antiviral.2013.09.028 (2013).
- 70 Reinke, L. M. *et al.* Different residues in the SARS-CoV spike protein determine cleavage and activation by the host cell protease TMPRSS2. *PLoS ONE* **12**, e0179177, doi:10.1371/journal.pone.0179177 (2017).
- 71 Lu, G. W., Wang, Q. H. & Gao, G. F. Bat-to-human: spike features determining 'host jump' of coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and beyond. *Trends in Microbiology* **23**, 468-478, doi:10.1016/j.tim.2015.06.003 (2015).
- 72 Walls, A. C. *et al.* Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, 11157-11162, doi:10.1073/pnas.1708727114 (2017).
- 73 Li, F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual review of virology* **3**, 237-261, doi:10.1146/annurev-virology-110615-042301 (2016).
- 74 Duckert, P., Brunak, S. & Blom, N. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Engineering Design & Selection* **17**, 107-112, doi:10.1093/protein/gzh013 (2004).
- 75 Tian, S., Huajun, W. & Wu, J. Computational prediction of furin cleavage sites by a hybrid method and understanding mechanism underlying diseases. *Scientific Reports* **2**, 261, doi:10.1038/srep00261 (2012).
- 76 Shih, Y.-P. *et al.* Identifying Epitopes Responsible for Neutralizing Antibody and DC-SIGN Binding on the Spike Glycoprotein of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Journal of Virology* **80**, 10315-10324, doi:10.1128/JVI.01138-06 (2006).
- 77 Han, D. P., Lohani, M. & Cho, M. W. Specific Asparagine-Linked Glycosylation Sites Are Critical for DC-SIGN- and L-SIGN-Mediated Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Entry. *Journal of Virology* **81**, 12029-12039, doi:10.1128/JVI.00315-07 (2007).
- 78 Nagarajan, R., Scutari, M. & Lèbre, S. *Bayesian Networks in R*. (Springer, 2013).
- 79 Landuyt, D. *et al.* A review of Bayesian belief networks in ecosystem service modelling. *Environmental Modelling & Software* **46**, 1-11, doi:<https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2013.03.011> (2013).
- 80 Li, W. *et al.* Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* **310**, 676-679, doi:10.1126/science.1118391 (2005).
- 81 Li, Y. *et al.* Antibodies to Nipah or Nipah-like viruses in bats, China. *Emerg Infect Dis* **14**, 1974-1976, doi:10.3201/eid1412.080359 (2008).
- 82 Drummond, A. J. & Rambaut, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 214 (2007).

- 83 McVean, G., Awadalla, P. & Fearnhead, P. A coalescent-based method for detecting and estimating recombination from gene sequences. *Genetics* **160**, 1231-1241 (2002).
- 84 Wilson, D. J. & McVean, G. Estimating diversifying selection and functional constraint in the presence of recombination. *Genetics* **172**, 1411-1425 (2006).
- 85 Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A. & Muhire, B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus evolution* **1** (2015).
- 86 Petitjean, M. & Vanet, A. VIRAPOPS: a forward simulator dedicated to rapidly evolved viral populations. *Bioinformatics* **30**, 578-580 (2013).
- 87 Ahn, M., Cui, J., Irving, A. T. & Wang, L.-F. Unique Loss of the PYHIN Gene Family in Bats Amongst Mammals: Implications for Inflammasome Sensing. *Scientific Reports* **6**, doi:10.1038/srep21722 (2016).
- 88 Ahn, M., Irving, A. T. & Wang, L. F. Unusual regulation of inflammasome signaling in bats. *Cytokine* **87**, 156-156 (2016).
- 89 Paweska, J. T. *et al.* Lack of Marburg virus transmission from experimentally infected to susceptible in-contact Egyptian fruit bats. *The Journal of infectious diseases* **212**, S109-S118 (2015).
- 90 Paweska, J. T. *et al.* Virological and serological findings in Rousettus aegyptiacus experimentally inoculated with vero cells-adapted hogan strain of Marburg virus. *PloS one* **7**, e45479 (2012).
- 91 Schuh, A. J. *et al.* Modelling filovirus maintenance in nature by experimental transmission of Marburg virus between Egyptian rousette bats. *Nature communications* **8**, 14446 (2017).
- 92 Cogswell-Hawkinson, A. *et al.* Tacaribe virus causes fatal infection of an ostensible reservoir host, the Jamaican fruit bat. *J Virol* **86**, 5791-5799, doi:10.1128/JVI.00201-12 (2012).
- 93 Zhou, P. *et al.* Unlocking bat immunology: establishment of Pteropus alecto bone marrow-derived dendritic cells and macrophages. *Scientific Reports* **6**, 38597, doi:10.1038/srep38597  
<https://www.nature.com/articles/srep38597#supplementary-information> (2016).
- 94 Farr, B., Gwaltney, J., Adams, K. & Hayden, F. Intranasal interferon-alpha 2 for prevention of natural rhinovirus colds. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **26**, 31-34 (2009).
- 95 Zhang, Q. *et al.* IFNAR2-dependent gene expression profile induced by IFN- $\alpha$  in Pteropus alecto bat cells and impact of IFNAR2 knockout on virus infection. *PLoS ONE* **12**, e0182866, doi:10.1371/journal.pone.0182866 (2017).
- 96 Fuchs, J. *et al.* Evolution and Antiviral Specificities of Interferon-Induced Mx Proteins of Bats against Ebola, Influenza, and Other RNA Viruses. *Journal of Virology* **91**, e00361-00317, doi:10.1128/JVI.00361-17 (2017).
- 97 Kuzmin, I. V. *et al.* Innate Immune Responses of Bat and Human Cells to Filoviruses: Commonalities and Distinctions. *Journal of Virology* **91**, e02471-02416, doi:10.1128/JVI.02471-16 (2017).
- 98 Liang, Y.-Z. *et al.* Cloning, expression, and antiviral activity of interferon  $\beta$  from the Chinese microbat, Myotis davidii. *Virologica Sinica* **30**, 425-432, doi:10.1007/s12250-015-3668-2 (2015).

- 99 Fu, K. & Baric, R. S. Map locations of mouse hepatitis virus temperature-sensitive mutants: confirmation of variable rates of recombination. *Journal of Virology* **68**, 7458-7466 (1994).
- 100 Rockx, B. *et al.* Structural Basis for Potent Cross-Neutralizing Human Monoclonal Antibody Protection against Lethal Human and Zoonotic Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Challenge. *Journal of Virology* **82**, 3220-3235, doi:10.1128/JVI.02377-07 (2008).
- 101 Coughlin, M. M. & Prabhakar, B. S. Neutralizing Human Monoclonal Antibodies to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus: Target, Mechanism of Action and Therapeutic Potential. *Reviews in Medical Virology* **22**, 2-17, doi:10.1002/rmv.706 (2012).
- 102 Bachelder, E. M., Beaudette, T. T., Broaders, K. E., Dashe, J. & Fréchet, J. M. Acetal-derivatized dextran: an acid-responsive biodegradable material for therapeutic applications. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 10494-10495 (2008).
- 103 Broaders, K. E., Cohen, J. A., Beaudette, T. T., Bachelder, E. M. & Fréchet, J. M. Acetalated dextran is a chemically and biologically tunable material for particulate immunotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 5497-5502 (2009).
- 104 Kauffman, K. J. *et al.* Synthesis and characterization of acetalated dextran polymer and microparticles with ethanol as a degradation product. *ACS applied materials & interfaces* **4**, 4149-4155 (2012).
- 105 Chen, N. *et al.* Degradation of acetalated dextran can be broadly tuned based on cyclic acetal coverage and molecular weight. *International journal of pharmaceutics* **512**, 147-157 (2016).
- 106 Jiang, W., Gupta, R. K., Deshpande, M. C. & Schwendeman, S. P. Biodegradable poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Advanced drug delivery reviews* **57**, 391-410 (2005).
- 107 Kanthamneni, N. *et al.* Enhanced stability of horseradish peroxidase encapsulated in acetalated dextran microparticles stored outside cold chain conditions. *International journal of pharmaceutics* **431**, 101-110 (2012).
- 108 Hoang, K. V. *et al.* Acetalated Dextran Encapsulated AR-12 as a Host-directed Therapy to Control Salmonella Infection. *International journal of pharmaceutics* **477**, 334-343, doi:10.1016/j.ijpharm.2014.10.022 (2014).
- 109 Junkins, R. D. *et al.* A robust microparticle platform for a STING-targeted adjuvant that enhances both humoral and cellular immunity during vaccination. *Journal of Controlled Release* **270**, 1-13 (2018).
- 110 Belser, J. A., Katz, J. M. & Tumpey, T. M. The ferret as a model organism to study influenza A virus infection. *Disease models & mechanisms* **4**, 575-579 (2011).
- 111 Davies, Bryan W., Bogard, Ryan W., Young, Travis S. & Mekalanos, John J. Coordinated Regulation of Accessory Genetic Elements Produces Cyclic Di-Nucleotides for *V. cholerae* Virulence. *Cell* **149**, 358-370, doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.053> (2012).
- 112 Chua, K. B. *et al.* A previously unknown reovirus of bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11424-11429, doi:10.1073/pnas.0701372104 (2007).

- 113 Chua, K. B. *et al.* Investigation of a Potential Zoonotic Transmission of Orthoreovirus Associated with Acute Influenza-Like Illness in an Adult Patient. *Plos One* **6**, doi:10.1371/journal.pone.0025434 (2011).
- 114 Tripp, D. W. *et al.* Apparent field safety of a raccoon poxvirus-vectored plague vaccine in free-ranging prairie dogs (*Cynomys* spp.), Colorado, USA. *Journal of wildlife diseases* **51**, 401-410 (2015).
- 115 Slate, D. *et al.* Oral rabies vaccination in North America: opportunities, complexities, and challenges. *Plos Neglect. Trop. Dis.* **3**, e549 (2009).
- 116 Freuling, C. M. *et al.* The elimination of fox rabies from Europe: determinants of success and lessons for the future. *Phil. Trans. R. Soc. B* **368**, 20120142 (2013).
- 117 Tripp, D. W. *et al.* Season and application rates affect vaccine bait consumption by prairie dogs in Colorado and Utah, USA. *Journal of wildlife diseases* **50**, 224-234 (2014).
- 118 Roberts, M. *et al.* Topical and cutaneous delivery using nanosystems. *Journal of Controlled Release* **247**, 86-105 (2017).
- 119 Mishra, D. K., Dhote, V. & Mishra, P. K. Transdermal immunization: biological framework and translational perspectives. *Expert opinion on drug delivery* **10**, 183-200 (2013).
- 120 Ebrahimian, M. *et al.* Co-delivery of Dual Toll-Like Receptor Agonists and Antigen in Poly (Lactic-Co-Glycolic) Acid/Polyethylenimine Cationic Hybrid Nanoparticles Promote Efficient In Vivo Immune Responses. *Frontiers in immunology* **8**, 1077 (2017).
- 121 Karande, P. & Mitragotri, S. Transcutaneous immunization: an overview of advantages, disease targets, vaccines, and delivery technologies. *Annual review of chemical and biomolecular engineering* **1**, 175-201 (2010).
- 122 Unidad, J., Karatay, E., Neelakantan, R., Jose, A. & Johnson, D. M. in *33rd International Conference of the Polymer Processing Society*.
- 123 Oliveira, M. S. N. & McKinley, G. H. Iterated stretching and multiple beads-on-a-string phenomena in dilute solutions of highly extensible flexible polymers. *Physics of Fluids* **17**, 071704, doi:10.1063/1.1949197 (2005).
- 124 Epstein, J. H. *et al.* Nipah virus ecology and infection dynamics in its bat reservoir, *Pteropus medius*, in Bangladesh. *International Journal of Infectious Diseases* **53**, 20-21, doi:10.1016/j.ijid.2016.11.056.
- 125 Borremans, B. *et al.* (Dryad Data Repository, 2016).
- 126 Ionides, E. L., Nguyen, D., Atchadé, Y., Stoev, S. & King, A. A. Inference for dynamic and latent variable models via iterated, perturbed Bayes maps. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 719-724 (2015).
- 127 Jones, K. E. *et al.* Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* **451**, 990-993, doi:10.1038/nature06536 (2008).
- 128 Alagaili, A. N. *et al.* Middle East respiratory syndrome coronavirus infection in dromedary camels in Saudi Arabia. *MBio* **5**, doi:10.1128/mBio.00884-14 (2014).
- 129 Homaira, N. *et al.* Nipah virus outbreak with person-to-person transmission in a district of Bangladesh, 2007. *Epidemiology and Infection* **138**, 1630-1636, doi:10.1017/s0950268810000695 (2010).

- 130 Islam, M. S. *et al.* Nipah Virus Transmission from Bats to Humans Associated with Drinking Traditional Liquor Made from Date Palm Sap, Bangladesh, 2011–2014. *Emerging Infectious Disease journal* **22**, 664, doi:10.3201/eid2204.151747 (2016).
- 131 Olival, K. J. *et al.* Ebola Virus Antibodies in Fruit Bats, Bangladesh. *Emerging Infectious Diseases* **19**, 270-273, doi:10.3201/eid1902.120524 (2013).
- 132 Manning, S. E. *et al.* Human rabies prevention-United states, 2008. *MMWR Recomm Rep* **57**, 1-28 (2008).
- 133 (National Institutes of Health, 2014).

### Section III RELEVANT PAPERS

We are attaching three relevant papers:

- Ge *et al.* (2017). Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 Receptor. *Nature*.
- Menachery *et al.* (2016). SARS-like WIV-CoV poised for human emergence. *PNAS*.
- Zhou *et al.* (*In Press*). Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature*.

**Pièce originale 3**



**Broad Agency Announcement  
PREventing EMerging Pathogenic Threats (PREEMPT)  
BIOLOGICAL TECHNOLOGIES OFFICE**

**HR001118S0017**

**January 19, 2018**



TABLE OF CONTENTS

**PART I: OVERVIEW INFORMATION .....3**

**PART II: FULL TEXT OF ANNOUNCEMENT .....4**

- 1. Funding Opportunity Description.....4**
  - 1.1. Program Overview .....4**
  - 1.2. Program Metrics.....12**
  - 1.3. Ethical, Legal, and Societal Implications (ELSI) .....15**
  - 1.4. Protection of Sensitive Information .....15**
- 2. Award Information.....16**
  - 2.1. General award information .....16**
  - 2.2. Fundamental Research .....17**
- 3. Eligibility Information.....18**
  - 3.1. Eligible Applicants .....18**
  - 3.2. Organizational Conflicts of Interest .....19**
  - 3.3. Cost Sharing/Matching .....20**
- 4. Application and Submission Information .....20**
  - 4.1. Address to Request Application Package.....20**
  - 4.2. Content and Form of Application Submission .....20**
  - 4.3. Funding Restrictions .....31**
  - 4.4. Other Submission Requirements .....31**
- 5. Application Review Information .....31**
  - 5.1. Evaluation Criteria.....31**
  - 5.2. Review of Proposals.....32**
- 6. Award Administration Information .....33**
  - 6.1. Selection Notices .....33**
  - 6.2. Administrative and Policy Requirements .....34**
  - 6.3. Reporting.....35**
  - 6.4. Electronic Systems.....35**
- 7. Agency Contacts.....35**
- 8. Other Information .....35**
- 9. Appendix 1 – Volume II checklist .....37**

## PART I: OVERVIEW INFORMATION

- **Federal Agency Name** – Defense Advanced Research Projects Agency (DARPA), Biological Technologies Office
- **Funding Opportunity Title** – PREventing EMerging Pathogenic Threats
- **Announcement Type** – Initial
- **Funding Opportunity Number** – HR001118S0017
- **Catalog of Federal Domestic Assistance Numbers (CFDA)** – **12.910 Research and Technology Development**
- **Dates**
  - Posting Date – January 19, 2018
  - Proposal Abstract Due Date and Time – February 13, 2018 4:00 ET
  - Proposal Due Date and Time – March 27, 2018 4:00 ET
  - BAA Closing Date – March 27, 2018
  - Proposers' Day – January 30, 2018

<https://www.fbo.gov/spg/ODA/DARPA/CMO/DARPA-SN-18-18/listing.html>
- **Concise description of the funding opportunity** – **DARPA is soliciting innovative proposals to develop novel and scalable approaches to preempt viral spillover and transmission from animals or vectors into humans.**
- **Anticipated individual awards** - **Multiple awards are anticipated.**
- **Types of instruments that may be awarded** - **Procurement contract, cooperative agreement or other transaction.**
- **Any cost sharing requirements** - Cost sharing may be required under applicable statutory regulations for other transactions for prototype projects awarded under the authority of 10 U.S.C. § 2371b.
- **Agency contact**
  - Points of Contact  
James Gimlett, Ph.D. Program Manager  
Biological Technologies Office

The BAA Coordinator for this effort may be reached at:

[PREEMPT@darpa.mil](mailto:PREEMPT@darpa.mil)

DARPA/BTO

ATTN: HR001118S0017

675 North Randolph Street

## PART II: FULL TEXT OF ANNOUNCEMENT

### 1. Funding Opportunity Description

This publication constitutes a Broad Agency Announcement (BAA) as contemplated in Federal Acquisition Regulation (FAR) 6.102(d)(2) and 35.016 and 2 CFR § 200.203. Any resultant award negotiations will follow all pertinent law and regulation, and any negotiations and/or awards for procurement contracts will use procedures under FAR 15.4, Contract Pricing, as specified in the BAA.

DARPA is soliciting innovative proposals for research to develop new tools and models to quantify the likelihood of a virus to jump from an animal host into humans, and to develop and validate new scalable technologies to target potential human-capable viral pathogens in wild reservoirs and/or mosquito vectors to prevent transmission to humans.

#### 1.1. PROGRAM OVERVIEW

##### Introduction

During U.S. international operations, military forces are deployed to remote locations around the globe, often in areas where endemic and emerging diseases are prevalent<sup>1</sup>. Most of these emerging and re-emerging diseases originate in animal reservoirs and then jump into humans. Numerous trends, including the increased interactions between human, animal and insect populations due to increased population densities, globalization, densification of livestock production, and rising human encroachment into animal habitats, have increased the risks of new viral outbreaks in those regions where Department of Defense (DoD) personnel are typically deployed. Often, DoD personnel are among the first responders in outbreak situations. Emerging infectious diseases, for which few medical countermeasures are available, represent a major threat to the warfighter and national security and could have devastating impacts on U.S. public health.

Despite biosurveillance efforts around the globe, new viral outbreaks continue to outpace preparedness efforts and show no signs of abating. During the first three quarters of 2017 outbreaks of avian influenza A (H7N9), Chikungunya, MERS coronavirus, Ebola, Seoul virus, Hepatitis E, Hepatitis A, Yellow Fever, Lassa, and Zika viruses were recorded<sup>2</sup>. While current biosurveillance strategies focus on detection of known pathogens within the human population following an infectious outbreak event, there is a dearth of research and surveillance on sentinel or reservoir animals<sup>3</sup>. Animal-specific viruses that have the potential to infect humans (*namely* “human-capable” pathogens), but have not yet spilled over into human populations, are rarely considered. As a result, infectious agents are detected only *after* an outbreak—that is, after an animal pathogen has adapted to become capable of infecting humans. Consequently, the outbreak response is largely reactive and not initiated until after an epidemic has already begun. The PREEMPT program represents a radical departure from current practice, aiming to target viral

---

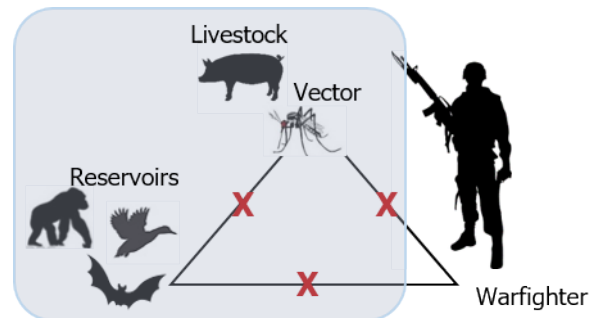
<sup>1</sup> Halliday Jo E.B. et al. (2017). Driving improvements in emerging disease surveillance through locally relevant capacity strengthening. *Science*.

<sup>2</sup> World Health Organization (2017). <http://www.who.int/csr/don/archive/year/2017/en/>.

<sup>3</sup> Metcalf, J.E. and Lessler, J. (2017). Opportunities and challenges in modeling emerging infectious diseases. *Science*.

biothreats within the animal reservoirs where they originate and preempt their entry into human populations *before* an outbreak occurs.

Recently, the scientific community has advanced its understanding of host-pathogen genetics and mechanisms of adaptation across hosts<sup>4,5</sup>, developed analytic tools to predict animal hosts of new and potential human-transmissible viruses, and learned how to identify “hot spot” geographic regions where an animal-to-human virus jump is imminent<sup>6,7</sup>. This understanding is empowered by new high-throughput data generation capabilities and sophisticated analytic and computational tools. Together, this new understanding and capability hold great promise for the development of advanced integrated models that can assess and likely provide guidance for action that prevents human virus emergence before the virus gains entry to the human population. The PREEMPT program aims to develop new tools and models to quantify the likelihood of a virus quasispecies (QS) to jump from an animal host into humans. In parallel, PREEMPT seeks to develop and validate new scalable technologies that prevent transmission of viral pathogens in wild reservoirs and/or mosquito vectors to humans or to bridge animals that serve as intermediary hosts prior to virus jump into humans.



### **Research Objectives**

PREEMPT research objectives are structured along two Technical Areas (TAs). Both Technical Areas must be performed in parallel by vertically integrated, interdisciplinary teams. Proposers must present a plan to address both Technical Areas and meet key milestone decision points that occur at the end of year 2.

- 1) TA1: Develop and validate integrated, multiscale models that quantify the likelihood a human-capable virus will emerge from an animal reservoir residing in a “hot spot” geographic region.
- 2) TA2: Develop scalable approaches that target and suppress the animal virus in its reservoir(s) and/or vector(s), to reduce the likelihood of virus transmission into humans.

### **Technical Area 1 (TA1)**

<sup>4</sup> Lloyd-Smith, J.O. (2010). Identifying genetic markers of adaptation for surveillance of viral host jumps. *Nature Reviews Microbiology*.

<sup>5</sup> Plowright, R.K. et al. (2017). [Pathways to zoonotic spillover](#). *Nature Reviews Microbiology*.

<sup>6</sup> Olival, K.J. et al. (2017). Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature*.

<sup>7</sup> Han, B.A. et al. (2016). Undiscovered Bat Hosts of Filoviruses. *PLoS Negl Trop Dis*.

Studies within TA1 must produce and validate models that: (a) quantify the likelihood of a virus to jump into a new animal species and/or humans, (b) identify opportunities for proactive intervention, and (c) determine likely efficacy, scalability, and sustainability of prevention strategies.

Proposers are expected to leverage high-throughput virus screening methods, metagenomics, ecological surveillance, and advanced modeling tools to generate risk models for species jump that will enable near real-time data analysis and identification of potential risks and risk factors. This far-forward biosurveillance system should also identify opportunities for preemptive intervention, assessing likely efficacy, scalability, safety, and sustainability of preemptive strategies to target viral threats in animal reservoirs and/or vectors before they enter the human population.

### ***TA1 Components***

Proposers should address, at minimum, the following aspects:

- 1) Selection of zoonotic or vector-borne viral pathogen(s) (multiple viruses within the same family may be addressed if they share a common animal reservoir and/or vector)
- 2) Field data collection
- 3) Multi-species field samples studied in a controlled laboratory setting
- 4) Data analysis, integration, and model development
- 5) Real-time data sharing and analysis
- 6) Model outputs
- 7) Experimental validation of model predictions in a controlled, environment-simulated laboratory setting

#### *1. Selection of zoonotic or vector-borne viral pathogen*

This BAA only will consider proposals focused on zoonotic and/or vector-borne viruses. Microorganisms other than viruses are not responsive to this announcement. A rationale for the viruses selected is required. Virus selection may be based on, but is not limited to, the following factors: high frequency of re-emergence (*e.g.* avian influenza virus), patterns of virus host range or host breadth (predicted zoonotic potential), potential for rapid spread due to vector-mediated transmissibility, severity of disease pathology, and likelihood of pandemic threat.

#### *2. Field data collection*

Proposers must identify and justify suitable geographic “hotspots” within which they will collect field data. Proposers must consider all of the following criteria when selecting geographic hot spots for field data collection:

- 1) Previous evidence of geographic distribution of zoonotic reservoirs and/or vectors for known or unknown human viruses; these maps may be based on epidemiological, phylogenetic, ecological, biogeographic, socio-economic data, or other;
- 2) Evidence of past species jump events in or near the selected geographic location;

- 3) Demonstrated capabilities and infrastructure to perform research in the selected geographic region and/or collaboration with an established DoD or Department of Health and Human Services (DHHS) partner (*e.g.*, a Naval Medical Research Unit site, Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, or Centers for Disease Control), such that the performer can coordinate far-forward surveillance activities and access local lab and analytics capabilities;
- 4) Appropriate levels of in-country government approval, cooperation, infrastructure and logistical support where samples will be collected and analyzed; and
- 5) Rationale for reservoirs/species to be sampled.

Where applicable, proposers must consider seasonal distribution (*e.g.*, wet-dry seasons for mosquito), temporal ecological factors (*e.g.*, time of fruiting for fruit bats), and temporal behavioral traits (*e.g.*, sexual maturation) of zoonotic species for field sampling. Potential geographic areas may include, but are not limited to, endemic regions; those undergoing ecological shifts (thus increasing risk for spillover due to changes in animal-human interactions); those harboring host species with high zoonotic potential that are in proximity to human populations and “bridge” animal hosts (*e.g.*, human-bat-swine ecosystems); and prior sites of spillover events or outbreaks. The selection of geographic areas of common military deployment that also meet the above criteria is strongly encouraged. Proposers should describe feasible approaches to increase the probability of detecting viruses within animal reservoirs and/or vectors—residing in selected geographic areas—that have the potential to become human-capable. Proposers should describe sample collection methods in detail, being sure to include longitudinal sampling frequency. Development of novel and rapid sampling approaches for the real-time continuous screening of emerging or re-emerging pathogens at the human-animal interface is encouraged. Proposers are encouraged to identify field samples that were collected during past outbreak events, or field data already generated, that could be accessed for retrospective analyses. In such cases, proposers should describe how and where the data were collected, and establish quality control methods for data evaluation and use. Although human use research will not be funded by PREEMPT, the use of human samples or data from prior outbreaks obtained through other programs may be included in the research plan as long as samples are appropriately de-identified (see, for example, <https://humansubjects.nih.gov/human-specimens-cell-lines-data>).

### 3. Multi-species laboratory testing of field samples

Proposers should discuss protocols to determine and quantify the virus population QS diversity from the vector or reservoir at the time of sample collection ( $t=0$ ) in a manner that minimizes QS alterations, which commonly result from cell line passaging. Proposers should assess the need for longitudinal collection of samples to understand viral QS temporal dynamics (temporal changes in sequence and fitness landscapes) in field virus populations. The initial viral QS isolated from a field sample ( $t=0$ ) will be hereon annotated as “QS<sub>0</sub>”. Proposers must describe *in vitro* and/or *in vivo* experiments to assess jump potential of the QS<sub>0</sub> population to a relevant new host. Experimental approaches to monitor viral species jump may include, but are not limited to: changes in viral population QS during cell line passaging between relevant species; infection of appropriate animal models; infection of natural animal hosts; and controlled, multi-species laboratory ecosystems.

Lab testing should determine the key parameters influencing the probability of a viral QS<sub>0</sub> to jump and adapt to a new host species. Potential parameters across different host animals or vectors may include, but are not limited to:

- 1) QS diversity profiles
- 2) Rates of virus infection and amplification
- 3) Virus incubation period
- 4) Viremia and viral shedding
- 5) Transmission bottlenecks
- 6) Animal host evolutionary and immune pressures

The data generated should enable the development of genotype-to-phenotype maps and the determination of mutation(s) associated with virus jump to a new host.

#### *4. Data analysis, integration, and model development*

Proposers should identify the relevant data needed for developing integrated models of risk assessment. Proposers should discuss the development of probabilistic models of virus jump using advanced computational methods and tools, including both model-driven and data-driven approaches. Models should integrate multi-scale and cross-host species data, including but not limited to, field and experimental data (*e.g.*, QS dynamics), ecological data (*e.g.*, demographic, socio-economic, epidemiological, biogeographical, and other metadata), and other relevant data available, especially that generated from past spillover events. Models should consider all factors associated with pathogen emergence and transmission, particularly multi-host immunological landscapes. Models should also capture viral evolutionary trajectories, fitness landscapes in zoonotic and/or vector species, and quantify the transmission dynamics underlying species jump.

#### *5. Real-time data sharing and analysis*

The PREEMPT program is expected to generate significant amounts of data, primarily from next generation sequencing (NGS) of viral populations and analysis of host molecular signatures. Proposers should identify methods for near-real-time data sharing and analysis.

#### *6. Model outputs*

Proposers should explain how they will develop probabilistic models and machine learning techniques that integrate multi-scale and cross-species data (*e.g.*, molecular signatures, demographic, ecological, socio-economic, epidemiological, weather, climate, and other metadata) to quantify a pathogen's likelihood to cross species barriers and infect humans. Models should capture viral evolutionary trajectories and mutations that govern species jump. Models should quantify transmission dynamics, accounting for the diversity of viral QS. Models should identify key parameters of the pathogen, host species, vector dynamics, and ecological interactions contributing to species jump, and should inform a preemption strategy by identifying optimal pressure points (*e.g.*, jump-enabling mutations, stochastic transmission bottlenecks, and viral amplification requirements) that can be targeted to reduce the likelihood of species jump. For proposals addressing vector-borne viruses, proposers should describe methods to quantify

the likelihood of virus adaptation to a new vector and propose experimental methods to validate these predictions. Proposers should discuss metrics for grading model accuracy, sensitivity, and specificity. Models should be able to receive dynamic biosurveillance inputs and accommodate virus QS changes.

### *7. Experimental validation of model predictions*

Proposers must describe in detail a plan to establish relevant *in vivo*, multi-species experimental approaches to validate model outputs. Experimental testing may closely resemble or recapitulate real-life settings (*e.g.*, climate, phylogenetically adjacent host species, and vector “biting” patterns) to enable the quantification of the probability of spillover and/or transmission events in a controlled manner. Approaches that closely recapitulate real-life ecosystems and natural hosts are strongly encouraged. To improve model accuracy, sensitivity, and specificity, performers must iterate both theoretical and empirical experiments.

### ***TA1 Key Outputs***

The key outputs for TA1 must include the following:

- 1) Integrated models that quantify likelihood of virus jump and can be easily adapted to receive dynamic surveillance and virus data input.
- 2) Stochastic models quantifying bottlenecks (*e.g.*, transmission, cell entry, and infection rates) and mutational fitness maps (*e.g.*, enabler mutations and their frequency).
- 3) Identification and assessment of potential preemptive intervention targets to preempt virus jump from the reservoir and/or vector.

### **Technical Area 2 (TA2)**

Studies within this technical area aim to develop deployable and scalable methods to preempt viral jump across species.

### ***TA2 Components***

Technical Area 2 aims to develop deployable and scalable methods to preempt viral jump to other species. Proposers must address, at minimum, all of the following aspects:

- 1) Proof-of-concept preemption approaches;
- 2) Scalable delivery methods;
- 3) Analysis of long-term sustainability; and
- 4) Experimental validation.

#### *1. Proof-of-concept preemption approaches*

Proposers should describe how the output of TA1 *in silico* models will guide preventive method design, and how quantitative information of virus-host species barriers and transmission bottlenecks will be used to develop strategies to preempt emergence of human-capable viruses. Models should guide the selection of: host species to be treated (*e.g.*, wild animals, “bridge”



animals, vectors, and livestock); potential molecular targets (*e.g.*, key mutation(s) enabling receptor binding in a new host); targets associated with transmission cycle dynamics (*e.g.*, reduction of viral load within the reservoir and/or vector that would preclude transmission); and other relevant factors identified by the models. Proposers should describe the preemptive methods that address different model outputs. Examples of preemptive approaches include but are not limited to:

- 1) Specific disruption of jump-capable genes from virus QS in reservoirs and/or vectors using small interfering RNAs or CRISPR/Cas-based targeted deletions.
- 2) Suppression of virus jump to a new host through antibody-mediated virus neutralization.
- 3) Suppressed reservoir and/or vector viremia using virus defective interfering particles (DIPs) to outcompete virus replication.
- 4) Suppressed transmission among animal reservoirs through induced immunity (*e.g.*, vaccinate the animal).
- 5) Alternative methods informed by experimental and theoretical models. The development of novel preemptive approaches are strongly encouraged.

## 2. Scalable delivery methods

Proposers must describe scalable approaches to deliver the preemptive therapeutic to achieve animal and/or vector population-level control of the targeted virus, including strategies for reaching less accessible animal reservoirs (*e.g.*, rodents or non-human primates). Approaches that enable host-to-host therapeutic distribution (*i.e.*, do not require individual treatment) that are self-limiting, only activate when the viral pathogen target is present, and/or have a controllable “on/off-switch” are encouraged. Potential scalable methods of inoculation may include, but are not limited to:

- 1) Self-disseminating treatments or preventives (*e.g.*, transmissible recombinant vaccines, therapeutic interfering particles, or self-spreading antiviral therapies).
- 2) Bait vaccination or treatment of wild or domestic animals.
- 3) Spray-based methods.

Approaches that utilize genetic modifications of vectors (*e.g.*, engineered mitochondrial DNA) are acceptable. The proposed method of inoculation must be justified. The proposer must describe strategies for closely controlling preemptive delivery and spread.

## 3. Analysis of long-term safety and efficacy

Proposers must establish initial methods to assess the long-term safety and efficacy of preemptive approaches (*e.g.*, determine the mechanism by which species specificity of a vaccine is maintained, and assess evolutionary stability and ecological safety).

## 4. Experimental validation

Proposers must describe approaches to validate preemptive methods of choice in controlled experimental models. Multi-species experimental platforms that closely recapitulate real-life ecosystems and use natural hosts are strongly encouraged.

### ***TA2 Key Outputs***

The key outputs of TA2 must include the validation of new “block-before-jump” preemption technologies for one of the following:

- 1) Validate suppression of virus jump from wild animal reservoir to humans and/or an intermediate animal carrier (*e.g.*, domestic livestock).
- 2) Validate suppression of virus jump or transmission from wild reservoir to vector, vector to a different vector species, and/or from vector to human.

### **Period of Performance**

DARPA anticipates that the PREEMPT program will provide up to three and a half years of funding for research and development to be performed over Phase I (base) and II (option) periods of 24 and 18 months, respectively.

### **Timeline**

PREEMPT spans a 42-month effort with a 24-month Phase I (base) and an 18-month Phase II (option). In general, Phase I should provide early validation of zoonosis risk models, and Phase II should establish efficacy and scalability of zoonosis prevention approaches.

### ***Phase I (Base period)***

Phase I efforts aim to develop experimental and mathematical models to quantify the likelihood a virus will jump from one host species to another, identify potential targets for spillover preemption, and develop scalable methods of preemption. During Phase I, performer teams will:

- 1) Identify the genetic adaptations that enable species jump.
- 2) Develop mathematical models to quantify the likelihood of species jump based on:
  - a. Molecular data (*e.g.*, viral QS data from deep sequencing) and
  - b. Ecological data (*e.g.*, immune state of the host population before pathogen emergence, species relatedness, etc.).
- 3) Identify bottlenecks for intervention (*e.g.*, *transmission, cell entry, viral amplification, infection rate, and other mechanisms associated with viral cross-species compatibility*).
- 4) Develop initial scalable platforms that target viruses in reservoirs and/or vectors to prevent viral jump into other animals or humans.

By the end of year 1 (Phase I) performers will be expected to have:

- 1) Identified signatures of fitness and spillover potential of a pathogen between two species.
- 2) Quantified the genetic and transmission factors requirements of viral QS to jump to a new host (*e.g.*, develop genotype-to-phenotype maps, identify specific mutations, etc.) using far-forward biosurveillance data from selected high-risk regions.

By the end of year 2 (Phase I) performers will be expected to have:

- 1) Initially demonstrated that models can quantify the probability of human-capable virus pathogens to jump from one species to another species.
- 2) Demonstrated proof of concept methods for targeting human-capable virus pathogens in the reservoirs and/or vectors to reduce the probability of virus jump.
- 3) Provided initial strategies to scale up preemption methods.

***Phase II (Option period)***

Phase II efforts aim to develop probabilistic models for intra- and inter-species viral amplification and transmission dynamics, integrated models for risk assessment, and experimental validation of new approaches to preempt species jump. During Phase II, performer teams will extend Phase I modeling efforts to:

- 1) Quantify intra- and inter-species viral amplification dynamics and transmission.
- 2) Develop integrated models that quantify the probability of a virus QS to jump to bridge animal species or to humans.
- 3) Experimentally validate scalable methods for their ability to preempt zoonotic spillover.

By the end of year 3.5 (Phase II) performers will be expected to:

- 1) Demonstrate accuracy of risk assessment and preemption models in a relevant multi-species experimental setting.
- 2) Demonstrate the ability to suppress viral jump to a new species in controlled experimental settings.

It is recognized that appropriate milestones and metrics may depend upon the type of virus, the reservoir, the mechanisms of species jump, and the proposed preemption methods. Proposers must offer quantitative milestones and metrics (see Tables 1 and 2 below for notional metrics) for their proposed proof-of-principle use case. Proposers must demonstrate relevant research experience in the required technical areas. Proposals involving multiple teams and/or experimental approaches should be structured as unified efforts that address the program Technical Areas in parallel, in an integrated manner.

**1.2. PROGRAM METRICS**

In order for the Government to evaluate the effectiveness of a proposed solution in achieving the stated program objectives, proposers should note that the Government hereby promulgates the following program metrics that may serve as a guideline for assessing program progress, risk and impact. Although the following program metrics are provided, proposers should note that the Government has identified these goals with the intention of bounding the scope of effort while affording the maximum flexibility, creativity, and innovation in proposing solutions to the stated problem. Proposers should offer more appropriate and specific metrics for their particular use case and technical approach, including intermediate metrics (i.e. every 6 months, or sooner) to help further evaluate progress. Final metrics are to be negotiated at the time of contracting.

Table 1: Notional Milestones, Deliverables, and Program Metrics for TA1

Phase	Milestones and Deliverables	Program Metric
I	<p>Collected field surveillance data:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Virus QS molecular data (<i>e.g.</i> from deep sequencing) and metadata from longitudinal samples (<i>e.g.</i> obtained from selected high-risk areas (<i>e.g.</i> bat cave) and/or from prior outbreak event)</li> <li>• Host species immune molecular data</li> </ul>	<p>Quantitative measures of:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Longitudinal viral population QS (<math>QS_{t=0}</math>, <math>QS_{t=6\text{ months}}</math>, <math>QS_{t=12\text{ months}}</math>,..) diversity in selected high-risk areas (<i>e.g.</i> frequency of mutations, evolutionary trajectories) (<b>6 months</b>)</li> <li>• Viral QS diversity in samples obtained from animal, vector, and/or human from prior outbreak event (<i>e.g.</i> frequency of species-specific mutations) (<b>9 months</b>)</li> <li>• Immune molecular signatures from host reservoir or intermediate reservoir species (<b>12 months</b>)</li> </ul>
	<p>Multi-species lab test data:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Virus QS genotype-phenotype maps for at least 2 relevant host species</li> </ul>	<p>Quantitative measures of:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cell entry and adaptation across species <i>in vitro</i> and/or <i>in vivo</i> (<i>e.g.</i> QS diversity during passage across species) (<b>18 months</b>)</li> </ul>
	<p>Initial mathematical models that assess risk of virus jump</p>	<p>Model capability to describe/predict:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Virus QS evolutionary trajectories between 2 relevant species (<b>9 months</b>)</li> <li>• Key molecular factors that could be targeted to prevent virus jump <i>in vitro</i> and/or <i>in vivo</i> (<i>e.g.</i> signatures of fitness of a pathogen between two relevant host species) (<b>18 months</b>)</li> <li>• Molecular targets for preemption (<b>24 months</b>)</li> </ul>
	<p>Established testbeds for validation of model predictions</p>	<p>Testbeds mimic natural environment as quantified by performer-defined parameters (<b>24 months</b>)</p>
II	<p>Multi-species lab test data</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Quantify virus QS transmission factors between two species <i>in vivo</i></li> </ul>	<p>Quantitative measures of:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Virus amplification and transmission dynamics (<i>e.g.</i> rate of infection vs. viremia, amplification rates, and incubation time) (<b>30 months</b>)</li> </ul>
	<p>Advanced mathematical models that assess risk of virus jump</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Integration of molecular data and virus amplification/transmission dynamics</li> <li>• Integration of host immune evolutionary pressures and virus QS dynamics</li> </ul>	<p>Models predict:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Intra- and inter-species transmission dynamics (<b>36 months</b>)</li> <li>• Probability of spillover (risk assessment) (<b>42 months</b>)</li> <li>• Top 2 targets to reduce probability of transmission between two species to</li> </ul>

Phase	Milestones and Deliverables	Program Metric
		inform TA2 ( <b>42 months</b> )
	Further validation of model prediction in established testbeds	Validated model prediction accuracy in multispecies environment ( <b>42 months</b> )

Table 2: Notional Milestones, Deliverables, and Program Metrics for TA2

Phase	Milestones and Deliverables	Program Metric
I	Proof-of-concept demonstration of preemptive approach that reduces either the probability of virus jump or the frequency of virus QS variants at high risk for species jump	Quantitative validation of preemptive approach as established by performer ( <b>24 months</b> ) Examples: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Frequency of high-risk mutation within virus QS in reservoir reduced &gt;3X</li> <li>• Virus incubation period in vector extended &gt;3X</li> <li>• Virus amplification rate in reservoir or vector reduced &gt;3X</li> <li>• Viremia in host or vector reduced &gt;5X</li> </ul>
II	Demonstrated efficacy of preemption method	Reduced probability of transmission between two species by >5X <i>in vivo</i> for top 2 targets ( <b>36 months</b> )
	Demonstrated scalability of preemption method	Quantitative scalability as established by performer ( <b>42 months</b> )

### Data Sharing

Proposers must ensure all technical data items (including experimental findings, processed data, methods of processing, research reports, and publications) and software (source code and executables) generated from PREEMPT program funding are made available to DARPA. Regularly submitted reports (*e.g.*, monthly or quarterly) should contain all relevant project data, including (but not limited to) raw and analyzed data and any necessary annotations and interpretation. Data and/or samples collected from de-identified human volunteers/patients from previous outbreak events must include associated anonymized metadata (*e.g.*, signs/symptoms, diagnostic test results, interventions, clinical observations, and outcomes). All raw data and metadata should be recorded according to approved experimental standards.

To gain enhanced scientific value from open collaboration in fundamental research, DARPA may seek permission to share some or all program-generated data with the broader research community as open data (including the possibility of accessing, reusing, and redistributing under appropriate licensing terms) to the extent permitted by applicable laws and regulations (*e.g.*, privacy, security, and export control).

DARPA anticipates that a large amount of data will be generated under this program by each performer and that the analyses and validation will be strengthened by compiling and integrating

information across all performers. Performers are strongly encouraged to establish the appropriate agreements to enable collaboration and data sharing. DARPA encourages sharing of pre-existing data, including those generated through funding by other sources, although this is not a requirement of the program.

As feasible, DARPA intends to share data within the PREEMPT performer community to promote program goals. To facilitate sharing and exchange of data items, performers will be required to enter an Associate Contractor Agreement (ACA); an ACA clause will be included in the contract or agreement awarded.

### **PREEMPT Transition Plan**

Proposers must include a PREEMPT Technology Transition Plan. Proposers must indicate the types of partners (*e.g.*, government, private industry, non-profit) they plan to pursue and submit a timeline with incremental milestones toward successful engagement. Proposers should begin transition activities during the early stages of the program (Phase I). Awardees must include DARPA in the development of transition relationships. If the transition plan includes a start-up company, a business development strategy must be included as well. The extent by which the proposed intellectual property (IP) rights will impede the Government's ability to transition the technology will be considered in the proposal evaluation.

### **1.3. ETHICAL, LEGAL, AND SOCIETAL IMPLICATIONS (ELSI)**

DARPA is committed to ensuring that efforts funded under this BAA adhere to ethical and legal regulations currently in place for federally and DoD-funded research. Program developments will be discussed with a panel of expert external advisors with expertise in bioethical and biosafety issues that may emerge as a consequence of advances in biomedical science and technology. Proposers to this BAA should address potential ethical, legal, and societal implications of the proposed technology.

### **1.4. PROTECTION OF SENSITIVE INFORMATION**

PREEMPT is a 6.1 fundamental research program aimed at enhanced biosurveillance and novel approaches to preempt viral pathogens in animal reservoirs from jumping into human populations. DARPA follows current DoD policy for contracted fundamental research. DARPA recognizes, however, that PREEMPT program components aimed at understanding and quantifying mechanisms for viral zoonotic spillover could potentially generate sensitive information that could be misused. Since this is a fundamental research program, the risk of misuse currently cannot be reasonably evaluated. However, proposers are notified that during proposal evaluation and/or program performance, when such a risk reasonably can be evaluated, DARPA may determine that risk of misuse creates exceptional circumstances, compelling reasons, and/or national security reasons under current DoD policy for contracted fundamental research. DARPA therefore expects that proposers to this program understand and will comply with various government guidance regarding potential gain-of-function research of concern (GOFROC)<sup>8</sup> and dual use research of concern (DURC)<sup>9,10,11,12,13</sup>. See <https://www.phe.gov/s3/dualuse/Pages/default.aspx> for further information.

---

<sup>8</sup> Gain-of-Function Research (GOFROC) refers to studies with the potential to generate pathogens with pandemic potential exhibiting high transmissibility and high virulence.

DARPA requires that proposals include a Risk Mitigation Plan that will be incorporated into any resulting agreements or contracts and includes the following information:

- 1) An assessment of potential risks to public health, agriculture, plants, animals, the environment, and national security.
- 2) Proposed guidelines that the proposer will follow to ensure maximal biosafety and biosecurity during the course of the research.
- 3) A communication plan that addresses content, timing, and the extent of distribution of potentially sensitive dual-use information. The plan must also address how input from DARPA, other government, and community stakeholders will be taken into account in decisions regarding communication and publication of potentially sensitive dual-use information.

## **2. Award Information**

### **2.1. GENERAL AWARD INFORMATION**

Multiple awards are possible. The amount of resources made available under this BAA will depend on the quality of the proposals received and the availability of funds.

The Government reserves the right to select for negotiation all, some, one, or none of the proposals received in response to this solicitation and to make awards without discussions with proposers. The Government also reserves the right to conduct discussions if it is later determined to be necessary. If warranted, portions of resulting awards may be segregated into pre-priced options. Additionally, DARPA reserves the right to accept proposals in their entirety or to select only portions of proposals for award. In the event that DARPA desires to award only portions of a proposal, negotiations may be opened with that proposer. The Government reserves the right to fund proposals in phases with options for continued work, as applicable. The Government reserves the right to fund a Phase II option based on funding availability, an

---

<sup>9</sup> Dual Use Research of Concern (DURC) refers to life sciences research that can be reasonably anticipated to provide knowledge, information, products or technology that could be directly misapplied to pose a significant threat with broad potential consequences to public health and safety, agricultural crops and other plants, animals, the environment, materiel, or national security.

<sup>10</sup> Proposed framework for the oversight of dual use life sciences research: strategies for minimizing the potential misuse of research information, National Science Advisory Board for Biosecurity (NSABB). June 2007.

<sup>11</sup> Recommendations for the evaluation and oversight of proposed gain-of-function research by the National Science Advisory Board for Biosecurity (NSABB). May 2016.

<sup>12</sup> Tools for the Identification, Assessment, Management, and Responsible Communication of Dual Use Research of Concern: A Companion Guide to the United States Government Polices for Oversight of Life Sciences Dual Use Research of Concern. NIH. September 2014.

<sup>13</sup> United States Government Policy for Oversight of Life Sciences Dual Use Research of Concern. DURC Policy. March 2012.

assessment of Phase I research results, and a determination that awarding the option is in the best interests of the Government. The Government reserves the right to request any additional, necessary documentation once it makes the award instrument determination. Such additional information may include but is not limited to Representations and Certifications (see Section VI.B.2., “Representations and Certifications”). The Government reserves the right to remove proposers from award consideration should the parties fail to reach agreement on award terms, conditions, and/or cost/price within a reasonable time, and the proposer fails to timely provide requested additional information. Proposals identified for negotiation may result in a procurement contract, grant, cooperative agreement, or other transaction, depending upon the nature of the work proposed, the required degree of interaction between parties, whether or not the research is classified as Fundamental Research, and other factors.

Proposers looking for innovative, commercial-like contractual arrangements are encouraged to consider requesting Other Transactions. To understand the flexibility and options associated with Other Transactions, consult <http://www.darpa.mil/work-with-us/contract-management#OtherTransactions>.

In all cases, the Government contracting officer shall have sole discretion to select award instrument type, regardless of instrument type proposed, and to negotiate all instrument terms and conditions with selectees. DARPA will apply publication or other restrictions, as necessary, if it determines that the research resulting from the proposed effort will present a high likelihood of disclosing performance characteristics of military systems or manufacturing technologies that are unique and critical to defense. Any award resulting from such a determination will include a requirement for DARPA permission before publishing any information or results on the program. For more information on publication restrictions, see the section below on Fundamental Research.

## **2.2. FUNDAMENTAL RESEARCH**

It is DoD policy that the publication of products of fundamental research will remain unrestricted to the maximum extent possible. National Security Decision Directive (NSDD) 189 defines fundamental research as follows:

‘Fundamental research’ means basic and applied research in science and engineering, the results of which ordinarily are published and shared broadly within the scientific community, as distinguished from proprietary research and from industrial development, design, production, and product utilization, the results of which ordinarily are restricted for proprietary or national security reasons.

As of the date of publication of this BAA, the Government expects that program goals as described herein may be met by proposers intending to perform fundamental research and proposers not intending to perform fundamental research or the proposed research may present a high likelihood of disclosing performance characteristics of military systems or manufacturing technologies that are unique and critical to defense. Based on the nature of the performer and the nature of the work, the Government anticipates that some awards will include restrictions on the resultant research that will require the awardee to seek DARPA permission before publishing any information or results relative to the program.



Proposers should indicate in their proposal whether they believe the scope of the research included in their proposal is fundamental or not. While proposers should clearly explain the intended results of their research, the Government shall have sole discretion to select award instrument type and to negotiate all instrument terms and conditions with selectees. Appropriate clauses will be included in resultant awards for non-fundamental research to prescribe publication requirements and other restrictions, as appropriate. This clause can be found at <http://www.darpa.mil/work-with-us/additional-baa>.

For certain research projects, it may be possible that although the research being performed by the awardee is restricted research, a subawardee may be conducting fundamental research. In those cases, it is the awardee's responsibility to explain in their proposal why its subawardee's effort is fundamental research

### **3. Eligibility Information**

#### **3.1. ELIGIBLE APPLICANTS**

All responsible sources capable of satisfying the Government's needs may submit a proposal that shall be considered by DARPA.

##### **3.1.1. Federally Funded Research and Development Centers (FFRDCs) and Government Entities**

###### **FFRDCs**

FFRDCs are subject to applicable direct competition limitations and cannot propose to this BAA in any capacity unless they meet the following conditions: (1) FFRDCs must clearly demonstrate that the proposed work is not otherwise available from the private sector. (2) FFRDCs must provide a letter on official letterhead from their sponsoring organization citing the specific authority establishing their eligibility to propose to Government solicitations and compete with industry, and their compliance with the associated FFRDC sponsor agreement's terms and conditions. This information is required for FFRDCs proposing to be awardees or subawardees.

###### **Government Entities**

Government Entities (e.g., Government/National laboratories, military educational institutions, etc.) are subject to applicable direct competition limitations. Government entities must clearly demonstrate that the work is not otherwise available from the private sector and provide written documentation citing the specific statutory authority and contractual authority, if relevant, establishing their ability to propose to Government solicitations.

###### **Authority and Eligibility**

At the present time, DARPA does not consider 15 U.S.C. § 3710a to be sufficient legal authority to show eligibility. While 10 U.S.C. § 2539b may be the appropriate statutory starting point for some entities, specific supporting regulatory guidance, together with evidence of agency approval, will still be required to fully establish eligibility. DARPA will consider FFRDC and

Government entity eligibility submissions on a case-by-case basis; however, the burden to prove eligibility for all team members rests solely with the proposer.

### **3.1.2. Non-U.S. Organizations**

Non-U.S. organizations and/or individuals may participate to the extent that such participants comply with any necessary nondisclosure agreements, security regulations, export control laws, and other governing statutes applicable under the circumstances.

## **3.2. ORGANIZATIONAL CONFLICTS OF INTEREST**

### FAR 9.5 Requirements

In accordance with FAR 9.5, proposers are required to identify and disclose all facts relevant to potential OCIs involving the proposer's organization and *any* proposed team member (subawardee, consultant). Under this Section, the proposer is responsible for providing this disclosure with each proposal submitted to the BAA. The disclosure must include the proposer's, and as applicable, proposed team member's OCI mitigation plan. The OCI mitigation plan must include a description of the actions the proposer has taken, or intends to take, to prevent the existence of conflicting roles that might bias the proposer's judgment and to prevent the proposer from having unfair competitive advantage. The OCI mitigation plan will specifically discuss the disclosed OCI in the context of each of the OCI limitations outlined in FAR 9.505-1 through FAR 9.505-4.

### Agency Supplemental OCI Policy

In addition, DARPA has a supplemental OCI policy that prohibits contractors/performers from concurrently providing Scientific Engineering Technical Assistance (SETA), Advisory and Assistance Services (A&AS) or similar support services and being a technical performer. Therefore, as part of the FAR 9.5 disclosure requirement above, a proposer must affirm whether the proposer or *any* proposed team member (subawardee, consultant) is providing SETA, A&AS, or similar support to any DARPA office(s) under: (a) a current award or subaward; or (b) a past award or subaward that ended within one calendar year prior to the proposal's submission date.

If SETA, A&AS, or similar support is being or was provided to any DARPA office(s), the proposal must include:

- The name of the DARPA office receiving the support;
- The prime contract number;
- Identification of proposed team member (subawardee, consultant) providing the support; and
- An OCI mitigation plan in accordance with FAR 9.5.

### Government Procedures

In accordance with FAR 9.503, 9.504 and 9.506, the Government will evaluate OCI mitigation plans to avoid, neutralize or mitigate potential OCI issues before award and to determine whether it is in the Government's interest to grant a waiver. The Government will only evaluate OCI mitigation plans for proposals that are determined selectable under the BAA evaluation criteria and funding availability.

The Government may require proposers to provide additional information to assist the Government in evaluating the proposer's OCI mitigation plan.

If the Government determines that a proposer failed to fully disclose an OCI; or failed to provide the affirmation of DARPA support as described above; or failed to reasonably provide additional information requested by the Government to assist in evaluating the proposer's OCI mitigation plan, the Government may reject the proposal and withdraw it from consideration for award.

### **3.3. COST SHARING/MATCHING**

Cost sharing is not required; however, it will be carefully considered where there is an applicable statutory condition relating to the selected funding instrument. Cost sharing is encouraged where there is a reasonable probability of a potential commercial application related to the proposed research and development effort.

For more information on potential cost sharing requirements for Other Transactions for Prototype, see <http://www.darpa.mil/work-with-us/contract-management#OtherTransactions>

## **4. Application and Submission Information**

### **4.1. ADDRESS TO REQUEST APPLICATION PACKAGE**

This announcement, any attachments, and any references to external websites herein constitute the total solicitation. If proposers cannot access the referenced material posted in the announcement found at <http://www.darpa.mil>, contact the administrative contact listed herein.

### **4.2. CONTENT AND FORM OF APPLICATION SUBMISSION**

All submissions, including abstracts and proposals must be written in English with type not smaller than 12 point font. Smaller font may be used for figures, tables, and charts. Copies of all documents submitted must be clearly labeled with the DARPA BAA number, proposer organization, and proposal title/proposal short title.

#### **4.2.1. Proposal Abstract Format**

Proposers are strongly encouraged to submit an abstract in advance of a proposal to minimize effort and reduce the potential expense of preparing an out of scope proposal. The abstract is a concise version of the proposal comprising a **maximum of 8 pages** including all figures, tables, charts, and the Executive Summary slide. The (optional) submission letter is not included in the page count. All pages shall be formatted for printing on 8-1/2 by 11-inch paper with font size not smaller than 12 point. Smaller font sizes may be used for figures, tables, and charts.

Submissions must be written in English.

Abstracts must include the following components:

- A. Cover Sheet (does not count towards page limit): Include the administrative and technical points of contact (name, address, phone, fax, email, lead organization). Also

include the BAA number, title of the proposed project, primary subcontractors, estimated cost, duration of the project, and the label “ABSTRACT.”

B. Executive Summary Slide: Provide a one slide summary in PowerPoint that effectively and succinctly conveys the main objective, key innovations, expected impact, and other unique aspects of the proposed project. Proposers should use the slide template provided as Attachment 1 to the BAA posted at <http://www.fbo.gov>.

C. Goals and Impact: Clearly describe what is being proposed and what difference it will make (qualitatively and quantitatively), including brief answers to the following questions:

1. What is the proposed work attempting to accomplish or do?
2. How is it done today? And what are the limitations?
3. What is innovative in your approach and how does it compare to current practice and state-of-the-art (SOA)?
4. What are the key technical challenges in your approach and how do you plan to overcome these?
5. Who will care and what will the impact be if you are successful?
6. How much will it cost and how long will it take?

D. Technical Plan: Outline and address all technical challenges inherent in the approach and possible solutions for overcoming potential problems. This section should provide appropriate specific milestones (quantitative, if possible) at intermediate stages of the project to demonstrate progress and a brief plan for accomplishment of the milestones.

E. Capabilities: Provide a brief summary of expertise of the team, including subcontractors and key personnel. A principal investigator for the project must be identified, and a description of the team’s organization. Include a description of the team’s organization including roles and responsibilities. Describe the organizational experience in this area, existing intellectual property required to complete the project, and any specialized facilities to be used as part of the project. List Government-furnished materials or data assumed to be available. If desired, include a brief bibliography with links to relevant papers, reports, or resumes of key performers. Do not include more than two resumes as part of the abstract. Resumes count against the abstract page limit.

#### **4.2.2. Proposal Format**

All full proposals must be in the format given below. Proposals shall consist of two volumes: 1) **Volume I, Technical and Management Proposal**, and 2) **Volume II, Cost Proposal**. All pages shall be printed on 8-1/2 by 11-inch paper with type not smaller than 12 point. Smaller font may be used for figures, tables and charts. The page limitation for full proposals includes all figures, tables, and charts. Volume I, Technical and Management Proposal, may include an attached bibliography of relevant technical papers or research notes (published and unpublished) which document the technical ideas and approach upon which the proposal is based. Copies of not more than three (3) relevant papers may be included with the submission. The bibliography

and attached papers are not included in the page counts given below. The submission of other supporting materials along with the proposals is strongly discouraged and will not be considered for review. **The maximum page count for Volume 1 is 36 pages.** A submission letter is optional and is not included in the page count. Volume I should include the following components:

**NOTE: Non-conforming submissions that do not follow the instructions herein may be rejected without further review.**

a. Volume I, Technical and Management Proposal

Section I. Administrative

A. Cover Sheet (LABELED “PROPOSAL: VOLUME I”):

1. BAA number (HR001118S0017);
2. Lead organization submitting proposal (prime contractor);
3. Type of organization, selected from among the following categories: “LARGE BUSINESS,” “SMALL DISADVANTAGED BUSINESS,” “OTHER SMALL BUSINESS,” “HBCU,” “MI,” “OTHER EDUCATIONAL,” OR “OTHER NONPROFIT”;
4. Proposer’s reference number (if any);
5. Other team members (if applicable) and type of business for each;
6. Proposal title;
7. Technical point of contact (Program Manager or Principle Investigator) to include: salutation, last name, first name, street address, city, state, zip code, telephone, fax, e-mail;
8. Administrative point of contact (Contracting Officer or Grant Officer) to include: salutation, last name, first name, street address, city, state, zip code, telephone, fax, e-mail;
9. Award instrument requested: cost-plus-fixed-fee (CPFF), cost-contract—no fee, firm-fixed-price, grant, cooperative agreement, other transaction, or other type (specify);
10. Place(s) and period(s) of performance ;
11. Proposal validity period;
12. Total funds requested from DARPA, and the amount of cost share (if any); AND
13. Date proposal was submitted.

Information on award instruments is available at <http://www.darpa.mil/work-with-us/contract-management>.

B. Official Transmittal Letter.

Section II. Detailed Proposal Information

- A. Executive Summary: Provide a synopsis of the proposed project, including answers to the following questions:
- What is the proposed work attempting to accomplish or do?
  - How is it done today, and what are the limitations?
  - What is innovative in your approach?
  - What are the key technical challenges in your approach and how do you plan to overcome these?
  - Who or what will be affected and what will be the impact if the work is successful?
  - How much will it cost, and how long will it take?
- B. Executive Summary Slide: Provide a one slide summary in PowerPoint that effectively and succinctly conveys the main objective, key innovations, expected impact, and other unique aspects of the proposed project. Proposers should use the slide template provided as **Attachment 1** to the BAA posted at <https://www.fbo.gov>.
- C. Goals and Impact: Clearly describe what the team is trying to achieve and the difference it will make (qualitatively and quantitatively) if successful. Describe the innovative aspects of the project in the context of existing capabilities and approaches, clearly delineating the uniqueness and benefits of this project in the context of the state of the art, alternative approaches, and other projects from the past and present. Describe how the proposed project is revolutionary and how it significantly rises above the current state of the art. Describe the deliverables associated with the proposed project and any plans to commercialize the technology, transition it to a customer, or further the work.
- D. Technical Plan: Outline and address technical challenges inherent in the approach and possible solutions for overcoming potential problems. This section should provide appropriate measurable milestones (quantitative if possible) and program metrics (see Section 1.2) at intermediate stages of the program to demonstrate progress, and a plan for achieving the milestones. The technical plan should demonstrate a deep understanding of the technical challenges and present a credible (even if risky) plan to achieve the program goal. Discuss mitigation of technical risk. The technical plan should address the TA1 and TA2 proposal content requirements detailed in Section 1.1.
- E. Management Plan: Provide a summary of expertise of the team, including any subcontractors, and key personnel who will be doing the work. Resumes count against the proposal page count. Identify a principal investigator for the project. Provide a clear description of the team's organization including an organization chart that includes, as applicable: the programmatic relationship of team members; the unique

capabilities of team members; the task responsibilities of team members, the teaming strategy among the team members; and key personnel with the amount of effort to be expended by each person during each year. Provide a detailed plan for coordination including explicit guidelines for interaction among collaborators/subcontractors of the proposed effort. Include risk management approaches. Describe any formal teaming agreements that are required to execute this program.

**F. Capabilities:** Describe organizational experience in relevant subject area(s), existing intellectual property, specialized facilities, and any Government-furnished materials or information. Discuss any work in closely related research areas and previous accomplishments.

**G. Statement of Work (SOW):** The SOW should provide a detailed task breakdown, citing specific tasks and their connection to the interim milestones and program metrics. Each phase of the program (Phase I base and Phase II option) should be separately defined in the SOW and each task should be identified by TA (1 or 2). The SOW must not include proprietary information.

For each task/subtask, provide:

- A detailed description of the approach to be taken to accomplish each defined task/subtask.
- Identification of the primary organization responsible for task execution (prime contractor, subcontractor(s), consultant(s), by name).
- A measurable milestone, i.e., a deliverable, demonstration, or other event/activity that marks task completion. Include quantitative metrics.
- A definition of all deliverables (e.g., data, reports, software) to be provided to the Government in support of the proposed tasks/subtasks.

**H. Schedule and Milestones:** Provide a detailed schedule showing tasks (task name, duration, work breakdown structure element as applicable, performing organization), milestones, and the interrelationships among tasks. The task structure must be consistent with that in the SOW. Measurable milestones should be clearly articulated and defined in time relative to the start of the project.

**I. PREEMPT Transition Plan (see Section 1.2):** Proposers must indicate the types of partners (e.g., government, private industry, non-profit) they plan to pursue and submit a timeline with incremental milestones toward successful engagement. Proposers should begin transition activities during the early stages of the program (Phase I). The plan should describe any potential DARPA roles. If the plan includes a start-up company, a business development strategy must be included as well.

- J.** PREEMPT Risk Mitigation Plan (see Section 1.4): Proposers must provide a risk mitigation plan that addresses the following:
- An assessment of potential risks to public health, agriculture, plants, animals, the environment, and national security.
  - Proposed guidelines that the proposer will follow to ensure maximal biosafety and biosecurity during the course of the research.
  - A communication plan that addresses content, timing, and the extent of distribution of potentially sensitive dual-use information. The plan must also address how input from DARPA, other government, and community stakeholders will be taken into account in decisions regarding communication and publication of potentially sensitive dual-use information.
- K.** Ethical, Legal, and Societal Implications (ELSI) (see Section 1.3): Proposers should address potential ethical, legal, and societal implications of the proposed technology.

Section III. Additional Information (Note: Does not count towards page limit)

A brief bibliography of relevant technical papers and research notes (published and unpublished) which document the technical ideas upon which the proposal is based. Copies of not more than three (3) relevant papers can be included in the submission.

- a. Volume II, Cost Management Proposal

Cover Sheet (LABELED “PROPOSAL: VOLUME II”):

1. BAA number;
2. Lead Organization Submitting proposal;
3. Type of organization, selected among the following categories: “LARGE BUSINESS”, “SMALL DISADVANTAGED BUSINESS”, “OTHER SMALL BUSINESS”, “HBCU”, “MI”, “OTHER EDUCATIONAL”, OR “OTHER NONPROFIT”;
4. Proposer’s reference number (if any);
5. Other team members (if applicable), CAGE Code(s), and type of business for each;
6. Proposal title;
7. Technical point of contact (Program Manager or Principal Investigator) to include: salutation, last name, first name, street address, city, state, zip code, telephone, fax (if available), electronic mail (if available);
8. Administrative point of contact (Contracting Officer or Grant Officer) to include: salutation, last name, first name, street address, city, state, zip code, telephone, fax (if available), and electronic mail (if available);



9. Award instrument requested: cost-plus-fixed-fee (CPFF), cost-contract—no fee, cost sharing contract – no fee, or other type of procurement contract (*specify*), grant, cooperative agreement, or other transaction;
10. Place(s) and period(s) of performance;
11. Total proposed cost separated by basic award and option(s) (if any);
12. Name, address, and telephone number of the proposer’s cognizant Defense Contract Management Agency (DCMA) administration office (*if known*);
13. Name, address, and telephone number of the proposer’s cognizant Defense Contract Audit Agency (DCAA) audit office (*if known*);
14. Date proposal was prepared;
15. DUNS number (<http://www.dnb.com/get-a-duns-number.html>);
16. Taxpayer ID number (<https://www.irs.gov/Individuals/International-Taxpayers/Taxpayer-Identification-Numbers-TIN>);
17. CAGE code (<https://www.dlis.dla.mil/bincs/FAQ.aspx>);
18. Proposal validity period

**Note that nonconforming proposals may be rejected without review.**

**Proposers that do not have a Cost Accounting Standards (CAS) complaint accounting system considered adequate for determining accurate costs that are negotiating a cost-type procurement contract must complete an SF 1408.** For more information on CAS compliance, see <http://www.dcaa.mil/cas.html>. To facilitate this process, proposers should complete the SF 1408 found at <http://www.gsa.gov/portal/forms/download/115778> and submit the completed form with the proposal. To complete the form, check the boxes on the second page, then provide a narrative explanation of your accounting system to supplement the checklist on page one. For more information, see [http://www.dcaa.mil/preaward\\_accounting\\_system\\_adequacy\\_checklist.html](http://www.dcaa.mil/preaward_accounting_system_adequacy_checklist.html).

The Government strongly encourages that tables included in the cost proposal also be provided in an editable (e.g., MS Excel) format with calculation formulas intact to allow traceability of the cost proposal numbers across the prime and subcontractors.

The Government requires that the proposer provide a detailed cost breakdown to include:

- (1) Total program cost broken down by Phase I (Base) and Phase II (Option) in Contractor Fiscal Year to include:
  - i. Direct Labor – Including individual labor categories with associated labor hours and direct labor rates. If selected for award, be prepared to submit supporting documentation to justify labor rates. (i.e., screenshots of HR databases, comparison to NIH or other web-based salary database);
  - ii. Consultants – If consultants are to be used, proposer must provide a copy of the consultant’s proposed SOW as well as a signed consultant agreement or other document which verifies the proposed loaded daily / hourly rate, hours and any other proposed consultant costs (e.g., travel);

- iii. Indirect Costs – Including Fringe Benefits, Overhead, General and Administrative Expense, Cost of Money, Fee, etc. (must show base amount and rate), if available, provide current Forward Pricing Rate Agreement or Forward Pricing Rate Proposal. If not available, provide 2 years historical data to include pool and expense costs used to generate the rates. For academia, provide DHHS or ONR negotiated rate package or, if calculated by other than a rate, provide University documentation identifying G&A and fringe costs by position;
  - iv. Travel – Provide the purpose of the trip, number of trips, number of days per trip, departure and arrival destinations, number of people, estimated rental car and airfare costs, and prevailing per diem rates as determined by gsa.gov, etc.; Quotes must be supported by screenshots from travel websites;
  - v. Other Direct Costs – Itemized with costs including tuition remission, animal per diem rates, health insurance/fee; back-up documentation is to be submitted to support proposed costs;
  - vi. Equipment Purchases – Itemization with individual and total costs, including quantities, unit prices, proposed vendors (if known), and the basis of estimate (e.g., quotes, prior purchases, catalog price lists, etc.); any item that exceeds \$5,000 must be supported with back-up documentation such as a copy of catalog price lists or quotes prior to purchase (NOTE: For equipment purchases, include a letter stating why the proposer cannot provide the requested resources from its own funding), and;
  - vii. Materials – Itemization with costs, including quantities, unit prices, proposed vendors (if known), and the basis of estimate (e.g., quotes, prior purchases, catalog price lists, etc.); any item that exceeds \$5,000 must be supported with back-up documentation such as a copy of catalog price lists or quotes prior to purchase.
- (2) A summary of total program costs by major task;
  - (3) A summary of projected funding requirements by month;
  - (4) An itemization of any information technology (IT) purchase (including a letter stating why the proposer cannot provide the requested resources from its own funding), as defined in FAR Part 2.101;
  - (5) An itemization of Subcontracts. **All subcontractor cost proposal documentation must be prepared at the same level of detail as that required of the prime.** Subcontractor proposals should include Interdivisional Work Transfer Agreements (IWTA) or evidence of similar arrangements (an IWTA is an agreement between multiple divisions of the same organization);
  - (6) The source, nature, and amount of any industry cost-sharing. Where the effort consists of multiple portions which could reasonably be partitioned for purposes of funding, these should be identified as options with separate cost estimates for each;
  - (7) Identification of pricing assumptions of which may require incorporation into the resulting award instrument (e.g., use of Government Furnished Property/Facilities/Information, access to Government Subject Matter Expert/s, etc.);
  - (8) Any Forward Pricing Rate Agreement, DHHS rate agreement, other such approved rate information, or such documentation that may assist in expediting negotiations (if available); and
  - (9) Proposers with a Government acceptable accounting system who are proposing a cost-type contract must submit the DCAA document approving the cost accounting system.

**4.2.3. Additional Proposal Information**

**Proprietary Markings**

Proposers are responsible for clearly identifying proprietary information. Submissions containing proprietary information must have the cover page and each page containing such information clearly marked with a label such as “Proprietary” or “Company Proprietary.”

NOTE: “Confidential” is a classification marking used to control the dissemination of U.S. Government National Security Information as dictated in Executive Order 13526 and should not be used to identify proprietary business information.

**Unclassified Submissions**

DARPA anticipates that submissions received under this BAA will be unclassified. However, should a proposer wish to submit classified information, an *unclassified* email must be sent to the BAA mailbox requesting submission instructions from the Technical Office PSO. If a determination is made that the award instrument may result in access to classified information, a SCG and/or DD Form 254 will be issued by DARPA and attached as part of the award.

**Human Research Subjects/Animal Use**

Proposers that anticipate involving Human Research Subjects or Animal Use must comply with the approval procedures detailed at <http://www.darpa.mil/work-with-us/additional-baa>.

**Small Business Subcontracting Plan**

Pursuant to Section 8(d) of the Small Business Act (15 U.S.C. § 637(d)) and FAR 19.702(a)(1), each proposer who submits a contract proposal and includes subcontractors might be required to submit a subcontracting plan with their proposal. The plan format is outlined in FAR 19.704.

**Section 508 of the Rehabilitation Act (29 U.S.C. § 749d)/FAR 39.2**

All electronic and information technology acquired or created through this BAA must satisfy the accessibility requirements of Section 508 of the Rehabilitation Act (29 U.S.C. § 749d)/FAR 39.2.

**Intellectual Property**

All proposers must provide a good faith representation that the proposer either owns or possesses the appropriate licensing rights to all intellectual property that will be utilized under the proposed effort.

**For Procurement Contracts**

Proposers responding to this BAA requesting procurement contracts will need to complete the certifications at DFARS 252.227-7017. See <http://www.darpa.mil/work-with-us/additional-baa> for further information. If no restrictions are intended, the proposer should state “NONE.”

The table below captures the requested information:

Technical Data	Summary of	Basis for	Asserted Rights	Name of Person
----------------	------------	-----------	-----------------	----------------

Computer Software To be Furnished With Restrictions	Intended Use in the Conduct of the Research	Assertion	Category	Asserting Restrictions
(LIST)	(NARRATIVE)	(LIST)	(LIST)	(LIST)

For All Non-Procurement Contracts

Proposers responding to this BAA requesting a Grant, Cooperative Agreement, Technology Investment Agreement, or Other Transaction for Prototypes shall follow the applicable rules and regulations governing these various award instruments, but, in all cases, should appropriately identify any potential restrictions on the Government’s use of any Intellectual Property contemplated under the award instrument in question. This includes both Noncommercial Items and Commercial Items. Proposers are encouraged to use a format similar to that described in the section above. If no restrictions are intended, then the proposer should state “NONE.”

**System for Award Management (SAM) and Universal Identifier Requirements**

All proposers must be registered in SAM unless exempt per FAR 4.1102. FAR 52.204-7, “System for Award Management” and FAR 52.204-13, “System for Award Management Maintenance” are incorporated into this BAA. See <http://www.darpa.mil/work-with-us/additional-baa> for further information.

**4.2.4. Submission Information**

DARPA will acknowledge receipt of all submissions and assign an identifying control number that should be used in all further correspondence regarding the submission. DARPA intends to use electronic mail correspondence regarding HR001118S0017. Submissions may not be submitted by fax or e-mail; any so sent will be disregarded.

Submissions will not be returned. An electronic copy of each submission received will be retained at DARPA and all other non-required copies destroyed. A certification of destruction may be requested, provided the formal request is received by DARPA within 5 days after notification that a proposal was not selected.

For (abstract and) proposal submission dates, see Part I., Overview Information. Submissions received after these dates and times may not be reviewed.

**For Proposers Submitting Proposal Abstracts or Full Proposals as Hard Copies/On CD-ROM:**

Proposers must submit an original hardcopy and one (1) electronic copy of the abstract or proposal in PDF (preferred) on a CD-ROM to the mailing address listed in Part I. Each copy must be clearly labeled with HR001118S0017, proposer organization, technical point of contact, and proposal title (short title recommended).

Please note that submitters via hardcopy/CD-ROM will still need to visit <https://baa.darpa.mil> to register their organization concurrently to ensure the BAA office can verify and finalize their submission.

**For Proposers Submitting Proposal Abstracts or Full Proposals Requesting Procurement Contracts or OTs through DARPA’s BAA Submission Portal:**

Abstracts and Full Proposals sent in response to HR001118S0017 may be submitted via DARPA’s BAA Website (<https://baa.darpa.mil>). Visit the website to complete the two-step registration process. Submitters will need to register for an Extranet account (via the form at the URL listed above) and wait for two separate e-mails containing a username and temporary password. After accessing the Extranet, submitters may then create an account for the DARPA BAA website (via the “Register your Organization” link along the left side of the homepage), view submission instructions, and upload/finalize the abstract. Proposers using the DARPA BAA Website may encounter heavy traffic on the submission deadline date; it is highly advised that submission process be started as early as possible.

All unclassified concepts submitted electronically through DARPA’s BAA Website must be uploaded as zip files (.zip or .zipx extension). The final zip file should be no greater than 50 MB in size. Only one zip file will be accepted per submission. Classified submissions and proposals requesting assistance instruments (grants or cooperative agreements) should NOT be submitted through DARPA’s BAA Website (<https://baa.darpa.mil>), though proposers will likely still need to visit <https://baa.darpa.mil> to register their organization (or verify an existing registration) to ensure the BAA office can verify and finalize their submission.

Technical support for BAA Website may be reached at [BAAT\\_Support@darpa.mil](mailto:BAAT_Support@darpa.mil), and is typically available during regular business hours, (9:00 AM- 5:00 PM EST Monday – Friday).

Proposers using the DARPA BAA Website may encounter heavy traffic on the submission deadline date; it is highly advised that submission process be started as early as possible.

**For Full Proposals Requesting Cooperative Agreements:**

Proposers requesting cooperative agreements may submit proposals through one of the following methods: (1) hard copy mailed directly to DARPA; or (2) electronic upload per the instructions at <http://www.grants.gov/applicants/apply-for-grants.html>. Cooperative agreement proposals may not be submitted through any other means. If proposers intend to use Grants.gov as their means of submission, then they must submit their entire proposal through Grants.gov; applications cannot be submitted in part to Grants.gov and in part as a hard-copy. Proposers using the Grants.gov do not submit paper proposals in addition to the Grants.gov electronic submission.

Grants.gov Submissions: Grants.gov requires proposers to complete a one-time registration process before a proposal can be electronically submitted. First time registration can take between three business days and four weeks. For more information about registering for Grants.gov, see <http://www.darpa.mil/work-with-us/additional-baa>.

Hard-copy Submissions: Proposers electing to submit grant or cooperative agreement proposals as hard copies must complete the SF 424 R&R form (Application for Federal Assistance,) available on the Grants.gov website

[http://aapply07.grants.gov/apply/forms/sample/RR\\_SF424\\_2\\_0-V2.0.pdf](http://aapply07.grants.gov/apply/forms/sample/RR_SF424_2_0-V2.0.pdf).

Failure to comply with the submission procedures may result in the submission not being evaluated. DARPA will acknowledge receipt of complete submissions via email and assign control numbers that should be used in all further correspondence regarding proposals.

#### **4.2.5. Disclosure of Information and Compliance with Safeguarding Covered Defense Information Controls**

The following provisions and clause apply to all solicitations and contracts; however, the definition of “controlled technical information” clearly exempts work considered fundamental research and therefore, even though included in the contract, will not apply if the work is fundamental research.

DFARS 252.204-7000, “Disclosure of Information”

DFARS 252.204-7008, “Compliance with Safeguarding Covered Defense Information Controls”

DFARS 252.204-7012, “Safeguarding Covered Defense Information and Cyber Incident Reporting”

The full text of the above solicitation provision and contract clauses can be found at

<http://www.darpa.mil/work-with-us/additional-baa#NPRPAC>.

Compliance with the above requirements includes the mandate for proposers to implement the security requirements specified by National Institute of Standards and Technology (NIST) Special Publication (SP) 800-171, “Protecting Controlled Unclassified Information in Nonfederal Information Systems and Organizations” (see <https://doi.org/10.6028/NIST.SP.800-171r1>) that are in effect at the time the BAA is issued, or as authorized by the Contracting Officer, not later than December 31, 2017.

For awards where the work is considered fundamental research, the contractor will not have to implement the aforementioned requirements and safeguards; however, should the nature of the work change during performance of the award, work not considered fundamental research will be subject to these requirements.

### **4.3. FUNDING RESTRICTIONS**

Not Applicable.

### **4.4. OTHER SUBMISSION REQUIREMENTS**

Not Applicable.

## **5. Application Review Information**

### **5.1. EVALUATION CRITERIA**

Proposals will be evaluated using the following criteria, listed in descending order of importance: 5.1.1 Overall Scientific and Technical Merit; 5.1.2 Potential Contribution and Relevance to the DARPA Mission; and 5.1.3 Cost Realism.

#### **5.1.1. Overall Scientific and Technical Merit**

The proposed technical approach is innovative, feasible, achievable, and complete.

Task descriptions and associated technical elements provided are complete and in a logical sequence with all proposed deliverables clearly defined such that a final outcome that achieves the goal can be expected as a result of award. The proposal identifies major technical risks and planned mitigation efforts are clearly defined and feasible. The proposed PREEMPT Risk Mitigation Plan effectively provides the following: an assessment of potential risks; proposed guidelines to ensure maximal biosafety and biosecurity; a risk management plan for responsible communications; and a plan to address how input from the Government and community stakeholders will be considered regarding communication and publication of potentially sensitive dual-use information.

#### **5.1.2. Potential Contribution and Relevance to the DARPA Mission**

The potential contributions of the proposed effort are relevant to the national technology base. Specifically, DARPA's mission is to make pivotal early technology investments that create or prevent strategic surprise for U.S. National Security.

The proposer clearly demonstrates its capability to transition the technology to the research, industrial, and/or operational military communities in such a way as to enhance U.S. defense. In addition, the evaluation will take into consideration the extent to which the proposed intellectual property (IP) rights will potentially impact the Government's ability to transition the technology.

#### **5.1.3. Cost Realism**

The proposed costs are realistic for the technical and management approach and accurately reflect the technical goals and objectives of the solicitation. The proposed costs are consistent with the proposer's Statement of Work and reflect a sufficient understanding of the costs and level of effort needed to successfully accomplish the proposed technical approach. The costs for the prime proposer and proposed subawardees are substantiated by the details provided in the proposal (e.g., the type and number of labor hours proposed per task, the types and quantities of materials, equipment and fabrication costs, travel and any other applicable costs and the basis for the estimates).

It is expected that the effort will leverage all available relevant prior research in order to obtain the maximum benefit from the available funding. For efforts with a likelihood of commercial application, appropriate direct cost sharing may be a positive factor in the evaluation. DARPA recognizes that undue emphasis on cost may motivate proposers to offer low-risk ideas with minimum uncertainty and to staff the effort with junior personnel in order to be in a more competitive posture. DARPA discourages such cost strategies.

## **5.2. REVIEW OF PROPOSALS**

## **Review Process**

It is the policy of DARPA to ensure impartial, equitable, comprehensive proposal evaluations based on the evaluation criteria listed in Section V.A. and to select the source (or sources) whose offer meets the Government's technical, policy, and programmatic goals.

DARPA will conduct a scientific/technical review of each conforming proposal. Conforming proposals comply with all requirements detailed in this BAA; proposals that fail to do so may be deemed non-conforming and may be removed from consideration. Proposals will not be evaluated against each other since they are not submitted in accordance with a common work statement. DARPA's intent is to review proposals as soon as possible after they arrive; however, proposals may be reviewed periodically for administrative reasons

Award(s) will be made to proposers whose proposals are determined to be the most advantageous to the Government, consistent with instructions and evaluation criteria specified in the BAA herein, and availability of funding.

## **Handling of Source Selection Information**

DARPA policy is to treat all submissions as source selection information (see FAR 2.101 and 3.104), and to disclose their contents only for the purpose of evaluation. Restrictive notices notwithstanding, during the evaluation process, submissions may be handled by support contractors for administrative purposes and/or to assist with technical evaluation. All DARPA support contractors performing this role are expressly prohibited from performing DARPA-sponsored technical research and are bound by appropriate nondisclosure agreements. Subject to the restrictions set forth in FAR 37.203(d), input on technical aspects of the proposals may be solicited by DARPA from non-Government consultants/experts who are strictly bound by the appropriate non-disclosure requirements.

## **Federal Awardee Performance and Integrity Information (FAPIS)**

Per 41 U.S.C. 2313, as implemented by FAR 9.103 and 2 CFR § 200.205, prior to making an award above the simplified acquisition threshold, DARPA is required to review and consider any information available through the designated integrity and performance system (currently FAPIS). Awardees have the opportunity to comment on any information about themselves entered in the database, and DARPA will consider any comments, along with other information in FAPIS or other systems prior to making an award.

## **6. Award Administration Information**

### **6.1. SELECTION NOTICES**

As soon as the evaluation of a proposal is complete, the proposers will be notified that 1) the proposal has been selected for funding pending contract negotiations, or 2) the proposal has not been selected. These official notifications will be sent via email to the Technical POC identified on the proposal coversheet.



### **6.1.1. Proposal Abstracts**

DARPA will respond to abstracts with a statement as to whether DARPA is interested in the idea. If DARPA does not recommend the proposer submit a full proposal, DARPA will provide feedback to the proposer regarding the rationale for this decision. Regardless of DARPA's response to an abstract, proposers may submit a full proposal. DARPA will review all full proposals submitted using the published evaluation criteria and without regard to any comments resulting from the review of an abstract.

### **6.1.2. Full Proposals**

As soon as the evaluation of a proposal is complete, the proposer will be notified that (1) the proposal has been selected for funding pending award negotiations, in whole or in part, or (2) the proposal has not been selected. These official notifications will be sent via e-mail to the Technical POC and/or Administrative POC identified on the proposal coversheet.

## **6.2. ADMINISTRATIVE AND POLICY REQUIREMENTS**

### **6.2.1. Meeting and Travel Requirements**

There will be a program kickoff meeting in the Arlington, VA vicinity and all key participants are required to attend. Performers should also anticipate regular program-wide PI meetings and periodic site visits at the Program Manager's discretion to the Arlington, VA vicinity. Proposers shall include within the content of their proposal details and costs of any travel or meetings they deem to be necessary throughout the course of the effort, to include periodic status reviews by the government.

### **6.2.1. FAR and DFARS Clauses**

Solicitation clauses in the FAR and DFARS relevant to procurement contracts and FAR and DFARS clauses that may be included in any resultant procurement contracts are incorporated herein and can be found at <http://www.darpa.mil/work-with-us/additional-baa>.

### **6.2.2. Controlled Unclassified Information (CUI) on Non-DoD Information Systems**

Further information on Controlled Unclassified Information on Non-DoD Information Systems is incorporated herein can be found at <http://www.darpa.mil/work-with-us/additional-baa>.

### **6.2.3. Representations and Certifications**

If a procurement contract is contemplated, prospective awardees will need to be registered in the SAM database prior to award and complete electronic annual representations and certifications consistent with FAR guidance at 4.1102 and 4.1201; the representations and certifications can be found at [www.sam.gov](http://www.sam.gov). Supplementary representations and certifications can be found at <http://www.darpa.mil/work-with-us/additional-baa>.

#### **6.2.4. Terms and Conditions**

A link to the DoD General Research Terms and Conditions for Grants and Cooperative Agreements and supplemental agency terms and conditions can be found at <http://www.darpa.mil/work-with-us/contract-management#GrantsCooperativeAgreements>.

### **6.3. REPORTING**

The number and types of reports will be specified in the award document, but will include as a minimum monthly financial status reports and quarterly technical status reports. The reports shall be prepared and submitted in accordance with the procedures contained in the award document and mutually agreed on before award. Reports and briefing material will also be required as appropriate to document progress in accomplishing program metrics. A Final Report that summarizes the project and tasks will be required at the conclusion of the performance period for the award, notwithstanding the fact that the research may be continued under a follow-on vehicle.

### **6.4. ELECTRONIC SYSTEMS**

#### **6.4.1. Wide Area Work Flow (WAWF)**

Performers will be required to submit invoices for payment directly to <https://wawf.eb.mil>, unless an exception applies. Performers must register in WAWF prior to any award under this BAA.

#### **6.4.2. i-EDISON**

The award document for each proposal selected for funding will contain a mandatory requirement for patent reports and notifications to be submitted electronically through i-Edison (<http://public.era.nih.gov/iedison>).

## **7. Agency Contacts**

**Communication via e-mail is preferred.**

Points of Contact

The BAA Coordinator for this effort may be reached at:

[PREEMPT@darpa.mil](mailto:PREEMPT@darpa.mil)

DARPA/BTO

ATTN: HR001118S0017

675 North Randolph Street

Arlington, VA 22203-2114

For information concerning agency level protests see <http://www.darpa.mil/work-with-us/additional-baa#NPRPAC>.

## **8. Other Information**

DARPA will host a Proposers Day in support of the PREEMPT program on **January 30, 2018**, at the Executive Conference Center in Arlington, VA. The purpose is to provide potential

proposers with information on the PREEMPT program, promote additional discussion on this topic, address questions, provide a forum to present their capabilities, and to encourage team formation.

Interested proposers are not required to attend to respond to the PREEMPT BAA, and relevant information and materials discussed at Proposers Day will be made available to all potential proposers in the form of a FAQ posted on the DARPA Opportunities Page. The event will be webcast for those who would like to participate remotely.

DARPA will not provide cost reimbursement for interested proposers in attendance.

An online registration form and various other meeting details can be found at the registration website, <https://events.sa-meetings.com/PREEMPTProposersDay>.

To encourage team formation, interested proposers are encouraged to submit information to be shared with all potential proposers through the Proposers Day website and the DARPA Opportunities Page. This information may include contact information, relevant publications, and a slide or poster to summarize the proposer's interests.

Participants are required to register no later than **January 23, 2018**, for physical attendance, and **January 26, 2018**, for the webcast. This event is not open to the Press. The Proposers Day will be open to members of the public who have registered in advance for the event; **there will be no onsite registration**.

All foreign nationals, including permanent residents, must complete and submit a DARPA Form 60 "Foreign National Visit Request," which will be provided in the registration confirmation email.

Proposers Day Point of Contact: [DARPA-SN-18-18@darpa.mil](mailto:DARPA-SN-18-18@darpa.mil).

**9. Appendix 1 – Volume II checklist**

**Volume II, Cost Proposal  
Checklist and Sample Templates**

**The following checklist and sample templates are provided to assist the proposer in developing a complete and responsive cost volume. Full instructions appear in Section 4.2.2 beginning on Page 25 of HR001118S0017. This worksheet must be included with the coversheet of the Cost Proposal.**

1. Are all items from Section 4.2.2 (Volume II, Cost Proposal) of **HR001118S0017** included on your Cost Proposal cover sheet?

**YES**       **NO**      **Appears on Page(s)** [Type text]

If reply is “No”, please explain:

2. Does your Cost Proposal include (1) a summary cost buildup by Phase, (2) a summary cost buildup by Year, and (3) a detailed cost buildup of for each Phase that breaks out each task and shows the cost per month?

**YES**       **NO**      **Appears on Page(s)** [Type text]

If reply is “No”, please explain:

3. Does your cost proposal (detailed cost buildup #3 above in item 2) show a breakdown of the major cost items listed below:

Direct Labor (Labor Categories, Hours, Rates)

**YES**       **NO**      **Appears on Page(s)** [Type text]

Indirect Costs/Rates (i.e., overhead charges, fringe benefits, G&A)

**YES**       **NO**      **Appears on Page(s)** [Type text]

Materials and/or Equipment

**YES**       **NO**      **Appears on Page(s)** [Type text]

Subcontracts/Consultants

**YES**       **NO**      **Appears on Page(s)** [Type text]

Other Direct Costs

**YES**       **NO**      **Appears on Page(s)** [Type text]

Travel

**YES**       **NO**      **Appears on Page(s)** [Type text]

If reply is “No”, please explain:

4. Have you provided documentation for proposed costs related to travel, to include purpose of trips, departure and arrival destinations and sample airfare?

**YES**       **NO**      **Appears on Page(s)** [Type text]

If reply is “No”, please explain:

5. Does your cost proposal include a complete itemized list of all material and equipment items to be purchased (a priced bill-of-materials (BOM))?  
 YES       NO      **Appears on Page(s)** [Type text]

If reply is “No”, please explain:

6. Does your cost proposal include vendor quotes or written engineering estimates (basis of estimate) for all material and equipment with a unit price exceeding \$5000?  
 YES       NO      **Appears on Page(s)** [Type text]

If reply is “No”, please explain:

7. Does your cost proposal include a clear justification for the cost of labor (written labor basis-of-estimate (BOE)) providing rationale for the labor categories and hours proposed for each task?  
 YES       NO      **Appears on Page(s)** [Type text]

If reply is “No”, please explain:

8. Do you have subcontractors/consultants? If YES, continue to question 9. If NO, skip to question 13.  
 YES       NO      **Appears on Page(s)** [Type text]

9. Does your cost proposal include copies of all subcontractor/consultant technical (to include Statement of Work) and cost proposals?  
 YES       NO      **Appears on Page(s)** [Type text]

If reply is “No”, please explain:

10. Do all subcontract proposals include the required summary buildup, detailed cost buildup, and supporting documentation (SOW, Bill-of-Materials, Basis-of-Estimate, Vendor Quotes, etc.)?  
 YES       NO      **Appears on Page(s)** [Type text]

If reply is “No”, please explain:

11. Does your cost proposal include copies of consultant agreements, if available?  
 YES       NO      **Appears on Page(s)** [Type text]

If reply is “No”, please explain:

12. If requesting a FAR-based contract, does your cost proposal include a tech/cost analysis for all proposed subcontractors?  
 YES       NO      **Appears on Page(s)** [Type text]

If reply is “No”, please explain:

13. Have all team members (prime and subcontractors) who are considered a Federally Funded Research & Development Center (FFRDC), included documentation that clearly demonstrates work is not otherwise available from the private sector AND provided a letter on letterhead from the sponsoring organization citing the specific authority establishing their eligibility to propose to government solicitations and compete with industry, and compliance with the associated FFRDC sponsor agreement and terms and conditions.

**YES**       **NO**      **Appears on Page(s)** [Type text]

If reply is “No”, please explain:

14. Does your proposal include a response regarding Organizational Conflicts of Interest?

**YES**       **NO**      **Appears on Page(s)** [Type text]

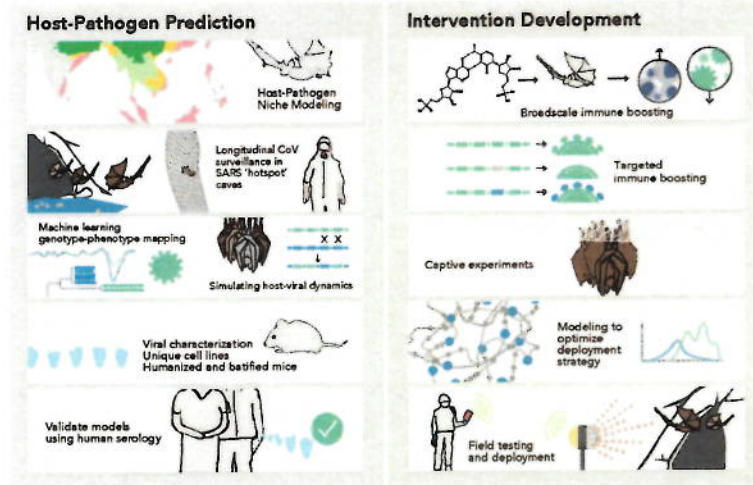
If reply is “No”, please explain:

15. Does your proposal include a completed Data Rights Assertions table/certification?

**YES**       **NO**      **Appears on Page(s)** [Type text]

If reply is “No”, please explain:

## CONCEPT



## APPROACH

### Host-Pathogen Prediction:

- **Integrated field sampling, viral characterization, modeling:** In-depth sampling of bat SARSr-CoVs in high-risk site of active spillover, Yunnan, China. Spatial models using bat and viral data to estimate SARSr-CoV jump potential across Asia. 'Spatial viral spillover risk' [Mobile App](#) of background viral jump risk across Asia.
- **Experimental assays to test QS<sub>0</sub> jump potential:** Sequence QS<sub>0</sub> spike protein similarity to high-risk SARSr-CoVs, model spike structure to assess ACE2 binding, then *in vitro* and ACE2 humanized mouse experiments. Use results to test machine-learning genotype-to-phenotype model predictions of viral spillover risk.
- **Genotype-phenotype models:** Models to estimate evolutionary/recombination rates, capacity to generate future QS capable of human infection, based on spike protein diversity, recombination frequency etc.
- **Validation with previously-collected human sera:** Use LIPS assays that target specific SARSr-CoV spikes to identify spillover of these strains in a high-risk population in Yunnan, China.

### Intervention Development:

- **(1) Broadscale immune boosting:** Inoculate bats with immune modulators to upregulate their naturally-inhibited innate immunity and suppress viral replication, transiently reducing viral shedding/spillover risk.
- **(2) Targeted immune boosting:** In concert with above, inoculate bats with novel chimeric polyvalent recombinant spike proteins to enhance their adaptive immune memory against specific, high-risk viruses.
- **Viral dynamics:** Develop stochastic simulation models to estimate the frequency, efficacy, and population coverage required for intervention approaches to effectively suppress the viral population.
- **Field trial:** Use team expertise in wildlife vaccine delivery (transdermal nanoparticles, raccoon poxvirus vector) to develop effective molecule delivery via automated aerosolization onto bats at roost entrance at our three test cave sites in a cave complex in Yunnan, China, where SARSr-CoVs have infected people.

## IMPACT

- Security concerns across Asia make the region a potential deployment site for US warfighters. Troops face increased disease risk from SARSr-CoVs, which are shed via urine and feces as bats forage at night.
- Our work in Yunnan, China shows that: 1) bat SARSr-CoVs exist that can infect human cells, produce SARS-like illness in humanized mice, and are not affected by monoclonal or vaccine treatment; and 2) bat SARSr-CoV host-jump into local human populations is frequent. These viruses are therefore a **clear and present danger to US defense forces in the region and global health security.**
- Our goal is to analyze, predict, then "DEFUSE" the spillover potential of novel bat-origin high-risk SARSr-CoVs in Southeast Asia and across these viruses distribution. This will safeguard the US warfighter, reduce risk for local communities and their livestock, improving food and global health security.
- Our strategy is based on immune parameters that are found across all bat taxonomic groups. If successful, the DEFUSE approach can be adapted to MERS-CoV in the Middle East, other SARSr-CoVs in Africa, and other high-impact bat-origin viruses (e.g. Hendra, Nipah, Ebola, Marburg viruses).

## CONTEXT

- No technology exists to reduce exposure to novel bat CoVs. No effective therapeutics or countermeasures for SARS-CoV, related CoVs, or other bat viruses (Ebola, Marburg, Nipah, Hendra etc).
- Our team has conducted pioneering research modeling disease emergence, understanding CoV virology, bat immunity, and wildlife vaccine delivery. Previous work provides proof-of-concept for: 1) predictive 'hotspot' modeling; 2) upregulating bat immune response through the STING IFN pathway; 3) recombinant chimeric spike-proteins from SARSr-CoVs; 4) molecule delivery to wildlife incl. bats.
- DEFUSE approach is based on immunological pattern found across bat families, therefore will be broadly effective, scalable, economical and achievable in the allotted time frame. It poses little environmental risk, and presents no threat to the warfighter, or non-target populations.
- Immune modulation is more likely to be effective than CRISPR-Cas9 gene drives because bats are relatively long-lived, highly mobile, and have long inter-generational periods (2-5 years) with low progeny (1-2 pups). Furthermore, gene drive technology could have negative ecological consequences and its effectiveness will be hard to evaluate within the defined Period of Performance.

	Phase I	Phase II	Total
Proposed	\$8,411,546	\$5,797,699	\$14,209,245

Human Use/  Animal Use

HR001118S0017 PREEMPT



# Pièce originale 5

## REJECTION OF DEFUSE PROJECT PROPOSAL

---

Proposal Title: DEFUSE - Defusing the Threat of Bat-borne Coronaviruses (2018)

Proposal Identifier: HR001118S0017-PREEMPT-FP-019

Amounts Requested by EcoHealth Alliance:

Phase I	\$8,411,546
Phase II	\$5,797,699
<b>Total:</b>	<b>\$14,209,245</b>

---

### RESULT

The DEFUSE proposed project by EHA was **rejected by DARPA**, although “*if funding became available*”, certain components of particular interest could have gone ahead, subject to a clear contractual Dual Use Research of Concern (DURC) risk mitigation plan that “*includes a responsible communications plan*”.

### REASONS FOR REJECTION

The Biological Technologies Office of DARPA reviewed the EcoHealth Alliance DEFUSE proposal and the Evaluation Reports and decided it was “**selectable**”. In doing so, two out of three reviewers considered the aim of preempting “zoonotic spillover through reduction of viral shedding in the bat caves” as of interest to DARPA. These reviewers assessed the EHA and Collaborators team and concluded that:

- They have plenty of prior experience.
- They have access to Yunnan caves where bats are infected with SARSr viruses.
- They have carried out past surveillance work
- They have developed geo-based risk maps of zoonotic hotspots
- Their proposed experimental work is logical and can validate molecular and evolutionary models.
- Their proposed preemption approaches can rapidly be validated using bat and "batenized" mouse models.

However, the Biological Technologies Office did not recommend it be funded **at that time** because significant weaknesses were identified:

1. The proposal is considered to potentially involve GoF/DURC research because they propose to synthesize spike glycoproteins which bind to human cell receptors and insert them into SARSr-CoV backbones to assess whether they can cause SARS-like disease.
2. However the proposal does not mention or assess potential risks of Gain of Function (GoF) research.
3. Nor does the proposal mention or assess Dual Use Research of Concern (DURC) issues, and thus fails to present a DURC risk mitigation plan.
4. The proposal hardly addresses or discusses ethical, legal, and social issues (ELSI).
5. The proposal fails to discuss problems with the proposed vaccine delivery systems caused by the known issues of variability in vaccine dosage.
6. The proposal did not provide sufficient information about how EHA would use any data obtained and how they would model development or perform any necessary statistical analysis.
7. The proposal did not explain clearly how EHA will take advantage of their previous work, nor how that previous work could be extended.
8. The proposal failed to clearly assess how it would deploy and validate the “TA2 preemption methods” in the wild. This refers to carrying out experiments with effective immune boosting molecules and delivery techniques via FEA aerosolization mechanism at one test and two control bat cave sites in Yunnan, China (PARC, EHA, WIV).
9. The proposal does not address concerns about these vaccines not being able to protect against the wide variety of coronaviruses in bat caves which are constantly evolving, due to insufficient epitope coverage.

---

*DRASTIC independently assesses that the tone of the proposal (see for instance the ‘our cave complex’) and the deep suggested involvement of some of the WIV parties (Shi Zheng Li employed half-time for 3 years - paid via the grant - and invited to DARPA headquarters at Arlington), may not have helped either - especially in the absence of any DURC risk mitigation program.*

*It is clear that the proposed DEFUSE project led by Peter Daszak could have put local communities at risk by failing to consider the following issues:*

- Gain of Function
- Dual Use Research of Concern
- Vaccine epitope coverage
- Regulatory requirements
- ELSI (ethical, legal, and social issues)
- Data Usage

END

## Piece originale 6

**From:** Fauci, Anthony (NIH/NIAID) [E]  
**Sent:** Wed, 25 Mar 2020 15:01:21 +0000  
**To:** DELFRAISSY Jean-francois  
**Cc:** (b) (6)  
**Subject:** RE: France situation COVID-19

Jean-Francois:

Thank you for your note. I do not see Yazdan copied on your e-mail, and I please forward this e-mail to him. The NIH position is that we should preferably make drugs available on randomized, controlled clinical trials and not freely distribute them. There is a strong push in the USA, favored by the President, to make certain of these drugs more widely available outside of an RCT using mechanisms such as "compassionate usage". In the USA, as you know, HC (plaquenil) is an approved drug for malaria as well as for certain autoimmune diseases such as SLE. Thus, physicians can prescribe the drug on an "off label" usage. This likely will be the major modality of distribution of this drug in the USA, at least for the foreseeable future.

I am copying Cliff Lane on this e-mail. Please include him on any further correspondence on this subject.

Best regards,

Tony

Anthony S. Fauci, MD  
Director  
National Institute of Allergy and Infectious Diseases  
Building 31, Room 7A-03  
31 Center Drive, MSC 2520  
National Institutes of Health  
Bethesda, MD 20892-2520  
Phone: (b) (6)  
FAX: (301) 496-4409  
E-mail: (b) (6)

The information in this e-mail and any of its attachments is confidential and may contain sensitive information. It should not be used by anyone who is not the original intended recipient. If you have received this e-mail in error please inform the sender and delete it from your mailbox or any other storage devices. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) shall not accept liability for any statements made that are the sender's own and not expressly made on behalf of the NIAID by one of its representatives.

---

**From:** DELFRAISSY Jean-francois (b) (6)>  
**Sent:** Wednesday, March 25, 2020 10:35 AM  
**To:** Fauci, Anthony (NIH/NIAID) [E] (b) (6)>  
**Cc:** DELFRAISSY Jean-francois (b) (6)>  
**Subject:** France situation COVID-19

Hello,

I am once again in service since the global sanitary crisis COVID-19 hit France a couple of weeks ago. I am now leading the Scientific Council for COVID-19, composed of 10 persons, serving the French President , Emmanuel Macron.

The Council was created on March the 10th and we were heavily involved in advisory activities in relation to the President's decision to put the generalized quarantine into force, because we didn't have any better choice.

Firstly

We have a limited number of diagnosis tests, this prevents us from taking up a Korean-like strategy within the next few days. However, by the end of the quarantine (within the following six weeks), we will be able to have a generalisation of the diagnosis test and develop korean-like apps, as well as a strategy for testing and treatment if we have any drugs available by this time. Before this, we will go through a difficult phase in the following weeks, because we won't have enough beds in our care units in some part of France ...

Secondly

On the therapeutic level, Yazdan Yazdanpanah has taken my place and who is now leading REACTing.

Tomorrow morning a french-european medical trial will begin, under the control of the WHO, with 5 arms (placebo/kalatra/kalatra +interferon béta / product of Guilead / hydroxychloroquine alone or in combination for next week).

As you may know, we are currently facing a press buzz since the announcement made by Dr. Raoult about the effectiveness of hydroxy-chloroquine. His data is not particularly convincing. We can distinguish a slight positive signal but it must be confirmed by a well made randomised trial. We also started a monkey-model study with HC and we should have the results by the end of next week. Also a cohort of severe COVID+ patients have been created and some will be treated with HC : we will analyse those results with all the consciousness needed. It will also be possible to do a prevention trial for healthcare

professionals and aging people with HC. I have an enormous political pressure to release HC and to give it to everyone but I am currently resisting...

How is the situation in the USA, especially after Trump's announcement ? What is the NIH position ? What will be put into force ?

Thanks for your answer.

I put Yazdan Yazdanpanah in a copy of this email.

Best regard

**Pr. Jean-François Delfraissy**

Président | *President*

Comité consultatif national d'éthique pour les sciences de la vie et de la santé

*National Ethical Consultative Committee for life sciences and health*

Ancien Directeur de l'ANRS | *ANRS former Director*

M [REDACTED] (b) (6)

T [REDACTED] (b) (6)

## Pièce originale 7

*Madison Cawthorn*  
11<sup>th</sup> District of North Carolina



*Congress of the United States*  
House of Representatives

January 12, 2022

The Honorable Lloyd Austin  
Secretary of Defense  
1000 Defense, The Pentagon  
Washington, D.C. 20301

The Honorable Xavier Becerra  
Secretary of Health and Human Services  
200 Independence Avenue, SW  
Washington, D.C. 20024

Rochelle Walensky, M.D.  
Director, Centers for Disease Control and Prevention  
395 E Street SW  
Washington, D.C. 20201

Dear Secretary Austin, Director Walensky, and Secretary Becerra:

On January 20<sup>th</sup>, 2020, the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) confirmed the first case of COVID-19 in the United States from samples taken on January 18<sup>th</sup> in the state of Washington,<sup>1</sup> but for many of us, the pandemic truly started with “two weeks to stop the spread” announced on March 16<sup>th</sup>, 2020. Since then, Americans have endured lockdowns, the looming specter of infection and illness, and unprecedented medical mandates.

Now, nearly two years later, the question remains: What is the true origin of the Coronavirus, also known as SARS-CoV-2?

For the most part, our legacy media has not been much help, willfully neglecting to investigate the improbable claims of Chinese Communist Party (CCP) propagandists and mindlessly repeating bureaucratic talking points. Too often, our media uses headlines to sensationalize the mundane, allowing the pursuit of ratings to obscure the significant.

Media coverage of U.S. Senator Rand Paul’s intense questioning of Dr. Fauci stands as a classic example. The media portrayed this as mere interpersonal political conflict—irascible senator versus put-upon public servant.

---

1

<https://www.cdc.gov/museum/timeline/covid19.html#:~:text=January%2020%2C%202020%20CDC,18%20in%20Washington%20state.>

But there is much more to this story. Senator Paul's questions, countered by Dr. Fauci's smug, egocentric, and obfuscatory responses, illuminated an issue that—if proven true—will be remembered as one of the biggest scandals in American history. Namely, whether the United States had—through its official medical apparatus—contributed to the creation of the Coronavirus by CCP scientists in the Wuhan Institute of Virology.

Recently, new information has come to light, detailing just how this may have occurred and by what methods a cover-up may have evolved. These documents appear to substantiate not only Senator Paul's—and others'—critiques of Dr. Fauci, but also the cloud of suspicion that the frankly unbelievable bureaucratic answers to simple questions have generated over the last two years. Based on the evidence presented by leaked official documents, we demand answers to the following questions:

1. Was the DARPA report referenced in Project Veritas' video of January 10<sup>th</sup>, 2022, actually "hidden in a top-secret share drive," and if so, why?
2. What is the DARPA protocol for determining whether a report should be classified or unclassified? Further, who at DARPA is responsible for withholding release the original report detailing the issues with the proposed Ecohealth Alliance project?
3. If the inclusion of this report in a top-secret folder was a mistake, what is the DARPA protocol for ensuring that this type of mistake does not recur?
4. Did Dr. Fauci and/or NIAID fund Project DEFUSE at facilities in Wuhan and in the U.S. (as alleged by Major Joseph Murphy in a report to the Inspector General), even after DARPA rejected the idea because it came too close to violating regulations against gain of function research? Further, what facilities in the U.S. also participated in this research?
5. Millions of Americans suffered as curatives were hidden for unknown reasons. To what extent, if any, was there any attempt to suppress potential curatives identified in Major Murphy's report?
6. What is the extent of Ecohealth Alliance's collaboration with Wuhan Institute of Virology in the creation of SARS-CoV-2?
7. Did the NIH, NIAID, and/or Ecohealth Alliance change the definition of gain-of-function research with an eye to bypass the moratorium on gain-of-function research?
8. Do Dr. Fauci, NIH, and/or NIAID recognize the danger that "nebulous" definitions of gain-of-function research pose to international health?
9. Was Dr. Fauci party to or co-conspirator with any effort to mislead the American public? Was he aware of NIH funding of gain-of-function research and the true origins of the Coronavirus?

Answers to these questions are necessary to assign responsibility for a pandemic that has stolen the lives of many, deprived millions of schoolchildren of their education, and bankrupted small businesses. In our system of government, based on popular representation, honest answers are a must, forming the basis for accountability and preparation for other crises that may arise. In our capacity as members of the U.S. House of Representatives, we demand answers to restore faith in our institutions and organs of government, faith that has been tested by continued dissembling from those in charge. With honest, fact-based answers, we may collectively turn the page on this chapter of history and move forward. As Thomas Jefferson said, "honesty is the first chapter in the book of wisdom."

We look forward to your forthright, thorough, and timely response.



Madison Cawthorn  
Member of Congress



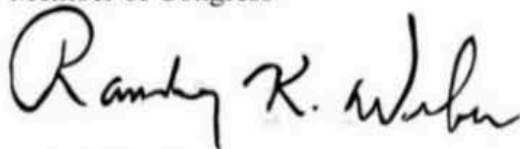
Bill Posey  
Member of Congress



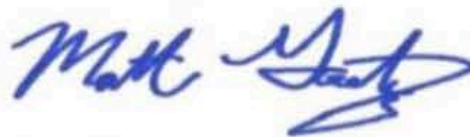
Diana Harshbarger  
Member of Congress



Lisa McClain  
Member of Congress



Randy Weber  
Member of Congress



Matt Gaetz  
Member of Congress